HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	RT-PCRと細胞培養法を組合せた伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)の検出
Author(s)	吉仲, 桃子; 堀, 友花; 本西, 晃 他
Citation	さけ・ます資源管理センター研究報告, 1, 29-34
Issue Date	1998-12
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53386
Type	journal article
File Information	bulletin21.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Bulletin of the National Salmon
Resources Center, No. 1: 29-34
December 1998

さけ・ます資源管理センター
研究報告　第1号　29-34頁
1998年12月

RT-PCRと細胞培養法を組合せた伝染性造血器壊死症ウイルス（IHNV）の検出

吉仲桃子[*1]・堀　友花[*1]・本西　晃[*2]・河西一彦[*3]・山本　淳[*4]
鈴木邦雄[*5]・宇賀神光男[*6]・野村哲一[*7]・吉水　守[*1]

[*1]〒041-8611 北海道函館市港町3-1-1 北海道大学水産学部微生物学講座
[*2]〒399-7102 長野県東筑摩郡明科町2871 長野野県水産試験場
[*3]〒198-0105 東京都西多摩郡奥多摩町720 東京都水産試験場奥多摩分場
[*4]〒401-0511 山梨県南都留郡忍野村忍草3098-1 山梨県水産技術センター忍野支所
[*5]〒360-0023 埼玉県熊谷市佐谷田4044 埼玉県水産試験場熊谷支場
[*6]〒321-0902 栃木県宇都宮市柳田1260 栃木県水産試験場
[*7]〒062-0922 札幌市豊平区中の島2-2 水産庁さけ・ます資源管理センター

Detection of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus Using RT-PCR Combined with Tissue Culture

Toko Yoshinaka[*1], Yuuka Hori[*1], Akira Motonishi[*2], Kazuhiko Kasai[*3], Atsushi Yamamoto[*4], Kunio Suzuki[*5], Mitsuo Ugazin[*6], Tetsuichi Nomura[*7], and Mamoru Yoshimizu[*1]

[*1] *Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato 3-1-1, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan*
[*2] *Nagano Prefectural Fisheries Experimental Station, Akashina, Higashichikuma, Nagano 399-7102, Japan*
[*3] *Okutama Branch, Tokyo Fisheries Experimental Station, Okutama, Nishitama, Tokyo 198-0105, Japan*
[*4] *Oshino Branch, Yamanashi Fisheries Technology Center, Oshino, Minamitsuru, Yamanashi 401-0511, Japan*
[*5] *Kumagaya Branch, Saitama Prefectural Fisheries Experimental Station, Kumagaya, Saitama, 360-0023, Japan*
[*6] *Tochigi Prefectural Fisheries Experimental Station, Utsunomiya, Tochigi 321-0902, Japan*
[*7] *Research Division, National Salmon Resources Center, Fisheries Agency of Japan, 2-2 Nakanoshima, Toyohira-ku, Sapporo 062- 0922, Japan*

Abstract.– Direct RT-PCR, tissue culture and RT-PCR combined with tissue culture were compared for the IHNV inspection in juvenile masu (*Oncorhynchus masou*) and sockeye salmon (*O. nerka*). The detection rate of IHNV from artificially infected rainbow trout (*O. mykiss*) was also compared by using tissue culture and RT-PCR combined with tissue culture. IHNV-infected salmonid fish were detected highly using RT-PCR combined with tissue culture. This method restrained inhibition of IHNV RNA extraction, because IHNV was replicated in the inoculated cells and inhibition of IHNV RNA extraction was diluted. The RT-PCR combined with tissue culture is a good method for the routine examination of IHNV.

