

ニジマスのヘルペスウイルス病に関する研究

降 幡 充

緒 言

第1章 長野県下で発生しているニジマスのヘルペスウイルス病

第2章 ニジマス由来 *Oncorhynchus masou virus* (OMV-RT株)の環境水中での生存性および各種消毒剤による不活化

第1節 飼育用水中におけるOMV-RT株の生存性

第2節 各種消毒剤によるOMV-RT株の不活化

第3章 ホルマリン不活化OMVワクチンの開発

第1節 ホルマリン不活化OMVワクチンの有効ウイルス抗原量

第2節 成魚に対するホルマリン不活化OMVワクチンの有効性

第3節 採卵親魚へのホルマリン不活化OMVワクチン接種による卵巣腔液中へのウイルス出現抑制効果

総合考察

謝 辞

引用文献

緒 言

わが国の養殖ニジマスに発生した疾病としては、1960年代のピブリオ病やカラムナリス病、1960年代後半から発生が見られた不明病(後に伝染性膵臓壊死症(infectious pancreatic necrosis: IPN)と確定(Sano, 1976; 山崎, 1990)、1972年からは水カビ病が、さらに、1974年以降には伝染性造血器壊死症(infectious hematopoietic necrosis: IHN)の発生が報告されている(Sano *et al.*, 1977)。その後もイクチオホヌス症、レンサ球菌症、冷水病などが発生したが、中でもIHNはサケ科魚類の仔・稚魚に大きな被害をもたらす疾病であり、ニジマス養殖において特に警戒すべき疾病の一つである(本西, 1984; Kimura and Yoshimizu, 1991)。このIHNの防除対策として(1)発眼卵のヨード剤による消毒、(2)IHNウイルス非汚染用水の使用、(3)専任の孵化管理者の設置、(4)養殖資材の消毒、(5)飼育用水の非再利用と用具の専用化、(6)鳥獣の侵入防止、(7)良好な飼育環境の保持が計られ、安定した種苗生産と被害の軽減を図ることができている(本西, 2004)。

サケ科魚類のヘルペスウイルスは1970年代前半にアメリカ合衆国ワシントン州の孵化場のニジマス親魚から分離され、*Herpesvirus salmonis*と命名された(Wolf *et al.*, 1978)。その後長く分離されなかったが、1986年に

カリフォルニア州サクラメント川に遡上したスチールヘッドトラウト親魚から分離され、Steelhead Herpesvirus (SHV)と仮称された(Hedrick and McDowell, 1986)。日本では、1972年および1974年に十和田湖の孵化場でヒメマス稚魚から分離され、*Nerka virus in Towada Lake Akita and Aomori prefectures* (NeVTA)と命名された(Sano, 1976)。1978年には北海道のサクラマス採卵親魚の卵巣腔液から分離され、本ウイルスが腫瘍原性を有することから、*Oncorhynchus masou*から分離されたOncogenicなウイルスとして*Oncorhynchus masou virus* (OMV)と命名された(Kimura, 1981a)。その後、養殖ヤマメの口部腫瘍(Sano *et al.*, 1983)からも分離され、北日本に回帰する天然のサクラマスおよび陸封型のヤマメにも広く分布していることが明らかになった(Yoshimizu *et al.*, 1993, 1995)。

米国カリフォルニア州で分離されたSHV株は*H. salmonis*と同じウイルスであり、病原性もほとんど認められなかった。しかしわが国で分離されたOMVは宿主のサクラマスを始めヒメマス、サケ、ギンザケ、ニジマスに病原性を示し、特にヒメマス、サケ、サクラマスには強い病原性を示し、腫瘍原性も実験的に確かめられた(Kimura *et al.*, 1981b; Yoshimizu *et al.*, 1987)。1988

年以降、淡水養殖ギンザケおよび海面養殖ギンザケにヘルペスウイルス病が見られるようになり(堀内ら,1989)、幼魚から成魚、特に出荷間近の成魚が感染・発症し、死亡率も 10~30%に達することから産業的に問題となった(Kumagai *et al.*,1994)。さらに、1992年に北海道の養殖ニジマス成魚にヘルペスウイルス病が見られ、ギンザケが発病した場合と比較し大量の成魚が死亡することから、経済的損失が問題となった(鈴木,1993)。

その後、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が、中部日本に伝播し、1994年以降、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でヘルペスウイルス病による大量死亡が発生し、翌2000年には長野県内の複数の養鱒場に被害が広まった(Yoshimizu and Nomura,2001)。本病は0年魚(12g)から1,000g以上の親魚まで年齢に関係なく発病し、累積死亡率が34~77%に達した。特に100g以上の出荷サイズおよび親魚の被害が70%以上を占めたことから本疾病による被害は甚大で、養鱒場の経営が危ぶまれる様相を呈した。長野県水産試験場では緊急魚病情報を県内養鱒場に配布し、ヘルペスウイルス病に関する情報提供と防疫対策の徹底を図るよう呼びかけたが、被害はその後も続いている。

養殖ニジマスにおいて、これまでに問題となったウイルス性疾病はIPNおよびIHNであり、これらは仔・稚魚期に罹患する疾病である。仔・稚魚期の養殖施設で

は、前述のように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、病気の制御が可能である(本西,1997)。しかし、ヘルペスウイルス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、施設のまた経済的に困難である。特に、稚魚期から100gサイズあるいは1kgサイズの大型魚までを飼育するには大量の飼育用水が必要であり、これをウイルス非汚染水である地下水や紫外線殺菌処理水でまかなうことは現実的に困難と言わざるを得ない。こうした現状から、ヘルペスウイルス病については仔・稚魚期に加え成魚期の新たな防除対策が求められている。

本研究では、本州中部の各地で発生しているニジマスのヘルペスウイルス病の病態解明と産業被害軽減を目指した防除技術の確立を目指し、まず第1章で、ニジマスのヘルペスウイルス病の発生状況および感染源の究明を行い、また本症の病理組織学的特徴、原因ウイルスの病原性および魚体内分布について検討した。次いで第2章では、原因ウイルスの環境中での生存性とウイルスの有効な消毒方法を検討した。最後に、第3章では、成魚期の防除対策としてホルマリン不活化ワクチンの有効性の検討を行った。また、ニジマスの飼育環におけるウイルスの感染環遮断を目的に、感染耐過した親魚にワクチンを投与し、採卵親魚体腔液へのウイルス出現抑制効果について検討した。

第1章 長野県下で発生しているニジマスのヘルペスウイルス病

目 的

1999年に長野県下の民間養鱒場において親魚候補群に原因不明の大量死が発生した。死亡率が高く、採卵は断念せざるを得なくなった。病魚の外観には鰓腐れ、体表の斑点状退色、潰瘍および膿瘍の形成が認められ、内臓では肝臓の退色、脂肪の斑状発赤が観察された。翌2000年には長野県内の複数の養鱒場で同様の症状を呈す疾病が発生した。本章では、長野県内で発生したニジマスの大量死亡の原因究明、県内の発生状況の実態および感染原因の把握を行い、病理組織学的観察を行い死因を考察した。

サクラマスから *Oncorhynchus masou virus* (OMV) が分離された当初、OMVのサクラマス、シロサケ、ギンザケおよびニジマスに対する病原性は仔魚期のみであった(木村ら, 1983)。一方、ギンザケから分離されたOMVはギンザケに対し、稚魚のみならず、より大型の魚に対しても病原性を有していることが報告され(熊谷ら, 1995)、さらにギンザケ由来OMVの病原性は5gサイズのギンザケに対し強いが、サクラマスに対しては弱く、ニジマスに対しては認められなかったと報告している。今回、ニジマス病魚から分離されたOMV-RT株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。一方、ニジマス養鱒場ではイワナ、アマゴをはじめ他のサケ科魚類が養殖されている場合が多い。また、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種が養殖池に混入している場合もある。そのため、これら養殖場で見られる各魚種のニジマス由来株OMVに対する感受性を検討した。

サケ科魚類のヘルペスウイルス病の病理組織学的特徴に関しては、ヒメマスおよびギンザケの自然発病事例(Sano, 1976; 堀内ら, 1989; Kumagai *et al.*, 1994)では、肝臓の著しい壊死が観察され、サクラマス、サケおよびギンザケの人為感染事例では、1ヶ月令時感染魚は腎臓が主要標的臓器であったが、3ヶ月令魚では脾臓および膵臓の壊死、特に肝臓の壊死病巣が顕著になったと報告されている(Kimura *et al.*, 1981a; Tanaka *et al.*, 1984)。今回、ニジマスの自然発病魚および人為感染魚の病理組織学的および電子顕微鏡学的特徴を観察し、既報の他の魚種と比較した。

一般にIHNVおよびIPNVなどのウイルス感染症を耐過した個体から、その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再び出現することはよく知られている。しかし、全ての感染耐過魚がウイルスを保有しているかどうか、また、成熟するまでの間、ウイルスは魚体内のどこに潜んでいるかなど不明な点が多く残されている。近年、OMV特異遺伝子検出用PCRがAso *et al.* (2001)によって確立され、培養法と同等あるいはそれ以上の検出感度を有することが明らかになった。そこでニジマスのヘルペスウイルス病魚の魚体内でのウイルス分布状況をOMV特異遺伝子検出用PCRにより調査し、次いで、成熟期における感染耐過魚のウイルス魚体内分布状況を調査した。

材料と方法

長野県内における本病発生状況の実態把握

2000年2月から翌年1月の間に、長野県下の157養鱒場を訪ね、養鱒場主からの聞き取りによりニジマスの異常大量死の発生状況および感染源を調査するとともに、病魚の微生物学的検査を行った。さらに、異常大量死のあった2養鱒場を選び、発病魚群の飼育量、体重、流行期間、死亡率および水温を調査した。

病原体検査

養鱒場において衰弱個体あるいは外観症状のある個体を採取し、直ちに氷蔵して試験室に運んだ。病魚106尾の外観および内臓を観察し、外部寄生虫およびウイルス検査を行い、内98尾を対象に細菌検査を、また68尾を対象に真菌検査を行った。さらに、1養鱒場の瀕死魚5尾(23~43g BW)は、病理組織検査、PCRによるOMV特異遺伝子の検出、主要臓器のウイルス感染価の測定および分離ウイルスの中和試験を行った。

外部寄生虫検査として、鱗、体表および鰓を検鏡した。細菌検査は腎臓よりトリプトソーヤ寒天培地を用いて細菌分離を試み、20で7日間の培養を行った。真菌検査は *Ichthyophonus hoferi* 感染の有無を目的に腎臓および肝臓組織の圧扁標本を作製し、顕微鏡観察した。

ウイルス検査は腎臓組織を摘出し、抗生物質入り Hanks' Balanced Salt Solution (penicillin-G 800 I.U./m, streptomycin 800μg/m, mycostatin 200unit/m in Hanks' BSS) を9倍量(W/V)添加して磨碎し、遠心分離(2,000rpm10分, 4)後、上清をさらに Hanks' BSS で10倍(V/V)に希釈した。4で一夜静置後、R

RTG-2細胞に接種し、15℃で14日間観察した。

病理組織検査は、供試魚を飼育池から取り上げた直後に解剖し、各臓器を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従い厚さ4μmのパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して、光学顕微鏡により観察した。

OMV特異遺伝子検出PCRはAso *et al.* (2001)に従って行った。RTG-2細胞が細胞変性効果(cytopathic effect: CPE)を呈したwellからウイルス感染細胞を含む培養液を抜き取り、14,800rpm、15分間遠心し、ペレット化した。Phosphate-buffered saline (PBS)で2回洗浄したペレットに200μlのDNA抽出剤InstaGene Matrix(BIO-RAD Laboratories社)を添加し、56℃、20分間温水浴し、強く攪拌した後、沸騰水中に8分間置いた。試料は攪拌後、10,000rpm、90秒遠心し、上清を鋳型DNA溶液(1μl)として使用した。

F10 (5'-GTACCGAACTCCCGAGTC-3')

R5 (5'-AACTGAACTACTCCG GGG-3')のプライマーセットを用い、PCR反応液の全量を20μlとし、ポリメラーゼにはPremix Taq Takara Ex Taq Version (Takara)を用いた。反応条件は、変性を94℃30秒間、アニーリングを56℃30秒間、伸長反応を72℃30秒間とし、増幅サイクル数は30サイクルとした。その反応産物を2%アガロースゲルで電気泳動し、遺伝子断片(439bp)の増幅を確認した。なお、PCRの陽性対照にはOMV 00-7812株を用いた。

主要臓器のウイルス感染価は、腎臓、肝臓、脾臓および脳組織を対象とし、少量の滅菌珪砂を入れた滅菌乳鉢に摘出し、前述のHanks' BSSを9倍量(W/V)添加し、乳棒で磨砕した。磨砕液を1.5mlチューブに移し、15℃で3時間静置後、2,000rpmで10分間(4℃)遠心分離した。Hanks' BSSで10倍希釈した上清のウイルス感染価をRTG-2細胞を用いて50%終末点法により測定し、臓器1g当たりのウイルス感染価を算出した。

中和試験は(社)日本水産資源保護協会から分与を受けた抗OMV家兔血清(ND₅₀=1:140)を7倍に希釈し、等量の分離ウイルスと混和した。対照には抗血清の代わりに胎児血清を2%添加したMinimum Essential Medium (MEM-2)を用いた。15℃で2時間反応後、RTG-2細胞を用いて50%終末点法により両者のウイルス感染価を測定した。

自然発病魚の病理組織学的観察

2001年の6月から7月にかけてニジマスのヘルペスウイルス病が発生した2ヶ所の養鱒場から8尾の瀕死の

ニジマス(体重124~832g)を採取した。病理学的な病兆概要を得るため、外観および内臓の観察の後、寄生虫や細菌の検出を目的に鰓および体表を鏡視した。細菌分離は腎臓からトリプトソーヤ寒天培地(15℃7日間培養)を用いた。前述の方法に従い腎臓組織からウイルス分離を行った。

皮膚やその下の体側筋組織を含む潰瘍部位、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、消化管および鰓の組織を10%緩衝ホルマリン液で固定し、常法によりパラフィン包埋し、厚さ4μm切片を作製した。組織切片はヘマトキシリン・エオシン染色を施し、病理組織学的観察を行った。

人為感染魚の病理組織学的観察と電子顕微鏡学的観察

OMV (RtNa-0010株)はRTG-2細胞(Wolf and Quimby, 1962)を用いて15℃で培養し、試験に供するまで-80℃で保存した。ニジマス(0年魚、平均体重34.2g)は流水飼育(10尾/水槽)し、攻撃区は反復水槽、対照区は1水槽とした。攻撃区は、1尾当たり10^{2.3} TCID₅₀/100μlを腹腔内接種し、対照区には100μlのMEMを接種した。供試魚には市販ペレット飼料を与え、水温13.5℃で36日間給餌飼育した。

この間、病魚の病兆および毎日の死亡尾数を記録した。瀕死魚や死亡直後の魚から得た内臓器官の組織は前述した病理組織学的観察を行った。また、透過型電子顕微鏡観察を目的に改良カルノフスキー液で前固定を行い、0.1Mリン酸緩衝液で洗浄後、2%オスミウム酸で後固定を行い、エポキシ樹脂に包埋した。その後、厚さ120~130nmの超薄切片を作製し、酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛による二重染色を行った。ウイルスの再分離は腎臓組織よりRTG-2細胞を用いて行った。

自然発病魚および成熟期におけるOMV感染耐過魚の魚体内でのウイルス分布

自然発病魚は長野県下の養鱒場から瀕死成魚30尾を採取し、本試験に供した。OMV感染耐過魚は春期から夏期にかけて本疾病が流行した長野県水産試験場構内のニジマス親魚群を用いた。成熟段階の異なる3群、すなわち、前卵黄形成期をレベル1、卵黄形成後期をレベル2および排卵期をレベル3として、それぞれ9、10および10尾を供試した。

OMVの検出は、各供試魚の腎臓、肝臓、脳、脊椎神経前部、脊椎神経中部および脊椎神経後部組織から前述したOMV特異遺伝子検出用PCRにより行った。OMV感染耐過魚のレベル1、レベル2およびレベル3の供試魚は血液もPCR試料とした。また、比較のためRT

G-2細胞を用いて培養法によるウイルス検査も併せて行った。培養法によるウイルス検査は、各臓器の組織に抗生物質入り Hanks' B S S (penicillin-G 1,000 I.U./m, streptomycin 1,000 µg/m, mycostatin 800 U/m) を9倍量 (W/V) 添加してホモジナイズし、遠心分離 (10,000rpm、15分、4℃) 後、上清をさらに Hanks' B S S で10倍 (V/V) に希釈した。4℃ で一夜静置後、RTG-2細胞に接種し、15℃ で14日間観察した。

異なるサイズのニジマスに対するOMVの病原性

供試魚は長野県水産試験場で生産された各種サイズのSPFのニジマスを用いた。ウイルス攻撃には、2000年に長野県下のニジマス病魚 (体重211g) から分離されたOMV (RtNa-0010株) を用いた。供試ウイルス液は、RTG-2細胞を用いて15℃ で培養し、試験に供するまで-80℃ で保存した。

OMVの人為感染は、注射法と浸漬法により行った。注射法の試験では、平均体重1.3gの魚50尾、11.3gの魚25尾および114.1gの魚10尾にウイルス液を $10^{3.8}$ TCID₅₀/50µl/尾となるよう腹腔内接種した。注射法の試験では、平均体重11.2gの魚30尾それぞれにウイルス液を $10^{2.3}$ TCID₅₀/100µl/尾あるいは $10^{4.3}$ TCID₅₀/100µl/尾ずつ腹腔内接種した。注射法の試験では、平均体重95.2gの魚10尾それぞれにウイルス液を $10^{2.8}$ TCID₅₀/100µl/尾あるいは $10^{4.8}$ TCID₅₀/100µl/尾ずつ腹腔内接種した。試験A、およびBの対照魚にはウイルス液の代わりにMEM-5を同様に接種した。試験Aの水温は11.0~15.2 (平均水温12.5℃) 試験BおよびCは10.1~11.7 (平均水温10.5℃) で、いずれも脱塩素水道水で流水飼育し、市販配合飼料を給餌した。試験A、B、およびCの観察期間はそれぞれ35、42および20日間で、毎日病兆と死亡尾数を記録し、死亡魚の腎臓組織からウイルスの再分離を行い、接種ウイルスによる死亡かを確認した。

浸漬法の試験では、平均体重1.9gの魚25尾を $10^{1.8}$ 、 $10^{2.8}$ および $10^{3.8}$ TCID₅₀/mのウイルス液に1時間浸漬した。対照魚にはウイルス液の代わりにMEM-5を用いた。11.0~12.7 (平均水温12.0℃) の脱塩素水道水で流水飼育し、市販配合飼料を給餌しながら35日間観察し、病兆と死亡尾数を記録した。死亡魚の腎臓組織からウイルスの再分離を行い、接種ウイルスによる死亡かを確認した。

OMVに対する養殖サケ科魚および在来生息魚の感受性
供試魚はサケ科養殖魚類としてアマゴ *Oncorhynchus*

masou ishikawae (20尾、平均体重18.4g)、イワナ *Salvelinus leucomsenis* (19尾、41.1g)、コレゴヌス *Coregonus lavaretus mareana* (20尾、14.7g)、ブラウントラウト *Salmo trutta* (10尾、25.2g)、ニジマス *O. mykiss* (20尾、16.8g) を、養殖場に見られる在来の生息魚類としてコイ *Cyprinus carpio* (20尾、8.8g)、フナ *Carassius auratus* (20尾、8.7g)、ウグイ *Tribolodon hakonensis* (20尾、7.4g) を供試した。これらはいずれも、長野県水産試験場、同佐久支場および同木曾試験地で生産されたSPF魚である。

供試ウイルス株は前述と同様にOMV (RtNa0010株) を用いた。供試ウイルス液は、RTG-2細胞を用いて15℃ で培養し、試験に供するまで-80℃ で保存した。

