

# ヒラメラブドウイルス (*Rhabdovirus olivaceus*) の 感染症に関する研究

大 迫 典 久

## Pathology for hirame rhabdovirus (*Rhabdovirus olivaceus*)

Norihisa OSEKO

Hirame rhabdovirus (HRV, *Rhabdovirus olivaceus*) was recently discovered from moribund hirame (*Paralichthys olivaceus*) and has been found widely in the Japanese hirame culture farms and it also is thought to have pathogenicity to salmonid fish. To establish the prevention technique of the disease by HRV in salmonid fish, histopathological observations for the salmonids and hirame and examination of HRV pathogenicity in salmonids were made.

Diseased fish showed hemorrhage in muscle, congestion of gonad and accumulation of ascitic fluid in hirame. Histopathological observation showed necrosis and hemorrhage in kidney and spleen. Hyperemia and hemorrhage were observed in the tissue of somatic muscle, alimentary tract, testis and ovary.

Pathogenicity of the HRV was shown in rainbow trout: *Oncorhynchus mykiss* and masu salmon; *O.masou* in salmonid fish (rainbow trout, masu salmon, chum salmon; *O.keta*, coho salmon; *O.kisutch*, and pink salmon; *O.gorbuscha*) by artificial infection.

Club-like or cord-like structures were easily recognized on the cell surface of HRV infected rainbow trout gonad cells (RTG-2) by electromicroscopical observations. Most of them contained many viral particles on the surface. These morphological characters were of HRV.

On the artificial infection of HRV to hirame, any symptoms of the disease was not observed at water temperature higher than 15 °C in the range examined between 5 and 20 °C. This indicated that regulation of breeding water temperature was effective for prevention of HRV infection. The ultraviolet irradiation of  $6.0\sim 7.8\times 10^3\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$  and disinfectants (500ppm of saponated cresol, 200ppm of benzalkonium chloride, 100ppm of iodine and 50ppm of sodium hypochlorite) were effective to inactivate HRV.

**Key word:** *Rhabdovirus olivaceus* (hirame rhabdovirus; HRV), hirame (*Paralichthys olivaceus*), histopathology, pathogenicity, prevention.

## 目 次

緒 言	130
第 I 章 ヒラメにおける HRV 感染症の発生状況および病理組織学的特徴	132
第 1 節 HRV 感染症の発生過程および被害状況	132

第2節 HRV 自然発病ヒラメの病理組織像	138
第II章 HRV のサケ科魚類に対する病原性およびその病理組織像	143
第1節 HRV のサケ科魚類に対する病原性	143
第2節 HRV のニジマスに対する病原性	147
第3節 HRV 人工感染ニジマスの病理組織像	157
第III章 In vitro および in vivo における HRV の感染細胞中での増殖像	161
第1節 In vitro における HRV の増殖像	162
第2節 In vivo における HRV の増殖像	168
第IV章 HRV の防除対策の検討	170
第1節 HRV 感染発症に及ぼす水温の影響	171
第2節 紫外線および各種消毒剤の HRV 不活化効果	179
総 括	186
要 約	191
謝 辞	193
参考文献	193

## 緒 言

近年、わが国の沿岸海域では天然資源の増大を目的とした増殖事業と、より高い生産性を追求した養殖事業が推し進められている。養殖事業では生産性の追求から養魚は限られた環境下に生活することを余儀なくされ、ひとたび細菌やウイルス等による感染症が発生すると、その高い伝播性により甚大な被害を被ることから、感染症防除対策は養殖業における大きな課題となっている。

1984年3月、兵庫県の淡路島で、翌年3月兵庫県水産試験場、北海道の焼尻島および香川県の女木島において、いずれも体表や鱗の充出血、腹部膨満、生殖腺のうっ血、筋肉内出血などを主徴とする養殖ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) の疾病が発生し、病魚の各臓器からニジマス生殖線由来細胞 (rainbow trout gonad cell: RTG-2 (以下同様); WOLF and QUIMBY 1969) に IHNV と類似の細胞変性効果 (cytopathic effect: CPE (以下同様)) を発現するウイルスが分離された。魚類の病原ウイルスに関しては、1962年に初めてサケ科魚類の伝染性膵臓壊死症ウイルス (infectious pancreatic necrosis virus: IPNV (以下同様); WOLF 1966) が発見されて以来、サケ科魚類の伝染性造血器壊死症ウイルス (infectious hematopoietic necrosis virus: IHNV (以下同様); AMEND *et al.*, 1969), ウィルス性出血性敗血症ウイルス (viral hemorrhagic septicemia virus: VHSV (以下同様); JENSEN 1963), サケ科魚類のヘルペスウイルス (*Herpesvirus salmonis*; WOLF and TAYLOR 1975; WOLF *et al.* 1975), 十和田湖のヒメマスから発見されたウイルス (nerkavirus in Towada Lake, Akita and Aomori: NeVTA; SANO 1976), サクラマスのウイルス (*Oncorhynchus masou virus*: OMV,

KIMURA *et al.* 1981), シロサケのウイルス (chum salmon virus: CSV; WINTON *et al.* 1981) 等が発見され, またウナギ (*Anguilla rostrata*, *A. anguilla*) からはアメリカウナギから分離されたウイルス (eel virus of America: EVA (以下同様); SANO 1976), ヨーロッパウナギから分離されたウイルス (eel virus of Europe unknown: EVEX (以下同様); SANO *et al.* 1977), 並びにウイルス性腎臓病原因ウイルス (eel virus of European eel: EVE; SANO *et al.* 1981a) 等が発見されている。以上の他, 主要な魚類病原ウイルスとしてはコイ (*Cyprinus carpio*) の春ウイルス病ウイルス (spring viremia of carp virus: SVCV; FIJAN *et al.* 1971) および鰓炎症ウイルス (swimbladder inflammation of carpivirus: SBIV; BACHMANN and AHNE 1974), パイク (*Esox lucius*) 稚魚のラプトウイルス病ウイルス (pike fry rhabdovirus: PFRV; BOOTSMAN 1971), アメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) のヘルペスウイルス病原因ウイルス (channel catfish virus: CCV; FIJAN 1968) 等が知られている。また我国の海産養殖魚介類の病原ウイルスとしては, クルマエビ (*Penaeus japonicus*) のバキュロウイルス性中腸腺壊死症 (SANO *et al.* 1981b), ブリ (*Seriola quinqueradiata*) のリンホシステイス症 (松里 1975) やウイルス性肝臓壊死症 (反町・原 1985), トラフグ (*Takifugu rubripes*) の口白症 (井上ら 1986), さらにシマアジの神経壊死症 (MORI *et al.* 1992), マダイ (*Pagrus major*) のイリドウイルス感染症 (井上ら 1992) の原因ウイルスが報告されている。養殖ヒラメから分離されたウイルスはこれらの魚類病原ウイルスとは異なり新しいウイルスと考えられ, 宿主の名にちなみ *Rhabdovirus olivaceus* と命名され (KIMURA *et al.* 1986), 一般にヒラメラプトウイルス, 略して HRV と称されている。

HRV はサケ科魚類病原ウイルスの IHNV や VHSV と類似している (西沢 口頭発表\*) ことから, サケ科魚類にも感染にする可能性が極めて大であると考えられ, サケ科魚類がわが国冷水域において水産上重要なことを鑑み, その感染・伝播の危険性が憂慮される。そこで本研究では HRV 感染症の発症過程, 発病機構を病理組織学的に究明し, かつ感染防除対策の基礎を確立することを目的として種々の検討を行なった。

まず第 I 章においてこのウイルス感染症の発生, 被害状況およびウイルス分離の経緯を述べ, 発病機構を明らかにする目的でヒラメを対象に病理組織学的な観察を行った。ついで第 II 章では我が国北方冷水域の重要な増養殖対象魚であるサケ科魚類, 特にサケ (*Oncorhynchus keta*), ニジマス (*O. mykiss*), サクラマス (*O. masou*), ギンザケ (*O. kisutch*) 及びカラフトマス (*O. gorbuscha*) を対象に HRV の病原性を検討し, HRV と同属のラプトウイルスである IHNV および VHSV 感染症と本症との相違を病理組織学的に比較検討した。第 III 章では HRV の増殖過程及び生成物を検討する目的で, まず培養細胞を用いて *in vitro* で本ウイルスの細胞内増殖過程を経時的に電子顕微鏡を用いて観察しこの結果を他の魚類病原ラプトウイルスの増殖過程と比較検討した。ついで *in vitro* での観察結果を基に発症魚を対象に HRV の *in vivo* での増殖の場を観察した。さらに第 IV 章では HRV 感染症の防除対策の確立を目的に飼

\*西沢豊彦・吉水 守・木村喬久: 魚類病原ウイルス HRV に関する研究: ウイルス構造蛋白の他魚類病原ラプトウイルスとの比較。昭和61年度日本水産学会春期大会

育環境水温が15℃を越えた場合自然終息する傾向がみられたことより、HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を発症率、死亡率および血液学的性状の面から検討した。ついで HRV の各種消毒剤、紫外線に対する感受性を検討した。

本論文は自然発症ヒラメの病理組織、HRV のニジマスに対する強い病原性、HRV 感染細胞に見られる形態的特徴および飼育水温制御と紫外線や消毒剤による HRV の防除について報告する。

## 第 I 章 ヒラメにおける HRV 感染症の発生状況および病理組織学的特徴

本章ではまず第 1 節において兵庫県、香川県および北海道におけるヒラメの HRV 感染症の発生経過、被害状況、ウイルス分離の経緯、分離ウイルスの性状等について検討した。次いで第 2 節では本ウイルス感染症の病理学的特徴を明らかにすることを目的に、兵庫県および北海道で発生した本症の病理組織学的検討を行なった。

### 第 1 節 HRV 感染症の発生経過および被害状況

1984年春に兵庫県下で飼育中のヒラメ病魚から分離されたウイルス HRV は、翌年には兵庫県、北海道および香川県で飼育中のヒラメ病魚からも分離され、本疾病による被害は三重県、岡山県と広がっていることが分かり（吉水ら 1987）、現在本ウイルスによる養殖場における被害はヒラメのみならずクロダイにも及んでいる（安部ら 口頭発表\*）。

本節では1984年から1985年にかけて兵庫県下のヒラメに発生した2例、および1985年の北海道および香川県下での発生例1例を対象にその発生経過、被害状況、病魚の観察結果をとりまとめるとともに、分離ウイルスについて1986年以降岡山県、三重県下のヒラメおよびクロダイ病魚から分離されたウイルスを含め理化学的、血清学的性状を検討した。

### 材 料 と 方 法

ヒラメ病魚の発生状況および被害状況調査：

兵庫県および香川県下の発生例につきヒラメの飼育水温、飼育状況および飼育群中における病魚の発生および病害の状況、被害量等を両県水産試験場の魚病相談室の調査資料および兵庫県水産試験場の飼育観察記録を基に、また北海道での発生例では業者の養殖日誌を基に被害状況の調査を行った。

病魚の検査法およびウイルスの分離：

---

\*安部昌明・松本紀男・反町 稔：クロダイに発生した HRV 感染症と分離された HRV の各種海産魚に対する病原性、平成元年度日本魚病学会春期大会。



兵庫県淡路島、兵庫県水産試験場、香川県女木島および北海道焼尻島で飼育中のヒラメ病魚を供試し、症状を観察後、魚体重、体長を測定し、無菌的に開腹して腎臓、脾臓および生殖腺を対象に細菌検査およびウイルス検査を実施した。

細菌検査はトリプティケースソイ寒天 (trypticase soy agar: TSA; Difco社) 平板培地を用い、腎臓および脾臓試料を画線培養し、25℃で5日間観察した。ウイルス検査は腎臓と脾臓の混合試料および生殖腺をホモゲナイズ後、ミリポアフィルター HA (0.45  $\mu\text{m}$ ) で濾過除菌し、氷冷して実験室に運び RTG-2 に接種して、15℃で10日間観察した。CPE の観察された細胞培養液を濾過後再度 RTG-2 細胞に接種し、同様の CPE 出現を待ってウイルスを分離した。

なお RTG-2 細胞の培養には牛胎児血清 (Gibco社) 10%、ペニシリン100 I.U./ml、ストレプトマイシン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む Eagle の最小必須栄養素培地 (Minimam Essential Medium: MEM (以下同様); Gibco社) にトリス緩衝液 (最終濃度 tris- (Hydroxymethyl)-aminomethane-HCl 0.17%およびtris-(Hydroxymethyl)-aminomethane 0.063%, pH7.8) を添加し、炭酸水素ナトリウム濃度を0.75%としたもの (以後 MEM<sub>10</sub>-Tris と称す) を使用した。

供試ウイルスおよびその同定法:

1984年に兵庫県淡路島の養殖ヒラメ病魚から分離した 8401-H 株、1985年に兵庫県水産試験場のヒラメから分離した 8501-H 株、香川県下の養殖場のヒラメから分離した 8501-K 株および北海道のヒラメから分離した 8501-Y 株、さらに1986年に岡山県水産試験場の山本章造氏により同県下のヒラメから分離され同定依頼を受けた 8601-O 株、養殖研究所の反町稔博士により三重県下のヒラメおよび香川県下のクロダイから分離され、同定依頼を受けた 8601-M 株および BS8601-K 株の計 7 株を対象に以下の理化学的および血清学的性状により同定した。

理化学的性状検査:

- 1) エーテル感受性試験: 供試ウイルス培養液 (10<sup>7</sup>TCID<sub>50</sub>/ml (50% tissue culture infectious dose)) をミリポアフィルター HA (0.45 $\mu\text{m}$ ) で濾過した培養濾液 4 ml に 1 ml のジエチルエーテル (特級, 和光純薬社) を加え、4℃で18時間反応後、窒素ガス (純度99.9995%, 日本酸素社) でエーテルを除去しウイルス感染価 (TCID<sub>50</sub>/ml) を測定した。対照には Hanks 液 (balanced salt solution; Gibco社) を用いた。対照の感染価に対し 1/100以下に感染価が減少した場合、エーテルに感受性ありと判定した。
- 2) 酸 (pH 3.0) 感受性試験: 塩酸を用いて pH 3.0 に調整した MEM<sub>10</sub> に供試ウイルス培養濾液を 1/10量加え 10℃で3時間静置後、ウイルス感染価を測定した。対照には pH 7.2 の MEM<sub>10</sub>-Tris を用いた。対照の感染価に対し 1/100以下に感染価が減少した場合、酸感受性ありと判定した。
- 3) 熱安定性試験: 供試ウイルス培養濾液をカーンチューブに 0.5ml づつ分注し、各々を 50℃ および 60℃ のウォーターバスで 1分から5分間の所定時間加熱後、氷冷して各々のウイルス感染価を測定した。対照温度は 15℃で行なった。

4) 5'ヨード 2'デオキシウリジン (IUdR 以下同様) による増殖阻害: RTG-2細胞に感染多重度 (multiplicity of infection: m.o.i. (以下同様)) = 0.01となるよう供試ウイルスを接種後, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の IUdR を含む MEM<sub>10</sub>-Tris で15°C 10日間培養し, 培養上澄液のウイルス感染価を測定した。対照には IUdR の代わりに Hanks 液を用いた。対照の感染価に対し 1/100以下に感染価が減少した場合 IUdR による増殖阻害があると判定した。

#### HRV 感染 RTG-2 細胞の超薄切片作成:

HRV の代表株として 8401-H 株を供試し, 25cm<sup>2</sup>容組織培養用フラスコで単層培養した RTG-2 細胞に m.o.i. = 0.1となるよう HRV を接種し, 15°C で24時間培養後パラフォルム・グルタルアルデヒド混合液で 4°C 2時間固定した。ついで 0.1M カコジレートバッファーで洗浄後 2% オスミック酸で 4°C で1時間固定した。アルコールで脱水後エポン (Epok 812, 応研社) で包埋した。このブロックをウルトラミクロトームで薄切し, 酢酸ウラン, クエン酸鉛で染色して超薄切片を作成した。観察は電子顕微鏡 (日立社 H-300型) を用い 75kV で行なった。

#### 抗HRV家兎血清の作製:

10<sup>7</sup>TCID<sub>50</sub>/ml の 8401-H 株 1ml を抗原としてフロイント不完全アジュバント (Difco社) を用い家兎の耳の静脈中に週 1回ずつ計 4回の抗原接種を行い 1週間後中和抗体の産生を確認した後, 採血を行ない血清を分離し常法に従って非動化して抗血清とした。

#### 抗血清による中和試験:

抗血清としては上述の抗 8401-H 株家兎血清, 水産庁研究部から配布された抗 IHNV (HV-1) 家兎血清およびフランス国立水産研究所 P. DE KINKELIN 博士から分与を受けた抗 VHSV (polyvalent) 家兎血清を供試した。まず Hanks 液で各抗血清の中和抗体価 (50% neutralization dose, ND<sub>50</sub>) が 1:100となるよう希釈し, 次いで 200TCID<sub>50</sub>/50  $\mu\text{l}$  となるよう調製した供試ウイルス液に等量の各抗血清を加え 15°C で30分間反応させた。反応後のウイルス液を予め 96穴マイクロタイタープレート中に 15°C, 24時間培養しておいた RTG-2 細胞に 50  $\mu\text{l}$ /穴ごと 4穴に接種し CPE 出現の有無を観察した。

## 結 果

#### 病害の発生経過および被害状況:

兵庫県下では, 1984年 3月に淡路島で海面小割生簀で養殖中のヒラメに原因不明の疾病が発生し, さらに翌年 1月同様の疾病が兵庫県水産試験場内で飼育中のヒラメにも発生した。これらのヒラメ病魚の外部症状および解剖所見は共に体表や鰭にスレ様の充出血, 腹部膨満, 腹水の貯留, 生殖腺のうっ血, 肝臓の充出血, 腸管の発赤, 筋肉内の充出血等であった。

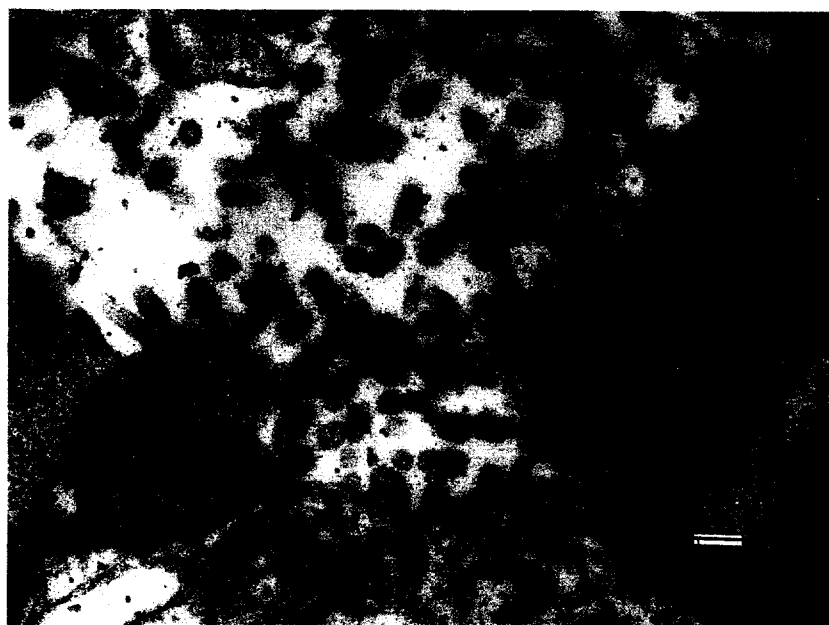
発病時期は前者が 3月下旬から 4月下旬, 後者では 1月中旬から 3月であり, 発病水温は 6°C ~ 8°C, 終息時の水温は 18°C 前後であった。発病したヒラメの体重は 100~300g, 被害量は淡路島の場合, 発病時の最大日間死亡率が約 1%, 累積死亡率は 25%, 水産試験場での累積死亡率は 7.2% であった。

香川県女木島では 1985年 2月下旬から 4月にかけて, 陸上の円形ターポリン水槽で養殖中の

**Table 1.** Outline of HRV disease outbreaks of cultured hirame in Hyogo, Kagawa and Hokkaido Prefectures, 1984 and 1985.

Place	Year	Water temp. (°C)	Body weight (g)	Cumulative mortality(%)	Signs of disease
Hyogo Pref. (Awaji Island)	1984	6~18°C	250~300	25	Hemorrhage in the muscle and fins Congestion of the gonads Accumulation of ascitic fluid
Hyogo Pref. (H.P.F.E.S.*)	1985	8~10°C	100~250	7.2	Hemorrhage in the muscle and fins Congestion of the gonads Accumulation of ascitic fluid
Kagawa Pref. (Megi Island)	1985	8~16°C	300~700	3.3	Hemorrhage in the muscle and fins Congestion of the gonads Accumulation of ascitic fluid
Hokkaido (Yagishiri Island)	1985	2~12°C	110~200	92	Hemorrhage in the muscle Congestion of the gonads (Accumulation of ascitic fluid)

\* : Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.



**Fig. 1.** Ultramicroscopical form of hiramé rhabdovirus (*Rhabdovirus olivaceus*) isolated from hiramé in Hyogo Prefecture (bar=200nm).

ヒラメに体表面の充出血，腹水の貯留，生殖腺のうっ血，筋肉内の出血を主徴とする疾病が発生した。罹病魚の体重は300~700g，水温の低い2月下旬より病魚が見られ始め5月上旬に終息したが，発病時の水温は8~16°C，累積死亡率は3.3%（約500尾）であった。

北海道でも1985年2~4月にかけて焼尻島のヒラメ養殖場で陸上水槽にて飼育中のヒラメに

**Table 2.** Results of viral and bacterial examination of moribund hirame cultured in Hyogo, Kagawa and Hokkaido Prefectures.

Sampling place	date	Fish No.	Body weight (g)	Body length (cm)	Isolation of			
					bacteria		virus	
					Kd* <sup>1</sup> Sp* <sup>1</sup>	Kd+Sp* <sup>1</sup>	Gonad	
Hyogo Pref. (Awaji Island)	April 1984	1	205	17.0	-	-	+	+
		2	236	26.5	-	-	+	+
		3	235	27.0	-	-	+	+
		4	250	18.0	-	-	+	+
		5	250	29.0	-	-	+	+
Hyogo Pref. (H.P.F.E.S. * <sup>2</sup> )	January 16~ February 8 1985	1	262	22.2	-	-	+	+
		2	223	12.5	-	-	+	+
		3	248	17.0	-	-	+	+
		4	242	18.0	-	-	+	+
		5	275	23.0	-	-	+	+
Kagawa Pref. (Megi Island)	April 9 1985	1	275	36.0	-	-	+	+
		2	280	46.0	-	-	+	+
		3	264	33.0	-	-	+	+
		4	290	47.0	-	-	+	+
Hokkaido (Yagishiri Island)	April 11 1985	1	195	26.2	-	-	+	+
		2	195	25.9	-	-	+	+
		3	131	22.4	-	-	+	+
		4	170	22.4	-	-	+	+
		5	116	21.7	-	-	+	+

\*<sup>1</sup> : Kd=Kidney, Sp=Spleen, Kd+Sp=Kidney and spleen mixture.

