ニジマスの成長に伴う伝染性造血器壊死症 (IHN) に対する感受性の変化

河西一彦^{*1}・米沢純爾^{*1}・小野 淳^{*1}
長谷川敦子^{*1}・本間智晴^{*2,3}・福田 颯穂^{*2}

(1992 年 10 月 15 日受付)

Brood and Size Dependent Variation in Susceptibility of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* to Artificial Infection of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV)

Kazuhiko Kasai^{*1}, Junji Yonezawa^{*1}, Atsushi Ono^{*1},
Atsuko Hasegawa^{*1}, Tomoharu Honma^{*2,3} and Hideo Fukuda^{*2}

^{*1} Okutama Branch, the Tokyo Metropolitan Fisheries Experiment Station, Kotaba 720,
Okutama-machi, Nishitama-gun, Tokyo 198-01, Japan

^{*2} Laboratory of Aquatic Pathology, Department of Aquatic Bioscience,
Tokyo University of Fisheries, 5-7, Konan 4, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

^{*3} Niigata Prefectural Fish Farming Center, Toyoda, Mano-machi,
Sado-gun, Niigata 952-03, Japan

(Received October, 15, 1992)

For the purpose of obtaining basic knowledge for screening IHN resistant stocks, infection experiments were performed by using a virulent strain of IHNV, TK8901 from 37 g diseased rainbow trout and several different brood and size groups of rainbow trout juveniles. In the infection experiments, 22 progenies, derived from individual pairing of rainbow trout, were inoculated with TK8901 by immersion method at the stages of 1, 8 and 25 g body weight. The results indicated that evident differences in mortality existed among the progenies. Cumulative mortalities of the virus infected fish ranged from 65% to 100% (87.4% in average) in 1 g groups, 33% to 90% (57.2%) in 8 g groups and 10% to 85% (57.0%) in 25 g groups. However, changes in susceptibility of fish with size differed among the progenies. These results suggest that challenge tests using different developmental stages of fish are necessary to estimate the susceptibility of rainbow trout to IHN for screening IHN-resistant strains.

サケ科魚類の IHN (伝染性造血器壊死症) は従来、主として稚魚が冒される疾病とされ、一般に成長に伴って抵抗性が増加すると考えられてきたが (Amend *et al.*, 1973; Amend, 1974), 近年、国外ではベニザケ *O. nerka* やマスノスケ *O. tshawytscha* の 1, 2 年魚にも発生が認めら

れ (Yasutake, 1978; Burke and Grischowsky, 1984; Traxler, 1986; LaPatra *et al.*, 1991), 国内でもニジマス *O. mykiss* やヤマメ *O. masou masou*, アマゴ *O. masou macrostomus* でより成長した段階の大きさの魚 (以下、大形魚と記載する) に被害が及んでいる^{*4,5,6}。大形魚での被害が目立つようになってきた理由として、ウイルスの病原性が変化した可能性が示唆されることから、耐病系品種の開発は大形魚の被害低減をも考慮して行う必要がある。このためには、魚の成長に伴う IHN ウイルスに対する感受性の変化を明らかにし、選抜育種のための耐病性評価時期を検討しておく必要がある。

著者らは耐病系確立のための基礎知見を得るため、本

^{*1} 東京都水産試験場

^{*2} 東京水産大学水族病理学研究室

^{*3} 現在、新潟県栽培漁業センター

^{*4} 第 1~14 回全国養鱈技術協議会 (1976~1989)

^{*5} 森 真朗・池谷文夫・小松俊夫・西村定一 (1987): 昭和 62 年度日本魚病学会春季大会講演要旨。

^{*6} 荒井 真・田代文男 (1984): 岐阜県水産試験場研究報告, 29, 63-68.