人為感染は各供試魚に対し $10^{3.8}$ TCID₅₀/100µl/尾のウイルス液を腹腔内接種した。対照魚にはウイルス液の代わりにMEM-5液を同様に接種した。試験魚は、9.0~13.1 (平均水温11.0℃) の脱塩素水道水で流水飼育し、市販配合飼料を1日1~2回給餌しながら42日間観察した。死亡魚は毎日取り上げ、外観および内臓を観察した後、腎臓組織からRTG-2細胞を用いてウイルスの再分離を行った。試験終了時、生残魚の一部は死亡魚と同様にウイルスの分離を行い、さらに腎臓組織から前述したOMV特異遺伝子検出用PCRによりOMV特異遺伝子の検出を行った。

結 果

長野県内におけるニジマス大量死の発生状況および実態把握

ニジマスの異常大量死は158養鱒場の内18養鱒場で発生していた。発生は通年にわたり、12gの0年魚から1,000g以上の親魚にまで見られた。発病群は100g以下が5養鱒場 (28%)、100~1,000gが6養鱒場 (33%)、1,000g以上が7養鱒場 (39%) であった。感染原因は近県や県内養鱒場からの活魚の導入による感染が10養鱒場 (56%)、同一水系による水平感染が5養鱒場 (28%)、不明が3養鱒場 (16%) であった。

AおよびB養鱒場の合計7群の発生状況をTable1-1に示した。A養鱒場の観察した6発病群の死亡は4月上旬から7月下旬に見られ、流行期間は79~117日間、累積死亡率は33.6~77.0%であった。その間の水温は8.1~20.6℃であった。B養鱒場では9月下旬 (水温12.5℃) に40gの魚が発病し、2001年1月中旬 (水温8.2℃) まで105日間死亡が続いたことから、本飼育群は処分された。この間の累積死亡率は41.4%であった。

Table 1-1. Epizootiological survey of OMV disease in rainbow trout

Fish farm	No. of rearing fishes in the pond	Mean body weight (g)	Epizootic period (Duration)	Cumulative mortality (%)	Water temperature ()
A	3,500	110	2000.5.12 - 7.31 (79)	37.7	10.5 - 20.6
A	2,600	190	2000.4.20 - 7.19 (89)	34.5	9.4 - 18.8
A	3,900	190	2000.4.28- 7.19 (81)	33.6	9.4 - 18.8
A	1,000	1,000	2000.4.4 - 7.31 (117)	72.1	8.1 - 20.6
A	500	420	2000.4.12 - 7.5 (83)	77.0	8.7 - 18.8
A	700	800	2000.4.12 - 7.4 (83)	70.1	8.7 - 18.8
B	75,000	40	2000.9.29 - 2001.1.14 (105)	41.4	8.2 - 12.5

検査結果

外観所見として、多くの個体の体表に斑点状の退色症状が観察された。発病群全体としては体表の潰瘍形成を伴う個体は少なかった。鰓はやや退色し、鰓弁の出血が見られた。内臓所見として、肝臓が退色し、中には肝臓に白斑の形成が見られる個体が観察された (Fig.1-1)。他には腹腔内脂肪および腸に発赤が観察されたが、発病群や同疾病耐過群に腫瘍を形成した個体は確認されなかった。外部寄生虫、細菌および真菌検査では、異常死を引き起こす外部寄生虫は認められず、病魚 98 尾中 3 尾から *Streptococcus iniae* が分離され、また、*Ichthyophonus hoferi* は 68 尾中 4 尾に観察された。ウイルス検査では

106 尾中 85 尾 (80%) から RTG-2 細胞に多核巨細胞を特徴とする CPE が観察され、分離ウイルスは RTG-2 細胞で継代が可能であった。

病理組織検査では、肝臓の実質細胞に核崩壊を伴った激しい壊死病巣が多数観察された (Fig.1-2)。PCR では、OMV 00-7812 株と同じサイズの産物 (439 bp) が増幅された (Fig.1-3)。主要臓器のウイルス感染価は、肝臓が $10^{5.6-8.3}$ 、腎臓が $10^{4.9-8.4}$ 、脾臓が $10^{5.4-8.4}$ 、脳が $10^{5.8-7.7}$ TCID₅₀/g であった。分離ウイルスは、抗 OMV 家兔血清を用いた中和試験において $2 \log_{10}$ TCID₅₀ 以上の感染価の減少が認められ、抗 OMV 家兔血清により中和された。



Fig. 1-1. Diseased rainbow trout (16.1g BW), showing white spots in the liver. Scale bar = 1cm.

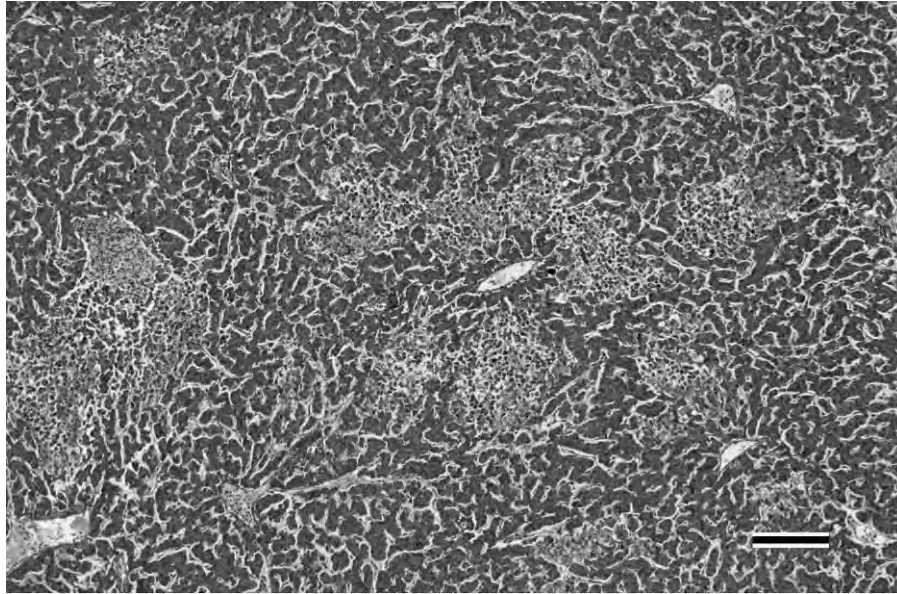


Fig. 1-2. Multiple foci of severe necrosis in the liver. H-E stain, Scale bar = 200 μ m.

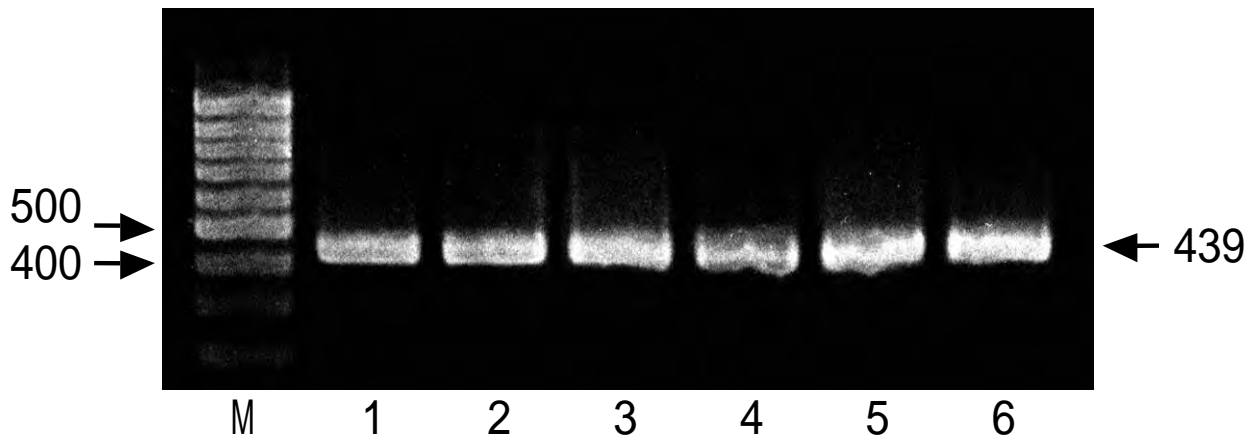


Fig. 1-3. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products of 5 virus isolates from diseased fish and OMV strain 00-7812. Lanes: M; DNA molecular weight marker, 1-5; virus isolates from diseased fish, 6; OMV strain 00-7812.

自然発病魚および人為感染魚の外観と内臓所見

自然発病魚はほぼ全て体色が黒化し、退色した斑点病巣あるいは基底脂肪組織およびその下の体側筋組織を含む潰瘍病巣があった。鰓は鰓弁に出血をともなって退色していた。肝臓は顕著に退色し、多くの白斑病巣が見られた。脾臓および腎臓は出血をともなって腫脹していた。腸管および幽門垂は激しく内出血し、粘膜上皮が分離していた。OMVは供試試料の全てから分離された。寄生

虫は観察されず、また細菌も分離されなかった。

人為感染では、注射後13日目に瀕死魚が2つの攻撃区に出現し、累積死亡率は最終的に50%および70%に達した。対照区には死亡は認められなかった(Fig.1-4)。瀕死魚あるいは死亡魚の外観および内部所見は自然発病魚とほぼ同様であった。人為感染魚では1尾が皮膚の潰瘍を形成しなかった。なお、OMVはウイルス攻撃区の瀕死魚あるいは死亡魚全てから再分離された。

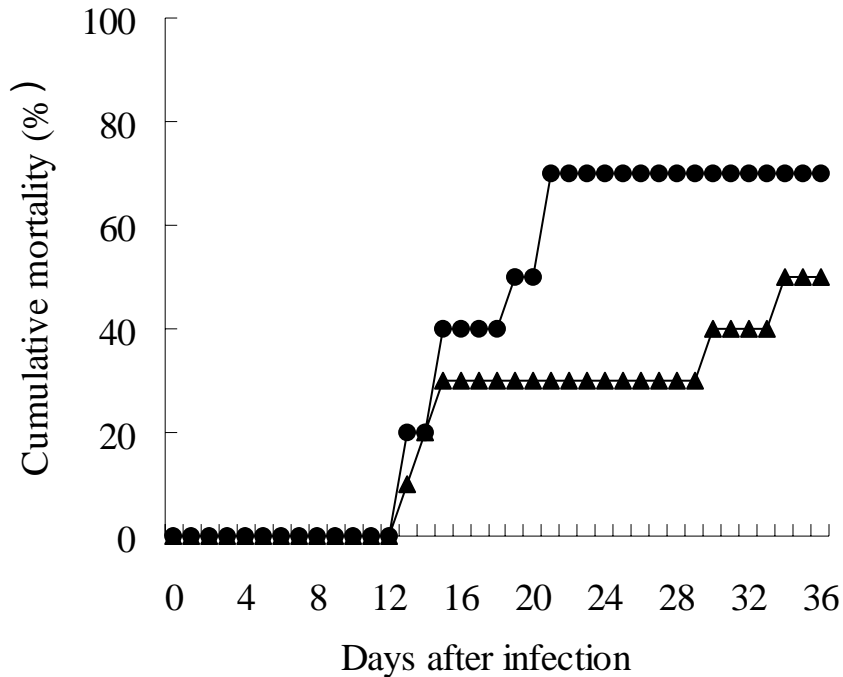


Fig.1-4. Cumulative mortality of rainbow trout that were injected intraperitoneally with $10^{2.3}$ TCID₅₀/100 μ /fish of the OMVat 13.5 . No mortality was observed in the control group(not shown).

自然発病魚および人為感染魚の病理組織学的観察

感染魚の病理組織学的所見は自然発病魚と人為感染魚に違いは認められず、供試魚全てにおいて脾臓に最も激しい変化が見られた。自然発病魚の脾臓は脾髄や英動脈に出血した多くの壊死病巣が認められた (Fig.1-5A)。人為感染魚の脾臓は全個体共に出血をともなって広く壊死していた (Fig.1-5B)。これらの壊死病巣において、脾細胞および英組織細胞は核の膨化、核膜過染、核崩壊および核濃縮などの核変性を示して壊死し、核の断片化が起こっていた。自然発病および人為感染においても腎臓には造血組織に出血した壊死病巣が見られた (Fig.1-5C)。広範囲な壊死病巣では、多くの尿管上皮細胞も影響を受け、壊死していた。肝臓では壊死病巣の形成程度が個体によって異なっていた。脾臓や造血組織に激しい感染病巣を示した多くの個体では、主に肝実質にある小さな血管の周囲に多数の壊死病巣が観察された (Fig.1-5D)。壊死病巣では、肝細胞索が壊れ、その肝細胞は炎症細胞の浸潤なしに核変性や細胞の断片化を示し、激しく壊死していた (Fig.1-5E)。非感染病巣部分では、多くの肝細胞が萎縮していた。一方、脾臓や造血組織が著しく冒されているにもかかわらず、いくつかの個体では肝細胞の明

瞭な壊死が認められなかった。これらの肝臓では、有糸分裂像を示す細胞および大型の核と好塩基性細胞質をもつ大型の細胞が多数存在した。これらの細胞は細胞索内や胆汁管近傍に見られ、一部の細胞は集塊を形成していた。細胞はマクロファージに似ており、肝細胞の再生像ではなかった。生残魚の肝臓では、好塩基性の小核を有する多くの小細胞が肝細胞索に広がる病巣小結節を多数形成していた (Fig.1-6A)。心臓では、出血を伴う小さな壊死病巣が心室に発生し (Fig.1-6B)。その心筋細胞は核濃縮した凝固壊死あるいは空砲化を伴い、膨化していた。腸管は固有層や粘膜下織が組織壊死した重度の出血病巣を示し (Fig.1-6C)。絨毛が崩壊していた。幽門垂も組織壊死した固有層や粘膜下織に重度の出血あるいは上皮剥離を示していた。人為感染魚の脾臓では腺房細胞の壊死が見られた。鰓弁結合織は壊死し、軽度な出血が見られた (Fig.1-6D)。皮膚の潰瘍病巣では、表皮は崩壊し、その下の真皮結合組織および脂肪組織は壊死し、マクロファージの浸潤が見られた。皮膚の下の体側筋組織では、結合組織が重度に壊死し、出血していた。また、関連する筋細胞も壊死していた (Fig.1-6E)。

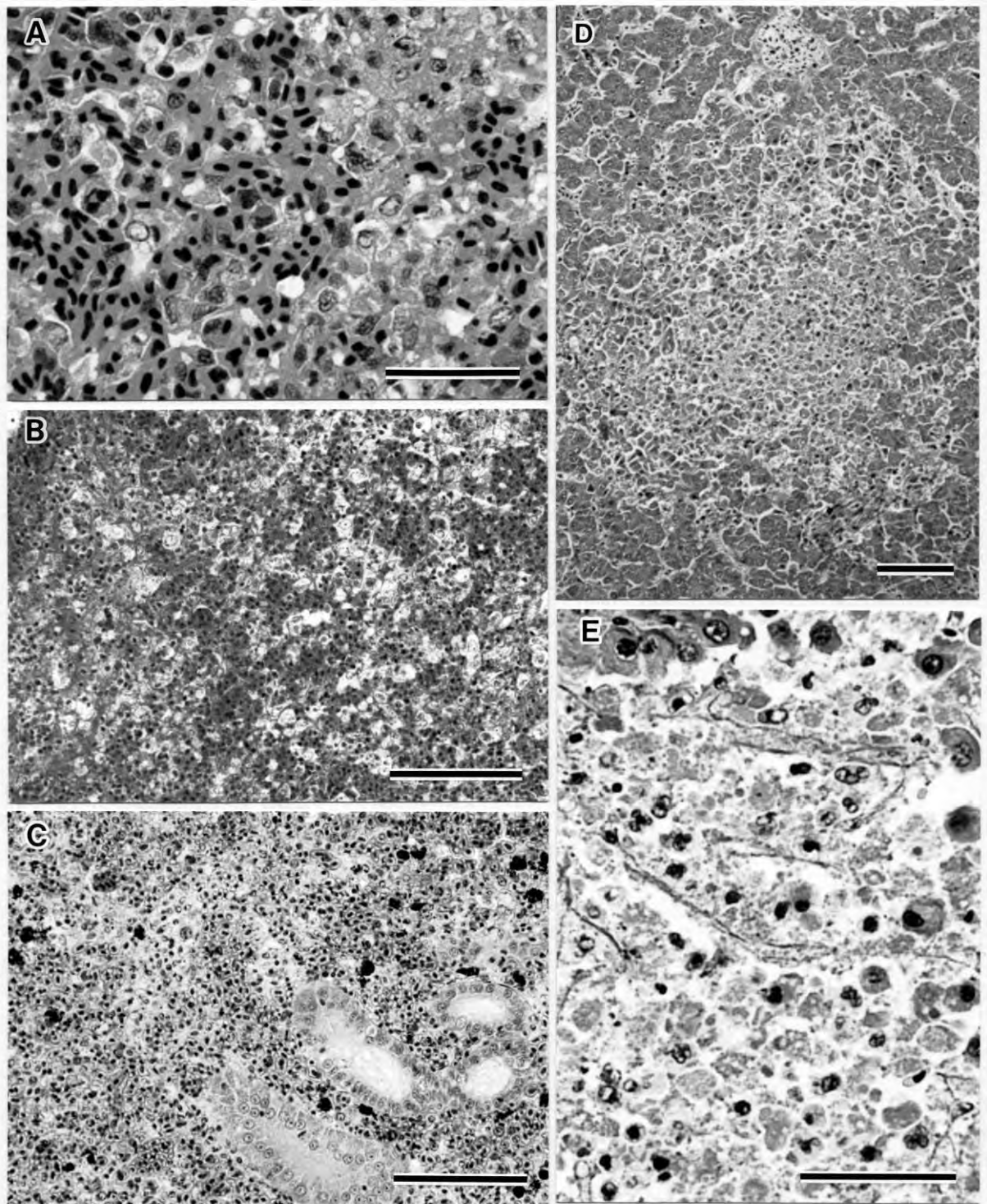


Fig. 1-5. Histopathological signs of OMV-infected rainbow trout. (A) Necrotic lesion with hemorrhage in the splenic pulp of naturally diseased fish. OMV-infected cells were necrotized showing nuclear degenerations. H&E, Scale bar= 50 μ m. (B) Necrotic lesion with hemorrhage in the spleen of experimentally infected fish. H&E, Scale bar= 100 μ m. (C) Necrotic lesion with hemorrhage in the hematopoietic tissue in the kidney of experimentally infected fish. H&E, Scale bar= 100 μ m. (D) A necrotic focus presumably at the early stage of infection in the liver of naturally diseased fish. H&E, Scale bar= 100 μ m. (E) Developed necrotic focus in the liver of naturally diseased fish. Most of OMV- infected hepatocytes showed nuclear degenerations and cellular fragmentation. H&E, Scale bar= 50 μ m.

