

富士の介及び親魚種の伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV)

富士の介分離株に対する感受性

平塚 匡・加地奈々・青柳敏裕・三浦正之・井上孝太郎*・難波亜紀**・間野伸宏*

山梨県が開発したニジマス *Oncorhynchus mykiss* 雌及びマスノスケ *O. tshawytscha* (英名: キングサーモン) 偽雄を交配した全雌異質三倍体魚「富士の介」¹⁾は、2019年10月の流通開始以降、親譲りの希少性や味の良さ²⁾が高く評価され、市場や消費地での需要も増している。今後富士の介を安定供給するためには、生産量に大きな影響を及ぼす魚病の発生をコントロールすることが重要であり、富士の介と魚病の関係性に関する種々の知見集積は急務といえる。これまでにマス類養殖で問題となる主要な疾病の病原体に対する富士の介の感受性は概ね明らかにされているが⁴⁾、民間養魚場での生産が年々進むにつれ、新たな問題も浮き彫りになってきている。マス類養殖で甚大な被害を招くウイルス病に伝染性造血器壊死症 (IHNV) があるが⁵⁾、既報において富士の介は IHNV ウイルス (以下、IHNV) に対して優れた抗病性を有することが明らかにされている⁵⁾。一方で、富士の介を生産する一部の県内養魚場において、本ウイルスによる成魚サイズ以上での斃死事例が散見されるようになった。IHNV は日本国内に侵入して以降、独自に進化を続け、その性状や病原性の多様化が進んでいる⁸⁾。魚種特異的に病原性を示す株の報告もあることから¹⁰⁾、富士の介に対し高い病原性を示す株が存在する可能性も懸念された。

そこで本研究では、富士の介から分離された IHNV を用い、本株に対する富士の介及び親魚種の感受性を感染試験により評価するとともに、実際に富士の介で IHNV 被害が生じている民間養魚場において、富士の介等の稚魚を導入し自然感染させることで、現場レベルでの富士の介の IHNV 発生動向等についても検証した。また、本研究に関わる IHNV 株を分子系統解析に供することで、富士の介分離株の遺伝的系統や他魚種分離株との関係性等についても併せて検討を行った。

材料及び方法

供試ウイルス

県内の民間養魚場で養殖されている富士の介 (平均体重 2,381g) から 2021 年 6 月に分離された IHNV (YFTV2110) 株を使用した。EPC 細胞を 175cm² プラスチックフラスコにて 20℃ で培養し、単層形成後に供試ウイルス株を接種し、15℃ で培養を行った。細胞全体に細胞変性効果 (CPE) が認められた段階でフラスコを -80℃ で凍結した。翌日以降に急速解凍後、一部を力価測定用として分注し、残りを供試ウイルス原液として試験に供するまで -80℃ で再度凍結保存した。ウイルス力価は、EPC 細胞を用いて TCID₅₀ 法により測定した。

IHNV 富士の介分離株による 3 魚種感染試験 (各成長段階における感受性評価)

富士の介と親魚種の本株に対する感受性を評価するため、各成長段階の魚を用いた感染試験を行った。試験は計 5 回実施し、各試験で使用した供試魚の尾数や平均体重、ウイルスの攻撃濃度や方法等は表 1 の通りとした。

試験 1 から試験 4 は山梨県水産技術センター忍野支所 (以下、当支所) で 2021 年に作出したいずれも同一ロッ

Hiratsuka Tadashi, Kaji Nana, Aoyagi Toshihiro, Miura Masayuki, Inoue Koutaro, Namba Aki, Mano Nobuhiro

*, 日本大学生物資源科学部海洋生物学科水圏生物病理学研究室

**, 日本大学短期大学部 (三島校舎) 食物栄養学科

トの富士の介、ニジマス（通常二倍体）、マスノスケ（通常二倍体）、試験 5 については 2022 年作出の富士の介、ニジマス（全雌三倍体）、マスノスケ（通常二倍体）を供試魚として使用した。供試魚の選別は、3 魚種の給餌率を約 1 週間統一した後に行った。供試魚の平均体重は、3 魚種とも試験 1 は 5.7g、試験 2 は 32.1g、試験 3 は 58.8g、試験 4 は 159.4g、試験 5 は 148.9g で、供試尾数は試験 1 から試験 3 は各 30 尾、試験 4 及び試験 5 は各 20 尾とした。

実験感染は、試験 1 のみ浸漬法、その他は注射法により行った。浸漬法は供試魚を 5.4%塩水に 2 分間浸漬した後に、地下水にて $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml となるよう希釈した供試ウイルス液に 15 分間浸漬することで攻撃した。浸漬処理は 3 魚種同時に同一容器内で行い、処理中はブローアーにより通気した。注射法は供試ウイルス液を MEM-2 で希釈し、所定の攻撃濃度（試験 2： $10^{6.1}$ TCID/尾、試験 3： $10^{6.3}$ TCID/尾、試験 4： $10^{6.1}$ TCID/尾、試験 5： $10^{7.1}$ TCID/尾）となるよう各供試魚の腹腔内に 0.1mL 注射した。注射は FA100（DS ファーマアニマルヘルス）溶液にて麻酔をかけた供試魚を飼育水でリンスし、タオルで体表の水分を軽く拭き取った後、供試魚の両腹鰭の中心と両胸鰭の中心を結ぶ線の間あたりに行った。なお、注射技術や魚種間での差を極力無くするため、職員 2～3 名で各魚種を概ね同尾数処理するとともに、魚種についても一定尾数毎にローテーションをしながら注射するようにした。いずれの試験も攻撃後はポリプロピレン製のコンテナ槽（L64×W44×D38cm）に供試魚をそれぞれ収容し、12.5℃の地下水をかけ流しながら（試験 1 及び 2：毎秒 40mL、試験 3：毎秒 50mL、試験 4：毎秒 70mL、試験 5：毎秒 60mL）、魚体重の 0.5～1.0%の配合飼料を概ね平日の 5 日間給餌し飼育を行った。試験期間中は毎日死亡魚の確認及び回収を行うとともに、死亡が確認された場合は、症状の観察と EPC 細胞あるいは CHSE-214 細胞を用いた腎臓あるいは脾臓からのウイルス分離を行い、接種後の CPE の形態から死因が IHN であることを確認した。各感染試験の実施期間は、試験 1 及び 2 は 36 日間、試験 3 は 44 日間、試験 4 は 50 日間、試験 5 は 56 日間とした。

