

広島県内の養殖ヤマメからのOncorhynchus masou virus(OMV)の検出

誌名	広島県水産試験場研究報告
ISSN	03876039
巻/号	22
掲載ページ	p. 1-4
発行年月	2004年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



広島県内の養殖ヤマメからの *Oncorhynchus masou* virus (OMV) の検出

永井 崇裕

Detection of *Oncorhynchus masou* virus (OMV) from masu salmon *Oncorhynchus masou* cultured in Hiroshima Prefecture

Takahiro NAGAI

Abstract: From 2000 to 2003 a disease characterized by tumor-like formation around the mouth was occurred in masu salmon cultured at two farms in Hiroshima prefecture. This clinical sign was similar to that of OMV disease (OMVD) in salmonid fish. A virus was isolated from ovarian fluid of the affected fish in RTG-2 cells with a CPE characterized by syncytia, and identified as OMV by PCR. In addition to ovarian fluid, OMV was detected from tumor, kidney and brain of diseased fish by PCR.

This is the first record of OMVD in Hiroshima prefecture because OMV has not been detected from salmonid fishes until now. In experimental infection it was revealed that the pathogenicity of OMV isolated from masu salmon was low against adult rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*.

緒 言

日本におけるサケ科魚類のヘルペスウイルス感染症は、1972年および1974年に十和田湖の孵化場で死亡したヒメマス *Oncorhynchus nerka* 稚魚から分離された NeVTA (Nerka Virus Towada Lake, Akita and Aomori) に関する報告が最初である¹⁾。1978年には北海道の孵化場のヤマメ *O. masou* 卵巣液からヘルペスウイルスが分離され *Oncorhynchus masou* virus (OMV) と名付けられた²⁾。この OMV は複数のサケ科魚類稚魚に対して病原性を有し³⁾、腫瘍原生ウイルスであることが証明されている⁴⁾。その後のヘルペスウイルスによる被害としては、1988年から発生した宮城県の海面養殖ギンザケ *O. kisutch*⁶⁾や、1992年から発生した北海道のニジマス *O. mykiss* の被害が挙げられる。それらはその後の徹底した防疫体制により一旦終息した⁵⁾と考えられたが、1999年から OMV は本州中部で再びニジマス成魚に大きな被害を与えるようになってきている⁷⁾。NeVTA や OMV などの日本のサケ科魚類から分離されたヘルペスウイルスは、血清学的に近縁であることから同一種と考えられ Salmonid Herpesvirus-2 (SaHV-2) と呼称されている⁵⁾。

これまで、広島県では OMV によるサケ科魚類の死

亡の発生例は報告されておらず、また分離例もなかった。しかし、2000年の夏から秋に広島県北部の2ヶ所の養殖場で、OMV の特徴である口部に腫瘍様の症状を呈するヤマメが数多く観察された。そこで、これらのヤマメの臓器や卵巣液から OMV の検出を行うとともに、現在長野県を中心とする本州中部で問題となっているニジマス成魚の OMV 感染症との関係を明らかにするために、分離された OMV のニジマス成魚に対しての病原性を検討した。また、養殖場からの OMV の防除を目的として、ポピドンヨード剤による発眼卵の消毒を行い効果を検討した。

材料および方法

ウイルスの検出

RTG-2 細胞を用いたウイルスの分離

広島県北部の二カ所の養殖場 (A および B 養殖場) において、2000年から2003年にかけて毎年10月 (水温 10.5℃~16.0℃) に無作為にヤマメのメス親魚を取り上げ、1 mL マイクロピペットを用いて卵巣液を採取した。採取直後の卵巣液にはペニシリン・カナマイシン混液を加え (最終濃度500IU/mL および500µg/mL)、氷冷

しながら水産試験場に持ち帰り、4℃で一晩静置した。翌日、遠心分離(10,000×g, 5分間, 4℃)により細胞片を除去した後、RTG-2細胞に培地の10分の1の量の上澄み液を接種し、10℃で培養した。RTG-2細胞の培養には5%牛胎児血清, Tris 緩衝液(8 mM Tris-HCl, pH 7.5) および0.075%NaHCO₃を添加したEagle's MEM (Gibco) を用いた。