Key words: virus detection, IHN, IHNV, RT-PCR

Contribution A No. 3 from the National Salmon Resources Center.
© 1998 National Salmon Resources Center

緒　言

伝染性造血器壊死症（infectious hematopoietic necrosis; IHN）はサケ科魚類，特にベニザケ，ニジマス，マスノスケ，アマゴ，サクラマス等の主として稚魚期に発生する極めて致死性の高いウイルス性疾病である．本疾病は1953年にRucker et al.（1953）によってアメリカ合衆国ワシントン州におけるベニザケのウイルス性疾病として初めて報告されて以来，カナダを含めた北米大陸はもちろん，日本でも1971年に北海道に発生が認められ，1974年以後，日本各地にその発生域を広めた（Yoshimizu 1996）．現在では台湾（Chen et al. 1983），フランス（Baudin et al. 1987），イタリア（Bovo et al. 1987），ドイツ（Enzmann et al. 1992），その他のヨーロッパ諸国（Olesen and Korsholm 1997）においても発生がみられる．

この致死性の高いIHNの疾病対策は，サケマス類の孵化放流事業および養殖業において重要な課題である．IHNは主として稚仔魚期に発生するため，採卵用親魚が病原体を保有していれば卵や精子を介し，孵化後のほとんど抵抗力を持たない稚仔魚へ垂直感染する（Yoshimizu et al. 1989a）．そのため親魚が感染を受けているか否かの調査が重要である（吉水・野村 1989）．さらに孵化仔魚の伝染性造血器壊死症ウイルス（IHNV）保有の有無はその後の種苗生産の成否を左右するため，稚魚期の健康チェックはきわめて重要である．従来，魚類のウイルス検査法は魚類由来の株化細胞を用いたウイルス分離を基本に行われてきた．しかし最終結果を出すまでに約1～2週間を要する（吉水 1996）．IHNVをはじめ魚類のウイルス病の多くはその進行が早く，結果が出るまでに魚が全滅することが起こり得る．そこで，短時間で正確な診断が可能となる方法の開発が進められ，特異的なプライマーを設定したpolymerase chain reaction（PCR）法といった遺伝子に基づく診断法が開発されてきた（Winton 1991; Lopez-lastra et al. 1994; Nishizawa et al. 1994）．しかし，現状ではキャリアや感染初期の稚魚の検査にはウイルス量が少ない上に，核酸の抽出阻害があるなどの問題があり，有効な検査法の開発が望まれている．

本研究ではIHNVの確定診断に血清学的検査法の代用としてreverse transcription（RT）-PCRが利用可能であるか否かの検討と，IHNVの分離に最適な細胞であるRTE-2細胞（Yoshinaka et al. 1997a）での培養法とRT-PCR法を組合せることで，IHN特有の症状を呈していない感染魚からもIHNVを検出することを目的に検討し，現時点での迅速・簡便かつ正確なIHN診断へのRT-PCRの応用を試みた．

材料と方法

感染実験供試魚　サクラマス発眼卵をヨード剤で消毒後（50 ppm, 10分間），北海道大学水産学部の魚類隔離実験室内孵化槽に収容し，脱塩素処理水道水を用いて流水飼育し，SPF（specific pathogen free）魚を得た．臍嚢吸収直後の浮上稚魚に$10^{3.2}$ $TCID_{50}$/mlのIHNV ChAb株（Yoshimizu et al. 1989b）で60分間浸漬攻撃した．攻撃開始後17日目に死亡が観察されはじめ，その時の稚魚13尾(平均体重 0.47 g)を本実験に供試した．なお，供試魚は使用するまで-20℃に凍結保存した．

核酸抽出法　感染発症した3尾の頭部と尾部を取り除き，内臓部分（背筋，背骨を含む）を細切後，プールして1.5 mlのマイクロチューブに入れ，500 lのdenaturing solutionを加えてホモジナイズした．このホモジナイズ液を再度denaturing solutionを用いて10^{-4}まで10倍希釈した．各希釈液列からAGPC法（Yoshinaka et al. 1997 b）によりRNAを抽出し，RT-PCRのテンプレートとした．次に，10尾の瀕死あるいは死亡魚を2群に分け，5尾については個体別に同様にして100倍希釈液からRNAを抽出した．残りの5尾については個体別にRTE-2細胞を用いたウイルス検査を実施した．なおRT-PCRはYoshinaka et al.（1997 b）の方法に従い行った．

