総説

伝染性膵臓壊死症

佐野元彦*・岡本信明

(2017年11月7日受付)

Infectious Pancreatic Necrosis

Motohiko Sano* and Nobuaki Okamoto

Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo 108-8477, Japan

(Received November 7, 2017)

ABSTRACT—Infectious pancreatic necrosis (IPN) was first reported in freshwater trout in 1940's in Canada and in 1950's in the USA, and subsequently spread around the world. The causative agent, infectious pancreatic necrosis virus (IPNV), which was the first fish-virus isolated in a cell culture, is a double-stranded RNA virus in the family Birnaviridae. In 1960's, Japanese rainbow trout aquaculture suffered a lot of fish losses at the fry stage, and the cause was confirmed to be IPNV by the virological study. In 1980's, IPN in Japan has gradually calmed down due to being worked synergistically with hatchery biosecurity practice, increase of host resistance and decrease of virus virulence. However, it is still one of the obstacles in the Atlantic salmon industry in the world.

伝染性膵臓壊死症 Infectious pancreatic necrosis (IPN) は、サケ科魚稚魚に膵臓の壊死などを引き起こすウイルス感染症である。その原因ウイルス IPNV は魚類ウイルスとして初めて分離され、IPN/IPNV の研究が魚病学、魚類ウイルス学、魚類免疫学を先導してきたと言える。IPNV と類似したウイルスがブリ、ヒラメ、ウナギなど 100 種以上の様々な淡水魚・海水魚から分離されており (Munro and Midtlyng, 2011)、これらのウイルスと IPNV との進化学的な関係は必ずしも明確ではなく、原因ウイルス側から見たときには混乱を生じる。そのため、ここではサケ科魚の IPN に限って述べる。

歴 史

膵臓の壊死を特徴とするサケ科稚魚の疾病は、1940 年代にはじめてカナダのカワマス *Salvelinus fontinalis* で、1950 年代には米国でもカワマスとニジマス *Oncorhynchus mykiss* で認められ、伝染性膵臓壊死症と呼ばれた。その後、ヨーロッパなど世界中に感染が拡大した。米国東部魚病研究所の Ken Wolf 博士が原因不明であった本感染症

病魚から 1960 年に魚類細胞を用いて原因ウイルス IPNV を分離した (Wolf, 1988)。これが魚類ウイルスの最初の分離であった。日本では 1964 年頃から長野県と静岡県の養殖ニジマス稚魚での不明病として知られるようになった。東京水産大学の佐野徳夫博士は、Ken Wolf 博士の研究室で当時まだ最新の技術であった細胞培養を用いたウイルス分離・培養を習得し、日本にこの技術を持ち帰り、病魚から IPNV を分離し、日本で不明病として知られた疾病が IPN であることをはじめて明らかにした (Sano, 1971)。

ウイルス性の疾病であることが判明し、その後、孵化施設での隔離飼育、器具の消毒や操作者の手足の殺菌等の防除対策の検討が精力的に進められた (「魚類防疫への挑戦」編集委員会, 2000)。その対策が功を奏し、日本における IPN 発生は 1972 年頃をピークに減少していき、1980 年代には散発的な発生となった。疾病の原因が明らかとなり、その対策が講じられるまで、生残魚を親にしてその子供を採るということが行われたが、これが選抜育種となったことは想像に難くなく、実際にニジマス自体が IPN に強くなっていった (Okamoto *et al.*, 1993)。原因ウイルスを見ると、病原性の低い分離株が 1980 年代には増加し、このウイルスの弱毒化も加わり、防除対策、

