

ニジマスの伝染性造血器壊死症 (IHN)

耐病性系統作出に関する研究

学位論文内容の要旨

静岡県でのニジマス養殖において、魚病による被害、経済的損失が生産量の10%を超え、その対策確立が急務となっている。中でも、伝染性造血器壊死症 (IHN)は1974年に県内に侵入してから30年以上経た現在においても、最も被害額の多い疾病であり、魚病被害全体の約1/3を占めている。

これまで、IHN対策として親魚からの垂直感染を断つために、ヨード剤による発眼卵の消毒と感受性を有する時期 (おおむね3 gまで) をウイルスフリーの飼育用水による飼育が実施され、この防疫対策が効を奏し、稚仔魚期のIHN発生は少なくなり、北日本の1水系1孵化場あるいは1養魚場の多くで本病がなくなった。しかし、本州中部のニジマス主産県では、50 g以上の出荷間際のニジマスや親魚など、様々なサイズで発症することや、他の疾病との混合感染も多いことから、問題が複雑化している。

本研究では、IHN耐病性系統作出を目的に、まずIHN抗体検出ELISA法を用い、県内のニジマスのIHNウイルス感染実態を明らかにした。また、親魚のウイルス保有率およびELISA抗体価との関係について検討するとともに、IHN発症が起こる飼育水中のウイルス感染粒子数を測定した。そして、ウイルスの変異と魚の耐病性の関係について調べるために、IHNウイルス5株の病原性について検討した。次いで、染色体操作を用いてIHN耐病性系統を作出するとともに、その耐病性機構について、魚体内ウイルス量との関係から考察した。

まず、第1章では、静岡県内の養鱒場におけるニジマスのIHNウイルス感染状況を明らかにするため、抗体検出ELISA法を開発し、民間養鱒場および水産技術研究所富士養鱒場内の調査を行った。その結果、ほとんどの民間養鱒場においてIHNウイルス感染耐過魚が存在し、県内には広くIHNが蔓延していることが明らかとなった。富士養鱒場においても、ウイルスフリー用水で飼育可能な隔離施設内のニジマスはIHNウイルスの感染履歴を持たないものの、屋外池においては、そのほとんどがIHNウイルス感染履歴を有することが明らかとなった。親魚のウイルス保有率は13.3%であったが、ウイルス保有と抗体保有の間に関連性は見出せなかった。さらに、最確数法を応用しIHNが発生する飼育用水中に、感染性ウイルス粒子がいくつ存在するかを調べたところ、10t中に1感染粒子という数字が算出された。

第2章では、ウイルスの変異と宿主の耐病性獲得について検討するため、分離年、場所の異なる5株のIHNウイルス株 (RtShiz0606, RtShiz06a, RtNag06b, RtNag96, ChAb7601) を用いて人為感染試験を行い病原性を比較検討した。その結果、累積死亡率はウイルス株により大きく異なり、RtShiz0606株が最も強い病原性を示し (10^4 TCID₅₀/mlでの死亡率, 92%)。最も病原性の弱いのはChAb7601株 (同10%) であった。この傾向はニジマスの由来 (静岡県産および長野県産) が異なっても同様の結果であった。また、RtShiz0606株は、G遺伝子の分子系統学的解析から、従来のJrtグループの2つのサブグループに属さず、新たに出現したウイルスと考えられた。これはIHNウイルスが宿主の耐病性獲得に対応して変異することで、病原性を維持しているものと考えられ、このことが、耐過魚の選抜育種による耐病性系統の確立を難しくする要因ではないかと考えられた。

そこで第3章では、IHN耐病性系統作出のため、近年確立された染色体操作方法を用い、雌性発生を2世代施すことにより、ニジマスクローン2系統 (RT92H10およびRT92H04) を作出するとともに、これら系統の耐病性形質および再生産形質に関する項目について検討した。耐病性形質では、IHNウイルス人為感染試験による累積死亡率はRT92H04 (96%) と比較