卵巣腔液を用いたウイルス検出法　1995年9月に北海道内の河川に遡上した，IHNV陰性のサクラマスから採取した卵巣腔液を用い，卵巣腔液450 μlに$10^{5.8}$ $TCID_{50}$/mlのIHNV ChAb株を50 μl加えた．その後2つに分け，一方は卵巣腔液で10^{-4}まで10培希釈し，他方はdenaturing solutionを用いて同様に10^{-4}まで希釈した．両希釈液列から上述のAGPC法によりRNAを抽出，RT-PCRのテンプレートとした．なお，卵巣腔液を希釈に用いた試料では100 μlを，denaturing solutionで希釈した試料は全量をRNAの抽出に供した．同時に，卵巣腔液による希釈液列をそれぞれ細胞培養用6ウェルプレートに培養したRTE-2細胞に接種し，15℃で30時間培養後，細胞からRNAを抽出し，RT-PCRのテンプレートとした．

分離ウイルスの鑑別　1995年9月に北海道の標津川と伊茶仁川に遡上したサクラマスの卵巣腔液から分離したウイルスと愛知県水産試験場内水面漁業研究所から検査を依頼された体重70 gのニジマスから分離されたウイルス（Ov-A,B）の計3株を24ウエルプレートに培養したRTE-2細胞に接種し，CPEの発現を確認後，培養上清を取り除き，感染細胞を回収してdenaturing solutionを500 μl加えてホモジナイズし，前述のAGPC法によりRNAを抽出して，RT-PCRのテンプレートとした．RT-PCRは前述の方法に従った．

培養細胞により増殖させたウイルスのRT-PCRによる検出　2.0×10^5 cells/mlのRTE-2細胞5 mlを細胞培養用6ウェルプレートに播き，20℃で24時間培養した．培地を取り除き，multiplicity of infection（M.O.I.）=1.0および0.1になるようにそれぞれIHNV ChAb株を接種し，15℃で1時間吸着後，培地を5 mlずつ加え，15℃で0, 12, 24, 36時間培養した．所定時間後，培養液を取り除き，感染細胞をHanks' BSSで2回洗浄し，denaturing solutionを500 μl加えてホモジナイズした．AGPC法によりRNAの抽出を行い，PCRのテンプレートとした．なお，ウイルスの感染価は培養液と感染細胞の両方について50%終末点法により測定し，log$TCID_{50}$/mlとして表した．

細胞培養とRT-PCRの組合せによるウイルス検査　1997年7月に北海道内で飼育されたサクラマス稚魚32尾とベニザケ稚魚30尾，1997年12月から1998年1月にかけて北海道大学水産学部微生物研究室および山梨県，埼玉県，東京都，栃木県および長野県の各水産試験場で実施した平均体重0.15 gのニジマス稚魚500尾に対する同居感染実験に供したニジマス稚魚計1,174尾について，細胞培養とRT-PCRを組合せてIHNV感染の有無を検査した．2.0×10^5 cells/mlに調製したRTE-2細胞を細胞培養用96ウェルプレートに播き，20℃で24時間培養した．それぞれの稚魚は1-2 mlの抗生物質入り緩衝液（Anti Ink: penicillin-G 1,500 I.U./ml, streptomycin 1,500 μg/ml, mycostatin 800 unit/mlを含むHanks' Balanced Salt Solution）を添加してホモジナイズし，1晩4℃で静置後，あらかじめ培養しておいた96ウェルプレートに4ウェルずつ接種した．48時間後，各サンプルについて2ウェルはRNA抽出に，残りの2ウェルはCPE観察とウイルス分離に使用した．CPE観察は10日間行った．RNA抽出用の2ウェルは培養液を取り除き，200 μl TE buffer（0.2 M Tris-HCl pH 8.3, 0.1 M EDTA）で細胞を懸濁し，1.5 mlマイクロチューブに移した．Denaturing solutionを500 μl加えて，上述と同様にAGPC法でRNAを抽出した．抽出したRNAをテンプレートとしてIHNVのRT-PCRを行い，増幅産物の確認を行った．1997年7月の北海道内のサクラマス稚魚とベニザケ稚魚，各60尾については，稚魚のホモジナイズを直接RNA抽出し，RT-PCRを行った結果とも比較した．

