



Title	サクラマスおよびシロサケ受精卵中におけるIHNVの消長に関する研究
Author(s)	吉水, 守; 佐見, 学; 木村, 喬久
Citation	日本水産学会誌, 54(12), 2089-2097 https://doi.org/10.2331/suisan.54.2089
Issue Date	1988-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38618
Rights	© 1988 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	yoshimizu-68.pdf



サクラマスおよびシロサケ受精卵中における IHNV の 消長に関する研究

吉水 守, 佐見 学, 木村 喬久

(1988 年 7 月 13 日受付)

Survival and Inactivation of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in Fertilized Eggs of Masu Salmon *Oncorhynchus masou* and Chum Salmon *O. keta*

Mamoru Yoshimizu,* Manabu Sami,* and Takahisa Kimura*

The possibility of vertical transmission of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) was studied using the eggs of masu salmon *Oncorhynchus masou* and chum salmon *O. keta*. One day after incubation, IHNV was not detected from the eggs of masu salmon and chum salmon contaminated with IHNV. Eggs just after fertilization, and eyed eggs were injected intraovum with IHNV by microglass needle. Infectivity of IHNV inside the eggs decreased gradually and could not be detected 1 week or 5 weeks after incubation. This reduction rate of IHNV infectivity in the fertilized egg was similar to that found in the mixture with IHNV and the homogenized egg contents. Several kinds of phospholipid, amino acid and vitamin those were components of yolk showed anti-IHNV activity. In the eyed eggs, the embryos of both masu salmon and chum salmon were infected with IHNV, and this infectivity increased rapidly and reached more than $10^{3.5}$ TCID₅₀/fish. The cumulative mortality of both masu salmon and chum salmon were 90%. The rate of susceptibility of hatched-out masu salmon and chum salmon fry against IHNV were different, and the cumulative mortality was more than 90% in masu salmon and 20 to 30% in chum salmon artificially infected with IHNV by immersion method. From above results, we concluded that the vertical transmission of IHNV is doubtful.

サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (infectious hematopoietic necrosis; IHN) は、わが国では 1971 年に北海道立水産孵化場のベニザケ稚魚でその発生が初めて確認され、翌年には北海道さけ・ますふ化場の同稚魚に再び発生が認められた。¹⁾ 1974 年以降本症は本州のニジマスに急速に広まり、²⁾ 現在本州各地の多くのニジマス養殖場が IHNV に汚染され、ニジマスの養殖生産における大きな障害の一つとなっている。

IHN の予防・防疫対策としては、幼稚魚の飼育水温を調節する方法^{3,4)}を始めワクチンの開発、⁴⁾ 化学療法^{5,6)}等が研究されているが、現在最も効果的でかつ広く用いられている方法は、卵をヨード剤により消毒し、その後ウィルスフリーの環境で飼育する方法である。^{7,8)}

我国でも、飼育水温を 15°C 以上に保つことにより効を奏している例もあるが、ほとんどのニジマス養殖場では、上述の方法により IHNV の被害から免れている。すなわち、まず発眼初期に卵をヨード剤 (50 ppm, 20 min) で消毒した後、IHNV に感受性を持つ時期をウィ

ルスフリーの湧水あるいは紫外線で処理した用水で飼育し、その後稚魚を河川水を用いた飼育池に移し飼育している。⁹⁾

ところで Mulcahy and Pascho¹⁰⁾は IHNV がサケ科魚類 2 魚種の精子の表面に吸着することを明かにし、死卵からの IHNV の検出例等を考慮した上で、IHNV の垂直感染の可能性を示唆している。¹¹⁾ また Nusbaum and Grizzle¹²⁾ もアメリカナマズの精子に CCV が吸着する現象を報告し、CCV の垂直感染の可能性を論じている。わが国でも最近、卵を消毒しウィルスフリーの飼育用水を用いたにもかかわらず IHN が発症した例が見られ、改めて垂直感染の可能性が論議されるようになってきている。

本報では IHNV に対する感受性の異なるサクラマス *Oncorhynchus masou* とシロサケ *O. keta* 卵を用い、IHNV 垂直感染の可能性を検討した。

実験材料と方法

供試ウイルス IHNV として 1976 年に網走川のシロ

* 北海道大学水産学部微生物学講座 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

サケ採卵親魚の体腔液より分離した ChAb 株, 1986 年 IHN 発症シロサケの瀕死魚より分離した ChIw 株, および 1983 年に青森県内水面水産試験場のニジマス採卵親魚の体腔液より分離した RtTo 株の 3 株¹³⁾を供試し, 100 I.U./ml の penicillin, 100 µg/ml の streptomycin (Sigma) および 10% FBS 加 EAGLE の MEM (Gibco; 以後 MEM-10 と称す) にて培養した RTG-2 細胞¹⁴⁾を用い, 15°C で 7 日間培養後, 培養液をミリポアフィルター HA (0.45 µm) で濾過, 小分けして -80°C にストックし以後の実験に供試した。

供試魚卵および供試魚 サクラマスおよびシロサケの未受精卵, 精液ならびに発眼卵を北海道さけ・ますふ化場より分与を受け, 卵については 50 ppm のイソジン(明治製菓)で 20 分間消毒後, 水産学部内の飼育槽に移し脱塩素処理水道水で孵化させ, 以後も同様の水で飼育した。稚魚については孵化後, 卵黄嚢吸収時のシロサケおよび一カ月齢のサクラマスならびにシロサケを供試した。なお孵化ならびに飼育水温は 10°C とした。

