

IV イリドウィルス様感染症に関する研究-II

小 川 健

目 的

マダイ0年魚イリドウィルス様感染症対症療法剤の探索を行い、効果的な投与方法を確立することを目的とする。本年度は前年度に引続いて人工感染方法の検討を行い、その上で栄養剤等投与によるマダイ0年魚における斃死率の低減効果を明らかにする。

1. 人工感染方法の検討

前年度の供試魚より小さい養殖用種苗サイズのマダイ稚魚を用いて、病死魚の腎臓、脾臓から作成したウィルス液によって感染試験を行う。

1) 感染試験 1

材 料 お よ び 方 法

供試ウィルス液：作成方法は図1のとおりで、表1に示した本年度供試ウィルス液のうち、A、B液を用いた。

試験区および内容：表2に示す。

感染状況の検討：35尾区からウィルス液接種後隔日に5尾ずつサンプリングし脾臓のスタンプ標本における異形肥大細胞の出現状況を調べ、区ごとの斃死率と併せて検討した。

異形肥大細胞は、赤血球の数倍以上の大きさで、かつギムザ染色で青ないし青紫色に濃染され、明らかにそれと判る細胞のみに限り、多少とも判断に迷う細胞は全て除外した。

結 果 お よ び 考 察

試験結果を表3、4に示した。IV区で1尾斃死があったが、斃死魚は脾臓中の異形肥大細胞が確認されず、イリドウィルス感染症による斃死とは断定で

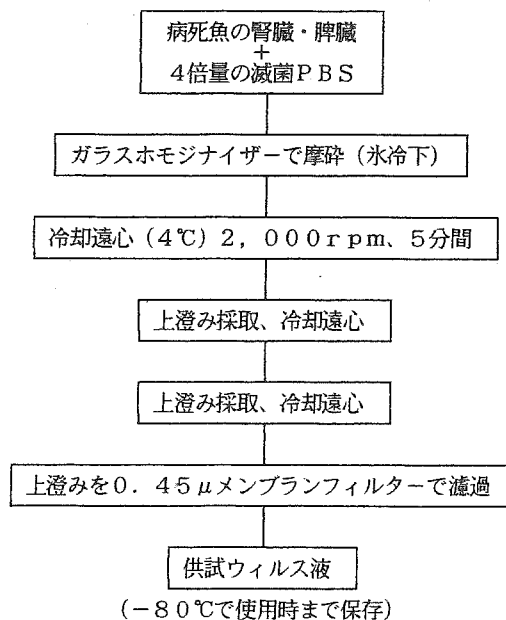


図1 供試ウィルス液作成方法

表1 供試ウィルス液の由来

ウィルス液	作成年月日	作成材料
A	92.10.11	1992.8.20~10.4の病死マダイ0年魚の腎臓、脾臓。作成後-80℃で保存
B	93.8.12	1992.10.4の病死マダイ0年魚-80℃凍結保存サンプルの腎臓、脾臓
C	93.9.26	1993.9.13~9.20の病死マダイ0年魚-20℃凍結保存サンプルの腎臓、脾臓
D	93.10.12	1993.9.18~10.8の病死マダイ0年魚-20℃凍結保存サンプルの腎臓、脾臓
E	93.11.5	1993.10.20~11.2の病死マダイ1年魚-20℃凍結保存サンプルの腎臓、脾臓

表2 感染試験1の内容

区	供試尾数	感染方法	内容	備考
I-1	20	対照	腹腔内接種 滅菌PBS 0.05 ml/尾	斃死率観察
-2	35	"	"	異形肥大細胞観察
II-1	20	接種法	腹腔内 10 ⁻² 濃度B液 0.05 ml/尾	"
-2	35	"	"	"
III-1	20	"	腹腔内 10 ⁻¹ 濃度B液 0.05 ml/尾	"
-2	35	"	"	"
IV-1	20	"	腹腔内 B原液 0.05 ml/尾	"
-2	35	"	"	"
V-1	20	浸漬法	10 ⁻³ 濃度B液に10分間浸漬	"
-2	35	"	"	"
VI-1	20	接種法	腹腔内 A原液 0.05 ml/尾	斃死率観察