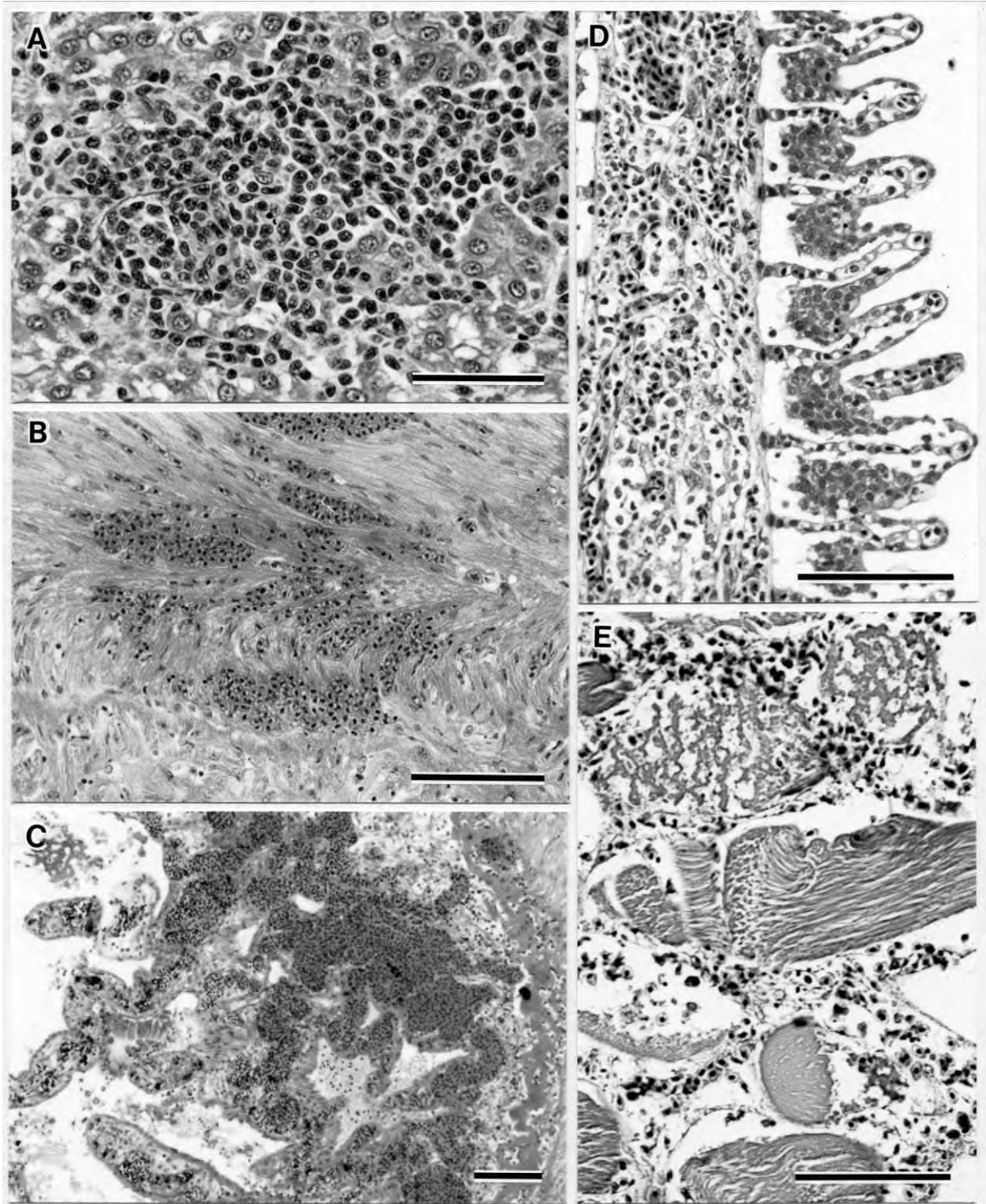


Fig. 1-6. Histopathological signs of OMV-infected rainbow trout. (A) Nodular lesion consisted of cells with a basophilic nucleus in the liver of survived fish in infectivity experiment. H&E, Scale bar= 50 μ m. (B) Necrotic lesions with hemorrhage in the ventricle of experimentally infected fish. H&E, Scale bar= 100 μ m. (C) Necrotic lesions in the intestine of experimentally infected fish. The epithelium was extensively destroyed and the underlying tunica propria and submucosa were also necrotized severe hemorrhage. H&E, Scale bar= 100 μ m. (D) Necrotic lesion in connective tissues of a gill filament of naturally diseased fish. Separation of the epithelium from gill lamellae is an artifact by sample processing. H&E, Scale bar= 100 μ m. (E) Necrotic lesion in the lateral musculature. The connective tissues were necrotized hemorrhage, and involved muscle cells were also necrotized. H&E, Scale bar= 100 μ m.

人為感染魚の電子顕微鏡学的観察

人為感染魚のウイルス感染細胞の電子顕微鏡観察では、核内でウイルスのヌクレオカプシッドが、また細胞質内でウイルス成熟粒子が認められた。ヌクレオカプシッドは直径115~120nmの正六角形で、そのいくつかは高電子密度のコアを有していた(Fig.1-7A)。成熟ビリオンは電子密度が高く、明瞭な厚いエンベロープを有し、その大きさは220~280×200~260nmであった(Fig.1-7A)。肝細胞や造血細胞におけるOMV感染細胞の初期段階では、核内に増大する染色質や断片化した核小体を持つ多くのヌクレオカプシッドが見られ、細胞質内にはエンベロープを持つビリオンは少なかった。これらの感染細胞には断片化した粗面小胞体(rER)と滑面小胞体(sER)が見られ、新たに形成したミエリン様構造と同様にクリステを損傷したミトコンドリアが見られた。膨化、核濃染および断片化のような核変性が見られる壊死段階では、エンベロープを持つビリオンの多くは細胞質内に移動したが、ヌクレオカプシッドは依然核内に存在した。細胞質の電子密度は非常に低く、多くの断片化したrERやsER、変性したミトコンドリアおよびミエリン様構造が見られた(Fig.1-7B)。特に、壊死した心筋細胞には空胞化した筋形質が顕著に見られた(Fig.1-7C)。脾臓の細胞断片化した病巣では、OMV感染細胞の間隙に多くの放出されたビリオンや細胞断片が見られ(Fig.1-7D)。造血組織および肝臓でも同様であった。

自然発病魚および成熟期におけるOMV感染耐過魚の魚体内でのウイルス分布

瀕死魚からのOMV特異遺伝子の検出は、腎臓、肝臓、脳、脊椎神経前部、脊椎神経中部および脊椎神経後部の各臓器からそれぞれ67、77、90、70、47および80%の割合で検出された。しかし、培養法ではそれぞれ10、13、47、33、30および43%の検出率であった(Fig.1-8)。

感染耐過した成熟親魚の検出結果をTable 1-2に示した。レベル1で腎臓から8/9尾で、また脳、脊椎神経中部および後部から1/9尾で、OMV遺伝子が検出された。レベル2では脊椎神経中部の1/10尾を除き、各臓器から40~60%の割合で検出された。レベル3では卵巣腔液を含め全ての部位から40~90%の割合で検出された。しかし、ウイルス分離はレベル2およびレベル3では困難であり、レベル3の肝臓と腎臓、脳からいずれも1/10尾からOMVが分離された。レベル2および3の血液からはそれぞれ8/10および5/9尾でOMV遺伝子が検出された(Table 1-2)。

異なるサイズのニジマスに対するOMVの病原性

試験において、1.3g、11.3gおよび114.1gの実験魚における累積死亡率はそれぞれ84、88および70%であった(Table 1-3)。これら1.3gおよび11.3g魚の主な病兆は、鰓の退色、肝臓および腎臓の退色、脾臓の腫脹、腸管の発赤であった。114.1g区の死亡魚では、鰓弁での出血ならびに肝臓の白斑病巣も認められた。脾臓の腫脹、腸管の発赤も顕著であった。1.3g対照区で1尾が死亡したが、OMVは再分離されなかった。

試験において、11.2g魚に対する2濃度攻撃の累積死亡率はともに86.7%であった。病兆は試験の1.3gおよび11.3g魚の死亡魚と同様であった。対照区で1尾が死亡したが、OMVは再分離されなかった。

試験において、95.2g区では2濃度でウイルス攻撃を行ったが、何れの攻撃区においても累積死亡率は100%であった。死亡魚の病兆は、試験の114.1g区での死亡魚と同様であった。対照区で1尾の死亡があったが、OMVは再分離されなかった。

試験において、1.9g魚に対する $10^{1.8}$ 、 $10^{2.8}$ および $10^{3.8}$ TCID₅₀/mの浸漬攻撃の累積死亡率はそれぞれ0、8および80%であった。1.9g区における死亡魚の主な症状は、鰓の退色と鰓弁の出血、肝臓のわずかな退色、腎臓の退色と出血、脾臓の腫脹、腸管の黄色化であった。対照区の魚に死亡はなかった。

養殖サケ科魚および在来生息魚のOMV感受性

ニジマス由来OMVで攻撃したコレゴヌスおよびニジマスで死亡が見られ、累積死亡率はそれぞれ10および90%であった(Table 1-4)。コレゴヌスの2尾の死亡は、攻撃後13および16日目に起こり、後者の腎臓組織からOMVが再分離され、また、2尾の腎臓組織からOMV特異遺伝子が検出された。後者の外観および内臓所見は、鰓のわずかな退色、肝臓の退色と白斑病巣、腎臓の退色、腸管の発赤で、ニジマス死亡魚の病兆とほぼ同じであった。これらのことからコレゴヌスの死亡原因はOMVによるものと判断された。

アマゴ、イワナ、ブラウントラウトあるいはフナで死亡はなかった(Table 1-5)。コイおよびウグイでは、攻撃魚および対照魚に死亡が見られたが、腎臓組織からOMVは分離されず、また、OMV特異遺伝子も検出されなかったことから、いずれも外部寄生虫症による死亡が原因と考えられた。

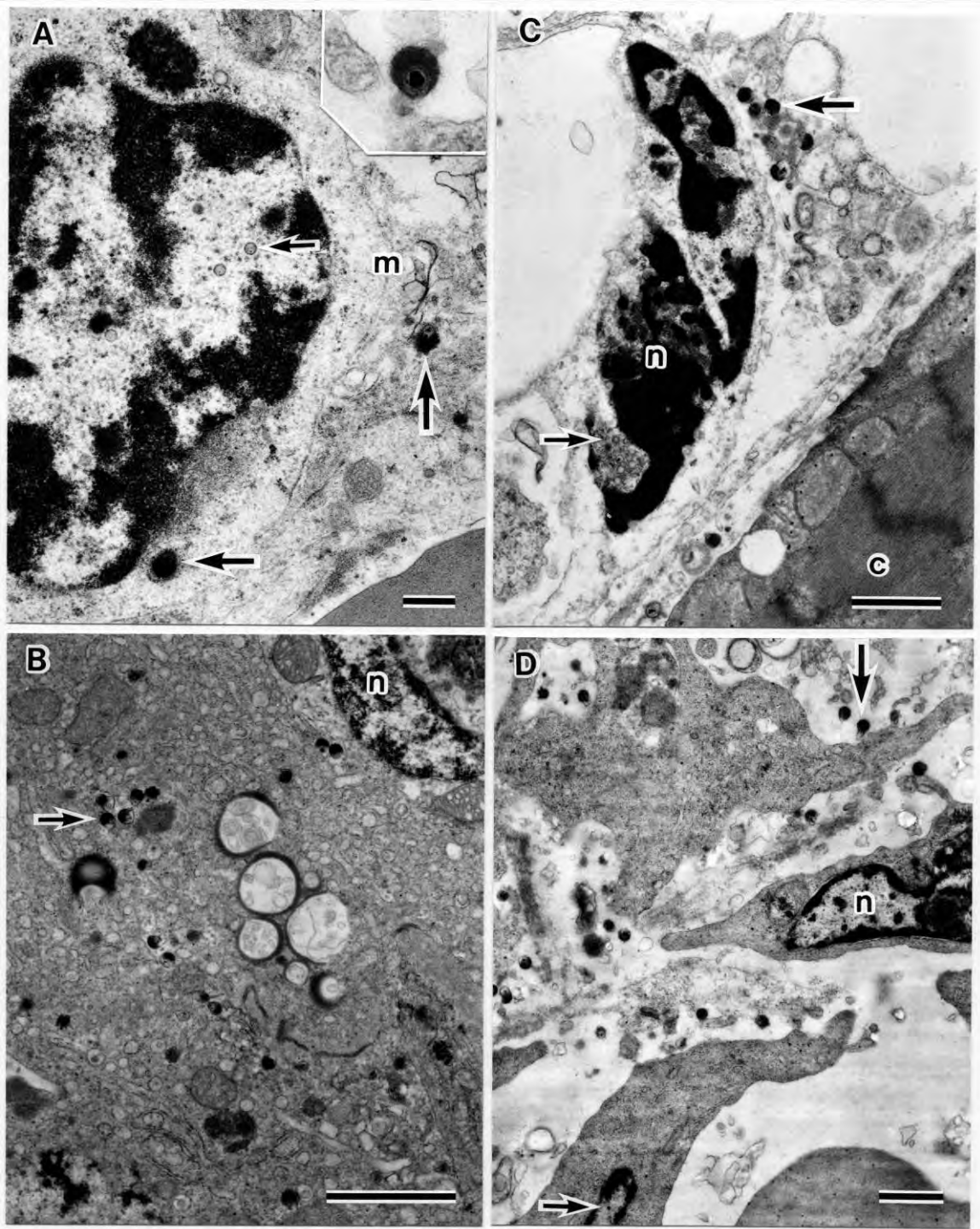


Fig. 1-7. Electron micrographs of OMV-infected cells. (A) OMV-infected hematopoietic cell showed many nucleocapsids in a nucleus and enveloped virions in a cytoplasm. In this cell, an enveloped virion was present in the expanded space between two nuclear membranes. Electron dense chromatin was increased and attached on the inner nuclear membrane. m: outer nuclear membrane. Scale bar= 450 nm. In set shows a virion with a thick envelope (233x220 nm). (B) OMV-infected hepatocytes with many virions in a cytoplasm showing degenerated mitochondria and fragmented sER. Scale bar= 250 nm. (C) OMV-infected cardiac muscle cell showed many virions in the vacuolated sarcoplasm. Nucleocapsids are present within the destroyed nucleus with coagulated chromatin. c: myofibrils of cardiac muscle cell. Scale bar = 1200 nm. (D) OMV-infected splenocytes. Infected splenocytes had been fragmented and many free virions were present among cellular fragments. Scale bar=1,400 nm. Large arrows indicate virions in the cytoplasm. Small arrows indicate nucleocapsids in the nucleus. n: nucleus.

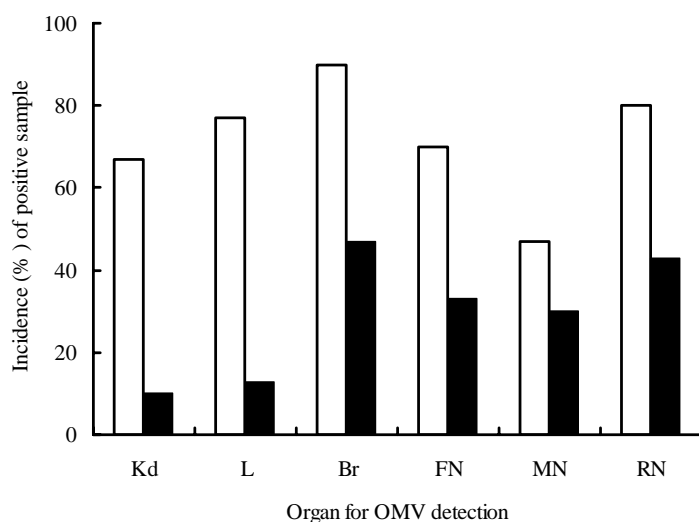


Fig. 1-8. Detection of OMV in different organs of infected fish by PCR and cell culture method. Kd; Kidney, L; Liver, Br; Brain, FN; Front Nerve, MN; Middle Nerve, RN; Rear Nerve. PCR, CPE.

Table. 1-2. Detection of OMV from rainbow trout organs in different maturity stages by PCR and cell culture method.

Stage	No.	Kidney		Liver		Brain		Front nerve		Middle nerve		Rear nerve		Ovarian fluid	
		CPE	PCR	CPE	PCR	CPE	PCR	CPE	PCR	CPE	PCR	CPE	PCR	CPE	PCR
Level 1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		0/9	8/9	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	0/9	0/9	1/9	0/9	1/9	0/9	0/9
Level 2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	5	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	6	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	7	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	8	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
	10	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
		0/10	5/10	0/10	5/10	0/10	6/10	0/10	6/10	0/10	1/10	0/10	4/10	0/10	0/10
Level 3	1	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	+
	3	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
	4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
	5	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
	6	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	7	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	8	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+
	9	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
		1/10	9/10	1/10	6/10	1/10	6/10	0/10	7/10	0/10	4/10	0/10	6/10	5/10	6/10

+: positive, -: negative, NT: not tested,

Level 1: previtellogenesis stage, Level 2: late vitellogenesis stage, Level 3: ovulation stage.

Table. 1-3. Detection of OMV in different stages of maturity of rainbow trout blood by PCR

Stage	No.	PCR
Level 1	1	+
Level 2	1	+
	2	+
	3	+
	4	+
	5	+
	6	+
	7	-
	8	-
	9	+
	10	+
Level 3	1	+
	2	NT
	3	+
	4	+
	5	+
	6	-
	7	-
	8	+
	9	-
	10	-

+: positive, -: negative, NT: not tested,
 Level 1: previtellogenesis stage,
 Level 2: late vitellogenesis stage,
 Level 3: ovulation stage.

Table 1-4. Cumulative mortality of different sized rainbow trout artificially infected with OMV RtNa-0010 strain

Exp.	Challenge method	Body weight (g)	Challenge dose (TCID ₅₀ /fish or m)	No. of challenged fish	No. of dead fish	Mortality (%)
	Intraperitoneal injection	1.3	10 ^{3.8}	50	42	84
			Control	50	1	2
		11.3	10 ^{3.8}	25	22	88
			Control	25	0	0
		114.1	10 ^{3.8}	10	7	70
			Control	10	0	0
	Intraperitoneal injection	11.2	10 ^{2.3}	30	26	86.7
			10 ^{4.3}	30	26	86.7
			Control	30	1	3
	Intraperitoneal injection	95.2	10 ^{2.8}	10	10	100
			10 ^{4.8}	10	10	100
			Control	10	1	10
	Immersion method	1.9	10 ^{1.8}	25	0	0
			10 ^{2.8}	25	2	8
			10 ^{3.8}	25	20	80
			Control	25	0	0

Table 1-5. Susceptibilities of several freshwater fishes to OMV strain RtNa-0010

Fish species	Body weight (g)	No. of dead fish in challenged group / examined	No. of dead fish showing positive CPE/examined	No. of dead fish showing positive PCR/examined	No. of survivors showing positive CPE/examined	No. of survivors showing positive PCR/examined	No. of death fish in non-challenged group/examined
Amago salmon (<i>Oncorhynchus masou ishikawae</i>)	18	0/20			0/10	0/5	0/19
Japanese charr (<i>Salvelinus leucomsenis</i>)	42	0/19			0/9	0/5	0/19
White fish (<i>Coregonus lavaretus mareana</i>)	15	2/20	1/2	2/2	0/9	0/5	0/20
Broun trout (<i>Salmo trutta</i>)	25	0/10			0/5	0/5	0/10
Rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	17	18/20	17/18		0/1	0/1	0/20
Common carp (<i>Cyprinus carpio</i>)	9	4/20	0/4	0/4	0/8	0/5	6/20
Crucian carp (<i>Carassius auratus</i>)	9	0/20			0/10	0/5	0/20
Japanese dace (<i>Tribolodon hakonensis</i>)	7	1/20	0/1	0/1	0/9	0/5	1/20

Challenge dose: $10^{3.8}$ TCID₅₀/fish.