表 1 各成長段階における 3 魚種感染試験方法

試験区	平均体重(g) ^{※1}			供試尾数	攻撃濃度	攻撃方法	試験期間 ^{※2}
	ニジマス	富士の介	マスノスケ				
試験1 (5.7g)	5.7±0.3	5.7±0.3	5.7±0.3	30	$10^{5.8}$ TCID ₅₀ /ml	浸漬	36日間 (R4.6.20-7.25)
試験2 (32.1g)	32.1±1.3	32.1±1.5	32.1±1.3	30	$10^{6.1}$ TCID ₅₀ /尾	注射	36日間 (R4.11.18-12.23)
試験3 (58.8g)	58.8±1.9	58.8±2.5	58.8±2.8	30	$10^{6.3}$ TCID ₅₀ /尾	注射	44日間 (R5.1.20-3.4)
試験4 (159.4g)	159.4±5.2	159.4±5.3	159.4±5.4	20	$10^{6.1}$ TCID ₅₀ /尾	注射	50日間 (R5.7.12-8.30)
試験5 (148.9g)	148.9±3.7	148.9±3.2	148.9±4.0	20	$10^{7.1}$ TCID ₅₀ /尾	注射	56日間 (R6.5.17-7.11)

※1 数値は平均±標準偏差。

※2 試験期間は供試3魚種全ての死亡が完全に終息するまでとした。

民間養魚場における現地感染試験

富士の介で IHN による被害が生じている県内の民間養魚場に当支所で作出した富士の介及びニジマスの稚魚を導入し自然感染させることで、現場レベルで両魚種の感受性を評価するとともに、長期間飼育による IHN の発生動向等について観察を行った。

供試魚には 2022 年 11 月に作出した富士の介及びニジマス（通常二倍体）を各 1,000 尾使用し、平均体重はそれぞれ 6.9g 及び 6.7g であった。2023 年 4 月 18 日に当該養魚場へ供試魚を運搬し、屋外コンクリート池（L20m×W5m×D0.85m）に設置したカゴ（L84cm×W137cm×D91cm、2 個並列設置）へ収容することで自然感染させた（図 1）。なお、試験開始時点で供試魚収容池及びその上流池には富士の介（2～3kg サイズ）が収容されて

おり、上流池では毎日僅かな死亡がみられていた。

試験期間中は毎日死亡魚の確認及び回収を行うこととし、それらや給餌等の一連の飼育管理については当該養魚場の従業員に依頼した。死亡魚が確認された場合は全て冷凍保存するとともに、死亡状況によっては即日現地に赴き病魚を回収し、適宜検査を実施した。検査は主に死亡開始時や終息時等に行い、通常の魚病検査と同法により行った。すなわち、外観や内部症状の観察、TS 寒天培地及び改変サイトファーガ寒天培地を用いた腎臓からの細菌分離、EPC 細胞を用いた腎臓からのウイルス分離等を行い、死因が IHNV であるか否かを確認した。なお、検査結果において IHNV 以外の疾病に罹患していた場合でも、投薬等の処置は実施しないこととした。試験期間は、2023 年 4 月 18 日から 2024 年 5 月 1 日の 380 日間とした。試験池の用水は河川水を使用しており、試験期間中の平均水温は 13.7℃ (9.8℃～18.0℃) であった (図 2)。



図 1 供試魚収容池 (左：ニジマス、右：富士の介)

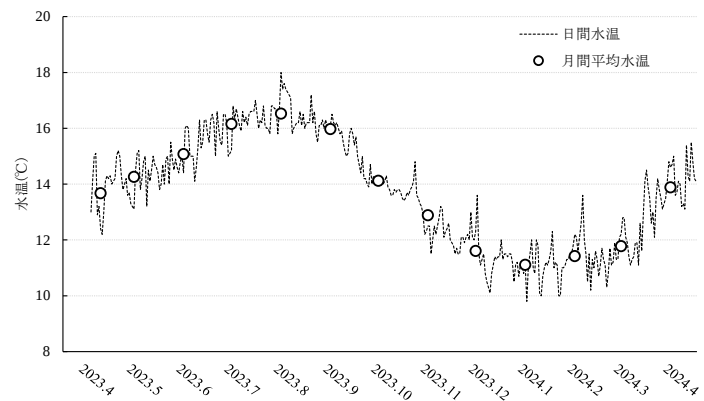


図 2 試験期間中の飼育水温の推移

IHNV 株の分子系統解析

本研究に関わる IHNV 株について、遺伝的系統や富士の介分離株と他魚種分離株の関係性等を把握するため、分子系統解析を行った。

供試株には、本研究で使用した IHNV 富士の介分離株及び現地感染試験にて死亡魚より分離された IHNV 株の他、既報⁵⁹⁾にて感染試験の供試ウイルスとしたニジマス分離株及びヤマメ分離株、魚病診断において富士の介より分離された IHNV 株を用いた。

分子系統解析は、Namba *et al.* (2021)¹⁰⁾の方法に従い upstream 及び downstream プライマーを用い IHNV の G-gene の部分領域を PCR 増幅後、同プライマーを用いて常法により決定した塩基配列を用いて実施した。なお、分子系統解析は日本大学が実施した。

結 果

IHNV 富士の介分離株による 3 魚種感染試験

各成長段階の富士の介及びニジマス、マスノスケを IHNV 富士の介分離株で攻撃した際の累積死亡率等の結果を表 2、累積死亡率の推移を図 3 から 7 に示した。

試験 1 (5.7g サイズ) の累積死亡尾数は、多い順にニジマス 8 尾、富士の介 5 尾、マスノスケ 0 尾で、累積死亡率は 26.7%、16.7%、0% となり、ニジマス及び富士の介に比べマスノスケは有意に死亡率が低くなった (表 2, Tukey の母比率の検定, 以下, 母比率検定, ニジマスとマスノスケ間: $p < 0.01$, 富士の介とマスノスケ間: $p < 0.05$)。死亡魚からウイルス分離では、全ての個体から IHNV が再分離された。

試験 2 (32.1g サイズ) の累積死亡尾数は、多い順にニジマス 25 尾、富士の介 17 尾、マスノスケ 1 尾となった。

マスノスケでは1尾の死亡が確認されたが IHNV は再分離されず、IHN が疑われる症状等も確認できなかったため、本個体は供試ウイルス感染による死亡ではないものと判断した。そのため、累積死亡率はニジマス 83.3%、富士の介 56.7%、マスノスケ 0%となり、3 魚種間で死亡率に有意な差が認められた（表 2、母比率検定、ニジマスと富士の介間： $p<0.05$ 、ニジマス及び富士の介とマスノスケ間： $p<0.01$ ）。