供試魚: FL=8.9cm, BW=17.4g 試験期間: 1993.8.14~8.27

表3 感染試験1における斃死状況

区	経過日数														斃死率 (%)	IV症斃死率 (%)	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
I-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV-1	0	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	5	0
V-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VI-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* : 細菌、寄生虫、異形肥大細胞いずれも (-)
飼育水温 : 27.8~27.0℃、平均水温 : 27.5℃

表4 感染試験1の異形肥大細胞出現状況

区	経過日数										計	肥大細胞出現率 (%)
	2	3	4	6	8	10	12	14日				
I-2	0/5		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/35	0
II-2	0/5	(0/1)*	0/5	0/5	0/5	(0/1)*	0/5	0/5	0/3	0/35	0	0
III-2	0/5		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/35	0	0
IV-2	0/5		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/35	0	0
V-2	0/5		0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/35	0	0

* : () は斃死魚 飼育水温 : 27.8~27.0℃、平均水温 : 27.5℃

きなかった。したがって本症による斃死率は各区とも0%で、また各35尾区における異形肥大細胞も全く観察されず出現率は0%であった。

ウイルス液Aは前年度の試験で平均体重63.6gのマダイ稚魚を発症させたが、本年度は平均体重17.4gの稚魚で、しかも本症が発生し易いといわれる高水温時に攻撃したにもかかわらず感染が認められなかったことから、凍結保存中のウィルス力価の低下が疑われた。

2) 感染試験2

前試験で全く感染がみられなかったため、より小型の種苗を用いて、またウイルス液も新たに本年度病死魚の腎、脾臓から作成し、感染試験を実施した。

材料および方法

試験区および内容：表5に示すとおりで、攻撃後14日間飼育して斃死状況を観察した。

結果および考察

ウイルス液接種後の各区の斃死状況を表6に示した。イリドウィルス感染症による斃死は10日から出現し始め、C液の 10^{-1} 濃度区および原液区で100%、 10^{-3} 濃度液浸漬区で60%の斃死率となった。しかしB液接種区では試験期間中斃死は全くみられなかった。試験終了後各区の生残魚の脾臓における異形肥大細胞の出現状況を調べたところ、対照区の9尾には全くなく、IV区の4尾中3尾、V区の10尾中1尾に観察された。

表5 感染試験2の内容

区	供試尾数	平均体重 (g)	感染方法	内 容
I	10	5.9	対 照	腹腔内接種：滅菌PBS0.05ml/尾
II	10	5.9	接種法	腹腔内： 10^{-1} 濃度C液0.05ml/尾
III	10	5.9	〃	腹腔内：C原液0.05ml/尾
IV	10	5.9	浸漬法	10^{-3} 濃度C液に10分間浸漬
V	10	5.9	接種法	腹腔内：B原液0.05ml/尾

供試魚：FL=6.7cm

試験期間：1993.9.27~10.10

表6 感染試験2における斃死状況

区	経過日数														計	斃死率 (%)	IV症斃死率 (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14 (日)			
I	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	10	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	2	2	10	100	100
III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	2	10	100	100
IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	2	6	60	60
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*：異形肥大細胞なし

飼育水温：24.9~23.2℃、平均水温：24.1℃

これらの結果から、 -80°C で約10ヶ月間凍結保存した病死魚の腎臓・脾臓から作成したB液は、本年度の病死魚から作成したC液に比較してウィルス力価が低かったといえる。

3) 感染試験3

本年度斃死魚から作成したウィルス液による攻撃での感染状況を見るため、小型稚魚および対症療法に関する試験の供試魚と同程度と推定される大きさの稚魚を用いて感染試験2と平行して行った。

材料および方法

試験区および内容：表7に示すとおり。

感染状況の検討：ウィルス液接種後隔日に各区3尾ずつ取上げ、脾臓のスタンプ標本の異形肥大細胞の出現状況と斃死の状況により検討した。

表7 感染試験3の内容

区	供試尾数	平均体重 (g)	感染方法	内 容
I	21	38.6	対 照	腹腔内接種：滅菌PBS 0.1 ml/尾
II	21	38.6	接種法	腹腔内：C原液 0.1 ml/尾
III	21	38.6	〃	腹腔内：C原液 0.2 ml/尾
IV	21	38.6	浸漬法	10^{-3} 濃度C液に10分間浸漬
V	21	38.6	接種法	腹腔内：B原液 0.2 ml/尾
VI	21	5.9	〃	腹腔内：C原液 0.05 ml/尾

