

伝染性造血器壞死症（IHN）に関する研究－II

大型魚由来IHNV分離株のアマゴに対する病原性

中居 裕

Studies on Infectious Hematopoietic Necrosis (IHN) - II

Virulence of IHN Virus Strains from Large Sized Salmonid Fishes to Amago salmon, *Oncorhynchus masou ishikawae*

Yutaka NAKAI

養殖サケ科魚類の病害のうち伝染性造血器壞死症（以下IHN）の被害は最も大きいものの一つである。IHNは国内での発生当初（1974～77年）は仔稚魚にのみ発生する^{1・2)}とされていた。しかし、岐阜県では1977年に200 g のアマゴでIHN の発生^{3・4)}が見られたのを初めとして、現在では岐阜県全域のニジマス・アマゴで従来よりかなり大型の魚でIHN が見られるようになった。なおこの状況は全国に広がっている⁵⁾。

IHN は発症後の対策がないため予防面に力が注がれている。その方策としてヨード剤による発眼卵消毒、飼育水の紫外線殺菌及び隔離飼育施設内の化学的消毒があげられ、仔稚魚期の発症防止に効果をあげている。しかし実際上隔離飼育の難しい稚魚期以降の防疫対策の実施は困難であるため、大きな問題となりつつある。

本研究では本症対策の基礎資料を得ることを目的とした。すなわち、ニジマス・アマゴ・ヤマメ大型魚から分離された株を用いて、アマゴ稚魚および成魚に対する病原性と感染耐過の影響を検討し、従来のIHN との比較を行なった。なお本研究は（社）日本水産資源保護協会委託事業「平成3～4、8～9年度魚病対策技術開発研究」の一部として実施した。

方 法

実験1 前代以前にIHNVに感染履歴のあるアマゴとそうでないアマゴに対する大型魚由来IHNVの病原性の検討

1 供試ウイルス

感染実験には以下のGHV7701、89-24-12、H-40-1、HV7601の4株を使用した。

GHV7701株は1977年4月、当場で飼育中のアマゴ200 g より分離^{3・4)}されたものである（TCID₅₀法によるクローニング済み）。

89-24-12株は1989年4月、当県の民間養魚場で飼育中のニジマス500 g より分離されたもの（IHN発症魚）

である（TCID₅₀法によるクローニング済み）

H-40-1株は1990年4月、当場で飼育中のヤマメ297.2 g より分離されたである。クローニングは行なっていない。

HV7601株は1976年、長野県で発生したニジマス稚魚より分離されたもので、1987年長野県水産試験場より分与された。IHNV国内標準株として使用した。

供試ウイルスはKAMEI et al⁶⁾の作製したモノクローナル抗体（抗IHN Virus[以下IHNV] 3種 [5HG-1、6H G-27、6HM-7] • 抗 Infectious Pancreatic Necrosis Virus[IPNV] 2種 [4PG-3N、4PG-4] • 抗Hirame Rhabdovirus[HRV] 2種 [4HRG-6、4HRG-10]）を用いたImmunoperoxidase法⁷⁾により同定を行い、IHNVであることを確認した。

2 供試ウイルス調製法

EPC 細胞を150cm²プラスチックフラスコで20℃で24時間培養した。その後供試ウイルスを M.O.I=10²~10³ TCID₅₀/cellとなるように接種し、15℃で培養した。5~7日後、CPEが全体の80%以上になったとき、-80℃で凍結した。その後、急速解凍し遠心沈澱処理(4℃)により細胞残滓を取り除き-80℃で保存した。ウイルス力値はEPC 細胞を用いてTCID⁵⁰法により測定した。

3 供試魚

アマゴを用いた。前代以前にIHNVに感染履歴のあるアマゴは、当場で累代飼育されている0.3 g のものを各区200尾供試した。前代以前にIHNVに感染履歴のないアマゴは、当県の民間養魚場で累代飼育されている1.0 g のものを各区150尾供試した。なお供試魚は当場より1968年頃導入したものの子孫である。同養魚場は実験開始時までIHN未発生であった。