\*<sup>2</sup> : Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.

\*<sup>3</sup> : Infected with *Flexibacter* sp.

腹水貯留、生殖腺のうっ血、筋肉内の出血を主徴とする疾病が発生した。この地方で一年のうちで水温が最も低くなる2月から病魚が見られ始め、4月までにほとんどの魚が死亡した。この時の水温は2月で2℃、4月で8℃であった。病魚の体重は110~200g、本症による死亡数は3月から4月にかけて最も多く4月初旬の10日間で7500尾（養殖開始時の約60%）が死亡し、本症が終息した4月下旬の累積死亡率は92%に達した。以上の発症例の概要をTable 1に示した。

#### ウイルス分離：

兵庫県淡路島および兵庫県水産試験場の病魚では5尾中5尾から、また香川県水産試験場の病魚でも4尾中4尾から、さらに北海道の焼尻島の病魚では、検査した5尾中4尾からRTG-2細胞にIHNV様のCPEを形成するウイルスが分離された（Table 2）。なおいずれの試料からも特定の細菌は分離されなかった。

#### 分離ウイルスの性状：

1984年に最初にヒラメ病魚から分離した8401-H株を含む供試ウイルス8株の性状をTable

**Table 3.** Characteristics of virus strains isolated from moribund hirame cultured in Hyogo, Kagawa, Hokkaido, Okayama and Mie Prefectures during 1984 to 1986.

Virus strain	Ether treatment 4 °C 18h	pH3.0 15°C 3h	Heating		IUdR 50µg/ml	Neutralization*1 antisera against		
			50°C 2 min	60°C 1 min		HRV	IHNV	VHSV
			Yes	No		No		
8401-H	Sensitive	Sensitive	—*2	—	—*3	Yes	No	No
8501-H	"	"	—	—	—	"	"	"
8501-K	"	"	—	—	—	"	"	"
8501-Y	"	"	—	—	—	"	"	"
8601-O	"	"	—	—	—	"	"	"
8601-M	"	"	—	—	—	"	"	"
BS8601-K	"	"	—	—	—	"	"	"

\*1 : Neutralization test by anti HRV (8401-H), IHNV and VHSV rabbit sera.

\*2 : Heat stability. \*3 : Inhibit.

3に示した。供試株はいずれもエーテル、酸 (pH3.0) に感受性を有し、IUdR (50µg/ml) 存在下でも増殖は阻害されず、50°Cでは2分間あるいは60°Cで1分間の加熱処理により完全に失活し易熱性であった。8401-H株感染 RTG-2細胞で観察されたウイルス粒子は砲弾型を呈し、大きさは80×160~180nmであった (Fig. 1)。また供試ウイルスはいずれも抗 HRV (8401-H) 家兎血清により中和されたが、IHNV および VHSV に対する抗血清では中和されなかった。

## 考 察

HRV 自然感染の被害状況をまとめた結果、いずれの場合でも水温が15°C前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられている。したがって本症の発生は春先の飼育水温が低い時期に限られ、特に飼育水温が著しく低い北海道では被害量も大きい。また水温が高くなる時期に終息が見られたことから本病の感染発症には水温の影響が示唆された。また本病罹病ヒラメの体重は兵庫県、北海道および香川県の場合、それぞれ100~300g、110~200gおよび300~700gと出荷サイズのヒラメにまで感染・発病することが明らかになり経済的にも大きな損失となった。

一方、病魚の腎臓、脾臓および生殖腺からいずれも RTG-2細胞に IHNV と類似の CPE を発現するウイルスが分離された。1984年兵庫県淡路島のヒラメ病魚から分離されたウイルスをはじめ、1985年に兵庫県水産試験場、北海道焼尻島および香川県女木島のヒラメ病魚から分離されたウイルス、さらに1986年に岡山県および三重県下の養殖ヒラメ稚魚ならびに香川県下の養殖クロダイから分離されたウイルスはいずれも IUdR による増殖阻害は認められず、エーテル、酸 (pH 3) に感受性を示し、電顕観察では80×160~180nm の砲弾型を呈してラブドウイルスの特徴を示し、いずれも抗 HRV 血清により中和され HRV と同定された。

HRV のヒラメに対する病原性については五利江・中本 (1986) が体重95~265gのヒラメに HRV を $10^6$ TCID<sub>50</sub>/尾宛腹腔内に接種して10°Cで飼育し、累積死亡率は20%であったと報告している。また反町 (1987) は体重98~203gのヒラメに $10^{6.1}$ TCID<sub>50</sub>/尾宛腹腔内に接種し12°Cで飼育した場合、その累積死亡率は67%に達したと報告している。さらに吉水ら (1987) がクロダイ

(*Mylio macrocephalus*) から, SANO and FUKUDA (1987) がメバル (*Sebastes inermis*) から HRV を分離し, 反町 (1987) がマダイおよびクロダイで, 安部ら (口頭発表\*) がクロダイ, キジハタ (*Epinephelus akaara*), クジメ (*Hexagrammos agrammus*), マハゼ (*Acanthogobius flavimanus*) およびアサヒアナハゼ (*Pseudoblennius cottoides*) に対し HRV が病原性を有することを報告し, HRV はヒラメのみならず多くの海産魚に病原性を有していることが明らかとなり, その被害の拡大が危惧される。したがって今後早急に HRV の伝播および感染防除策を確立する必要があると考える。

## 第 2 節 HRV 自然発症ヒラメの病理組織像

HRV 感染症の診断および感染防除対策を確立するに際し, その基礎的知見としての病理組織学的所見が重要であると考え, 本節では兵庫県下および北海道で発生した HRV 自然発症ヒラメ病魚を対象に各臓器の病理組織像を観察した。

### 材 料 と 方 法

#### 供試魚および供試組織

1984年3月, 兵庫県下の養殖場で発病した10ヵ月齢のヒラメ病魚5尾(体重約100~300g)の生殖腺, 1985年1月から2月にかけて兵庫県水産試験場において自然発病したヒラメ病魚5尾(8ヵ月齢, 体長22.5~26.2cm, 体重111~230g)ならびに1985年4月に北海道焼尻島の養殖場で自然発病したヒラメ病魚7尾(体長21.5~23.5cm, 体重110~210g)の腎臓, 脾臓, 筋肉, 生殖腺, 肝臓, 消化管を供試した。対照には1985年6月北海道立栽培漁業総合センターで飼育中の健康なヒラメ3尾(体長約15cm, 体重約90g)の各臓器を用いた。供試魚と供試臓器の一覧は Table 4 に示したが, 対照以外の供試魚からはHRVが分離されている。

#### 病理組織標本作製法

瀕死の供試魚を飼育槽より取り上げ, 直ちにそれぞれの臓器を摘出し, ブアン氏液(飽和ピクリン酸水溶液, ホルマリン原液, 酢酸の混合比25:5:1)で1~2日間固定後, 80, 90, 95, 100%エチルアルコールで順次脱水し, キシレンを浸透後ヒストパラフィン(和光科学社)で包埋した。ついでパラフィンブロックを厚さ4 $\mu$ mの切片に薄切し, ヘマトキシレン・エオシン(H-E)の2重染色を施した後, 脱水・カバーガラスによる封入を行い, 光学顕微鏡を用いて観察した。

### 結 果

#### 腎臓:

\* 安部昌明・松本紀男・反町 稔: クロダイに発生した HRV 感染症と分離された HRV の各種海産魚に対する病原性. 平成元年度日本魚病学会春期大会。  
安部昌明・松本紀男・宮崎照雄: クロダイの HRV 感染症に関する研究. 自然発病魚と実験感染魚の病理組織. 平成元年度日本魚病学会秋期大会。

**Table 4.** List of the specimens of HRV infected hirame employed for histopathological examination.

date	Sampling place	Condition of fishes	Organ					
			Kidney	Spleen	Muscle	Gonad	Liver	Gut
Mar. 30'84	Private Fish	D* <sup>3</sup>				0* <sup>5</sup>		
30'84	Farm in	D				0		
Apr. 4'84	Hyogo Pref.	D				0		
5'84		D				0		
5'84		D				0		
Jan. 16'85	Hyogo	D	0	0	0	0	0	0
17'85	P.F.E.S.* <sup>1</sup>	D	0	0	0	0	0	0
23'85		D	0	0	0	0	0	0
Feb. 5'85		D	0	0		0	0	
8'85		D	0	0		0	0	0
Apr. 11'85	Yagishiri	D	0	0	0	0	0	
11'85	Island in	D	0	0	0	0	0	
11'85	Hokkaido	D	0	0	0	0	0	
11'85		D	0	0	0	0	0	0
11'85		D	0	0	0	0	0	0
11'85		D	0	0	0	0	0	0
11'85		D	0	0	0	0	0	0
Jun. 7'85	Hokkaido	H* <sup>4</sup>	0	0	0		0	0
7'85	M.C.C.* <sup>2</sup>	H	0	0	0		0	0
7'85		H	0	0	0		0	0

\*1 : Hyogo Prefectural Fisheries  
Experimental Station.

\*2 : Marine Cultivation Center.

\*3 : Diseased fish (Natural outbreak).

\*4 : Healthy fish (Control).

\*5 : Employed for histology.

正常魚の腎臓を Plate 1, Figs. 1, 2 に示した。硬骨魚類の腎臓は尿細管，ボーマン嚢とその間質の造血組織で構成されているが，兵庫県水産試験場の自然発病ヒラメでは，造血組織の各所に著しい出血像が観察され，さらに組織全体に瀰漫的な壊死がみられ，著しい融解壊死巣も認められた (Plate 1, Fig. 3)。この病変は出血部に隣接した場所に多く認められた。こうした病巣では核の濃縮，消失あるいは膨化といった核の退行像が見られ，塩基性色素による染色性が悪く，細胞が崩壊して融解するとともに纖維素の沈着も起こっていた。またこの壊死病巣に巻き込まれた尿細管上皮も壊死崩壊していることが多かった。また黒色大食細胞集塊部の色素沈着は少なく，褐色色素小顆粒が組織中に散在していた (Plate 1, Fig. 4)。

北海道焼尻島の自然発症魚でも兵庫県水産試験場のヒラメと同様の所見が得られたが，出血部において血液が網状組織内に浸潤せず，血球が密に詰まった組織像を示した個体も存在した (Plate 1, Figs. 5, 6)。

#### 脾臓：

対照魚の正常な脾臓の組織像を Plate 2, Figs. 7, 8 に示した。兵庫県水産試験場の自然発症

魚の脾臓には全体に著しい出血および壊死巣が観察され、特に脾髄には著しい巣状壊死および瀰漫的な壊死が起こっていた (Plate 2, Fig. 9)。この巣状壊死域では核の濃縮、消失を伴う退行像が認められ、細胞質の崩壊または融解が観察された。さらに著しい出血に加え出血辺縁部に纖維素の沈着がみられた。また瀰漫的な壊死局所でも壊死細胞の崩壊に加えて出血、水腫と纖維素の沈着を起こしていた。莢動脈や莢組織の細胞も顕著に変性し、この変性細胞が多数の小塊を形成して脾髄組織中に散在していた。一方、一部の中心動脈の周囲には壊死崩壊の見られない細網細胞の集団が認められた (Plate 2, Fig.10)。焼尻島の病魚でも出血像が観察されたが、兵庫県水産試験場の自然発症魚に比べればその程度は軽度であった。脾髄に著しい巣状壊死はみられなかったが、細網細胞の核濃縮、核消失を伴う壊死が広範囲に起こり、核の膨潤も若干観察された。特に動脈やその周囲の組織、リンパ様組織において細胞は核消失を伴う融解壊死を起こしていた。この壊死部は、水腫と纖維素の沈着を伴い脾髄組織中で小塊として分画されていた。また中心動脈にも著しい壊死が観察された (Plate 2, Figs.11, 12)。

#### 体側筋：

対照魚の体側筋では、筋組織の毛細血管は極めて細かったが (Plate 3, Figs.13, 14)、兵庫県水産試験場の自然発症魚では筋組織中の毛細血管は充血していた。さらに毛細血管末端の筋組織間質に異常な数の赤血球がみられる出血像が観察された (Plate 3, Fig.15)。この部位の毛細血管壁には細胞の崩壊像が観察され、これが出血の原因と考えられた (Plate 3, Fig.16)。北海道焼尻島の病魚の筋肉で同様の毛細血管の充血・怒張およびその端部における出血が観察された (Plate 3, Figs.17, 18)。

#### 精巣：

対照魚の精巣を Plate 4, Figs.19, 20に示した。兵庫県下の養殖場の自然発症魚では精巣小葉中隔及び精細管間質に充血から出血に至る循環障害が観察された (Plate 4, Fig.21)。個体差が見られたが精細管間質での出血の程度が著しい個体では、特に精巣辺縁部の出血が顕著で、精細胞や支持細胞は壊死に陥り、間質を構成する纖維芽細胞等が消失していた (Plate 4, Fig.22)。精巣中心部では精間質の充血が顕著で血栓状を呈していたが、精細管の精上皮の壊死はみられなかった。さらに精巣の輸精管や精管の結合織にも充血および出血が観察された。北海道焼尻島の病魚でも間質に充血像が認められ (Plate 4, Figs.23, 24)、輸精管や精管の結合織に顕著な出血像が観察された。

#### 卵巣：

対照魚の卵巣を Plate 5, Figs.25, 26に示した。兵庫県下の養殖場の自然発症魚では、卵巣薄板の間質中の毛細血管が充血・怒張し、卵巣腔に沿った毛細血管末端部には顕著な出血像が観察された (Plate 5, Figs.27, 28)。さらに間質中の毛細血管周囲の纖維芽細胞には、核の肥大や核濃縮が起こり壊死が認められ (Plate 5, Fig.28)、輸卵管の粘膜下結合組織にも充血や出血が起こっていた。また北海道焼尻島の病魚も兵庫県下の養殖場の自然発症魚とほぼ同様な病理組織像を示した (Plate 5, Figs.29, 30)。

#### 肝臓：



正常魚の肝臓を Plate 6, Figs. 31, 32 に示した。肝臓内の脾臓組織については後に詳述するが兵庫県水産試験場の自然発症魚の肝臓には、前述した他の組織中の毛細血管に観察されたような著しい充血や出血像は認められず、肝実質細胞にも異常増生や壊死巣はむしろ、核や細胞質にも顕著な病変は観察されなかった (Plate 6, Fig. 33, 34)。北海道焼尻島の病魚の肝臓は、兵庫の発病魚と同様肝臓内に局所的な壊死巣や増生像は観察されなかった (Plate 6, Fig. 35, 36)。

#### 脾臓：

対照魚の脾臓を Plate 7, Figs. 37, 38 に示した。兵庫県下の養魚場の自然発症魚では、個体によっては外分泌部の腺細胞が多数集合した複合胞状腺の中心にある肝門脈に充血がみられ、腺細胞の核が膨潤して空胞変性を起こしているものや、核濃縮が一部に認められるものも観察された場合もあったが、脾臓外分泌部に顕著な病変は観察されなかった。(Plate 7, Figs. 39, 40)。一方北海道焼尻島の病魚では顕著な病変は観察されなかった (Plate 7, Figs. 41, 42)。

#### 消化管：

対照魚の消化管を Plate 8, Figs. 43, 44 に示した。兵庫水産試験場の自然発症魚のうち症状の著しい個体では、消化管の粘膜固有層、粘膜下組織および筋層内の血管が顕著に充血・怒張し、組織内には著しい出血像が観察された。また粘膜固有層や粘膜下組織の疎性結合組織には細胞変性が起き、粘膜上皮組織中にも激しい出血が観察された。胃では粘膜上皮の出血は顕著でなかったが、腸管同様粘膜固有層や粘膜下組織、筋層中の著しい血管の充血、出血、細胞変性が認められた (Plate 8, Figs. 45, 46)。北海道焼尻島の病魚の腸管および胃の標本にも兵庫県水産試験場の自然発症魚とほぼ同様の所見が得られた。また、これら消化管の粘膜固有層および粘膜下組織中の充血や出血は、特に消化管壁側面で著しかった (Plate 8, Figs. 47, 48)。

## 考 察

HRV の病理組織学的特徴として、北海道と兵庫県下の自然発症魚では共に腎臓の造血組織に核濃縮、核消失、核膨化といった核の退行を伴う壊死や組織内での著しい出血が挙げられ、脾臓でも脾髄組織に著しい核変性を伴う壊死や、組織内の出血が見られた。さらに体側筋繊維間に血管の充血による怒張や毛細血管の出血、精巣、卵巣の間質組織中にみられる出血、消化管の粘膜層および筋層中の出血さらには充血といった魚体内各組織に認められる充血、出血像が観察された。肝臓には著しい壊死および出血は観察されなかった。以上各組織の病理組織学的検討結果をとりまとめて Table 5 に示した。

HRV は既知魚類ラブドウィルスの中では IHNV や VHSV に分類学上近縁である (西沢ら口頭発表)。そのうち IHNV 感染症は造血組織の著しい壊死を主徴とし、消化管の壊死、特に粘膜層中の好酸性顆粒細胞 (eosinophilic granular cell) の変性が著しい。また、肝臓内の肝実質細胞に核の膨化を伴う融解壊死が明瞭に観察され、広範囲な融解壊死巣を形成する場合もあり、肝門脈、肝静脈の血管壁、胆管周囲の結合織の壊死が観察されている (YASUTAKE and RASMUSSEN 1968, AMEND *et al.* 1968, AMEND and CHAMABERS 1970, YASUTAKE and

Table 5. Histopathological findings of HRV infected hirame.

Sampling place	Condition of fishes	Organ					
		Kidney	Spleen	Muscle	Gonad	Liver	Gut
Hyogo P.F.E.S.* <sup>1</sup>	D* <sup>2</sup> (Natural outbreak)	necrosis	necrosis	hyperemia	hyperemia	normal?	hemorrhage hyperemia
Private Fish Farm in Hyogo Pref.	D (Natural outbreak)	NT* <sup>3</sup>	NT	NT	hemorrhage hyperemia	NT	NT
Yagishiri Island in Hokkaido	D (Natural outbreak)	necrosis	necrosis	hyperemia	hemorrhage hyperemia	normal?	hemorrhage hyperemia

\*<sup>1</sup> : Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station.

\*<sup>2</sup> : Diseased fish.

\*<sup>3</sup>, NT: Not tested.

AMEND 1972, CARLISLE *et al.* 1979)。一方、VHSV 感染症では激しい出血像を示し、急性型では肝臓全域にわたる肝実質細胞の瀰漫的壊死が観察され、著しい壊死巣を形成し、細胞質の好酸性化、核内の染色質の核壁側への遍在、核濃縮、核崩壊、壊死巣周縁の水腫等が観察されている (GHITTINO 1965, AMLACHER *et al.* 1980, DE KINKELIN and CASTRIC 1982)。HRV 感染症を含むこれら 3 者に共通した主な症状は体色の黒化、異常遊泳、腹水の貯留、筋肉中および鰭基部の出血であり、病理組織学的には、腎臓の造血組織の壊死、脾臓の脾髄組織中の細網細胞の核濃縮、核崩壊、核融解を伴う壊死であった。相違点としては IHNV や VHSV 感染症ではニジマスの肝臓に著しい変化が観察されているが、HRV 感染症ではヒラメの肝臓にこのような変化はみられなかった。HRV 感染症は脂肪組織、鰾、腸管等魚体内各組織に著しい充血、出血を伴う出血性の敗血症をひき起こし、特に軀幹筋の出血が顕著であった点 VHSV 感染症 (GHITTINO 1965, BELLET 1965) に類似していた。また IHNV 感染症では消化管の壊死が顕著であり、特に消化管粘膜中の好酸性顆粒細胞 (ECG) の変性が著しいとされているが (YASUTAKE 1970)、ヒラメではニジマスの消化管に観察される好酸性顆粒細胞が存在しないためにこの点に関しては比較できなかった。

また最近 VHSV は海産魚のシーバスやターボットにも病原性を有することが人工感染試験により確かめられている (CASTRIC and DE KINKERIN 1984)。その症状はターボットの場合、体色の若干の黒化、頭部の出血による赤色化、眼球および鰭の出血等であり、解剖所見では腹水の貯留と肝臓及び腹腔壁の出血が報告され、病理組織学的には、腎臓の造血組織および脾臓の脾髄組織の壊死、肝臓では数個体に出血と壊死が観察されている。これらの症状および組織変化はヒラメの HRV 感染症の症状および病理組織像と共通する点が多く、今後 VHSV 感染症とのより詳細な比較検討を行う必要があると考える。

## 第Ⅱ章 HRV のサケ科魚類に対する病原性およびその病理組織像

前章では HRV 自然発症ヒラメの魚病理組織学的特徴が HRV と分類学上近縁であるサケ科魚類病原ウイルスの IHNV や VHSV 感染症の病理組織像が類似していることを明らかにした。

そこで本章では第 1 節で我国北方冷水域における重要な増養殖対象魚類であるサケ科魚類のサケ、ニジマス、ギンザケ、サクラマス、カラフトマスを対象に人工感染試験により HRV の病原性を検討し、第 2 節では HRV に高い感受性を示したニジマスを対象に HRV 接種量と供試魚の魚体重の感染発症に及ぼす影響を検討し、HRV のニジマスに対する病原性を IHNV のそれと比較検討した。さらに第 3 節では HRV 感染ニジマスの病理組織像を観察して IHNV 感染魚と病理組織学的に比較検討した。

### 第 1 節 HRV のサケ科魚類に対する病原性

本節では我が国北方冷水域における重要な増養殖対象魚種であるサケ、サクラマス、ニジマス、ギンザケ、カラフトマスを対象に人工感染試験による HRV のこれらの魚種に対する病原性を検討した。

#### 材料と方法

##### 供試魚

人工感染試験のうち浸漬感染試験には北海道大学水産学部微生物学講座実験室で脱塩素処理水道水を用いて孵化・飼育した 1 カ月齢のニジマス；平均体長 3.2cm, 平均魚体重 0.2g, ギンザケ；平均体長 3.8cm, 平均体重 0.3g, サケ；平均体長 4.2cm, 平均体重 0.4g, カラフトマス；平均体長 4.1cm, 平均体重 0.3g, 各 50 尾を用いた。腹腔内接種試験には同様に飼育した 3 カ月齢のニジマス；平均体長 4.0cm, 平均体重 0.5g, ギンザケ；平均体長 4.2cm, 平均体重 0.5g, サケ；平均体長 4.8cm, 平均体重 0.6g, サクラマス；平均体長 4.0cm, 平均体重 0.5g の各 20 尾を供試した。

##### 供試ウイルス

供試ウイルスとしては HRV の 8401-H 株を用い、RTG-2 細胞で 15℃ 1 週間培養後、パイアルチューブに分注し、試験に供すまで -80℃ にストックした。なお細胞の培養には MEM<sub>10</sub> を使用した。人工感染試験使用時のウイルス保存液の感染価は  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。

##### 人工感染試験方法

浸漬感染試験は 3 l 容水槽を用い HRV を  $10^{2.30}$  TCID<sub>50</sub>/ml 含む脱塩素処理水道水に供試魚を 12℃ 60 分間浸した後、水温 12~14℃ の脱塩素処理水道水を用いて 15 日間流水飼育した。腹腔内接種感染試験では供試魚を麻酔剤 MS-222 (三共社) 200ppm で 2~5 分間麻酔後、腹部を消

毒し、供試ウイルス液を1尾あたり50 $\mu$ l、すなわち10<sup>4.00</sup>TCID<sub>50</sub>/尾宛腹腔内に接種した。以後漬浸感染試験同様、流水で50日間飼育した。なおこれらの各群にはHRV培養液の代わりにMEM<sub>10</sub>を用いた対照区を設け同数の供試魚を収容し同一条件で飼育した。

#### 魚体内ウイルス量の測定法

各群の観察期間中、経日的に死亡尾数を計数し、死亡魚および観察期間終了時の生残魚を、水槽より取り上げた後、直ちに開腹し腎臓・脾臓を摘出し、10倍量のHanks液を加え、ストマッカー (Colworth-Type 80) を用いてホモジナイズし、ミリポアフィルターHA (0.45 $\mu$ m) で濾過して、ウイルス検査試料とした。ウイルス感染価の測定はRTG-2細胞を用い、常法の96穴マイクロプレート各4穴を用いる方法によりTCID<sub>50</sub>/gとして測定した。

### 結 果

**Table 6.** Result of virus isolation from artificially infected rainbow trout, coho salmon, chum salmon and pink salmon with HRV by immersion method.

