降海性アマゴから分離された IPN ウィルス

反 町 稔・佐 古 浩

(昭和 57 年 1 月 26 日受理)

Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) isolated from Anadromous Amago, *Oncorhynchus rhodurus*

Minoru SORIMACHI and Hiroshi SAKO

National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Agency, Tamaki-cho, Mie, Japan

(Received January 26, 1982)

Virological examination was carried out on the kidney and spleen of anadromous amago caught by the floating gill net in Nagara River and Miyagawa River in May, 1981. Tissue extracts were inoculated onto CHSE-214 (chinook salmon embryo) cells.

Virus which exhibited cytopathic effect in CHSE-214 cells were isolated from 9 of 71 fish from Nagara River and 1 of 4 fish from Miyagawa River. The isolates both from Nagara River and Miyagawa River were neutralized by anti-IPNV (Gifu) rabbit serum, indicated that they were antigenically related to IPN virus.

Among 71 sera of fish from Nagara River, 20 specimens showed the neutralization titer over 1:8 against IPNV.

The source of virus was discussed in relation to the released stock cultured in pond.

長良川の下流域では、初夏に溯上するカワマスが知られている(本庄, 1977)が、これは、アマゴ (*Oncorhynchus rhodurus*) が晩秋に降海し、冬期を伊勢湾で回遊して溯上したものであることが明らかにされ、降海性アマゴと呼ばれている。降海性アマゴは、回遊期間が短かく回帰率が高いこと、成長が良いことなどから、近年、長良川を中心とする木曾三川等において、積極的に放流事業が行われるようになった。降海性アマゴは、北方のサケ、マス放流事業に比べると、その資源量ははるかに小さいが、南方系のサケ科資源として重要視されている。

放流用のアマゴは、孵化後約1年間池中養成し、70~80gの銀毛化したものが用いられているが、池中養成期におけるアマゴの重要な疾病として、伝染性脾臓壊死症(IPN)、伝染性造血器壊死症(IHN)、癰瘍病、細菌性鯉病等が知られている。しかし、降海期、海洋回遊期、溯上期における病害に関しては、全く明らかにされていない。

そこで、降海性アマゴの病害実態を明らかにするため、溯上したアマゴの疾病調査を行ったところ、外観上健康と思われる魚からウィルスが分離され、それがIPNウィルスに同定されたので報告する。

材料及び方法

供試魚 供試魚には、1981年5月に長良川及び宮川に溯上したアマゴを、流し刺網で採捕して用いた。採捕地点は図1に示したように、長良川では岐阜県海津町地先(河口より約20km)、宮川では三重県玉城町地先(河口より約10km)であるが、河川別に調査尾数と魚体重を表1に示した。

長良川で採捕した供試魚は、撲殺後直ちに開腹して腎臓と脾臓を摘出し、宮川の供試魚はそのまま保冷して実験室に持帰り、検査に供した。

ウィルス検査 ウィルス検査は、腎臓(前部)と脾臓について行った。すなわち各臓器に Hanks' BSS を加えてホモジナイズし、1500×g, 10 分間遠心分離して、その上清をメンブレンフィルター (450 nm) で濾過し

* 養殖研究所

Fig. 1. Sampling sites of amago. Closed circles were indicated the sampling sites.

て接種液を調製した。その後、予めウシ胎児血清 (M. A. B.*) を 10% の割合で添加した、イーグル MEM 培

地 (ニッスイ) で培養した CHSE-214 細胞 (FRYER *et al.*, 1965) に、原体に対して 100 及び 1000 倍となるように接種し、15°C で 10 日間培養して、細胞変性効果 (CPE) の有無からウィルスの存在を判定した。

中和試験 分離ウィルスのうち、長良川の溯上魚から分離された 5 株、宮川の溯上魚から分離された 1 株の計 6 株について抗 IPNV 家兎血清 (Gifu)** で、また長良川の 2 株について抗 IHNV 家兎血清 (7601)** で、マイクロプレート法により中和試験を行った。すなわち、80 ND₅₀/0.05 ml の抗 IPN 及び抗 IHN 血清と 30-1000 TCID₅₀/0.05 ml の分離ウィルスを等量混合し、20°C、1 時間反応後 CHSE-214 細胞に接種して中和抗体価 (ND₅₀) を求めた。

