

プロフィールリスト

1. 病名		Viral haemorrhagic septicaemia (VHS)
2. 病原体		VHSV
	a) 分類	ラブドウイルス科 ノビラドウイルス属 種名: VHSV、シノニム エグドベット ウイルス
	b) 形態	砲弾型、直径約70 nm、長さ約180 nm、エンペローブあり
	c) 特徴	RNAウイルス (ssRNA) RNAの大きさ: 11,000 bp 6種のウイルスタンパク質: 分子量 約20~160 Kda
3. 地理的分布		北半球にのみ分布 ・ヨーロッパ大陸(主にI及びIa遺伝子型) ・北海、バルチック海等の北東大西洋(主にIb、II、III及びIVd遺伝子型) ・ボスニア湾沿岸(Ic遺伝子型) ・黒海沿岸(Ie遺伝子型) ・北米及び日本・韓国近海の北太平洋(IVa遺伝子型) ・カナダ沿岸の北西大西洋(IVb及びIVc遺伝子型) ・北米五大湖(IVb遺伝子型)
4. 宿主		宿主域は遺伝子型によって異なることが知られており、基本的には以下のように大別されるが、ウイルス株によって例外があることも報告されている(例えばIb型やIII型でもニジマスに高病原性を示す株が存在する。) Ia, Ic型: ニジマス等のマス類 Ib, II型: 天然海産魚(北海、バルト海) Ie型: 黒海周辺域の海産魚 III型: 天然海産魚(北海) IVa型: 養殖ヒラメ及び天然海産魚(北太平洋) IVb型: 天然淡水魚(北米五大湖) IVc型: 天然汽水魚(カナダ大西洋沿岸) IVd型: 養殖ランプフィッシュ(アイルランド) 代表的な魚種及び近年明らかとなったものを下記に示す。 ・ニジマス (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) ・ブラウントラウト (<i>Salmo trutta</i>) ・ブルーギル (<i>Lepomis macrochirus</i>) ・パイク (<i>Esox lucius</i>) ・タイセイヨウタラ (<i>Gadus morhua</i>) ・タイヘイヨウニンシ (<i>Clupea pallasii</i>) ・ヒラメ (<i>Paralichthys olivaceus</i>) ・メダカ (<i>Oryzias latipes</i>) (Ito & Olesen, 2013) ・カジカ (<i>Cottus pollux</i>) (Ito & Olesen, 2013) ・ランプフィッシュ (<i>Cyclopterus lumpus</i>) (Guðmundsdóttir, 2019) その他50種以上の魚類(別紙1、別紙2)
5. 発生情報		
	a) 潜伏期間	感染から発症・死亡までの期間は、遺伝子型や魚種またはそのサイズによって異なるが、一般的に浸漬感染試験の結果から通常5~10日後には発症する場合が多い。しかし、20日間を過ぎてから死亡が始まる魚種も存在する。(Ito & Olesen, 2013)
	b) キャリアー	生残魚の一部はキャリアーになる。
	c) 感染経路	・水平感染(経水) ・感染魚の尿及び生殖腺液 ・経口感染(組み換えウイルスを用いての試験結果)
	d) ベクター	・多くの感受性魚種 ・肉食性の鳥類 ・北米五大湖ではヒルと底生端脚類からVHSウイルスが分離されているが、これらが魚類に対する感染源となるかは不明。人為的にVHSウイルスに暴露しVHSウイルスを含むミジンコをニジマスに与えてもVHSを発症しない報告がある(Ito & Olesen, 2017)
	e) 蔓延状況(死亡率、罹患率など)	・死亡率と罹病率は遺伝子型や宿主の生理的状況やサイズ及び飼育環境により様々である。 ・9-12°Cでの死亡率が高い。 ・遺伝子型Ia感染のニジマスでの累積死亡率は、最大5-90 % ・遺伝子型IVa感染のニンシでの累積死亡率は、最大100 % ・遺伝子型IVa感染のヒラメでの累積死亡率は、最大100 % (感染試験)
	f) 感染ステージ	・ニジマスでは稚仔魚期で高い死亡率 ・系統で感受性に相違がある。
	g) 感染要因	・感染は水温1-15°Cの時に容易に起こる。 ・水温変動時(4-14°C)に発症するケースが多い。 ・VHSは淡水及び海水で発症
6. 症状		
	a) 臨床症状	・体色黒化 ・眼球突出 ・腹部膨満 ・貧血 ・骨格筋の点状出血 ・鰭基部の出血 ・異常遊泳
	b) 組織検査	・腎臓、肝臓及び脾臓の広範囲な壊死と空胞化、核濃縮、核融解、リンパ球浸潤 ・骨格筋においては、赤血球の筋束および筋線維中のうっ滞