卵の IHN 汚染方法 サクラマスの未受精卵 100 粒に IHN (ChAb 株) 培養濾液 ($10^{6.06}$ TCID₅₀/ml) を 5 ml 混合し, 30 分間静置後受精させ卵汚染群とした。同様に精液 2 ml に IHN (ChAb 株) 培養濾液を 1 ml 混合し, 未受精卵 100 粒を受精させ精子汚染群とした。さらに同方法で卵および精子の両者を汚染させた群および両者汚染群を 50 ppm のイソジン液で 20 分間消毒して消毒群を設定し, 汚染後の卵の累積死卵率とウイルス感染価の消長を観察した。

IHN の卵内接種法 サクラマス および シロサケの受精直後卵に IHN (ChAb 株) 培養濾液 ($10^{6.06}$ TCID₅₀/ml) を, 発眼卵には IHN (ChAb, ChIw 株) 培養濾液 ($10^{6.06}$ TCID₅₀) を, 先端の外径が 100 µm の自家製毛細ガラス針を用いて, 植物極側から卵黄中心部に卵一粒当たり 5 µl ずつ 100 粒に接種し, 対照としては MEM-10 を同様に接種した。

ウイルス感染価の測定法 供試魚卵を前述の方法で汚染後, 10°C の流水中に置き, 受精時汚染群および受精直後接種群では 1 週間毎, 発眼期汚染群では 2 日毎に卵および孵化稚魚を 10 粒あるいは 5 尾ずつ採取し Hanks' BSS を加えて摩砕後, ミリポアフィルター HA で濾過し, RTG-2 細胞を用いた常法のマイクロプレート法によりウイルス感染価を測定した。

IHN ChAb 株, ChIw 株, RtTo 株の病原性 卵黄嚢吸収時のシロサケ稚魚 50 尾を $10^{8.78}$ TCID₅₀/ml の IHN (ChAb, ChIw) を含む飼育水に, また卵黄嚢吸収時のシロサケおよび一カ月齢のサクラマスならびにシロサケ各 50 尾を $10^{2.00}$ TCID₅₀/ml の IHN (RtTo 株) を含む飼育水 1 l に一時間浸漬後流水飼育を行い, その

後の斃死数を観察した。

未受精卵内容物中における IHN の消長 シロサケ未受精卵を摩砕し, 滅菌ガーゼで卵膜を除去した内容物に等量の IHN (ChAb 株) 培養濾液 ($10^{6.06}$ TCID₅₀/ml) を懸濁し, 5°C に静置して 1, 3, 5, 7 日後のウイルス感染価を測定した。対照群としては Hanks' BSS に IHN 培養液を同様に懸濁しウイルス感染価を測定した。

卵内主要成分の IHN 不活化効果 アセトン不溶性脂質のうちグリセロリン脂質のレシチン, セファリン (和光純薬), スフィンゴ脂質のスフィンゴミエリン, セレブロシド (Sigma) をそれぞれ Hanks' BSS に懸濁し 50 W で 60 秒間超音波処理 (大竹製作所) した。また, 卵黄を構成するアミノ酸のうち L-アスパラギン酸, L-グルタミン酸, D,L-フェニルアラニン, L-トリプトファン, L-アルギニン, L-リジン, L-ヒスチジン, L-バリン, D,L-アラニン, L-ロイシン, D,L-イソロイシン, D,L-スレオニン, L-セリン, D,L-メチオニン, L-システインおよび L-プロリンの 17 種類 (和光純薬) さらにビタミン類としてアスコルビン酸, ピリドキサルリン酸, ビオチン および 葉酸 (和光純薬) をそれぞれ Hanks' BSS に溶解し (pH 6.5~7.5) 以下の実験に供試した。

まず脂質懸濁液を最終濃度 100 µg/ml, アミノ酸およびビタミン溶解液を最終濃度 1000 µg/ml となるように IHN (ChAb 株) 希釈液に混合し, 15°C で 30 分間静置した後, 細胞に接種し出現したブラック数を測定した。次に細胞培養用培地に, これらを上記の濃度に加え, 24 時間後に培養細胞を Hanks' BSS で 2 回洗浄した後, IHN (ChAb 株) を接種し出現したブラック数を測定した。さらに重層培地に同濃度で添加して培養し IHN (ChAb) のブラック数を測定した。

また供試した 17 種類のアミノ酸については Hanks' BSS に 1000 µg/ml となるように溶解後, これに IHN を約 100 PFU/ml となるように懸濁し, 5°C で 1, 3, 5, 7 日間静置しこの間の感染価の変化を観察した。さらにこれらのアミノ酸のうちブラックの減少が観察されたものを 199 培地 (Morgan *et al.*)¹⁵⁾ の組成に準拠して調製・混合し (総アミノ酸量, 370 µg/ml: グルタミン酸, 150; アスパラギン酸, 60; フェニルアラニン, 50; トリプトファン, 20; ヒスチジン, 20 およびアルギニン, 70 µg/ml), このアミノ酸混液に IHN を懸濁し 7 日間ウイルス感染価の変化を同様に観察した。なおブラック法は Kamei *et al.*¹⁶⁾ の方法に従い, 無処理の well と前述の各方法で処理した well のブラック数の比較を行ないブラック減少率として表示した。