東京海洋大学

* Corresponding author

E-mail: msano00@kaiyodai.ac.jp

宿主の抵抗性の増加と相まって、日本の IPN が減少していったと考えられている (Okamoto and Sano, 1992)。日本における IPNV 自体はサケ科魚からしばしば分離されるものの、この病勢の弱い状況は今も変わっていない。一方、ノルウェーなどのタイセイヨウサケ *Salmo salar* では、稚魚期からスモルト後の海水馴致時期（海水移行後 6 ヶ月程度）まで発生が見られる他、感染耐過魚では脾臓病（alphavirus 感染症）などにも感受性が高くなるなど、IPN は大きな生産障害の一つとなっている (Roberts and Pearson, 2005)。現在、IPNV は北米、ヨーロッパ、東アジア、東南アジア、オセアニアなどの様々な国の天然及び養殖のサケ科魚類で検出される。この感染地域の拡大には種卵・種苗の移動および養殖の発展が密接に関与している。

病 原 体

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) では IPNV などの 2 本鎖 2 分節の RNA ウイルスを 2 つ (bi) の RNA の意味でビルナウイルス Birnavirus とし、IPNV をこのビルナウイルス科の *Aquabirnavirus* 属に分類している。現在、この属には、IPNV、プリの腹水症原因ウイルス Yellowtail ascites virus (YTAV)、二枚貝から分離された *Tellina virus* (TV-1) の 3 種が記載されている。ウイルス粒子は直径約 60 nm の球形でエンベロープを持たない (Fig. 1)。2 分節のゲノム RNA は分節 A (約 3,100 塩基: Accession No. NC 001915) と分節 B (約 2,900 塩基: NC 001916) と呼ばれ、分節 A はウイルス構造タンパク質の VP2 と VP3 および非構造タンパク質の VP4 と VP5 を、分節 B は RNA 依存 RNA 合成酵素 VP1 をコードしている。分節 A が病原性や組織親和性を決定しており (Sano *et al.*, 1992)、さらにウイルス粒子の表面を構成するカプシドタンパク質 VP2 の特定のアミノ酸部位が宿主特異性、病原性や血清型と関連している (Santi *et al.*, 2004)。Aquabirnavirus の血清型は A、

B の 2 つに大別され、A 型はさらに A1～A9 に分けられる。A1 型には VR-299、Buhl 株など米国株、A2～A5 にはヨーロッパ株 (Sp 株: A2 型, Ab 株: A3 型)、A6～A9 にはカナダ株が主に含まれる。B 型には TV-1 が含まれる (Munro and Midtlyng, 2011)。なお、血清型 C および D に分類される Blotched snakehead virus などのビルナウイルスは ICTV の現在の分類では *Blosnavirus* 属に分類されている。インフルエンザウイルスのように分節 RNA の再集合が *in vitro* に加えて自然界でも起こることが知られ (Sano *et al.*, 1992; Romero-Brey *et al.*, 2009)、さらに、1 粒子中に 2 本以上の RNA 分節がパッケージされることもあるとされ (Lago *et al.*, 2016)、ウイルスが遺伝的に大きな変異を起こす可能性がある。

感染環としては、稚魚に IPNV が感染し、その生残魚がキャリアーになり、それから排泄されたウイルスが水平伝播あるいは卵・精子を介した垂直伝播により次世代に感染すると考えられる。海産魚から分離される Aquabirnavirus で見れば、魚の他、貝や海鳥の糞から検出されるなど、魚、貝、鳥を含めた生態系全般で感染環が成り立っている可能性が高い。

診 断 法

ニジマスでは主に 1 g 以下の稚魚が感染し、食欲が減退し、きりきり舞するなどの遊泳が見られる。病魚の外観症状として、体色黒化、眼球突出、腹部膨満、腹部や鰭基部の出血などが見られる (Fig. 2)。内部所見としては肝臓と脾臓の褪色、粘液が充満した腸管などが認められる。病理組織学的には、脾臓の腺房細胞およびランゲルハンス氏島細胞、また腎臓、肝臓、脾臓、幽門垂と腸管の粘膜下織などの広範な壊死が認められる (Wolf, 1988) (Fig. 3)。タイセイヨウサケではより大型のスモルト後の魚が海水飼育移行後に IPN に罹病し死亡する (Roberts and Pearson, 2005)。

本病の診断は、病魚からのウイルス分離と特異抗体を用いた蛍光抗体法や RT-PCR 等の核酸検出法などによる

Fig. 1. Negative stained virions of Infectious pancreatic necrosis virus.