Fish species	Fish			Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)
	No.	Days p.i. *1	condition	
Rainbow trout	1	8	D*2	3.55
	2	8	D	5.30
	3	9	D	5.30
	4	12	D	2.80
	5	15	S*3	5.80
	6	15	S	5.80
	7	15	S	≦1.80
	8	15	S	≦1.80
	9	15	S	≦1.80
Coho salmon	1	2	D	≦1.80
	2	10	D	≦1.80
	3	15	S	≦1.80
	4	15	S	≦1.80
	5	15	S	≦1.80
	6	15	S	≦1.80
	7	15	S	≦1.80
Chum salmon	1	12	D	≦1.80
	2	14	D	≦1.80
	3	15	S	≦1.80
	4	15	S	≦1.80
	5	15	S	≦1.80
	6	15	S	≦1.80
	7	15	S	≦1.80
Pink salmon	1	5	D	≦1.80
	2	15	S	≦1.80
	3	15	S	≦1.80
	4	15	S	≦1.80
	5	15	S	≦1.80
	6	15	S	≦1.80

\*1, p.i.: post-infection. \*2, D: Died fish. \*3, S: Survived fish.

浸漬感染試験

各実験群ともに顕著な死亡は見られず、観察期間終了時の累積死亡率はニジマス8%、ギンザケ4%、サケ4%、カラフトマス0%であり、ニジマスの対照群が若干高い値を示したが、いずれの試験群も対照群と比べほとんど差は認められず、死亡した個体に特徴的な症状は認め

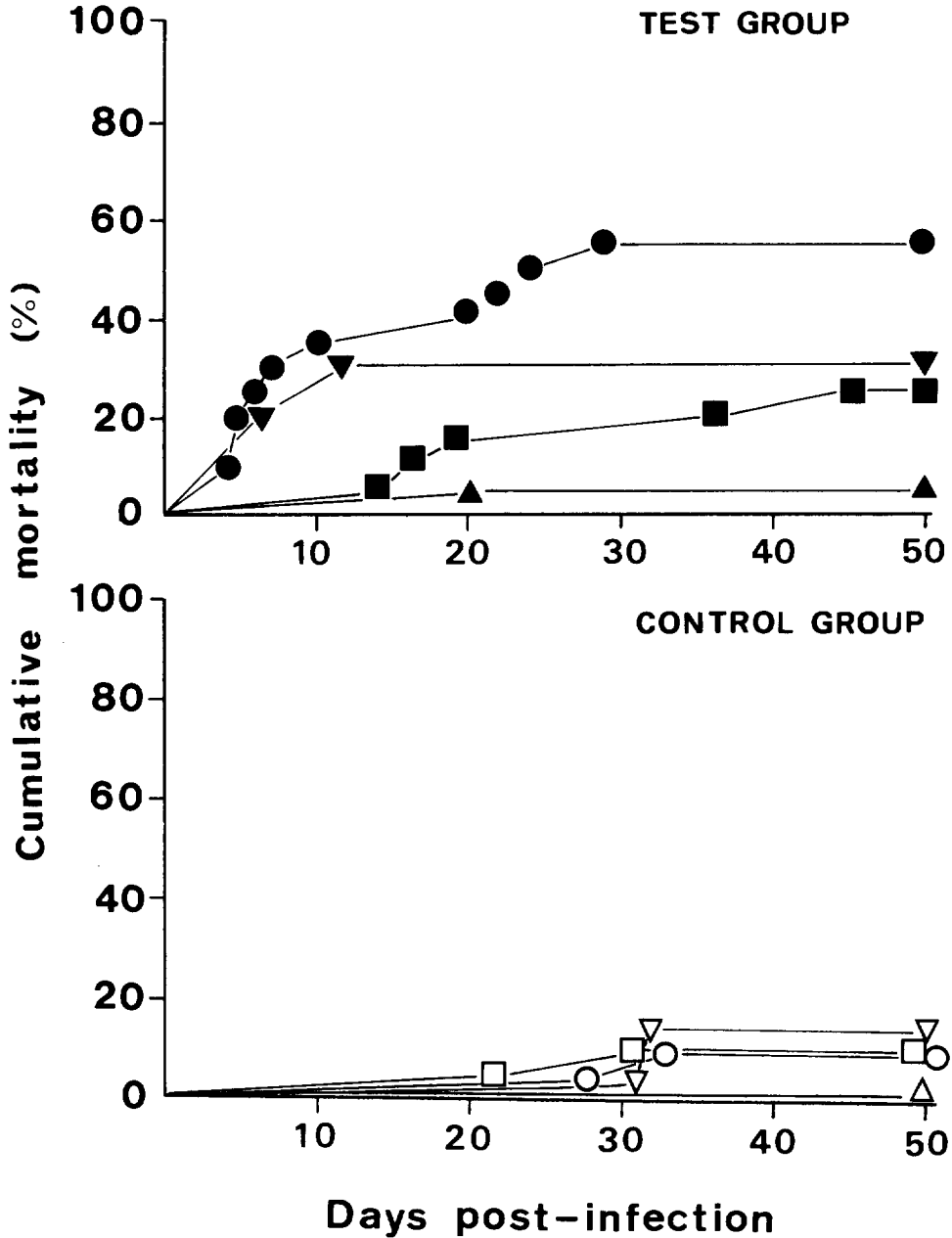


Fig. 2. Comparison of cumulative mortality among rainbow trout, coho salmon, chum salmon and masu salmon infected with HRV by intraperitoneal injection (dose :  $10^{4.00}$  TCID<sub>50</sub>/fish).  
 ○△□▽ : Control group. ●▲■▼ : Test group.  
 ○,● : rainbow trout. △,▲ : coho salmon. □,■ : chum salmon. ▽,▼ : masu salmon.

られなかった。ウイルス検査の結果ではニジマスの死亡魚全てと生残魚の一部からウイルスが分離され、それぞれの最大ウイルス感染価は $10^{5.30}$ ,  $10^{5.80}$ TCID<sub>50</sub>/gと比較的高い価を示す個体が認められた (Table 6)。一方、対照魚全てとギンザケ・サケ・カラフトマスの死亡魚および生残魚からはウイルスは分離されなかった。

#### 腹腔内接種感染試験

HRV の腹腔内接種攻撃法による累積死亡率をFig. 2 に示した。ニジマスでは4日目から死亡が観察され始め11日目までに35%の累積死亡率を示し、29日目に55%に達したが、以後30日目からは死亡は認められなくなった。死亡したニジマスは、体色黒化、眼球突出、腹水貯留、腎臓・脾臓の出血が認められ、筋肉内に顕著な出血がみられた (Plate 9, Fig. 49)。特に頭腎背側の筋肉内に激しい出血が特徴的に観察された。サクラマスの累積死亡率は6日目に20%、12日目に30%に達したが、以後死亡は見られなくなった。6日目に死亡したサクラマスには、ニジマスで観察された症状と同様な眼球の突出、筋肉中の顕著な出血、腹水貯留などが認められた (Plate 9, Fig. 50)。サケは漸次1尾ずつ死亡し観察終了時には25%の累積死亡率を示したが、死亡魚には症状はみられず、またギンザケでは死亡率5%で症状は認められなかった。ウイルス検査の結果をTable 7 に示したが、ニジマス、サクラマスの死亡魚からはウイルスが分離され、ニジマスでは $10^{2.55} \sim 10^{5.55}$ TCID<sub>50</sub>/g、サクラマスでは $10^{2.55} \sim 10^{4.55}$ TCID<sub>50</sub>/gの感染価を示し、全体的にサクラマスよりもニジマスの方が高い感染価を示した。しかしギンザケおよびサ

**Table 7.** Result of virus isolation from artificially infected rainbow trout, coho salmon, chum salmon and masu salmon with HRV by intraperitoneal injection.

Fish species	Fish			Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)	Fish species	Fish			Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)
	No.	Days p.i.	*1 condition			No.	Days p.i.	*1 condition	
Rainbow Trout	1	4	D* <sup>2</sup>	2.55	Chum salmon	1	14	D	≤1.80
	2	5	D	3.30		2	16	D	≤1.80
	3	5	D	5.55		3	19	D	≤1.80
	4	6	D	3.55		4	36	D	≤1.80
	5	7	D	4.30		5	45	D	≤1.80
	6	11	D	2.80		6	50	S	≤1.80
	7	20	D	5.30		7	50	S	≤1.80
	8	22	D	5.55		8	50	S	≤1.80
	9	24	D	4.05		9	50	S	≤1.80
	10	29	D	4.80		10	50	S	≤1.80
	11	50	S* <sup>3</sup>	≤1.80	Masu salmon	1	6	D	4.05
	12	50	S	≤1.80		2	6	D	3.80
	13	50	S	≤1.80		3	6	D	4.55
	14	50	S	≤1.80		4	6	D	2.55
	15	50	S	≤1.80		5	12	D	2.80
Coho salmon	1	29	D	≤1.80	6	12	D	3.05	
	2	50	S	≤1.80	7	50	S	≤1.80	
	3	50	S	≤1.80	8	50	S	≤1.80	
	4	50	S	≤1.80	9	50	S	≤1.80	
	5	50	S	≤1.80	10	50	S	≤1.80	
	6	50	S	≤1.80					

\*1, p.i.: post-infection. \*2, D: Died fish. \*3, S: Survived fish.

ケからは HRV は分離されなかった。

## 考 察

IHNV の宿主域としてはマスノスケ (*O. tshawytscha*) (ROSS *et al.* 1960), ベニザケ (*O. nerka*) (RUCKER *et al.* 1953), ニジマス (AMEND *et al.* 1969), 大西洋サケ (*Salmo salar*) (MULCAHY and WOOD 1986), ヤマメ (*O. masou*)・ヒメマス (*O. nerka*) (KIMURA *et al.* 1977) 等が知られ, VHSV ではニジマス (GHITTINO 1965, 1973), ブラウンマス (*S. trutta*)・カワマス (*Salvelinus fontinalis*) (TACK 1959, RASMUSSEN 1965), 大西洋サケ (DE KINKELIN and CASTRIC 1982) 等が報告されており, これらのウイルスは淡水産のサケ・マス類が主な宿主と考えられてきた。しかし, 近年 VHSV が海水養殖中のニジマスをはじめ海産魚のシーバス (*Dicentrarchus labrax*) やターボット (*Scophthalmus maximus*) にも病原性を有することが実験的に確かめられ (CASTRIC and DE KINKELIN 1980, 1984), サケ科魚類のみならず海産魚に対しても病原性を有していることが明らかとなった。この様にサケ科魚類病原ウイルスとして知られる IHNV や VHSV が幅広い宿主域を持つことが明らかにされつつあり, これらのウイルスに分類学上近縁である HRV がサケ科魚類に対しても病原性を有す可能性が危惧された。

本研究により浸漬感染法による累積死亡率は低かったが, ウィルス検査の結果ではニジマスからウイルスが分離され HRV はニジマスに対して病原性を有している可能性が示唆された。一方, 腹腔内接種攻撃法ではニジマスで高い累積死亡率並びに, ウィルス感染価が示され, しかもヒラメの HRV 感染発症魚と同様腹部膨満, 筋肉内の出血等の症状が観察され, HRV はニジマスに対して強い病原性が確認された。サクラマスはニジマスにつぐ累積死亡率とウイルス感染価を示し, ニジマスと同様の症状が認められたことからサクラマスに対しても HRV は病原性を有していることが明らかとなった。一方, ギンザケ・サケ・カラフトマスでは感染発症は認められなかったことより, これらの魚主に対しては病原性を示さないものと考えられた。

HRV はヒラメ以外にもサケ科魚類のニジマスやサクラマスに対して病原性を有することが明らかとなり, 今後サケ・マス養殖場における HRV の伝播・予防に対して十分留意する必要があることが示唆された。

## 第 2 節 HRV のニジマスに対する病原性

前章第 1 節で HRV はニジマスに対しても強い病原性を有することが明らかになり, ニジマス養殖場への伝播に対し十分留意する必要があるウイルスであることが示唆された。一方, 同じラブドウイルス群に属する IHNV は我が国やアメリカでニジマス稚魚に死亡率の高い疾病を引き起こし, また VHSV はヨーロッパで稚魚から商品サイズの大きさまでのニジマスに被害を及ぼしている。

HRV が IHNV や VHSV と同様, ニジマスに対して強い病原性を有することが明らかに

なったことから IHNV および VHSV 同様、ニジマスに対する感染防除策を講ずる必要がある。本節では HRV のニジマスに対する病原性を供試魚の魚体重と接種ウイルス量の両面から検討するとともに、ニジマスに対する HRV の病原性を現在我国のニジマスに多大な被害を与えている IHNV の病原性と比較検討した。

## 材 料 と 方 法

### 供試魚

北海道大学水産学部微生物学講座および同学部七飯養魚実習施設内の水槽で孵化後、育成したニジマス稚魚および幼魚を用い、平均魚体重0.2g群（1カ月齢）、0.5g群（3カ月齢）を各20尾、3.0g群（6カ月齢）を30尾、6.5g群（9カ月齢）を40尾、14.5g群（12カ月齢）を30尾、さらに18.2g群（15カ月齢）を20尾供試した。6.5g群は20、10、10尾の3群に分けたが、他の各群はすべて10尾ずつとして実験に供試した。3.0g以下の魚体重の供試魚は5l容の水槽に、それ以上の供試魚は20l容の水槽に收容し、水温12～14℃の脱塩素水道水で流水飼育した。このうち IHNV との感受性の比較には3.0gおよび6.5g群のニジマスを供試した。

### ウイルス接種法

ウイルスの人工感染試験は全て腹腔内接種法により行い、麻酔およびウイルス接種の手順は前節で述べた方法に従った。

供試魚の魚体重と HRV 接種量の感染発症に及ぼす影響を調べるために、Table 8～11に示すとおり、魚体重0.2g群20尾に $10^{3.00}$ TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{3.70}$ TCID<sub>50</sub>/g)、魚体重0.2g、0.5gおよび3.0g群それぞれ20、10および10尾に $10^{3.75}$ ～ $10^{4.00}$ TCID<sub>50</sub>/尾 (各々 $10^{4.45}$ 、 $10^{4.30}$ 、 $10^{3.52}$ TCID<sub>50</sub>/g)、魚体重3.0g、6.5gおよび14.5g群それぞれ10、20および10尾に $10^{5.30}$ TCID<sub>50</sub>/尾 (各々 $10^{4.82}$ 、 $10^{4.48}$ 、 $10^{4.12}$ TCID<sub>50</sub>/g)、さらに魚体重14.5gおよび18.2g群各10尾に $10^{6.00}$ ～ $10^{6.30}$ TCID<sub>50</sub>/尾 (各々 $10^{4.82}$ 、 $10^{5.04}$ TCID<sub>50</sub>/g) の HRV を接種した。また IHNV との感受性の比較には魚体重3.0g群のニジマスに $10^{4.30}$  TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{3.82}$ TCID<sub>50</sub>/g)、魚体重6.5g群に $10^{5.85}$ TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{5.04}$ TCID<sub>50</sub>/g) の IHNV を接種した。供試魚は12～14℃の流水で飼育し、観察期間は0.5gおよび18.2g群で15日間、1.0g群で50日間、他は30日間とした。なお対照群として各魚体重群10尾にウイルス液の代わりに MEM<sub>10</sub> を接種した群を設けた。

### 累積死亡率およびウイルス感染価の測定

観察期間中、経日的に死亡尾数を計数し、死亡魚および生残魚を計数して累積死亡率を求め、0.2gおよび0.5gの魚体は1尾ごと、3.0gの魚体は全ての内臓を、6.5g、14.5gおよび18.2g群では腎臓・脾臓混合試料を対象に前章で示した方法と同様に RTG-2 細胞を用いたウイルス検査を実施した。

## 結 果

### 魚体重とウイルス接種量の感染発症に及ぼす影響

ニジマスにおける魚体重とウイルス接種量の感染発症に及ぼす影響を以下の組合せで検討



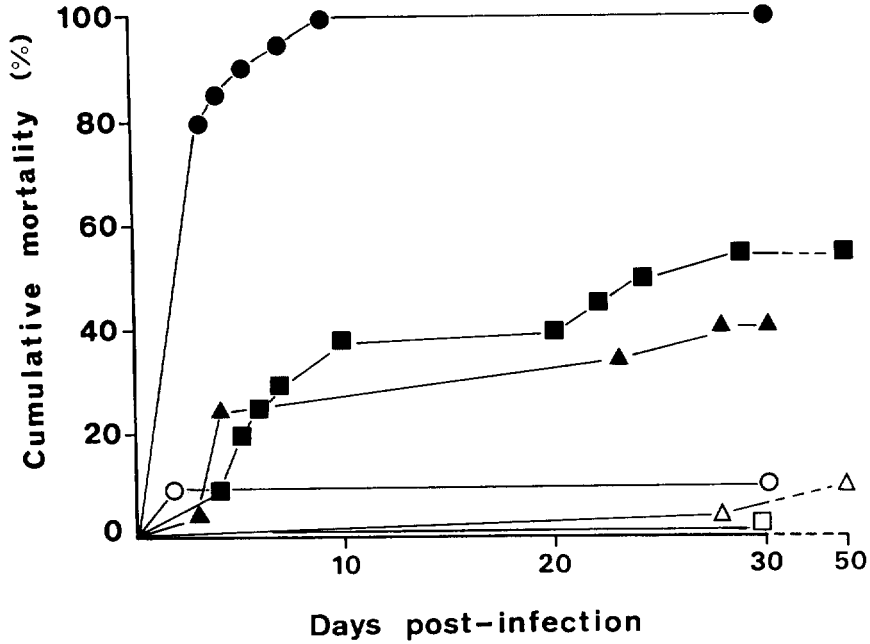


Fig. 3. Comparison of cumulative mortality in different sizes of rainbow trout (0.2-3.0g in body weight) infected with HRV by intraperitoneal injection (dose :  $10^{3.75}$ - $10^{4.00}$ TCID<sub>50</sub>/fish).  
○△□ : Control group. ●▲■ : Test group.

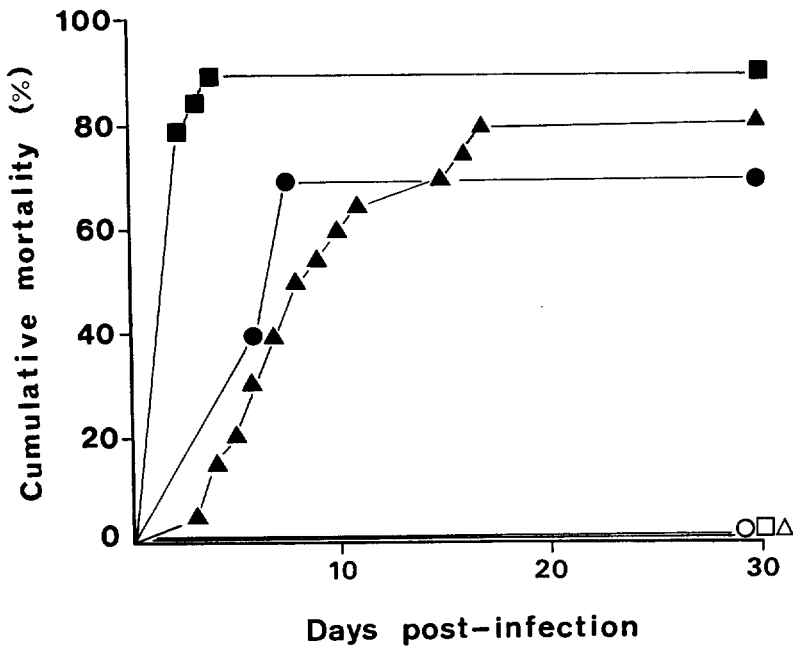


Fig. 4. Comparison of cumulative mortality in different sizes of rainbow trout (3.0-14.5g in body weight) infected with HRV by intraperitoneal injection (dose :  $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/fish).  
○△□ : Control group. ●▲■ : Test group.  
□, ■ : body weight 3.0g. △, ▲ : body weight 6.5g. ○, ● : body weight 14.5g.

**Table 8.** Result of virus isolation from different body sizes (0.2, 0.5, 3.0g in weight) of rainbow trout infected with HRV by intraperitoneal injection.

Body weight (g)	Challenged virus titer (log TCID <sub>50</sub> /fish)	Fish			Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)
		No.	Days p.i. * <sup>1</sup>	condition	
0.2	3.00	1	2	D* <sup>2</sup>	4.05
		2	2	D	3.80
		3	2	D	4.55
		4	4	D	5.80
		5	5	D	3.55
		6	6	D	8.80
		7	10	D	5.30
		8	12	D	5.05
		9	13	D	5.55
		10	13	D	5.55
	3.75	1	2	D	5.55
		2	2	D	4.80
		3	3	D	5.80
		4	3	D	5.05
		5	3	D	4.30
		6	4	D	5.30
		7	5	D	5.55
		8	7	D	5.30
		9	9	D	4.05
0.5	4.00	1		D	2.55
		2	4	D	3.30
		3	5	D	5.55
		4	6	D	3.55
		5	7	D	4.30
		6	11	D	2.80
		7	20	D	5.30
		8	22	D	5.55
		9	24	D	4.05
		10	29	D	4.80
3.0	4.00	1	2	D	6.80
		2	2	D	≤1.80
		3	2	D	3.05
	5.30	1	2	D	5.80
		2	2	D	3.80
		3	2	D	4.05

\*<sup>1</sup>, p.i.: post-infection. \*<sup>2</sup>, D: Died fish.