結　果

IHN感染発症群からのウイルス遺伝子の検出　IHNV感染発症群のサクラマス稚魚3尾の内臓をプールし，ホモジナイズした試料をRT-PCRで調べた．内臓ホモジナイズ液の原液からIHNV遺伝子は検出されなかったが，10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}希釈液からIHNV遺伝子が検出された（Fig. 1）．供試した5尾のうち1尾からのみウイルス核酸の増幅が認められたが，他の4尾からはPCR産物は得られなかった．同時に培養法を用いて検査した結果は全て陰性であった．

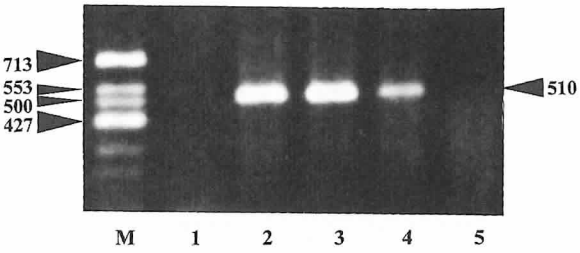

Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification products from homogenate of IHNV-infected masu salmon fry. Gel was stained with Ethidium Bromide. M, DNA molecular weight marker; 1, fish homogenate; 2, diluted 10^{-1} with homogenate buffer; 3, diluted 10^{-2} with homogenate buffer; 4, diluted 10^{-3} with homogenate buffer; 5, diluted 10^{-4} with homogenate buffer.

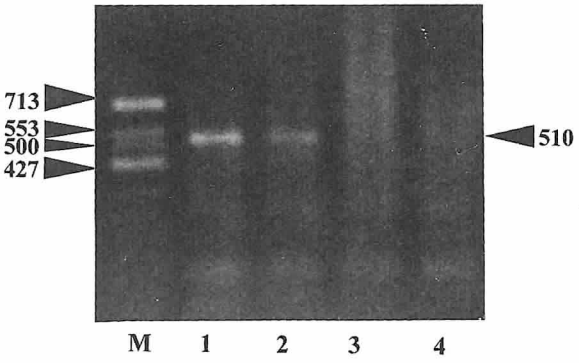

Fig. 2. Detection of IHNV by from cells inoculated with the diluted virus by ovarian fluid of masu salmon. Gel was stained with Ethidium Bromide. M, DNA molecular weight marker; 1, diluted 10^{-1} ($10^{3.8}$ $TCID_{50}$/ml) with the ovarian fluid; 2, diluted 10^{-2} ($10^{2.8}$ $TCID_{50}$/ml) with the ovarian fluid; 3, diluted 10^{-3} ($10^{1.8}$ $TCID_{50}$/ml) with the ovarian fluid; 4, diluted 10^{-4} ($10^{0.8}$ $TCID_{50}$/ml) with the ovarian fluid.

卵巣腔液を用いたウイルス検出法　IHNV陰性の卵巣腔液に$10^{5.8}$ $TCID_{50}$/mlのIHNV ChAb株を懸濁し，10^{-4}まで卵巣腔液とdenaturing solutionで希釈した後，RNAを抽出してRT-PCRを行った．卵巣腔液で希釈した場合は，各希釈液の100 μlから抽出を行ったため，感染価は1/5に減少していたが，いずれの希釈液列からもPCR産物は得られなかった．一方，denaturing solutionを用いて希釈した場合は，10^{-1}希釈液（ウイルス染価は$10^{3.8}$ $TCID_{50}$/ml）からPCR産物が得られた．同時に，ウイルス懸濁卵巣腔液の各希釈液を100 μl宛RTE-2細胞に接種し，30時間培養した培養細胞からRNAを抽出し，PCRを行った結果，10^{-2}希釈液（$10^{2.8}$ $TCID_{50}$/ml）を接種したものまでPCR産物が確認された（Fig. 2）．

