

学 位 論 文 題 名

ニジマスのヘルペスウイルス病に関する研究

学位論文内容の要旨

サケ科魚類のヘルペスウイルス病は、防疫対策の徹底により北日本ではほぼ終息した。しかし、1994年以降、中部日本に伝播し、静岡県、山梨県、岐阜県で発生が見られるようになった。ニジマスの主産県である長野県では、1999年に民間養鱒場のニジマス親魚に大量死が発生し、翌2000年には長野県内の複数の養鱒場に被害が広まった。本病は0年魚（12 g）から1,000 g以上の親魚まで年齢に関係なく発病し、100g以上の出荷サイズおよび親魚の被害が70%以上を占め、本疾病による被害は甚大であり、養鱒場の経営が危ぶまれる事態となった。他のウイルス性疾病では伝染性脾臓壊死症（IPN）や伝染性造血器壊死症（IHN）が発生し問題となっているが、これらは仔稚魚期に発症する疾病である。仔稚魚期の疾病の場合、ヨード剤による発眼卵の消毒ならびにウイルス非汚染水での飼育等の防疫対策を講じることで、病気の制御が可能となっている。しかし、今回の疾病はすべてのサイズで発病するため、IPNやIHNで培ってきた防疫・防除対策を成魚期まで継続することは、施設面および経済面で困難である。

本研究は、本病によるニジマス成魚の産業被害を軽減することを目的に、本州中部の各地で発生している疾病の病態解明を行うとともに、仔稚魚期に加え成魚期の新たな防除技術について検討した。

まず第1章では、ニジマスの成魚に発生した体表の斑点状退色症状、鰓の退色と鰓弁の出血、肝臓の退色と白斑形成、腹腔内脂肪の発赤および腸の発赤を特徴とする大量死の原因を検討した。肝臓の病理組織

検査から巣状壊死が観察され、培養細胞を用いたウイルス検査でヘルペスウイルスに特徴的な多核巨細胞を形成するCPEが観察された。分離ウイルスは抗OMV家兎血清により中和され、さらにPCRによりOMV特異遺伝子と同一の増幅産物（439bp）が得られたことから分離ウイルスはOMVと同定された。ニジマスに対する感染試験において、分離ウイルスは高い死亡率をもたらし、さらに、肝臓、腎臓、脾臓および脳組織のウイルス感染価が $10^{4.9 \sim 8.4}$ TCID₅₀/gと高い値を示したことから、本疾病はサケ科魚類のヘルペスウイルス病であることが明らかとなった。

次に、ニジマスの自然発病魚および病魚由来OMV株（OMV-RT）を用いた人為感染魚を対象に病理組織学的および電子顕微鏡学的観察を行った。外観および内臓所見は既報の研究で示された他のサケ科魚類と同様であったが、腸管に壊死が観察され、これが最も激しい変化であった。病理組織像からは、OMV-RTがまず腸管組織の細胞に感染し、肝臓、脾臓、造血組織、心臓および他の組織などに感染が広がっていくことが示唆された。また、第一標的臓器について、Tanaka *et al.* (1984) はサクラマスの成長に従い腎臓の造血細胞から肝臓に変化したとしているが、ニジマスの場合は、脾臓や腸管の細胞に激しい壊死が観察され、肝臓も主要な標的臓器であるが、第一標的臓器は腸管である可能性が示された。

IHNおよびIPNなどのウイルス感染症を耐過し、回復した個体から原因ウイルスを分離することは困難であるが、感染耐過魚が成熟すると生殖産物中に病原体が出現してくる現象が知られている。そこで、OMVの卵巣腔液への出現時期および出現部位を明らかにするため、成熟直前の親魚を対象に検討した。PCR法によるOMV特異遺伝子の検出状況から、OMVは成熟直前に腎臓に出現し、卵黄形成期以降、血液と共に各臓器に運ばれ、最終的に卵巣腔液に出現するとの仮説が得られた。

サクラマス由来OMVの病原性は仔魚期のみであるが、ギンザケ由来OMVの病原性は稚魚ばかりでなく、より大型の魚に対しても致死적이다ある。ニジマス由来OMV-RTのニジマスに対する病原性を明らかにすることを目的に異なるサイズのニジマスを用いた感染実験を実施した。ニジマス由来OMV-RTは腹腔内接種および浸漬による人為感染試験で1 gサイズの稚魚、10 gサイズの稚魚および100 gサイズの成魚に対しても強い病原性を示すことが明らかとなった。