し、その結果をFig. 3～6に示した。

魚体重0.2g群 $10^{3.00}$  TCID<sub>50</sub>/尾 (=  $10^{3.70}$  TCID<sub>50</sub>/g) のウイルスを接種した場合、3日目より死亡がみられ始め累積死亡率は10日目で35%、14日目で55%、24日目で65%に達した (Fig. 6)。魚体重0.2～3.0gのニジマスに $10^{3.75}$ ～ $10^{4.00}$  TCID<sub>50</sub>/尾のウイルスを接種した場合、魚体重0.2g ( $10^{4.45}$  TCID<sub>50</sub>/g) のニジマスでは2日目より死亡が観察され始め5日目に80%、9日目には100%の累積死亡率を示した。0.5g群 ( $10^{4.30}$  TCID<sub>50</sub>/g) では4日目から死亡が観察され始め観察終了日に55%となった。一方3.0g群 ( $10^{3.52}$  TCID<sub>50</sub>/g) では3日目に死亡が認められ始め累積

死亡率は30日目まで40%となった (Fig. 3)。死亡魚および瀕死魚のウイルス検査の結果では3.0g群の1尾を除き全ての死亡魚からウイルスが分離され、ウイルス感染価は0.2g群で $10^{3.80} \sim 10^{5.55}$  TCID<sub>50</sub>/g, 0.5g群で $10^{2.55} \sim 10^{5.55}$  TCID<sub>50</sub>/g, 3.0g群で $10^{3.05} \sim 10^{6.80}$  TCID<sub>50</sub>/gであった (Table 8)。各群とも魚体内のウイルス量はほぼ同程度の値を示し魚体重による差は認められなかった。

次に魚体重3.0g~14.5gのニジマスに $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/尾のウイルスを接種した場合、3.0g群 ( $10^{4.82}$  TCID<sub>50</sub>/g) では3日目に80%, 5日目に90%の累積死亡率を示した。6.5g ( $10^{4.48}$  TCID<sub>50</sub>/g) 群では3日目より死亡が見られ始め17日目に累積死亡率が80%に達した。また14.5g ( $10^{4.12}$  TCID<sub>50</sub>/g) のニジマスでは接種後6日目に死亡が見られ始め、7日目に70%に達したが以後死亡は認められなかった (Fig. 4)。魚体内のウイルス量は3.0g, 6.5gおよび14.5g群の死亡および瀕死個体でそれぞれ $10^{3.80} \sim 10^{5.80}$  (Table 8),  $10^{4.35} \sim 10^{7.05}$  および $10^{5.80} \sim 10^{7.30}$  TCID<sub>50</sub>/g (Table 9) の価を示した。特に14.5g群の死亡魚では供試魚No. 3の $10^{7.30}$  TCID<sub>50</sub>/gの様に極めて高い値を示す個体が見られ、生残魚にも3尾中2尾から $10^{2.80}$  および $10^{2.55}$  TCID<sub>50</sub>/gのウイルス感染価が測定された。

さらに魚体重14.5gおよび18.2g群に $10^{6.00} \sim 10^{6.30}$  TCID<sub>50</sub>/尾のウイルスを接種した場合、14.5g群 ( $10^{4.83}$  TCID<sub>50</sub>/g) でウイルス接種後4日目から死亡が見られ始め12日目に累積死亡率は100%に達した。18.2g群 ( $10^{5.04}$  TCID<sub>50</sub>/g) ではウイルス接種後2日目に発症が見られ始め、3日目に死亡が確認され5日目には累積死亡率が30%, 観察期間終了時の15日目には80%に達した (Fig. 5)。死亡魚、瀕死魚の魚体内ウイルス量は14.5g群で $10^{5.05} \sim 10^{7.30}$  TCID<sub>50</sub>/gと高い価を示し、供試魚No. 1およびNo. 2のように $10^{7.05} \sim 10^{7.30}$  TCID<sub>50</sub>/gと極めて高い値を示す個体も見られた。しかし、18.2g群のウイルス感染価は $10^{4.30} \sim 10^{5.80}$  TCID<sub>50</sub>/gであり14.5gに比べ低い価であった (Table 9)。

また、体重が同じでウイルス接種量が異なる場合の累積死亡率を0.2g, 3.0g, 14.5g群を対象に比較した結果をFig. 6に示した。魚体重0.2gのニジマスに $10^3$  および $10^4$  TCID<sub>50</sub>/尾, すなわち $10^{3.70}$  および $10^{4.45}$  TCID<sub>50</sub>/g, 魚体重3.0gのニジマスに $10^4$  および $10^5$  TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{3.52}$  および $10^{4.82}$  TCID<sub>50</sub>/g), 魚体重14.5gに $10^5$  および $10^6$  TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{4.12}$  および $10^{4.82}$  TCID<sub>50</sub>/g) のHRVを接種した場合、累積死亡率は各魚体重共にウイルス接種量が少ない群に比べ、多い群では高い価を示した。

#### HRV と IHNV の病原性の比較

魚体重3.0gおよび6.5gのニジマスを供試してHRVとIHNVに対する感受性を比較した結果をFig. 7に示した。魚体重3.0gのニジマスにIHNVを $10^{4.30}$  TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{3.82}$  TCID<sub>50</sub>/g) 接種した群では3日目に45%, 4日目に90%, 5日目に100%の累積死亡率を示したが、HRVを $10^{4.00}$  TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{3.52}$  TCID<sub>50</sub>/g) 接種した群では3日目から死亡が見られ始めたものの観察終了時に40%の累積死亡率を示したにすぎなかった (Fig. 7 a)。しかし、HRV接種で死亡した個体では筋肉内の出血、腹水貯留、腎臓・脾臓の出血などが観察されたが (Plate 10, Fig. 51), IHNV接種群には死亡魚に激しい出血などの顕著な症状は認められなかった。

**Table 9.** Result of virus isolation from different size (body weight 6.5, 14.5, 18.2g) of rainbow trout infected with HRV by intraperitoneal injection.

Body weight	Challenged virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)	Fish			Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)
		No.	Days p.i. * <sup>1</sup>	condition	
6.5	5.30	1	3	D* <sup>2</sup>	7.05
		2	4	D	6.05
		3	4	D	7.05
		4	5	D	7.05
		5	6	M* <sup>3</sup>	6.55
		6	6	D	5.80
		7	7	M	6.30
		8	7	M	5.30
		9	8	M	6.80
		10	8	D	5.80
		11	9	D	5.80
		12	10	D	5.05
		13	11	M	4.55
		14	15	D	4.80
		15	16	D	5.30
		16	17	D	5.05
		17	30	S* <sup>4</sup>	≤1.80
		18	30	S	≤1.80
		19	30	S	≤1.80
		20	30	S	≤1.80
14.5	5.30	1	6	D	6.55
		2	6	D	6.80
		3	6	D	7.30
		4	6	M	6.80
		5	7	D	6.30
		6	7	D	6.05
		7	7	M	5.80
		8	30	S	2.80
		9	30	S	≤1.80
		10	30	S	2.55
	6.00	1	4	D	4.05
		2	4	D	7.30
		3	5	D	5.05
		4	5	M	6.05
		5	5	D	6.05
		6	5	D	6.80
		7	9	M	6.55
		8	7	S	6.05
		9	11	S	6.30
		10	12	S	5.05
18.2	6.30	1	3	D	4.30
		2	4	D	5.80
		3	5	D	5.55
		4	6	D	5.05
		5	6	D	5.05
		6	6	D	5.05
		7	8	D	4.30
		8	10	D	4.80

\*<sup>1</sup>, p.i.: post-infection. \*<sup>2</sup>, D: Died fish. \*<sup>3</sup>, M: Moribund fish. \*<sup>4</sup>, S: Survived fish.

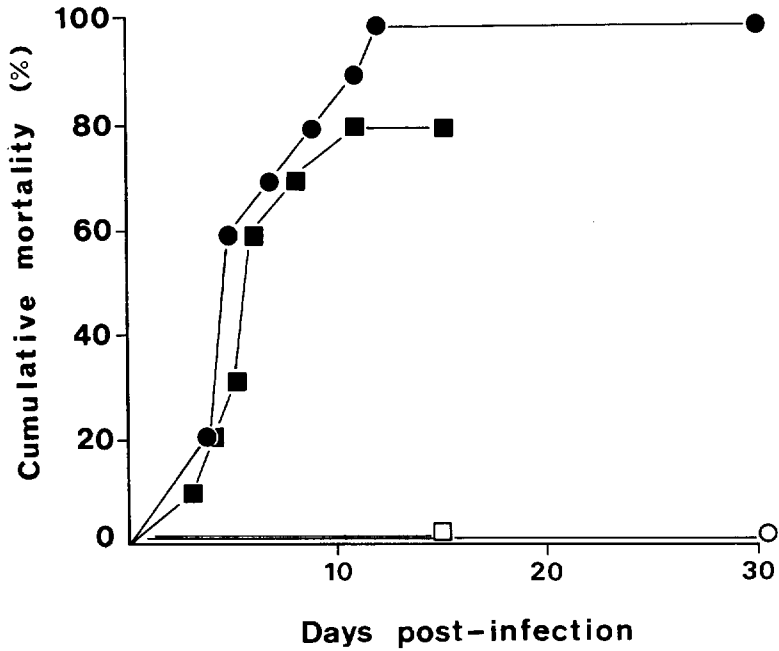


Fig. 5. Comparison of cumulative mortality in different sizes of rainbow trout (14.5g, 18.2g in body weight) infected with HRV by intraperitoneal injection (dose :  $10^{6.00}$ - $10^{6.30}$ TCID<sub>50</sub>/fish). ○△□ : Control group. ●▲■ : Test group. ○,● : body weight 14.5g. □,■ : body weight 18.2g.

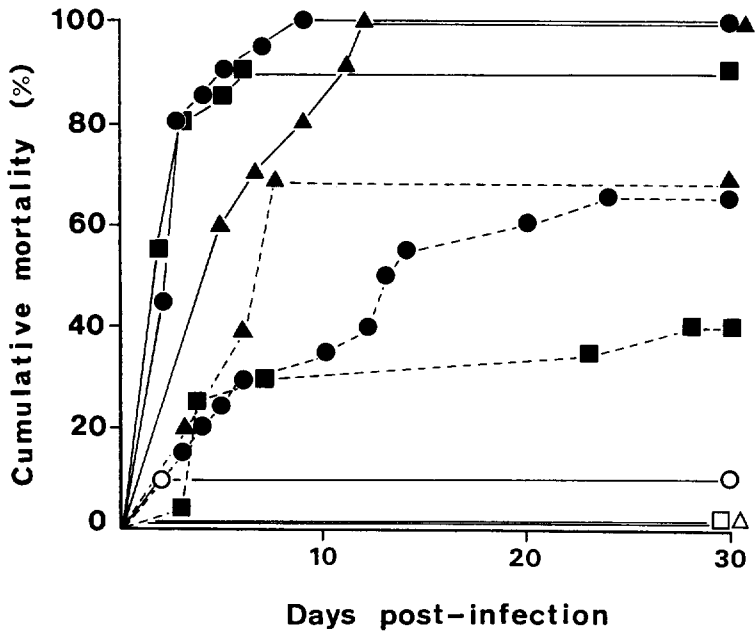


Fig. 6. Comparison of cumulative mortality of rainbow trout infected with different doses of HRV by intraperitoneal injection. ○ : body weight 0.2g. □ : body weight 3.0g. △ : body weight 6.5g. ●—● : dose:  $10^{3.00}$ TCID<sub>50</sub>/fish. ●—● : dose:  $10^{3.75}$ TCID<sub>50</sub>/fish. ■—■ : dose:  $10^{4.00}$ TCID<sub>50</sub>/fish. ■—■ : dose:  $10^{5.30}$ TCID<sub>50</sub>/fish. ▲—▲ : dose:  $10^{5.30}$ TCID<sub>50</sub>/fish. ▲—▲ : dose:  $10^{6.00}$ TCID<sub>50</sub>/fish.

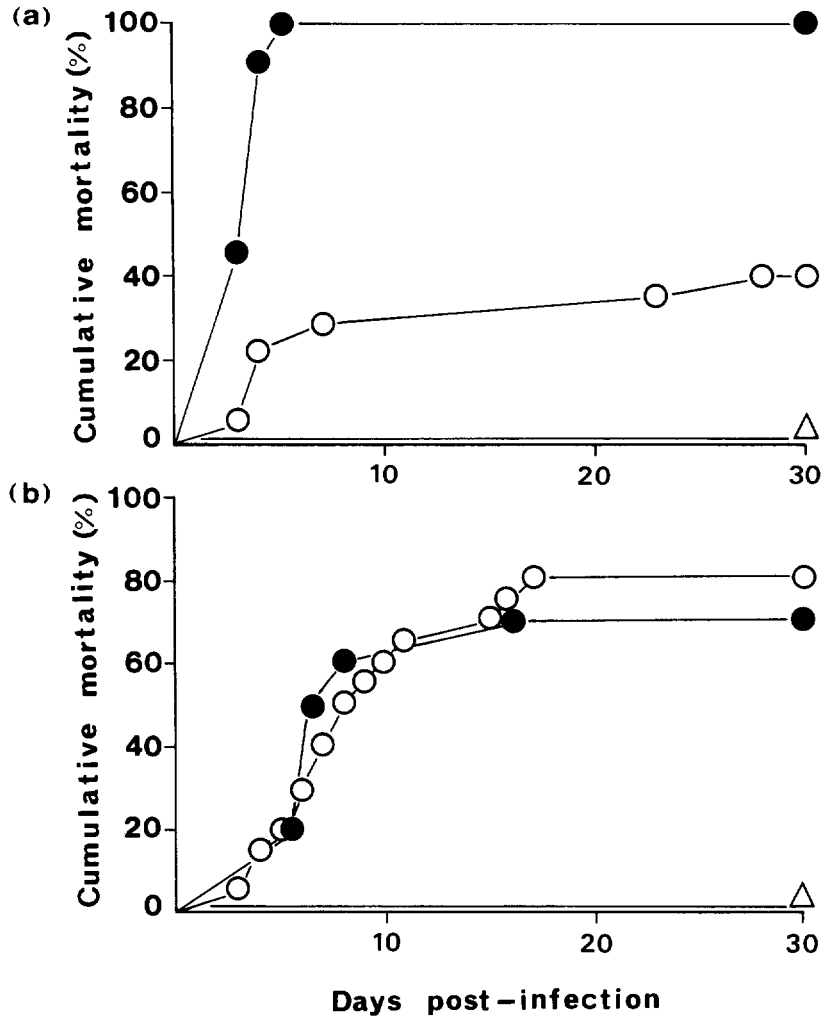


Fig. 7. Comparison of cumulative mortality in rainbow trout infected with HRV or IHNV by intraperitoneal injection. (a): Fish body weight 3.0g (The dose of HRV and IHNV was  $10^{4.00}$  and  $10^{4.30}$  TCID<sub>50</sub>/fish, respectively). (b): Fish body weight 6.5g (The dose of HRV and IHNV was  $10^{5.30}$  and  $10^{5.85}$  TCID<sub>50</sub>/fish, respectively).

△: control group. ○: test group of HRV. ●: test group of IHNV.

一方、魚体重6.5g群のニジマスに IHNV を  $10^{5.85}$  TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{5.04}$  TCID<sub>50</sub>/g) 接種した群では、5日目より死亡が観察され始め観察終了時には70%の累積死亡率を示した。HRV を  $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/尾 ( $10^{4.48}$  TCID<sub>50</sub>/g) 接種した群では3日目より死亡が見られ始め17日目に累積死亡率が80%に達した。この場合 IHNV 接種群と HRV 接種群の累積死亡率曲線はほぼ同様のカーブを示した (Fig. 7 b)。魚体内のウイルス量は3.0g群および6.5g群ともに死亡魚、瀕死魚からウイルスが分離され3.0g群の感染価は  $10^{3.05}$  ~  $10^{6.80}$  TCID<sub>50</sub>/g, 6.5g群でも  $10^{4.30}$  ~  $10^{6.30}$  TCID<sub>50</sub>/g (Table 10, 11) と高い価を示した。なお魚体重が6.5gの生残魚では HRV, IHNV 接種群ともウイルスは分離されなかった。

**Table 10.** Result of virus isolation from rainbow trout (body weight 3.0g) infected with HRV or IHNV by intraperitoneal injection.

Virus Species	Challenged virus titer (log TCID <sub>50</sub> /Fish)	Fish			Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)
		No.	Days p.i. * <sup>1</sup>	condition	
HRV	4.00	1	2	D* <sup>2</sup>	6.80
		2	2	D	≦1.80
		3	2	D	3.05
		4	30	S* <sup>3</sup>	≦1.80
		5	30	S	2.55
		6	30	S	2.30
		7	30	S	3.80
		8	30	S	3.30
IHNV	4.30	1	3	D	6.80
		2	3	D	5.80
		3	3	D	6.30
		4	3	D	6.30
		5	4	D	3.55
		6	4	D	3.30
		7	4	D	3.30
		8	4	D	3.55
		9	4	D	3.80
		10	4	D	5.55
		11	4	D	3.55
		12	4	D	3.05
		13	4	D	3.55
		14	5	D	3.80

\*<sup>1</sup>, p.i.: post-infection. \*<sup>2</sup>, D: Died fish. \*<sup>3</sup>, S: Survived fish.

## 考 察

HRV のニジマスに対する病原性を魚体重と接種ウイルス量の両面から検討したが、Table 12にまとめて示した様に供試したニジマスの魚体重範囲内 (0.2~18.2g) では1尾当りの接種ウイルス量が一定の場合、魚体重の増加と共にウイルスの病原性が低下する傾向が見られたが、魚体重が18.2gでも接種ウイルス量を多く (約 $10^5$ TCID<sub>50</sub>/g程度) すると累積死亡率が80%となり、強い病原性を示すことから、接種ウイルス量を供試魚1g当りで換算した場合、魚体重による差はさほど認められなかった。また魚体内のウイルス量は魚体重やウイルス接種量と関係なく、各群ともほぼ同様に高い値を示した。

このように HRV の病原性は魚体重には影響されず主にウイルス接種量により影響されることが明らかになったが、HRV の病原性を同じラブドウイルスに属しニジマスに対して強い病原性を示す IHNV と比較検討したところ、累積死亡率は魚体重3.0gの場合、HRV および IHNV 接種群で、それぞれ40%および100%、魚体重6.5g群では HRV および IHNV 接種群で

**Table 11.** Result of virus isolation from rainbow trout (body weight 6.5g) infected with HRV or IHNV by intraperitoneal injection.

Virus Species	Challenged virus titer (log TCID <sub>50</sub> /Fish)	Fish			Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)
		No.	Days p.i. * <sup>1</sup>	condition	
HRV	5.30	1	3	D* <sup>2</sup>	7.05
		2	4	D	6.05
		3	4	D	7.05
		4	5	D	7.05
		5	6	M* <sup>3</sup>	6.55
		6	6	D	5.80
		7	7	M	6.30
		8	7	M	5.30
		9	8	M	6.80
		10	8	D	5.80
		11	9	D	5.80
		12	10	D	5.05
		13	11	M	4.55
		14	15	D	4.80
		15	16	D	5.30
		16	17	D	5.05
		17	30	S* <sup>4</sup>	≤1.80
		18	30	S	≤1.80
		19	30	S	≤1.80
		20	30	S	≤1.80
IHNV	5.85	1	5	D	5.55
		2	5	D	5.55
		3	6	D	6.30
		4	6	D	5.80
		5	6	M	6.05
		6	8	M	5.55
		7	16	M	4.30
		8	30	S	≤1.80
		9	30	S	≤1.80
		10	30	S	≤1.80

\*<sup>1</sup>, p.i.: post-infection. \*<sup>2</sup>, D: Died fish. \*<sup>3</sup>, M: Moribund fish. \*<sup>4</sup>, S: Survived fish.

それぞれ80%および70%となった。このことから HRV の病原性は魚体重が軽い場合 IHNV より低く、魚体重が増すと IHNV とほぼ同程度となり、HRV は IHNV の様に宿主の魚体重による影響を受けにくい傾向のある点で両者は相違した。AMEND *et al.* (1973) や福田ら (1989) は、IHNV は主に稚魚期に感染し、1年魚で発病する場合は死亡率が低く、2年魚では発病しないことを報告している。一方、VHSV は体長6~8cmの稚魚から商品サイズ(250~300g)の成魚にまで被害が報告され、罹病する魚体サイズが広範囲に及ぶことが知られている(BELLET 1965)。したがって、ウイルスの病原性を魚体重の面から考察すると HRV は IHNV よりもむしろ VHSV に近いウイルスである可能性が示唆され、今後ニジマスの稚魚のみならず成魚に対しても HRV に対する感染防除策を講じる必要があると考える。



**Table 12.** Result of infectivity trails in different body weight of rainbow trout infected with HRV or IHNV by intraperitoneal injection.

Virus species	Challenged virus titer (log TCID <sub>50</sub> /fish)	Cumulative mortality					
		Body weight					
		0.2g	0.5g	3.0g	6.5g	14.5g	18.2g
HRV	3.00	65%					
		(3.70) *					
	3.75~4.00	100%	55%	40%			
		(4.45)	(4.30)	(3.52)			
	5.30			90%	80%	70%	
				(4.82)	(4.48)	(4.12)	
	6.00~6.30					100%	80%
						(4.82)	(5.04)
IHNV	4.30			100%			
				(3.82)			
	5.85				70%		
					(5.04)		

\*Challenged virus titer/body weight, (logTCID<sub>50</sub>/g).