試験 3（58.8g サイズ）の累積死亡尾数は、多い順にニジマス 27 尾、富士の介 23 尾、マスノスケ 0 尾となり、累積死亡率は 90.0%、76.7%、0%で、ニジマス及び富士の介と比べマスノスケの死亡率は有意に低くなった（表 2、母比率検定、 $p<0.01$ ）。なお、死亡した全ての個体から IHNV が再分離された。

試験 4（159.4g サイズ）の累積死亡尾数は、多い順にニジマス 5 尾、富士の介 4 尾、マスノスケ 1 尾となったが、うちニジマス 1 尾（攻撃後 28 日死亡個体）及びマスノスケ 1 尾で IHNV が再分離されなかったため、累積死亡率は 20.0%、20.0%、0%となった。供試ウイルス感染によるマスノスケの死亡は認められず、ニジマスと富士の介の死亡率は同等となる傾向がみられた（表 2）。

試験 5（148.9g サイズ）の累積死亡尾数は、ニジマス及び富士の介が 11 尾、マスノスケが 0 尾となり、累積死亡率は 55.0%、55.0%、0%で、ニジマスと富士の介の死亡率が同等で、マスノスケは有意に死亡率が低くなった（表 2、母比率検定、 $p<0.01$ ）。死亡した全ての個体から IHNV が再分離された。

死亡魚の症状については試験 1 から 5 を通して IHN 特有の症状が認められた。外観症状としては、全ての試験において体色黒化や眼球突出がみられ、試験 2 から 5 はそれに加えて腹部膨満等が確認された。解剖所見としては、全ての試験において鰓の貧血や肝臓の褪色、脂肪の点状出血等が認められ、試験 2 から 5 にかけて脾臓や腎臓の貧血、血液混じりの腹水貯留、腸管の肥大や出血がみられた。試験 4 及び 5 においては、加えて鰓の出血なども確認された。魚体サイズが大きくなるに伴い症状が多様になる傾向があり、IHNV による死亡個体の症状に魚種間での差異は認められなかった。

なお、試験 4 及び試験 5 では、いずれも富士の介において試験終了時点の生残個体 2 尾で眼球突出の症状が認められたが、摂餌等も良好で衰弱している様子は無く、解剖所見も異常はみられなかった。

試験期間中の死亡傾向としては、いずれの試験においても攻撃後 5 日前後で死亡が開始する傾向にあり、試験 1 及び 2 ではニジマスの死亡が先行し、試験 3 ではニジマスと富士の介の死亡するペースの差が縮まる傾向がみられ、試験 4 及び 5 では富士の介の死亡が先行し、最終的にニジマスと同等となった（図 3～7）。

表 2 各成長段階における富士の介由来 IHNV 感染試験結果

試験区	ニジマス	富士の介	マスノスケ
試験1 (5.7g)	26.7 ^a (8/8)	16.7 ^a (5/5)	0 ^b (0/0)
試験2 (32.1g)	83.3 ^a (25/25)	56.7 ^b (17/17)	0 ^c (0/1)
試験3 (58.8g)	90.0 ^a (27/27)	76.7 ^a (23/23)	0 ^b (0/0)
試験4 (159.4g)	20.0 ^a (4/5)	20.0 ^a (4/4)	0 ^a (0/1)
試験5 (148.9g)	55.0 ^a (11/11)	55.0 ^a (11/11)	0 ^b (0/0)

※1 数値はIHNV陽性尾数/累積死亡尾数(括弧内)から算出した累積死亡率(%)を表す。

※2 異なるアルファベット間で有意差あり(Tukeyの母比率の検定、 $p<0.01$)。

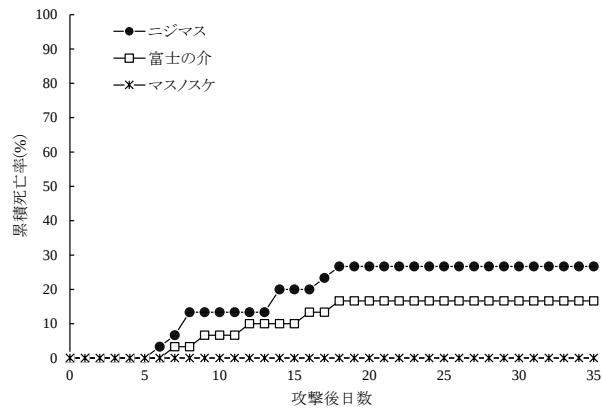


図3 5.7gサイズの累積死亡率の推移 (試験1)

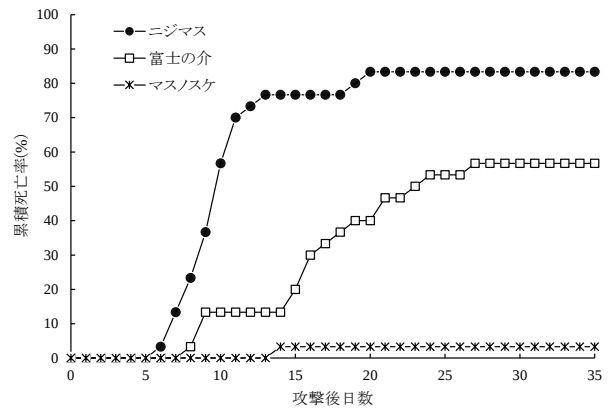


図4 32.1gサイズの累積死亡率の推移 (試験2)

※マスノスケのIHNによる累積死亡率は0%

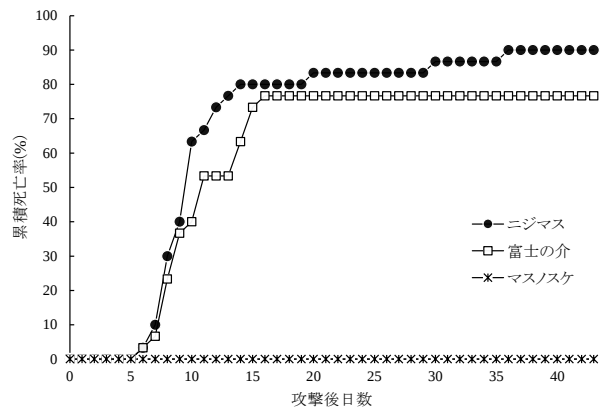


図5 58.8gサイズの累積死亡率の推移 (試験3)