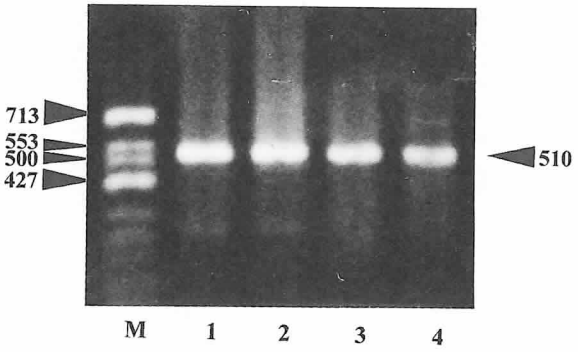

Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR amplification product from virus strains cultured in RTE-2 cells. Gel was stained with Ethidium Bromide. M; DNA molecular weight marker; 1, Virus isolated from ovarian fluid of masu salmon (Ov-A); 2,Virus isolated from ovarian fluid of masu salmon (Ov-B); 3, Virus was isolated from rainbow trout in Aichi Prefecture, 4, IHNV(ChAb).

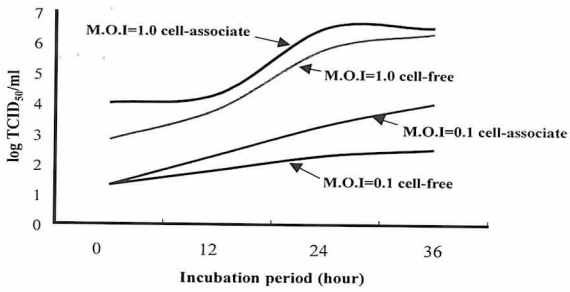

Fig. 4. Yield of cell free and cell associated IHNV(ChAb) in RTE-2 cells.

分離ウイルスの鑑別 北海道内の2河川に遡上したサクラマスから分離したウイルスと愛知県水産試験場内水面漁業研究所でニジマスから分離されたウイルス計3株を接種し，CPEが発現した直後の細胞から抽出したRNAのPCR産物を調べたところ，供試した3株からIHNV ChAb株と同一サイズのPCR産物が得られIHNVと判定した（Fig. 3）．

培養細胞により増殖させたウイルスのRT-PCRによる検出 M.O.I＝0.1でRTE-2細胞に接種した場合，感染細胞内でのウイルス感染価は接種直後$10^{1.8}$，12時間後$10^{2.3}$，24時間後$10^{3.8}$，36時間後$10^{4.3}$ $TCID_{50}$/mlと増加した（Fig. 4）．培養液中では，接種直後$10^{1.3}$であったものが36時間後$10^{4.0}$ $TCID_{50}$/mlに増加した．次に，M.O.I.を1.0として細胞に接種した場合，感染細胞内のウイルス感染価は接種直後$10^{2.5}$，24時間後$10^{6.3}$，36時間後に$10^{6.5}$ $TCID_{50}$/mlと増加した．また，培養液と感染細胞内のウイルス感染価は，培養24時間後まで感染細胞の方が高く，培養36時間後に両者ほぼ同じになった．上記のIHNV感染細胞を用いて行ったRT-PCR法によるIHNV遺伝子の検出はM.O.I.＝0.1で12時間後，M.O.I.＝1.0では接種直後の感染細胞から陽性となり，その時のウイルス感染価は前者で$10^{2.3}$ $TCID_{50}$/ml，後者で$10^{2.5}$ $TCID_{50}$/mlであった．

細胞培養とRT-PCRの組合せによるウイルス検査 1997年7月に北海道内のサクラマス稚魚32尾，ベニザケ稚魚30尾のIHNV検査を行った．サクラマス稚魚では直接PCRではすべて陰性，CPE観察によるウイルス分離では32検体中18検体が陽性となり（検出率56%），細胞培養とRT-PCRを組合せた方法では32検体中32検体が陽性となり，検出率は100%となった（Table 1）．ベニザケ稚魚では直接PCRではすべて陰性，CPE観察によるウイルス分離でもすべて陰性となったが，細胞培養とRT-PCRを組合せた方法では30検体中10検体が陽性となり，検出率は33%となった．

1997年12月から1998年1月にかけて北海道大学水産学部微生物研究室，山梨県，埼玉県，東京都，栃木県および長野県の各県で行ったニジマスのIHNV感染試験に関連して，IHNV攻撃群中の感染率を求めるために無作為に採取したニジマス稚魚の検査結果をTable 2に示した．北海道大学水産学部微生物研究室では177尾中34尾が陽性となり，そのうちCPEが観察されたのは7尾であった．山梨県の220尾では細胞培養とRT-PCRを組合せた方法で3尾が陽性となったが，CPEは観察されなかった．埼玉県，東京都，栃木県，長野県の試料では細胞培養とRT-PCRを組合せた方法でそれぞれ220尾中7尾，220尾中9尾，220尾中4尾，

Table 1. Comparison of IHNV detection in masu and sockeye salmon by direct RT-PCR, preculture combined RT-PCR, and tissue culture.