考 察

1999 年から長野県で発生が認められたニジマス的大量死の原因調査を行ったところ、大量死は通年見られ、10 g 前後の幼魚から 1 kg 以上の大型魚に見られた。特に 100 g 以上の魚での発症が全体の 70% 以上を占めた。また、観察した 7 飼育群の累積死亡率は 34 ~ 77% であったが、400 g 以上の大型魚の累積死亡率は 70% 以上と高かった。鰓の退色と鰓弁の出血、肝臓の退色ならびに腹腔内脂肪と腸の発赤が顕著であった。

外部寄生虫は認められず、*Streptococcus iniae* および *Ichthyophonus hoferi* の検出頻度が低いことから、これらは本症の直接の死因とは考えられなかった。一方、OMV 人為感染魚やギンザケのヘルペスウイルス病魚で見られる肝臓の巣状壊死が一部の病魚に認められ (Kimura *et al.*, 1981a; Kumagai *et al.*, 1994)、ウイルス検査において 80% の病魚から分離したウイルスは、何れもヘルペスウイルスに特徴的な多核巨細胞を形成する CPE を示し、抗 OMV 家兎血清により中和され、PCR により OMV の標準株と同じサイズの産物が増幅されたことから、本ウイルスは OMV と同定された。1、10 および 100 g サイズのニジマスに対する感染試験において本ウイルスは高い死亡率をもたらしたと、主要臓器におけるウイルス感染価は $10^{4.9-8.4}$ TCID₅₀/g と高かったことから、本病はサケ科魚類のヘルペスウイルス病と診断した (降幡ら, 2003)。

北海道の養鱒場で初めて発生したニジマスのヘルペスウイルス病が本州へ伝播した経緯は定かでないが、長野県下の場合、発生があった 18 養鱒場の内 10 養鱒場の感染源は購入した活魚であった。また、これらを汚染源とし、同一水系にある 5 養鱒場に水平感染した発症率を含めると、感染源の 83% が活魚の移動に起因したことが明らかになった。恐らく本州の主産県に被害が拡大した原因も活魚の移動による水平感染であると推定される。

ニジマスの自然発病魚および人為感染魚の病理組織学的および電子顕微鏡観察による所見を整理し、他魚種と比較したところ、外観および内臓の病理学的所見はサケ科魚類で報告された所見と同様であったが (Tanaka *et al.*, 1984; 堀内ら, 1989; Kumagai *et al.*, 1994)、本研究では腸管での激しい壊死が認められた。この壊死は最も著しい変化であり、また、腹腔内注射による人為感染と同様に自然感染にも観察された。このことは、OMV が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広がり、各組織で壊死病巣を形成したことを示している。一方で、電顕観察により、細胞の壊死が OMV の増殖と関連していることが明らかとなっ

た。さらに、OMV の明らかな標的細胞は脾臓の脾細胞と莢組織細胞、造血細胞、肝細胞、心筋細胞であった。それは、脾臓、肝臓、腎臓組織のウイルス感染価が $10^{4.9-8.4}$ TCID₅₀/g と高いことから伺えた (降幡ら, 2003)。第一標的細胞については、Tanaka *et al.*, (1984) はサクラムスの成長に従い、造血細胞から肝細胞に変化したとしている。ニジマスの場合、細胞の壊死は肝細胞よりも脾臓で激しく、この病変は腸管の壊死と同様に病魚の全てに観察された。したがって、肝細胞はニジマスにおいて第一標的細胞ではないと考える。

次いで、自然発病魚の魚体内でのウイルス分布について検討したところ、OMV は自然発病魚の腎臓、肝臓、脳、脊椎神経前部、脊椎神経中部および脊椎神経後部の全ての臓器から培養法により検出され、全身感染症の様相を呈していた。肝臓や腎臓は標的臓器の一つであるが、培養法による検出率が低かった。培養検査では臓器の 10 倍希釈液を RTG-2 細胞に接種しているが、細胞毒性により判定不能であった試料が含まれていたことが影響したと考えられる。PCR 法による OMV 特異遺伝子の検出は培養法に比べ全ての部位で検出率が上回り、OMV の検出には PCR 法がより適していると考えられた。さらに、成熟期における感染耐過魚の PCR 法による OMV 特異遺伝子検出結果から、OMV は成熟直前に腎臓に出現し、卵黄形成以降、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。

続いて、異なるサイズのニジマスに対するニジマス由来 OMV の病原性を確認したところ、ニジマス病魚から分離した OMV (RtNa-0010 株) は腹腔内注射および浸漬による人為感染実験で 1 g サイズのニジマス稚魚に対し 84 および 80% の高い死亡率をもたらした。ニジマス稚魚に対しても強い病原性をもつことが明らかになった。さらに、10 g サイズの稚魚および 100 g サイズの成魚に対しても改めて強い病原性が確認された。ニジマスはあらゆるサイズにおいて OMV に高い感受性を示すことから、ニジマスのヘルペスウイルス病の防除対策は魚体サイズに関わらず行わねばならないと考えられる。少なくとも稚魚期では、IHN および IPN 対策と同様に、ウイルスフリー用水を用い、防疫対策の徹底した隔離施設で飼育することで OMV を防除できると考えられる。一方、隔離施設から屋外施設に収容する 5 g サイズ以降については、OMV 汚染の疑われる飼育用水を使用せざるをえない場合が多く、新たな防除対策を講じる必要性が示唆された。

最後に、ニジマス以外の養殖サケ科魚および在来生息魚の OMV 感受性を検討したところ、コレゴヌスに死亡

が確認されたことから、コレゴヌスはニジマス由来OMVに対し感受性を有することが明らかとなった。しかしながら、ジマスの死亡率が90%であったのに対し、コレゴヌスの死亡率は10%と低かった。さらに、ニジマスおよびコレゴヌスを養殖し、ニジマスのヘルペスウイルス病が自然発病した1養殖場において、多くのニジマス群が発病したにもかかわらず、コレゴヌス群には発病が認められなかったことから、コレゴヌスのOMVに対する感受性はニジマスに比べ低いものと推定された。ただし、コレゴヌスはOMVに低いながらも感受性を有するため、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。また、コレゴヌスはOMVキャリアーになる可能性があり、本病の防疫対策上、コレゴヌスは注意を要する魚種の一つであると考えられる。一方、サケ科魚類のなかでもイワナ、アマゴおよびブラウントラウト、また、在来生息魚のコイ、フナ、ウグイにウイルス感染による死亡は認められなかった。また、調査したニジマスのヘルペスウイルス病が発生した養殖場においても、これらの魚種の死亡は確認されていないことから、OMVに対

する感受性はないと考えられる。これらの魚種がOMVのキャリアーになる可能性は低いか無いものと考えられるが、1970年代以降、サケ科魚ヘルペスウイルス病発症魚種が徐々に拡大している経緯をふまえると、今後さらに詳しく検討する必要があると考える。

ところで、サクラマスおよびギンザケのOMV感染耐過魚では、口の周囲、鱗、鰓蓋、体表および眼房に腫瘍が見られる個体が観察されている(Kimura *et al.*, 1981b; Sano *et al.*, 1983; Yoshimizu *et al.*, 1987; 堀内ら, 1989; Kumagai *et al.*, 1995)。実験的にはニジマスにおいてもOMV接種後240日後に見られている(Yoshimizu *et al.*, 1987)。長野県下の孵化場で感染耐過群を2000年以来観察してきたが、産卵期までの530日間、池中養殖群に腫瘍を形成した魚を見つけることはできなかった。このことは、ニジマス由来OMVは腫瘍原性を欠如している可能性を示しており、この腫瘍原性については今後さらなる研究が必要である。

第2章 ニジマス由来 *Oncorhynchus masou virus* (OMV-RT株) の環境水中での生存性 および各種消毒剤による不活化

魚類養殖においても、家畜同様に疾病発生リスクは避けられず、その防除対策は重要な課題の一つである。特にウイルス性疾病に対する効果的な治療法は現在のところなく、防除および防疫に頼らざるを得ない。IHNVを始め多くのウイルス性疾病の防除対策として、親魚の病原体保有の有無および既往症歴の把握をはじめ、発眼卵の消毒、飼育用水の殺菌、飼育施設の消毒等を実施し、病原体の侵入を防ぐ対策が取られている。

発眼卵の消毒は発眼卵表面に存在するIHNVウイルスの不活化を目的に、有機ヨード剤が検討されて (Amend and Pietsch, 1972)、その有効性が確認されて以来、サケ・マス増養殖事業においてポビドンヨード剤による卵消毒は不可欠となっている (野村, 1993; 本西, 1998)。また、ポビドンヨード剤以外では、マツカワの受精卵 (モラル期) において 0.5 mg/ のオキシダント海水に 10 分間浸漬する消毒方法がウイルス性神経壊死症原因ウイルスの防除に有効であると報告されている (渡辺・吉水, 2000)。

飼育用水の殺菌に関しては、紫外線およびオゾンを利用した殺菌装置が普及している (吉水・日向, 1992; 吉水, 1992; 吉水, 1998)。紫外線殺菌は紫外線 (波長 250 ~ 260nm) を水に照射して、水中に存在する微生物の DNA に傷をつけて殺菌する方法である。紫外線殺菌装置において、一般的な低圧紫外線ランプの照射量は $10^4 \mu W \cdot sec/cm^2$ 程度であり、グラム陰性の魚類病原細菌、ラドウイルス、ヘルペスウイルスおよびイリドウイルスは不活化可能である (木村ら, 1976; 吉水ら, 1986b)。長野県水産試験場では飼育用水確保のために低圧紫外線ランプを用いた紫外線殺菌装置を導入し、IHNV対策に効果を上げている (吉水ら, 1991; 本西, 1997)。この成果を基に、ニジマスおよび在来マスの淡水養殖において紫外線殺菌処理が広く行われている。最近では $10^5 \mu W \cdot sec/cm^2$ 程度の照射量が得られる中圧紫外線ランプを用いた高出力の流水式紫外線殺菌装置が開発され、一部の施設で稼働している (Kasai and Yoshimizu, 2002; 笠井ら, 2002)。

一方、オゾン殺菌は高圧放電法により発生した酸化力の強いオゾン処理槽に吹き込み、飼育水中に存在する微生物を殺菌する方法である (笠井・吉水, 2001)。ギンザケおよびニジマス養殖を中心に、オゾンによる飼育用水の殺菌と水質改善を目的に低濃度のオゾン

散気管から直接魚を飼育している養殖池の水中に吹き込む方法が広く普及したが、飼育水中のオゾン濃度から判断して殺菌効果は期待できなかった。海水のオゾン殺菌は淡水と異なり、オゾンガス気泡の直接作用と共に、海水をオゾン処理した際に生成されるオキシダントの殺菌作用によるところが大きい (伊藤ら, 1997)。この残留オキシダントは長期間残留し、魚毒性があるため、殺菌後海水は活性炭槽を通し、オキシダントを除去する必要がある (笠井・吉水, 2001)。独立行政法人水産総合研究センター厚岸栽培漁業センターではマツカワのウイルス性神経壊死症対策に本装置を導入し、オキシダント濃度 0.5 mg/ で 5 分間処理後活性炭槽を通し飼育用水として使用している (Watanabe *et al.*, 2000)。

近年、食塩水あるいは海水を電気分解して得られる電解水が水産分野へ応用されつつあり、その殺菌作用は電解水中に生成した次亜塩素酸等によるものである。笠井ら (2000) は流水式電解装置による魚類病原体の殺菌および不活化効果を検討し、飼育用水中の細菌に対しても有効な殺菌能力を有することを明らかにした。さらに、実用的には不可能とされてきた飼育排水の殺菌が可能になることを報告している (笠井ら, 2001a, b)。

養殖施設の消毒に関しては、飼育池、飼育器具、飼育管理者の手足および着衣等の消毒が水平感染を防除する上で重要である。IHNVに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果はエタノール、メタノール、プロパノール、クレゾール石鹼、ヨード剤、逆性石鹼製剤、石炭酸および塩素剤等を対象に検討されてきた (井上ら, 1991a, b)。IHNVは全ての消毒剤で不活化されたものの、塩素剤は有機物の混入により明らかな殺ウイルス効果の低下が認められ、アルコール系消毒剤およびクレゾール石鹼では活性阻害は少なかった。IPNVの場合はメタノール、クレゾール石鹼、ヨード剤および塩素剤で本ウイルスは不活化されるが、IHNV以上に使用条件や使用方法が厳しく、消毒が容易でないことが明らかになっている (井上ら, 1990; 井上ら, 1991b)。現在、内水面のサケ科魚類の防疫施設において、飼育池では塩素剤が、網類などの飼育道具、着衣および飼育管理者の手などは逆性石鹼製剤が、飼育管理者の手はアルコール類が、飼育管理者の足 (長靴) はクレゾール石

鯀あるいは塩素剤が主に使用されている。前述したオキシダント海水および電解海水を使用できる施設では、その殺菌効果を利用し、飼育器具類を一定時間浸漬することにより十分な消毒効果が得られている(渡辺・吉水, 1998, 2001)。古くから行われている飼育池や網類の天日干しは乾燥と日光消毒を兼ねた消毒法の一つと見なすことができ、菌および寄生虫の卵や幼生の消毒に簡便かつ有効な手段であり、塩素剤あるいは逆性石鹼製剤等を併用することによりさらに効果を増大させることができる。

このように、魚類病原体に対する多くの防除対策の知見がありながらも、内水面のサケ科魚類の養殖場では一連の防除対策が行われにくい状況にある。特に、稚魚期以降の屋外飼育池において排水を直接次の池に注水する構造の池では、一部の池のみ注水を中断できないため、飼育池の消毒が困難な状況となっている。古い養殖場にこの構造の池が多く、飼育池の消毒を行うためには系列全体の飼育を一時中断しなければならない。このような施設的な問題点を抱え、突発的に起こる疾病に対して常に飼育池の消毒を行うことは養殖経営上大きな問題であり、防除対策が進まない原因の一つとなっている。

本章では、消毒剤によるサケ科魚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、飼育用水中におけるOMV-RT株の生存性に着目し、微生物生態を利用した自然に優しい防除法の可能性を検討した。第2節では、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。

第1節 飼育用水中におけるOMV-RT株の生存性

目 的

長野県のニジマス主産地では、同一水系に複数の養殖場が存在し、その飼育排水が再び飼育用水として再利用されている。上流の養殖場で疾病が発生すると下流の養殖場でも同一疾病が発生するが、必ずしも上流から下流に順次発病するとは限らない。飼育魚の健康状態の違いにもよるが、その原因の一つとして飼育用水中の微生物の関与が考えられる。IPNVの魚類生息環境中での消長に関してToranzo and Hetrick(1982)およびToranzo *et al.* (1983)は海水中の微生物がIPNVの不活化に関与していると報告し、IHNVおよびOMVの不活化現象を検討した吉水ら(1986a)も飼育用水中の

微生物およびその産生物質の関与を示唆している。

こうした飼育用水中におけるウイルスの不活化現象を活用し、少量の消毒剤で有効にウイルス防除法の確立を検討するため、養殖場周辺の各種用水中におけるOMVの生存性を検討した。

材料と方法

供試ウイルス

2000年に長野県のふ化場においてニジマス病魚(体重211g)から分離されたOMV(RtNa-0010株)を供試した。ウイルスの培養にはRTG-2細胞を用い、15℃で培養して得られた培養上清を試験に供するまで-80℃にて保存した。

供試水

飼育用水として、わさび田における湧出直後の水(以下湧水と言う)、その水を起源とする未使用の養殖用水(以下未使用養魚用水と言う)、養殖場飼育排水(以下使用後養魚用水と言う)、養殖池の泥を10%懸濁した蒸留水(10%w/w湿重量、以下泥水と言う)および犀川の河川水(以下河川水と言う)を供試した。各種用水は、0.20μmフィルターろ過除菌処理あるいは高圧滅菌(121℃、15分)処理を行い、無処理水とともに試験まで4℃で保存した。

供試用水中でのウイルスの生存性

3本のガラスバイアルビン(16.5×45mm)に上記供試用水を0.5mlとり、 $10^{5.7}$ TCID₅₀/mlのOMV培養液を0.5ml添加後、10、15および20℃にて7日間静置した。1、3、5および7日後に試料のウイルス感染価をRTG-2細胞を用い、96wellマイクロプレートによる50%感染終末点法により測定した。なお、試料の希釈にはHanks' BSS(penicillin-G 800IU/ml, streptomycin 800μg/ml, nystatin 200units/ml)を用いた。

結 果

10℃における供試水中でのウイルスの消長

各供試水にOMVを懸濁し、10℃で保存した場合、高圧滅菌および濾過除菌した各供試水中のウイルス感染価は7日間ほぼ安定していた(Fig.2-1-1)。しかし、無処理および高圧滅菌処理した泥水では、懸濁後1日目に検出限界以下になり、15℃および20℃の場合でも同様であった。

15℃における供試水中でのウイルスの消長

15 で保存した場合、高圧滅菌処理およびろ過除菌処理した各供試水のウイルス感染価は3日目あるいは5日目までほぼ安定であったが、7日目にかけて漸減傾向を示した (Fig.2-1-2)。一方、無処理の各供試水のウイルス感染価は、5日目以降急激な減少傾向を示し、湧水は7日目、未使用養魚用水、使用後養魚用水および河川水は5日目に検出限界以下となった。

20 における供試水中でのウイルスの消長

20 で保存した場合、各供試水のウイルス感染価は1日目以降急激な減少傾向を示し、3日目に検出限界前後に、5日目には全ての供試水で検出限界以下となった (Fig.2-1-3)。

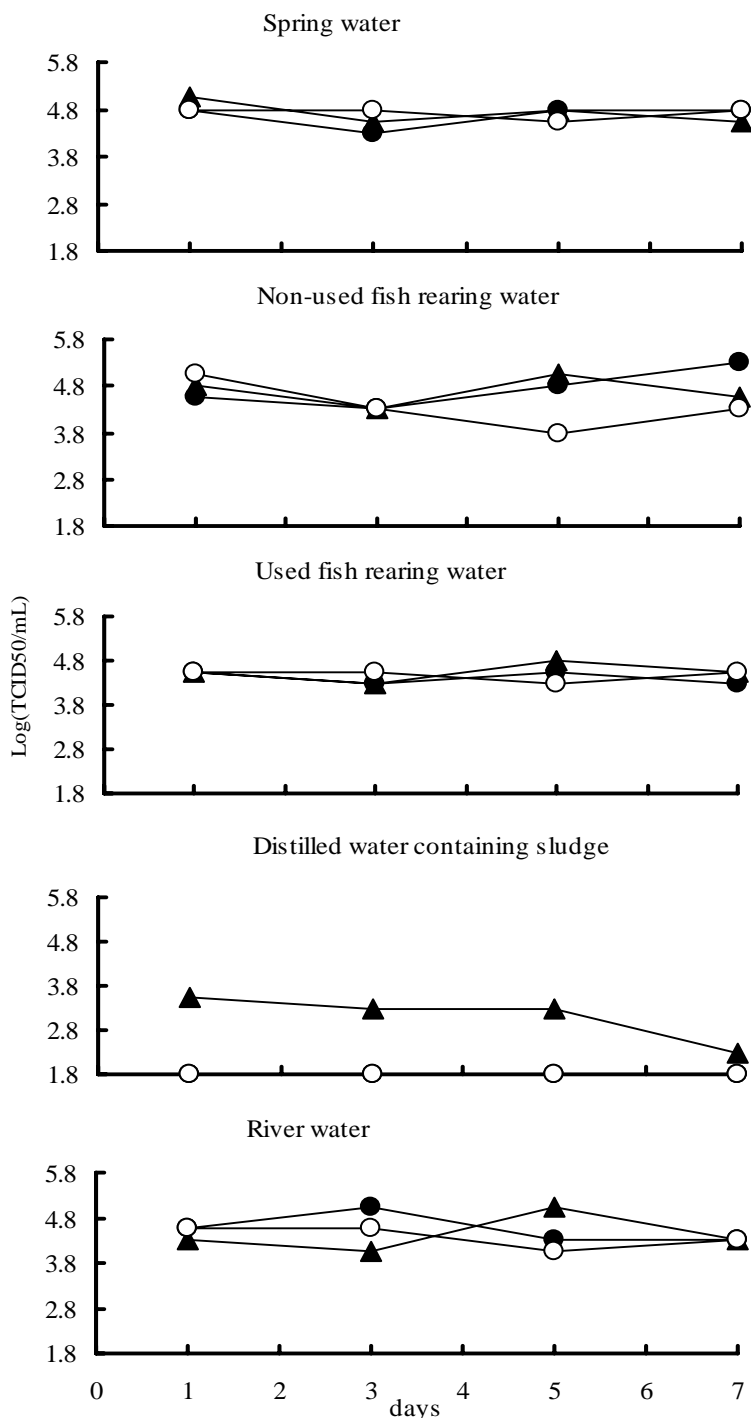


Fig. 2-1-1. Survival of OMV in spring water, non-used fish rearing water, used fish rearing water, distilled water containing sludge and river water which were autoclaved (○), filtered (△) and non-treated (●), respectively at 10 .