結 果

受精時卵表面汚染群の死卵率と IHN の消長 サク

Table 1. Cumulative mortalities and infectivities of IHNV (ChAb) on the eggs of masu salmon and chum salmon contaminated with IHNV on the surface of egg, sperm or both before fertilization

Species	Contaminated with IHNV	Dose Log. TCID ₅₀ /egg	Treatment	Cumulative mortality (%)	Infectivity (Log. TCID ₅₀ /egg)				
					day 1	1	2	3	4 5
Masu salmon* ¹	Egg & Sperm	4.83		0	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	Egg	4.75		0	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	Sperm	3.75		0	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50
	Egg & Sperm	4.83	Iodophore* ³	0	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50
Chum salmon* ²	Egg & Sperm	4.83		0	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50	≤1.50

*¹ *Oncorhynchus masou*, *² *Oncorhynchus keta*, *³ 50 ppm, 20 min.

ラムスの未受精卵汚染群、精子汚染群、両者汚染群ならびに両者汚染群をイソジン消毒した群、さらにシロサケの両者汚染群の5週間後までの累積死卵率とウイルス感染価の観察結果を Table 1 に示した。実験開始時卵1粒あたり $10^{3.75} \sim 10^{4.83}/g$ の IHNV で汚染した卵(精子も受精時の卵に換算)からは、精子汚染群を含めいずれの群からも翌日には IHNV は検出されなくなり、観察した5週間いずれの群にも死卵は見られずウイルスも検出されなかった。なお4週目に発眼卵となり7~8週後に全卵孵化した。

受精直後卵内接種群の死卵率と IHNV の消長 受精直後にサクラマス卵内に IHNV (ChAb 株) を接種した群の3週間後までの累積死卵率とウイルス感染価の観察結果を Fig. 1 に示した。受精直後に IHNV を接種した群は3週間の観察期間内に全卵死亡したが、IHNV は1週間後には検出されなくなった。対照群の累積死卵率は MEM-10 接種群で 42.9% であった。

受精時にシロサケ卵内に IHNV (ChAb 株) を接種した群の5週間後までの累積死卵率とウイルス感染価の観察結果を Fig. 2 に示した。受精直後に IHNV を接種した群では5週間の観察期間に全卵死亡したが、IHNV は5週間後には検出できなくなった。対照群の累積死卵率は、MEM-10 接種群で 41.4% であった。もちろんいずれの対照群からもウイルスは検出されなかった。

発眼期卵内接種群の死卵率と IHNV の消長 サクラマスの発眼卵内に IHNV (ChAb 株) を接種し、その後7日間累積死卵率あるいは孵化稚魚の累積死亡率および IHNV 感染価の消長を観察した結果を Fig. 3 に示した。IHNV 接種群では接種後3日目に孵化稚魚より1尾当たり $10^{8.80}$ TCID₅₀/g 以上のウイルス感染価が得られ、接種7日後までに全個体が死亡した。対照群の接種7日後までの累積死亡率は MEM-10 接種群で 30.0%, ガラス針を刺しただけの群で 22.9% であった。なおこの発眼卵はウイルス接種後1日目から孵化し始め5日後までに全卵が孵化した。

シロサケ発眼卵内に IHNV (ChAb, ChIw 株) を接種

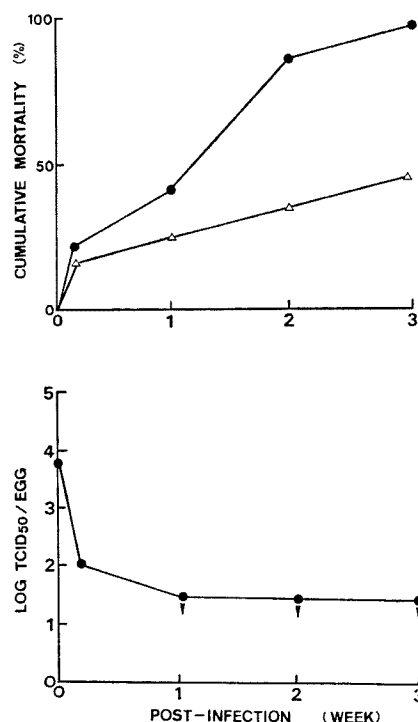


Fig. 1. Cumulative mortalities and infectivities of IHNV (ChAb) in the egg of masu salmon artificially intraovum injected with IHNV (dose; $10^{3.75}$ TCID₅₀/egg) just after fertilization.

●; Test group, △; Control group, ▽; Less than detectable limits.