Fig. 2. Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout fry displaying darkened body color and abdominal swelling.

Fig. 3. Severe necrosis of pancreatic acinar cells (arrows) in infectious pancreatic necrosis diseased rainbow trout.

Fig. 4. Cytopathic effect on BF-2 cells following infection with IPNV.

分離ウイルスの同定による。ウイルス分離には、感受性が高いBF-2細胞のほか、CHSE-214, RTG-2などのサケ科魚類由来細胞が用いられる (Fig. 4)。稚魚では個体全体あるいは内臓を材料として、より大型のキャリアー魚検出のための非破壊法では血液、卵巣液や胸びれのサンプルが用いられる。分離ウイルスの同定法として、中和試験、間接蛍光抗体法、ELISA、RT-PCR、定量RT-PCR、loop-mediated isothermal amplification (LAMP)などが開発されている。ウイルス分離が最も感度と信頼性が高いが、ウイルス分離は同定まで時間を要することから、死亡魚などウイルスが多量に存在する材料を用い、感度を犠牲にしても迅速性が要求されるときには、定量RT-PCRなどを使用する。

対 策

一般的なサケ・マス類での防疫対策が有効である。特にニジマスでは、ヨード剤で殺菌した受精卵をふ化施設に搬入し、感受性の高い稚魚時期以降まで隔離飼育することは極めて有効である。IPNVが精子に付着して垂直感染を起こすことが報告されたことがあるが、この実験の追試は成功しておらず、実際の養殖で起こるかどうかわからない。しかし、受精卵の輸入などの移動によりIPNが確実に広がっていった事実もあり、受精卵の受入れには十分注意し、少なくともヨードによる受精卵の殺菌と輸送資材の適切な廃棄は欠かせない。

IPNVは塩素、ヨードやオゾンにより不活化される (Munro and Midtlyng, 2011)。エタノールには不活化効果は無い。紫外線照射も有効であるが、99%の不活化に100–150 mJ/cm²の照射が必要とする報告があり、通常の紫外線照射装置ではIPNVの完全な不活化は期待できない (Munro and Midtlyng, 2011)。

IPNのワクチンについては、今までに多数の研究がある (Munang'andu *et al.*, 2014; Dhar *et al.*, 2017)。日本においては現在のところIPNの病勢が弱いことからワクチン開発の必要はないが、ノルウェーやチリなどのタイセイヨウサケでは種々のワクチンが実用化されている。不活化ウイルスに加え、免疫原性があるVP2のサブユニットワクチンが主に腹腔内投与 (経口投与もある) で用いられている。ワクチンによる獲得免疫は、中和抗体を含めたIgM抗体上昇によるほか、Th1細胞と細胞障害性T細胞も重要であるとされる。ウイルス侵入門戸におけるIgT抗体の役割はまだ明確ではない (Munang'andu *et al.*, 2014)。また、複数のVP2から構成されるウイルス様粒子 (VLP) やDNAワクチンなども研究されている。

日本で見出され系統保存されたニジマスのIPN耐病性系統と感受性系統を用い、遺伝学的手法で解析する量的形質遺伝子座QTLsの探索が魚類の疾病において初めて試みられた。その結果、IPN耐病性と連鎖する主遺伝子座が特定され、マーカーアシスト選抜 (MAS) の道が拓かれた (Ozaki *et al.*, 2001)。タイセイヨウサケにおいても耐病の選抜育種が行われ、IPN被害軽減に貢献しているほか、QTL解析に基づくIPN耐病遺伝子の特定もなされ、epithelial cadherin (cdh1) 遺伝子にあることが明らかにされている (Moen *et al.*, 2015)。

残された課題

日本においてはサケ・マス類でのIPN被害はほとんどなく、問題となっていないが、タイセイヨウサケでは海水馴致期間などで被害があり、世界的に見ると、今後、さらなるワクチン開発が行われ、耐病性に加えて成長、