してRT92H10で有意に低く (同70 %), RT92H10はIHN耐病性を有することを明らかにした。また, ウイルスの感染防御に関与するとされるNK活性について調べたところ, RT92H10が有意に高い活性を示した。一方でビブリオ病人為感染試験において, RT92H10の累積死亡率が60 %であるのに対し, RT92H04は13.3 %でありRT92H10のビブリオ病抵抗性が低い結果となった。再生産形質に関して, RT92H10 はRT92H04 と比較して成長が良好であることが明らかとなったが, 成長の遅いRT92H04が, 大部分の個体 (80 %) において2年で成熟する一方で, RT92H10はほとんどの個体が未成熟という結果であった。

最後に, 第4章で, 耐病性の理由について魚体内ウイルス量との関係により考察した。まず, 通常ニジマス群 (平均魚体重0.77 g) を用いてIHNウイルス3株 (RtShiz0606, RtNag96, ChAb7601) による人為感染試験を行い, 魚体内ウイルス量の変動を調べた。その結果, 魚体内ウイルス量は死亡率と密接に関連し, 死亡率の高いRtShiz0606株 (累積死亡率86 %) では魚体内ウイルス量が多く, 低いChAb7601株 (同12 %) ではウイルス量の増加は見られなかった。同様の結果は14 gのニジマス群を用いた試験においても得られた。

次にRtShiz0606 株を用い, IHN耐病性クローン群RT92H10および通常群の人為感染時における魚体内ウイルス量の変動を比較した。ウイルス濃度および魚体重は $10^{1.3}$ TCID₅₀/ fish, 7 g (試験1) および $10^{5.3}$ TCID₅₀/ fish, 14 g (試験2) であった。累積死亡率は試験1ではRT92H10が2 %, 通常群で24 %, 試験2ではそれぞれ18 %, 72 %であり, RT92H10はIHN耐病性を持つことが改めて確認された。魚体内ウイルス量の変動は, 試験1のRT92H10の腎臓では, ウイルスはあまり増殖せず, 6日目以降 10^4 TCID₅₀/g程度まで増加したものの, 10日目にはほとんど分離されなくなった。一方通常群では3日目には $10^{4.5}$ TCID₅₀/gを, 4日目には 10^6 TCID₅₀/gを超える個体が存在したが, 7日目以降はウイルス量が 10^5 TCID₅₀/g以上の高い値を示

す個体が存在する一方で、 10^4 TCID₅₀/g以下の個体も存在し、魚体内ウイルス量は4～6日目を境に、ウイルス量が増加し続ける個体と、減少する個体とに分かれる傾向が見られた。試験2においても、試験1とほぼ同様の傾向を示した。試験2では魚体内ウイルス量は腎臓および脾臓で測定したが、臓器によるウイルス増殖の違いは特に認められなかった。また、死亡するか否かの臨界線は 10^6 TCID₅₀/gと推察された。

以上、本研究では、静岡県内にIHNが広く蔓延していることを再認識し、その対策として耐病性系統の作出を試みた。IHN耐病性を有するクローン群RT92H10が作出され、人為感染時における魚体内ウイルス量は増殖するものの速くに減少することから死には至らないことを明らかにした。

今後RT92H10を用いてIHN耐病性メカニズムを明らかにするとともに、その情報を利用して通常群からIHN耐病性個体の選抜が可能になると考えられ、業界に大きな貢献をもたらすと確信している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守
副 査 教 授 荒 井 克 俊
副 査 教 授 岡 本 信 明
副 査 准教授 西 澤 豊 彦
副 査 助 教 笠 井 久 会

学 位 論 文 題 名

ニジマスの伝染性造血器壊死症 (IHN)

耐病性系統作出に関する研究

これまで、IHN 対策として親魚からの垂直感染を断つために、ヨード剤による発眼卵の消毒と感受性を有する時期（おおむね 3 g まで）をウイルスフリーの飼育用水による飼育が実施され、この防疫対策が効を奏し、稚仔魚期の IHN 発生は少なくなり、北日本の 1 水系 1 孵化場あるいは 1 養魚場の多くで本病による被害が沈静化した。しかし、本州中部のニジマス主産県では、50 g 以上の出荷間際のジニマスや親魚など、様々なサイズで発症が見られることや、他の疾病との混合感染も多いことから、問題が複雑化している。