し、その後15日間累積死卵率あるいは孵化稚魚の累積死亡率とウイルス感染価の消長を観察した結果を Fig. 4 に示した。IHNV 接種後9日目に孵化稚魚より1尾当たり $10^{8.80}$ TCID₅₀/g 以上のウイルス感染価が得られ、接種15日後までの卵および孵化稚魚の累積死亡率は、ChAb 株で 91.1%, ChIw 株で 88.9% であった。なおこの発眼卵はウイルス接種後3日目から孵化が始まり13

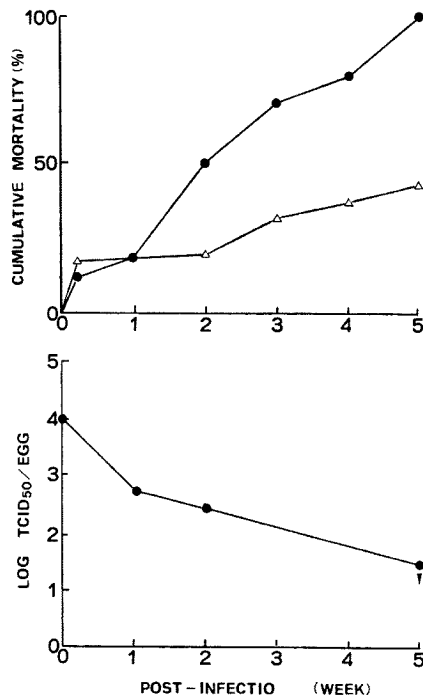


Fig. 2. Cumulative mortalities and infectivities of IHN (ChAb) in the egg of chum salmon artificially intraovum injected with IHN (dose; $10^{3.75}$ TCID₅₀/egg) just after fertilization.

●; Test group, △; Control group, ▽; Less than detectable limits.

日後までに全卵が孵化した。

IHN ChAb 株, ChIw 株, RtTo 株の病原性の比較

供試した IHN の各株 RtTo, ChAb および ChIw 株のサクラマスおよびシロサケに対する病原性を観察した結果を Fig. 5 に示した。RtTo 株は一カ月齢のサクラマスに対し 90%, 一カ月齢のシロサケに対しては 22%, 卵黄嚢吸収時のシロサケに対して 20% の累積死亡率を示した。ChAb 株および ChIw 株は卵黄嚢吸収時のシロサケに対して, それぞれ 6% および 28% の累積死亡率を示した。対照群は一カ月齢のサクラマスで 5%, 卵黄嚢吸収時のシロサケで 9% であった。

未受精卵内容物中における IHN の消長 シロサケ未受精卵内容物中における IHN (ChAb) 感染価の変化を Fig. 6 に示した。IHN の感染価は漸減傾向を示し一週間で約 2 オーダー減少した。Hanks' BSS に懸濁した対照群では 1 オーダーの減少にとどまった。

卵内主要成分の IHN 不活化効果 供試したアセトン不溶性脂質 4 種, アミノ酸 17 種およびビタミン 4 種の IHN (ChAb 株) 感染価におよぼす影響を Table

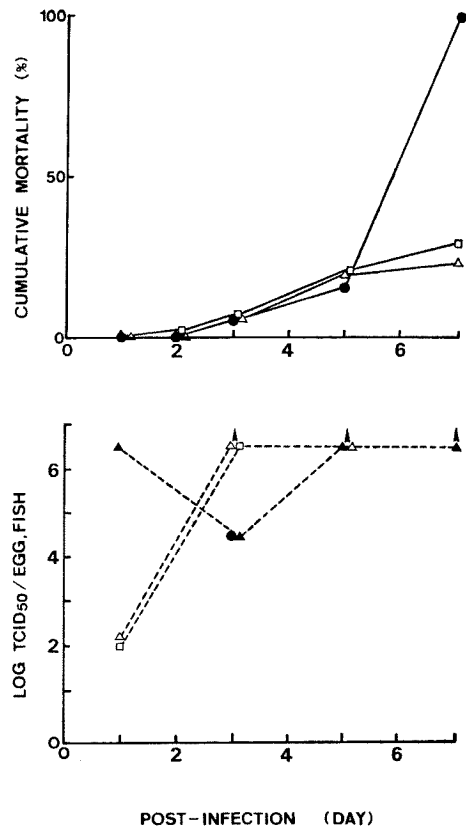


Fig. 3. Cumulative mortalities and infectivities of IHN (ChAb) in the eyed egg of masu salmon and fingerling intraovum injected with IHN (dose; $10^{3.75}$ TCID₅₀/egg).

●—●; Test group, □—□; Control group-1 (MEM₁₀), △—△; Control group-2 (needle), ●—●; Dead egg, ▲—▲; Dead fingerling, □—□; Alive egg, △—△; Alive fingerling, ▲; More than detectable limits.

2 に示した。IHN に直接 30 分間作用させた場合, セファリンおよびフェニルアラニンは 100 および 1000 μ g/ml の濃度で無処理対照と比べて 81 および 61% のブラック数の減少が観察された。またセファリンを細胞にあらかじめ加えた後, IHN を接種した場合にも 60% のブラック減少が観察された。さらにグルタミン酸, トリプトファン, ビリドキサルリン酸および葉酸を 1000 μ g/ml の濃度で重層培地に混合した場合, それぞれ 100, 69, 100, 100% のブラック数の減少が観察された。他の成分には著しいブラック減少は観察されなかった。

また供試した 17 種類のアミノ酸溶液 1000 μ g/ml に IHN を約 100 PFU/ml となるように懸濁し, 1, 3, 5, 7 日後の感染価を測定し, 対照のブラック数と比較した