7. 検査法	
a) 標的器官	<ul style="list-style-type: none"> ・疾病の盛期では皮膚と筋肉を含むすべての組織 ・標的器官は腎臓、脾臓及び心臓 ・慢性状態では、ウイルス力価が脳で高くなる場合がある
b) 簡易検査法	<ul style="list-style-type: none"> ・臓器スタンプ標本を用いた間接蛍光抗体法 ・RT-PCR法(通常のRT-PCR法ではウイルス分離に比べ検出感度が低い場合がある。)(Ito & Olesen, 2013) ・ウイルス分離に続く、特異抗体 (MAb IP5B11を推奨)を用いたIFATやELISAによる検査。(近年、モノクローナル抗体によるVHSウイルス遺伝子型の簡易識別手法が報告されている。)(Ito et al., 2013)
c) サーベラン	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞培養によるウイルス分離に続く、抗体を用いたIFATやELISAによる同定
d) 確定診断	<ul style="list-style-type: none"> ・ウイルス分離に続く、特異抗体 (MAb IP5B11を推奨)を用いたIFATやELISAによる同定。 ・RT-PCR後の増副産物のシーケンス。 ・リアルタイムRT-PCR。
(参考)ウイルス分離	
培養細胞/分離培地	<ul style="list-style-type: none"> ・BF-2細胞を推奨するが、EPC及びFHM細胞も使用される。 ・一般的に遺伝子型I、II及びIIIに対しEPC細胞の感受性はBF-2細胞に劣る。 ・しかし、遺伝子型IVに対しEPC細胞は高い感受性を示す。
培養条件	<ul style="list-style-type: none"> ・15°Cで7-10日間培養し、週に3回以上は細胞変性(CPE)を観察する。 ・CPEが観察されない場合には、盲継代を行う。
CPE/コロニー性状	<ul style="list-style-type: none"> ・用いる株化細胞により若干こととなるが、ラフドウイルス特有のドワ房状の細胞の球形化と剥離を特徴とする。
(参考)RT-PCR	
RNA抽出法	<ul style="list-style-type: none"> ・試薬メーカーの指示に従い、フェノール-クロロホルム方法を用いるか、RNAアフィニティカラムを用いて抽出する。RNAは、RNAseフリーの蒸留水に懸濁させる。
プライマー、産物サイズ	<ol style="list-style-type: none"> 1. RT-PCR (OIEマニュアル) VN Forward: 5'-ATG-GAA-GGA-GGA-ATT-CGTGAA-GCG-3' VN reverse: 5'-GCG-GTG-AAG-TGC-TGC-AGT-TCC-C-3' 増副産物 OIEマニュアルには1-505 bpと記載されているが、512 bpの誤りと考えられる(H22水産防疫委託事業報告書)。遺伝子型IVaについては他の遺伝子型に比べ反応が弱くなる(H22水産防疫委託事業報告書)。 2. RT-PCR (2006 OIEマニュアル及び特定疾病マニュアル) Forward: 5'-GGG-GAC-CCC-AGA-CTG-T-3' Reverse: 5'-TCT-CTG-TCA-CCT-TGA-TCC-3' 増副産物 810 bp
プロトコル	<ol style="list-style-type: none"> 1. RT-PCR(2014 OIEマニュアル) 50°C 30分間、95°C 15分間 x1 94°C 30秒、55°C 30秒、68°C 60秒 (x35サイクル) 68°C 7分間 2. RT-PCR (2006 OIEマニュアル及び特定疾病マニュアル) 50°C 30分間、94°C 2分間 94°C 30秒、52°C 30秒、68°C 60秒 (x35サイクル) 68°C 7分間
(参考)リアルタイムRT-PCR	
RNA抽出法	<ul style="list-style-type: none"> ・試薬メーカーの指示に従い、フェノール-クロロホルム方法を用いるか、RNAアフィニティカラムを用いて抽出する。RNAは、RNAseフリーの蒸留水に懸濁させる。
プライマー、産物サイズ	<ol style="list-style-type: none"> 1. リアルタイム RT-PCR (Jounstrup et al., 2013) Forward: 5'-AAA-CTC-GCA-GGA-TGT-GTG-CGT-CC-3' Reverse: 5'-TCT-GCG-ATC-TCA-GTC-AGG-ATG-AA-3' プローブ: 5'-FAM-TAG-AGG-GCC-TTG-GTGATC-TTC-TG-BHQ1 2. リアルタイム RT-PCR (Garver et al., 2011) Forward: 5'-ATG-AGG-CAG-GTG-TCG-GAG-G-3' Reverse: 5'-TGTAGT-AGG-ACT-CTC-CCA-GCA-TCC-3' プローブ: 5'-FAM-TAC-GCC-ATC-ATGATG-AGT-MGBNFQ-3'
プロトコル	<ul style="list-style-type: none"> リアルタイム RT-PCR (Jounstrup et al., 2012) 50°C 30分間、95°C 15分間 x1 94°C 15秒、60°C 40秒、72°C 20秒 (x40サイクル) 68°C 7分間 使用する機器やキット、またはその組み合わせにより検出感度が左右されるので、条件の最適化を行う必要がある。
8. 対策	
a) 殺菌・滅菌方法	<ul style="list-style-type: none"> ・1-プロパノール 30%、30秒 ・エタノール 40%、120秒 ・次亜塩素酸ナトリウム 100 ppm、15分 (栗田ら、2002)
b) ワクチン	<ul style="list-style-type: none"> ・不活化ワクチン、弱毒生ワクチン、リコンビナントワクチン及びDNAワクチン等が研究されているが、いずれも実用には至っていない。

