



Title	ニジマスにおけるヘルペスウイルス病の発生
Author(s)	降幡, 充; 細江, 昭; 武居, 薫 他
Citation	魚病研究, 38(1), 23-25 https://doi.org/10.3147/jsfp.38.23
Issue Date	2003-03-20
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53159
Type	journal article
File Information	article113.pdf



ニジマスにおけるヘルペスウイルス病の発生

降幡 充^{1*}・細江 昭¹・武居 薫¹・
小原昌和^{1,3}・中村 淳¹・本西 晃¹
吉水 守²

(2002年7月15日受付)

Outbreak of Salmonid Herpesviral Disease in Cultured Rainbow Trout

Mitsuru Furihata^{1*}, Akira Hosoe¹, Kaoru Takei¹,
Masakazu Kohara^{1,3}, Jun Nakamura¹,
Akira Motonishi¹ and Mamoru Yoshimizu²

¹Nagano Prefectural Fisheries Experimental Station,
Nakagawate 2871, Akashina,
Nagano 399-7102, Japan

²Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido
University, Minato 3-1-1, Hakodate,
Hokkaido 041-8611, Japan

³Horticulture & Special Products Division, Nagano
Prefectural Government, Minaminagano
Habashita 692-2, Nagano, Nagano
380-8570, Japan

(Received July 15, 2002)

ABSTRACT—From February 2000 to January 2001, epizootics occurred in cultured rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* weighing 12 – 1,503 g at 18 fish farms in Nagano Prefecture, Japan. A virus was isolated from diseased fish in RTG-2 cells with a CPE characterized by syncytia. High infectivity titers were demonstrated in the main internal organs and multiple necrotic foci were observed in the liver. The virus was identified as salmonid herpesvirus 2 by serological tests and PCR. Based on these results, the epizootic was diagnosed as salmonid herpesviral disease. In more than 80% cases, the outbreaks were linked with introductions of live fish.

Key words: salmonid herpesviral disease, *Oncorhynchus mykiss*, salmonid herpesvirus 2, rainbow trout, SaHV-2

日本におけるサケ科魚類のヘルペスウイルスは1972年

及び1974年に十和田湖の孵化場で死亡したヒメマス稚魚から¹⁾、次いで1978年には北海道のサクラマスの卵巣腔液からも分離された²⁾。その後、養殖ヤマベ (*Oncorhynchus masou*) の口部腫瘍 (基底細胞癌) や養殖ヒメマス (*O. nerka*) の大量死をはじめ³⁾、海面養殖ギンザケ (*O. kisutch*) 大型魚の死亡あるいは生残魚での口部腫瘍等の産業被害が報告されたが⁴⁾、防疫対策の徹底により北日本ではほぼ終息した⁵⁾。ニジマスのヘルペスウイルス病は1992年に北海道の養殖ニジマスに最初に発生し、成魚が死亡することから経済的損失が大きかったが、防疫対策の実施により発生件数は激減した。しかし、近年、再び本州中部に発生が見られ⁶⁾、ニジマスの主産県である長野県では、1999年に本ウイルス病に似た症状を有するニジマスの大量死亡が発生し、翌年には複数の養殖場に広がった。本研究では死亡原因と感染原因を明らかにするため、養殖場業者への聞き取り調査を行うとともに、病魚の病理学的検討を行った。

材料及び方法

2000年2月から翌年1月に長野県の18養殖場でニジマスの異常大量死亡が発生した。養殖場主からの聞き取りによって発生状況及び感染源を調査するとともに、2養殖場 (A, B) の7発病群について、飼育尾数、体重、流行期間、死亡率及び水温を調査した。

これら症例から採取した病魚106尾の外観及び内臓所見を観察し、外部寄生虫検査及びウイルス検査を行い、その内の98尾について細菌検査を、68尾について真菌検査を行った。さらに、1養殖場の瀕死魚5尾 (23~43 g BW) については、病理組織検査、分離ウイルスの中和試験及びPCRによる *Oncorhynchus masou* virus (OMV) 特異遺伝子の検出、主要臓器のウイルス感染価の測定も行った。外部寄生虫検査は鱗、体表及び鰓を検鏡した。細菌検査は腎臓よりトリプトソーヤ寒天培地を用いて常法に従い細菌分離を行い、20°Cで7日間の培養を行った。真菌検査は *Ichthyophonus hoferi* 感染の有無を腎臓及び肝臓組織の圧扁標本を作製し検鏡した。ウイルス検査は抗生物質 (penicillin-G 800 I.U./mL, streptomycin 800 µg/mL, mycostatin 200 unit/mL) 入り Hanks' Balanced Salt Solution で100倍に希釈した腎臓ホモジネート上清を15°Cで3時間静置した後、RTG-2細胞に接種し、15°Cで14日間CPE発現の有無を観察した。