研究に用いる供試ウイルス株を検討し、ニジマスの枝分かれ交配群を用いて成長段階の異なる時期に交配組ごとの感染実験を行い、成長に伴う感受性の変化について検討したので報告する。

材料及び方法

供試ウイルス株の選択

本研究に供試する IHN ウイルス（以下、IHNV と記載する）の検討株として従来、IHN 研究でしばしば用いられてきた HV7601 と、最近大形魚から分離された TK 8901 を用いた。HV7601 は 1976 年に長野県で IHN 罹病ニジマス稚魚より FHM 細胞を用いて分離され、TK 8901 は 1989 年に東京都で魚体重 37 g のニジマス病魚から EPC 細胞を用いて分離された IHNV である。両ウイルスはそれぞれ FHM 細胞で培養し、 -80°C に一旦保存した後ウイルス感染価を測定して感染実験に供試した。

供試魚は山形県遊佐ニジマスセンターより発眼卵で購入し、東京水産大学水族病理学研究室において水温 $12.0\sim 13.5^{\circ}\text{C}$ で飼育した魚体重 4.0 g 並びに 5.2 g のニジマス稚魚とした。ウイルスの感染は、5.4%食塩水に 2 分間、次いでウイルス液に 5 分間浸漬する高調処理二浴法で行った。供試魚への感染時のウイルス感染価はウイルス培養液を飼育水で希釈して $10^{5.0}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ となるよう調整した。食塩水、ウイルス液とも 13°C に調節し、それぞれ 600 ml を用いた。無接種対照区の魚は、ウイルスを含まない培養液（牛胎児血清を 2% 加えた MEM:MEM-2）を、感染区に加えたウイルス培養液と等量加えた飼育水に、感染区と同様にして浸漬した。感染後、供試魚を容量約 20 l のガラス水槽に収容し、脱塩素した水道水を注水しながら $13.5\sim 14.5^{\circ}\text{C}$ で 21 日間飼育・観察し、実験期間中、1 日 1 回市販のクランプルを投餌した。

成長に伴う感受性の変化

供試ウイルスは前述の実験で検討した IHNV 株のうち、TK8901 を用いた。接種ウイルス原液は MEM-2 を培養液として EPC 細胞を用いて 15°C で培養し、大部分の細胞が培養容器から剥がれるようになった時点で一旦 -80°C に凍結保存した。後日急速解凍し、必要量を分注して使用時まで再凍結するとともにウイルス感染価を測定した。

供試魚は 1990 年 1 月に東京都水産試験場奥多摩分場において、ニジマス 2⁺ 年魚の雌 30 尾、雄 10 尾を用い、雄 1 尾に対し、雌 3 尾の枝分かれ交配により得られた 30

組の受精卵のうち、同年 3 月に正常に孵化・浮上した 22 組の交配組別稚魚である。各交配組の母群は後述する 3 回の感染実験が終了するまで紫外線照射した河川水を用い、隔離施設において飼育を行った。

感染実験は孵化後 12~14 週（平均体重 1.0 g）、20~22 週（平均体重 8.1 g）、29~31 週（平均体重 24.6 g）の時点で合計 3 回実施した（以下、それぞれ 1 g サイズ、8 g サイズ、25 g サイズと記載する）。供試魚は、各回、各交配組の母群より約 40 尾を無作為に供試し、総魚体重を測定した後、1 及び 8 g サイズでは 3 l 容プラスチック水槽に、25 g サイズでは 5 l 容ポリバケツに収容した。感染は各サイズの供試魚に対して約 13°C の飼育水をそれぞれ 1, 1.5 並びに 2.5 l 注入し、ウイルスの感染価が $10^{5.6}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ になるようにウイルス液を添加した。止水通気で 1 時間浸漬接種し、換水後、それぞれ 2 水槽に分け、一部河川水を導入して半循環で飼育した。実験中の水温は各回約 13°C を維持するように循環式加熱冷却装置を用いて調温し、1 水槽当りの注水量は毎分 300~400 ml とした。循環水を通して他の水槽へウイルスが流入しないように、循環経路の途中に紫外線殺菌灯 15W4 本を設置して循環水を殺菌し、ウイルスの不活化を確認するため未感染魚がそれぞれ 20 尾入った 2 水槽に循環水を導入して対照区とした。また、通常の河川水を用いた対照区も設置した。斃死状況の観察は 21 日間行い、3~4 日ごとに 1 回市販の配合飼料を投餌した。毎日の斃死魚は -20°C にて凍結保存し、後日個体別にウイルス検査を実施した。

結 果

供試ウイルス株の選択

検討を行った IHNV2 株の感染実験結果を Table 1 に示した。

HV7601 による斃死率は 4.0 g で 20%、5.2 g で 7% とこれらサイズのニジマスに対しては高い斃死をもたらさなかった。一方、TK8901 のそれは 4.0 g で 90%、5.2 g で 47% に達し、HV7601 に比べ、強い病原性が認められた。このことから本研究においては TK8901 を攻撃用供試ウイルスとした。

