総説

伝染性造血器壊死症

西澤豊彦^{1*}・吉水 守²

(2016年 8 月31日受付)

Infectious Hematopoietic Necrosis

Toyohiko Nishizawa^{1*} and Mamoru Yoshimizu²

¹Department of Aqualife Medicine, Chonnam National University, Yeosu 59626, Republic of Korea

²Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan

(Received August 31, 2016)

ABSTRACT—Infectious hematopoietic necrosis (IHN) is a disease of salmonid fishes, mainly *Oncorhynchus* spp., including rainbow trout *O. mykiss* and Atlantic salmon *Salmo salar*. IHN causes serious economic losses. It was initially known as endemic in sockeye salmon fry *O. nerka* and chinook salmon fry *O. tshawytscha* in West Coast of North America since the 1950s. However, it was spread to Japan, Korea and Taiwan in the 1970s. It was spread to Italy and France in the 1990s. Currently, IHN can be found in many parts of the world, including Russia and South America. Mortality due to IHN in fish with ≤ 0.5 g of body weight can reach 60% to 100%. Mortality caused by IHN will reduce when fish grow bigger. However, the onset of IHN has also increased recently in fish with larger. Here, we describe the molecular epidemiology and virulence changes of IHN virus (IHNV) in Japan, and the detection and identification methods for IHNV. Furthermore, we will discuss the future prospects of IHNV researches.

伝染性造血器壊死症 (infectious hematopoietic necrosis, IHN) は、IHN ウイルス (IHN virus, IHNV) によるサケ科魚類の感染症で、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* を含む *Oncorhynchus* 属およびタイセイヨウサケ *Salmo salar* での被害が甚大である。本病は、1950年代頃から米国西海岸でベニザケ *O. nerka* およびマスノスケ *O. tshawytscha* 稚魚の病気として知られていた。IHN は北アメリカの風土病的存在であったが、1970年代に日本に続き韓国や台湾で、また1990年代にはイタリアとフランスで発生し、現在ではロシアや南アメリカ大陸を含め世界各地で発生が認められている (Bootland and Leong, 2011)。IHN は、稚魚 (魚体重 ≤ 0.5 g) では累積死亡率が60～100%に達するが、成長に伴い死亡率は低下する。マスノスケ、ベニザケおよびニジマスでよく発生するが、ギンザケ *O. kisutch* は抵抗性が高い (Kimura and Yoshimizu, 1991)。最近では冷水病との混合感染が多く、

大型魚の発症例が増し、時に親魚の死亡例も見られる。

病原 体

IHNV は、*Rhabdoviridae* (ラブドウイルス科) *Novirhabdovirus* 属の基準ウイルスで、同属には viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), hirame rhabdovirus (HIRRV) 等が分類される (Dietzgen *et al.*, 2012)。IHNV 粒子は、一般的に直径70–80 nm、長さ160–180 nm のエンベロープを有する砲弾型を呈し、約11,000塩基長の非分節マイナス鎖 RNA をゲノムとする。ウイルス粒子は5つの構造タンパク質 [L (RNA polymerase), G (glycoprotein), N (nucleoprotein), P (phosphoprotein), M (matrix protein)] から構成され、ウイルスゲノムには6つの遺伝子 (3'-N-P-M-G-Nv-L-5') が存在する (Dietzgen *et al.*, 2012)。G と L 遺伝子の間に位置する Nv 遺伝子は、non-virion protein をコードし、本属が novirhabdovirus と命名された由縁である。

G タンパク質は、IHNV 粒子表面のエンベロープに組み込まれ、細胞のレセプターと結合するリガンドとして機能する。また、抗 G タンパク質抗体がウイルス中和能

¹ Chonnam National University

² 北海道大学水産学部

* Corresponding author

E-mail: jjnishi@jnu.ac.jp

を有することから、本タンパク質は重要な感染防御抗原の一つである (Bootland and Leong, 2011)。IHNV の血清学的関係は、ポリクローナル抗体 (PABs) を用いた試験ではほぼ均一であるが、モノクローナル抗体 (MABs) を用いた試験では若干の差異が認められる (Bootland and Leong, 2011)。なお中和試験および蛍光抗体法等で、IHNV は VHSV や HIRRV と交差しない。