供試魚：FL=11.8、6.7cm

試験期間：1993.9.27~10.10

結果および考察

異形肥大細胞の出現状況を表8に示した。II区（C原液 0.1 ml 接種）で2日目から、III区（C原液 0.2 ml 接種）およびIV区（ 10^{-3} C液浸漬）で3日目から、V区（B原液 0.2 ml 接種）およびVI区（小型稚魚C原液 0.05 ml 接種）で6日目から観察され始め、最終的には対照区0%、II区38.1%、III区47.6%、IV区28.6%、V区19.1%およびVI区71.4%となった。

斃死魚は大型稚魚のII、III区で1尾ずつあったが、いずれも異形肥大細胞はみられなかった。しかしVI区の小型稚魚の5尾の斃死魚からは全て異形肥大細胞が確認された。また、V区のB原液接種で

表8 感染試験3における異形肥大細胞出現状況

区	経過日数(日)											計	肥大細胞出現率(%)
	2	3	4	6	7	8	9	10	11	12	14		
I	0/3		0/3	0/3	0/3		0/3			0/3	0/3	0/21	0
II	1/3		0/3(0/1)*	0/3	2/3		3/3			1/3(1/1)	0/1	8/21	38.1
III	0/3	(0/1)	1/3	2/3	2/3		2/3			2/3(1/1)	0/1	10/21	47.6
IV	0/3		1/3	0/3	1/3		3/3			0/3(1/1)	0/2	6/21	28.6
V	0/3		0/3	1/3	0/3		0/3			3/3	0/3	4/21	19.0
VI	0/3		0/3	2/3	(1/1)	3/3	(1/1)	3/3(2/2)	(1/1)	1/1		15/21	71.4

* : () は斃死魚

飼育水温：24.9~23.2 $^{\circ}\text{C}$ 、平均水温：24.1 $^{\circ}\text{C}$

19.1%の出現率が得られたことについては、本症の感染の成立には攻撃用ウィルス液力価の高低と共に供試魚の健康状態等の魚体側の要因も大きな影響を及ぼすことを示唆するものであろう。

感染率および斃死の状況から、本ウィルスに対する感受性は、 $\overline{BW} = 38.6g$ の稚魚よりも $\overline{BW} = 5.9g$ の小型稚魚の方が高いことが明らかで、人工感染試験としては、小型の供試魚を用い、新鮮な病死魚から作成したウィルス液で攻撃することで、適当な斃死率が得られるものと思われた。

2. 対症療法の検討

マダイ0年魚に栄養剤等を連続投与した後、これまでに検討してきた感染方法を用いて攻撃を行い、以後も栄養剤等の投与を継続し、斃死率の低減効果を調べる。

材料および方法

栄養剤等の投与飼育方法：表9に示すとおり。攻撃試験に際しては必要尾数だけ海面飼育小割から取上げて陸上水槽に移し、供試した。

試験区および内容：攻撃試験は二度行い、それぞれの区および内容を表10、11に示した。

攻撃試験1における異形肥大細胞の観察はウィルス液接種後隔日に3尾ずつ取上げて出現状況を調べた。

攻撃試験2ではウィルス液接種後約25°Cに加温飼育を行い、斃死状況を観察した。

表9 栄養剤等投与飼育方法

区	飼育尾数	飼育小割	栄養剤	投与量
I	150	海面1.5m角	対照	-
II	〃	〃	パンカルG散	2.2g (kg·BW/day)
III	〃	〃	Cオイル 100-リケン	2 ml (〃)
IV	〃	〃	ハマチエードSA	飼料の10%
V	〃	〃	ユベラフィードオイル	2 ml (〃)

供試魚：FL=8.8cm, BW=15.5g 給餌：EP飼料を1日1回飽食量
試験期間：1993.9.3～

表10 攻撃試験1の内容

区	供試尾数	平均体重(g)	感染方法	備考
I-1	10	36.8	腹腔内接種：C、D混合原液 0.4 ml/尾	斃死率観察 異形肥大細胞観察
I-2	21	〃	〃	
II-1	10	42.3	〃	同上
II-2	21	〃	〃	
III-1	10	42.3	〃	〃
III-2	21	〃	〃	
IV-1	10	46.5	〃	〃
IV-2	21	〃	〃	
V-1	10	41.3	〃	〃
V-2	21	〃	〃	

