

富士の介の IHNV に対する感受性試験

小澤 諒・三浦正之

山梨県水産技術センター忍野支所（以下、当支所）ではこれまでに付加価値の高い新たな地域特産魚としてニジマス *Oncorhynchus mykiss* 雌とマスノスケ *O. tshawytscha* 偽雄を交配した全雌異質三倍体魚（以下、富士の介）を作出し、成長等の特性を調べてきた¹⁻⁸⁾。さらに、2017年及び2018年の秋には実際の養殖現場における飼育特性を評価するための現地実証試験として、県内の養殖業者7経営体に対し富士の介の発眼卵を配布した。

一方、サケ科魚類の魚病においては、特に伝染性造血器壊死症（IHN）による被害が甚大であり、経営者に多大な損失を招くなど防疫上の課題となっている⁹⁻¹¹⁾。これを受け、前報¹²⁾においては富士の介の IHN ウイルス（IHNV）に対する感受性についてニジマス及びマスノスケと比較し、富士の介はニジマスよりも IHN に対する抗病性が優れた種苗である可能性が示唆された。

本試験では富士の介の IHN に対する抗病性に関してさらに知見を深めるため、前報¹²⁾とは異なる2株を使用し、それぞれの感受性についてニジマス及びマスノスケと比較したので結果を報告する。

材料及び方法

供試ウイルス

当県の民間養魚場で飼育されていたヤマメ（平均体重7.1g）から2016年6月に分離した YFTV1607 株（実験 I とする）及び、同じく当県の民間養魚場で飼育されていたニジマス（平均体重9.3g）から2016年5月に分離した YFTV1603 株（実験 II とする）を使用した。それぞれの株において攻撃実験に用いるウイルス液を作製するため、EPC 細胞を 175 cm² プラスチックフラスコにて 20 °C で培養後、供試ウイルスを接種し、その後 15 °C で培養した。そして細胞変性（以下、CPE）が細胞全体に広がったところでフラスコごと -80 °C で凍結し、その後急速解凍したものを試験に供した。なお、試験供試前に EPC 細胞を用いて各ウイルス液の力価を TCID₅₀ 法により測定した。

供試魚

当支所で2018年10月に作出し、それぞれFRP製の餌付け水槽で飼育された富士の介、全雌ニジマス 3n 及び全雌マスノスケ 3n を用いた。これらの三倍体魚の作出法については既報に準じた^{1,3)}。

実験 I においては2019年4月3日に各魚種の供試魚を選別した。体重はニジマス及びマスノスケが 2.7±0.1 g、富士の介が 2.7±0.2 g（平均±標準偏差、以下、平均±SD）だった。また、実験 II においては2019年5月17日に各魚種の供試魚を選別した。体重は3魚種ともに 4.0±0.2 g（平均±SD）だった。なお、各供試魚選別前の約1週間は3魚種の給餌率を合わせた。

試験方法

ウイルス攻撃は、初めに供試魚を 5.4 % の塩水に 2 分間浸漬し、続いてウイルス原液を懸濁させた井水に 15 分間浸漬する方法で行い、実験 I を 2019 年 4 月 4 日、実験 II を 2019 年 5 月 20 日に実施した。ウイルス液の濃度は実験 I 及び実験 II で各々 10^{6.05}TCID₅₀/mL 及び 10^{5.8}TCID₅₀/mL とした。なお、これらの浸漬処理はそれぞれ同

一の発泡スチロール内で3魚種同時に行ったほか、浸漬液はブローアを用いて通気した。また、塩水及びウイルス液浸漬中の水温は、実験Ⅰでは各々12.2℃及び13.0℃であり、実験Ⅱでは各々13.4℃及び14.2℃であった。浸漬後の供試魚は水温12.5℃の井水を約30 mL/sで掛け流したポリプロピレン製のコンテナ槽に魚種別に移し、21日間飼育観察した。なお給餌は適宜行ったほか、死亡魚があった場合はその都度取り上げ個別にウイルス分離した。ウイルス分離には脾臓、腎臓及び肝臓を用い、EPC細胞またはRTG-2細胞に接種後CPEの形態からIHNによる死亡か否かを判断した。

結果及び考察

初めに、実験Ⅰで使用したYFTV1607株による攻撃実験での累積死亡尾数はニジマスで最も多く21日間の飼育期間中に25尾の死亡が確認された。一方で、富士の介の死亡は1尾のみであり、マスノスケに関しては死亡がみられなかった。ニジマスの累積死亡率は83.3%となり、他2魚種よりも有意に高かった ($p < 0.01$, Fisher's exact test, 表1, 図1)。