分子疫学

日本での IHN は、1971年に北海道立水産ふ化場森支場で前年度にアラスカ州から輸入されたベニザケ発眼卵と共に卵管理されていたヒメマス幼魚で初めて発生し、翌年には北海道さけ・ますふ化場虹別事業場でアラスカ州産ベニザケ発眼卵由来仔魚および虹別ならびに千歳支場産ヒメマス仔魚で発生した (Yoshimizu, 1996)。従って、日本の IHNV は、ベニザケ汚染卵と共に米国より持ち込まれたと考えられている。その後1974年に長野および静岡県下のニジマスにも発生し、以来日本各地のニジマスや在来マスにも感染が拡大した。2000年代後半になり、長年保存されていた日本株のゲノム解析と病毒性試験が実施され、興味深い事実が明らかになった。まず、米国株は、分離地域に相関する3つのゲノグループ (U, M and L) に分類される (Bootland and Leong, 2011)。Uは

西海岸北部アラスカ州からワシントン州の株、Mはコロンビア川流域からアイダホ州の中部地域株、そしてLはオレゴン州南部からカリフォルニア州にかけての南部地域株である。1970年代の日本株は何れもUに分類され、米国株を含めた多様性は1.8%以下であった。これに対し、1980年代以降の日本株は新しいゲノグループ (JRt) を形成した (Fig. 1; Nishizawa *et al.*, 2006)。即ち、Yoshimizu *et al.* (1996) の疫学調査が示唆した如く、1970年代に米国U株が日本に持ち込まれ、その後独自の進化を遂げたことが分子疫学的に裏付けられた。なお、ヨーロッパ株は、米国M株を祖先型とし、ヨーロッパで独自に進化した (Fig. 1)。これは、日本では過去にベニザケ卵を米国西海岸北部地域から輸入していたが、ヨーロッパではニジマス卵を米国西海岸中部地域から輸入していた事とも合致する。

日本のニジマス養殖場で独自に進化した IHNV の多様性は、米国株に比べ有意に大きいことから (Fig. 1), IHNV の分子進化速度が日本の養殖環境下で加速していることが示された (Nishizawa *et al.*, 2006)。さらに、2000年代の日本株はニジマスに対し強い病毒性を示したが、1970年代株の病毒性は極めて低かった (Mochizuki *et al.*, 2009)。但し、1970年代に行った実験では、1970年代株もニジマスに強い病毒性を示した。従って、ニジ

Fig. 1. Molecular phylogeny among 49 isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on nucleotide sequences of glycoprotein gene's open reading frame. The distance marker refers to the expected number of substitutions per site. Black, green, red and light blue letters indicate North American, European, Japanese and Korean isolates, respectively. The first two letters of each isolate name indicate the host fish; i.e. Ch, Ko, Rt and Ay denote chum salmon, kokanee salmon, rainbow trout and ayu *Plecoglossus altivelis*, respectively. The following letters indicate the area of isolation. Ab, Yu and Mo denote Abashiri, Yurappu, and Mori of Hokkaido. Nag, Toya and Tochi denote Nagano, Toyama and Tochigi Prefectures of Honshu. The final two letters indicate years of virus isolations. The present phylogeny was update from that of Mochizuki *et al.* (2009).

Fig. 2. Comparison of nucleotide diversity among infectious hematopoietic necrosis viruses (IHNV) and viral hemorrhagic septicemia viruses (VHSV) in *Novirhabdovirus*, infectious pancreatic necrosis viruses and others isolates in *Aquavirnavirus*, and nervous necrosis viruses (NNV) in *Betanodavirus*. The distance marker refers to the expected number of substitutions per site.