病理組織検査は肝臓を10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、厚さ4 µmのパラフィン切片を作製し、H-E染色後光顕観察した。中和試験は (社) 日本水産資源保護協会から分与を受けた抗OMV家兔血清 (ND₅₀ = 1:140) を7倍に希釈し、RTG-2細胞を用いて50%終末点法による定性試験によって行った。OMV特異遺伝子検出用PCR⁷⁾はCPEが現れた培養細胞から行い、陽性対照と

¹ 長野県水産試験場

² 北海道大学大学院水産科学研究科

³ 現所属：長野県園芸特産課

* Corresponding author

E-mail: mfurihata@nifty.com

して OMV 00-7812 株を用いた。主要臓器のウイルス感染価は、腎臓、肝臓、脾臓及び脳について RTG-2 細胞を用いた 50% 終末点法により算出した。

結果及び考察

異常大量死亡は 12 g の 0 年魚から 1,503 g の親魚まで見られ、通年発生していた。18 養鱒場における発病サイズは 100 g 以下が 5 養鱒場 (28%), 100~1,000 g が 6 養鱒場 (33%), 1,000 g 以上が 7 養鱒場 (39%) であった。感染原因は近県や県内養鱒場からの活魚の導入によるものが 10 養鱒場 (56%), 同一水系による水平感染が 5 養鱒場 (28%), 不明が 3 養鱒場 (16%) であった。

A 養鱒場における 6 発病群の死亡は 4 月上旬から 7 月下旬に見られ、流行期間は 80~118 日間、累積死亡率は 33.6~77.0% であった。その期間の水温は 8.1~20.6°C であった。B 養鱒場では 9 月下旬 (水温 12.5°C) に 40 g の魚が発病し、2001 年 1 月中旬 (同 8.2°C) までの 107 日間死亡が続いたことから、飼育群は処分された。この間の累積死亡率は 41.4% であった (Table 1)。

外観所見として、体表における斑点状の退色症状、鰓の軽度の退色及び鰓弁の出血が観察された。発病群全体では潰瘍形成を伴う個体は少なかった。内臓所見は肝臓が退色し、一部の魚の肝臓に白斑の形成が見られた。その他、腹腔内脂肪の発赤、腸の発赤が観察された (Fig. 1)。発病群や耐過群に腫瘍を形成した個体は確認されなかった。

外部寄生虫検査では、死亡原因と考えられる寄生虫は認められなかった。また、細菌及び真菌検査では、病魚

98 尾中 3 尾から *Streptococcus iniae* が分離され、68 尾中 4 尾に *I. hoferi* が観察された。ウイルス検査では、106 尾中 85 尾 (80%) から RTG-2 細胞に多核巨細胞の形成を特徴とする CPE を示すウイルスが分離された。分離ウイルスは RTG-2 細胞で継代が可能であった。

中和試験に用いた分離ウイルス 5 株はいずれも抗 OMV 血清添加区で $2 \log_{10}$ 以上の感染価減少が認められ、中和陽性と判断された。また、PCR では OMV 00-7812 株と同じ位置 (439 bp) に 1 本の DNA セグメントが増幅された (Fig. 2)。病理組織検査では肝臓の実質細胞に核崩壊を伴った多数の壊死病巣が観察された (Fig. 3)。主要臓器のウイルス感染価は、肝臓が $10^{5.6-8.3}$ 、腎臓が $10^{4.9-8.4}$ 、脾臓が $10^{5.4-8.4}$ 、脳が $10^{5.8-7.7}$ TCID₅₀/g であった。

1999 年から長野県で発生したニジマスの異常な大量死の原因を調査した結果、異常大量死は通年発生しており、100 g 以上の魚の発症が全体の 70% 以上を占めた。また、400 g 以上の大型魚の累積死亡率は 70% 以上と高かった。主な病徴は鰓の軽度の退色と鰓弁の出血、肝臓の退色並びに腹腔内脂肪と腸の発赤であった。

大量死の原因と考えられる外部寄生虫は認められず、*S. iniae* 及び *I. hoferi* は検出頻度が低いことから直接の死因ではないと判断された。一方、OMV の感染実験病魚やギンザケのヘルペスウイルス病魚で見られる肝臓の巣状壊死像^{2,4)} が一部の病魚に見られ、ウイルス検査では 80% の病魚においてヘルペスウイルスに特徴的な多核巨細胞を形成する CPE が観察された。そして、分離ウイルスは抗 OMV 家兔血清により中和され、PCR により