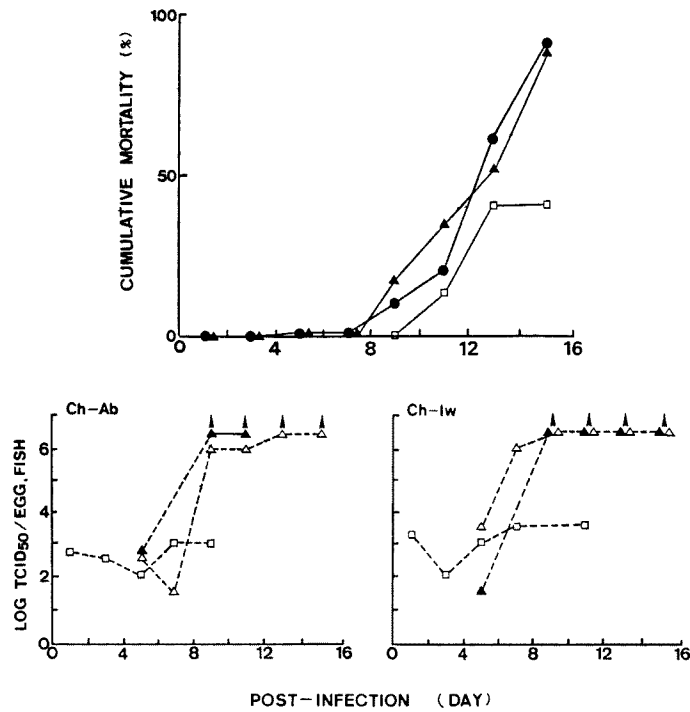


Fig. 4. Cumulative mortalities and infectivities of IHNV (ChAb) in the eyed egg of chum salmon and fingerling intraoviumly injected with IHNV (dose; $10^{3.75}$ TCID₅₀/egg).

●—●; Test group (ChAb) ▲—▲; Dead fingerling
 ▲—▲; Test group (ChIw) □—□; Alive egg
 □—□; Control group (MEM₁₀) △—△; Alive fingerling
 †; More than detectable limits.

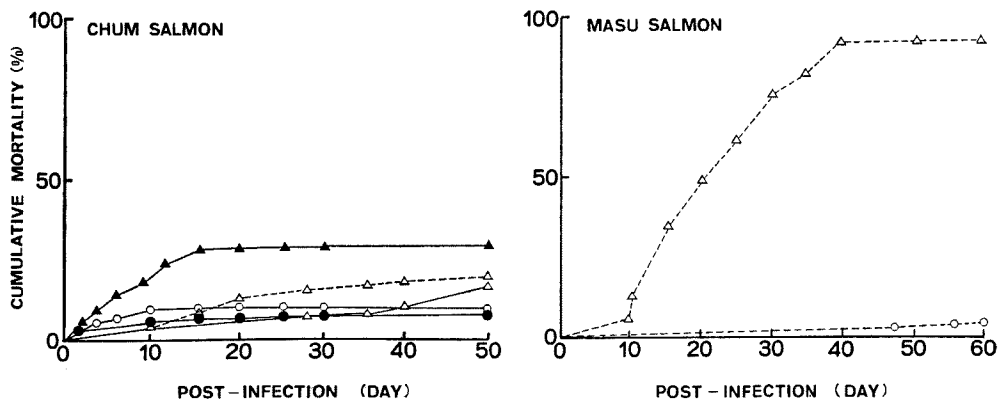


Fig. 5. Cumulative mortalities of masu salmon or chum salmon fry infected with IHNV (ChAb and ChIw dose; $10^{3.75}$ TCID₅₀/ml, 60 min., RtTo dose; $10^{2.00}$ TCID₅₀/ml, 60 min.) by immersion method.

—; Sac fry, ---; 1 month old, ●; ChAb, ▲; ChIw, △; RtTo, ○; Control

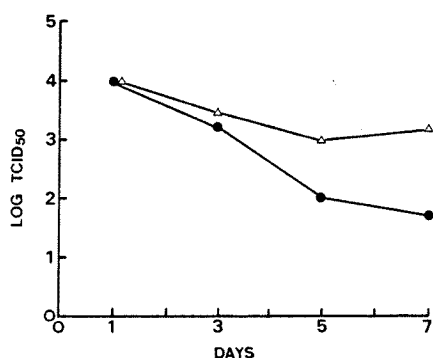


Fig. 6. Survival of IHN (ChAb) in the unfertilized egg contents of chum salmon.

●: Test group, △: Control group (suspended in Hanks' BSS).

