

学位論文題名

Studies on A New Virus Isolated from Salmonid Fish

サケ科魚類から分離された新しいウイルスに関する研究

学位論文内容の要旨

1991年春から1992年夏にかけ北日本で養殖中のギンザケ (Oncorhynchus kisutch)、イワナ (Salvelinus pluvius)、ニジマス (O. Mykiss) およびアユ (Plecoglossus altivelis) に異常遊泳を主徴とする疾病が発生し、これら病魚の脳からウイルスが分離された。本研究では分離ウイルスのウイルス学的性状、サケ科魚類に対する病原性、感染魚の病理組織学的変化、北日本における分布状況および防除対策に関する検討を行った。

まず第I章では、異常遊泳の症状を示したニジマス、ギンザケ、イワナ、アユの脳および正常なサクラマスの体腔液から分離したウイルス各1株とギンザケ由来株をクローン化した株の計6株について生物学的、理化学的、血清学的性状を検討した。供試株はいずれも 5-iododeoxyuridine (IUdR)、 bromovinyl deoxyuridine (BVdU) による増殖阻害は認められず、エーテル、クロロホルム、pH、熱に対し安定であった。電子顕微鏡観察からウイルス粒子はカプシットが 50~65 nmで、エンベロープをもつ 75~85 nm の正 20 面体であり、超音波処理をしたも

の 長 い エ ン ベ ロ ー プ 様 の も の が 観 察 さ れ た 。 庶 糖 液 中 で の 浮 遊 密 度 は $1.155 \sim 1.160 \text{ g/cm}^3$ 、 構 造 蛋 白 は 11 本 で、 単 鎖 の 約 7.3 kb の RNA を も ち、 逆 転 写 酵 素 活 性 を 有 し て い た 。 赤 血 球 凝 集 は 認 め ら れ な か っ た 。 供 試 し た 魚 類 培 養 細 胞 33 種 類 の う ち 27 種 の 細 胞 に 細 胞 変 性 CPE を 発 現 し、 特 に BF-2、 CHSE-214、 RTE-2、 SF-2 細 胞 に お い て 高 い 増 殖 量 を 示 し た 。 至 適 増 殖 温 度 は 15°C で あ っ た 。 感 染 細 胞 の 種 類 に よ っ て は CPE 形 成 後 細 胞 の 再 生 が 観 察 さ れ、 CHSE-214 細 胞 の 場 合、 再 生 細 胞 の 培 養 液 中 の ウ イ ル ス 感 染 価 は 継 代 12 回 ま で $10^{3.85}$ か ら $10^{6.58}$ 、 細 胞 内 の ウ イ ル ス 量 は $10^{5.8}$ か ら $10^{7.25} \text{ TCID}_{50} / \text{ml}$ で 比 較 的 安 定 的 で、 本 ウ イ ル ス の 持 続 感 染 が 成 立 し て い た 。 抗 IHNV (Infectious Hematopoietic Necrosis Virus)、 HRV (Hirame Rhabdovirus)、 VHSV (Viral Hemorrhagic Septicemia Virus)、 OMV (Oncorhynchus masou Virus)、 CSV (Chum Salmon Virus)、 IPNV (Infectious Pancreatic Necrosis Virus) 血 清 で は 中 和 さ れ ず、 抗 ギ ン ザ ケ 由 来 株 BrCo-9221 血 清 で の み 中 和 さ れ た 。 供 試 株 の ND_{50} は $1:960 \sim 1:2560$ の 範 囲 に あ っ た 。 以 上 の 結 果 か ら 本 ウ イ ル ス は エ テ ー ル 非 感 受 性 を 除 け ば レ ト ロ ウ イ ル ス の 性 状 を 有 し て い た が、 現 時 点 で は レ ト ロ ウ イ ル ス と 同 定 で き ず、 今 後 の 課 題 と な っ た 。

第 II 章 で は、 数 種 の サ ケ 科 魚 類 を 対 象 に 本 ウ イ ル ス の 病 原 性 を 浸 漬 攻 撃 法 お よ び 筋 肉 内 接 種 法 を 用 い て 検 討 し た 。 感 染 魚 は 自 然 発 症 魚 と 同 様 に 眼 球 突 出、 体 色 黒 化 を 示 し、 回 転 遊 泳 を 呈 し た 。 ギ ン ザ ケ ・ サ ク ラ マ ス で は 浸