また、長良川で採捕した 71 尾は、撲殺後直ちに尾柄部から採血して血清を採取し、Hanks' BSS で 1:4 から 2 倍希釈系列を作り、30-1000 TCID₅₀/0.05 ml の分離ウィ

Table 1. Anadromous amago examined in the present study

Date	Sampling site	No. of fish examined	Average body weight (g)
May 7, 1981	Kaizu, Nagara R.	12	660 (135- 910)
May 15, 1981	Kaizu, Nagara R.	45	676 (322-1125)
May 21, 1981	Kaizu, Nagara R.	14	655 (356-1400)
May 18, 1981	Tamaki, Miyagawa R.	4	696 (540- 774)

Table 2. Incidence of virus in the kidney and spleen of anadromous amago

Date	No. of fish examined	No. of fish virus positive	No. of organs virus positive	
			Kidney	Spleen
May 7, 1981	12	3	3	3
May 15, 1981	45	3	3	1
May 21, 1981	14	3	2	2
May 18, 1981	4	1	1	0

Table 3. Neutralization tests of isolates against anti-IPNV and anti-IHNV rabbit sera

Strain No.	Origin of fish	Anti-IPNV serum	Anti-IHNV serum	Normal serum
AV- 1	Nagara R.	1 : 32	<1 : 4	<1 : 4
AV- 3	Nagara R.	1 : 16		
AV- 4	Nagara R.	1 : 64		
AV- 5	Nagara R.	1 : 32	<1 : 4	<1 : 4
AV- 7	Nagara R.	1 : 32		
AV-10	Miyagawa R.	1 : 16		

ルス (AV-1) と等量混合して 20°C、1 時間反応後

CHSE-214 細胞に接種し、中和抗体価 (ND₅₀) を求めた。

* M. A. Bioproducts, Walkersville, Maryland 21793

** 抗血清は、いずれも化血研製 (640ND₅₀) のものを用いた。

結 果

ウィルス分離状況 降海性アマゴの疾病調査は、長良

Table 4. Serum neutralization titers of anadromous amago captured at Nagara River against IPN virus

Serum neutralization titer (1:)*	No. of fish
< 8	51 (1)**
8	2 (1)
16	10 (2)
32	6 (4)
64	2 (1)

* Sera were tested against 30-1000 TCID₅₀/0.05 ml IPN virus (AV-1).

** Figures in parentheses showed the number of fish virus positive.

川で3回、宮川で1回行われたが、ウィルス検査結果を表2に示した。

長良川に溯上したアマゴでは、71尾中9尾から、宮川に溯上したアマゴでは、4尾中1尾から、CHSE-214細胞において強い核濃縮を特徴とするCPEを示すウィルスが分離された。

分離されたウィルスを臓器別にみると、長良川では、腎臓、脾臓からともに分離されたもの5尾、腎臓からのみ分離されたもの3尾、脾臓からのみ分離されたもの1尾であった。宮川では、1尾の腎臓からのみ分離された。

中和試験 分離ウィルスの抗血清による中和試験の結果を表3に示した。

供試した6株の分離ウィルスは、すべて抗IPNV家兎血清で中和されたが、抗IHNV家兎血清では全く中和されないことから、長良川及び宮川の溯上魚から分離されたウィルスは、IPNウィルスと同定された。

中和抗体価 長良川の溯上魚71尾について、分離ウィルス (AV-1) に対する中和抗体価を調べた結果を、表4に示した。

調査した71尾中20尾 (28%) が、1:8以上の血清中和抗体価を示し、分離ウィルス (AV-1) に対して抗体を有していた。

考 察

サケ科魚類由来のウィルスとしては、IPNウィルス (Wood *et al.*, 1955), IHNウィルス (Amend *et al.*, 1969), VHSウィルス (Jensen, 1965) が著名であるが、近年我が国においてもIPNV, IHNVのほか、ヒメマスのNeVTA (Sano, 1976), サクラマスのOMV (Kimura *et al.*, 1981) などが報告されている。池中養