同様に、実験Ⅱで使用したYFTV1603株による攻撃実験においても累積死亡尾数はニジマスが15尾と最も多かった一方で、富士の介の死亡は2尾のみであり、マスノスケに関しては死亡がみられなかった。ニジマスの累積死亡率は50.0%となり、実験Ⅰと同様に他2魚種よりも有意に高いという結果になった ($p < 0.01$, Fisher's exact test, 表2, 図2)。

死亡魚の外観的特徴としてIHN特有の症状である眼球突出や体色黒化が確認された。またこのような外観症状が現れた個体はその後2日程度で死亡する傾向にあったが、飼育期間の後半になるほどこの傾向は薄れ、外観症状が出たまま数日間生存した個体や飼育期間終了日まで生存した個体もあった。一方解剖所見としては腸管の黄色化がみられた個体が多かったものの、脂肪出血等の特徴的な症状を呈した個体はごくわずかだった。また実験Ⅰに関しては、攻撃日から死亡日までの間隔が短い死亡魚ほど外観及び内臓に特有の症状がみられない個体が多かったことから、急性的な死亡であると考えられた。なおウイルス分離の結果、実験Ⅰ、Ⅱともに全死亡魚からIHNV特有のCPEが確認されたため全てIHNによる死亡と判断した。

現在、ニジマス養殖場における病害の中でIHNによる被害は最も大きいものの一つであるが⁹⁻¹¹⁾、本試験に供したIHNVの2株について富士の介はニジマスよりも感受性が低いことが分かった。

表1 実験Ⅰの試験結果 (YFTV1607 ヤマメ由来株, 攻撃濃度 $10^{6.05}$ TCID₅₀/mL)

魚種	体重 (g)	供試尾数	累積死亡尾数	累積死亡率 (%)
ニジマス	2.7 ± 0.1	30	25	83.3**
富士の介	2.7 ± 0.2	30	1	3.3
マスノスケ	2.7 ± 0.1	30	0	0

※体重の表記は平均±SD

※** $p < 0.01$ (Fisher's exact test)

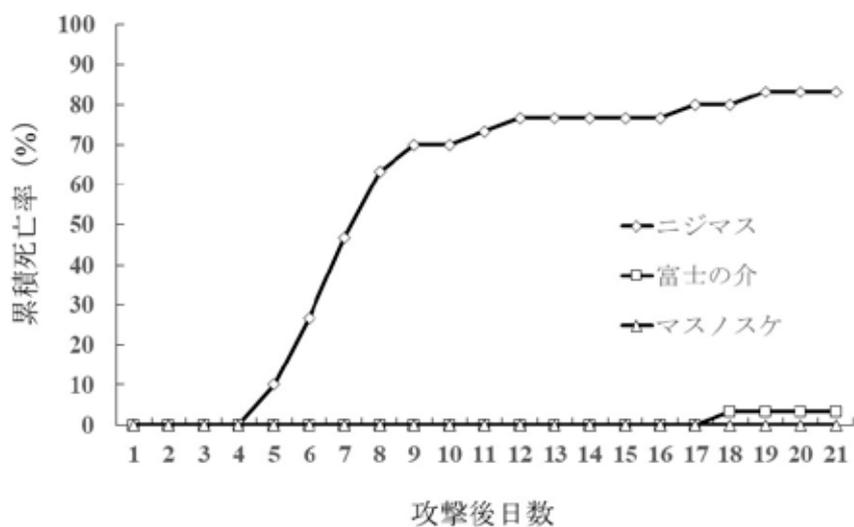


図1 実験Iにおける攻撃後の累積死亡率の推移

表2 実験IIの試験結果 (YFTV1603 ニジマス由来株, 攻撃濃度 $10^{5.8}$ TCID₅₀/mL)

魚種	体重 (g)	供試尾数	累積死亡尾数	累積死亡率 (%)
ニジマス	4.0 ± 0.2	30	15	50.0**
富士の介	4.0 ± 0.2	30	2	6.7
マスノスケ	4.0 ± 0.2	30	0	0

※体重の表記は平均±SD

※** $p < 0.01$ (Fisher's exact test)