4 感染方法

飼育水10 ℥に10⁵TCID₅₀/mℓとなるようにウイルス原液を混合し、通気しながら1時間浸漬した。対照区は飼育水のみを同様に処理した。

5 感染後の飼育方法

水質保持と曝気を兼ねて上部濾過器を設置した20 ℥プラスチック水槽(実容18 ℥)に供試魚を収容した。

飼育用水には水道水を活性炭カートリッジを用いて脱塩素したもの用い、注水量は200 ℥/分とした。

実験期間中は配合飼料少量を適宜給餌した。

水温は12℃±1に設定した。水温を保持するため二重水槽とし、外側の水槽に循環式冷却装置と投げ込み式ヒーターを用いて調節した。

6 観察項目

斃死魚は毎日取り上げ、斃死数・症状等を記録し、-20℃で保存した。その一部はプールサンプルとしてウイルス分離を行なった。対照区に斃死のあった場合は個体別に実施した。観察期間は21日(0.3 g)、31日(1.0 g)とした。

実験2 体重の異なるアマゴに対する大型魚由来IHN Vの病原性の検討

1 供試ウイルス

感染実験には以下のGHV7701、89-24-12、75-51、A-88-4-9、HV7601の5株を使用した。

GHV7701、89-24-12、HV7601株は実験1と同じである。

75-51株は1975年に岐阜県のアマゴ稚魚(0.8 g)から分離されたものである(TCID₅₀法によるクローニング

済み)。

A-88-4-9株は当県で1988年にアマゴ雌親魚の体腔液から分離されたものである(TCID₅₀法によるクローニング済み)。

なお、75-51株とA-88-4-9株は抗血清(日本水産資源保護協会配布)を用いた定量的中和試験により同定した。

2 供試ウイルス調製法

実験1と同じである。

3 供試魚

アマゴ(0.9 g)は長野県民間養魚場のもので、長野県水産試験場で飼育されたもの0.9 gのものを各区50尾供試した。なお、この養魚場はIHN未発生である。

アマゴ(20 g)はアマゴ(0.9 g)と同じ養魚場のもので、長野県水産試験場木曽試験地で飼育されたもの20 gを各区25尾供試した。

アマゴ(30 g)はアマゴ(20 g)と同群のもの30 gを各区25尾供試した。

4 感染方法および飼育方法

アマゴ(0.9 g)は10⁵および10⁶TCID₅₀/mℓに調製した500mℓのウイルス液と供試魚をビニール袋に入れ、直ちに酸素を詰め、ウイルス液を約12℃に保ち1時間浸漬した。対照区はMEM-2溶液のみを添加した。感染終了後、1 ℥プラスチックビーカー(実容0.7 ℥)に25尾ずつ2水槽に収容し、毎分64mℓの用水(水道水を活性炭カートリッジを用いて脱塩素したもの)を通水し、飼育した。

アマゴ(20 g)はウイルス液が3 ℥とした以外はアマゴ(0.9 g)と同じ方法である。感染終了後、20 ℥プラスチックビーカー(実容18 ℥)に25尾ずつ収容し、毎分約200mℓの用水(水道水を活性炭カートリッジを用いて脱塩素したもの)を通水し、飼育した。

アマゴ(30 g)の場合、通気しながら2-phenoxyethanol 50ppmで麻酔⁸⁾した後、1尾当たり10⁵および10⁶ TCID₅₀/mℓに調製したウイルス液0.05mℓを腹部から腹腔内に接種した。対照区にはMEM-2溶液0.05mℓを接種した。感染終了後はアマゴ(20 g)と同じ条件で飼育した。

各アマゴとも、飼育期間中は配合飼料少量を適宜給餌した。

水温は実験1と同じ方法で調節した。

5 観察項目

斃死魚は毎日取り上げ、斃死数・症状等を記録し、-20℃で保存した。その一部(アマゴ0.9 g)または全部(アマゴ20・30 g)を個体別にウイルス分離を行なった。観察期間は21日とした。