漬攻撃群で 6 %から 34 %、筋肉内接種群で 35 %から 63 %の累積死亡率を示し、スチールヘッドトラウトとアメマスの筋肉内接種群でも 30 %から 45 %の累積死亡率を示した。一方イトウでは 5%を示すにすぎなかった。浸漬・筋肉内接種いずれの死亡魚からもウイルスが分離され、しかも各試験群の全感染耐過魚からも高いウイルス感染価が得られた。このことから本ウイルスはサケ科魚類に対し病原性を有し、感染耐過魚はキャリアーになることが明かとなった。また人工感染試験魚について本ウイルスの魚体内での増殖部位および伝播を調べたところ、本ウイルスおよびウイルス抗原が最初に腎臓で検出・確認され、その後血液や脳からも観察された。

第Ⅲ章では、自然発症魚と人工感染魚について脳、腎臓、脾臓、肝臓等の臓器を対象に回転遊泳との関連性を中心に病理組織学的観察およびウイルス粒子の電顕観察を行った。感染初期の瀕死魚の間脳、小脳および中脳の周囲に充出血、神経細胞の空胞化、多量の神経膠細胞離出が観察された。感染試験後期に発症した個体の視葉、小脳、中脳の分子層には脳内血管の充血と膨大像が見られ、神経細胞の退行病変および空胞化が観察された。これらの結果から病魚の異常遊泳は本ウイルス感染に伴う脳内における病変の進行が原因と考えられた。その他、腎臓、肝臓、胸腺、心臓、卵巣等でも種々の病理学的変化が観察された。また、電顕観察により脳、腎臓、肝臓、血液及び心臓でウイルス粒子が観察された。本ウイルス感染魚で観察された病理学的変化は既知のウイルスによ

るものと異なっていた。

第Ⅳ章では、1991年から1994年にかけて、北日本で養殖中のサケ科魚類を対象に本ウイルスの分布調査を行った。本ウイルスは北海道・青森県・岩手県・宮城県・新潟県・山形県下の養殖ニジマス、サクラマス、ギンザケ、イワナ、アユから分離され、特に回転遊泳魚のみならず外観的的正常魚からも分離されたことから、本ウイルスが北日本の養殖サケ科魚類に広く分布していることが明らかとなった。

第Ⅴ章では、飼育用水の殺菌法として用いられている紫外線やオゾン処理および卵の消毒、飼育器具や飼育従事者の手足等の消毒に用いられている消毒剤の本ウイルス不活化効果を検討した。本ウイルスは通常 of 紫外線照射量 ($5.3-5.8 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec} / \text{cm}^2$) および 1.9 mg/l 、30秒のオゾン処理により不活化され、クレゾール 50 - 500 ppm、イソジン 10 - 100 ppm、オスバン 10 - 100 ppm、次亜塩素酸ナトリウム 10 - 50 ppm により不活化され、本ウイルスの防除法としてこれらによる処理が有効であることが確認された。

以上、本研究では異常遊泳症状を示すサケ科魚類からウイルスを分離し、そのウイルス学的性状を調べたところ、既知のウイルスと異なる新しいウイルスであることを明らかにした。本ウイルスはエーテル耐性のエンベロープを有する点を除けばレトロウイルス科の性状に一致した。また本ウイルスはサケ科魚類に対し病原性を示し、感染魚では既知のウイルス病と異なる病理学的変化が観

察された。感染魚体内で本ウイルスはまず腎臓で増殖し、血液系に入って脳に達し、脳の病変により感染魚は異常遊泳を呈するに至るものと考えられた。さらに本ウイルスは北日本に広く分布していることが明らかとなり、早急な防疫対策の確立が必要である。また、現在、養殖対象サケ科魚類で問題となっている本来発症しないサイズでの発症や、症状の悪化の傾向が目立つ各種疾病に本ウイルスが関与している可能性も検討する必要がある。

学位論文審査の要旨

主査	教授	絵面	良男
副査	教授	信濃	晴雄
副査	助教授	上田	宏
副査	助教授	田島	研一
副査	講師	吉水	守

学位論文題名

Studies on A New Virus Isolated from Salmonid Fish

(サケ科魚類から分離された新しいウイルスに関する研究)

本論文は、北日本で主に養殖サケ科魚類に発生した異常遊泳を主徴とする疾病の原因ウイルスを分離し、そのウイルス学的性状、病原性、病理組織学的変化および分布を明らかにしたものである。特に評価される成果は以下のとおりである。