### 第3節 HRV 人工感染ニジマスの病理組織像

前節までに HRV はニジマスに対してヒラメに対すると同様に強い病原性を有することを明らかにした。そこで HRV 感染症の発生が危惧されるニジマスについて、その予防、診断、防除策等を確立するための基礎的研究として、前節で人工感染試験に供試したニジマスを対象に HRV 感染症の病理組織学的検討を行い、第 I 章におけるヒラメ病魚の病理組織像と比較検討するとともに、IHNV 感染ニジマスの病理組織像とも比較検討した。

#### 材料と方法

##### 供試魚および供試組織

病理組織像の観察には前節で人工感染試験に供試したニジマスのうち 魚体重6.5gおよび14.5g, ウイルス接種量 $10^{5.30}$ TCID<sub>50</sub>/尾の群ならびに魚体重14.5g, ウイルス接種量 $10^{6.00}$  TCID<sub>50</sub>/尾の群およびそれぞれの対照群の魚を供試した。また HRV と IHNV の病理組織像を比較するために IHNV を $10^{5.85}$ TCID<sub>50</sub>/尾宛接種した6.5g群のニジマスを供試した。

HRV および IHNV 人工感染供試ニジマスは死亡直後および瀕死魚, 生残魚を対象とし, 瀕死魚および生残魚では 1 : 5000希釈のMS-222水溶液 2 l に 1 ~ 3 分間浸漬して麻酔を行ったのち実験に供試した。供試魚は腹部を切開し, 腎臓, 脾臓, 肝臓, 筋肉, 膀胱, 消化管を摘出し光顕用病理組織標本の作成に用いた。

##### 病理組織標本作製法

麻酔した供試魚を水槽より取り上げ、直ちにそれぞれの臓器を摘出し、ブアン氏液で1～2日間固定した。ついで前節で述べた方法に従いパラフィンブロックを作成し、4 $\mu$ mに薄切した後ヘマトキシレン-エオシン (H-E) 染色標本を作成し光学顕微鏡を用いて観察した。

## 結 果

### 腎臓 (体腎) :

対照群の腎臓 (Plate 11, Figs.52,53) と比較して、魚体重6.5gの瀕死魚の腎臓の造血組織細胞全体に核濃縮、核崩壊等核変性を伴う著しい壊死巣が観察され、造血組織中の毛細血管にも激しい出血が見られた (Plate 11, Fig.54)。この様な壊死巣では、塩基性色素による染色性の低下や細胞の融解壊死とその周囲に繊維素の沈着も観察された。しかし、腎臓の大部分占める尿細管上皮には顕著な変性は認められなかった。また魚体重14.5gの群ではウィルス接種量の異なる2群共に病魚の腎臓造血組織に上記と同様の病理組織像が認められた (Plate 11, Fig.55)。

IHNV 感染ニジマス病魚の腎臓では、HRV 感染病魚同様、造血組織細胞全体に核の膨化、濃縮、崩壊等の退行変性を伴う著しい壊死が観察された。さらに造血組織の壊死域中の尿細管上皮には核濃縮、核消失を伴う壊死変性が認められた (Plate 11, Figs.56,57)。

### 頭腎 :

腎臓同様、供試した3群全てのニジマス瀕死魚の頭腎には組織内全体に及ぶ著しい核退行を伴う壊死変性と激しい出血像が観察された (Plate 12, Fig.60)。壊死した組織は消失し、消失部分に置き代わり血球が浸潤して血海状を呈していた。また出血部には繊維素の沈着も観察された (Plate 12, Fig.61)。

IHNV 感染病魚の頭腎でも組織内全体におよぶ壊死および出血による血海像が認められ、HRV 接種群とほぼ同様な組織像が観察された (Plate 12, Figs.62,63)。

### 脾臓 :

HRV 感染群のニジマス病魚の脾臓ではウィルス接種後5日以内の比較的早期に死亡した個体に、中心動脈や莢動脈およびその周囲の莢組織に核消失を伴う融解壊死が観察され、脾髄組織中で小塊として分画されていた (Plate 13, Figs.66,67)。また、組織全体に広範囲に及ぶ核濃縮、核消失を伴う細胞の壊死像が観察されたが、瀰漫的であり顕著な巣状壊死は認められなかった。しかし、死亡に至る経過日数が増すに従い出血や壊死症状は著しくなり、比較的後期 (魚体重6.5gおよび14.5g、接種量 $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/尾の群でそれぞれ7日目および9日目以降) に死亡した個体の脾臓では組織内全体の壊死変性に加えて出血が著しく頭腎同様の血海状を呈し、繊維素の沈着も観察された (Plate 13, Figs.68,69)。魚体重14.5g、接種量 $10^{6.00}$  TCID<sub>50</sub>/尾の群でも比較的後期に顕著な出血や壊死は認められたが、血海状の変化は観察されなかった。

一方、IHNV 感染病魚の脾臓では発病経過に関係なく全ての発症魚において脾臓組織内全体に及ぶ瀰漫的な核の濃縮、消失を伴う壊死および脾髄部の中心動脈や莢動脈、莢組織の細胞融解壊死変性が観察されたが、HRV 感染病魚の組織内に見られた様な血海状を呈するほどの激

しい出血は認められなかった (Plate 13, Figs.70,71)。

#### 肝臓：

HRV 接種群のニジマス病魚の肝臓は死亡に至る経過日数の違いにより病理組織像が異なっていた。魚体重やウイルス接種量に関係なく、ウイルス接種後比較的早期に死亡した個体には顕著な病変は認められなかった (Plate 14, Figs.74,75)。しかし、魚体重6.5gおよび14.5g (接種量 $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/尾) の2群ではそれぞれ6日目および9日目に死亡した個体の肝組織中に部分的な出血と肝門脈や肝動脈の一部に充血が認められた。以後死亡に至る経過日数が増えるにつれて出血の度合が著しくなり、比較的後期 (魚体重6.5gおよび14.5g, 接種量 $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/尾) の群でそれぞれ11日目および12日目以降) に死亡した個体では組織中の各所に著しい出血が観察され、組織内全体に及ぶ広範囲な核濃縮を伴う細胞の壊死像が認められた。特に出血部位周囲の肝細胞では色素による染色性が低下し、水腫様の顕著な核融解を伴う細胞の融解壊死病巣が観察された。壊死巣周囲には間質の繊維組織と考えられる結合組織の増殖が若干観察された (Plate 14, Figs.76,77)。一方、魚体重14.5g (接種量 $10^{6.00}$  TCID<sub>50</sub>/尾) の群では死亡時期に関係なく顕著な変性は認められなかった。

IHNV 接種群のニジマス病魚では、死亡時期に関係なく組織内の各所に激しい出血が見られ、水腫様の核変性を伴う細胞の融解壊死が顕著に認められた (Plate 14, Figs.78,79)。このIHNV 感染魚の病理組織像は比較的後期に死亡したHRV 感染病魚の組織像とほぼ同じであった。

#### 体側筋：

HRV 感染魚では全ての病魚に外見的には線条、斑状に見られる体側筋内の毛細血管の充血および出血が観察された。組織像でも毛細血管中に多くの血球が密に詰まり血管が充血、怒張していた。また一部血管壁が破損し筋組織中に血球の浸潤像が観察された。特に全ての病魚で頭腎背側部の筋肉中の頭腎周囲および背側の真皮下部の出血が顕著であった (Plate 15, Figs.82,83)。

IHNV 感染病魚では筋肉中に点状の出血が観察されたが、HRV 感染病魚と比較した場合、出血が少ないかまたは全く認められない場合もあった (Plate 15, Figs.84,85)。

#### 膵臓：

膵臓では全ての群で部分的に外分泌部腺房の毛細血管周囲や外縁の細胞に核濃縮をともなう壊死が認められたが、腺細胞内の好酸性物質を含め外分泌部腺房全体に及ぶ顕著な壊死変性は観察されなかった (Plate 16, Figs.88,89)。

また、IHNV 感染病魚の膵臓でもHRV 感染病魚と同様に一部の外分泌部腺細胞に核濃縮を伴う壊死が観察された。しかし、組織全体には顕著な変化は認められなかった (Plate 16, Figs.90,91)。

#### 腸管：

HRV 感染病魚では魚体重やウイルス接種量に関係なく観察した全個体の腸管の粘膜層固有層、粘膜下組織、筋層ともに顕著な変性は認められなかった (Plate 17, Figs.94,95)。

一方、IHNV 感染病魚の腸管には粘膜下組織や緻密層中のエオシン好性顆粒細胞に核濃縮、核崩壊を伴う細胞壊死が観察された (Plate 17, Figs.96,97)。粘膜上皮では一部の細胞で核濃縮をとまう壊死が見られたが、筋層、膜では顕著な変性は認められなかった。また粘膜層、筋層中の毛細血管に充血・出血は観察されなかった。

### 考 察

前節で HRV の人工感染試験に供試したニジマスを対象に、まずその病理組織像をヒラメの組織像と比較検討すると共に、魚体重およびウイルス接種量が異なった場合に病理組織像上に現われる変化を観察した。

ニジマスでは多くの組織で魚体重およびウイルス接種量に関係なく同一の病理組織像を示した。すなわち、腎臓の造血組織では核濃縮、核崩壊等核変性を伴う著しい壊死と毛細血管の激しい出血が、脾臓の脾髄では中心動脈、莢動脈、莢組織に核変性を伴う顕著な融解壊死が、さらに体側筋、特に頭腎背側部では毛細血管の著しい充出血が観察された。なお、脾臓と肝臓では比較の後期に死亡した個体で接種ウイルス量の異なる 2 群で違いが認められた。接種量の少ない群では脾臓に組織内全体に及ぶ壊死と著しい出血が観察され、肝臓では組織中に著しい出血と核濃縮を伴う細胞壊死が認められた。これに対して、接種量の多い群では比較の後期に死亡した個体においても早期の死亡魚同様に脾臓の顕著な出血は見られず、肝臓の病変も認められなかった。このことは接種量が少ない場合、ニジマスでは出血性の貧血により死に至る期間が長くなり、脾臓の血管壁や肝臓組織内の変性が徐々に進行し、最終的に顕著な病変となって現われたものと推察される。

この HRV 感染ニジマスの病理組織学的所見を前章の HRV 感染ヒラメの病理組織像と比較した場合、両魚種ともに腎臓の造血組織に核濃縮、核消失、核膨化といった核の退行を伴う壊死像や著しい出血および脾髄組織に著しい核変性を伴う壊死が観察され、腎臓・脾臓が HRV の主な標的臓器である可能性が示唆された。また体側筋繊維間に血管の充血による怒張や毛細血管の出血が観察され、これらの腎臓、脾臓および筋肉の病理組織像が HRV 感染症の主な特徴であると考えられる。しかし、肝臓ではヒラメには病変が認められずニジマスでは顕著な出血および壊死がみられる個体と病変の見られない個体が存在し、腸管ではヒラメで観察された出

**Table 13.** Summary of comparative histopathology of HRV and IHNV infected rainbow trout.

Virus	Organ						
	Ant. Kidney	Kidney	Spleen	Liver	Muscle	Pancreas	Intestine
HRV	Necrosis	Necrosis	Necrosis	Normal	Hemorrhage	(Necrosis)	Normal
	Hemorrhage	Hemorrhage	Hemorrhage	Necrosis Hemorrhage			
IHNV	Necrosis Hemorrhage	Necrosis	Necrosis	Necrosis Hemorrhage	(Hemorrhage)	(Necrosis)	Necrosis

( ): Not remarkable.

血がニジマスでは認められなかった点が両者で相違していた。

次に人工感染による HRV 感染ニジマスの病理組織像を IHNV 感染ニジマスの組織像と比較した (Table 13)。両ウイルス接種群の累積死亡率はそれぞれ80%と70%とほぼ等しく、累積死亡率曲線も同様のカーブを示した (Fig. 7)。IHNV 感染ニジマスの病理組織は腎臓では HRV 感染魚同様、造血組織の顕著な壊死と出血、尿細管上皮の細胞変性および壊死が認められ、脾臓では組織内全体に及ぶ瀰漫的壊死および脾髄部、中心動脈や莢動脈、莢組織の壊死変性が顕著であった。これら IHNV 感染魚の病理組織像は HRV 感染魚と類似していたが、IHNV 感染魚では腎臓・脾臓の出血、筋肉の点状出血が顕著ではなく、肝臓では早期に死亡した個体を含め全個体に実質細胞の核変性を伴う壊死や出血が観察された。さらに腸管では粘膜下結合組織や緻密層中のエオシン好性顆粒細胞に核濃縮、核崩壊を伴う細胞壊死が認められた点 HRV 感染症の組織像と異なっていた。すなわち、HRV と IHNV 感染症を病理組織像の面から比較すると多くの点で類似しているものの、特に YASUTAKE (1970) により IHNV 感染魚に特有であると報告された粘液便垂下の原因と考えられる緻密層の好酸性顆粒細胞の壊死変性が HRV 感染魚では観察されず、HRV と IHNV 感染ニジマスは病理組織像の面からも明瞭に区別することができた (OSEKO *et al.* 1990)。IHNV および VHSV 感染症の死亡要因として腎臓組織の糸球体中の毛細血管の変性による腎炎が考えられ、ELGER and HENTSCHELL (1983) は VHSV に感染したニジマスの腎臓の糸球体を電顕により観察し、糸球体中の毛細血管壁に非水溶性で高分子の免疫複合体 (GN) の沈着を認め、これがニジマスの浸透圧調節を狂わせ、結果的に死亡に至らせると仮定している。さらに ELGER *et al.* (1986) はその根拠に腹水貯留や脳室内の水分貯留による眼球突出といった水腫を挙げ、また尿液中の電解質の変動も観察し、この仮説を支持する結果を報告している。しかしながら、HRV 感染ニジマスでは、尿細管には変性が認められず、腎小体の発達していない海産魚のヒラメ病魚にもニジマスと同様な腹水貯留等の水腫を引き起こすことから、HRV 感染魚の死亡要因としては糸球体の変性による浸透圧調節の機能障害よりも、ウイルスの主要な増殖場所と考えられる腎臓の造血組織の病理変性、末端の毛細血管の破損による血液循環障害が主であると考えられる。

### 第三章 In vitro および in vivo における HRV の 感染細胞中での増殖像

前章までに HRV 感染魚の病理組織像は IHNV および VHSV と類似した特徴を示すことを明らかにした。そこで HRV の培養細胞中における増殖像及び生成物について他のラブドウィルスとの異同を明らかにするため電子顕微鏡観察を行い、併せて生体内における HRV の増殖像について検討を行った。

本章ではまず第1節において培養細胞を用い in vitro で HRV 感染細胞を観察し、HRV の増殖過程と細胞に見られる HRV の構築物について観察して、IHNV, PFRV, EVA, EVEX

の4種のウィルスの増殖過程と比較検討した。次いで第2節では *in vitro* での知見に基づき、徳島県下で自然発症したヒラメ病魚および前章第1節で人工感染試験に供試したニジマスを対象に HRV の標的臓器である腎臓での増殖過程および増殖の場を *in vivo* で観察した。

## 第1節 *In vitro* における HRV の増殖像

前章までの病理組織学的検討結果から HRV 感染症は腎臓の造血組織、脾臓の脾髄に核変性を伴う顕著な壊死を引き起こすことが明らかとなった。HRV の感染魚体内での増殖部位および増殖過程を観察するに先立ち、まず HRV をはじめ魚類病原ラブドウイルスに幅広い感受性を有する RTG-2 細胞を供試し、*in vitro* における HRV の増殖過程および HRV 感染細胞の構造変化を既知の魚類病原ラブドウイルス IHNV、PFRV、EVA、EVEX の増殖像と比較検討した。

### 材料と方法

#### 供試細胞

供試細胞として、ニジマスの生殖線由来の RTG-2 細胞を用いた。細胞は直径2.5cmの組織培養用プラスチックプレート(テルモ)で MEM<sub>10</sub> Tris 培地を用い、15°C 24時間培養後感染試験に供試した。

#### 供試ウイルス

HRV は1984年に兵庫県下の養殖ヒラメから分離した8401-H株を、また対照の魚類病原ラブドウイルスとしては英国国立魚病研究所の B. J. HILL 博士より分与を受けた IHNV-H 株および EVA、東京水産大学の佐野徳夫博士より分与を受けた EVEX、さらに仏国国立水産研究所の P. DE KINKELIN 博士より分与を受けた PFRV 株の4株を供試した。これらの供試ウイルスは、使用するまで -80°C に保存した。

#### 細胞培養液中のウイルス量の測定

RTG-2 細胞に m.o.i. が 2 となるように各ウイルスを接種し、1時間の吸着を行った後 Hanks 液で洗浄し、新たに培地を加えて培養し、2時間おきに培養液の産生ウイルス量を測定した。なおウイルスの感染価は RTG-2 細胞を用いた常法のマイクロタイタープレート法により測定し TCID<sub>50</sub>/ml として示した。

#### 電顕試料作成

培養液のウイルス量を測定した細胞はパラフォルム・グルタルアルデヒド混合液で 4°C 12時間の前固定を行った。これらの細胞はシリコンポリスマンで剥して 3000r.p.m. で10分間遠心した後、上清液を捨て、カコジレート緩衝液で2回遠心洗浄を行い0.4%オスミック酸で4°C 2時間後固定した。後固定終了後カコジレート緩衝液で3回遠心洗浄を行い、以後前章で述べた方法にしたがって脱水し、エポン樹脂包埋を行い、超薄切片を作成した。作成した切片は酢酸ウラニール、酢酸鉛で2重染色を施し電子顕微鏡、日立H-7000を用い75kvで観察した。

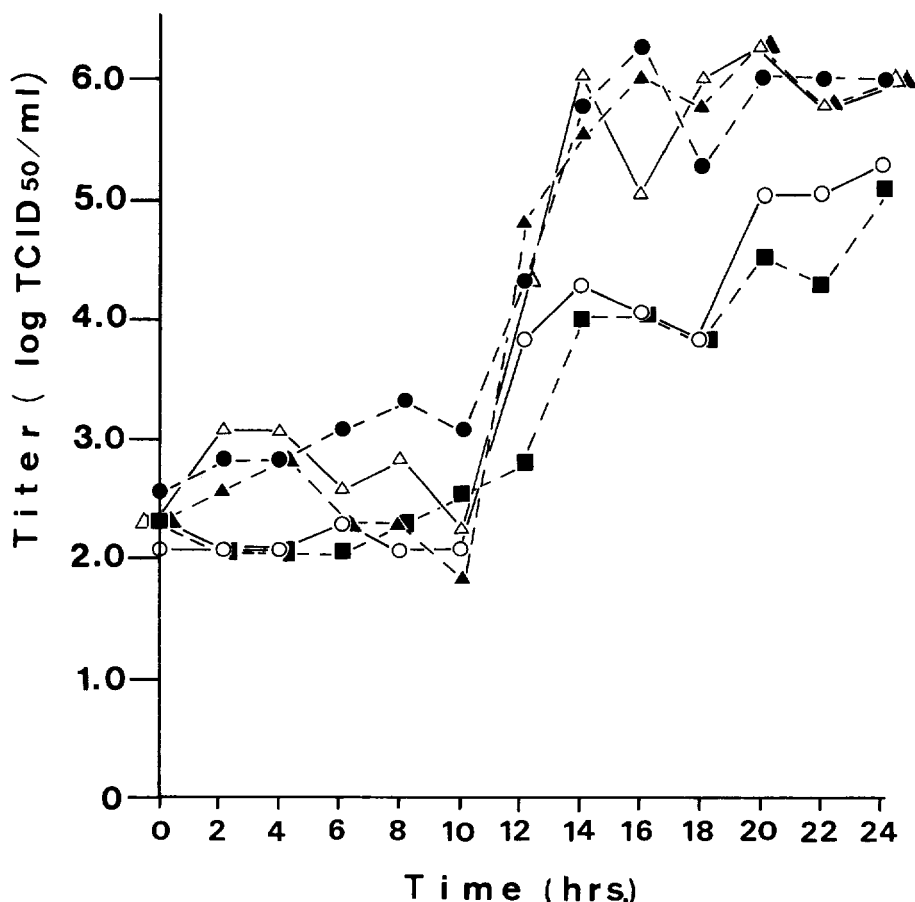


Fig. 8. Hourly trend of virus titers in cultured fluid on the RTG-2 cells infected with HRV, IHNV, PFRV, EVA and EVEX, respectively.

●—● : HRV. ○—○ : IHNV. ■—■ : PFRV,  
▲—▲ : EVA. △—△ : EVEX.