成長に伴う感受性の変化

各交配組の感染実験供試時点での平均魚体重を Table 2 に示す。3 回の感染実験で得られた供試魚の斃死数を、交配組に係わりなく各回ごとに合計し、累積斃死曲線として Fig. 1(A) に示した。

1 g サイズでは感染後 5 日目から斃死が始まり 8 日目

Table 1. Comparison in virulence to rainbow trout between two IHNV isolates, TK8901 and HV7601*¹

Code of isolate	Mean body weight of fish (g)	No. of fish used	No. of death	Mortality (%)
TK8901	4.0	10	9	90
	5.2	15	7	47
HV7601	4.0	10	2	20
	5.2	15	1	7
Control* ²	4.0	10	0	0
	5.2	15	0	0

*¹ Experimental fish were dipped in a 5.4% NaCl solution for 2 minutes and then exposed to a virus solution containing $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml of IHNV for 5 minutes. They were then reared for 21 days at 12.0–13.5°C.

*² Experimental fish were treated same as test fish group, except the virus solution had been replaced with water.

Table 2. Mean body weight(g) of 3 experimental fish groups at each inoculation trial of IHNV TK 8901

Code of progeny	Fish groups		
	1st	2nd	3rd
F- 1	0.88	9.0	22.8
F- 2	0.91	6.5	23.3
F- 3	1.14	8.7	24.9
F- 4	1.05	8.5	22.7
F- 5	1.26	9.1	24.5
F- 6	1.24	9.6	24.3
F- 7	0.98	6.4	22.0
F- 9	0.74	7.0	23.5
F-10	1.14	7.8	25.7
F-11	1.02	8.4	26.7
F-13	1.21	10.6	29.9
F-16	0.99	6.9	22.6
F-18	0.89	8.0	22.3
F-19	1.08	8.2	27.9
F-20	1.08	7.5	23.6
F-21	0.70	6.0	23.0
F-23	0.68	7.3	24.3
F-24	0.82	9.3	25.3
F-26	0.91	6.9	20.8
F-27	0.67	7.2	20.9
F-29	0.96	8.4	33.4
F-30	1.10	8.0	27.2

には 87.4% の供試魚が斃死した。一方、8 g と 25 g サイズでは斃死状況が類似しており、ともに 5 日目より斃死が始まったが、1 g サイズに比べ累積斃死率の上昇は緩やかであった。

各交配組の成長段階毎の IHNV 実験感染における累積斃死率を Table 3 に、また、このうち特徴的な累積斃死曲線を示したもののについて、その代表例を Fig. 1 (F-2 ~F-27) に示した。

同一サイズ内の斃死率は交配組毎に異なり、交配組別の 2 水槽間の平均斃死率の範囲は 1 g サイズで 65 ~ 100%, 8 g サイズで 33 ~ 90%, 25 g サイズでは 10 ~ 85% であった。これら成長に伴う斃死率の変化の特徴を交配組別にみると、斃死率の低下が顕著であったグループ、すなわち交配番号 F-1, 2 (Fig. 1), 3, 16 及び 18, 低下はしたが顕著でないグループ、すなわち F-4, 5, 6, 9, 11 (Fig. 1), 13, 21 及び 23, 8 g サイズより 25 g サイズの斃死率が上昇したグループ、すなわち F-7, 10, 19 (Fig. 1), 20, 26, 29 及び 30 とに大まかに類別され、さらにこれらの中に類別されない例として、斃死率が変わらないもの F-24 (Fig. 1) と斃死率が上昇したもの F-27 (Fig. 1) が認められた。

なお、斃死魚のウイルス検査の結果、IHNV の検出率は 1 g サイズ 98.6%, 8 g サイズ 99.6%, 25 g サイズ 100% で、小さなサイズでは斃死魚の傷みもあり検出率がやや低かったが、いずれの対照区においても斃死魚が認められなかったため、斃死魚はすべて IHNV 感染によるものと判断された。

考 察

著者らは本実験に先立ち、大形魚から分離された IHNV と従来、IHN 研究において種々の攻撃試験等に行い、しばしば用いられてきた HV7601 との病原性の比較を行い、大形魚に強い病原性を示す TK8901 を本研究の供試ウイルスとした。大形魚から分離された IHNV の病原性については山形県*⁷、北海道*⁸でも検討され、大形の IHN 病魚より分離された IHNV は大形のニジマスを致

*⁷ 鈴木裕之・伊藤靖志・岡本信明・佐野徳夫 (1984): 昭和 57 年度山形県内水面水産試験場事業報告, 183–186.