1. 分離ウイルスは、(1)50~65nmの正20面体のカプシッドを有し、エンベロープの大きさ75~85nmの粒子で、(2)蔗糖液中での粒子の浮遊密度が 1.16g/cm^3 (3)構成タンパク質は11種類、(4)単鎖で約7.3kbのRNAを持ち、(5)逆転写酵素活性を有し、(6)赤血球凝集能がなく、(7)既知のサケ科魚類病原ウイルス6種に対する抗血清で中和されなかった。以上の結果から、本ウイルスが、レトロウイルスに近似の新しい魚類病原ウイルスであることを明らかにした。なお、本ウイルスの分類学的な位置の確定は、今後の課題として残された。
2. 本ウイルスは、多くの魚類培養細胞中で増殖し、特に、BF-2, CHSE-214, RTE-2, CHH-1細胞で増殖量が多く、至適増殖温度は 15°C であった。また、これ

らの細胞等では、本ウイルス感染による細胞変性が認められた後に生残細胞の再生と再生細胞中でのウイルス増殖が観察され、再生細胞が継代可能であることから、本ウイルスが持続感染していることを確認した。

3. サケ科魚類に対する本ウイルスの病原性を浸漬法と筋肉内接種法により検討した。その結果、ギンザケとサクラマスでは自然発症魚と同様の症状を呈し浸漬法で6～34%、筋肉内接種法で35～63%の累積死亡率を示し、スチールヘッドトラウトとイワナに対しても同程度の死亡率を示したが、イトウでは5%であった。また、本実験におけるすべての生残魚から本ウイルスが分離され、いずれも高い感染価を有していた。以上から、本ウイルスがサケ科魚類に病原性を有するのみならず、感染耐過魚が本ウイルスのキャリアーとなることを明らかにした。

4. 人工感染魚体内における本ウイルスの動態を検討し、本ウイルスが最初に増殖する臓器は、腎臓であり、その後、血液系を介して各臓器に伝播することを示唆する結果を得た。

5. 自然発症魚と人工感染発症魚の病理組織学的観察から脳組織における特徴的な所見を得た。すなわち、間脳、小脳、中脳、視葉における充出血および神経細胞の空胞化と退行変性が観察されると共に本ウイルス粒子の存在を確認した。そして、これらの所見から本疾病の主徴である異常遊泳は、本ウイルスの感染に伴う脳内における病変の進行が原因であると考えた。また、腎臓、肝臓、胸腺、心臓、卵巣等でも病理学的変化が認められ、各臓器内にウイルス粒子が観察された。

6. 本ウイルスの分布調査を行った結果、本ウイルスは、北海道と青森、岩手、山形、宮城、新潟各県下で養殖中のニジマス、サクラマス、ギンザケ、イワナ、アユから分離された。特に異常遊泳魚のみならず、外観的に正常な養魚か

らも分離されたことから、本ウイルスが北日本の養殖サケ科魚類に広く分布していることを明らかにした。

7. 本疾病の防除対策の基礎的知見を得るために飼育用水、施設、卵等の殺菌・消毒法の検討を行い、次の結果を得た。本ウイルスは、常用の紫外線照射量 ($5.3 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{ec}/\text{cm}^2$) およびオゾン処理 (1.9mg/l, 30秒) で不活化された。またクレゾール (50~500ppm)、イソジン (10~100ppm)、オスバン (10~100ppm)、次亜塩素酸ナトリウム (10~50ppm) により不活化され、本ウイルスの防除にはこれらの処理が有効であることを確認した。

以上、本論文では、まず、北日本で養殖中の主にサケ科魚類に発生した異常遊泳を主徴とする疾病の原因が新しいウイルスによるものであることを明らかにした。次に、病魚の感染から異常遊泳への過程として、本ウイルスが魚体内に侵入後、まず標的組織である腎臓で増殖し、血液系を介して脳に達し、そこで増殖して脳の病変を生じることにより発症にいたるものと推察した。さらに本ウイルスが北日本の養殖サケ科魚類に広く分布していることから、早急な防除対策の必要性を指摘した。

以上の成果は北日本におけるサケ科魚類養殖事業に大きな警告を与えるのみならず、魚類病原ウイルス学に新しい知見を加えるとともに、水産学に貢献するところ大であることから、審査員一同は、本論文が博士（水産学）の学位論文として十分な業績と判定した。