減少率を Fig. 7 に示した。ジカルボキシアミノ酸のグルタミン酸, アスパラギン酸 (Fig. 7A), 芳香族アミノ酸のフェニルアラニン, トリプトファン (Fig. 7B), 塩基性ア

ミノ酸のヒスチジン, アルギニン (Fig. 7C), 脂肪族アミノ酸のロイシン (Fig. 7D) に顕著なプラーク数の減少が観察された。他のアミノ酸には顕著なプラーク数の変化は観察されなかった (Fig. 7E, F, G)。さらにプラークの減少が観察された7種類のアミノ酸のうちロイシンを除く6種類を 199 培地の組成に準拠して混合し, この混合液に IHN を同様に懸濁したが, この場合にも顕著なプラーク数の減少が観察された (Fig. 7H)。

考 察

IHN の垂直感染の可能性を検討するために, 本研究ではまず体腔液のウイルス検査が陰性であったサクラマスおよびシロサケ親魚群より得た未受精卵および精子を用い, IHN (ChAb 株) による卵表面汚染, 精子表面汚染, 両者汚染群および両者汚染群に消毒を施した群を設定し, ウイルスフリーの流水環境下に置き, 受精後の死卵およびウイルス感染価の消長を観察した。精子汚染群を含め IHN で汚染した卵からは, 翌日にはウイルス

Table 2. Effect of the egg components to the IHN infectivity

Egg component		Concentration (μg/ml)	Plaque reduction (%)		
			Direct reaction* ¹	Pre-treatment* ²	Mixed with overlay* ³
Amino acid	L-Aspartic acid	1000	14	12	3
	L-Glutamic acid	1000	3	17	100
	DL-Phenylalanine	1000	60	-3	8
	L-Tryptophan	1000	11	12	69
	L-Tyrosine	1000	34	18	-12
	L-Arginine	1000	8	14	0
	L-Lysine	1000	7	10	-5
	L-Histidine	1000	0	3	0
	L-Valine	1000	6	2	-6
	DL-Alanine	1000	6	22	2
	L-Leucine	1000	6	1	-22
	DL-iso-Leucine	1000	9	6	-8
	DL-Threonine	1000	15	10	-3
	L-Serine	1000	-3	-7	8
	DL-Methionine	1000	23	4	3
	L-Cysteine	1000	8	10	-7
	L-Proline	1000	19	-6	33
Vitamin	Ascorbic acid	1000	7	-2	44
	Pyridoxal phosphate	1000	-10	21	100
	Biotin	1000	9	-1	11
	Folic acid	1000	-43	ND	100
Lipid	Lecithin	100	-7	14	0
	Cephalin	100	81	60	16
	Sphingomyelin	100	34	10	0
	Cerebrosides	100	35	7	-3

*¹ IHN was mixed with these compounds and reacted 30 min, in 15°C.

*² These compounds were added in cell culture medium and washed away two times by Hanks' BSS just before virus inoculation.

*³ These components were added to overlay-medium after virus inoculation.

ND: Not determined.

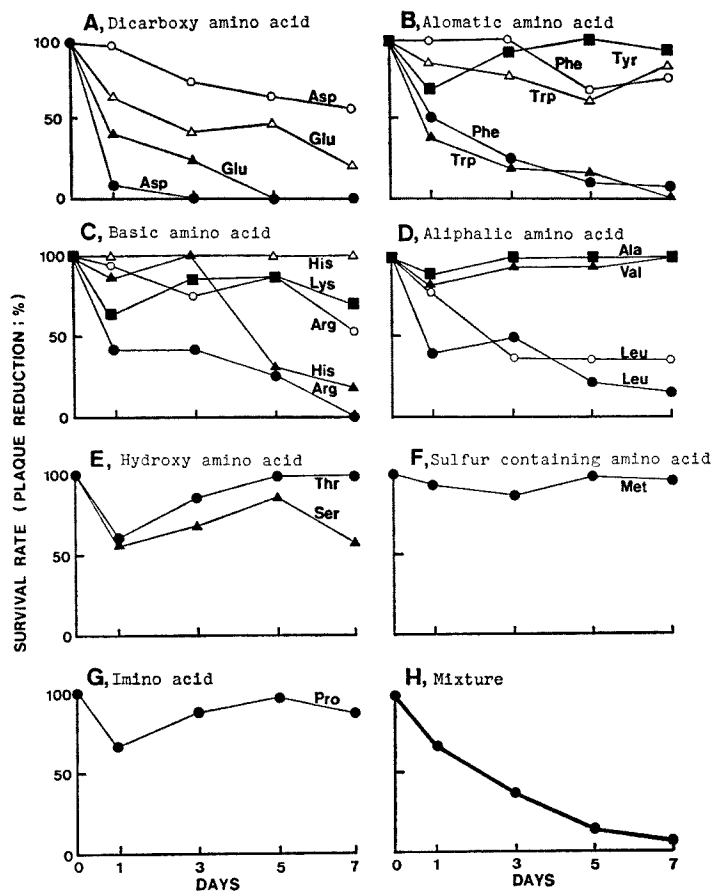


Fig. 7. Survival rate of IHNV (ChAb) in the mixture with IHNV and amino acid dissolved in Hanks' BSS.