#### 光顕試料作成

電顕試料作成に用いた各ウイルス感染細胞のエポキシ樹脂包埋ブロックを  $1\mu\text{m}$  に薄切し、スライドガラスに載せ、1%トルイジンブルー、1%ホウ酸ナトリウム水溶液で  $60^\circ\text{C}$  に加温しながら5分間染色した。染色後水洗し、充分乾燥した後、封入し光顕観察を行った。

## 結 果

#### 細胞培養液中のウイルス量の経時変化

ウイルスを接種した細胞の培養液中のウイルス感染価の経時変化をFig. 8に示した。ウイルス接種後10時間目まではHRV, IHNV, PFRV, EVA, EVEXともにウイルス感染価はほぼ  $10^2 \sim 10^3 \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  と低い価を示したが、ウイルス接種後12~14時間目にかけて各ウイルスとも急激な感染価の増加が観察された。12時間目以降24時間目までHRVでは  $10^{5.30} \sim 10^{6.30}$

TCID<sub>50</sub>/ml, EVA では $10^{5.05} \sim 10^{6.30}$  TCID<sub>50</sub>/ml, EVEX では $10^{5.55} \sim 10^{6.55}$  TCID<sub>50</sub>/mlを示した。IHNV と PFRV では14時間目以降でも漸次増加してゆき、24時間目に感染価は IHNV および PFRV でそれぞれ $10^{5.30}$ および $10^{5.05}$  TCID<sub>50</sub>/mlに達した。

#### ウイルス感染細胞の顕微鏡観察

供試した各ウイルスによる細胞のCPEをPlate 18, Figs.98~103に示した。RTG-2細胞は繊維芽性細胞で通常偏平で紡錘形を示す(Plate 18, Fig.98)が、HRV感染後22時間目、IHNVでは20時間目に一部の細胞において核が膨潤して肥大化し、細胞の形態が緩やかな球形を示し、トルイジンブルーによる細胞質の染色性が低下した(Plate 18, Figs.99, 100)。PFRVでは20時間目に核および細胞の肥大化が観察された。しかし、細胞質の染色性には変化が見られなかった(Plate 18, Fig.101)。EVEA, EVEXでは16時間目に細胞が顕著な球形化を示した。この球状細胞は核が消失し、多くの空胞や顆粒状物質で満たされていた(Plate 18, Figs.102, 103)。いずれのウイルスでも形態変化を示す細胞は時間の経過に従って増加し、24時間目ではほとんどの細胞が変性を示した。

#### RTG-2細胞におけるウイルスの増殖像

##### HRV :

HRVを接種したRTG-2細胞の電顕像にはウイルス接種後6時間目までは対照の細胞と比べて変化は認められなかった。8時間目に細胞質全体の電子密度が低くなったが、所々に電子密度の高い大きさ $0.3 \sim 0.4 \mu\text{m}$ のミトコンドリアと考えられる円形または楕円形の構造物が観察された(Plate 19, Fig.104)。また、細胞膜の表面の一部に電子密度の比較的高い突起状構造物の出現が観察され始めた。ウイルス接種後10時間目も8時間目とほぼ同様であったが、12時間目になると一部の細胞の細胞膜上に初めてウイルス粒子の出芽像が認められた。12時間目以降になるとこの様なウイルスの出芽像が大部分の細胞の細胞膜表面に見られ、細胞間にもラブドウイルス群の特徴である砲弾型をした大きさ約 $80 \times 180 \text{nm}$ のウイルス粒子が観察された(Plate 19, Fig.105)。ウイルス接種後、時間が経つにつれ著しいウイルスの出芽像が観察され、細胞周囲に貯留しているウイルス量が増加した。またウイルス接種後12時間目から突起物の表面からも、ウイルスの出芽が認められた。この突起状構造物は12時間~24時間目の細胞膜表面上に頻繁に出現し(Plate 19, Figs.106, 107)、突起物は電子密度が比較的高く内部には微小繊維状の構造を持っていた。その形や大きさは切断面の太さが $1 \mu\text{m}$ で長さ $1.8 \mu\text{m}$ と非常に大きな棍棒状をはじめ直径約 $0.6 \mu\text{m}$ の球形(Plate 20, Fig.108)、幅約 $0.4 \mu\text{m}$ で長さ約 $1 \mu\text{m}$ の棒状のもの(Plate 20, Fig.109)、幅約 $80 \text{nm}$ で長さ約 $0.8 \mu\text{m}$ の紐状のもの、幅が狭い紐状で長さが $3 \mu\text{m}$ と非常に長いもの(Plate 20, Fig.110)等様々であった。ほとんどの突起物の表面には多くのウイルス粒子の出芽が認められた。形態を保持している細胞ではウイルス粒子の出芽像は細胞膜上に散在して見られるか、または細胞膜に出現した突起の表面上に集中して見られ、細胞質中には認められなかった。22~24時間後のRTG-2細胞では核が肥大し、細胞膜が破損して細胞内容物が流出していたり、細胞が収縮し細胞質の電子密度が高くなり細胞膜が複雑に湾曲するような著しい変性が見られ、崩れかけている細胞の表面や変性した細胞の間、さらに



細胞内の空胞にも多くのウィルス粒子が観察された (Plate 20, Fig.111)。

IHNV :

IHNV感染 RTG-2 細胞では HRV 感染細胞と同様、8 時間目までは対照の細胞と比較して変化は認められなかった。10時間目になると細胞質の電子密度が著しく低下し、逆に細胞質膜は電子染色で濃く染まり、細胞内に電子密度の比較的高いミトコンドリアと考えられる構造物が観察された。IHNV 感染細胞は HRV 感染細胞と比較してさらに細胞質の電子密度が低下し、細胞質自体の構成成分が希薄になった (Plate 21, Fig.112)。IHNV 粒子も12時間目より出芽像が観察され始め、大多数のウィルス粒子の出芽は細胞膜上で明瞭に観察され、大きさは約  $80 \times 160 \sim 180\text{nm}$  であった (Plate 21, Figs. 113, 114)。また、12時間目以降に HRV 感染細胞と比較して極めて希ではあったが HRV で観察された突起物と類似した棒状の突起状構造物が観察され、その表面にはウィルス粒子の出芽が観察された (Plate 21, Fig.115)。しかし、紐状の突起物は認められなかった。20時間目になると HRV と同様に細胞質の電子密度の高い細胞質中に多くの空胞を持つ球形化した細胞が観察された。

PFRV :

PFRV 感染細胞もウィルス接種後10時間目までは感染細胞になんらの変化も認められなかったが、12時間目になると細胞質膜にウィルスの出芽像が観察され始めた。ウィルス粒子の大きさは約  $60 \sim 80 \times 130 \sim 150\text{nm}$  であった (Plate 22, Figs.116, 117)。観察されたウィルス粒子のほとんどは形態の保持が悪く、ウィルスの外部形態および内部形態を明瞭に観察することは困難であった。細胞質は HRV や IHNV で観察された様な細胞質の電子密度の低下や変性したミトコンドリア様の構造は認められなかった。また、12時間目の感染細胞では細胞膜表面に特有の竿状や袋状構造物が観察された。竿状の構造物は横断面が直径  $40 \sim 50\text{nm}$  の円形で、最大長が約  $1 \mu\text{m}$  非常に長く、中空で電子密度の高い縁を持っていた (Plate 22, Fig.118)。袋状構造物は最大のもので幅  $267\text{nm}$ 、長さ  $600\text{nm}$  の大きさを示し、竿状構造物と同様に中空で電子密度の高い縁を持っていた (Plate 22, Fig.119)。また、感染細胞の細胞膜は一部に崩壊が見られ波状を示していた。20時間目には HRV 感染細胞で見られた球形化した細胞と同様な細胞が観察された。

EVA :

EVA 感染細胞ではウィルス接種後10時間目までは変化が認められず、ウィルス粒子の出芽像が観察された時間は他のウィルスと同様にウィルス接種後12時間目であった (Plate 23, Figs.120, 121)。この時の細胞質の染色性やミトコンドリアには、PFRV 感染細胞と同様に変化は見られなかった。ウィルスの出芽は細胞膜のみで観察され、HRV で見られた突起物や PFRV で観察された竿状、袋状構造物は認められなかった。なお、ウィルス粒子の大きさは約  $55 \times 160 \sim 180\text{nm}$  であった。

EVEX :

EVEX 感染細胞でも他のウィルスと同様に10時間目まで変化は認められず、12時間目に初めて大きさ約  $60 \times 160 \sim 180\text{nm}$  のウィルス粒子の出芽が観察された (Plate 24, Fig.122)。細胞質の

染色性には PFRV, EVA 感染細胞と同じく変化は認められなかった。また12時間目に細胞膜表面に PFRV で観察されたものと同様な幅65~80nm, 長さ1.5 $\mu$ mほどの大きさの竿状または袋状構造物が観察された (Plate 24, Fig.123)。しかし, HRV 感染細胞で観察されたような突起状構造物は認められなかった。ウイルス接種後16時間目から球形化した感染細胞が認められ始めた。この球形化した細胞は細胞質の電子密度が高く, 特にミトコンドリアが著しく濃染して, 内部には多くの空胞が観察された (Plate 24, Fig.124)。24時間を経過すると球形化し崩壊した細胞が多く観察され, 細胞内の空胞中や湾曲した細胞膜上およびその周辺に多くのウイルス粒子が観察された (Plate 24, Fig.125)。

### 考 察

今回供試した HRV, IHNV, PFRV, EVA および EVEX はいずれも細胞の球形化を特徴とする CPE を発現したが各ウイルス感染細胞の切片を光顕観察したところ, HRV, IHNV, PFRV では20~22時間目, EVA, EVEX では16時間目から細胞の球形化が観察された。また HRV, IHNV, PFRV では核の肥大化と染色性の低下, EVA, EVEX では核の消失と空胞・顆粒状物質の充満が観察される等の相違も明らかにされた。一方, 電顕観察の結果は Table 14 にまとめた。BARONIET *et al.* (1982) は VHSV を感染させた RTG-2 細胞で同様の観察を行い, ウイルス接種後8時間目に細胞質中に顆粒状繊維構造の束やゴルジ体様の空胞, 12時間目に顆粒状繊維構造周辺で電子密度の高いリング状構造物および細胞膜表面に中空なウイルス粒

**Table 14.** Comparative electron microscopical characteristics of morphological changes on RTG-2 cells infected with different fish rhabdovirus, HRV, IHNV, PFR, EVA and EVEX.

Virus	Character		
	8-10 hr. P.I.*	12 hr. P.I.	12-24 hr. P.I.
HRV	Lower electron-dense of cytoplasm Degeneration of mitochondria	Budding of viral particles (80 $\times$ 180nm)	Club-like, cord-like protuberance
IHNV	Lower electron-dense of cytoplasm Degeneration of mitochondria	Budding of viral particles (80 $\times$ 160~180nm)	Club-like protuberance
PFRV	—	Budding of viral particles (60~80 $\times$ 130~150nm)	Rod-like, bubble-like structure
EVA	—	Budding of viral particles (55 $\times$ 160~180nm)	—
EVEX	—	Budding of viral particles (60 $\times$ 160~180nm)	Rod-like, bubble-like structure

\*: post infection.

子のエンベロープ様構造 (empty virus envelopes) を観察している。またウイルス粒子の出芽は24時間目からで、平均粒子サイズは $57 \times 165 \text{nm}$ であったと述べている。

本節で観察した結果およびVHSVに関する報告 (BARONI *et al.* 1982) に基づき各ウイルスを比較すると、まずウイルスの出現時期は各ウイルスともに12時間目前後であった。VHSVではBARONI *et al.* (1982) が24時間目としているが、DE KINKELIN and SCHERRER (1970) は11時間目に出芽を観察している。m.o.i.を1~2とした場合、魚類ラブドウイルスは12時間目前後が出芽時期と考えられる。顕微鏡観察で感染細胞の球形化および核の変性が観察された時期は最も早いEVA, EVEXでも16時間目以降であり、ウイルスの増殖は細胞の形態変化より前に既に始まることが明らかとなった。なお観察されたウイルス粒子はPFRVを除き、各ウイルスとも約 $60 \sim 80 \times 160 \sim 180 \text{nm}$  (PFRVは長さ $130 \sim 150 \text{nm}$ ) 程度の大きさで、ネガティブ染色の結果 (ZWILLENBERG *et al.* 1965, DARLINGTON *et al.* 1972, FIJAN 1972, DE KINKELIN *et al.* 1973, COHEN and LENOIR 1974, OLBERDING and FROST 1975, SANO 1976, SANO *et al.* 1977) と一致した。

つぎにウイルス粒子が出芽する迄の細胞内の変化はHRV, IHNVで8~10時間目に細胞質の電子密度が低下しミトコンドリアに変性が観察されたがPFR, EVA, EVEXでは変性は認められず、*Lyssavirus* 属に特有な変化と考えられた。一方、BARONI *et al.* (1982), ZWILLENBERG *et al.* (1965), DE KINKELIN and SCHERRER (1970) らはVHSVで顆粒状繊維およびリング状構造物を報告し、これらがウイルス形成に関与することを指摘している。しかし、本節で観察したウイルス感染細胞にはこれらの構造物は観察されなかった。

ウイルスの出芽時期にはPFRVおよびEVEXで電子密度の高い縁で囲まれた中空の竿状および袋状構造物が観察された。類似した構造物はVHSVでBARONI *et al.* (1982) により観察され、エンベロープのみの空のウイルス粒子とされている。したがって、PFRVおよびEVEXで見られたこれらの構造物も空のウイルスであると考えられるが、今後さらに検討する必要があるものと思われる。一方、HRVおよびIHNV感染細胞に比較的電子密度が高く内部に微小繊維構造を持つ突起状の構造物が細胞膜表面上に観察されその表面に多くのウイルス粒子の出芽像が観察された。特にHRV感染細胞で頻繁に見られたこの突起状構造物はIHNVでは極く希であり、他のウイルスでは見られずVHSVにも報告例がないことからHRVに特徴的なものと考えられる。HRVと同じ*Rhabdovirus* 科 *Lyssavirus* 属の狂犬病ウイルス (rabies virus) は細胞質内にネグリ小体やリッサ小体等の特有な封入体を形成する (MATUMOTO 1962, MATUMOTO *et al.* 1974) ことが知られ、HRV感染細胞で観察された突起状構造物は細胞表面上に形成されたがこの突起物表面に多くのウイルス粒子の形成が見られることから、ネグリ小体の一種である可能性が示唆された。また現在狂犬病ウイルスの診断に蛍光抗体法や酵素抗体法によるネグリ小体の検出が行なわれている (COONS and KAPLAN 1950) ことから、この構造物がHRVの迅速診断に応用できる可能性が示唆されたが、この点に関しては今後の検討課題である。

## 第 2 節 In vivo における HRV の増殖像

本節では HRV の標的組織での増殖部位および増殖過程を検討すると共に、特徴的な構築物の有無を観察することを目的として徳島県下で自然発症したヒラメおよび人工的に HRV に感染させたニジマスの腎臓の電顕観察を行なった。

### 材 料 と 方 法

#### 供試魚および供試組織

1988年3月に徳島県水産試験場内で飼育中に自然発症したヒラメ病魚3尾および前章で人工感染試験に供試した魚体重18.2gのニジマス18尾を供試した。

供試ヒラメ病魚は、発症が観察された後、直ちに開腹して腎臓を摘出した。またニジマスは前章第3節と同一の条件で飼育後同一条件でウイルス接種を行い、接種直後より毎日1回5日間（発症の観察され始めた2日目のみ1日2回）、3尾ずつを取り上げMS-222で麻酔後腎臓を摘出し、両魚種共に電顕用試料の作成に供試した。なお、人工感染したニジマスについては前章と同様の方法でウイルス感染価の測定を行なった。

#### 電顕標本の作成

摘出した腎臓は細切し、パラフォルム・グルタルアルデヒド混合液で4℃8時間前固定を行い、0.1Mカコジレート緩衝液で2回洗浄し、次いで1%オスミック酸で4℃2時間後固定した。固定後同緩衝液で3回洗浄し、50, 70, 80, 90, 95%のエタノールで0℃15分間ずつ順次脱水し、さらに100%エタノールで15分間ずつ3回脱水した。ついで置換剤QY-1（応研社）で30分、エボン樹脂（Epok812, 応研社）とQY-1の混合液（エボン樹脂：QY-1 = 1 : 3, 1 : 1, 3 : 1）で順次2時間ずつ樹脂を浸透、置換させエボン樹脂に包埋した。エボン樹脂は60℃で12時間硬化させてブロックとし、ウルトラミクロトームで薄切した後、酢酸ウラニル、クエン酸鉛で二重染色を行い日立製電子顕微鏡H-7000を用い75kvで観察した。

### 結 果

#### 自然発症ヒラメの電顕像

作成標本中のウイルス粒子を見出すことは非常に困難であったが、供試した3個体中2個体の腎臓組織内に造血組織の細網細胞の細胞膜表面や崩壊している細胞中に大きさ約80×180 nmの砲弾型のウイルス粒子が観察された（Plate 25, Figs.126~129）。しかしながら、観察されたウイルス粒子の大部分は形態保持がよくなく、またHRV感染による特異な構築物を他の細胞構造物と明瞭に区別して見出すことが困難であった。

#### 人工感染ニジマスの電顕像

まず供試魚の魚体内ウイルス量を Table 15 に示した。電顕観察に供試したニジマスではウイルス接種後2日目から発症が見られ始め、2.5日目に取り上げた3尾はいずれも $10^5$  TCID<sub>50</sub>/g以

**Table 15.** Virus infectivity of the rainbow trout employed for ultrastructural observation, infected with HRV (dose:  $10^{6.30}$ TCID<sub>50</sub>/fish) by intraperitoneal injection.

Fish No.	Days post infection	Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)
1	1	3.80
2		4.05
3		5.80
4	2	3.80
5		5.55
6		4.30
7	2.5	5.05
8		6.80
9		5.30
10	3	5.05
11		2.80
12		5.30
13	4	4.80
14		3.55
15		5.05
16	5	≤1.80
17		4.55

上と比較的高いウイルス感染価を示した。

ウイルス接種後1日目から5日目までの全個体の腎臓を対象に電顕観察を行なったが、ウイルス接種後1, 2日目の供試魚の腎臓組織の細胞は対照群と比較して特に変化は見られず、ウイルス粒子も認められなかった。魚体内ウイルス感染価が比較的高い価を示した2.5日目の個体では3尾中2尾, 3日目の個体では3尾中1尾の造血組織にウイルスの出芽像が認められた。特に2.5日目の魚体内ウイルス感染価が $10^{6.80}$  TCID<sub>50</sub>/gと最も高かった個体では多くのウイルス粒子が観察された。ウイルスの出芽像は細網細胞膜や膜上の突起状構造物の表面 (Plate 26, Figs. 130, 131; Plate 27, Figs. 132~135) にみられた。ウイルス粒子は大きさ約 $80 \times 180$ nmの砲弾型を示していたが、粒子の形態保持の程度は良好ではなかった。ウイルス接種後4, 5日目では壊死崩壊が著しく、ウイルス粒子は確認できなかった。

#### 考 察

自然発症ヒラメおよび人工感染ニジマスでは、共に標的臓器である腎臓の造血組織中の細網細胞の膜表面上にウイルス粒子の出芽像が確認され、HRVは造血組織が増殖場所であることが電顕像からも明らかとなった。またHRVはヒラメおよびニジマス感染魚の腎臓組織中で粒子を観察することが難しく、観察されたウイルス粒子も形態の保持が良好ではなかった。細胞膜表面に出芽して増殖するタイプのラブドウイルスは生体内で浸透圧や生体内に存在する酵素などの影響を受けて、変性し易いと考えられ、粒子の構造が脆いウイルスは長期間生体内で形態を保持することが難しいと推察される。同じ魚類病原ラブドウイルスであるIHNVおよび

VHSV の *in vivo* でのウイルス粒子の観察では AMEND and CHAMBERS (1970) が IHNV を人工感染させたギンザケ稚魚の頭腎、脾臓、幽門垂、膀胱、肝臓の電顕観察を行い、頭腎の造血組織および脾臓の脾髄部および幽門垂や膀胱の結合組織中に大きさ  $90 \times 158 \text{nm}$  の明瞭なウイルス粒子を多数観察している。一方 VHSV では OZEL and SCHWANZ-PFITZNER (1975) が自然発症魚および人工感染魚の腎臓、脾臓等の電顕観察を行なったがウイルス粒子を観察することが出来できなかったと報告している。また AMLACHER *et al.* (1980) はニジマスに VHSV を人工感染させ、激しい症状を示した病魚10尾の腎臓の電顕観察を行なったところ2尾には大きさ  $55 \sim 68 \times 166 \sim 216 \text{nm}$  のウイルス粒子が観察されたが、残り8尾には蛍光抗体法によりウイルスの存在が確認されているものの、ウイルス粒子は観察されなかったと報告している。これらの報告から HRV 粒子は VHSV と同様 IHNV に比して形態変化が起き易いものと推察された。

しかし、HRV 人工感染ニジマスの腎臓では造血組織の細網細胞の細胞膜上に前節の *in vitro* での HRV 感染 RTG-2 細胞の観察において見られたような突起状の構造物が観察され、その表面にはウイルス粒子の出芽像が認められた。この様な突起状構造物は IHNV や VHSV では報告例がなく HRV 独自の構造物であることが示唆された。

#### 第IV章 HRV の防除対策の検討

前章までに HRV はヒラメおよびニジマスに対して強い病原性を有し、今後ヒラメ養殖場のみならずサケ・マス養殖場においても HRV の伝播に十分に留意する必要があることが示唆された。

しかし、ウイルス性疾病に関しては効果的な治療法がなく、病原体の伝播防止等、防疫に頼らざるを得ない現状にある。魚類病原ラブドウイルスの防疫対策としては、幼稚魚の飼育水温を調節する方法 (AMEND 1970) をはじめ、ワクチンの開発 (AMEND 1976, FRYNER *et al.* 1976, 福田ら1989) や化学療法剤 (HASOBE and SANEYOSHI 1985a, b, 木村ら1987) の検討等の研究が為されている。ワクチンに関しては IHNV の弱毒化生ワクチンの開発およびその有効性に関する二、三の報告がみられているもの (FRYER *et al.* 1976, AMEND 1976, 福田ら1989)、開発に要する時間、他魚種への安全性や遺伝学的な安定性の面から実現にはまだ問題が残されている。一方、飼育水温の調節に関しては IHNV の場合、 $18 \sim 20^\circ\text{C}$  と水温が高くなるにつれ死亡率が減少すること、また VHS では自然発症例の水温の上限が  $15^\circ\text{C}$  付近であり、人工感染試験では飼育水温が高いほど魚体内ウイルスの残存期間および量が減少すること等が報告され (GHITTINO 1965, AMEND 1970, JØRGENSEN 1982, CASTRIC and DE KINKELIN 1984)、水温制御の有効性が示唆されている。また、現在最も効果的かつ広く用いられている方法は卵をポピドンヨード剤により消毒し、その後ウイルスフリーの環境下で飼育するいわゆる二段階方式であり (AMEND and PASCHO 1972, MULKAHY 1983, 木村ら1989)、我国でも市販のヨード剤 (イソジン; 有効ヨード 1%) による卵の消毒 (50ppm 15分) が一般的に行なわれ効を奏して

いる。また吉水ら(1986)は紫外線照射によるウイルス不活化効果を明らかにし、IHNV汚染水の紫外線処理による不活化および同処理水を用いたニジマスの飼育例を報告している(YOSHIMIZU *et al.*, 1990)。

ところで前章までに HRV の自然発症例では兵庫県下の 2 例の場合、水温は 6~18℃、北海道の場合は 2~12℃、また香川県下の例でも 8~16℃といずれも水温が 15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられ、HRV 感染発症に水温が大きな影響を及ぼしていることが示唆された。そこで本節ではまず第 1 節で水温制御による HRV 感染症の予防法を確立するため HRV の人工感染に及ぼす水温の影響について検討し、第 2 節では飼育環境、器具および器材の HRV 汚染防止ならびに親魚から卵へのウイルス伝播防止策の確立を目指し、紫外線および各種消毒剤の HRV 不活化効果を検討した。

## 第 1 節 HRV 感染発症に及ぼす水温の影響

HRV 感染症の自然発症例では水温が 15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられ、水温が HRV 感染発症に影響を及ぼすものと推察された。同じ魚類病原ラブドウィルスの IHNV や VHSV の感染発症にも水温が大きく影響していることが報告されている(AMEND 1970, JøRGENSEN 1982)ことから、本節では HRV 感染症の防除対策確立の基礎として HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を検討した。

### 材 料 と 方 法

#### 供試魚

1985年11月にヒラメ1年魚(体長11.9~19.7cm, 平均体長16.1cm, 体重12~73g, 平均体重44.3g)50尾を、北海道泊町の養魚場から北海道大学水産学部構内の実験水槽中に設けた飼育水槽に移し、1群を10尾として5群に分け、水温を5, 10, 15および20℃として飼育した。対照群はいずれも一週間予備飼育後実験に供した。なお、飼育装置は多量の海水の入手が困難であったことより循環水方式とした。飼育水槽は、50ml容の大型プラスチックコンテナを用い、上面ろ過装置を設置した。水温の調節はヒーターとクーラーを併用して、水温を各温度とも±1℃になるように設定した。

#### 供試ウイルス

供試ウイルスとしては HRV8401-H 株を用い、RTG-2 細胞で培養後、バイアルチューブに分注し、実験に供すまで -80℃ に保存した。なお保存したウイルス液の感染価は  $10^{6.30}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった。

#### 人工感染実験法

人工感染実験は腹腔内接種法によった。MS-222で麻酔後、 $10^{5.30}$ TCID<sub>50</sub>/尾となるようあらかじめ調製してあったウイルスを0.1ml宛腹腔内に接種し、15日間経過を観察した。対照群はMEM<sub>10</sub>で同様の処理を行った。

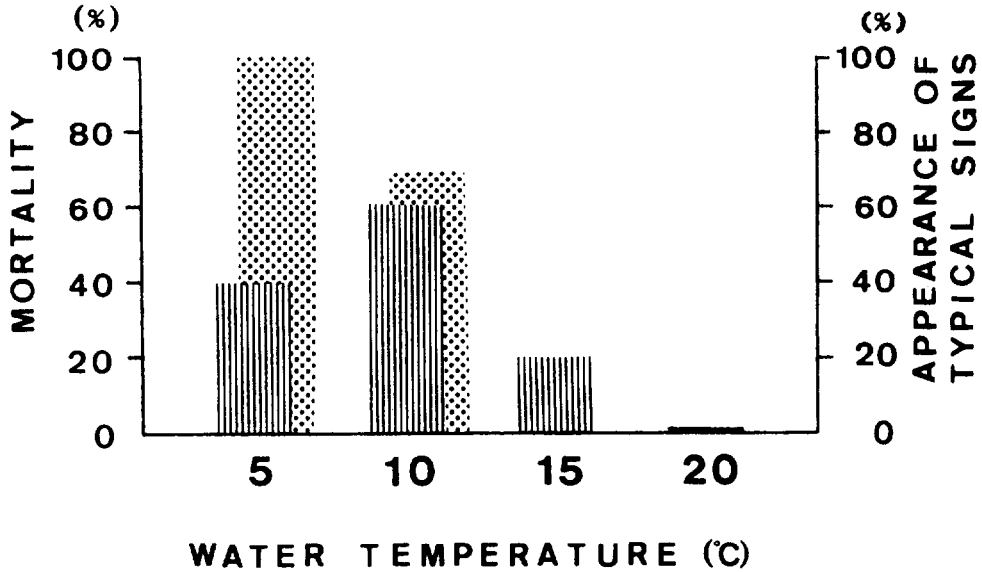


Fig. 9. Effect of water temperature on cumulative mortality and appearance of the typical signs of disease in the hiramé after 15 days of artificial infection with HRV; dose, I.P. $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/fish.  
 ||||| : Dead fish.  
 : Fish showing the typical sign.