肉質などの優良形質を備えた魚の育種は益々研究されていくものと考えられる。これらを支えるサケ科魚のゲノムや遺伝子などの基盤的な知見の集積もさらに必要と考える。近年、日本でのニジマス海面養殖が増加してきており、タイセイヨウサケでの海水馴致ストレスと IPN 発生の関係を考えると、海水馴致時期に再びニジマスで IPN が問題となるかもしれない、注視が必要だろう。

サケ科魚以外に由来する IPNV と区別がつかないウイルスも知られており、IPNV と類似の Aquabirnavirus の病原性獲得も含めたウイルスの進化についても明らかにする必要がある。

文 献

- Dhar, A. K., S. LaPatra, A. Orry and F. C. T. Allnutt (2017): Infectious pancreatic necrosis virus. In "Fish viruses and bacteria: pathology and protection" (ed. by P. T. K. Woo and R. C. Cipriano). CABI International, Wallingford, pp. 1–12.
- 「魚類防疫への挑戦」編集委員会 (2000): 成功・失敗事例集 魚類防疫への挑戦 (サケ・マス編). 緑書房, 東京, 187 p.
- Lago, M., J. F. Rodríguez, I. Bandín and C. P. Dopazo (2016): Aquabirnavirus polyploidy: A new strategy to modulate virulence?. *J. Gen. Virol.*, **97**, 1168–1177.
- Moen, T., J. Torgersen, N. Santi, W. S. Davidson, M. Baranski, J. Ødegård, S. Kjøglum, B. Velle, M. Kent, K. P. Lubieniecki, E. Isdal and S. Lien (2015): Epithelial cadherin determines resistance to infectious pancreatic necrosis virus in Atlantic salmon. *Genetics*, **200**, 1313–1326.
- Munang'andu, H. M., S. Mutoloki and Ø. Evensen (2014): Acquired immunity and vaccination against infectious pancreatic necrosis virus of salmon. *Dev. Comp. Immunol.*, **43**, 184–196.
- Munro, E. S. and P. J. Midtlyng (2011): Infectious pancreatic necrosis and associated aquatic birnaviruses. In "Fish diseases and disorders, volume 3: viral, bacterial and fungal infections, 2nd edition" (ed. by P. T. K. Woo and D. W. Bruno). CABI International, Wallingford, pp. 1–65.
- Okamoto, N. and T. Sano (1992): Studies on the generation of infectious pancreatic necrosis. In "Salmonid diseases" (ed. by T. Kimura). Hokkaido University Press, Sapporo, pp. 41–47.
- Okamoto, N., T. Tayama, M. Kawanobe, N. Fujiki, Y. Yasuda and T. Sano (1993): Resistance of a rainbow trout strain to infectious pancreatic necrosis. *Aquaculture*, **117**, 71–76.
- Ozaki, A., T. Sakamoto, S. Khoo, K. Nakamura, M. R. Coimbra, T. Akutsu and N. Okamoto (2001): Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Genet. Genomics*, **265**, 23–31.
- Roberts, R. J. and M. D. Pearson (2005): Infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.*, **28**, 383–390.
- Romero-Brey, I., I. Bandín, J. M. Cutrín, V. N. Vakharia and C. P. Dopazo (2009): Genetic analysis of aquabirnaviruses isolated from wild fish reveals occurrence of natural reassortment of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.*, **32**, 585–595.
- Sano, M., N. Okamoto, H. Fukuda, M. Saneyoshi and T. Sano (1992): Virulence of infectious pancreatic necrosis virus is associated with the larger RNA segment (RNA-segment A). *J. Fish Dis.*, **15**, 283–293.
- Sano, T. (1971): Studies on viral diseases of Japanese fishes-I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: first isolation from epizootics in Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **37**, 495–498.
- Santi, N., V. N. Vakharia and Ø. Evensen (2004): Identification of putative motifs involved in the virulence of infectious pancreatic necrosis virus. *Virology*, **25**, 31–40.
- Wolf, K. (1988): Fish viruses and fish virus diseases. Cornell University Press, New York, 476 p.