●—● ▲—▲ ■—■: Concentration of amino acid, 1000 µg/ml
○—○ △—△: Concentration of amino acid, 500 µg/ml
●—●: Mixed with 6 kinds of amino acid (Glu: 150, Asp: 60, Phe: 50, Trp: 20, His: 20, Arg: 70 µg/ml)

は検出できなくなり、発眼期まで死卵は見られずウイルスも回収されなかった (Table 1)。

この結果は Amend^{17,18)} の報告を支持するものであったが、供試卵数が各群 100 粒と少なく限られた条件下での実験であったため、次に以上の結果を再確認することを目的に、自家製の毛細ガラス針を用いて IHNV を受精直後に強制的に卵内に接種し、卵内での IHNV の消長を観察した。IHNV はサクラマスで 1 週間後、シロサケで 5 週間後には検出限界以下となった (Fig. 1, 2)。ただサクラマスで 3 週間後、シロサケで 5 週間後に全卵が死亡した。MEM-10 を接種した対照群の累積死卵率は 41.4~42.9% とウイルス接種群のそれとは明らかに有意差があり、ウイルス接種群における卵の死亡はウイルス接種によるものと考えられた。しかし受精直後の卵

の場合、胚の細胞数は少なく卵内はウイルスが十分増殖できる環境ではなく、感染価の漸減傾向は卵内が IHNV の生存に不適当な環境であるためと考えられた。

そこでこのウイルス感染価の漸減現象を *in vitro* で観察すべく、シロサケ未受精卵から内容物を取り出し IHNV (ChAb) を懸濁して感染価の消長を観察した。Burke and Mulcahy¹⁹⁾ はベニザケ卵内容物中において IHNV の感染価は安定であると述べているが、本実験では漸減傾向が観察され (Fig. 6)、この傾向は受精卵内での IHNV の消長と類似するものであった。

この結果は受精卵中に IHNV を不活化する物質が存在する可能性を示唆するものと考え、安藤²⁰⁾ の報告に見られるサケ科魚類の卵構成成分のうち主要成分および胚体形成に際し含量の変動する物質を対象に抗ウイルス効

果のスクリーニングをブラック法²¹⁾により行なったところ、リン脂質のセファリン、アミノ酸のグルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ビタミンのピリドキサルリン酸、葉酸に抗ウイルス効果が観察された (Table 2)。さらに遊離アミノ酸に IHNV を懸濁した場合にもグルタミン酸、アスパラギン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン、アルギニン、ロイシンにウイルス不活化効果が観察され、500 µg/ml でも 1000 µg/ml と同等のウイルス不活化効果を示したロイシンを除く、これら 6 種のアミノ酸を混合した場合には、より低濃度 (総アミノ酸量 370 µg/ml) で同等のウイルス不活化効果が観察されたことから (Fig. 7)、今後より多くの卵構成成分について同様の検討を行なうと共に、これらの卵黄成分が、単独のみならず複合的にも効果を示すかどうか検討する必要があると考える。

以上の結果は、たとえ IHNV が精子を介して受精時に卵内に侵入したとしても、ウイルスは不活化されてしまうと考えられ、受精卵をヨード剤により消毒し、その後ウイルスフリーの環境で飼育すれば IHNV 防除は可能であると考えられる。現に本州中部の各県下では、発眼初期に卵を消毒し、IHNV に感受性を有する期間をウイルスフリーの湧水や紫外線処理した河川水を用いて飼育を行い、その後河川水を用いた飼育池に稚魚を移す方法により IHNV による被害から免れている。ただ時折 IPN の発生を見ることがあるが、これは IPNV の紫外線感受性が低いためと考えられる。²²⁾

ところで安藤,²³⁾ 須山・荻野,²⁴⁾ 高間ら²⁵⁾ はリン脂質のうち特にアセトン不溶性脂質; セファリン, レシチン, スフィンゴミエリン, セレブロシド等が胚体形成に際し、著しく消費されることを報告している。そこで発眼卵を供試し、IHNV を卵内に接種した後の卵あるいは孵化稚魚の累積死亡率とウイルス感染価の消長を観察したが、ウイルス感染価はサクラマスで、接種後 3 日目、シロサケで 9 日目に孵化稚魚から一尾当たり $10^{6.50}$ TCID₅₀/g 以上と高い値が得られた。またサクラマスでも接種後 7 日以内に全個体が死亡し、シロサケでも ChAb 株, ChIw 株共に接種後 15 日以内に 90% 程度が死亡した。なお対照群の 7 日目までの累積死亡率は、毛細ガラス針を刺しただけの群で 22.9%, MEM-10 接種群で 30.0% で、MEM-10 による胚への影響は少なかったものと考えられる (Fig. 3, 4)。以上のように抗ウイルス効果を有する物質が胚体形成に際し減少すると考えられる発眼期の卵内に IHNV が侵入した場合、サクラマス、シロサケ共に胚体は IHNV に感染し急激なウイルスの増殖が起こることが明かとなった。今後は発眼期のどの時期からウイルスが増殖しうるのかを明らかにする必要があると考える。死亡した卵から IHNV が時折分離されること

があり、Mulcahy and Pascho¹¹⁾ はこれらの卵が IHNV の垂直感染に重要な役割を果たすものと報告している。しかし以上の結果から考察するとこれらの死卵は発眼期に IHNV に感染したものと考えられ、厳密な意味での垂直感染には該当しないと考えられる。

最後に今回供試した IHNV (ChAb および ChIw 株) は共に発眼期のシロサケ胚に高い死亡率をもたらし、その病原性が危惧された。そこで今回供試したシロサケから分離した IHNV (ChAb 株と ChIw 株) の病原性をニジマスから分離した RtTo 株の病原性と比較を行った。一カ月齢のサクラマスに対して RtTo 株は累積死亡率 90% と強い病原性を示したが、卵黄嚢吸収時および一カ月齢のシロサケに対しては累積死亡率はそれぞれ 20, 22% と低い値を示しシロサケの IHNV に対する感受性は、サクラマスに比べかなり低いものであることが再確認された (Fig. 5)。また ChAb および ChIw 株は共に発眼卵の胚に高い死亡率をもたらしたが、孵化後卵黄嚢吸収時のシロサケの累積死亡率は 6% および 28% と低く、RtTo 株とほぼ同様の値を示した。このような従来知られている種特有の抵抗性がいつの時期に現れ、何に起因するものか興味深い問題であると考えられる。