Table 1. Results of epizootiological survey of salmonid herpesviral disease in rainbow trout

Fish farm	No. of fish reared in the pond	Mean body weight (g)	Epizootic period (Duration in day)	Cumulative mortality (%)	Water temperature (°C)
A	3,500	110	2000.5.12-7.31 (80)	37.7	10.5-20.6
A	2,600	190	2000.4.20-7.19 (90)	34.5	9.4-18.8
A	3,900	190	2000.4.28-7.19 (82)	33.6	9.4-18.8
A	500	420	2000.4.12-7.5 (84)	77.0	8.7-18.8
A	700	800	2000.4.12-7.4 (83)	70.1	8.7-18.8
A	1,000	1,000	2000.4.4-7.31 (118)	72.1	8.1-20.6
B	75,000	40	2000.9.29-2001.1.14 (107)	41.4	8.2-12.5

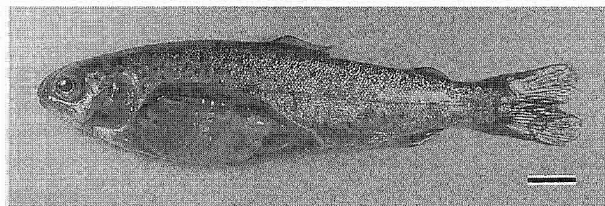


Fig. 1. Diseased rainbow trout (16.1 g BW), showing white spots in the liver. Bar = 1 cm

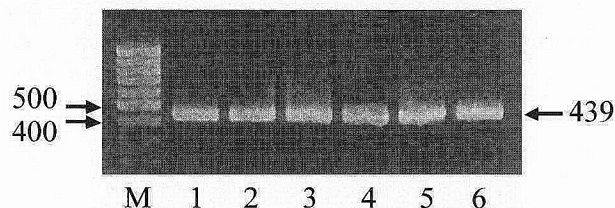


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification products of 5 virus isolates from diseased fish and OMV strain 00-7812. Lanes: M; DNA molecular weight marker, 1-5; virus isolates from diseased fish, 6; OMV strain 00-7812

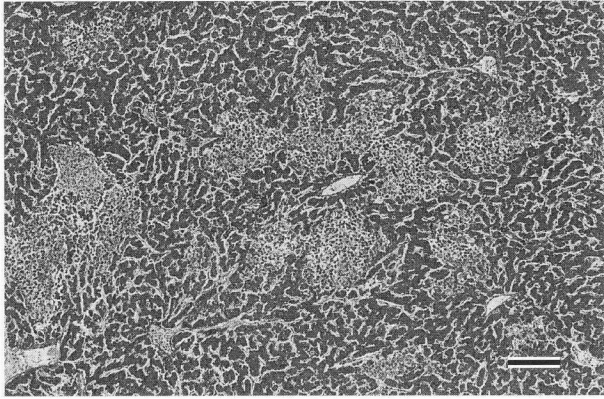


Fig. 3. Multiple foci of severe necrosis in the liver. H-E stain, Bar=200 μ m

OMV 特異遺伝子が増幅されたことから、本ウイルスは salmonid herpesvirus 2 と判断された。主要臓器のウイルス感染価は $10^{4.9-8.4}$ TCID₅₀/g と高く、本病はサケ科魚類のヘルペスウイルス病と診断された。

北海道の養鱒場で初めて発生したニジマスのヘルペス

ウイルス病が本州へ伝播した原因は定かでない。長野県下の場合、発生があった18養鱒場の内10養鱒場の感染源は購入した活魚であった。また、これらと同一水系のために水平感染した5養鱒場を含めると、感染源の83%が活魚の移動に起因していた。恐らく本州の主産県に被害が拡大した原因も活魚の移動によると推定される。

文 献

- 1) Sano, T. (1976): *Fish Pathol.*, **10**, 221-226.
- 2) Kimura, T., M. Yoshimizu, M. Tanaka and H. Sannohe (1981): *Fish Pathol.*, **15**, 143-147.
- 3) Kimura, T. and M. Yoshimizu (1991): *Annual Rev. Fish Disease*, **1**, 67-82.
- 4) Kumagai, A., K. Takahashi and H. Fukuda (1994): *Fish Pathol.*, **29**, 127-134.
- 5) Yoshimizu, M., H. Fukuda, T. Sano and T. Kimura (1995): *Vet. Res.*, **26**, 486-492.
- 6) Yoshimizu, M. and T. Nomura (2001): *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., Suppl.*, **5**, 11-14.
- 7) Aso, Y., J. Wani, D. A. S. Klenner and M. Yoshimizu (2001): *Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ.*, **52**, 111-116.