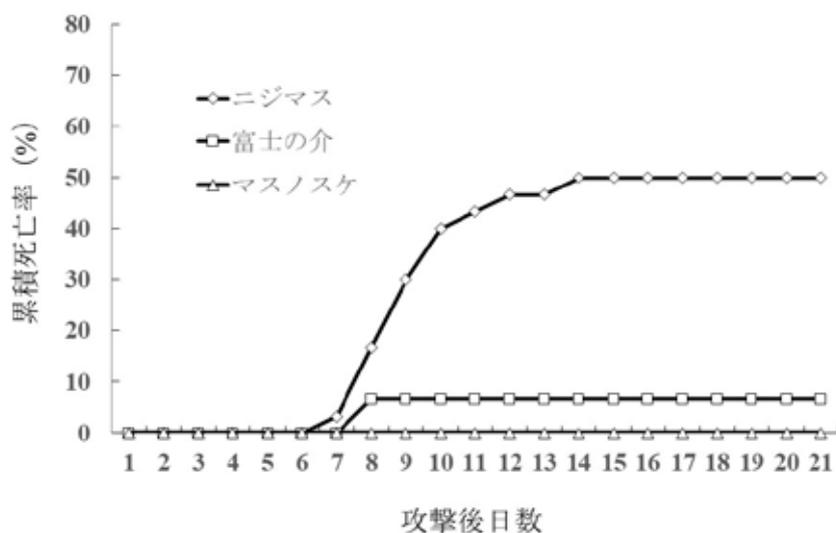


図2 実験IIにおける攻撃後の累積死亡率の推移

総合考察

富士の介においては今後ますますの養殖生産の拡大が期待される一方で、その抗病特性について知見を集めていく必要がある。特にサケ科魚類の養殖場において IHN による被害は甚大であることから、前報¹²⁾では富士の介の IHNV に対する感受性についてニジマス及びマスノスケと比較した。その結果、IHNV 攻撃後の累積死亡率はニジマスで有意に高く 23.3 %となった一方で、富士の介及びマスノスケでは死亡がみられなかったため、富士の介はニジマスよりも IHN に対する抗病性に優れている可能性が示唆された。しかし、試験に供した IHNV 株は県内養殖場で飼育されていたニジマス由来の 1 株のみであったため、多様性があり株によって病毒性が異なることで知られる IHNV に対する富士の介の感受性について知見を深めるにはさらなる試験を重ねる必要があった。そのため本試験では前回と異なる県内養殖場由来の IHNV 株 2 株を供試することとし、うち 1 株はヤマメから分離された株を用いて攻撃試験を実施した。その結果、両供試株について富士の介の死亡率はニジマスよりも有意に低く、魚種や養殖場の由来を問わず IHN に対する抗病性に優れている可能性が示唆された。また、マスノスケに死亡がみられなかったことから、富士の介は IHN に対する抗病性についてマスノスケの性質を強く継承したものと推察された。

IHNV は 1950 年代から米国のベニザケ及びマスノスケでその存在が知られるようになり、日本では 1970 年に北海道のベニザケ及びヒメマスで初めて確認され、その後全国のニジマス及び在来マスに蔓延した^{11,15)}。県内においても IHN は各地のマス類養殖場に蔓延し、種苗の初期減耗の最たる要因となっている。一方でヒメマスの IHN による被害については少なくとも近年は確認されていない。このことから、現在までに県内の IHNV 株が養殖生産量の多いニジマスや一部在来マスのみに対し強い病毒性を示すものに変異した可能性があり¹⁵⁾、これらの株は反対にヒメマスやマスノスケといった養殖生産量の少ない種苗に対しては病原性が低いのかもしい。

また、2017 年から開始された富士の介の現地実証試験をみても、富士の介の IHN による死亡率はニジマスと比較して劇的に低いという報告を受けており、本試験の結果を支持する形となっている。今後富士の介の養殖が拡大される中で、各養殖場における IHNV 株の病毒性や環境条件により死亡率は変動すると考えられるが^{9-10,16)}、現時点では富士の介に限定した大量死亡が起こる可能性は低いであろう。ただし、現地実証試験においても IHN による富士の介の死亡事例は少数かつ死亡率は低いものの報告されているほか、本試験においても多少の死亡が確認されたため、今後このような IHNV 株が富士の介に強毒性を示すものに変異する可能性も考えられる。さらに、全国でみればマスノスケに強い病毒性を示す IHNV 株が存在する可能性があり、それらは富士の介に対しても同様の病毒性を示す恐れがあるため、養殖場においては外部からの種苗導入を極力避けるなど、新たな型や株の IHNV を持ち込まないことが重要になってくるだろう。