マスの IHNV 感受性は、生残魚の自然選抜により徐々に低下してきたが、それを上回る速さで IHNV の病毒性が上昇していると考えられる (Mochizuki et al., 2009)。

IHNV の遺伝的多様性は、VHSV, aquabirnavirus (ABV) あるいは nervous necrosis virus (NNV) に比べ遙かに小さい (Fig. 2)。これは、1970 年以降に米国西海岸の風土病であった IHN が、IHNV 汚染卵の移動により世界各地に拡散したことを裏付けている。興味深いことに、IHNV を含む各 RNA ウイルスにおける系統樹末端での分子進化速度に大きな差異は無い。即ち、VHSV, ABV および NNV は病原体として発見される遙か以前に、各地で独自にゆっくりと進化し、ある程度の多様性が既に確立されていたと考えられる。また、ウイルスが新たな宿主と出会い病原体として発見された後、その進化速度は急激に加速されたと考えられる。IHNV もニジマスという新たな宿主で、現在も急速な進化を続けている様である (Fig. 1)。日本のニジマス養殖場では IHN 生残魚を人為的に作出し、養殖に供する地域があり、これらの行為は IHNV 強毒株の作出を助長している可能性がある。

症状および組織病理

IHN 罹病魚は、活動が鈍くなり、浮上し流れに向かって力無く泳ぎ、時に激しく泳ぐが、やがて死亡する。罹病魚は、腹水貯留、眼球突出、貧血を呈し、特に鰓の褪色が著しい。胸鰭基部や肛門付近の軀幹筋に V 字状の出

血が認められることもある (Fig. 3A)。大型魚では、腹腔壁、脾臓と幽門垂周囲の脂肪組織、腹膜、脳や心臓を囲む膜などにしばしば出血点が見られる。組織病理では、腎臓造血組織の激しい壊死および脾臓造血組織の壊死が特徴的である。症状が進むと、肝臓にも巣状壊死が、また胃腸固有層の顆粒細胞に壊死が見られる。また、脾臓の腺房およびランゲルハンス島の細胞の部分的な退行変性・壊死も例外なく見られる (Wolf, 1988)。

検出・同定

IHNV の検出は、分離培養が基本である。IHNV は、RTG-2, CHSE-214, FHM 細胞や他のサケ科魚由来株化細胞でも良く増殖する。IHNV の増殖温度域は 13°C ~ 20°C で、至適温度は 15°C ~ 18°C である。IHNV に感染した株化細胞は球形化し房状に集合した後、培養器底から剥離する (Fig. 3B)。IHNV 感染による細胞変性効果 (cytopathic effect, CPE) は VHSV や HIRRV 感染と類似するため、培養後に蛍光抗体法 (Fig. 3D) や RT-PCR 等による同定が不可欠である (OIE, 2016)。蛍光抗体法、ELISA および RT-PCR 等で、病魚からの IHNV 直接検出も可能であるが、死因特定を目的とする場合には検体中に IHNV が critical level (臨界値) 以上存在することを確認する必要がある。経験値ではあるが、IHNV の critical level は感染価で 10^6 TCID₅₀/g-tissue、ゲノム量で 10^8 genome/g-tissue 程度である。

Fig. 3. Photos of infectious hematopoietic necrosis (IHN)-affected fish and detection methods of IHN virus (IHNV). A: Masou salmon affected with IHN. B: Cytopathic effect (CPE) observed in RTG-2 cells at 4 days after inoculation of IHNV. C: Detection of RTG-2 cells infected with IHNV by immunofluorescence antibody test (IFAT) using rabbit antiserum against IHNV. D: Budding IHNV particles from RTG-2 cells observed with a transmission electron microscope.

最近、IPNV等のウイルスと混合感染している検体が多数見られる。IPNVと混合感染した検体からのIHNVの分離培養では、予め検体中のIPNVを抗IPNV血清で完全に中和する必要がある、操作は煩雑である。近年、IPNVに持続感染したEPC細胞が樹立された。本細胞は、IHNVあるいはVHSVに対する感受性を維持しながら、IPNVには感受性を示さない(Kim *et al.*, 2012)。従って、本持続感染細胞を用いれば、IPNV混合感染検体からでもIHNVの分離・培養が容易である。

防 除 対 策

魚類では母子免疫は成立せず、また仔稚魚期(サケ科魚類では、0.3 g以下)に液性免疫の応答が認められない。従って、ワクチンによる予防対策が有効になるまで

の期間は、衛生管理、親魚選別、および卵消毒を柱とした防除対策が重要である。

1) 衛生管理: IHNVは、消毒剤に対し比較的感受性が高い。手指の消毒には塩化ベンザルコニウム液(200 ppm)あるいはクレゾール石ケン液(100 ppm)が、器具類および水槽等の消毒等には次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素濃度 50 ppm)が各々有効である。また、飼育水の殺菌には、低圧紫外線の照射($10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$)が有効である(吉水・笠井, 2002)。