Fish	Direct RT-PCR*	RT-PCR combined with tissue culture*	Tissue culture*
Masu salmon	0/32 (0%)	32/32 (100%)	18/32 (56%)
Sockeye salmon	0/30 (0%)	10/30 (33%)	0/30 (0%)

*Number of positive fish/number of fish examined (percentage of positive fish).

Table 2. Comparison of IHNV inspection for rainbow trout artificially infected with IHNV at various laboratories.

Laboratory	RT-PCR combined with tissue culture	Tissue culture
Hokkaido Univ.	34/177 (19%)*	7/177 (3%)
Yamanashi	3/220 (1%)	0/220 (0%)
Saitama	7/220 (3%)	0/220 (0%)
Tokyo	9/220 (4%)	0/220 (0%)
Tochigi	4/220 (1%)	1/220 (0.4%)
Nagano	6/117 (5%)	1/220 (0.4%)

*Number of positive fish/number of fish examined (percentage of positive fish).

117尾中6尾からIHNV遺伝子が検出された．しかし，CPEが観察されたのは栃木県と長野県の各1尾のみであった．対照魚はすべて陰性であった．

考　察

ウイルス病の診断にPCR法を応用しようと検討が始まった当初，病魚の組織内にウイルス遺伝子が1コピーでも存在すれば，理論的に検出が可能であることから多くの試みがなされ，dsRNAウイルスであるIPNV（Lopez-lastra et al. 1994）などではRNAの抽出が比較的容易なこともあり多くの研究成果が報告されている．しかし，IHNVに関してはその多くが培養ウイルスから抽出したRNAを用いたもので，病魚の組織から直接RNAの抽出を行った報告は少なく，1995年になってChiou et al.（1995）やDrolet et al.（1995）らが実験感染させた未発症魚でのIHNV遺伝子の存在部位をPCR法と蛍光抗体法を用いて比較検討した結果を報告しているにすぎない．

そこで本研究ではまず，IHNV感染発症群のサクラマス稚魚を対象にRT-PCR法によるIHNV遺伝子の検出を試みた．3尾プールの魚体ホモジナイズ液の原液からは遺伝子増幅産物は検出されず，10^{-1}-10^{-3}希釈液から検出された．このことは，魚体にウイルス核酸の抽出またはPCRに阻害的に働く物質が存在し，原液ではウイルス核酸の抽出ができなかったかあるいはPCRの反応阻害が起きたと考えられる．このように，核酸の抽出またはPCRに阻害的に働く物質の存在が示唆されたことから，ウイルス核酸を抽出する場合，試料を希釈することによって阻害物質の濃度を下げる必要があると考えられる．

上記と同一群のサクラマス稚魚を各個体毎に，培養法とRT-PCR法によるウイルス検査を行い比較したところ，培養法ではIHNVはいずれの魚体からも分離されなかったが，RT-PCR法で1尾からPCR産物が得られ，魚体試料希釈液からの本PCR法による検出感度が通常の培養法と比べ低くないことが示された．ただ，今回は魚体が小さく，同一個体の標的臓器を両法で検査していないため，直接的な比較はできなかった．