結 果

実験1の結果を第1表に示した。累積斃死率は89-24-12株(1.0 g)の67.3%が最高であった。0.3 gと1.0 gにおける累積斃死率の高低は株により異なった。各区の斃死魚の一部をウイルス分離した結果、いずれの区からもウイルスが分離され、CPEの形態からすべてIHNVと判断した。また、斃死魚の症状は鰓の退色、肝臓の退色、

腎臓・脾臓の肥大等、IHNの定型的症状が観察された。なお、対照区もわずかな斃死が認められたが、ウイルス分離をしたところウイルスは分離されず、IHNによる斃死ではないと判断した。

実験2の結果を第2~4表に示した。0.9 gでは89-24-12株(10^6)の61%が最高の累積斃死率であった。20 gでは89-24-12株(10^6)、A-88-4-9株の8%、30 gではA-88-4-9株(10^6)の16%が最高の累積斃死率であった。0.9 g

第1表 岐阜県水産試験場産アマゴのIHNV 4株に対する感受性(攻撃濃度: 10^5 TCID₅₀/ml)

	HV7601		89-24-12		H-40-1		GHV7701		対照区	
	0.3 g	1.0 g	0.3 g	1.0 g	0.3 g	1.0 g	0.3 g	1.0 g	0.3 g	1.0 g
平均体重(g)	0.3	1.0	0.3	1.0	0.3	1.0	0.3	1.0	0.3	1.0
供試尾数	198	152	206	150	201	148	200	152	199	149
累積斃死尾数	15	12	106	101	111	73	113	29	7	1
累積斃死率(%)	7.6	7.9	51.5	67.3	55.2	49.3	56.5	19.1	3.5	0.7
ウイルス分離	+	+	+	+	+	+	+	+	0/7	0/1

観察期間: 21日(耐過) 31日(非耐過) ウィルス分離: (陽性: プールサンプル) IHNV陽性尾数/検査尾数

第2表 長野県産アマゴ(0.9 g)のIHNV 5株に対する感受性

分離株	HV7601		89-24-12		A-88-4-9		75-51		GHV7701		対照区
	10 ⁵	10 ⁶									
供試尾数	50	49	51	46	40	25	49	52	50	50	
累積斃死尾数	7	4	15	28	11	15	14	18	18	5	
累積斃死率(%)	14	8	29	61	28	60	28	34	36	10	
ウイルス分離	2/7	1/4	4/6	4/7	5/6	3/6	3/7	6/6	5/6	0/5	

観察期間: 22日 ウィルス分離: IHNV陽性尾数/検査尾数

第3表 長野県産アマゴ(20.0 g)のIHNV 5株に対する感受性(浸漬法)

分離株	HV7601		89-24-12		A-88-4-9		75-51		GHV7701		対照区
	10 ⁵	10 ⁶									
供試尾数	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	
累積斃死尾数	0	0	1	2	3	3	0	2	0	0	
ウイルス分離			1/1	2/2	2/3	2/3			0/2		
IHNによる累積斃死率(%)	0	0	4	8	8	8	0	2	0	0	

観察期間: 21日 ウィルス分離: IHNV陽性尾数/検査尾数(=累積斃死尾数)

第4表 長野県産アマゴ(30.0 g)のIHNV 5株に対する感受性(注射法)

分離株	HV7601		89-24-12		A-88-4-9		75-51		GHV7701		対照区
	10 ⁵	10 ⁶									
供試尾数	25	25	24	24	25	25	24	25	25	25	
累積斃死尾数	0	0	3	4	3	5	1	0	3	2	
ウイルス分離			3/3	3/4	2/3	4/5	1/1		1/3	1/2	
IHNによる累積斃死率(%)	0	0	13	13	8	16	4	0	4	4	0