PCR法によるウイルスの検出

採取したヤマメ全個体の卵巣液の遠心残渣および口部に腫瘍の観察された個体に関しては、腫瘍部、腎臓および脳についてPCR法によるOMV遺伝子検出を行った。これらの組織には、核酸抽出液(1.0mg/mL Proteinase K, 0.5% Tween 20)を加えてホモジナイズした後、37℃で15分間インキュベートした。これに、TE(10mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)飽和フェノールを加えて混合し遠心分離(12,000×g, 5分間)を行った。この上澄み液にさらにTE飽和フェノールを加えて混合し遠心分離(12,000×g, 5分間)した後、上澄み液にクロロホルム・イソアミルアルコール混液(24:1)を加えて混合し、遠心分離(12,000×g, 1分間)を行った。得られた水層を抽出核酸としてPCR法により増幅した。プライマーはF10(5'-GTACCGAAACTCCCGAGTC-3')およびR5(5'-AACTTGAACTACTCCGGGG-3')⁸⁾を使用し、耐熱性DNAポリメラーゼにはTheroprime DNA polymerase (ABgene)を用いた(増幅産物長は439bp)。PCRの反応条件として、94℃で5分間反応させた後、94℃・1分、56℃・1分、72℃・1分を1サイクルとして35サイクル反応させ、最後に72℃で10分間反応させた。PCR産物は1.5%アガロースゲル-TAE緩衝液(400mM Tris-酢酸 pH 8.0, 1 mM EDTA)で電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色した。

分離したウイルスのニジマス成魚への病原性試験

2000年にB養殖場のヤマメ卵巣液から分離されたO#22株を用いて、OMV非感染が確認されているニジマス(平均体重103.3g)に対する感染実験を行った。O#22株はRTG-2細胞を用いて10℃で13日間培養し、遠心分離(1,500×g, 5分間, 4℃)して細胞片を除去して用いた。培養後の力価は10^{4.4}TCID₅₀/mLとなった。このようにして調整したウイルス液を、FA-100(田辺製薬)で麻酔したニジマスの体側筋肉内に注射器によって0.3mL(10^{3.9}TCID₅₀/fish)接種した。対照区にはPBS(-)

と同様に接種した。実験にはウイルス接種区および対照区ともそれぞれニジマス10尾を用い、ウイルス接種後11.5℃から15.4℃の止水中で46日間飼育し、発病とへい死状況を観察した。死亡したニジマスについては腎臓、脾臓および脳からRTG-2細胞を用いてウイルスの再分離を行うとともに、実験終了時に生残していたニジマスについても同様の検査を行った。

ポピドンヨード剤による発眼卵の消毒

ポピドンヨード剤による発眼卵の消毒には、水産用イソジン液(明治製菓)を用法用例に従って用いた。すなわち、水産用イソジン液50mLを飼育水10Lで希釈した溶液(有効ヨウ素濃度50ppm)で発眼卵を15分間浸漬処理した。消毒した発眼卵の一部は、水産試験場に持ち帰り紫外線処理井戸水を用いて飼育した。

結果および考察

ウイルスの検出

採取したヤマメの中に図1に示すように口部に腫瘍がある個体が観察された。腫瘍は尾鰭や尻鰭に見られる場合もあった。腫瘍が観察された個体の発現率は年によって異なり飼育魚の0~50%の範囲であった。

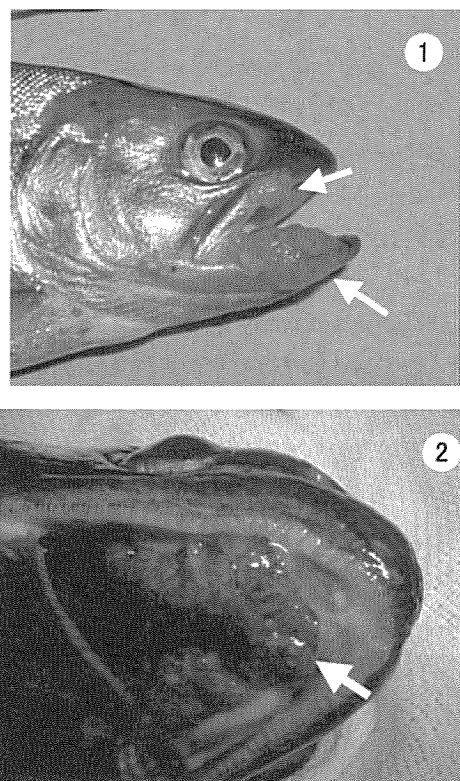


図1 広島県内の養殖場で確認されたヤマメの口部腫瘍(何れも200~300gの親魚)