試験期間：1993.10.16～10.29

ビタミン製剤等投与期間：43日間

表11 攻撃試験 2 の内容

区	供試尾数	平均体重(g)	感染方法	備考
I	7	44.0	腹腔内接種：E原液 0.4 ml/尾	攻撃後加温飼育 斃死率観察
II	7	51.7	〃	〃
III	7	49.0	〃	〃
IV	7	50.9	〃	〃
V	7	45.3	〃	〃

試験期間：1993.11.6~11.19 ビタミン製剤等投与期間：63日間

結果および考察

攻撃試験 1 の結果を表 12, 13 に示した。斃死については III 区 (ビタミン C 剤) で 1 尾であったが、脾臓の異形肥大細胞が見られず斃死原因は明確ではなかったため、イリドウィルス感染症による斃死率は全区とも 0% であった。

表12 攻撃試験 1 における斃死状況

区	経過日数 (日)														斃死率 (%)	IV 症斃死率 (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
I-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III-1	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	0
IV-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* : 異形肥大細胞なし 攻撃後飼育水温：23.7~21.0℃、平均水温：22.3℃

表13 攻撃試験 1 の異形肥大細胞出現状況

区	経過日数 (日)										計	肥大細胞出現率 (%)
	2	3	4	6	8	10	12	14	計			
I-2	0/3		0/3	0/3	0/3	3/3	1/3	1/3	5/21	23.8		
II-2	1/3	(0/1)*	0/3	0/3	1/3	3/3	2/3	1/2	8/21	38.1		
III-2	0/3		0/3 (0/1)	0/3	3/3	3/3	2/3	1/2	9/21	42.9		
IV-2	0/3		0/3	0/3	0/3	2/3	1/3	1/3	4/21	19.0		
V-2	0/3		0/3	0/3	2/3	1/3	2/3	1/3	6/21	28.6		

* : () は斃死魚 攻撃後飼育水温：23.7~21.0℃、平均水温：22.3℃

異形肥大細胞は、II 区 (パントテン酸カルシウム) で 2 日目、III 区および V 区 (ビタミン E 製剤) で 8 日目、I 区 (対照) および IV 区 (総合ビタミン剤) で 10 日目から出現し始め、出現率は I 区 23.8%、II 区 38.1%、III 区 42.9%、IV 区 19.0% および V 区 28.6% となった。このように出現率は、対照区の 23.8% に対し総合ビタミン区が 19.0% と僅かに低い値となったが、その他の区は

ずれも対照区より高く、供試したビタミン製剤等の感染・発病抑制効果は明らかではなかった。

異形肥大細胞の出現率が各区共ある程度の%を示しているにもかかわらず、斃死が全く見られなかった原因の一つとして水温の低下が考えられた。このため攻撃試験2を実施したが、結果は表14に示すとおり、IV区で10%のイリドウィルス感染症による斃死率がみられたにすぎず、また各区の生残魚についてもII区の2尾から異形肥大細胞が観察されただけで、斃死率の低減効果の検討はできなかった。

表14 攻撃試験2における斃死状況

区	経過日数(日)														計	斃死率 (%)	IV症斃 死率(%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
I	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	1	10
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

* : 異形肥大細胞 (+)

飼育水温 : 26.2~22.0℃、平均水温 : 25.1℃

本試験では飼育にEP(発泡成型)飼料を用いたことにより、ビタミンの添加量が制限されたため、大量投与方法を検討したうえで再試験の必要があろう。

また、本研究の一連の実験において、感染率、斃死率に大きな変動があり、その原因として攻撃に用いたウィルス液力価の違いが考えられた。したがって今後の感染試験にあたっては、安定した病原性を持つ攻撃用ウィルス液の量的な確保が問題と思われる。

調査結果搭載印刷物

平成5年度魚病対策技術開発研究成果報告書 平成6年9月(予定) (社)日本水産資源保護協会