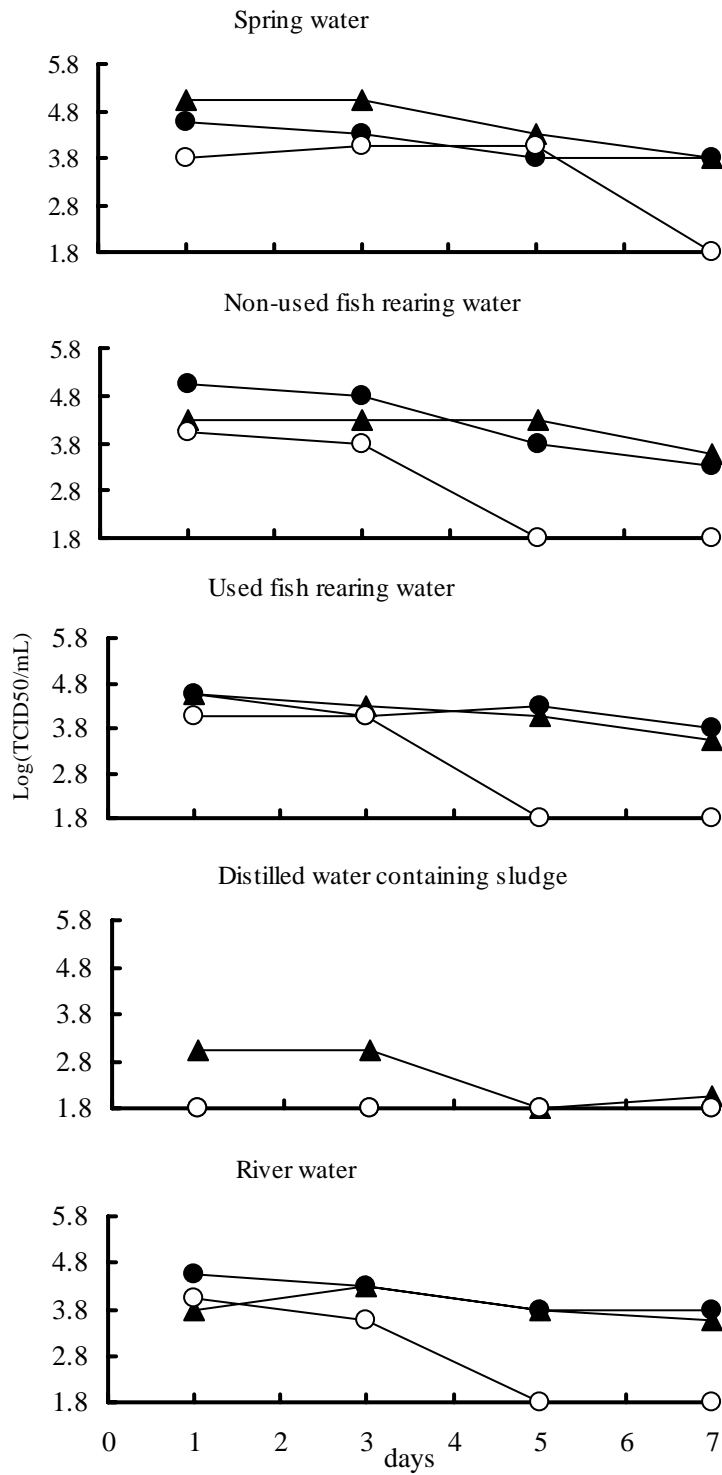


Fig. 2-1-2. Survival of OMV in spring water, non-used fish rearing water, used fish rearing water, distilled water containing sludge and river water which were autoclaved (●), filtered (○) and non-treated (▲), respectively at 15 °C.

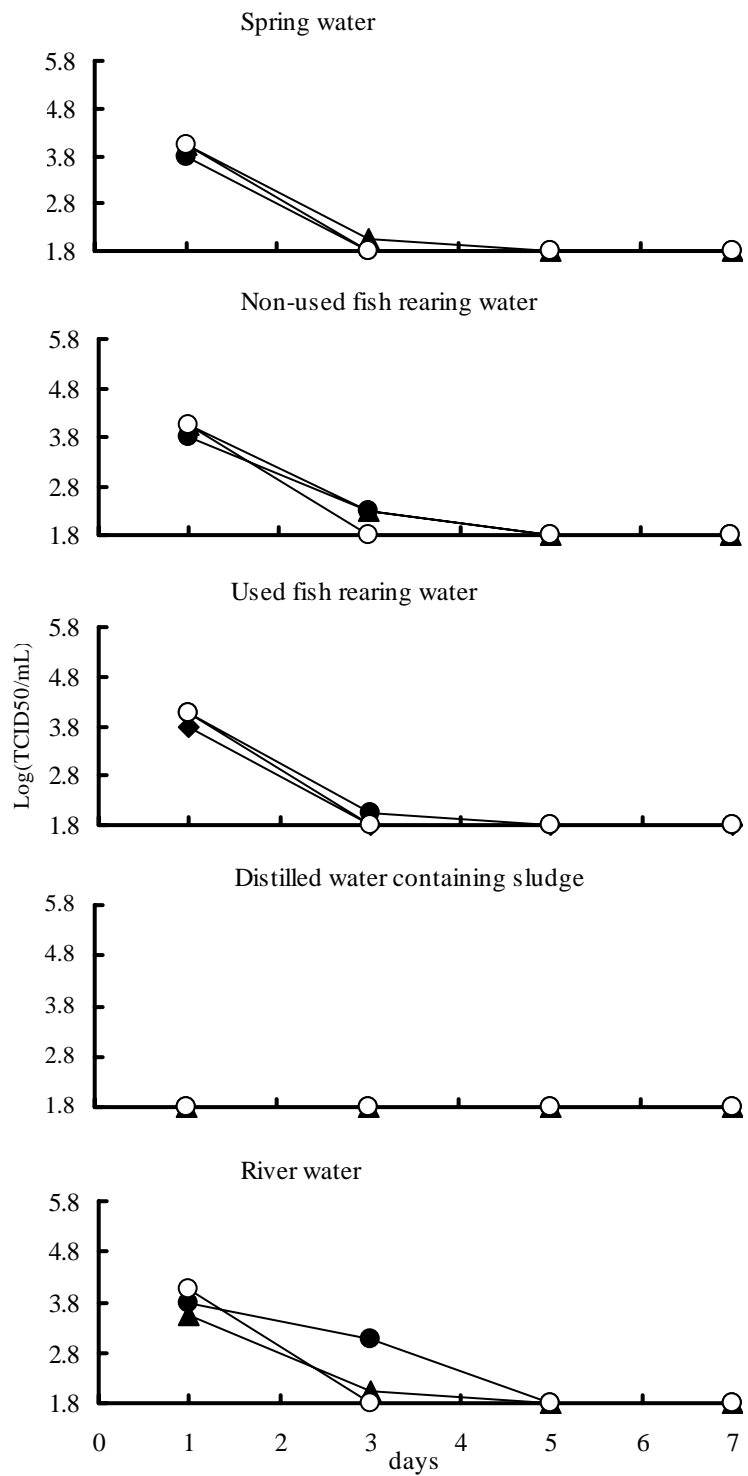


Fig. 2-1-3. Survival of OMV in spring water, non-used fish rearing water, used fish rearing water, distilled water containing sludge and river water which were autoclaved (○), filtered (△) and non-treated (●), respectively at 20 °C.

考 察

本節では、養魚場周辺の飼育水中におけるOMVの生存性を検討した。高圧滅菌あるいは過滅菌した各供試水中におけるOMVの生存性を無処理の各供試水と比較したところ、10 および 15 ではいずれもほぼ安定あるいは漸減傾向であったが、無処理の各供試水は 15 になると急激な感染価の減少が観察された。このような飼育用水中に懸濁した場合に急速なウイルスの不活化が観察される現象は、IHNおよびサクラマスから分離されたOMVでも報告されており(吉水ら,1986a)、本試験においても吉水ら(1986a)の報告同様に飼育水中に存在する細菌が菌体外へ産生した物質およびウイルスの菌体への吸着による可能性が示唆された。なお、20 では急激な感染価の減少を示し、無処理の供試水は3日目に、高圧滅菌あるいは過滅菌した各供試水は5日目以降検出限界以下となった。これは、OMVの温度耐性が弱いためと考えられ、予備試験においても20 で保持した場合120時間(5日)で99%不活化していた。

長野県のニジマス養殖は、育水温が10~15の範囲であることが多く、この水温ではOMVの感染性が15では3日程度、10では7日以上保持されていた。今回の試験では14日後のOMVの感染性を検討していないが、吉水ら(1986a)が行った飼育水中のOMVの生存性では、15で3日未満、10で3日程度と報告されているので、本試験における10でのOMVの生存性は7日程度と推定される。これらOMVの生存性の結果から、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日間放置することにより養殖池をOMVフリーにできる可能性が示された。この方法は養殖を中断せずに養殖池のOMVを防除でき、養殖経営者にとって十分実行できる防除対策であると考えられる。

第2節 各種消毒剤によるOMV-RT株の不活化

目 的

IHNに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果はエタノール、メタノール、プロパノール、クレゾール石鹼、ヨード剤、逆性石鹼製剤、石炭酸および塩素剤で検討され、何れの消毒剤でも不活化されたが、塩素剤は有機物の混入により殺ウイルス効果の低下があったとしている(井上ら,1991a,b)。

本節では消毒剤によるOMVの防除対策の確立を目的に、現在養殖場でIHNおよびIPNVの消毒に用いられている消毒剤として、卵消毒に用いられているポビド

ンヨード液、一般に手足の消毒に使用されている塩化ベンザルコニウム液およびクレゾール石鹼液、さらに飼育池の消毒に使用されている次亜塩素酸ナトリウム液、卵膜軟化症対策や外部寄生虫の駆虫剤として使用された過マンガン酸カリウム液および感染細胞の固定に用いられるホルムアルデヒド液のOMVに対する殺ウイルス効果を検討した。

材料と方法

供試ウイルス

供試ウイルスとしてOMV(00-7812株)を用いた。ウイルスの培養はCHSE-214細胞を用い、15で14日間培養後、培養液を回収してミリポアフィルターHA(0.45 μ m)で濾過し、試験に供するまで-80に保存した。

供試消毒剤

ハロゲン系消毒剤としてポビドンヨード液(有効ヨウ素50ppm、水産用イソジン;明治製菓)および次亜塩素酸ナトリウム液(和光純薬工業)を、フェノール系消毒剤としてクレゾール石鹼液(ヤクハン製薬)を、アルデヒド系消毒剤としてホルムアルデヒド液(和光純薬工業)を、界面活性剤として塩化ベンザルコニウム液(10%水溶液、オスパン液;武田薬品工業)を、過酸化水素系消毒剤として過マンガン酸カリウム(和光純薬工業)を用いた。次亜塩素酸ナトリウム液の反応停止剤としてチオ硫酸ナトリウム(関東化学)を用いた。

なお、ホルマリン、クレゾール石鹼液およびオスパンは公称含有物換算、ポビドンヨード液は公称有効ヨード換算、次亜塩素酸ナトリウムは実測有効塩素量、過マンガン酸カリウムは純物換算で濃度を表示した。供試消毒液およびチオ硫酸ナトリウムはいずれもミリポアフィルターHAで濾過除菌し、また過マンガン酸カリウムは1M水溶液を原液とし、消毒液を所定の濃度に希釈して試験に供した。なお、次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度はヨウ素滴定法により測定した。

供試消毒剤のOMV不活化効果

供試消毒薬のOMV不活化効果は木村・吉水(1990)の方法に従って行った。すなわち、所定濃度に希釈した消毒薬と2,000あるいは3,000PFU/200 μ に調整したウイルス液を等量混合し、0、15および25で30秒間あるいは20分間反応させた。反応液に9倍量のHanks'BSを加えて消毒薬の細胞毒性を軽減した後、予め24wellプレートに培養したCHSE-214細胞に200 μ /wellず

つ2穴に接種し、プラーク法(Kamei *et al.*,1987)で反応液ウイルス感染価の減少率求めた。また、OMVの感染価を90%以上減少させる各種消毒剤の最小濃度も求めた。

なお、次亜塩素酸ナトリウム液はウイルスと反応させた後、混合液の1/2量の0.01Mチオ硫酸ナトリウムで中和した後9倍量のHanks' B S Sを加え、ウイルス感染価を求めた。対照にはHanks' B S Sを用いた。

有機物存在下での供試消毒剤のOMV不活化効果

有機物存在下における各種消毒剤のOMV不活化効果を検討するため、所定濃度に調整した各種消毒剤にペプトン(BACT™ peptone, DIFCO)を最終濃度が0.1あるいは1.0%となるよう添加し、前述と同様にウイルス液と15で30秒間反応させた後、ウイルス感染価の減少を求めた。ペプトン濃度が0%の時の不活化率を100%としてペプトン存在下の各種消毒剤による不活化率を求めた。

結 果

供試消毒剤のOMV不活化効果

100ppmのポビドンヨード液は反応温度にかかわらず0.5分および20分の反応時間でOMVを完全に不活化したが、20ppm以下ではOMVを不活化することはできなかった(Table 2-2-1)。

3,500ppmのホルムアルデヒド液は0および15で反応時間にかかわらずOMVを完全に不活化したが、25で0.5分間処理の場合、プラーク減少率は98%で、完全

に不活化できなかった。また、ホルムアルデヒド液の処理濃度あるいは処理温度が低下、また反応時間の短縮によりその不活化効果は減少傾向を示した(Table 2-2-2)。

OMVの感染価を90%以上減少させる各種消毒剤の最小濃度はポビドンヨード液、オスバン液およびクレゾール石鹼液は反応条件にかかわらずいずれも100ppmであった。次亜塩素酸ナトリウム液は、反応時間が0.5分の場合50ppm、20分では1ppmであった。過マンガン酸カリウム液は反応条件にかかわらずいずれも15.8ppmであった。ホルムアルデヒド液は反応時間が0.5分の場合、0および15では700ppm、25では350ppmであった。また、反応時間が20分の場合、0および15の最小濃度はそれぞれ700および350ppmであった(Table 2-2-3)。

有機物存在下での供試消毒剤のOMV不活化効果

ペプトンを0.1および1.0%添加したホルムアルデヒド液の不活化効果はペプトン未添加時の不活化率の93および96%で、有機物存在下でも不活化効果にほとんど影響は認められなかった。しかし、ペプトンを0.1および1.0%添加したポビドンヨード液ではそれぞれペプトン未添加時の不活化率の100および0%で、有機物存在下での不活化効果の低下が認められた。同様に、オスバン液は0および0%、クレゾール石鹼液は0および29%、次亜塩素酸ナトリウム液は0および8%、過マンガン酸カリウム液は5および0%といずれも不活化効果は低下した。

Table 2-2-1. Plaque reduction of OMV at different temperature and reaction time by Iodophor

Temperature ()	Reaction time (min)	% of plaque reduction				
		Concentration of disinfectant (ppm)				
		100	20	10	2	1
0	0.5	100	62	0	0	0
	20	100	83	0	0	0
15	0.5	100	60	22	1	13
	20	100	65	27	9	16
25	0.5	100	5	0	0	0
	20	NT*	NT	NT	NT	NT

*NT: not tested.

Table 2-2-2. Plaque reduction of OMV at different temperature and reaction time by Formaldehyde

Temperature ()	Reaction time (min)	% of plaque reduction				
		Concentration of disinfectant (ppm)				
		3,500	700	350	70	35
0	0.5	100	93	77	15	26
	20	100	95	87	21	29
15	0.5	100	96	87	31	4
	20	100	98	96	35	39
25	0.5	98	100	92	40	3
	20	NT	NT	NT	NT	NT

NT: not tested.

Table 2-2-3. Minimum concentration of disinfectants to show the 90% plaque reduction of OMV at different temperature and reaction time by Formaldehyde

Disinfectants	Reaction time (min)	Concentration of disinfectant (ppm)		
		0	15	25
Iodophor	0.5	100	100	100
	20	100	100	NT
Benzalkonium chloride	0.5	100	100	100
	20	100	100	NT
Saponated cresol	0.5	100	100	100
	20	100	100	NT
Sodium hypochlorite	0.5	50	50	50
	20	1	1	NT
Potassium permanganate solution	0.5	15.8	15.8	15.8
	20	15.8	15.8	NT
Formaldehyde	0.5	700	700	350
	20	700	350	NT

NT: not tested.

考 察

本節では、ポビドンヨード液、塩化ベンザルコニウム液、クレゾール石鹼液、過マンガン酸カリウム液、次亜塩素酸ナトリウム液およびホルムアルデヒド液のOMVに対する不活化効果について検討した。

羽鳥ら(2003)は、ポビドンヨード液、次亜塩素酸ナトリウム液、塩化ベンザルコニウム液、クレゾール石鹼液、ホルムアルデヒド液および過マンガン酸カリウム液について、IH NおよびOMVの感染価を90%以上減少させるに要する最小濃度を検討し、IH Nについては反応温度15・0.5分ではそれぞれ100、50、200、100、3500および160ppm、反応温度15・20分ではそれぞれ100、10、100、50、3500および16ppmとしている。OMVについては本試験結果とほぼ一致していた。

以上より、各種消毒剤がOMVを不活化する濃度はI

H Nの場合に比べ同程度かそれ以下であったことから、従来のIH Nに対する防除対策を実施すればOMVに対しても十分な防除効果が期待できると考えられた。すなわち、ポビドンヨード液による受精直後の受精卵、検卵後の発眼卵およびそれら使用機材の消毒を行い、さらに、次亜塩素酸ナトリウム液による飼育池および飼育管理者の足(長靴)、塩化ベンザルコニウム液による網類などの飼育道具、着衣および飼育管理者の手など、クレゾール石鹼液による飼育管理者の足(長靴)の消毒が有効であると考えられる。また、各消毒剤の特徴をふまえ、次亜塩素酸ナトリウム液は有機物の混入による殺ウイルス効果の低下が起きないように注意するとともに、手足の消毒等日常頻繁に繰り返し使用する消毒液は2~3日毎に定期的に、あるいは、汚れてきたら早めに新しい消毒液に取り替えることが必要である。

第3章 ホルマリン不活化OMVワクチンの開発

IHNおよびIPNは、ヨード剤による発眼卵の消毒ならびに本ウイルスに感受性が高い仔・稚魚期を非汚染水で飼育するなどの防疫対策を講じることで被害の軽減を図ってきた。しかし、ニジマスのヘルペスウイルス病は全てのサイズで発病するため、OMVフリーの稚魚を防疫施設からOMV汚染が疑われる屋外池に収容した場合、OMVに感染・発病することは想像に難くない。そのため、IHNおよびIPNで行われている稚魚期の防除対策に加え、成魚期の新たな防除対策が必要となった。

抗生物質および合成抗菌剤などの化学療法剤の一部が、魚類の細菌感染症の治療あるいは寄生虫の駆除を目的に水産用医薬品に指定され、治療に使用されている。また、抗ヘルペスウイルス剤としてフォスフォノアセテートやアシクロビルをはじめとする核酸誘導体が開発され、ヒトのヘルペスウイルス病治療に使用されている。OMVはこれら抗ヘルペスウイルス剤に感受性を有し(Kimura *et al.*, 1983a, b; Suzuki *et al.*, 1987a, b)、*in vivo*においても感染症の抑制と腫瘍の発現抑制が認められている(Kimura *et al.*, 1983b)。しかし、本薬剤は魚類のウイルス病の治療薬としては認可されておらず、使用できたとしても薬価の面で経済的負担が大きいと考えられる。