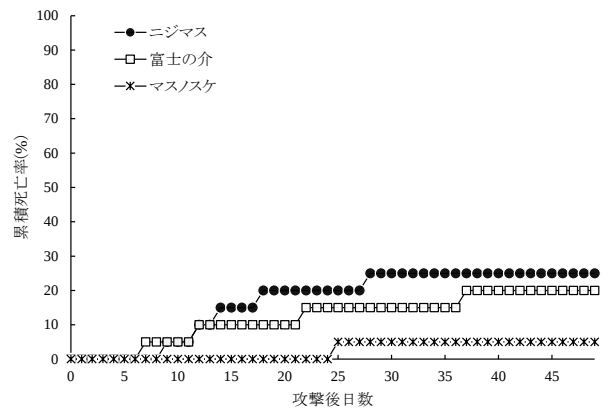


図6 159.4gサイズの累積死亡率の推移 (試験4)

※ニジマス, マスノスケのIHNによる累積死亡率は20%, 0%

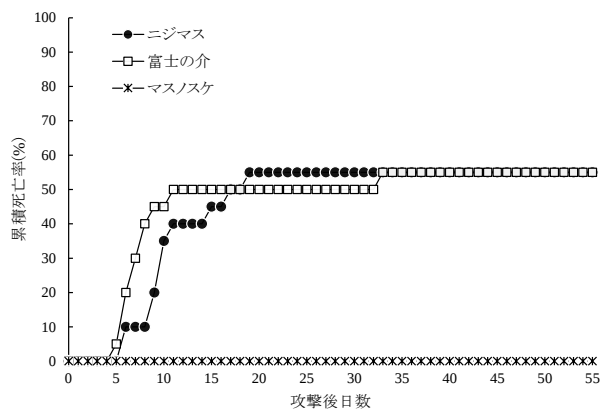


図7 148.9gサイズの累積死亡率の推移 (試験5)

民間養魚場における現地感染試験

試験期間中の富士の介及びニジマス稚魚の日間死亡尾数及び生残率の推移を図8、死亡魚の検査結果を表3に示した。また、検査結果を受け供試2魚種のIHNの発生状況をまとめたものを表4、さらにIHN発生時の2魚種の死亡状況の詳細を図9に示した。

2023年4月18日に供試魚を収容し試験を開始したところ、ニジマスでは4月24日（試験開始7日目）から死亡がみられるようになり、4月25日（平均体重7.8g）及び5月18日（平均体重7.1g）に検査を行った結果、IHNと冷水病、IHNとカラムナリス病の混合感染であった（表3）。その後急激に死亡数が増加し、4月27日には日間死亡数が最多の157尾に達した後、概ね5月28日頃には終息した。なお、この期間での累積死亡率は94.7%となった（図8、表4）。

富士の介は4月27日（試験開始9日目）から死亡がみられるようになり、4月28日に死亡魚の検査を行ったところ（富士の介 平均体重10.1g）、ニジマスと同様、IHNと冷水病の混合感染による死亡であった（表3）。その後、5月26日頃に終息を迎え、その間の累積死亡率は68.7%、日間最多死亡尾数は5月3日の94尾であった（図8、表4）。富士の介においては8月12日頃から再度死亡がみられるようになり、8月17日（平均体重17.0g）及び9月27日（平均体重22.0g）にそれぞれ検査を行ったところ、いずれも死因はIHNであった（表3）。死亡は9月30日頃には終息し、この期間での累積死亡率は53.0%、日間最多死亡尾数は6尾と、前回発生時と比べ累積死亡率や日間死亡尾数が低下あるいは減少する傾向がみられた（図8、表4）。なお、死亡魚の主な症状としては、体色黒化や眼球突出、鰓や内臓の貧血等のIHN特有の症状が認められ、魚種間で違いはみられなかった（表3）。

2023年10月以降は2魚種とも大きな異常はみられず、試験終了時の最終的な生残尾数はニジマス15尾、富士の介91尾で、生残率はそれぞれ1.5%、9.1%であった。なお、生残魚の平均体重はニジマスで1,000g（最大約1,200g）、富士の介で377g（最大約600g）であった。

2魚種間のIHNの発生動向をみると、ニジマスは1回のみの発生であったが被害は甚大であったのに対し、富士の介はニジマスより被害は少なかったものの、2度に渡る発生が認められた（図9）。また、飼育条件は概ね同一の中、ニジマスのみでカラムナリス病が発症するなど、発生する魚病についても魚種間で違いがみられた（表3）。

なお、試験期間終了後も2024年8月12日までの間継続飼育を行ったが、2魚種ともにIHN等による大きな死亡は認められなかった。

表3 現地感染試験における死亡魚の検査結果

検査年月日	魚種	検査尾数	平均体重(g)	主な症状	検査結果
2023.4.25	ニジマス	3	7.8	体色黒化、眼球突出、鰓や肝臓の貧血	IHNと冷水病
2023.4.28	富士の介	3	10.1	背鰭すり切れ、鰓や肝臓の貧血、脂肪の点状出血	IHNと冷水病
2023.5.18	ニジマス	3	7.1	眼球突出、鰓や腎臓の貧血、脾臓の肥大	IHNとカラムナリス病
2023.8.17	富士の介	2	17.0	体色黒化、眼球突出、鰓や肝臓等の貧血	IHN
2023.9.27	富士の介	3	22.0	眼球突出、鰓や肝臓等の貧血	IHN

表4 現地感染試験におけるIHN発生状況

魚種	IHN発生期間(日数) ^{※1}	日間死亡尾数 ^{※2}	累積死亡尾数/生残尾数	累積死亡率(%)
ニジマス	2023.4.24～5.28 (35日)	0～157	943 / 996	94.7
富士の介	2023.4.27～5.26 (30日)	0～94	686 / 999	68.7
富士の介	2023.8.12～9.30 (50日)	0～6	134 / 253	53.0