観察期間: 21日 ウィルス分離: IHNV陽性尾数/検査尾数(=累積斃死尾数)

では、HV7601株を除いて 10^5 区より 10^6 区の方が累積斃死率は高くなったが、20 g および30 g では攻撃濃度の上昇が累積斃死率を上昇させることはほとんどなく、累積斃死率そのものも低かった。各区の斃死魚の一部をウイルス分離した結果、20 g (GHV7701) を除いたいずれの区からもウイルスが分離され、CPEの形態からすべてIHNVと判断した。また、斃死魚の症状は鰓の退色、肝臓の退色、腎臓・脾臓の肥大等、IHNの定型的症状が観察された。なお、対照区もわずかな斃死が認められたが、ウイルス分離をしたところウイルスは分離されず、IHNによる斃死ではないと判断した。

考 察

前報⁹⁾では同じ供試株および方法でニジマス(0.3 g)に対する感受性を検討した。結果は以下のとおりであった。

GHV7701 (94.1%) 89-24-12 (100%)

H-40-1 (89.3%) HV7601 (54.1%)

その比較では、最低でも34.1%も累積斃死率がアマゴの方が低かった(H-40-1株)。また、長野県産アマゴの結果(実験2 : 0.9 g)を見ても低い累積斃死率であることから、分離由来魚種を問わず、大型魚由来株に対するアマゴ稚魚の病原性はニジマスより弱いと考えられた。したがって、アマゴ稚魚はニジマス稚魚よりもIHNVに対して抵抗性があるものと思われる。このことは、養殖場におけるIHN被害の実態とも一致するものである。

当場では1975年12月に初めてIHNが発生して以来、毎年その被害を受けている。その間累代飼育を続けてきたアマゴがIHNVに対して抵抗性を身につけたことも考えられた。そのことを明らかにするために、前代以前にIHNVに感染履歴のないアマゴを用いたが、当場累代のアマゴと結果に大差はなかった。供試魚体重が異なるため、成長に伴う抵抗性の増加^{10) 11)}を考慮しても、アマゴ稚魚はニジマス稚魚よりもIHNVに対して元来抵抗性があるものと考えられた。

ただし、魚種特異性株が存在するという報告¹²⁾があり、アマゴ由来株の中にアマゴに対して強い病原性を持つ株が存在するかもしれない。この点に関しては株数を増やして検討する必要がある。

前報⁹⁾では、大型魚由来株であるGHV7701株と89-24-12株がニジマス大型魚においても強い病原性を有することを明らかにしたが、アマゴ大型魚では低い累積斃死率

であった。ただし、アマゴ稚魚由来株である75-51株ではほとんど斃死がなかったことから、アマゴにおいても大型魚由来株の方が大型魚に対する病原性が強いと考えられた。得られた結果は、アマゴ稚魚の結果と成長に伴う抵抗性の増加^{10) 11)}から、予想されたことである。この結果から、アマゴ大型魚に強い病原性を持つ分離株は見あたらない。このことは養殖場におけるIHN被害の実態とは必ずしも一致せず、今後の検討課題である。

アマゴ体腔液由来のA-88-4-9株の結果は89-24-12株と同等であった。このことは、体腔液中のIHNVには強い病原性を有することを示唆するものであり、改めて、発眼卵のヨード剤消毒の励行および親魚収容池下流への魚の収容の危険性を示唆するものである。

ニジマス稚魚由来株であるHV7601株のアマゴに対する病原性は微弱であった。特に大型魚では斃死は見られず、この点は前報⁸⁾で示したニジマスと同様であった。ところが、アマゴ稚魚由来株である75-51株ではアマゴ大型魚で1尾ではあるが、斃死が認められた。この株の分離当時(1975年)は大型魚におけるIHNは認められていないが、この結果はその後の大型魚でのIHNの発生を暗示するものかもしれない。IHN発生当時の稚魚由来株の中にはニジマス大型魚に強い病原性を持つものが既に示されている¹³⁾。