9. 発生事例	<ul style="list-style-type: none"> ・1950年頃からヨーロッパ大陸におけるニジマス養殖場 ・1989年にアメリカのマスノスケ、ギンザケ、スチールヘッドから分離 ・1990年代にカナダ沿岸の北東大西洋における天然魚 ・北米の北太平洋沿岸における天然魚 ・1990年代後半以降に日本及び韓国におけるヒラメ養殖場 ・2006年北米五大湖での天然魚 ・2012年スコットランドでの種苗生産場のベラで死亡発生(Munro et al., 2015) ・2015年アイスランドの陸上飼育施設のランプフィッシュで死亡発生(Guðmundsdóttir et al., 2019)
10. その他	-

出典

- Guðmundsdóttir (2019) Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in Iceland caused by VHS virus genotype IV. *Journal of Fish Diseases*, 42, 47–62.
- Ito & Olesen (2017) Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) remains viable for several days but at low levels in the water flea *Moina macrocopa*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 127, 11–18.
- Ito & Olesen (2013) Susceptibility of various fresh water fish species in Japan to an isolate of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVb. *Diseases of Aquatic Organisms*, 107, 1–8.
- Ito et al., (2010) Development of a monoclonal antibody against viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) genotype IVa. *Disease of Aquatic Organisms*, 89, 17–27.
- Ito et al., (2012) Typing of viral haemorrhagic septicaemia virus by monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*, 93, 2546–2557.
- Jounstrup et al., (2013) Development and validation of a novel Taqman based real time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of Fish Diseases* 2013, 36, 9–23.
- Garver et al., (2011) Development and validation of a reverse transcription quantitative PCR for universal detection of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Disease of Aquatic Organisms*, 95, 97–112.
- Munro et al., (2015) A mortality event in wrasse species (*Labridae*) associated with the presence of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Journal of Fish Diseases*, 38, 335–341.
- 栗田ら (2002) ヒラメVHSウイルスに対する各種市販消毒剤の殺ウイルス効果, *魚病研究*, 37, 175–181.