※1 日間死亡尾数や死亡傾向等からのおおよその日付。

※2 IHN発生期間中の最少～最多値。

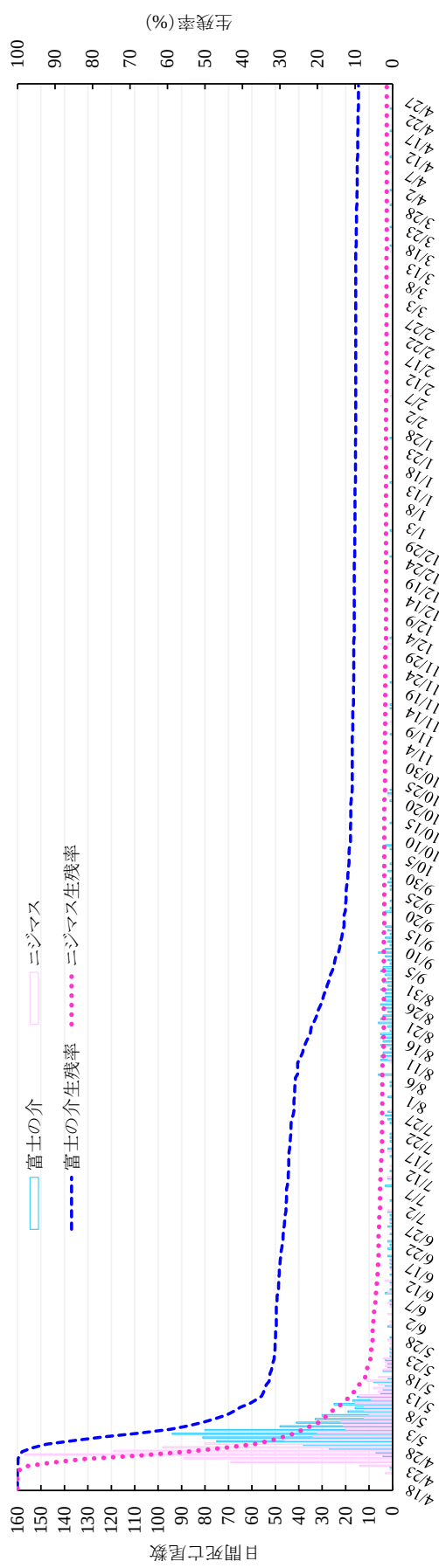


図 8 現地感染試験における 2 魚種の日間死亡尾数及び生存率の推移

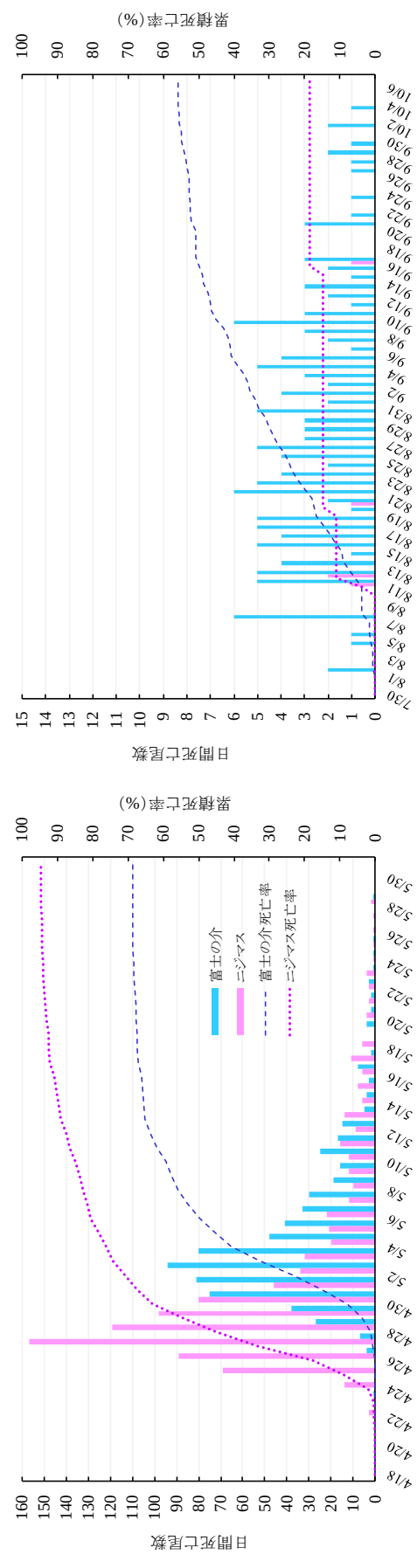


図 9 IHN 発生時の 2 魚種の死亡状況 (左図：ニジマス及び富士の介 1 度目，右図：富士の介 2 度目)

IHNV 株の分子系統解析

分子系統解析に供した IHNV 株を表 5、解析結果より作成した分子系統樹を図 10 に示した。分子系統解析には、感染試験供試株 4 株（本報 1 株、既報 3 株^{5a)}）の他、現地感染試験において分離されたニジマス 2 株及び富士の介 3 株の計 5 株、魚病診断において富士の介より分離された 7 株を用いた（表 5）。

解析の結果、供試した 16 株のうち 14 株が JN 系統（長野系統）^{12,13)}、2 株が Jnk 系統（北関東系統）¹¹⁾であった（表 5）。分子系統樹を作成したところ、富士の介から分離された IHNV 株は、既報の供試株であるニジマス分離株（YN1501, YN1601）及びヤマメ分離株（YN1602）とは異なる 2 つのクラスターを形成し（図 10）、本感染試験で使用した富士の介分離株（YN0018）は YN0012 株などを含む富士の介クラスターに属していた。

現地感染試験の死亡魚より分離された IHNV 株をみると、試験開始直後に死亡したニジマスより分離された株（YN2312）は Jnk 系統であったのに対し、同時期の富士の介で分離された株（YN2313）は JN 系統であった。ニジマスでも病気の発生初期の分離株（YN2312）は Jnk 系統であったのに対し、終期の分離株（YN2314）は JN 系統と、系統レベルで違いがみられた。富士の介においては、初回発生時の分離株（YN2313）は富士の介クラスターには属さず、ニジマスの終期分離株（YN2314）と比較的高い相同性を示した。一方で 2 度目発生時の初期分離株（YN2315）と終期分離株（YN2316）は高い相同性を示し、いずれも YN1904 株などを含む富士の介クラスターに属していた（図 10）。