なお、実験区のウイルス分離率の多くが100%未満であった。ところで、アマゴ20・30 gを用いた実験では対照区の斃死がないことから、斃死原因はすべてIHNV接種によるものと考えられる。にもかかわらずIHNVが分離されない斃死魚が存在する原因としては、ウイルス分離の際の試料量が少なすぎた(多くの検体を処理する都合上)ことが考えられるが、このことだけで説明はできず、IHNVが原因で斃死しても、通常のウイルス分離では陰性になることがあるのかもしれない。

要 約

1. 大型魚由来のIHNVはアマゴに一定程度の病原性を示したが、ニジマスほどではなかった。
2. 前代以前にIHNVに感染履歴のあるアマゴとそうでないアマゴのIHNVに対する感受性には差がなかった。
3. 大型魚由来のIHNVは、稚魚由来のものに比べて、アマゴ大型魚における病原性が強いと考えられた。しかし、その病原性は強いものではなかった。

今回の研究に際し、IHNV同定用のモノクローナル抗体を分与して下さったサッポロビール株式会社亀井勇統氏（現佐賀大学海浜台地生物生産研究センター助教授）、アマゴを分与して下さった長野県水産試験場本西晃氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 花田博・平野正義・佐野宜八郎・植松久夫・稻葉繁雄・渡辺佳一郎, 1978 ; 静岡県に発生したニジマスの伝染性造血器壊死症 (IHN) について. 静岡富鱈研報, 2, 59-84.
- 2) 荒井真・田代文男, 1975 ; マス類のウイルス病に関する研究-III IHNの岐阜県内の発病状況について. 岐水試研報, 21, 139-144.
- 3) 森川進・荒井真・田代文男, 1979 ; マス類のウイルス病に関する研究-IV アマゴ(*O. rhodurus*) 1年魚におけるIHNの発病例. 同誌, 24, 63-68.
- 4) 中居裕・荒井真, 1994 ; マス類のウイルス病に関する研究-VI (補遺) アマゴ1年魚から分離されたウイルスの同定について. 同誌, 39, 59-60.
- 5) 第22回全国養鱈技術協議会要録, 1997.
- 6) KAMEI, Y., J.L. POTEY, M. YOSHIMIZU, T. KIMURA, S. SHIRAHATA, and H. MURAKAMI, 1990; Antigenic Analysis of Fish viruses with Monoclonal Antibodies. Trends in Animal Cell Culture Technology, Kodansha Tokyo, 201-204.
- 7) KAMEI, Y., M. YOSHIMIZU, T. KIMURA, and H. MURAKAMI, 1991; Comparative Antigenic Analysis of Two Fish Rhabdoviruses, Hirame Rhabdoviruses (HRV) and Infectious Hematopoietic Necrosis virus (IHNV) with Monoclonal Antibodies. 1991; Proceedings Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, Oregon State University, 73-81.
- 8) 隆島史夫・河西晴之・浅川治・山田善章, 1982 ; 魚類麻酔剤としての2-phenoxyethanol. 水産増殖, 30(1), 48-51.
- 9) 中居裕, 1994 ; 伝染性造血器壊死症 (IHN) に関する研究-I 大型魚由来分離株のニジマスに関する病原性. 岐水試研報, 39, 37-44.
- 10) AMEND, D.F., W.T. YASUTAKE, J.L. FRYER, K.S. PILCHER and W.H. WINGFIELD, 1973; Infectious hematopoietic necrosis (IHN). In "Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control" (ed. by W.A.Dill). FAO EIFAC Tech.Pap.17 (Suppl.2), pp.80-87.
- 11) AMEND, D.F., 1974; Infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus disease. U.S., Fish Disease Leaflet 39.
- 12) 鈴木邦夫・坂井勝信, 1992 ; サクラマスおよびニジマスに対するIHNウイルスのワクチン効果. 北海道水産孵化場研報, 46, 1-8.