成期のアマゴのウィルス性疾患としては、他の養殖サケ・マス類と同様に、IHNは稚魚、1年魚ともに発病してその被害が大きいことが知られている。IPNもSano and Yamazaki (1973) によって報告されて以来、稚魚での発病例は数多く知られているが、1年魚以上でのその例は知られていない。

IPNウィルスが分離された長良川の9尾及び宮川の1尾のうち、長良川の2尾の体表にウオビルによる損傷が認められたほか、肉眼的には異常はみられず、平均魚体重も非分離魚を上回り、ウィルス感染が成長等に及ぼす影響は、ないものと思われた。

伊勢湾に降海するアマゴは、天然魚と放流魚に大別されるが、数量的には後者がやや多いと言われている。長良川及び宮川で調査した75尾のうち、10尾からIPNウィルスが分離されたこと (表2)、ウィルスは分離されなくても血清中和抗体価が上昇している個体が多いこと (表3)、両河川ともに同一養魚場産の種苗が放流されたことなどから、養魚池において感染して発病した耐過群、または不顕性感染群が放流された可能性が考えられた。そこで、放流用種苗と同一群で、養魚場において飼育されていた魚群20尾の、腎臓及び脾臓を用いて同様に検査したところ、13尾からウィルスが分離され、しかも抗IPN家兎血清で中和され、IPNウィルスと同定された。養魚場産、長良川及び宮川に溯上したアマゴから分離されたIPNウィルスの由来が、同一のものであるか否かは、今後詳細に検討しなければならないが、岐阜県水試の調査では、放流用種苗が生産された養魚場は、過去にIPNが発生したこともあるので、今回溯上アマゴから分離されたIPNウィルスは、養魚場由来である可能性が強い。

長良川のアマゴのIPNVに対する血清中和抗体価は、ウィルスが分離されたにもかかわらず、いずれも1:64以下であった。長良川におけるアマゴの漁獲は、産業的には5月を中心とした一時期に限られるため、それ以降の追跡調査は行わなかったが、溯上し、生殖腺が発達するとともにそれらの持続感染系の魚ではウィルス活性が高まることが予想され、ウィルスの検出率及び血清の抗体価はさらに高まるものと思われる。

天然魚から分離されたウィルスについてみると、北海道におけるサケ・マス増殖事業において、シロザケからIHNウィルスが分離されている (木村ら, 1979) が、これらウィルスの由来については、魚類防疫上の観点からも検討しなければならない。いずれにしても、放流種

苗あるいは溯上した親魚がウィルスを体外に放出することによって、病原体の拡散と水域の汚染の危険性があることから、今後、河川、海面を問わず、放流種苗は事前に飼育経歴を十分調査するとともに、魚病検査を行い、病原体フリーであることを確認して用いる必要があろう。

稿を終るにあたり、本研究を遂行する上で、供試魚の収集に多大な御協力をいただいた、岐阜県水産試験場の職員諸氏に厚く御礼申し上げる。

文 献

- AMEND, D. F., W. T. YASUTAKE and R. W. MEAD (1969): A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **98** (4), 796-804.
- FRYER, J. L., A. YUSHA and K. S. PILCHER (1965): The *in vitro* cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126** (Art. 1), 566-586.
- 本荘鉄夫 (1977): アマゴの増養殖に関する基礎的研究. 岐阜水試研報, **22**, 1-103.
- JENSEN, M. H. (1965): Research on the virus of Egtved disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126** (Art. 1), 422-426.
- 木村喬久・吉水 守・田中 真・三戸秀敏 (1979): 魚病に関する研究—XXVI. シロザケ (*Oncorhynchus keta*) 採卵親魚の魚類病原ウイルス保有状況について. 昭和 54 年度日本水産学会春季大会, 講演要旨集, pp. 40.
- KIMURA, T., M. YOSHIMIZU, M. TANAKA and H. SANNOHE (1981): Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*—I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, **15** (3/4), 143-147.
- SANO, T. and T. YAMAZAKI (1973): Studies on viral diseases of Japanese fishes—V. Infectious pancreatic necrosis of Amago trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **39** (5), 477-480.
- SANO, T. (1976): Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **10** (2), 221-226.
- WOOD, E. M., S. F. SNIESZKO and W. T. YASUTAKE (1955): Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *A.M.A. Arch. Pathol.*, **60**, 26-28.