次に，卵巣腔液成分によるウイルス核酸の抽出阻害についてRT-PCRを用いて検討したところ，卵巣腔液で希釈した場合，いずれの濃度の試料からもPCR産物は得られなかったが，denaturing solutionで希釈した場合は，10^{-1}希釈液からPCR産物が得られた．そのときのウイルス感染価は$10^{3.8}$ $TCID_{50}$/mlであった．これは本研究で設定したRT-PCRの検出限界$10^{1.8}$ $TCID_{50}$/mlと比較して1/100も検出感度が低く，卵巣腔液中にもウイルス核酸に対して阻害的に働く物質が存在していると考えられた．次に，卵巣腔液で希釈したウイルス液をRTE-2細胞に接種し，15℃で30時間培養してその感染細胞からウイルス核酸を抽出し，PCRを行ったところ，10^{-2}希釈液（$10^{2.8}$ $TCID_{50}$/ml）の卵巣腔液を接種した細胞からもPCR産物が得られ，検出感度が10倍上昇した．この結果は，卵巣腔液中に存在していたウイルス核酸の抽出またはPCRに対して阻害的に働く物質の作用が，魚体成分を含まない希釈液で希釈されたことにより抑えられ，さらに培養細胞でウイルスが増殖したために検出感度が上昇したと考えられる．

通常分離したウイルスは，中和試験を行い同定する．このステップをPCR法で代用できるかどうか，CPEの発現を待ってRT-PCRを行ったところ，約8時間でPCR産物が得られIHNVであると判定し得た．このことは，中和試験に比べると同定に要する時間の短縮の点で優れていると考えらる．

次に，ウイルスが少ない試料への対応として，細菌の場合に広く実施されている増菌培養手法を行うことを考え，RTE-2細胞を用いて測定したウイルス感染価をもとにIHNVの増殖量とRT-PCRによる検出時期との関係を検討した．M.O.I.を0.1としてウイルスを接種した場合，培養12時間後からRT-PCR法によりIHNVが検出され，その時のウイルス感染価は$10^{2.3}$ $TCID_{50}$/mlであった．M.O.I.が1.0の場合は，感染直後から検出され，その時のウイルス感染価は$10^{2.5}$ $TCID_{50}$/mlであった．また今回はM.O.I.を0.1として検討したが，0.001の場合も24時間後には，ウイルス感染価が本PCR法の検出限界$10^{2.0}$ $TCID_{50}$/mlを越えることから（Yoshinaka et al. 1997a），試料を接種後1日培養すれば，RT-PCR法での検出が十分可能であると考えられた．同時に検討した蛍光抗体法の結果では，M.O.I.が0.1の場合は24時間後，M.O.I.が1.0の場合は12時間後から陽性となり，そのときの感染価は$10^{4.0}$ $TCID_{50}$/mlであった（データは示していない）．このことは検査材料を一度RTE-2細胞に接種し，細胞内でウイルスを増殖させた後にPCR法でIHNV遺伝子を検出すれば，時間にして1日を余分に要するのみで，従来よりも早く正確に診断が可能になると考えられる．しかし，卵巣腔液試料など，一部の試料では細胞毒性効果を示す場合もあり，この場合は細胞内でのウイルス増殖も遅いと考えられ，ウイルス接種後の培養時間を長くするなどの工夫が必要であろう．いずれにしてもウイルス核酸抽出の前段階に培養細胞でのウイルス増殖を行うことは，RT-PCRによるIHNVの検出法において有利に働く方法であることが示された．

この細胞培養とRT-PCRを組合せて行う方法が有効であることは1997年7月に北海道内のサクラマス稚魚，ベニザケ稚魚のIHNV検査結果と1997年12月から1998年1月にかけて北海道大学水産学部微生物研究室，山梨県，埼玉県，東京都，栃木県および長野県の各水産試験場で行ったニジマスのIHNV感染試験に関連して，IHNV攻撃群中の感染率を求めるために無作

為に採取したニジマス稚魚の検査結果をみても明らかである．ウイルス分離による検査方法ではIHNV陽性魚をかなり見落としてしまうとともに，細胞に現れた変化を細胞毒性かどうか判定するために継代が必要であり，さらにIHNVによる細胞変性であることを確認するために血清学的検査が必要となる．これに対して，細胞培養とRT-PCRを組合せた方法では，培養細胞に検体を接種することでRNAの抽出阻害として働く物質が希釈されるとともに，ウイルスが存在すれば，その量が増加することでよりRT-PCRで検出しやすくなる．

このように，病魚の診断および分離ウイルスの鑑別にPCR法の応用が可能となったが，実際のウイルス検査において，多数の試料を扱う場合には，一度サンプルをRTE-2細胞に接種し，1～2日後に細胞を回収してRT-PCRを行う方法が，現段階では一番早く，簡便，確実に診断できる方法と考えられた．

謝　辞

本研究は日本水産資源保護協会の委託事業「海外悪性伝染病影響評価シミュレーションモデル開発」によった．ここに記して深く感謝申し上げる．

引用文献

Baudin, F. L. 1987. IHN in France. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., **7**: 104.