要 約

サクラマスとシロサケの未受精卵および受精卵を供試し、人為的に IHNV で汚染した後の死卵率およびウイルス感染価の消長を観察するとともに、卵内成分の IHNV 感染価に及ぼす影響についても検討し以下の結論を得た。

- 1) 両魚種ともに、受精時に卵あるいは精子が汚染されても死卵は見られず、ウイルスも検出されなかった。
- 2) 受精直後の卵内に IHNV を接種した場合、サクラマスで 3 週間以内、シロサケで 5 週間以内に全卵死亡したが、ウイルスはサクラマスで 1 週間後、シロサケで 5 週間後に検出限界以下となった。
- 3) シロサケの未受精卵内容物に IHNV を懸濁した場合、ウイルス感染価の漸減傾向が観察され、セファリン、グルタミン酸、フェニルアラニン、トリプトファン、ピリドキサルリン酸および葉酸にウイルス不活化効果が観察された。
- 4) 発眼卵内に IHNV を接種した場合、サクラマスでは 7 日以内に全個体、シロサケでは 15 日以内に 90% が死亡し、両魚種とも一尾当たり $10^{6.50}$ TCID₅₀/g 以上のウイルス感染価が得られた。

謝 辞

本研究の遂行に当たり適切なご助言とご指導を頂いた北海道大学水産学部微生物学講座助教授絵面良男博士に

感謝申し上げると共に、貴重な試料の提供とご助言を頂いた北海道さけ・ますふ化場調査課魚病研究室長野村哲一氏に厚く御礼申し上げます。なお本研究の一部は農林水産技術会議の“近海漁業資源の家魚化システムの開発に関する総合研究（マリーナランディング計画）”の研究費によった。ここに記して謝意を表する。

参考文献

- 1) T. Kimura and T. Awakura: Proceedings from the International Symposium on Disease of Cultured Salmonids, Seattle, WA., 1977, pp. 124-160.
- 2) T. Sano, T. Nishimura, N. Okamoto, T. Yamazaki, and T. Hanada: *J. Tokyo Univ. Fish.*, **63**, 81-85 (1977).
- 3) D. F. Amend: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **27**, 265-270 (1970).
- 4) D. F. Amend: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **33**, 1059-1066 (1976).
- 5) M. Hasobe and M. Saneyoshi: *Fish Pathology*, **20**, 343-351 (1985).
- 6) 木村喬久, 吉水守, 西沢豊彦: 北大水産彙報, **38**, 151-155 (1987).
- 7) D. F. Amend and J. P. Pietsch: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **29**, 61-65 (1972).
- 8) D. Mulcahy: Proceedings of Viral diseases of salmonid fishes in the columbia river. 1982, pp. 7-8.
- 9) 木村喬久: 魚病学(感染症・寄生虫編), 新水産学全集, 17-B, 恒星社恒星閣, 東京, pp. 5-13 (1983).
- 10) D. Mulcahy and R. J. Pascho: *Science*, **225**, 333-335 (1984).
- 11) D. Mulcahy and R. J. Pascho: *J. Fish Diseases*, **8**, 393-396 (1985).
- 12) K. E. Nusbaum and J. M. Grizzle: *Aquaculture*, **65**, 1-5 (1987).
- 13) 吉水 守, 野村哲一, 栗倉輝彦, 木村喬久: さけ・ます孵化場研究, **42**, 1-20 (1988).
- 14) K. Wolf and M. C. Quimby: *Science*, **135**, 1065-1066 (1962).
- 15) J. F. Morgan, J. F. Morton and R. C. Parker: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **73**, 1.
- 16) Y. Kamei, M. Yoshimizu and T. Kimura: *Fish Pathology*, **22**, 147-152 (1987).
- 17) D. F. Amend, W. T. Yasutake, J. L. Fryer, K. S. Pilcher, and W. E. Wingfield: FI: EIFAC 72/Sc II-Symp. **3**, 1-9 (1972).
- 18) D. F. Amend: *J. Wildlife Dis.*, **11**, 471-477 (1975).
- 19) J. Burke and D. Mulcahy: *J. Fish Diseases*, **6**, 543-547 (1983).
- 20) 安藤一夫: 東水大研究報告, **54**, 61-98 (1966).
- 21) Y. Kamei, M. Yoshimizu, Y. Ezura, and T. Kimura: *Microbiol. Immunol.*, **32**, 67-73 (1988).
- 22) 吉水 守, 瀧澤宏子, 木村喬久: 魚病研究, **21**, 47-52 (1986).
- 23) 安藤一夫: 日水誌, **28**, 73-76 (1962).
- 24) 須山三千三, 荻野珍吉: 日水誌, **23**, 785-788 (1958).
- 25) 高間浩蔵, 座間宏一, 五十嵐久尚: 北大水産彙報, **20**, 117-129 (1969).