表 5 分子系統解析に供した IHNV 株

分離株 No.	分離			平均体重 (g)	系統	その他
	年	養魚場	魚種			
YN1501	2015	E	ニジマス	20.8	JN	感染試験供試株(既報 ⁵⁾ , YFTV1505)
YN1601	2016	C	ニジマス	9.3	Jnk	感染試験供試株(既報 ⁶⁾ , YFTV1603)
YN1602	2016	B	ヤマメ	7.1	JN	感染試験供試株(既報 ⁶⁾ , YFTV1607)
YN1904	2019	D	富士の介	378.5	JN	魚病診断
YN1922	2019	A	富士の介	153.9	JN	魚病診断
YN0011	2021	A	富士の介	104.0	JN	魚病診断
YN0012	2021	D	富士の介	554.6	JN	魚病診断
YN0018	2021	D	富士の介	2381.0	JN	感染試験供試株(YFTV2110)
YN0022	2021	E	富士の介	2688.8	JN	魚病診断
YN2311	2023	D	富士の介	91.0	JN	魚病診断
YN2312	2023	D	ニジマス	7.8	Jnk	現地試験分離株(発生初期)
YN2313	2023	D	富士の介	10.1	JN	現地試験分離株(発生初期)
YN2314	2023	D	ニジマス	7.1	JN	現地試験分離株(発生終期)
YN2315	2023	D	富士の介	17.0	JN	現地試験分離株(発生初期・2度目)
YN2316	2023	D	富士の介	22.0	JN	現地試験分離株(発生終期・2度目)
YN2317	2023	F	富士の介	1661.0	JN	魚病診断

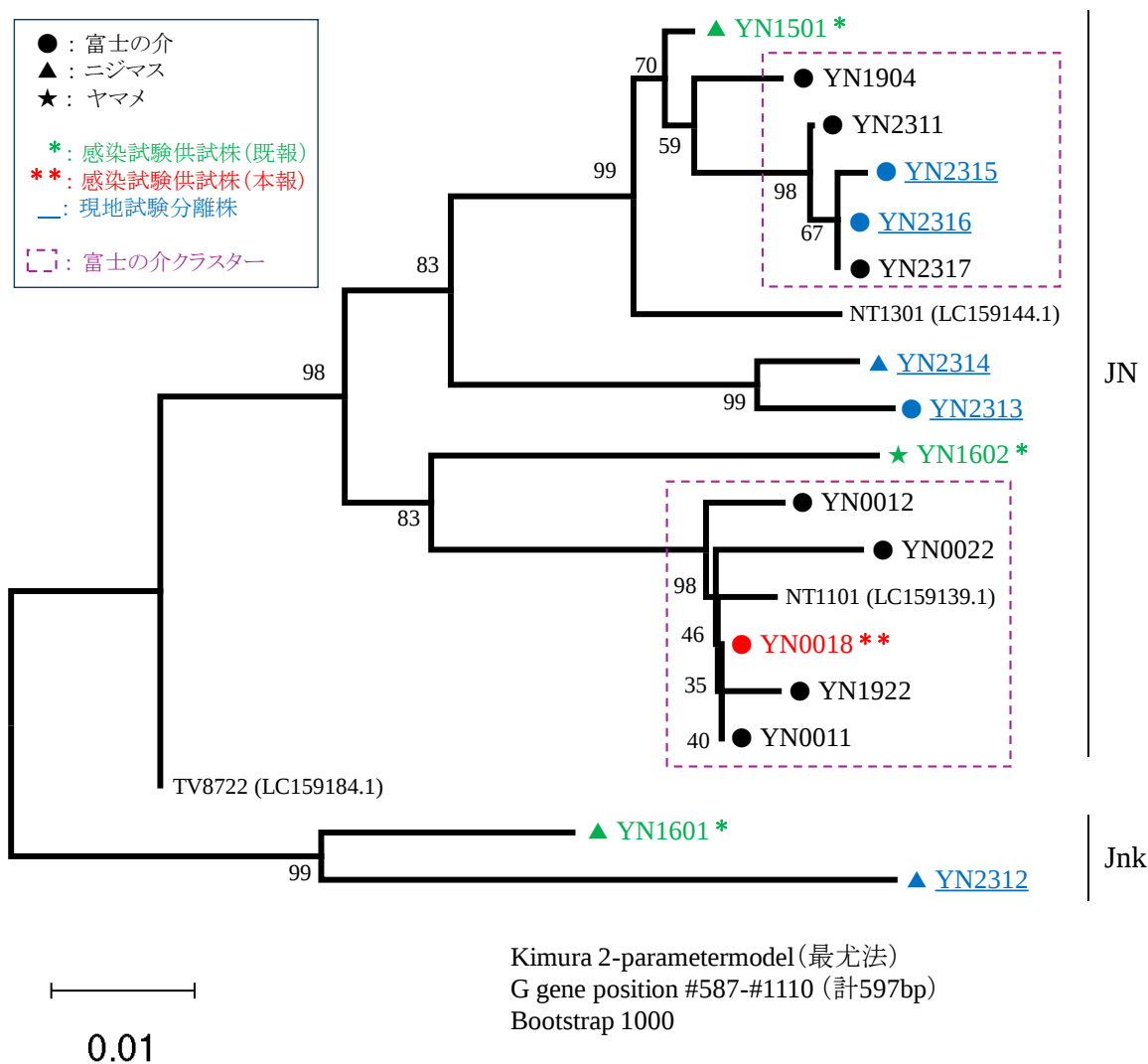


図 10 供試 IHNV 株の分子系統樹

考 察

IHN は国内のマス類養殖業に深刻な被害をもたらしているサケ科魚類のウイルス感染症であり、以前は稚魚期に大量死を引き起こすことで知られていたが、近年では大型魚や親魚での発症例もみられるなど、その被害は拡大を続けている⁹⁾。すなわち、本ウイルス症の発生の有無やサイズ、規模はその後の生産計画に大きな影響を及ぼす一因ともなり得る。これまでに富士の介（稚魚）の IHNV への感受性については、県内のニジマス及びヤマメ分離株において調べられており、いずれの株に対しても富士の介はニジマスより有意に感受性が低く、優れた抗病性を有する可能性が示唆されている⁵⁰⁾。民間養魚場での養殖が始まった 2017 年から現在に至るまでの間、確かに富士の介の稚魚期での IHN による大量死亡事例等の報告は無く、本結果を支持する形となっている。一方で、現場での成長段階が進むにつれ、一部の養魚場において 100g 前後の成魚や 2kg を超える出荷直前の大型魚での IHN による死亡事例が散見されるようになり、このことは富士の介あるいは富士の介の雄親であるマスノスケに対し高い病原性を示す IHNV 株の存在を懸念させるものとなった。

そこで本研究では、実際に富士の介に被害を与えた IHNV 株を供試ウイルスとし、富士の介及び両親であるニジマス、マスノスケに実験感染させることで、本株に対する 3 魚種の感受性を評価した。また、富士の介の感受性が成長に伴い変化している可能性も考えられたため、成長段階毎（5.7～159.4g）にそれぞれ試験を行った。感染試験の結果、計 5 回の全ての試験において供試株感染による富士の介の死亡が認められ（累積死亡率 16.7～