富士の介に対してはこれまでに、各々異なる養殖場由来のニジマス分離株 2 株、ヤマメ分離株 1 株の計 3 株で IHNV の攻撃試験を実施してきた。そしてその全てにおいて富士の介の感受性はニジマスと比較して有意に低かった。このことから富士の介は IHN に対し優れた抗病性を持つと考えられ、養殖場において初期減耗が少なく計画生産を行いやすい種苗であることが示唆された。さらに、初期減耗を抑えることで飼料ロスや労力の削減にも繋がることから、経営面においても優れた魚種になることが期待される。

要約

1. 富士の介の IHN に対する抗病性に関する知見を得る目的で、ニジマス及びマスノスケを比較対照とし攻撃試験を実施した。
2. 供試ウイルス株はヤマメ由来株及びニジマス由来株とし、攻撃濃度は各々 $10^{6.05}$ TCID₅₀/mL 及び $10^{5.8}$ TCID₅₀/mL とした。

3. ヤマメ由来株における累積死亡率はニジマスが 83.3 %であったのに対し、富士の介は 3.3 %、マスノスケでは死亡がみられず、ニジマスのみ死亡率が有意に高かった。
4. ニジマス由来株における累積死亡率はニジマスが 50.0 %であったのに対し、富士の介は 6.7 %、マスノスケでは死亡がみられず、ニジマスのみ死亡率が有意に高かった。
5. 攻撃試験の結果から富士の介は IHN に対する抗病性についてニジマスよりも優れている可能性が示されたほか、現地実証試験においても IHN による大量被害の事例はなく、本試験の結果を支持している。
6. 富士の介は IHN に対する抗病性に優れている可能性が高いと考えられ、養殖する上で歩留まりが良く計画生産を行いやすい種苗になることが期待される。

文献

- 1) 高橋一孝 (2009) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について ニジノスケ・サクラヒメ異質三倍体魚の作出. 山梨県水産技術センター事業報告書, 36, 1-5.
- 2) 加地弘一 (2010) : バイテク魚のピ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.
- 3) 高橋一孝 (2012) : マスノスケの飼育と全雌魚・性転換雄魚の作出について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 39, 1-7.
- 4) 高橋一孝 (2012) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について－Ⅱ 異質三倍体ニジマスの成長と成熟状況について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 39, 26-31.
- 5) 名倉盾 (2012) : ニジノスケの食味について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 39, 32-33.
- 6) 大浜秀規 (2015) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について－Ⅲ ニジマス三倍体, ニジノスケ三倍体及びマスノスケ三倍体の成長と成熟状況について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 42, 9-18.
- 7) 三浦正之 (2017) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について－Ⅳ 全雌異質三倍体ニジノスケの成長及び成熟状況. 山梨県水産技術センター事業報告書, 44, 1-12.
- 8) 加地奈々・小澤諒・三浦正之・岡崎巧 (2018) : サケ科魚類の新しい養殖対象種について－Ⅴ 全雌異質三倍体ニジノスケの低酸素耐性について. 山梨県水産技術センター事業報告書, 45, 1-4.
- 9) 中居裕 (1994) : 伝染性造血器壊死症 (IHN) 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.
- 10) 中居裕 (1999) : 伝染性造血器壊死症 (IHN) に関する研究－Ⅱ 大型魚由来 IHNV 分離株のアマゴに対する病原性. 岐阜県水産試験場研究報告, 44, 19-23.
- 11) 本西晃 (2004) : 養殖サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (IHN) 防除技術開発に関する研究. 博士論文. 北海道大学. 北海道.
- 12) 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.
- 13) 森川進 (2003) : サケ科魚類のせつそう病の防除に関する研究. 岐阜県淡水魚研究所研究報告, 48, 1-234.
- 14) 青島秀治 (2007) : 水産試験場等の診断記録からみた我が国における養殖サケ科魚類の疾病問題 (1978～2002年) . 魚病研究, 42(2), 119-122.
- 15) 西澤豊彦・吉水守 (2017) : 伝染性造血器壊死症. 魚病研究, 52(1), 1-5.
- 16) 小野淳 (1998) : 東京都におけるマス類成魚感染型 IHN の発病事例. 東京都水産試験場調査研究報告, 210, 37-43.