そこで、魚類の生体防御機構を利用して病気の発生を防ぐ、ワクチンの開発を考えた。魚類ワクチンは病原体全体を使用する不活化ワクチンと有効な成分を精製して使用する成分ワクチンに大別される。前者は病原体をホルマリン、クロロホルム、加熱により不活化したもので、後者は細菌のリポ多糖(LPS)やリポゾーム、ウイルス構成タンパクが用いられている。ワクチネーションの方法は筋肉あるいは腹腔内にワクチンを接種する注射法、ワクチン液に魚を一定時間浸漬する浸漬法、また、ワクチンを経口的に投与する経口法がある(飯田, 1996)。現在、国内で利用されている魚類ワクチンは、アユおよびサケ科魚類のピブリオ病(浸漬)、ブリおよびブリ属魚類の α 溶血性レンサ球菌症(経口、注射)、マダイ、ブリ属魚類およびシマアジのイリドウイルス感染症(注射)さらに、これらを組み合わせたワクチンとしてブリの α 溶血性レンサ球菌症およびピブリオ病(注射)、ブリ属魚類のイリドウイルス感染症および α 溶血性レンサ球菌症(注射)がある。これらワクチンはいずれも不活化ワクチンである。国外で市販されている魚類ワクチンはせっそう病、コイの穴あき病、ピブリオ病、冷水性ピブリオ病、冬季

潰瘍病、パスツレラ症、ナマズの腸敗血症、レッドマウス病、カラムナリス病、 β 溶血性レンサ球菌症、細菌性腎臓病、伝染性脾臓壊死症、伝染性サケ貧血症、サケ脾臓病等がある(飯田, 2003)。

第1章で述べたようにニジマスのヘルペスウイルス病の被害は大きく、本疾病の治療法がない現状においてワクチンの開発は急務である。そのため、ニジマス成魚期におけるヘルペスウイルス病の防除対策を目的にホルマリン不活化ワクチンの開発の検討を行った。

一方、IHN、IPNおよびサケ科魚ヘルペスウイルス病などのウイルス感染症を耐過し、回復した魚から原因ウイルスを分離することは困難である。しかし、感染耐過魚が成熟すると生殖産物中にウイルスが再び出現することはよく知られている。吉水ら(1988)は、1976~1986年にかけて北日本の遼上および養殖サケ科魚類採卵親魚(サクラマス、シロザケ、カラフトマス、ヤマベ、ニジマス)の卵巢腔液における病原ウイルス保有状況を調査し、サクラマス、シロザケ、ヤマベ、ヒメマスからIHNが、サクラマスおよびヤマベからOMVが分離されたと報告した。卵巢腔液に病原ウイルスが存在すると、産卵の際に環境水中にウイルスが放出され、他の魚へ水平感染するものと考えられ、これらの防除対策が必要である。

本章第1節では、高いワクチン効果を得るためホルマリン不活化ワクチンに必要なウイルス抗原量を検討した。次いで、第2節では第1節で求めたウイルス抗原量をもとにホルマリン不活化注射ワクチンを作製し、成魚に対する感染防御効果を検討した。さらに第3節では、親魚のOMV排出防止ならびにOMV感染環の遮断を目的に採卵親魚候補群に対するホルマリン不活化ワクチンを接種し、卵巢腔液中へのウイルス排出阻止の可能性を検討した。

第1節 ホルマリン不活化OMVワクチンの有効ウイルス抗原量

目 的

ワクチンの投与により魚に免疫を獲得させるには、魚が十分に免疫応答できる健康な状態であること、ワクチンの投与時期、投与方法および投与量が適切であることが必要である(岡本ら, 2001)。

本節では、ワクチンの投与時期として十分に免疫機構

の発達した 30 g のニジマスを対象に、投与方法としてワクチン効果が最も期待できる腹腔内注射法を選択し、ワクチンの投与量、すなわち、1尾あたり 0.1 ml 投与する場合のウイルス抗原量を検討した。

材料と方法

供試魚

長野県水産試験場で生産された S P F 魚で、平均体重 30 g のニジマスを供試した。

ウイルス株

供試株は 2000 年に長野県のふ化場においてニジマス病魚（体重 211 g）から分離された O M V（RtNa-0010 株）を用いた。

ウイルス液の作製

培養細胞は R T G - 2 細胞を用い、まず牛胎児血清（Gibco）を 5 % 添加した M E M（ニッスイ，M E M - 5）で 150 cm² フラスコにて 48 時間培養した。古い培養液を除いた後、新しい培養液 80 ml を加えて、10⁴ TCID₅₀ の O M V を接種し、15 で培養した。ほぼ全ての細胞が C P E を示し、約 80 % 以上の細胞が剥離した時点でウイルス培養液を 150 cm² フラスコのまま -80 で凍結保存した。後日、ウイルス培養液を流水中で急速解凍し、ウイルス感染価をマイクロタイター法（R T G - 2 細胞）により測定後、保存容器に移し替え、使用まで -80 で凍結保存した。総計 1,680 ml のウイルス培養液を作製し、そのウイルス感染価は 10^{6.5-7.8} TCID₅₀/ml、平均 10^{7.0} TCID₅₀/ml であった。

不活化ワクチン液の作製

ウイルス液を 4 で 80,000 G、120 分間超遠心し、100 倍に濃縮した 10⁹ TCID₅₀/ml のウイルス培養液を作製した。さらに、その濃縮培養液を M E M - 5 液で 10 倍および 100 倍に希釈し、10⁷ および 10⁸ TCID₅₀/ml のウイルス培養液を作製した。ウイルスの不活化は最終濃度が 0.3 % になるようホルマリンを培養液に添加し、24 時間後各不活化培養液を R T G - 2 細胞、C H S E - 214 細胞に接種し、C P E の出ないことを確認した。10⁷、10⁸ および 10⁹ TCID₅₀/ml の不活化ワクチン液は使用するまで 4 に保存した。

血中中和抗体価

10⁶、10⁷ および 10⁸ TCID₅₀/0.1 ml /尾をそれぞれ 5 尾の供試魚の腹腔内に注射した。対照魚には M E M - 5 を 0.1 ml

同様に注射した。これらの供試魚は 12.2 ~ 13.8 の脱塩素水道水で流水飼育し、市販配合飼料を給餌した。

不活化ワクチン接種 14 日後に尾静脈より 1 ml シリンジで血液を採取し、4 で 24 時間静置後、3,000 rpm、15 分間遠心し、血清試料を得た。Hanks' B S S で 10 倍に希釈した血清を 96 well マイクロプレート上で 2 倍階段希釈液列を作製し、10² TCID₅₀/0.05 ml に調整したウイルス液を全ての well に等量滴下した。マイクロミキサーを用いて血清とウイルス液をよく混和し、15 で 30 分間反応後、R T G - 2 細胞を播き、15 で 7 日間培養して血中中和抗体価を測定した。

ワクチン接種とウイルス攻撃

10⁶、10⁷ および 10⁸ TCID₅₀/0.1 ml /尾をそれぞれ 10 尾（平均体重 30.2 g）の供試魚の腹腔内に接種した。対照魚には M E M - 5 を 0.1 ml 同様に接種した。これらの供試魚は 13 の脱塩素水道水で流水飼育し、市販配合飼料を給餌した。

ワクチンの有効性は攻撃試験により評価した。不活化ワクチン接種 14 日後にワクチン接種魚および対照魚（平均体重 34.2 g）に RtNa-0010 株を 10^{1.3} TCID₅₀/尾となるよう腹腔内に接種し、10.3 ~ 12.8（平均水温 12.6）で 36 日間観察した。毎日死亡尾数を記録し、死亡魚の腎臓組織からウイルスの再分離を行い、サケ科魚ヘルペスウイルス病による死亡を確認した。

統計解析

死亡率の統計解析は Fisher の直接確率計算法により行った。ワクチンの有効率（R P S ; Amend, 1981）は累積死亡率から次式によって計算した。

$$R P S = \{ 1 - (\text{ワクチン区の死亡率}(\%) / \text{対照区の死亡率}(\%)) \} \times 100$$

結 果

注射後 12 日から死亡が始まり、対照区の累積死亡率が 70 % であったのに対し、1尾あたり 10⁶、10⁷ および 10⁸ TCID₅₀ のウイルス抗原量を腹腔内に接種したワクチン区の累積死亡率はそれぞれ 40、30 および 10 % であった（Fig. 3-1-1）。10⁸ TCID₅₀/尾を接種した区は対照区に比べ有意に低かった（p < 0.01）。10⁶、10⁷ および 10⁸ TCID₅₀/尾を接種した区の R P S はそれぞれ 42.9、57.1 および 85.7 % であった（Table 3-1-1）。各区 5 尾ずつ計 40 尾の血中中和抗体価を測定したが、何れの魚においても血中中和抗体価は検出限界以下であった（Table 3-1-2）。

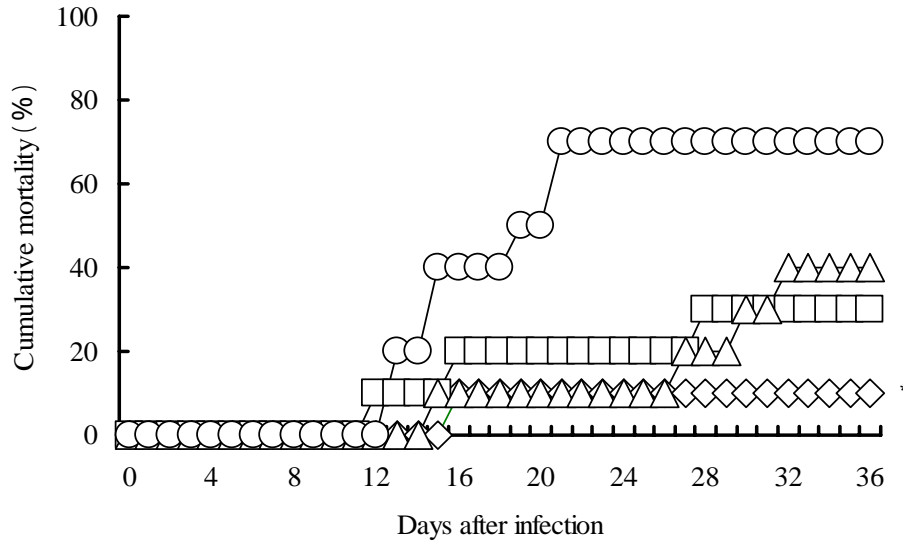


Fig. 3-1-1. Cumulative mortality of rainbow trout that were injected intraperitoneally with $10^{2.3}$ TCID₅₀ /0.1 m /fish of OMV. : vaccinated with 10^8 TCID₅₀/fish. : vaccinated with 10^7 TCID₅₀/fish. : vaccinated with 10^6 TCID₅₀/fish. : unvaccinated. No mortality was observed in the control group (not shown). *: p<0.01 (Fisher's exact probability test).

Table 3-1-1. Dose of effective antigen for vaccine against OMV in rainbow trout

Experiment group	Challenge dose (logTCID ₅₀ /fish)	No. of challenged fish	No. of death fish	Mortality (%)	RPS (%)
vaccinated with 10^6 TCID ₅₀ /fish	2.3	10	4	40.0	42.9
vaccinated with 10^7 TCID ₅₀ /fish		10	3	30.0	57.1
vaccinated with 10^8 TCID ₅₀ /fish		10	1	10.0 *	85.7
unvaccinated with MEM-5		10	7	70.0	
vaccinated with 10^6 TCID ₅₀ /fish	-	10	0	0	
vaccinated with 10^7 TCID ₅₀ /fish	-	9	0	0	
vaccinated with 10^8 TCID ₅₀ /fish	-	10	0	0	
unvaccinated with MEM-5	-	10	0	0	

*: p<0.01 (Fisher's exact probability test)

Table 3-1-2. Neutralizing antibody titers in rainbow trout inoculated with the formalin-inactivated virus vaccine

Experiment group	Neutralizing antibody titer (1:)				
	Data from Individuals				
vaccinated with 10^6 TCID ₅₀ /fish	<10	<10	<10	<10	<10
vaccinated with 10^7 TCID ₅₀ /fish	<10	<10	<10	<10	<10
vaccinated with 10^8 TCID ₅₀ /fish	<10	<10	<10	<10	<10
unvaccinated with MEM-5	<10	<20	<10	<10	<40

考 察

ホルマリン不活化OMVワクチンを作製するにあたり、有効なワクチン抗原量の検討を行った。ウイルス抗原量が 10^8 TCID₅₀/尾の場合、累積死亡率は有意に低く、また、R P Sも85.7%と、ワクチンとして有効な結果が得られた。ウイルス抗原量が 10^7 TCID₅₀/尾の場合、累積死亡率は30%と対照区に比べ有意な差はなかったものの対照区の累積死亡率70%の半分以下であり、またR P Sは57.1%と、ワクチンが有効と評価される60%に近い値を示していることから(Amend,1981)、ウイルス抗原量が 10^7 TCID₅₀/尾の場合も有効な感染防御能が得られるものと推定した。ウイルス抗原量が 10^6 TCID₅₀/尾では十分なワクチン効果的が得られないと判断した。これらの結果から、OMVに対するホルマリン不活化ワクチンの抗原量は 10^7 TCID₅₀/尾程度以上必要であると考えられた。

第2節 ホルマリン不活化ワクチンの有効性

目 的

第1節でOMVに対するホルマリン不活化ワクチンの有効な抗原量を検討し、 10^7 TCID₅₀/尾程度以上必要であると推定した。そこでウイルス抗原量が 10^7 TCID₅₀/尾程度になるようワクチンを作製し、成魚に対する感染防御効果を人為感染試験により評価した。

材料と方法

供試魚

長野県水産試験場で生産されたS P F魚で、平均体重30gのニジマスを供試した。

ウイルス株

供試株は2000年に長野県のふ化場においてニジマス病魚(体重211g)から分離されたOMV(RtNa-0010株)を用いた。

不活化ワクチン液の作製

前節と同様にウイルス液を作製し、凍結・解凍後、ウイルス感染価をマイクロタイター法で測定した。不活化ワクチン液には $10^{7.7}$ TCID₅₀/mのウイルス液を用いた。ウイルスの不活化は、最終濃度が0.3%になるようホルマリンを添加した。ウイルスの不活化の確認は、後日、不活化したウイルス液をRTG-2細胞に接種して、C P Eの出ないことを確認した。不活化ワクチン液は使用するまで4に保存した。

血中中和抗体価

$10^{6.7}$ TCID₅₀/0.1m/尾の不活化ワクチン液を5尾の供試魚の腹腔内に接種した。対照魚にはMEM-5を0.1m同様に注射した。これらの供試魚の脱塩素水道水で流水飼育し、市販配合飼料を給餌した。

不活化ワクチン接種14日後に尾静脈より1mLシリンジで血液を採取し、4で24時間静置後、3,000rpm、15分間遠心し、血清試料を得た。Hanks' B S Sで5倍に希釈した血清を96wellマイクロプレート上で2倍階段希釈液列を作製し、 10^2 TCID₅₀/0.05mに調整したウイルス液を全てのwellに等量滴下した。マイクロミキサーを用いて血清とウイルス液をよく混和し、15で30分間反応後、RTG-2細胞を播き、15で7日間培養して血中中和抗体価を測定した。

ワクチネーションとウイルス攻撃

$10^{6.7}$ TCID₅₀/0.1m/尾の不活化ワクチン液を平均体重23gの供試魚の腹腔内に接種した。対照魚にはMEM-5を0.1m同様に接種した。これらの供試魚は13の脱塩素水道水で流水飼育し、市販配合飼料を給餌した。

ワクチンの有効性は攻撃試験により評価した。不活化ワクチン接種14日後に20尾(平均体重34.2g)のワクチン接種魚および対照魚にRtNa-0010株を $10^{0.9}$ および $10^{2.9}$ TCID₅₀/0.1m/尾となるようそれぞれ腹腔内に接種し、前者は80日間、後者は40日間観察した。攻撃群は攻撃濃度毎に2水槽、攻撃対照群は1水槽を設けた。水温は8.8~12.3(平均水温10.7)で、毎日死亡尾数を記録し、死亡魚の腎臓組織からウイルスの再分離を行い、サケ科魚ヘルペスウイルス病による死亡を確認した。

統計解析

死亡率の統計解析はFisherの直接確率計算法により行った。ワクチンの有効率(R P S; Amend,1981)は前述のように累積死亡率から計算した。

結 果

ワクチネーションの期間中ワクチン接種魚に遊泳異常や摂餌不良など特に異常は観察されなかった。 $10^{0.9}$ TCID₅₀/尾攻撃の場合、腹腔内注射後15日目から死亡が始まり、80日目までにワクチン1および2の累積死亡率はそれぞれ30および10%、対照1および2の累積死亡率はそれぞれ80および75%に達した(Fig.3-2-1)。それぞれのワクチン区の累積死亡率は対照区に比べ有意($p < 0.01$)に低く、ワクチン1および2のR P Sはそれぞれ62.5および86.7%であった(Table 3-2-1)。

10^{2.9} TCID₅₀/尾攻撃の場合、腹腔内注射後 12 日目から死亡が始まり、40 日目までにワクチン 3 および 4 の累積死亡率はそれぞれ 35 および 45%、対照 3 および 4 の累積死亡率はそれぞれ 78.9 および 85% に達した (Fig.3-2-2)。それぞれのワクチン区の累積死亡率は対

照区に比べ有意 (p<0.01) に低く、ワクチン 3 および 4 の R P S はそれぞれ 55.7 および 47.1% であった。

血中中和抗体価を測定したが、ワクチン接種魚に中和抗体価の上昇は認められなかった (Table 3-2-2)。

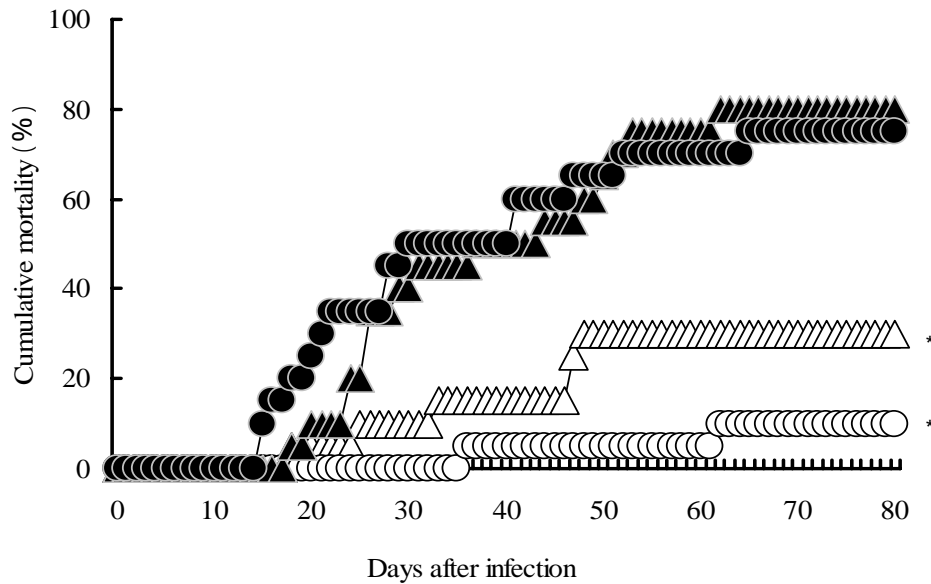


Fig. 3-2-1. Cumulative mortality of rainbow trout that were injected intraperitoneally with OMV. vaccinated 1 (●), vaccinated 2 (▲), control 1 (▨) and control 2 (○) challenged with 10^{0.9} TCID₅₀/0.1ml /fish. No mortality was observed in the control group (not shown). *: p<0.01 (Fisher's exact probability test).