2) 親魚選別: IHNV感染耐過魚では、成熟期の生殖産物(卵巣腔液および精液)にIHNVが出現し、垂直感染(経卵感染)の汚染源となる(Yoshimizu *et al.*, 1993)。サケ・マス類では受精後、発眼に至るまで約1ヶ月を要するため、採卵時に卵巣腔液のIHNV検査を実施できる。

3) 受精卵の消毒: 産卵親魚の体腔液に排出されたIHNVは精子あるいは卵を汚染し、仔稚魚におけるIHN発症の原因になることから、IHNVの垂直感染は避けられないと考えられてきた。しかし、精子と共に卵内に侵入したIHNVは胚に感染し、最終的に胚は死亡する。また、卵内のIHNVは卵内容物により不活化される。卵表面に吸着したIHNVも経卵垂直感染の原因になるが、発眼期に卵をポピドンヨード処理(50 ppm, 15分)することで卵表面のIHNVは不活化される。従って、死卵の除去および発眼卵の消毒により、IHNVの経卵垂直感染は阻止可能である(Yoshimizu, 2003)。

予 防

これまで、不活化および弱毒IHNVワクチン、遺伝子組換えGタンパク質および同タンパク遺伝子を用いたDNAワクチン等が開発されてきたが(Bootland and Leong, 2011)、多くは市販には至っていない。近年DNAワクチンがカナダで市販され話題になった。また、Poly(I:C)(合成2本鎖RNA)投与後にウイルスIHNVを接種することで、ニジマスに強力な防御免疫を誘導する新たな免疫法が考案された(Kim *et al.*, 2009)。本法は、VHSVやNNVでも有効である。一方、飼育温度管理された魚(ウイルス増殖温度域内で且つ発症温度域外)にウイルスを接種することでも、強力な感染防御が誘導されることがVHSV、NNVおよびred seabream iridovirus (RSIV)で示された(Nishizawa *et al.*, 2011, 2012; Oh *et al.*, 2014)。本免疫法の原理は、温度管理によりウイルスの増殖速度を制御することで、ウイルスの病毒性を間接的に抑制することにある。IHNVは20°C増殖可能であるが、同温度でIHNは発症しないため、本免疫法の応用は将来的に十分期待できる。

最近の研究動向・残された課題

1960年代に魚類株化細胞が樹立されて以降、IHNVの

研究は飛躍的に進歩し、診断・検出法および解析法はほぼ成熟期に至った。防除法も Yoshimizu (2003) の方法が世界標準となり完結した。IHN 対策で残された課題は、ワクチンを含めた予防法と治療法の確立である。これまでの IHNV ワクチンは、relative percent survival (RPS) 値60%以上で、実験的に十分に有効である。しかし、本 RPS 値は養殖業者にとっては微妙である。IHN の様に非免疫魚の死亡率が100%近くに達する場合、RPS 値60%のワクチンを投与した魚でも計算上40%相当が死亡するため、養殖業者がワクチンの効果に疑問を抱くのも当然である。養殖業者が求めるワクチンとは、おそらく RPS 値が80%以上であろう。これに対し、ウイルス感染耐過魚の防御能は極めて高い (RPS 値95%以上)。即ち、人為的に感染耐過魚を作り出す、いわゆる生ワクチンであれば、養殖業者も十分満足である。最近まで、生ワクチンの開発・研究は殆ど行われなかった。これは、免疫魚が持続感染することで、病原体を排出し続け、養殖環境の汚染に繋がることが懸念されるためである。IHN の防除対策はすでに確立され、北海道および東北地方では IHN の発生はない。デンマークでは、ゾーニングと徹底した衛生管理で VHS の駆除に成功した。残念ながら、本州中部ではニジマス等を IHNV 汚染環境下で養殖せざるを得ない地域があり、あえて感染耐過魚を作出して養殖に供する業者も見受けられる。しかし、これらは IHNV の変異を助長し、強毒株の作出に繋がっている。研究過程ではあるが、十分に免疫された感染耐過魚では、免疫に用いたウイルスが最終的に排除される様である。とすれば、安全で効率的な感染耐過魚の作出方法の開発は産業的にも重要である。そのためには、ウイルスの病毒性機構ならびに持続感染機構の研究を進め、ウイルス感染耐過メカニズムの解明が不可欠である。さらに、これらの研究は、ウイルス感染魚の治療法の確立へと発展すると考えている。