本研究では、ニジマスの IHN 耐病性系統作出を目的とし、まず IHNV に対する抗体検出 ELISA 法を用い、静岡県内のニジマスの IHN ウイルス感染実態を検証した。次いで、ウイルスの変異と魚の耐病性獲得の関係について検討し、さらに、染色体操作を用いて IHN 耐病性系統を作出し、その耐病性機構について、魚体内ウイルス量との関係から考察した。

まず、第 1 章では、静岡県内の養鱒場におけるニジマスの IHN ウイルス感染状況を明らかにするため、抗体検出 ELISA 法を開発し、民間養鱒場および水産技術研究所富士養鱒場内の調査を行った。その結果、ほとんどの民間養鱒場において IHN ウイルス感染耐過魚が存在し、県内には広く IHN が蔓延していることが明らかとなった。富士養鱒場においても、ウイルスフリー用水で飼育可能な隔離施設内のニジマスは IHN ウイルスの感染履歴を持たないものの、屋外池においては、そのほとんどが IHN ウイルス感染履歴を有することが明らかとなった。

第 2 章では、ウイルスの変異と宿主の耐病性獲得について検討するため、分離年、場所の異なる 5 株の IHN ウイルス株 (RtShiz0606, RtShiz06a, RtNag06b, RtNag96, ChAb7601) を用いて人為感染試験を行い、病原性を比較検討した。その結果、累積死亡

率はウイルス株により大きく異なり， RtShiz0606 株が最も強い病原性を示し (10^4 TCID₅₀/ml での死亡率， 92 %)， 最も病原性の弱いのは ChAb7601 株 (同 10 %) であった。また， RtShiz0606 株は， G 遺伝子の分子系統学的解析から， 従来の Jrt グループの 2 つのサブグループに属さず， 新たに変異により出現したウイルスと考えられた。これは IHN ウイルスが宿主の耐病性獲得に対応して変異することで， 病原性を維持しているものと考えられ， このことが， 感染耐過魚を用いた選抜育種による耐病性系統の確立を難しくする要因ではないかと考えられた。

そこで第 3 章では， IHN 耐病性系統作出のため， 近年確立された染色体操作方法を用い， 雌性発生を 2 世代施すことにより， ニジマスクローン 2 系統 (RT92H10 および RT92H04) を作出するとともに， これら系統の耐病性形質および再生産形質に関する項目について検討した。耐病性形質では， IHN ウイルス人為感染試験による累積死亡率は RT92H04 と比較して RT92H10 で有意に低く， RT92H10 は IHN 耐病性を有することを明らかにした。また， ウイルスの感染防御に関与するとされる NK 活性について調べたところ， RT92H10 が有意に高い活性を示した。一方でビブリオ病人為感染試験において， RT92H10 の累積死亡率が 60 % であるのに対し， RT92H04 は 13.3 % であり RT92H10 のビブリオ病抵抗性が低い結果となった。再生産形質に関して， RT92H10 は RT92H04 と比較して成長が良好であることが明らかとなったが， 成長の遅い RT92H04 が， 大部分の個体 (80 %) において 2 年で成熟する一方で， RT92H10 はほとんどの個体が未成熟という結果であった。

最後に， 第 4 章で， 耐病性の理由について魚体内ウイルス量との関係により考察した。IHN 人為感染後の魚体内ウイルス量の変動を検討したところ， 死亡するか否かの閾値は 10^6 TCID₅₀/g と推察された。RT92H10 の人為感染時における魚体内ウイルス量は， 一旦増殖するものの速くに減少するため， 死には至らないことを明らかにした。

以上， 本研究では， 静岡県内に IHN が広く蔓延していることを再認識し， その対策として耐病性系統の作出を試みた。IHN 耐病性を有するクローン群 RT92H10 が作出され， 人為感染時における魚体内ウイルス量は増殖するものの， 速やかに減少することから死には至らないことを明らかにした。今後 RT92H10 を用いて IHN 耐病性メカニズムを明らかにするとともに， その情報を利用して通常群から IHN 耐病性個体の選抜が可能になると考えられ， 業界に大きな貢献をもたらすと確信している。