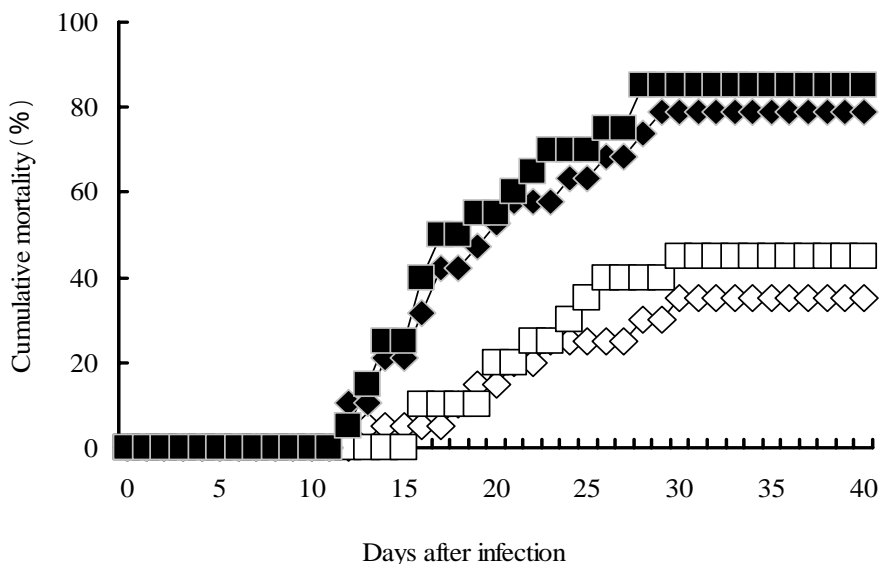


Fig. 3-2-2. Cumulative mortality of rainbow trout that were injected intraperitoneally with OMV. vaccinated 3 (■), vaccinated 4 (◆), control 3 (□) and control 4 (◇) challenged with 10^{2.9} TCID₅₀/0.1ml /fish. No mortality was observed in the control group (not shown). *: p<0.01 (Fisher's exact probability test).

Table 3-2-1. Vaccine efficacy against artificial OMV infection in rainbow trout

Experiment group	Challenge dose (logTCID ₅₀ /fish)	No. of challenged fish	No. of death fish	Mortality (%)	RPS (%)
vaccinated 1	0.9	20	6	30.0 *	62.5
vaccinated 2		20	2	10.0 *	86.7
control 1		20	16	80.0	
control 2		20	15	75.0	
vaccinated 3	2.9	20	7	35.0 *	55.7
vaccinated 4		20	9	45.0 *	47.1
control 3		19	15	78.9	
control 4		20	17	85.0	
vaccinated	-	20	0	0	
control		20	0	0	

*: p<0.01 (Fisher's exact probability test)

Table 3-2-2. Neutralizing antibody titers in rainbow trout inoculated with the formalin-inactivated virus vaccine

Experiment group	Neutralizing antibody titer (1:)				
	Data from Individuals				
vaccinated	<5	<5	<5	<5	<5
control	<5	<5	<5	<5	<5

考 察

前節でホルマリン不活化OMVワクチンの必要抗原量が 10^7 TCID₅₀/尾程度以上と推定したが、今回の試験では $10^{6.7}$ TCID₅₀/尾のワクチン抗原量で試験を行った。 $10^{0.9}$ および $10^{2.9}$ TCID₅₀/尾の2濃度で攻撃試験を行ったが、ワクチン区の累積死亡率はいずれも対照区より有意 (p < 0.01) に低く、また、RPSは47.1~86.7%で、 $10^{0.9}$ TCID₅₀/尾攻撃では60%を超えている。これらの結果から、ニジマスのヘルペスウイルス病に対するホルマリン不活化OMVワクチンは、 10^7 TCID₅₀/尾程度のワクチン抗原量を腹腔内投与すれば有効であることが明らかとなった。

ニジマスのヘルペスウイルス病に対する成魚の防除対策は、隔離施設からOMVの汚染が疑われる屋外池に出す前に不活化ワクチンを接種することにより解決できると考えられる。

第3節 採卵親魚へのホルマリン不活化OMVワクチン接種による卵巣腔液中へのウイルス出現抑制効果

目 的

成熟期に親魚の卵巣腔液中に存在するOMVが、採卵作業に伴い排出され、飼育水が汚染されると養殖場の飼育魚、あるいは、1河川に複数の養魚場が存在する地域では下流の養殖場の飼育魚に水平感染することが十分考えられる。第1章では成熟直前にOMVが魚体内に出現してくることが明らかになった。そこで本節では、採卵親魚の卵巣腔液中へのウイルス出現抑制、ひいてはOMVの感染環の遮断を目的に、成熟前の採卵親魚候補群にホルマリン不活化OMVワクチンを接種し、ウイルスの出現抑制効果について検討した。

方 法

供試魚

静岡県下の民間養魚場において、ニジマスのヘルペスウイルス病がほぼ終息したニジマス親魚候補群を供試した。

不活化ワクチンの作製

ニジマス由来 RKV-3 株あるいは RHV-SH-2000 株を用いて 10^6 TCID₅₀/m のウイルス液を、また、大腸菌による IHN 組換え G タンパク質 (250 µg/m) および *Vibrio anguillarum* (NCMB 6) 培養液 (OD₆₀₀=1.0) を作製した。3 種類の抗原を混合し、最終濃度が 0.3% になるようホルマリンを添加して不活化し、3 種混合不活化ワクチンとした。

ワクチネーション

試験 1 では、採卵 3 ヶ月前、すなわち成熟開始前に上記 3 種混合不活化ワクチン 0.1 m を体側中央の背鰭基部に筋肉内接種した (3 ヶ月前ワクチン接種群)。対照区は無処理とした (無処理群)。

また、試験 2 では採卵 6 ヶ月前の親魚候補群に 3 種混合ワクチンを同様に接種し (ワクチン 1 回接種群)。さらに採卵 3 ヶ月前の同群の一部にブースターとして再度 3 種混合ワクチンを同様に接種した (ブースターワクチン接種群)。なお、供試した OMV 株は試験 1 ではニジマス由来 RKV-3 株を、試験 2 ではニジマス由来 RHV-SH-2000 株を用いた。

卵巣腔液からの OMV 検出

3 ヶ月前ワクチン接種群および無処理群はそれぞれ 60 尾および 20 尾を、またワクチン 1 回接種群およびブースターワクチン接種群はそれぞれ 30 尾および 41 尾を供試した。採卵時の卵巣腔液の採取は吉水・野村(1989)に従い、麻酔した親魚の生殖口に滅菌した 1 mL チップを挿入し、卵巣腔液を採取した。卵巣腔液に同量の Anti.Ink を添加し、4 で一夜静置後、RTG-2 細胞に接種し、15 で 14 日間、CPE の出現を観察した。残った卵巣腔液を用いて PCR による OMV 特異遺伝子の検出 (Aso, 2001) を行った。

血中中和抗体価

試験 1 のワクチン接種群および無処理群はそれぞれ 60 尾および 20 尾を、また試験 2 のワクチン 1 回接種群およびブースターワクチン接種群はそれぞれ 30 尾および 41 尾を供試した。採卵 3 ヶ月前および採卵時に各試験区供試魚の尾静脈より 1 mL シリンジで血液を採取し、前節と同様に血中中和抗体価を測定した。

結 果

採卵親魚候補群に 3 種混合ワクチンを接種した場合のワクチン接種前接種 3 ヶ月後の OMV に対する血中中和

抗体価を Fig. 3-3-1 に示した。ワクチン接種前の平均血中中和抗体価は 1:98 であったが、接種 3 ヶ月後には 1:158 と上昇した ($p < 0.01$)。また、採卵時における血中中和抗体価を比較すると、無処理群が 1:60 ~ 1:640 であったのに対し、ワクチン接種群は 1:320 ~ 1:>1280 と、血中抗体価の著しい上昇が観察された (Fig. 3-3-2)。卵巣腔液からの OMV 特異遺伝子の検出は、非ワクチン接種群の OMV 検出率が 90% であったのに対し、ワクチン接種群は 22% と大きく減少した ($p < 0.01$, χ^2 検定) (Table 3-3-1)。

次いで、ワクチン 1 回接種群およびブースターワクチン接種群の採卵時における OMV に対する血中中和抗体価を Fig. 3-3-3 に示した。ワクチン 1 回接種群の血中抗体価は 1:50 ~ 1:125 の範囲を示し、平均血中抗体価は 1:71 であったが、ブースターワクチン接種群は 1:225 ~ 1:525 の範囲を示し、平均血中抗体価は 1:367 と大幅に上昇した ($p < 0.01$)。卵巣腔液からの OMV 特異遺伝子の検出は、ワクチン 1 回接種群の OMV 検出率が 33% であったのに対し、ブースターワクチン接種群は 12% と減少した ($p < 0.05$, χ^2 検定) (Table 3-3-2)。

考 察

親魚の生息環境への OMV 排出の防止を図り、OMV の感染環の遮断を目的に、採卵親魚候補群に対するホルマリン不活化 OMV ワクチン接種の効果を検討した。採卵親魚に *V. anguillarum* の培養液に OMV と IHN の G タンパク質を混合し、ホルマリンで不活化した 3 種混合ワクチンを注射した結果、OMV に対する血中中和抗体価は非接種対照群に比べ有意に上昇した。その結果、卵巣腔液からの OMV 検出は、対照群の検出率が 90% であったのに対し、成熟 3 カ月前にワクチンを接種した群では 22%、6 カ月前に 1 回接種した群が 33%、3 カ月前に再度追加接種した群は 12% となり、卵巣腔液中への OMV 排出抑制に有効であることが明らかとなった。

採卵場において卵巣腔液は等調液による洗卵作業により排水路等に流出するケースが多い。成熟前の親魚へのホルマリン不活化 OMV ワクチン投与は卵のウイルス汚染を軽減するだけでなく、ウイルスによる生息環境汚染も軽減し、結果的に OMV の感染環の遮断に有効な方法と考えられる。通常、採卵親魚は食用に供さないため、親魚へのホルマリン不活化 OMV ワクチン投与は防疫対策上有効な手段として検討に値すると考える。

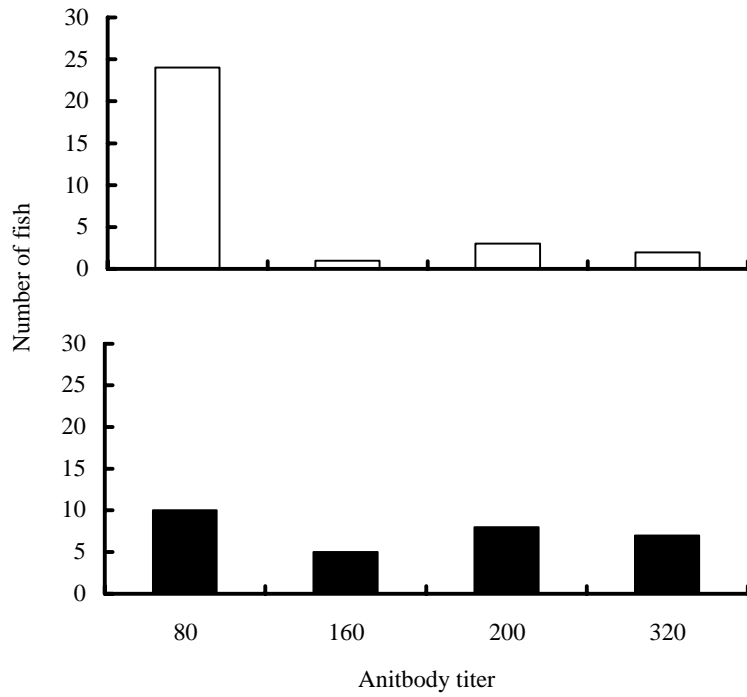


Fig. 3-3-1. Antibody responses against OMV in unvaccinated fish () and fish 3 months () after vaccination at 2,000 analyzed by neutralization test.

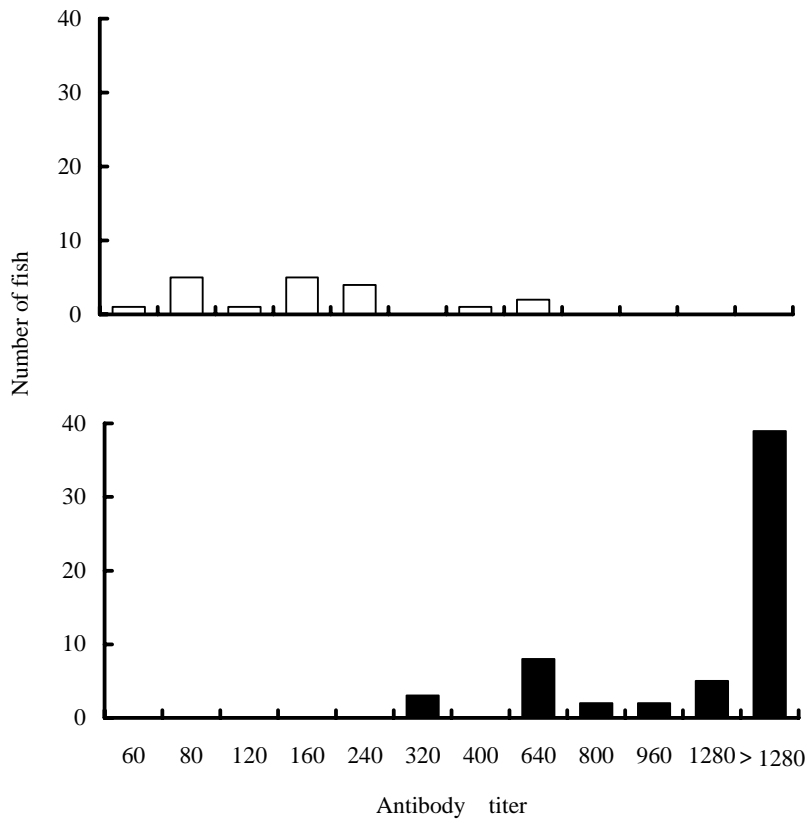


Fig. 3-3-2. Antibody responses against OMV in non-vaccinated fish () and vaccinated fish () analyzed by neutralization test.

Table. 3-3-1. Detecion of OMV from ovarian fluid of rainbow trout by PCR and viral titer by 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)/m .

Experiment group	Positive fish/examined fish (%)	Viral titer (log TCID ₅₀ /m)
vaccinated	13/60 (22%)	1.8 - 4.1
control	18/20 (90%)	2.3 - 4.8

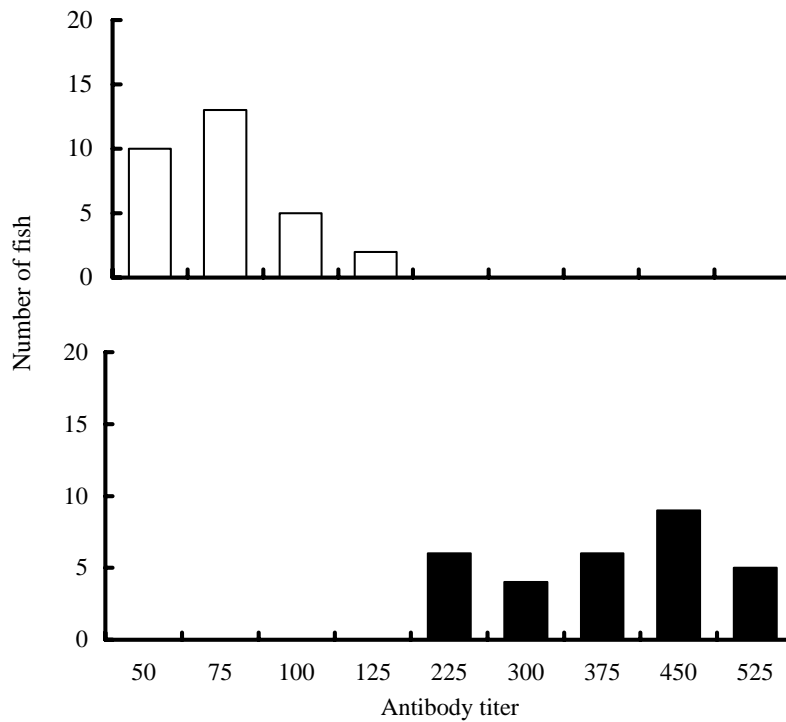


Fig. 3-3-3. Antibody responses against OMV in one time vaccinated fish () and booster vaccinated fish () analyzed by neutralization test.

Table. 3-3-2. Detecion of OMV from ovarian fluid of rainbow trout by PCR and viral titer by 50% tissue culture infective dose (TCID₅₀)/m .

Experiment group	Positive fish/examined fish (%)	Viral titer (log TCID ₅₀ /m)
one time	10/30 (33%)	2.3 - 3.8
booster	5/41 (12%)	2.3 - 3.8

総合考察

本研究は、成魚のニジマスに発生したヘルペスウイルス病の防除技術を確立することを目的として行った。本論文第1章では、長野県内で発生したヘルペスウイルス病とみられるニジマスの大量死の原因究明を行うとともに、県内の発生状況の実態把握およびその感染原因について調査した。また、サクラマス、ギンザケ、シロザケなどの自然感染あるいは人為感染試験から得られた病理組織学的特徴と比較し、ニジマスにおける本疾病の特徴を明らかにした。病魚から分離されたウイルスについてニジマスの異なるサイズに対する病原性を明らかにした。さらに、養殖場で見られる各魚種のニジマス由来株OMVに対する感受性を検討し、防除対策の確立のための必要な基本技術を検討した。さらに、第2章から第3章において原因ウイルスの環境中での生存性、各種消毒剤感受性を検討し、隔離施設から池出しされた後の感染・発症防止を目的に、ワクチンの有効性を検討した。

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、肝臓の退色と肝臓の白斑形成、腹腔内脂肪の発赤および腸の発赤を特徴とする原因不明の大量死が、サケ科魚ヘルペスウイルス病であることを明らかにした。肝臓の病理組織検査から巣状壊死が観察されたこと、腎臓組織の細胞培養によるウイルス分離から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、分離ウイルスは抗OMV家兔血清により中和されたこと、PCRによりOMV特異遺伝子と同一分子量(439bp)の増幅産物が得られたことから本ウイルスはOMVに同定された。1、10および100gサイズのニジマスに対する感染試験において本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 $10^{4.9-8.4}$ TCID₅₀/gと高かったことから、本疾病はサケ科魚ヘルペスウイルス病であると診断した。

次に、ニジマスのヘルペスウイルス病の自然発病魚およびOMV人為感染魚の病理組織学的および電子顕微鏡学的特徴を検討した。外観および内臓の病理学的所見は今まで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、それは最も激しい壊死変化であることを明らかにした。これは、OMVがまず腸管組織の細胞に感染し、そして、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を示唆するものと考えられた。また、第一標的細胞について、Tanaka *et al.* (1984)はサクラマスの成長に従い腎臓の造

血細胞から肝細胞に変化したとしているが、ニジマスの場合、瀕死魚においては全ての魚に肝細胞の壊死が観察されず、一方、全ての病魚には脾臓や腸管の細胞に激しい壊死が観察されたことから、肝細胞はニジマスにおいて主要な標的細胞であるが、第一標的細胞ではない可能性を示唆した。

IHNおよびIPNなどのウイルス感染症を耐過し、回復した魚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再び出現してくる。そこで、OMV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用いて検討した。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、卵黄形成以降、血液と共にOMVは各臓器に運ばれ、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の致死病的病原性は仔魚期のみであり、一方、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病的である。ニジマス由来OMV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は腹腔内接種および浸漬による人為感染実験で1gサイズのニジマス稚魚に対しても強い病原性をもつことが明らかになった。さらに、10gサイズの稚魚および100gサイズの成魚に対しても改めて強い病原性が確認された。