*⁸ 鈴木邦夫・坂井勝信 (1989): 平成元年度北海道水産孵化場研究報告, 44, 57–62.

Table 3. Susceptibility of 22 rainbow trout progenies to IHNV TK8901 at three growth stages*¹

Code of progeny	Male No.	Mortality (%) ^{*2}		
		Growth stages in terms of fish body weight (g)		
		1.0	8.1	24.6
F-1	M1	95, 85 (90)	55, 30 (43)	40, 25 (33)
F-2		100, 100 (100)	70, 50 (60)	10, 10 (10)
F-3		100, 100 (100)	55, 35 (45)	30, 15 (23)
F-4	M2	95, 90 (93)	90, 90 (90)	75, 75 (75)
F-5		90, 74 (82)	55, 39 (47)	50, 45 (48)
F-6		95, 65 (80)	60, 50 (55)	60, 47 (54)
F-7	M3	90, 60 (75)	50, 45 (48)	65, 55 (60)
F-9		79, 55 (67)	80, 55 (68)	45, 30 (38)
F-10	M4	100, 95 (98)	50, 40 (45)	80, 75 (78)
F-11		100, 95 (98)	85, 85 (85)	90, 44 (67)
F-13	M5	95, 95 (95)	42, 38 (40)	53, 45 (49)
F-16	M6	95, 90 (93)	75, 65 (70)	45, 40 (43)
F-18		100, 95 (98)	75, 60 (68)	55, 50 (53)
F-19	M7	100, 95 (98)	45, 40 (43)	90, 80 (85)
F-20		85, 75 (80)	55, 20 (38)	50, 45 (48)
F-21		100, 85 (93)	44, 41 (43)	50, 50 (50)
F-23	M8	90, 85 (88)	75, 70 (73)	65, 61 (63)
F-24		90, 80 (85)	80, 75 (78)	83, 80 (82)
F-26	M9	89, 67 (78)	60, 45 (53)	75, 65 (70)
F-27		65, 65 (65)	80, 75 (78)	84, 72 (78)
F-29	M10	95, 85 (90)	40, 25 (33)	85, 70 (78)
F-30		85, 75 (80)	60, 60 (60)	85, 65 (75)

*¹ Experimental fish were immersed in a virus solution containing $10^{5.6}$ TCID₅₀/ml of IHNV for 60 minutes and reared for 21 days at 12.7–13.7°C.

*² Tests were conducted in duplicate (approximately 20 fish in each tank) and the average mortality of each duplicate test is shown in parenthesis.

死させ、稚魚から分離された IHNV との病原性の違いが指摘されている。さらに、最近の分離株ほど大形のニジマスに対して高い病原性を有することが示唆されている (Fukuda *et al.*, 1992)。成長に伴う交配別稚魚の IHNV に対する感受性の変化及び遺伝率の算定は 1g 未満のベニザケ稚魚で報告されているが (Amend and Nelson, 1977; McIntyre and Amend, 1978), 大形魚の IHN をも考慮して耐病系品種の選抜を行うには通常、隔離飼育される 2g 未満の稚魚のみならず、より成長した段階での IHN 感受性を、大形魚にも強い病原性を示す強毒ウイルスを用いて検討する必要があると考えられる。

一般にニジマスの IHNV に対する感受性は成長に伴って低下するとの報告があるが、今回の実験でも、全

体の供試魚すなわち、全交配組総計の魚体重別の斃死率は 1g サイズの時点で最も高く、より小さいサイズで IHNV に対する感受性が高いことが確認された。さらに、交配組の中には、魚体重増加とともに急激に感受性が低下するものや、かえって斃死率が上昇する交配組も存在した。全ての交配組をサイズ毎に一群とみなした結果は、多数の親魚から得られた業務卵に由来する稚魚を飼育している一般の養鱒場での IHN による斃死状況を反映する一例と思われる。

今回の実験結果では魚体重増加に伴う斃死率の変化は各交配組によって大きく異なり、大まかに、5つのタイプに類別できる。すなわち、IHNV に対する感受性が成長とともに急激に低下するグループ、低下はするが顕著

Fig. 1. Variant susceptibility of rainbow trout progenies to artificial infection of IHN TK8901 at 3 different growth stages.