ニジマス養殖場ではイワナ、アマゴなどを始め、他のサケ科魚類が養殖されている場合が多い。養殖目的ではないもののコイ、フナあるいはウグイなど一般河川に生息する魚が養殖池に混入している場合もある。そこでこれら養殖場で見られる魚のOMV-RTに対する感受性を検討した。コレゴヌスが低いながらもOMV-RTに感受性を示したが、イワナ、アマゴ、ブラウントラウト、コイ、フナおよびウグイに死亡は認められず、本病発生養殖場においても、これら魚種の死亡は確認されなかった。しかし、これらの魚種がOMVキャリアーになる可能性については、今後さらに詳しく検討する必要があると考える。コレゴヌスは、同一養殖場においてニジマスとの飼育は避ける必要がある。

第2章では、ニジマスのヘルペスウイルス病の防除対策を目的に、第1節では飼育池の消毒ができない養殖場の防除対策として、飼育水中におけるOMVの生存性に着目し、消毒剤を用いない防除法の可能性を検討した。長野県のニジマス養殖は飼育水温が10～15℃の範囲であることが多く、この飼育水温下でのOMVの感染性は10℃で7日程度、15℃では3日程度保持された。塩素剤などの薬剤を使用して養殖池の消毒ができない場合には、順次上流の飼育池から飼育を中止し、7日間池を空けることにより養殖池をOMVフリーにできる可能性が示唆された。

次に第2節では、現在各地の養殖場でIHNVおよびIPNVの消毒に用いられている各種消毒剤のOMVに対する殺ウイルス効果を検討した。各種消毒剤がOMVを不活化する濃度はIHNVと比べほぼ同様であったこと

から、従来のIHNVに対する消毒法を実施すればOMVに対しても十分な防除効果が期待できると考えられる。

第3章では、隔離飼育施設からOMVの汚染が疑われる屋外池に出す際の防除対策およびOMV感染環の遮断を目的にOMVDワクチンの開発を行った。第1節では、まずOMV-RTのホルマリン不活化ワクチンの開発に必要な最少ウイルス抗原量を検討した。その結果、ホルマリン不活化OMV-RTを 10^7 TCID₅₀ / 尾程度腹腔内に投与すると感染防御効果が認められた。この数値を基にホルマリン不活化ワクチンを作成し、腹腔内に0.1 ml宛投与した場合、感染防御効果（RPS）は60 %以上を示し、OMVDに対する防御効果が十分期待できる結果が得られた。

次いで第2節では、感染耐過魚を採卵に供する場合、卵巢腔液中のOMVが採卵場の飼育排水中に放出され、環境を汚染することが懸念されるため、採卵候補個体にワクチンを投与し、卵巢腔液中へのウイルス出現が抑制されるかどうかを検討した。成熟3～6ヶ月前にワクチンを投与した親魚候補個体では、卵巢腔液中にOMVが出現する個体数が90%から22%と大幅に減少し、本手法が成熟期のウイルス産生抑制に有効であることが示された。以上の結果から、ニジマス稚魚を隔離飼育施設から屋外池に出す前に、本ワクチンを腹腔内に投与することにより、本病の感染発症が抑制できるものと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守

副 査 教 授 田 島 研 一

副 査 助 教 授 西 澤 豊 彦

学 位 論 文 題 名

ニジマスのヘルペスウイルス病に関する研究

ニジマスのヘルペスウイルス病 (*Oncorhynchus masou virus disease: OMVD*) は魚令・魚体サイズにかかわらず感染・発病することから、従来のウイルス非汚染水による飼育を稚魚期から成魚期まで継続することは、施設面および経済面で困難である。本研究は、ニジマス成魚における産業被害の軽減を目的に、まず本病の病態解明を行い、ついで成魚期の新たな防除技術について検討した。