#### 細菌およびウイルス検査法

供試魚を無菌的に開腹した後、腎臓組織を一白金耳量2%塩化ナトリウム加トリプトケースソイ寒天培地に接種し、25°Cで1週間培養し細菌感染の有無を観察した。次いで腎臓、脾臓を摘出し、10倍量の Hanks 液を加えストマッカーを用いてホモジナイズし、ミリポアフィルター HA (0.45 $\mu$ m) で濾過し、ウイルス検査試料とした。ウイルス感染価は、第II章第1節で述べた RTG-2 細胞を用いた常法の96穴マイクロプレート法により測定した。なお分離ウイルスの同定は、抗 HRV (8401-H) 家兎血清による中和試験によった。

#### 病理組織標本の作成法

各試験群の瀕死魚、観察終了時の生残魚（以下生残魚）の腎臓および脾臓を摘出し、第I章第2節と同様の方法に従い病理組織標本を作製した。

#### 電顕標本の作成

5°C試験群の瀕死魚の腎臓を細切し、第III章第2節と同様の方法に従い電顕標本を作成し、日立製電子顕微鏡H-7000を用いて75kVで観察した。

#### 血中中和抗体価の測定法

供試魚血清の倍々希釈液列を Hanks 液で作成し、96穴マイクロタイタープレートに50 $\mu$ l 宛1希釈につき4穴に分注後、200TCID<sub>50</sub>/50 $\mu$ l/穴に調製した HRV を加え、15°Cで60分間反応させた。対照には、血清のかわりに Hanks 液を50 $\mu$ l 加え混合した。次いで MEM<sub>10</sub>で $1.0 \times 10^5$ /mlに調製した RTG-2 細胞を各穴に100 $\mu$ l ずつ分注し、15°Cで10日間培養し、常法により ND<sub>50</sub> を求めた。



**Table 16.** Results of virus reisolation from hirame injected with HRV.

Exp. group	Water temp. (°C)	Fish		Virus titer (log TCID <sub>50</sub> /g)
		No.	condition	
Control	10	1	N* <sub>1</sub>	<1.80
		2	N	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80
		6	N	<1.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	N	<1.80
Test	5	1	D* <sub>2</sub>	≧8.80
		2	M* <sub>3</sub>	≧8.80
		3	M	7.30
		4	D* <sub>4</sub>	7.30
		5	S	≧8.30
		6	S	8.30
		7	S	8.05
		8	S	≧8.80
		9	S	≧8.80
		10	S	8.30
Test	10	1	D	7.05
		2	D	6.80
		3	D	7.80
		4	M	5.80
		5	D	6.05
		6	M	5.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	S	5.30
Test	15	1	D	<1.80
		2	D	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80
		6	N	<1.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	N	<1.80
Test	20	1	N	<1.80
		2	N	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80

\*<sub>1</sub>, N: Normal fish. \*<sub>2</sub>, D: Died fish. \*<sub>3</sub>, M: Moribund fish\*<sub>4</sub>, S: Diseased fish (survived).

### 血球染色

血液約50 $\mu$ lをスライドグラスに広げて風乾し、血球の薄層塗抹標本を作成してメイ・グリュンワールドギムザ染色を施し光顕で観察した。

### ヘマトクリット値の測定

瀕死魚および生残魚を水槽より取り上げ、尾柄部を切断し、ヘマトクリット管(テルモ)に採血した。ヘマトクリット管は10,500rpm 5分間遠心し、ヘマトクリットリーダーにて全血液量に対する赤血球量の百分率を測定した。

## 結 果

### 累積死亡率

HRV 腹腔内接種15日目の各水温における供試魚の累積死亡率をFig. 9に示した。なお、病理組織標本作成の為に取上げた瀕死魚も死亡試験群尾数に含めた。5℃は、他の試験群と比較し当初から動作が緩慢で、発症による遊泳動作の変化等の観察が困難であった。10日目ごろに発症が観察され11日目に3尾が死亡した。さらに13日目に1尾が死亡し、累積死亡率は40%に達した。生残魚にも発症がみられ、観察終了時の累積死亡率は変わらなかったものの残りの個体全てにも筋肉内出血、体色黒化、生殖腺の発赤、腹水貯留などの著しい症状が観察された。10℃試験群では4～5日目に発症が認められ、背側、腹側の体側筋中に出血のある個体が観察された(Plate 28, Figs. 136, 137)。発症個体は、体色が黒化し、動作が緩慢となり、水底に静止したり水面近くをフラフラ遊泳するといった異常遊泳が観察された。6日目に1尾、8日目に3尾さらに10日目に2尾死亡し累積死亡率は60%に達した。なお実験最終日でさらに1尾に発症が認められた。15℃試験群では5日目に1尾さらに13日目に1尾が死亡し、累積死亡率は20%となったが、いずれの個体にも症状は認められなかった。20℃試験群では、観察期間を通じていずれの個体にも変化はみられなかった。

### 魚体内ウイルス量

供試魚の魚体内ウイルス量の測定結果をTable 16に示した。5℃試験群において死亡魚は $10^{7.30} \sim 10^{8.80}$  TCID<sub>50</sub>/g、瀕死魚で $10^{7.30} \sim 10^{8.80}$  TCID<sub>50</sub>/g以上、さらに生残魚でも $10^{8.05} \sim 10^{8.80}$  TCID<sub>50</sub>/g以上と高い価を示し、死亡魚、瀕死魚、生残魚のいずれも魚体内ウイルス量に大差は認められなかった。10℃試験群では瀕死魚の場合 $10^{5.80}$  TCID<sub>50</sub>/g、死亡魚では $10^{6.05} \sim 10^{7.80}$  TCID<sub>50</sub>/gと高い値を示したが、生残魚では発症した個体で $10^{5.30}$  TCID<sub>50</sub>/gであったのに対し、無症状の個体からはウイルスは分離されなかった。また15℃、20℃試験群ではウイルスは分離されなかった。5℃試験群および10℃試験群の各尾の腎臓より分離したウイルスは、抗HRV家兎血清による中和試験によってHRVであることが確認された。

### 細菌検査

TSA培地を用いた細菌検査の結果、対照群、5、10、15、20℃試験群いずれの供試魚の腎臓からも細菌は分離されなかった。

## 病理組織学的検討結果

## 腎臓：

5℃試験群の発症魚の腎臓を Plate 29, Figs.140,141 に示した。HRV 感染症の特徴である造血組織の充出血や壊死が瀕死魚、生残魚全てに観察された。さらに瀕死魚では腎臓の造血組織全域にわたり明かな核の膨化が引き起こされていた。

10℃群の瀕死魚の腎臓の病理組織像を Plate 29, Figs.142,143 に示した。10℃試験群の瀕死魚は、5℃試験群に比べ壊死部が小規模であり、血管の充血も比較的少なく、組織全体におよぶ壊死は認められなかった。ウイルスが分離され軽度の症状が認められた個体では、組織内に若干の出血がみられるものの造血組織に変化は認められなかった。生残魚のうち発症が認められずウイルスも分離されなかった個体では、対照群と比較して特異的な病変は観察されなかった (Plate 30, Figs.144,145)。

15℃, 20℃試験群では、対照群と比較して変化は認められなかった (Plate 30, Figs.146~149)。なお、20℃試験群では全個体に黒色大食細胞の増加が観察された (Plate 30, Figs.148,149)。

## 脾臓：

5℃試験群の瀕死魚の脾臓の病理組織像を Plate 31, Figs.152,153 に示した。脾臓にも著しい出血像が観察され血海を呈していた。特に脾髄では著しい壊死巣の形成が認められた。また腎臓の造血組織と同様に核の膨潤が部分的に観察された。生残魚においても同様の所見が見られたが脾髄組織中の一部分に正常と考えられる組織を残している個体もみられた。

10℃試験群の瀕死魚の脾臓では莢動脈の血管壁の融解、脾髄組織の壊死が起こっているものの5℃試験群に比べさほど顕著ではなかった (Plate 31, Figs.154,155)。生存魚のうち発症しなかった個体では血管壁の融解が若干見られたものの脾髄組織には顕著な変性は認められず、マクロファージの浸潤像が観察された (Plate 32, Figs.156,157)。

15℃, 20℃試験群では、対照群と比較して変化はみられなかったが、15℃, 20℃試験群には腎臓同様に黒色大食細胞の増加が観察された (Plate 32, Figs.158~161)。

## 人工感染ヒラメの腎臓の電顕像

作成標本中のウイルス粒子を見出すことは困難であったが、供試した腎臓組織内に造血組織の細網細胞の細胞膜や突起状構造物表面に大きき約80×180nmの砲弾型のウイルス粒子の出芽像が観察された (Plate 33, Figs.162~165)。

## 血中中和抗体価

各試験群の生残魚の観察終了時における抗 HRV 血中中和抗体価 (ND<sub>50</sub>) は Table 17 に示す通りである。5℃試験群の生残魚で1:10~1:23, 10℃試験群で1尾を除き1:32~1:45, 15℃試験群では1:14~1:45, 20℃試験群では1尾を除き1:32~1:90であり全般的にはさほど高い値は得られなかったが水温の高い試験群でより高い値を示す傾向が観察された。

**Table 17.** Neutralizing antibody titers in hirame sera injected with HRV.

Exp. group.	Water temp. (°C)	Fish no.	Neutralizing antibody titer*
Control	10	6	1 : <8
		7	1 : <8
		8	1 : <8
		9	1 : <8
		10	1 : <8
Test	5	8	1 : 16
		9	1 : 23
		10	1 : 10
Test	10	7	1 : 45
		8	1 : 45
		9	1 : <8
		10	1 : 32
Test	15	5	1 : 14
		6	1 : 45
		7	1 : 45
		8	1 : <16
		9	1 : 38
Test	20	1	1 : 32
		2	1 : 91
		3	1 : 45
		4	1 : 45
		5	1 : <16

\* ND<sub>50</sub> VS 10<sup>2.00</sup> TCID<sub>50</sub>/well

## ヘマトクリット値

生残魚のヘマトクリット値を Table 18 に示した。対照群の平均が31.1%，5℃試験群の発症魚の平均は29.9%，10℃試験群の平均は38.3%，15℃試験群の平均は33.3%，20℃試験群の平均は39.2%であり，5℃試験群の発症魚中に対照群に比して19.3%と低い値を示す個体が見られたが，他の群では顕著な傾向は観察されなかった。

## 血球塗抹標本の観察

血球塗抹標本の観察結果を Plate 34 に示した。5℃試験群では発症した生残魚を対象としたが，幼若赤血球が他の群と比較し非常に高い割合で出現した (Plate 34, Fig.168)。の幼若赤血球の増加は5℃群の標本を作成した全個体に観察され，小型のリンパ球様細胞の相対量も比較的多かった。10℃試験群の瀕死魚では小型のリンパ球様細胞，好中球が比較的多く (Plate 34, Fig.169)，発症魚では大型のリンパ球様細胞が多数出現していた (Plate 34, Fig.170)。15℃試験群でも10℃試験群同様に個体差はあるものの小型のリンパ球様細胞と好中球数が著しく増加する傾向を示したが，大型リンパ球様細胞は見られなかった (Plate 34, Fig.171)。20℃試験群では全く発症が認められなかったのにもかかわらず他の試験群に比しリンパ球様細胞 (Plate 34, Fig.172) の顕著な増量が認められ，好中球は全個体ともに若干の増量が観察された。

Table 18. Heamatocrit value (%) of hirame injected with HRV.

Exp. group	Water temp. (°C)	Fish No.	Ht. (%)	Average of Ht. (%)
Control	10	6	38.1	31.1
		7	35.7	
		8	34.4	
		9	24.2	
		10	23.4	
Test	5	8	19.3	29.9
		9	36.6	
		10	33.9	
Test	10	7	37.7	38.3
		8	37.1	
		9	37.4	
		10	41.0	
Test	15	5	32.9	33.3
		6	28.4	
		7	34.9	
		8	30.0	
		9	40.3	
Test	20	1	31.4	39.2
		2	43.1	
		3	48.5	
		4	38.4	
		5	34.7	

## 考 察

HRV の *in vitro* での至適発育温度は15°C~20°Cである (KIMURA *et al.* 1986) が、魚体内における5°Cでの高い増殖量および10°Cでの速い増殖速度は、生体内でのHRVの増殖を考えるうえで、宿主の免疫系の関与等多くの要因を考慮しなければならないと考える。BISSET (1948) や AVTALION *et al.* (1973) は魚類の免疫応答は温度依存性であり低温下での抗体産生能の低下による急速な抗体価の減少を報告している。また魚は低水温下ではストレスを生じるが、WEDEMEYER (1970) はこのようなストレスが魚体の免疫応答を鈍らせていることを報告し、ROBERTS (1975) は一般的には防御反応は水温が高いほど速やかな反応を示すことを述べている。ヒラメの好適水温は21°Cとされ (森実 1984)、本研究でも各飼育群の血中中和抗体価は5から20°Cの間では水温が高い方がより高い値を示す傾向が観察され、飼育水温の相違による免疫応答の差が上述の魚体内でのウイルスの感染増殖に関与している可能性が示唆された。

病理組織学的検討結果をまとめて Table 19 に示した。対照群には何らの病変も観察されなかったが、5°C群では、第I章で述べた自然発症例のヒラメ同様HRV感染症の特徴である腎臓の造血組織各所での血管の充出血、細網細胞の核濃縮を伴う壊死、および脾臓での著しい出血

**Table 19.** Summarized histological findings of hirame reared in different water temperature injected with HRV.

Exp. group	Water temp (°C)	Condition of fish	Histological findings	
			kidney	spleen
Control	10	Healthy fish	normal	normal
Test	5	Moribund fish	necrosis	necrosis
		Diseased fish (survival)	necrosis	necrosis
	10	Moribund fish	necrosis	necrosis
		Diseased fish (survival)	(necrosis)	(necrosis)
		Healthy fish	normal	normal
15	Healthy fish	normal	normal	
20	Healthy fish	normal	normal	

( ) : Not remarkable.

や壊死が瀕死魚、生残魚全てに観察され、腎臓の静脈周囲の組織に著しい核濃縮のみられる個体も存在した。なお瀕死魚の腎臓を対象に電顕観察を行なったところ細網細胞にウイルスの出芽像が認められた。10°C 試験群の瀕死魚では 5°C 試験群に比べ壊死の程度は軽く、発症した生残魚ではその程度は瀕死魚よりさらに軽度であった。10°C 試験群の非発症魚、15°C 試験群、20°C 試験群では腎臓および脾臓組織に変化は認められなかった。また 10°C 試験群の生残個体には脾臓組織中にマクロファージの浸潤像が見られ、20°C 試験群の腎臓および 15、20°C 試験群の脾臓に黒色大食細胞の増殖と考えられる像が認められた。この黒色大食細胞は色素が酸化還元系を利用した酵素の働きによる生体防御的役割をもつことが指摘されている (EDELSTEIN 1971)。さらに血球塗抹標本の観察で、5°C 試験群の個体に明らかな幼若赤血球の増加が観察されたが、発病個体が体の各所に生じた出血や造血組織の壊死による貧血に対応した補修作用であると考えられた。なお、ヘマトクリット値も生残魚を試験対象としたにも関わらず 5°C 試験群に著しい貧血状態を示す個体が見られている。また小型のリンパ球様細胞が水温の高い群で顕著で、15°C 試験群の個体には好中球数が著しく多い個体も認められた。このように病理組織学的には、HRV 感染症はウイルスの増殖によって腎臓、脾臓などの組織の破壊が主要な病変であることが明らかとなったが、この組織破壊の程度はリンパ系の細胞性免疫の働きによりある程度左右されているものと考えられ、飼育水温が高い場合、血中中和抗体の産生、マクロファージによる貪食や EDELSTEIN (1971) の指摘する黒色大食細胞の防御的役割、さらに破壊された組織の再生等の活性が高まり発症および死亡にまで至らないのではないかと推察された。同じ魚類ラブドウイルス IHNV と VHSV の人工感染試験における水温の影響について、IHNV の場合 AMEND (1970) は 12~16°C で飼育したベニサケは高い死亡率を示したが、18~20°C と飼育水温が高くなるにつれ死亡率は減少したと報告している。さらに 12°C で感染させた後飼育温度を上昇させた場合、飼育水温の上昇が IHNV 防御に有効であることを報告し、抗体産生の他にインターフェロンが関与していることを示唆した。このインターフェロン産生については DE KINKELIN and LE BERRE (1974) が IHNV 感染ニジマスで報告している。一方 VHS に関して

は、一般的に死に至る水温の上限が15℃付近とされ (GHITTINO 1965, DORSON and DE KINKELIN 1974), また JøRGENSEN (1982) は 5~20℃ のニジマスの人工感染試験で、飼育水温が低いほど魚体内のウィルスは残存期間が長かつ分離率が高いものの、15, 20℃での飼育個体からはウィルスは分離されなかったと報告し、その理由にインターフェロンの産生を挙げている。DE KINKELIN and DORSON (1973) や DORSON and DE KINKELIN (1974) は VHSV 感染ニジマスでのインターフェロンの産生量を検討し、水温が高いほど産生量が多いことを報告している。したがって、HRV に関しても高水温飼育によるウィルス感染症の発症抑制に抗体産生に加えてインターフェロンも関与している可能性が考えられる。

以上より飼育水温が高いほど免疫系その他の防御作用が強まることが考えられ、事実、HRV の感染防除策としては水温を15℃以上で飼育することが効果的であるとの吉水ら (1987), 大迫ら (1988b) の報告以来、各地のヒラメ養殖場では15℃以上での飼育が励行され、1988年以降ヒラメでの HRV 感染症の発症例はほとんど報告されていない。

## 第2節 紫外線および各種消毒剤の HRV 不活化効果

魚類のウィルス病に対する効果的な治療法は現在までのところなく、その対策としては防疫が基本となっている。HRV の防疫についても感染魚から放出されたウィルスによる飼育用水、飼育器具などの汚染の防止、ウィルスクャリアー親魚から稚魚への伝播の防止等を図る必要がある。

卵および飼育器具等に対する魚類病原ウィルスの消毒に関しては AMEND and PIETSCH (1972) がポリビニールピロリドヨード剤について検討し卵表面の消毒に有効であることを報告している。また井上ら (1990, 1991), 片岡ら (口頭発表\*) はポビドンヨード剤をはじめ市販の各種の消毒剤による IHNV および IPNV の不活化効果を検討し、常温下ではいずれも公称有効濃度で十分ウィルスは不活化され、中でも片岡ら (口頭発表) はハロゲン系消毒剤および逆性石鹼の塩化ベンザルコニウムは低温下でも有効であることを報告している。さらに吉水ら (1986), YOSHIMIZU *et al.* (1990) は魚類病原ウィルスの紫外線感受性を検討し、二本鎖 RNA の IPNV や CSV を除き、ラブドウィルスやヘルペスウィルスは紫外線に強い感受性を有し、IHNV 汚染水でも市販の殺菌灯による紫外線処理によりニジマスの飼育が可能であると報告している。本節では HRV を対象にその紫外線感受性を検討し、ついで市販の各種消毒剤の HRV 不活化効果を検討した。

### 材料と方法

#### HRV の紫外線感受性

供試ウィルス：紫外線 (U.V.) 感受性の検討には本稿第 I 章で供試した HRV の 8401-H 株、

\*片岡ひろこ・吉水 守・佐見 学・吉田 隆・木村喬久：魚類病原ウィルスの防疫に関する研究—VI、各種消毒剤の効果的使用法について。平成元年度日本魚病学会春期大会。

8501-Y株, M8501-K株, BS8501-K株の4株および対照に IHN<sub>V</sub> (ChAb株), IPNV (VR-299株) を供試した。

U.V. 照射装置: U.V. の線源としては市販の紫外線殺菌灯 (ナショナル社GL-15型) を用い, U.V. 照射量は照度計 (トプコン社UVR-254型) による照度の実測値と照射時間から計算した。紫外線感受性の測定方法: 供試したウイルスの培養濾液約0.5ml を直径60mmの組織培養用プラスチックシャーレ (ペトレイ60mm, テルモ社) にとり, 厚さが2mm以下になるよう広げ, 所定の時間U.V. 照射を行なって照射前後のウイルス感染価を測定した。3回の反復実験によりウイルス感染価を90%以上減少させるのに要するU.V. 照射量を求めID<sub>90</sub>として表示した。なおウイルス感染価の測定は前章までと同様 RTG-2細胞を用いたマイクロタイタープレート法により行なった。

#### HRV の各種消毒剤による不活化効果

供試ウイルス: 供試消毒剤による HRV の不活化効果の検討には HRV の8401-H株を用いた。

供試消毒剤: 消毒剤として市販のクレゾール石鹼液 (ヤクハン製薬社), 塩化ベンザルコニウム (オスバン, 武田薬品工業社), ポビドンヨード剤 (イソジン, 明治製薬社), 次亜塩素酸ナトリウム (和光純薬工業社) を供試し, 次亜塩素酸ナトリウムの反応停止剤としてはチオ硫酸ナトリウム (関東化学社) を用いた。なおクレゾール石鹼液, オスバンは公称含有物換算, イソジンは公称有効ヨード換算, 次亜塩素酸ナトリウムは実測有効塩素量で濃度を示した。

消毒剤の調製: 消毒剤およびチオ硫酸ナトリウムはミリポアフィルターHA (0.45 $\mu$ m) で過除菌した後, 各消毒剤は所定の濃度に再蒸留水で希釈し実験に用いた。なお次亜塩素酸ナトリウムの有効塩素濃度はオルトトリジン法で測定した。

消毒剤によるウイルス不活化効果の測定法: 供試消毒剤によるウイルス不活化効果の測定は, 所定濃度に希釈した消毒剤と HRV 希釈液 (200~300pfu (plaque forming unit)/ml) を等量混合し 0 $^{\circ}$ C, 15 $^{\circ}$ C, 25 $^{\circ}$ C で30秒および20分間反応させた後, 混合液に9倍量の Hanks 液を加えて消毒剤の細胞毒性を軽減させ EPC 細胞に接種した。プラーク法は KAMEI *et al.* (1987) の方法に従い, 試験群と消毒剤の代わりに Hanks 液を用いた対照群の出現プラーク数をもとに, 試験群のプラーク減少率として表示した。なお次亜塩素酸ナトリウムについては1% (v/v in DW2) チオ硫酸ナトリウム溶液を反応液に添加して反応を停止させた。

## 結 果

#### HRV の紫外線感受性

HRV の紫外線感受性測定結果を Table 20 に示した。U.V. 照射前の HRV8401-H 株培養濾液の感染価は $10^{4.55} \sim 10^{5.05}$  TCID<sub>50</sub>/ml であったが $200 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$  の U.V. を10秒間照射 ( $2.0 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$  の照射) することにより $10^{4.05} \sim 10^{4.80}$  TCID<sub>50</sub>/ml に減少した。同様にして $4.0 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$  を照射した場合には $10^{3.80} \sim 10^{4.55}$  TCID<sub>50</sub>/ml に減少し, さらに $6.0 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$  の照射により $10^{3.35} \sim 10^{4.30}$  TCID<sub>50</sub>/ml に減少した。これらの結果をもとに供試ウイルスの感染価



Table 20. Susceptibility of HRV strains to ultraviolet (U.V.).