Bovo, G., G. Giorgetti, P. E. V. Jorgensen, and N. J. Olesen. 1987. Infectious hematopoietic necrosis: first detection in Italy. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., **7**: 62-63.

Chen, S-N., S-C-Chi, H-H. Shin, and G-H. Kou. 1983. The occurence of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Taiwan. Proceeding of Republic of China-Japan Cooperative Science Seminar on Fish Diseases. pp. 56-58.

Chiou, P. P., B. S. Drolet, and J. C. Leong. 1995. Polymerase chain amplification of infectious hematopoietic necrosis virus RNA extracted from fixed and embedded fish tissue. J. Aquatic Animal Health, **7**: 9-15.

Drolet, B. S., P. P. Chiou, J. Heidel, and J. C. Leong. 1995. Detection of truncated virus particles in a presistent RNA virus infection *in vivo*. J. Virology, **69**: 2140-2147.

Enzmann, P. J., H. Dangshat, B. Feneis, D. Schmitt, G. Wizigmann, and H. J. Schlotfeldt. 1992. Demonstration of IHN virus in Germany. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., **12**: 185.

Lopez-lastra, M., M. Gonzalez, M. Jashes, and A. M. Sandino. 1994. A detection method for infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) based on reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). J. Fish Dis., **17**: 269-282.

Nishizawa, T., K. Mori, and T. Nakai. 1994. Polymerase chain reaction amplification of RNA of striped jack nervous virus (SJNNV). Dis. Aquat. Org., **18**: 103-107.

Olesen N. J. and H. Korsholm. 1997. Control measures for viral diseases in aquaculture: eradication of VHS and IHN. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., **17**: 229-223.

Rucker. R. R. ,W. J. Whipple, J. R. Parvin, and C. A. Evans. 1953. A contagious disease of salmon possibly of virus origin. Fish. Wildl. Serv., Fish. Bull., **76**: 35-46.

Winton, J. R. 1991. Recent advances in detection and control of infectious hematopoietic necrosis virus in aquaculture. Annual Rev. Fish Dis., **1**: 83-93.

Yoshimizu, M. 1996. Disease problems of salmonid fish in Japan caused by international trade. Rev. Sci. Off. Int. Epiz., **15**: 533-549.

吉水　守. 1996. ウイルス学的検査法. 魚病学概論（室賀清邦・江草周三編），恒星社厚生閣, 東京. pp. 144-148.

吉水 守・野村哲一. 1989. サケマス採卵親魚の病原微生物検査法. 魚と卵, **158**: 49-59.

Yoshimizu, M., M. Sami, and T. Kimura. 1989a. Survivability of infectious hematopoietic necrosis virus in fertilized eggs of masu and chum salmon. J. Aquatic Animal Health, **1**: 13-20.

Yoshimizu, M., T. Nomura, T. Awakura, Y. Ezura, and T. Kimura. 1989b. Prevalence of pathogenic fish viruses in anadoromous masu salmon (*Onchorhynchus masou*) in the northern part of Japan, 1976-1987. Phsiol. Ecol. Japan, Spec., Vol. **1**: 559-576

Yoshinaka, T., M. Yoshimizu, and Y. Ezura. 1997a. Selection of a suitable cell line for isolation of the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) from ovarian fluid of Japanese salmonid fish. Fish Pathol., **32**: 75-80.

Yoshinaka, T., M. Yoshimizu, T. Sawabe, and Y. Ezura. 1997b. Detection and identification of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). Fish. Sci., **63**: 592-595.