まず、ニジマスの成魚に発生した体表の斑点状退色症状、鰓の退色と鰓弁の出血、肝臓の退色と白斑形成、腹腔内脂肪の発赤および腸の発赤を特徴とする大量死の原因を検討した。自然発病魚の病理組織検査で肝臓に巣状壊死が観察され、RTG-2 細胞によるウイルス検査で106尾中85尾にヘルペスウイルスに特徴的な多核巨細胞を形成するCPEが観察された。分離ウイルスは抗OMV家兎血清により中和され、PCRによりOMV特異遺伝子と同一の増幅産物(439bp)が得られた。肝臓、腎臓、脾臓および脳組織のOMV感染価が $10^{4.9 \sim 8.4}$ TCID₅₀/gと高い値を示し、魚体重1 g, 11 gおよび114 gのニジマスを用いた人為感染試験で、本ウイルスは70~88%と高い死亡率をもたらし、接種ウイルスが再分離されたことから、本病はOMVDであることが明らかとなった。

ニジマスの自然発病魚由来OMV株(OMV-RT)を用いた人為感染発病魚の外観および内臓所見は既報のサケ科魚類と同様であったが、病理組織学的観察で、腸管に激しい壊死が観察された。病理組織像からOMV-RTは、まず腸管組織の細胞に感染し、主要な内臓に広がっていくことが示唆された。また第一標的臓器は腸管である可能性が示された。

OMV-RTの卵巣腔液への出現時期および出現部位を明らかにする

ため、成熟段階の異なる親魚の腎臓、肝臓、脳、脊椎神経（前部、中部および後部）組織および血液を対象に PCR による OMV 特異遺伝子の検出を行った。検出状況は、前卵黄形成期の腎臓で 89%、卵黄形成後期の脊椎神経中部を除く各臓器で 40～60%、排卵期の卵巣腔液を含め全ての臓器で 40～90%であった。卵黄形成後期および排卵期の血液ではそれぞれ 80%および 56%であった。以上の結果から、OMV-RT は成熟直前に腎臓に出現し、卵黄形成期以降血液と共に各臓器に運ばれ、最終的に卵巣腔液に出現するとの仮説が得られた。

OMV-RT の病原性について、ニジマスの 1 g、10 g サイズの稚魚および 100 g サイズの成魚の人為感染試験で 70～100%の累積死亡率をもたらした。稚魚および成魚に強い病原性を示すことが明らかとなった。さらに、ニジマス養鱒場内で養殖されるサケ科魚類のイワナ、アマゴ、ブラウントラウトおよびコレゴヌス (White fish)、また時に河川より養殖場に混入するコイ、フナおよびウグイの OMV-RT に対する感受性を腹腔内接種により検討した。コレゴヌスの死亡率が 10%と OMV-RT に感受性を示したが、他の魚種に死亡はなく、本病発生養殖場でもこれら魚種の死亡は確認されなかった。従って、コレゴヌスは防疫対策上同一養殖場でニジマスとの飼育を避ける必要がある。

次いで、飼育水中の OMV 生存性から消毒剤を用いない飼育池の防除法の可能性を検討した。飼育水中の OMV-RT の感染性は 10℃で 7 日程度、15℃では 3 日程度保持された。本結果より、順次上流の飼育池から飼育を中止し、7 日間以上池を空けることにより養殖池を OMV フリーにできる可能性が示唆された。

養殖場で Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) の消毒に使用されるポビドンヨード液、塩化ベンザルコニウム液および次亜塩素酸ナトリウム液の OMV に対する殺ウイルス効果を検討した。OMV 感染価を 90%以上減少させる消毒剤の最小濃度は IHNV とほぼ同様であったことから、従来の IHNV に対する消毒法により OMV を防除できると考えられた。

最後に、ニジマスを隔離飼育施設から OMV の汚染が疑われる屋外池に移す際の防除対策および親魚の OMV 排出防止を目的に、ワクチンの開発を行った。10^{6.7} TCID₅₀/尾のワクチンを腹腔内接種し、2 週間後に攻撃試験を行ったところ、対照区の累積死亡率 75～85%に対してワクチン区は 10～45%と有意に低く、ワクチンの有効率も 47～87%となり OMV-RT に対する防御効果が十分期待できた。さらに、成熟 3 ヶ月前の親魚候補個体にワクチンを接種し、卵巣腔液中の OMV 特異遺伝子の検出を行ったところ、OMV 出現率は 90%から

22%に有意に減少し，成熟期のウイルス産生抑制に有効であることが示された。

以上の結果から，稚魚期のニジマスには現行のウイルス病対策を行い，稚魚を隔離飼育施設から屋外池に移す前に本ワクチンを腹腔内に接種することにより本病の感染発症が抑制できると考える。