(A); Total cumulative mortality in 3 growth stages regardless of the progenies.

(F-2); Progeny F-2. Mortality decreased markedly with the growth.

(F-11); Progeny F-11. Mortality decreased modestly with the growth.

(F-19); Progeny F-19. Lowest mortality was seen at 8g stage.

(F-24); Progeny F-24. Mortality did not differ with the growth.

(F-27); Progeny F-27. Mortality increased with the growth.

でないグループ、8gより25gサイズの斃死率が上昇するグループ、並びに斃死率が変化しないものおよび成長に伴って斃死率が上昇したものそれぞれ1例(F-24, 27)認められた(Table 3)。それらの中で一部は25gに成長した時点で10~30%と低い斃死率を示したが、22交配組のうち8交配組では25gの魚においても70%以上が斃死した。また、8gと25gを比べると、25gでの斃死率が8gのそれより30%以上上昇するものが3例(F-10, 19, 29)認められた。これは、ニジマスの成長過程において、一時的にIHNに対する感受性が低下する場合があるか、あるいはある時期を越えて感受性が高くなる場合

があることを示すものと考えられるが、そのメカニズムは現在のところ不明である。いずれにしても、これらの結果は、最も感受性が高いと思われる1g以下の大きさでIHNに対する感受性を比較しても、より成長した段階での感受性を推定することは必ずしもできないことを示している。どの発育段階においてもIHNに耐性を示す系統が得られれば理想的であるが、20年の発病の歴史を経た今日に至っても、そのような耐病系統は得られておらず、IHNによる被害は低減していない。被害額を低減させるための現実的な対処の1つとして、成長に伴って速やかに抵抗性を獲得する系統の選抜にも着目すべき

であろう。そのためにも複数の発育段階における攻撃試験が必要と考えられる。すなわち、特に隔離飼育が解かれるサイズでの攻撃試験は必須であり、さらに成長した段階においても IHN に対する感受性を検討する必要があると思われる。

なお、本研究で用いた枝分れ交配は遺伝率を推定するための遺伝学的手法であるが、今回の実験で得られた結果の遺伝学的解析については別報で行う予定である。

文 献

- Amend, D. F. (1974): Infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus disease. U. S. Fish and Wildlife Service. Fish Disease Leaflet 39.
- Amend, D. F. and J. R. Nelson (1977): Variation in the susceptibility of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* to infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Fish Biol.*, **11**, 567-573.
- Amend, D. F., W. T. Yasutake, J. L. Fryer, K. S. Pilcher and W. H. Wingfield (1973): Infectious hematopoietic necrosis (IHN). In "Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control" (ed. by W. A. Dill). FAO EIFAC Tech. Pap. 17 (Suppl. 2), pp. 80-87.
- Burke, J. A. and R. S. Grischkowsky (1984): An Epizootic caused by infectious haematopoietic necrosis virus in an enhanced population of sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), smolts at Hidden Creek, Alaska. *J. Fish Dis.*, **7**, 421-429.
- Fukuda, H., T. Honma, H. Y. Chou and T. Sano (1992): Infectious hematopoietic necrosis in Japan. In "Proceedings of the OJI international symposium on salmonid diseases". Hokkaido University Press, pp. 96-102.
- LaPatra, S. E., C. N. Lannan and T. D. Kreps (1991): An epizootic of infectious hematopoietic necrosis in yearling chinook salmon. Amer. Fish. Soc., Fish Health Section Newsletter, **18**(2), 4-5.
- McIntyre, J. D. and D. F. Amend (1978): Heritability of tolerance for infectious hematopoietic necrosis in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **107**, 305-308.
- Traxler, G. S. (1986): An epizootic of infectious haematopoietic necrosis in 2 year old kokanee, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), at Lake Cowichan, British Columbia. *J. Fish Dis.*, **9**, 545-549.
- Yasutake, W. T. (1978): Histopathology of yearling sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) infected with infectious hematopoietic necrosis (IHN). *Fish Pathol.*, **14**, 59-64.