1:上下の顎に発生した腫瘍, 2:口腔内部(上顎)に発生した腫瘍

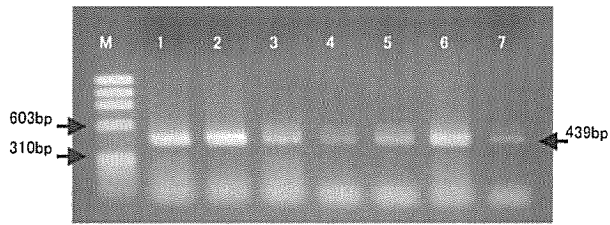


図2 PCR産物の電気泳動像

M: DNA マーカー, 1: A 養殖場分離ウイルス (2000年), 2: B 養殖場分離ウイルス (2000年), 3: A 養殖場ヤマメ腫瘍 (2001年), 4: B 養殖場ヤマメ腫瘍 (2001年), 5: A 養殖場分離ウイルス (2003年), 6: B 養殖場分離ウイルス (2003年), 7: OMV 標準株 (00-7812)

表1 ヤマメ卵巣液からの OMV の検出

養殖場	年	平均体重 (g)	検査尾数	検出尾数(検出率%)	
				分離培養法	PCR 法
A	2000	396	25	8 (32)	NT
	2001	452	26	0 (0)	2 (8)
	2002	310	20	1 (5)	4 (20)
	2003	230	20	2 (10)	2 (10)
B	2000	209	25	12 (48)	NT
	2001	244	25	4 (16)	0 (0)
	2002	163	20	0 (0)	1 (5)
	2003	173	9	2 (22)	1 (11)

NT: not tested

予備的に口部の腫瘍、腎臓、脾臓および脳からウイルスの分離を RTG-2 細胞によって試みたが、分離が困難であったため、分離には全て卵巣液を用いた。卵巣液からは培養10日から14日程度で、多核巨細胞の形成を特徴とする細胞変性効果 (CPE) を示すウイルスが分離された。卵巣液から分離されたウイルスや、腫瘍から抽出した核酸を用いて行った PCR の結果を図2に示した。何れの試料からも OMV 標準株 (00-7812) と同様の439 bp の PCR 産物が増幅された。OMV による CPE の特徴である多核巨細胞が観察され、分離されたウイルスや腫瘍から OMV 遺伝子が検出されたことから、ヤマメの腫瘍の原因は OMV によるものと判断された。広島県内で OMV は未確認であり、本報が OMV が確認された初めての事例となる。

卵巣液からのウイルス分離および PCR 法による OMV 検出結果を表1に示した。A および B 養殖場ともに毎年卵巣液から OMV が検出された。口部腫瘍が観察されない個体からもウイルスが分離される例も多くあった。

口部腫瘍が観察される個体の腫瘍、腎臓および脳からの PCR 法による OMV 検出結果を表2に示した。2003年の B 養殖場で採取したヤマメには腫瘍が確認されなかったため、卵巣液、腎臓および脳からの OMV 検出

表2 ヤマメ組織からの PCR 法による OMV の検出

養殖場	年	検査尾数	検出尾数		
			腫瘍	腎臓	脳
A	2001	2	2	1	1
	2002	7	7	0	5
	2003	9	8	0	2
B	2001	6	6	1	3
	2002	8	8	0	2
	2003	9	NT	0	0

NT: not tested (何れの魚にも腫瘍は確認されなかった)

を行ったところ、卵巣液からのみ検出された。PCR 法によって部位毎の OMV 検出率を比較したところ、腫瘍からは高い割合で検出された。腫瘍に次いで脳から検出される例も多かったが、腎臓から検出されることは少なかった。通常の魚病検査においてウイルス分離を行う器官として腎臓を用いることが多いが、OMV に関しては検査部位に注意が必要だと考えられた。また、脳からの高い検出率は、OMV 感染ニジマスにおいて脳から最も高い割合 (90%) で検出された報告⁹⁾と一致している。

分離したウイルスの病原性試験

ニジマス成魚の OMV による大量死が長野県を中心とする本州中部で問題となっている⁷⁾ため、今回分離された OMV のニジマス成魚に対する病原性を検討した。ウイルス接種区のニジマスは10尾供試したうち1尾が接種8日後に死亡したものの、それ以後38日間死亡は見られなかった。死亡したニジマスの腎臓、脾臓および脳からは OMV が再分離され、組織 1g 当たりのウイルス力価は腎臓および脾臓で $10^{3.8}$ TCID₅₀、脳で $10^{2.8}$ TCID₅₀となった。一方、生残した全てのニジマスの臓器から OMV は再分離されなかった。また、対照区のニジマスに死亡は見られなかった。OMV によるニジマス病死魚のウイルス力価は腎臓で $10^{4.9-8.4}$ 、脾臓で $10^{5.4-8.4}$ および脳で $10^{5.8-7.7}$ TCID₅₀/g と報告されている⁷⁾が、今回の感染実験により死亡したニジマス臓器のウイルス力価はこれらの結果よりも約 $1/10^5$ から $1/10$ 程度低かった。感染試験の死亡状況や死亡したニジマスのウイルス力価から、今回分離された OMV のニジマス成魚に対する病原性は低いと考えられた。このことから、現在本州中部で問題となっている OMV と今回の OMV の直接的な関連性はないと考えられた。また、木村ら³⁾は OMV のヤマメ稚魚に対する強い病原性があることを実験的に示しているが、今回調査した養殖場は OMV に汚染されていると考えられるものの、OMV によるヤマメ稚