76.7%)，いずれも累積死亡率はマスノスケ（全て 0%）より有意に高く，ニジマス（20.0～90.0%）よりは低いあるいは同等傾向となった。ニジマス及びヤマメ分離株を用いた感染試験（供試魚平均体重 2.7～4.0g）においては，攻撃方法や濃度は多少異なるものの，いずれも富士の介の累積死亡率（0～6.7%）はニジマス（23.3～83.3%）より有意に低く，マスノスケ（全て 0%）との間に差は認められていない⁵⁰⁾。本試験では 5.7g サイズの富士の介で累積死亡率が 16.7%となっていること，それ以上のサイズでも 20.0～76.7%とある程度の死亡がみられることから，富士の介から分離された本供試株はニジマスやヤマメ分離株とは異なり，富士の介に対し高い病原性を有する可能性が示唆された。分子系統解析において，富士の介から分離された株と既報の供試株間の塩基配列の相同性は低く，かつ富士の介分離株は独自のクラスターを形成した点も，富士の介に病原性を示す IHNV の存在を後押しするものである。

他方で，マスノスケにおいては全ての試験を通して富士の介分離株感染による死亡は認められなかった。ニジマス及びヤマメ分離株感染時もマスノスケの死亡はみられておらず⁵⁰⁾，これらと同様に本株においてもマスノスケに対しては病原性を示さないことが明らかとなった。このことは，マスノスケに強い病原性を示す株が出現し，これがマスノスケの血を引く富士の介の死亡を引き起こしている可能性を否定するものになるであろう。富士の介の IHNV を含めた魚病病原体に対する感受性は多くがニジマスとマスノスケの中間を示し⁴⁷⁾，これらはマスノスケの優良な性質が富士の介に導入された結果であると考えられている。本試験においても富士の介の死亡率はニジマスより低くなる傾向がみられたことから，富士の介に病原性を示す IHNV 株に対しても同様の効果が得られているものと思われた。

次に実際の養殖現場での IHNV 発生動向等をより詳細に把握するため，民間養魚場において現地感染試験を行った。その結果，試験期間を通してニジマスでは 1 度，富士の介は 2 度の IHNV の発生が確認された。多様な IHNV が存在する環境下では，1 つの発症事例の中で遺伝子型の異なるウイルスが感染している場合がみられる¹⁴⁾。実際，IHNV は株間で抗原性や病原性に差異があり，再感染，いわゆる「二度罹り」が起こることが知られている¹⁵⁾。IHNV 株の分子系統解析結果をみると，ニジマスでは感染初期と終期それぞれで分離された IHNV 株は JN 及び Jnk と異なる系統であった。同ウイルスの遺伝子型は抗原に関わる G タンパク質の塩基配列情報を基に分析されており，抗原性の差異による二度罹りが生じていた可能性が考えられた。富士の介は，1 及び 2 度目の感染ともに JN 系統の IHNV であったが，富士の介クラスターに属していたのは 2 度目の株のみであり，株間で相違性がみられた。一部の富士の介生産養魚場においてはこれまでに IHNV が 2 度発生した報告例があり，本研究結果と合わせて考えると，養殖生産場において IHNV の二度罹りは頻繁に生じているものと推察された。

試験期間終了時の最終的な生残率をみると，ニジマスが 1.5%であったのに対し，富士の介は 9.1%と約 6 倍高い値であった。分離されたウイルス株の系統や感染回数など 2 魚種間で条件は異なっていたものの，生残率の観点で言えば，富士の介はニジマスよりも IHNV による被害を受けにくいことが養殖現場レベルでも立証されたと言える。すなわち，富士の介の IHNV に対する感受性はニジマスと比較すると低いものと考えられ，これは前述の所内試験の結果を支持するものである。また，富士の介の IHNV 発生動向について，1 度目より 2 度目の方が累積死亡率が低くなっている点にも注目したい。考えられる要因としては，感染株間の病原性の違いの他に，1 度目発生時の生残魚が免疫を獲得した可能性も有り得る。稚魚期などの早期から富士の介に病原性を示す株が存在する環境下での飼育を行い，恒常的に本株に暴露させ免疫付与することで，成魚期以降での IHNV の発生抑止あるいは被害軽減に繋がるかもしれない。

本所内感染試験及び現地感染試験を通して，富士の介の稚魚期においても IHNV による感染及び死亡が起こりうることを明らかにした。一方で，養殖現場における稚魚期での本症の発生報告は極めて少なく，100g 前後の成魚から 2kg 以上の出荷直前の大型魚での発生が目立っている。本試験において，32.1g サイズ以下では供試株に対する富士の介の感受性はニジマスより低くなる傾向が強かったが，58.8g サイズではその差は縮まり，148.9g サイ

ズ以上では2魚種間の感受性がほぼ同等となった。この一連の結果をみると、富士の介の本株に対する感受性は成長とともにニジマス寄りに変化してきている可能性がある。ニジマスやサクラマスの IHN に対する感受性は成長に伴って低下することが報告されているが¹⁶⁻¹⁸⁾、本試験の富士の介においては同様の結果とはならなかった。本試験では約 60g 付近で富士の介の感受性に変化がみられ始めたが、サケ科魚類においてこのサイズ近辺で生じる変化とすればスモルト化（銀化）が挙げられる。スモルト化とは降海するため必要な生理的な体内変化等を指すが、同時にスモルト期は他の時期と比較して疾病に対する抵抗性が低下することが指摘されている¹⁹⁾。アマゴ及びサクラマスではスモルトの方がパーよりせっそう病及びビブリオ病原菌に対する感受性が高いとの報告もあり、この理由としてスモルトにおける皮膚構造の変化が大きな影響を与えている可能性が示唆されている¹⁹⁾。マスノスケはニジマスに比べスモルト化しやすく、それに伴い鱗の剥離も起こりやすいといった特徴がある。本性質の一部受け継いだ富士の介はニジマスよりスモルト化しやすいために、当該変化が起こるタイミングで IHN に対する抵抗性が落ちている可能性も考えられた。富士の介のパー及びスモルト個体間の IHN に対する感受性の差異についても今後検討する必要があるかもしれない。