ニジマス養鱒場ではイワナ、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く、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種が養殖池に混入している場合もある。これら養殖場で見られる各魚種のニジマス由来OMVに対する感受性を検討した。コレゴヌスはOMVに低いながらも感受性を有するため、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。また、コレゴヌスはOMVキャリアーになる可能性があり、本病の防疫対策上、コレゴヌスは注意を要する魚種の一つであると考えられた。イワナ、アマゴおよびブラウントラウトのサケ科養殖魚類、また、在来生息魚のコイ、フナ、ウグイに死亡はなく、我々が調査しているニジマスのヘルペスウイルス病の発生した養殖場においてもこれら魚種の死亡は確認されていないことから、OMVに対する感受性はないと推定された。しかし、これらの魚種がOMVキャリアーになる可能性は無いと思われるが、1970年代以降ヘルペスウイ

ルス病発症魚種が徐々に拡大していく経緯をふまえると、今後さらに詳しく検討する必要があると考えられた。

第2章では、消毒剤による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、飼育用水中における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、この飼育用水の水温下ではOMVの感染性が10では7日程度、15では3日程度保持されると考え、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日間放置することにより養殖池をOMVフリーにできる可能性を示した。

次に第2節では、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に対する防除対策を実施すればOMVに対しても十分な防除効果が期待できると考えられた。

第3章第1節では、成魚期の防除対策としてOMVの細胞培養液を用いてホルマリン不活化注射ワクチンの開発を目指した。OMVに対する本ワクチンのウイルス抗原量は 10^7 TCID₅₀/尾程度以上必要であることを明らかにし、これをもとに作製した本ワクチンの感染防御効果を検討し、OMVに対する予防効果が十分期待できる結果が得られた。本症に対する成魚の防除は、隔離施設からOMVの汚染が疑われる屋外池に出す前に本ワクチンを腹腔内に接種することにより解決できると考えられた。

第2節では親魚の生息環境へのOMV排出防止を図り、OMVの感染環の遮断を目的に親魚が成熟する前にホルマリン不活化注射ワクチンを接種したところ、卵巣腔液中へのOMV排出抑制に有効であることが明らかとなった。

以上が本研究の成果である。魚の場合はウイルス病の治療は困難で、現状では防疫対策に頼るしかない。本研究で得られた成果に一般的な防疫対策を加え、ニジマスのヘルペスウイルス病の防除対策は以下のとおりとなる。

衛生管理および施設管理

飼育管理者は専任とし、施設の入り口には踏み込み式の消毒槽および手の消毒器を設置する。飼育管理者の衣類・手・網類などの飼育道具の消毒は所定濃度の塩化ベンザルコニウム液、飼育管理者の足（長靴）の消毒は次亜塩素酸ナトリウム液あるいはクレゾール石鹼液、養殖機材および養殖施設の消毒には次亜塩素酸ナトリウム液

を使用する。

卵管理

受精卵は、受精直後にポピドンヨード剤で50ppm15分間の消毒を行い、ふ化容器に収容する。発眼期に検卵を行い、死亡卵を除去する。再度上記濃度のポピドンヨード剤で消毒し、防疫対策の徹底したふ化施設に収容する。ふ化施設の用水は湧水あるいは地下水を使用する。これが不可能な場合は $10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 以上の紫外線照射を行い、用水の殺菌を行った上で使用する。自動検卵機の使用の際は、検卵後必ず消毒する。

仔稚魚期管理

仔稚魚は成魚と隔離した施設あるいは池で飼育する。飼育用水は湧水あるいは地下水を使用する。これが不可能な場合は $10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 以上の紫外線照射を行い、用水の殺菌を行った上で使用する。日常の管理に飼育する器具・機材は作業ごとに適当な消毒剤で消毒して使用する。

成魚期管理

OMVの汚染が疑われる用水を使用する場合には、屋外池に収容する前にホルマリン不活化OMVワクチンを接種する。ニジマスのヘルペスウイルス病が発生した場合は、できるだけ速やかに発病群の処分を行い、ウイルス伝播防止のため消毒等を行う。飼育池など次亜塩素酸ナトリウム液などの塩素剤で消毒できない場合は、順次上流の飼育池から飼育を中止し、7日間放置の上飼育を開始する。

親魚管理

採卵親魚は養魚場の最下流あるいは別の場所で飼育する。成熟前の採卵用親魚候補にホルマリン不活化OMVワクチンを接種する。採卵時に卵巣腔液を採取し、ウイルス検査を行う。

長野県におけるニジマス養殖におけるヘルペスウイルス病は1999年に初めて発生し、翌2000年には県内に被害が広がった。いずれも死亡率が高く、大きな問題になり、直ちに本疾病の防除対策の確立に着手し、上記のような防除対策が必要であると考えた。しかし、成魚や親魚の防除対策はワクチンの使用を前提としている。本疾病に対するワクチンは前述したように十分その予防効果が期待できるものの、水産用医薬品として実用化されていない。ワクチンの使用ができない現在、成魚の防除対策は飼育用水および飼育魚のOMVフリー化と本疾病の侵入防止が不可欠である。

本疾病が発生した養鱒場では、飼育用水および飼育魚のOMVフリー化のため上流の池から下流の池へと順に

池の消毒を行い、OMVフリー魚を収容することが必要である。池の消毒ができない場合には15で7日間以上放置する方法もある。また、同一水系に複数の養殖場が存在し、上流の養殖場の飼育排水を再び利用して養殖を行っている養殖場では、上流の養殖場から下流の養殖場へと順に本疾病のクリーン化を図る必要があり、水系全体で本疾病の防除対策に取り組みねばならない。

本疾病の養殖場への侵入は、鳥獣等による持ち込みもあるが、そのほとんどが人的行為に基づく本疾病に感染した活魚の導入が原因であり、これを防止することが必要である。県内の本疾病の発生状況を調査する中で、発生があった18養殖場の内10養殖場の感染源は購入した活魚であった。また、これらを原因とし、同一水系のために水平感染した5養殖場の場合を含めると、感染源の83%が活魚の移動に起因していた。現在、活魚の移動は頻繁に行われており、養殖経営上なくてはならない取引になっている。活魚を導入する場合にはOMVに感染していない魚を導入するよう注意すべきである。

このように、本疾病が活魚の移動によって広がっていること、また、種苗の病歴を知らぬまま購入しているこ

とから、長野県の養殖団体は水産試験場を窓口にして活魚購入者に購入先養殖場の本疾病発生状況の有無の情報提供を行う取り組みを行った。この取り組みは養殖業者に自らの防疫意識を向上させ、大いに意味のある施策であった。

ニジマスのヘルペスウイルス病の防除対策モデルとして、無病種苗の導入に努めるなど個々の養殖業者の防疫意識を高め、上流から下流へ、また、地域毎に先に述べた防除対策を実施すれば、本疾病の被害は食い止められるであろう。

マス類の種苗生産は防疫対策を施した施設で行っているが、IHNおよびIPNはその汚染が拡大し、養殖場のある水系、広くはその地域からIHNおよびIPNを無くすことは不可能になってきている。本疾病もこのような状況に陥らないよう防疫対策だけでなく、ワクチンの実用化等早急な防除対策を考える必要がある。また、依然、養殖業者が行っている病歴の不明な活魚の導入は魚類病原体の伝播防止の観点から問題点が非常に多く、養殖業界が今後様々な魚病問題を克服する上での大きな課題の一つである。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、長野県下でニジマスへのヘルペスウイルス病による大量死亡が発生した当初から、その診断及び疾病防除技術の開発に終始懇切なるご指導、ご助言を頂き、本論文のご校閲を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院教授 吉水 守博士に深甚なる謝意を表します。また、本論文の作成に当たりご校閲の労を賜った北海道大学大学院水産科学研究院教授 田島研一博士、同助教授 西澤豊彦博士に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究に多くのご助言ご指導をいただいた三重

大学生物資源学部水圏生物生産学講座教授 宮崎照雄博士および北海道大学大学院水産科学研究院学術研究員 笠井久会博士、長野県水産試験場長 古川賢男氏、同諏訪支場長 本西 晃博士を始め、水産試験場の関係各位に厚く感謝の意を表します。

さらに当人らの修士論文の作成にあたり、共同で研究させて頂いた北海大学大学院水産科学研究科の麻生唯白氏（現在、味の素株式会社）、羽鳥秀一氏（現在、社団法人京都微生物研究所）、三重大大学生物資源学部水圏生物生産学講座の鈴木可奈氏に心からお礼申し上げます。

参 考 文 献

- Amend, D.F. and J.P. Pietsch (1972): Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses. *J. Fish. Res. Bd. Canada.*, **29**, 61-65.
- Amend, D.F. (1981): Potency testing of fish vaccines. *Dev. Biol. Standard.*, **49**, 447-454.
- Aso, Y., J. Wani, D.A.S. Klenner and M. Yoshimizu (2001): Detection and identification of *Oncorhynchus masou* virus (OMV) by polymerase chain reaction (PCR). *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **52**, 111-116.
- 降幡 充・細江 昭・武居 薫・小原昌和・中村 淳・本西 晃・吉水 守 (2003): ニジマスにおけるヘルペスウイルス病の発生. *魚病研究*, **38**, 23-25.
- 羽鳥秀一・本西 晃・西澤豊彦・吉水 守 (2003): 各種消毒剤の *Oncorhynchus masou* virus (OMV) に対する不活化効果. *魚病研究*, **38**, 185-187.
- Hedrick, R.P., T. McDowell, W.D. Eaton, L. Chan and W. Wingfield (1986): *Herpesvirus salmonis*: First occurrence in anadromous salmonids. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **6**, 66-68.
- 堀内三津幸・宮澤真紀・中田 実・飯田九州男・西村伸一郎 (1989): 淡水養殖ギンザケのヘルペスウイルス感染例. *水産増殖*, **36**, 297-305.
- 飯田貴次 (1996): 魚病学概論, 第2章 魚類の生体防御, 恒星社厚生閣, 東京, 9-20.
- 飯田貴次 (2003): 世界における魚類ワクチンの開発現状と将来展望, シンポジウム「免疫学の進歩と水産業への寄与」, *魚病研究*, **38**, 196.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1990): I P N ウイルスおよび I H N ウイルスに対する消毒剤の効力評価法に関する検討. *魚病研究*, **26**, 195-200.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1991a): I H N ウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. *魚病研究*, **26**, 189-194.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史 (1991b): I P N ウイルスおよび I H N ウイルスに対する逆性石鹼製剤の殺ウイルス効果. *魚病研究*, **26**, 195-200.
- 伊藤慎悟・吉水 守・絵面良男 (1997): 人工海中における低濃度オキシダントの魚類病原微生物に対する殺菌・不活化効果. *日水誌*, **63**, 97-102.
- Kamei, Y., M. Yoshimizu and T. Kimura (1987): Plaque assay of *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Fish Pathol.*, **22**, 147-152.
- 笠井久会・吉水 守 (2001): オゾンによる魚類飼育用水の殺菌法. *日本医療・環境オゾン研究会報*, **28**, 2-6.
- Kasai, H and M. Yoshimizu (2002): Disinfection of water for aquaculture. *Fish. Sci.*, **68**, Supl. 1, 821-824.
- 笠井久会・石川麻美・堀 友花・渡辺研一・吉水 守 (2000): 流水式海水電解装置の魚類病原細菌およびウイルスに対する殺菌効果. *日水誌*, **66**, 1020-1025.
- 笠井久会・渡辺研一・吉水 守 (2001a): 流水式海水電解装置による飼育排水の殺菌. *日水誌*, **67**, 222-225.
- 笠井久会・渡辺研一・吉水 守 (2001b): パッチ式海水電解装置の魚類病原細菌およびウイルスに対する殺菌効果. *水産増殖*, **49**, 237-241.
- 笠井久会・大沢秀一・小林 正・吉水 守 (2002): 飼育用水の中圧紫外線処理によるヒラメスクーチカ症の防除. *魚病研究*, **37**, 199-200.
- 木村喬久・吉水 守 (1990): 魚類病原ウイルスに対する消毒剤の効果的消毒法について, 平成元年度魚病体策技術開発研究成果報告書, 第2分冊, 日本水産資源保護協会, 東京, 1-20.
- 木村喬久・吉水 守・田島研一・絵面良男・坂井 稔 (1976): 養魚用水の紫外線殺菌について— 魚病原菌ならびに養魚水中生存菌の紫外線感受性について. *日水誌*, **42**, 23-44.
- Kimura, T. and M. Yoshimizu (1991): Viral disease of fish in Japan. *Annual Rev. Fish Dis.*, **1**, 67-82.
- Kimura, T., M. Yoshimizu and M. Tanaka (1981b): Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*. Oncogenic nature. *Fish Pathol.*, **15**, 149-153.
- 木村喬久・吉水 守・田中 真 (1983): サケ科魚類の稚仔魚期における OMV 感受性 魚令と魚種間による相違. *魚病研究*, **17**, 251-258.
- Kimura, T., S. Suzuki and M. Yoshimizu (1983a): *In vitro* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on the fish herpesvirus, *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral. Res.*, **3**, 93-101.
- Kimura, T., S. Suzuki and M. Yoshimizu (1983b): *In vivo* antiviral effect of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine on experimental infection of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) fry with *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral. Res.*, **3**, 103-108.
- Kimura, T., M. Yoshimizu, M. Tanaka and H. Sannohe

- (1981a): Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, **15**, 143-147.
- Kumagai, A., K. Takahashi and H. Fukuda (1994): Epizootics caused by salmonid herpesvirus type 2 infection in maricultured coho salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 127-134.
- 熊谷 明・高橋清孝・福田穎穂(1995): 海面養殖ギンザケから分離されたヘルペスウイルスの病原性. 魚病研究, **30**, 215-220.
- 本西 晃(1984): ニジマスの飼育管理. 魚病対策の問題点と予防方策に関するワークショップ, 魚病研究, **18**, 224-22.
- 本西 晃(1997): 内水面における養殖サケ科魚類の防疫対策. 種苗期疾病対策シリーズ No.6, 水産庁・(社)日本栽培漁業協会, 東京, pp.1-12.
- 本西 晃(1998): 器材・施設の消毒. 月刊海洋(号外)**14**, 118-122.
- 本西 晃(2004): 養殖サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (IHN) 防除技術開発に関する研究(北海道大学学位論文).
- 野村哲一(1993): サケマス増殖事業におけるせつそう病の疫学的研究. さけ・ますふ研報, **47**, 1-99.
- 岡本信明・中西照幸・飯田貴次(2001): シンポジウム「我が国における魚類ワクチン開発の現状」, 魚病研究, **36**, 103-104.
- Sano, T. (1976): Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **10**, 221-226.
- Sano, T., H. Fukuda and N. Okamoto (1983): Yamame tumor virus: lethality and oncorenecity. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1159-1163.
- Sano, T., T. Nishimura, N. Okamoto, T. Yamazaki, H. Hanada and Y. Watanabe (1977): Studies on viral diseases of Japanese fishes, . Infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) of salmonids in the mainland of Japan. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **63**, 81-85.
- 鈴木邦夫(1993): ニジマスの新しいウイルス病. 試験研究は今, 北海道水産部, No. 165.
- Suzuki, S., H. Machida and M. Saneyoshi (1987a): Antiviral activity of various 1-β-D-arabinofuranosyl-E-5-halogenovinyluracils and E-5-bromovinyl-2'-deoxyuridine against salmon herpes virus, *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Antiviral. Res.*, **7**, 79-86.
- Suzuki, S., S. Izuta, C. Nacayama and M. Saneyoshi (1987b): Inhibitory effects of 5-alkyl- and 5-alkenyl-1-β-D-arabinofuranosyluracil 5'-triphosphates on herpes virus-induced DNA polymerases. *J. Biochem.*, **102**, 853-857.
- Tanaka, M., M. Yoshimizu and T. Kimura (1984): *Oncorhynchus masou* virus: Pathological changes in masu salmon (*Oncorhynchus masou*), chum salmon (*O. keta*) and coho salmon (*O. kisutch*) fry infected with OMV by immersion method. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **50**, 431-437.
- Toranzo, A. E. and F. M. Hetrick (1982): Comparative stability of two salmonid viruses and poliovirus in fresh, estuarine and marine waters. *J. Fish Disease*, **5**, 223-231.
- Toranzo, A. E., J. L. Barja, M. L. Lemos and F. M. Hetrick (1983): Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **3**, 51-53.
- 渡辺研一・吉水 守(1998): オゾン処理海水を用いた飼育器具類および受精卵の消毒. 魚病研究, **33**, 145-146.
- 渡辺研一・吉水 守(2000): ウイルス性神経壊死症原因ウイルスに汚染したマツカワ受精卵のオゾン処理海水による消毒. 日水誌, **66**, 1066-1067.
- 渡辺研一・吉水 守(2001): 電解海水による飼育器具の消毒. 日水誌, **67**, 304-305.
- Watanabe, K., T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2000): Selection of brood stock candidates of barfin flounder using an ELISA system with recombinant protein of barfin flounder nervous necrosis virus. *Dis. Aquat. Org.*, **41**, 219-223.
- Wolf, K. and M. C. Quimby (1962): Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science*, **135**, 1065-1066.
- Wolf, K., R. W. Darlington, W. G. Taylor, M. C. Quimby and Y. Nagabayash (1978): *Herpesvirus salmonis*: Characterization of a new pathogen of rainbow trout. *J. Virol.*, **27**, 659-669
- 山崎隆義(1990): 長野県におけるサケ科魚類の伝染性すい臓壊死症 (IPN) の防除対策に関する研究(北海道大学学位論文).
- 吉水 守(1992): 魚類養殖および栽培漁業でのオゾンの利用. オゾン年鑑 93-94 年度版, リアライズ社, 東京, pp.401-409.

- 吉水 守(1998) : 魚類病原微生物の紫外線およびオゾン感受性. 種苗期疾病対策シリーズ No.11, 水産庁・(社)日本栽培漁業協会, 東京, pp.1-16.
- 吉水 守・野村哲一(1989) : サケマス採卵親魚の魚類病原微生物検査法. 魚と卵, **37**, 49-59.
- 吉水 守・日向進一(1992) : 養殖用水の殺菌法-紫外線およびオゾンの利用-. 工業用水, **404**, 2-8.
- Yoshimizu, M. and T. Nomura(2001) : *Oncorhynchus masou* virus(OMV) epidemiology and its control strategy. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult.*, **Suppl. 5**, 11-14.
- 吉水 守・瀧澤宏子・亀井勇統・木村喬久(1986a) : 魚類病原ウイルスと環境由来微生物との相互作用: 飼育用水中での生存性. 魚病研究, **21**, 223-231.
- 吉水 守・瀧澤宏子・木村喬久(1986b) : 魚類病原ウイルスの紫外線感受性. 魚病研究, **21**, 47-52.
- Yoshimizu, M., M. Tanaka and T. Kimura(1987) : *Oncorhynchus masou* virus(OMV): Incidence of tumor development among experimentally infected representative salmonid species. *Fish Pathol.*, **22**, 7-10.
- Yoshimizu, M., M. Sami and T. Kimura(1989) : Survaiability of infectious hematopoietic necrosis virus in fertilized eggs of masu and chum salmon. *J. Aquat. Anial Heaith*, **1**, 13-20.
- 吉水 守・野村哲一・粟倉輝彦・木村喬久(1988) : 北日本におけるサケ科魚類採卵親魚の魚類病原ウイルス保有状況について(昭和 51 年~昭和 61 年) . さけ・ますふ研報, **42**, 1-20.
- 吉水 守・佐見 学・小原昌和・山崎隆義・木村喬久(1991) : 限外濾過濃縮法による飼育水中の IHN 検出および紫外線の IHN 不活化効果について. 日水誌, **57**, 555-560.
- Yoshimizu, M., T. Nomura, Y. Ezura and T. Kimura(1993) : Surveillance and control of infectious hematopoietic necrosis virus(IHN) and *Oncorhynchus masou* virus(OMV) of wild salmonid fish returning to the northern part of Japan 1976-1991. *Fish. Res.*, **17**, 163-173.
- Yoshimizu, M., H. Fukuda, T. Sano and T. Kimura(1995) : Salmonid herpesvirus 2; Epizootiology and selological relationship. *Vet. Res.*, **26**, 486-492.