魚の大量死は確認されていない。このことから、今回分離された OMV はヤマメ稚魚に対しての病原性も低いと推定された。

感染源の推定およびポピドンヨード剤による防疫

感染源を推定するために、OMV が検出された二カ所の養殖場で調査を行ったが、二カ所の養殖場間で魚の移動は確認されず、また県外からの種苗や発眼卵の移動も確認されなかった。親魚に感染が認められたことから、調査の2年前（今回感染の確認された親魚の孵化時期）に感染していた可能性もあり、感染源を推定するのは困難であった。

このような OMV の防疫対策として、OMV の垂直感染の防除効果が明らかになっているポピドンヨード剤¹⁰⁾による発眼卵消毒を行った。A および B 養殖場で生産された OMV 汚染の確認された発眼卵をポピドンヨード剤によって消毒した後、水産試験場で孵化させ飼育したところ、ヤマメから OMV は検出されず、口部腫瘍を生じる個体も確認されなかった。このことから、ポピドンヨード剤による発眼卵消毒の有効性が再確認された。一方、A および B 養殖場においても同様の発眼卵消毒を2000年から2003年まで毎年全ての発眼卵に対して行った。親魚の生産サイクルを考慮して2～3年間、発眼卵消毒を繰り返すことで養殖場のヤマメを OMV フリーにする計画であったが、発生当初の2000年と比較すると卵巣液からの OMV 検出率は低下しているものの、依然として OMV は検出され、また口部の腫瘍も確認されている。この原因として、異なった年齢のヤマメが同じ養殖場内の隣接する池で飼育されており、また養殖場内で飼育用水の再利用も見られることから、OMV に感染している異なった年齢のヤマメからの水平感染が疑われた。このことから、養殖場内で OMV 感染症を確実に撲滅させるためには、垂直感染を防ぐための発眼卵消毒を行うとともに、水平感染を防ぐために年齢の異なる魚を確実に分離して飼育する必要があると考えられる。

謝 辞

ヤマメの採取等に協力して頂いた柳川建専門員（県庁水産振興室）および広瀬久己主任技術員（水産試験場）、

OMV の検出法を指導して頂いた西澤豊彦助教授（北海道大学大学院）に感謝の意を表する。

引用文献

- 1) Sano, T. (1976) : Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **10**, 221–226.
- 2) Kimura, T., M. Yoshimizu, M. Tanaka and H. Sannohe (1981) : Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* – I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, **15**, 143–147.
- 3) 木村 喬久・吉水 守・田中 真 (1983) : サケ科魚類の稚仔魚期における OMV 感受性魚令と魚種間による相違. 魚病研究, **17**, 251–258.
- 4) Kimura, T., M. Yoshimizu and M. Tanaka (1981) : Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* – II. Oncogenic nature. *Fish Pathol.*, **15**, 149–153.
- 5) 吉水 守 (2000) : 本邦の在来疾病と輸入疾病ならびに未侵入疾病. 生物と海洋, **126**, 18–27.
- 6) Kumagai, A., K. Takahashi and H. Fukuda (1994) : Epizootic caused by Salmonid Herpesvirus Type 2 infection in maricultured coho salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 127–134.
- 7) 降幡 充・細江 昭・武居 薫・小原昌和・中村 淳・本西 晃・吉水 守 (2003) : ニジマスにおけるヘルペスウイルス病の発生. 魚病研究, **38**, 23–25.
- 8) Aso, Y., J. Wani, D. A. S. Klenner and M. Yoshimizu (2001) : Detection and identification of *Oncorhynchus masou virus* (OMV) by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.*, **52**, 111–116.
- 9) 吉水 守・本西 晃・降幡 充 (2002) : サケ科魚類の OIE 指定伝染病 OMVD の撲滅に向けた研究. 平成13年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 日本水産資源保護協会, 101–108.
- 10) 日本水産資源保護協会 (1995) : サケ科魚類のヘルペスウイルス病. 最近問題となっている魚病 (サケ科魚類およびアユ), 魚類防疫技術書シリーズ XIII, 51–67.