本研究より、富士の介に病原性を示す IHN 株の存在が初めて明らかになった。本株は富士の介の稚魚期から成魚期、出荷サイズの大型魚まで幅広く病原性を示す可能性が示唆され、今後は成魚期以降での発生を如何に抑制するかが課題となる。まずは本株が未侵入の養魚場においては引き続き他養魚場との水の行き来を避ける等の防疫対策を徹底するとともに、本株が存在する養魚場においては 100g サイズ付近での選別や池移動等、魚にストレスやダメージを与えるような作業は極力避けることが IHN 発生リスクを減らす上で重要になると考えられる。各養魚場で富士の介の養殖環境や生産スタイルは様々であることから、今後はそれらをしっかり把握した上で効果的と考えられる対策等を提案していく必要があると思われる。

謝 辞

現地感染試験の実施を快諾いただくとともに、試験魚の飼育管理から死亡魚の回収等の一連の作業を行っていただきました養魚場関係者の皆様に心より感謝申し上げます。

要 約

1. 富士の介から分離された IHN 株の富士の介及び親魚種に対する病原性を感染試験により評価するとともに、現場レベルでの IHN 発生動向等を把握するため現地での自然感染試験を行った。併せて本研究に関わる IHN 株の遺伝的関係性を確認するために分子系統解析を行った。
2. 各成長段階での感染試験の結果、富士の介の累積死亡率はニジマスより低いあるいは同等となり、マスノスケより有意に高くなった。富士の介はサイズの上昇に伴いニジマスとの死亡率の差が縮まり、概ね 60g から 150g サイズの間で同等となる傾向がみられた。
3. 本試験より富士の介に病原性を示す IHN 株の存在が初めて確認され、本株は稚魚期から成魚期まで幅広く病原性を示すことが明らかとなった。なお、本株のマスノスケに対する病原性は認められなかった。
4. 民間養魚場における現地感染試験では、富士の介はニジマスより IHN による被害を受けにくい魚種であることが現場レベルで示され、所内試験の結果を支持した。
5. 分子系統解析の結果、富士の介分離株は塩基配列の相同性が高く、クラスターを形成することが明らかとなった。また、本解析から富士の介は異なる IHN 株に再感染し、二度罹りを起こしていることを確認した。
6. 富士の介は成長段階が進むにつれ IHN に対する感受性が高くなることが示唆されたが、これは IHN 株の病原性の影響の他に、スモルト化等の魚自体の変化が絡み合い引き起こされている可能性も考えられた。

文 献

- 1) 三浦正之（2017）：山梨県開発の新養殖魚について：ニジマス×マスノスケの全雌三倍体魚. アクアネット 5月号, 20 (5) , 56-60.
- 2) 平塚匡・三浦正之（2019）：山梨県の新たな地域特産魚「富士の介」の肉質評価. 山梨県水産技術センター事業報告書, 46, 10-19.
- 3) 平塚匡・三浦正之（2022）：富士の介と海面養殖サーモンの肉質の比較. 山梨県水産技術センター事業報告書, 49, 6-11.
- 4) 加地弘一（2010）：バイテク魚のビブリオ病原菌に対する感受性試験（短報）. 山梨県水産技術センター事業報告書, 37, 77-78.
- 5) 小澤諒・三浦正之・岡崎巧（2019）：富士の介のせつそう病菌及び IHNV に対する感受性試験. 山梨県水産技術センター事業報告書, 46, 20-25.
- 6) 小澤諒・三浦正之（2020）：富士の介の IHNV に対する感受性試験. 山梨県水産技術センター事業報告書, 47, 13-17.
- 7) 平塚匡・三浦正之・青柳敏裕（2023）：富士の介等のレンサ球菌及びサケ科魚ヘルペスウイルス（OMV）に対する感受性. 山梨県水産技術センター事業報告書, 50, 13-21.
- 8) 西澤豊彦・吉水守（2017）：伝染性造血器壊死症. 魚病研究, 52, 1-5.
- 9) 難波亜紀（2018）：ニジマスの IHN の発生状況と調査に基づく被害低減対策. 養殖ビジネス, 55, 34-37.
- 10) 鈴木邦夫・坂井勝信（1992）：サクラマスおよびニジマスに対する IHN ウイルスのワクチン効果. 北海道水産孵化場研報, 46, 1-8.
- 11) Namba, A., Minakami, K., Takee, T., Shiibashi, K., Sugio, M., Yasuda, S., Takeuchi, H., Ishikawa, T., Matsubara, T., Arai, H., Nakanishi, T., Mano, N. (2021) : Temporal Change in Genetical Lineages of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV) in the North Kanto Region of Japan from 1981 to 2015. *Fish Pathol.* 56, 35-42.
- 12) Nishizawa, T., Kinoshita, S., W.-S. Kim, Higashi, S., Yoshimizu, M. (2006) : Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis Aquat Org*, 71, 267-272.
- 13) Mochizuki, M., Hyoung Jun Kim, Kasai, H., Nishizawa, T., Yoshimizu, M. (2009) : Virulence Change of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus against Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* with Viral Molecular Evolution. *Fish Pathol.* 44, 159-165.
- 14) 東京海洋大学・長野県水産試験場・静岡県水産・海洋技術研究所富士養鱒場（2024）：伝染性造血器壊死症（IHNV）の清浄化と強毒化阻止に向けて（提言）. 農林水産省戦略的プロジェクト研究推進事業「国内主要養殖魚の重要疾病のリスク管理技術の開発」成果普及資料, 1-18.
- 15) 杉野御祐・安田秋太・難波亜紀・柴崎康宏・間野伸宏（2021）：伝染性造血器壊死症ウイルス（IHNV）の系統間における抗原性の差異と二度罹りとの関係. 日本魚病学会大会講演要旨集, 11
- 16) 河西一彦・米沢純爾・小野淳・長谷川敦子・本間智晴・福田穎徳（1993）：ニジマスの成長に伴う伝染性造血器壊死症（IHNV）に対する感受性の変化. 魚病研究, 28, 35-40.
- 17) 中居裕（1994）：伝染性造血器壊死症（IHNV）に関する研究-I 大型魚由来分離株のニジマスに対する病原性. 岐阜県水産試験場研究報告, 39, 37-44.
- 18) 鈴木邦夫・坂井勝信（1991）：IHNV ウイルスのサクラマス稚魚および幼魚に対する病毒性の差異. 北海道水産孵化場研報, 45, 23-27.
- 19) 森川進（1989）：せつそう病に関する研究XVII サクラマスおよびアマゴのスモルトおよびパーの細菌性疾病に関する差異. 岐阜県水産試験場研究報告, 34, 9-15.