文 献

- Bootland, L. M. and J. C. Leong (2011): Infectious hematopoietic necrosis virus. In "Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal infections, 2nd Edition" (ed. by P. T. K. Woo and D. W. Bruno). CAB international, Oxfordshire, UK, pp. 66–109.
- Dietzgen, R. G., C. H. Calisher, G. Kurath, I. V. Kuzmin, L. L. Rodriguez, D. M. Stone, R. B. Tesh, N. Tordo, P. J. Walker, T. Wetzel and A. E. Whitfield (2012): Family Rhabdoviridae. In "Virus Taxonomy: Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses" (ed. by A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens and E. J. Lefkowitz). Elsevier Academic Press, San Diego, CA, pp. 686–713.
- Kim, H. J., N. Ohseko, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2009): Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or Poly(I:C). *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 105–113.
- Kim, H. J., J. K. Cho, H. K. Hwang, M. J. Oh and T. Nishizawa (2012): Establishment and characterization of the epithelioma papulosum cyprini (EPC) cell line persistently infected with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), an aquabirnavirus. *J. Microbiol.*, **50**, 821–826.
- Kimura, T. and M. Yoshimizu (1991): Viral diseases of fish in Japan. *Ann. Rev. Fish Dis.*, **1**, 67–82.
- Mochizuki, M., H. J. Kim, H. Kasai, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2009): Virulence change of infectious hematopoietic necrosis virus against rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral molecular evolution. *Fish Pathol.*, **44**, 159–165.
- Nishizawa, T., S. Kinoshita, S. Higashi, W. S. Kim and M. Yoshimizu (2006): Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 267–272.
- Nishizawa, T., I. Takami, M. Yang and M. J. Oh (2011): Live vaccine of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) for Japanese flounder at fish rearing temperature of 21°C instead of Poly(I:C) administration. *Vaccine*, **29**, 8397–8404.
- Nishizawa, T., H. J. Gye, I. Takami and M. J. Oh (2012): Potentiality of a live vaccine with nervous necrosis virus (NNV) for sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* at a low rearing temperature. *Vaccine*, **30**, 1056–1063.
- Oh, S.-Y., M. J. Oh and T. Nishizawa (2014): Potentiality of a live vaccine with red seabream iridovirus (RSIV) for rock bream *Oplegnathus fasciatus* by controlling fish rearing temperature. *Vaccine*, **32**, 363–368.
- O.I.E. (world organization for animal health) (2016): Infectious hematopoietic necrosis. Chapter 2.3.4, Manual of diagnostic tests for aquatic animals. <http://www.oie.int/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online/>.
- Yoshimizu, M. (1996): Disease problems of salmonid fish in Japan caused by international trade. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 533–549.
- Yoshimizu, M. (2003): Control strategy for viral diseases of salmonids and flounder. In "Biosecurity in aquaculture production systems: Exclusion of pathogens and other undesirables" (ed. by C. S. Lee and P. J. O'Bryen). World Aquaculture Society, AIP workshop, Baton Rouge, Louisiana, USA, pp. 35–41.
- 吉水 守・笠井久会 (2002): 種苗生産施設における用水および排水の殺菌. *工業用水*, **523**, 13–26.
- Yoshimizu, M., T. Nomura, Y. Ezura and T. Kimura (1993): Surveillance and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and *Oncorhynchus masou* virus (OMV) of wild salmonid fish returning to the northern part of Japan 1976–1991. *Fish. Res.*, **17**, 163–173.
- Wolf, K. (1988): Infectious hematopoietic necrosis. In "Fish viruses and fish viral diseases" (ed. by K. Wolf). Cornell University Press, Ithaca, N.Y., pp. 83–114.