Virus	Strain	U.V. treatment time(sec)	U.V. dosage* <sup>1</sup> ( $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ )	Titer (log TCID <sub>50</sub> /ml)			ID <sub>90</sub> * <sup>1</sup> <U.V. dosage> ( $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ )
				experiment			
				1	2	3	
HRV	8401 H	0	0	4.55	5.05	4.55	6.0-7.8 x 10 <sup>3</sup>
		10	2.0 x10 <sup>3</sup>	4.30	4.80	4.05	
		20	4.0 x10 <sup>3</sup>	4.05	4.55	3.80	
		30	6.0 x10 <sup>3</sup>	3.55	4.30	3.55	
	8501 Y	0	0	6.05	5.05	5.30	6.0-7.8 x 10 <sup>3</sup>
		10	2.0 x10 <sup>3</sup>	5.80	4.80	5.05	
		20	4.0 x10 <sup>3</sup>	5.55	4.55	4.80	
		30	6.0 x10 <sup>3</sup>	5.05	4.30	4.55	
	M-8501 K	0	0	5.05	5.30	-* <sup>3</sup>	7.8 x 10 <sup>3</sup>
		10	2.0 x10 <sup>3</sup>	4.80	5.05	-	
		20	4.0 x10 <sup>3</sup>	4.55	4.80	-	
		30	6.0 x10 <sup>3</sup>	4.30	4.55	-	
BS-8501 K	0	0	5.05	5.05	-	7.8 x 10 <sup>3</sup>	
	10	2.0 x10 <sup>3</sup>	4.80	4.80	-		
	20	4.0 x10 <sup>3</sup>	4.55	4.55	-		
	30	6.0 x10 <sup>3</sup>	4.30	4.30	-		
IHNV	ChAb	0	0	5.05	5.80	5.55	0.6-1.3 x 10 <sup>3</sup>
		10	1.0 x10 <sup>3</sup>	3.55	4.30	4.80	
		20	2.0 x10 <sup>3</sup>	2.05	2.80	2.80	
		30	3.0 x10 <sup>3</sup>	<1.80	2.05	<1.80	
IPNV	VR-299	0	0	7.30	8.05	7.80	0.5-1.0 x 10 <sup>5</sup>
		50	5.0 x10 <sup>3</sup>	7.30	7.05	6.30	
		1'40	1.0 x10 <sup>3</sup>	6.30	6.30	6.05	
		3'20	2.0 x10 <sup>3</sup>	3.80	4.30	4.80	

\*<sup>1</sup>: U.V. intensity, 200 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ .\*<sup>2</sup>: U.V. dose showed 90% or more reduction of virus infectivity.\*<sup>3</sup>: Not tested.

の変化を図示すると Fig. 10 の様になり, U.V. 照射前後のウイルス感染価を90%以上減少させるのに要するU.V. 照射量 (ID<sub>90</sub>) は6.0~7.8 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ と測定された。

8501-Y株も照射前が10<sup>5.05</sup>~10<sup>6.05</sup> TCID<sub>50</sub>/ml であった感染価が2.0 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ の照射で10<sup>4.80</sup>~10<sup>5.80</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに, 6.0 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ の照射で10<sup>4.30</sup>~10<sup>5.05</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに減少し, ID<sub>90</sub>は6.0~7.8  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ と測定された。さらに M8501-K 株および BS8501-K 株は共に照射前に10<sup>5.05</sup>~10<sup>5.30</sup> TCID<sub>50</sub>/ml であった感染価が, 2.0 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ の照射で10<sup>4.80</sup>~10<sup>5.05</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに, 6.0 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ の照射で10<sup>4.30</sup>~10<sup>4.55</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに減少しID<sub>90</sub>は7.8 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ と測定された。

以上供試した HRV 4 株のID<sub>90</sub>は株間により顕著な差は認められず, いずれも6.0~7.8 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ であった。

一方対照に供試した IHNV (ChAb株) では照射前が10<sup>5.05</sup>~10<sup>5.80</sup> TCID<sub>50</sub>/ml であった感染価が1.0 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ の照射で10<sup>3.55</sup>~10<sup>4.80</sup> TCID<sub>50</sub>/mlに, 2.0 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ の照射で

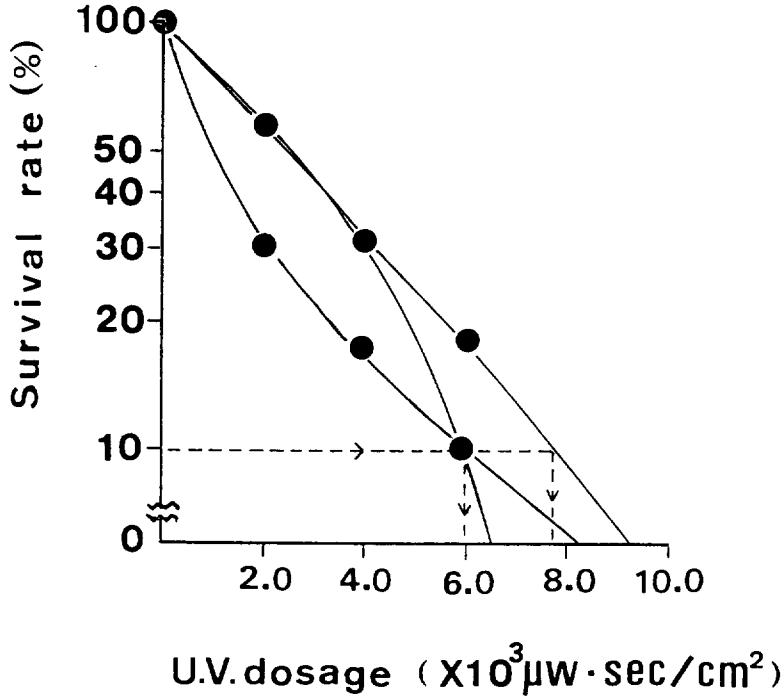


Fig.10. Reduction of HRV (8401-H) infectivity by U.V. irradiation appeared in survival rate (log scale) of virus.

$10^{2.05} \sim 10^{2.80}$  TCID<sub>50</sub>/ml に減少し、ID<sub>90</sub>は $0.6 \sim 1.3 \times 10^3 \mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ と測定された。またIPNV (VR-299株) では照射前が $10^{7.30} \sim 10^{8.05}$  TCID<sub>50</sub>/ml であった感染価が $5.0 \times 10^4 \mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ の照射で $10^{7.30}$  TCID<sub>50</sub>/ml に、 $2.0 \times 10^5 \mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ の照射で $10^{3.80} \sim 10^{4.80}$  TCID<sub>50</sub>/ml に減少し、ID<sub>90</sub>は $0.5 \sim 1.0 \times 10^5 \mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$ と測定された。

消毒剤による HRV の不活化効果

クレゾール：

クレゾール石鹼の HRV 不活化効果を Table 21 に示した。HRV のプラーク数を90%以上減少させるのに要するクレゾール石鹼の濃度は、反応温度が0℃の場合は反応時間30秒で500ppm

Table 21. Virucidal activity of saponated cresol solution on HRV.

Temperature (°C)	Time (min)	Plaque reduction (%)					
		Concentration (ppm)					
		5000	1000	500	100	50	10
0	0.5	93	98	97	0	0	1
	20	—	100	100	94	96	78
15	0.5	98	99	99	50	0	0
	20	—	100	100	100	100	96
25	0.5	100	95	97	0	0	0
	20	—	100	100	100	100	96

**Table 22.** Virucidal activity of benzalkonium chloride on HRV.

Temperature (°C)	Time (min)	Plaque reduction (%)					
		Concentration (ppm)					
		200	100	20	10	2	1
0	0.5	99	72	0	0	9	1
	20	100	100	100	95	14	0
15	0.5	100	99	0	0	2	0
	20	100	100	97	90	0	21
25	0.5	100	97	55	32	8	1
	20	100	100	99	100	72	43

**Table 23.** Virucidal activity of povidon iodine on HRV.

Temperature (°C)	Time (min)	Plaque reduction (%)					
		Concentration (ppm)*					
		100	20	10	2	1	0.2
0	0.5	100	33	17	11	0	2
	20	—	91	91	49	0	0
15	0.5	97	42	24	21	0	0
	20	—	99	98	74	26	0
25	0.5	95	4	0	6	0	0
	20	—	100	91	72	39	20

\*active principle concentration.

以上、また反応時間20分の場合は50ppm以上であり、反応温度が15℃および25℃の場合は、共に反応時間30秒で500ppm以上、反応時間20分の場合は10ppm以上であった。

塩化ベンザルコニウム：

塩化ベンザルコニウムの HRV 不活化効果を Table 22 に示した。HRV のプラーク数を90%以上減少させるのに要する塩化ベンザルコニウムの濃度は、反応温度が0℃の場合は反応時間30秒で200ppm以上、また反応時間20分の場合は10ppm以上であり、反応温度が15℃および25℃の場合は、共に反応時間30秒で100ppm以上、反応時間20分で10ppm以上であった。

ポビドンヨード：

ポビドンヨードの HRV 不活化効果を Table 23 に示した。HRV のプラーク数を90%以上減

**Table 24.** Virucidal activity of sodium hypochlorite on HRV.

Temperature (°C)	Time (min)	Plaque reduction (%)					
		Concentration (ppm)					
		100	50	10	5	1	0.5
0	0.5	99	96	42	24	25	14
	20	100	100	99	99	72	57
15	0.5	99	98	54	38	26	25
	20	100	100	100	100	73	66
25	0.5	100	97	54	27	18	16
	20	100	100	95	98	74	54

小ささせるのに要するポビドンヨードの濃度は反応温度に関係なく 0℃, 5℃および20℃いずれも反応時間30秒で100ppm以上, また反応時間20分で10ppm以上であった。

次亜塩素酸ナトリウム:

次亜塩素酸ナトリウムの HRV 不活化効果を Table 24 に示した。HRV のプラーク数を90%以上減少させるのに要する次亜塩素酸ナトリウムの濃度は, 反応温度に関係なく 0℃, 5℃および20℃いずれも反応時間30秒で50ppm以上, 反応時間20分で 5 ppm以上であった。

## 考 察

紫外線の HRV 不活化効果について検討したところ, 分離地の異なる供試 4 株の HRV の紫外線感受性は株間で差は認められず, ウイルス感染価を90%以上減少させるのに要する U.V. 照射量 ( $ID_{90}$ ) は,  $6.0\sim 7.8\times 10^3 \mu W\cdot sec/cm^2$  であった。MCKELVIE and DESANTOLS (1975) や吉水ら (1986) は魚類病原ウイルスのうち, IPNV および CSV の U.V. 感受性はその  $ID_{90}$  が約  $3.0\sim 9.0\times 10^4 \mu W\cdot sec/cm^2$  と紫外線に対する感受性が低いものの, IHNV, OMV, *Herpesvirus salmonis*, CCV はそれらの  $ID_{90}$  が  $0.3\sim 1.5\times 10^3 \mu W\cdot sec/cm^2$  を示し, グラム陰性菌の殺菌に要する紫外線照射量 (木村ら1976) と同程度であり高い感受性を有することを明らかにしている。本節の結果でも対照として供試した IPNV の  $ID_{90}$  は  $0.5\sim 1.0\times 10^5 \mu W\cdot sec/cm^2$ , IHNV で  $0.6\sim 1.3\times 10^3 \mu W\cdot sec/cm^2$  となり MCKELVIE and DESANTOLS (1975) や吉水ら (1986) の結果と一致した。したがって HRV の紫外線感受性は IPNV, CSV の約10倍, IHNV, OMV, *H. salmonis*, CCV の約1/5~1/10であることが明らかとなった。市販の一般的な流水式紫外線殺菌装置の公称処理能力における紫外線照射量  $5.0\sim 6.8\times 10^4 \mu W\cdot sec/cm^2$  は HRV の  $ID_{90}$  値の約 8 倍であり, HRV は同じ魚類病原ラブドウイルスの IHNV に比べ若干紫外線感受性は低いものの, グラム陰性細菌群・魚類ヘルペスウイルス・IHNV と同様に市販の紫外線殺菌装置によって充分不活化できるものと考えられ, 飼育用水を汚染した HRV の不活化法として紫外線殺菌法が有効であることが示唆された。

一方, 市販の消毒剤の HRV 不活化効果を90%以上のプラーク減少率を示す消毒剤の濃度と

**Table 25.** Minimum concentration of the disinfectants (practical value) showed 90% or more plaque reduction of HRV.

Disinfectant	Time (min.)	Concentration (ppm)		
		Temperature		
		0℃	15℃	20℃
Saponated cresol solution	0.5	500	500	500
	20	50	10	10
Benzalkonium chloride	1.5	200	100	100
	20	10	10	10
Povidon iodine	0.5	100	100	100
	20	10	10	10
Sodium hypochlorite	0.5	50	50	50
	20	5	5	5

して求めたところ (Table 25), 公称有効濃度が5000~10000ppm (原液の100~50倍希釈) であるフェノール系消毒剤のクレゾール石鹼液は反応時間が20分の場合15℃および25℃では10ppm以上で効果があり, 0℃の場合でも50ppmであった。また, 極めて短時間 (30秒) の処理でも反応温度に関係なく500ppmの濃度があれば十分であり, クレゾール石鹼液は HRV に対して公称有効濃度の1/10~1/20量で十分なウイルス不活化効果を示した。次に界面活性剤である塩化ベンザルコニウムは, 反応時間が20分の場合反応温度に関係なく10ppm以上で有効であり, 反応時間が30秒と極めて短時間の処理でも反応温度15℃および25℃の場合100ppm以上で, また0℃でも200ppm以上で効果を示し, 公称有効濃度500~1000ppm (原液の200~100倍希釈量) の1/2~1/3程度の濃度で使用すれば HRV の不活化に充分効果的であった。さらにハロゲン系の消毒剤, ポビドンヨードと次亜塩素酸ナトリウムは, 反応温度に関係なくイソジンの場合反応時間が20分の場合に10ppm, また30秒の場合でも100ppmの濃度で有効であり, 次亜塩素酸ナトリウムは反応時間が20分の場合に5ppm, 30秒の場合に50ppmで有効であった。これらは共に公称有効濃度の1/4~1/10の濃度でありイソジンおよび次亜塩素酸ナトリウムでは原液の1000倍の濃度で十分効果的であることが明らかとなった。この様に今回供試した4種の消毒剤はいずれも公称有効濃度よりも低い濃度で十分な HRV 不活化効果を示した。しかし, 反応時間が30秒の場合, 20分の場合より10~50倍の濃度を要したことから, いずれの消毒剤でもできるだけ長く作用させることが望ましいと考えられる。一方, 片岡ら (口頭発表) は IHNV や IPNV に対する各種消毒剤のウイルス不活化効果を検討し, ハロゲン系消毒剤およびオスバンは低温 (0℃) 下でもその効果が維持されていたと報告している。HRV でも供試した消毒剤の中ではハロゲン系の消毒剤のイソジンや次亜塩素酸ナトリウムが短時間 (30秒) 作用させた場合, 反応温度に関係なく低温下 (0℃) でも比較的低い濃度で HRV の不活化効果を示した。さらに極めて低い濃度, イソジンで2ppm, 次亜塩素酸ナトリウムで0.5ppmでも10%以上のブラック減少を示したことから, 比較的低温下で感染発症を引き起こし伝播する HRV の冬季間, 低水温下での消毒にはイソジンまたは次亜塩素酸ナトリウムを使用することがより効果的であると考えられる。

以上の紫外線および各種薬剤の HRV 不活化効果の検討結果から, AMEND and PIETSCH (1972), MULKAHY (1983), 木村ら (1989), YOSHIMIZU *et al.* (1990) が提案し, 現在サケマスの IHNV 防除対策として最も効果的でかつ広く用いられている方法, すなわち発眼初期に卵をヨード剤により消毒し, その後稚魚がウイルスに感受性を示さなくなるまで病原ウイルスフリーの用水あるいは紫外線照射処理をした飼育水等を用いた病原ウイルスフリーの環境下での飼育による二段階方式が HRV についても応用できる可能性が示唆された。しかしヒラメの場合は受精から孵化までの期間が短いことから, 消毒時期およびその方法等について今後具体的に検討する必要があると考える。

## 総 括

沿岸海域での海面養殖事業が盛んになるにつれ養殖魚の疾病被害が増加し、その防除対策が大きな課題となっている。魚類のウイルス性疾病に関しては現在までのところ効果的な治療法がなく、防除対策は予防・防疫に頼るしかない現状にある。

1984年3月の兵庫県淡路島での発生例をはじめ、翌年1月から3月にかけての兵庫県水産試験場、北海道焼尻島および香川県女木島の養殖ヒラメでの発生例はいずれも体表および鰭の充出血、腹部膨満、生殖腺のうっ血、筋肉内出血を主徴とする疾病であった。1984年の兵庫県淡路島、翌年の兵庫県水産試験場での発生例ともに、1月から4月にかけて発生し、この時の飼育水温は6～18℃、累積死亡率は7.2%と25%であった。北海道の場合も発生時期は2月から4月にかけてで、飼育水温は2～12℃、累積死亡率は92%、さらに香川県下の例でも発生時期は2月下旬から4月、飼育水温は8～16℃であり、累積死亡率は3.3%であった。これらの病魚からはいずれもニジマス生殖腺由来細胞(RTG-2)に伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)と類似の細胞変性効果(CPE)を発現するウイルスが分離された。同様のウイルスは1986年に岡山県および三重県下の養殖ヒラメ稚魚、香川県下の養殖クロダイ、韓国から輸入されたメバルからも分離されている。分離ウイルスはいずれもDNA合成阻害剤であるIuDRによる増殖阻害は認められず、エーテル、酸(pH3)に感受性を有し、ウイルス粒子は80×160～180nmの砲弾型を呈するなど、ラブドウイルスの特徴を示し、KIMURA *et al.* (1986) 命名のヒラメラブドウイルス(*Rhabdovirus olivaceus*, HRV)と同定された。

HRV感染症の主な症状は体色の黒化、異常遊泳、腹水の貯留、筋肉中および鰭基部の出血であり、病理組織学的には、腎臓の造血組織の壊死、脾臓の脾髄組織中の細網細胞の核濃縮、核崩壊、核融解を伴う壊死であって既知の近縁の伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)やウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV)感染症の諸症状(GHITTINO 1965, YASUTAKE and RASMUSSEN 1968)に共通したものであった。IHNVやVHSV感染症ではニジマスの肝臓に著しい変化が観察されているが、HRV感染症ではヒラメの肝臓にこのような変化はみられなかった。HRV感染症は魚体内各組織に著しい充出血を伴う出血性の敗血症をひき起こし、特に軀幹筋の出血が顕著であった点VHSV感染症に類似している。最近VHSVは海産魚のシーバスやターボットにも病原性を有することが人工感染試験により確かめられているが(CASTRIC and DE KINKELIN 1984)、ターボットで観察された症状および組織変化はヒラメのHRV感染症の症状および病理組織像と共通する点が多い。この様にHRVはウイルス学的にも、病理組織学的にもサケ科魚類の病原ラブドウイルスであるIHNVやVHSVに極めて類似していたことからHRVもサケ科魚類に対して病原性を有することが危惧された。

そこで数種のサケ科魚類に対するHRVの病原性を検討した。その結果HRVはニジマスに対しても強い病原性を有することが確認された。また、サクラマスに対してもHRVは病原性を有していることが明かとなったが、累積死亡率や魚体内ウイルス量からニジマスよりも感受性

は低いものと推察された。この様に HRV はヒラメ以外にもサケ科魚類のニジマスやサクラマスに対しても病原性を有することが明らかとなり、今後サケ・マス養殖場における HRV の伝播・感染に対して十分留意する必要があることが示唆された。

ところで IPNV や OMV をはじめ一般に魚類病原ウイルスは主として稚魚期に多大な被害を及ぼし、魚類ラブドウイルスでは IHNV や PFRV が稚魚期に被害を与えるウイルスとしてよく知られている。そこで HRV のニジマスに対する病原性を魚体重と接種ウイルス量の両面から検討した。HRV は供試したニジマスの魚体重範囲内 (0.2~18.2g) では 1 尾当りの接種ウイルス量が一定の場合、魚体重の増加と共に病原性の低下が観察されたが、接種ウイルス量を供試魚 1g 当りで換算した場合、魚体重による差はほとんど認められなかった。一般に稚魚期の魚では生体防御機構としての免疫系が未発達であり、ニジマスでは免疫応答を示すには魚体重が約 1g 程度にまで成長している必要があるとされている (AMEND and JOHNSON 1981)。魚類病原ウイルスに対する免疫応答としては中和抗体の産生が知られているが、DE KINKELIN and LE BERRE (1974) は IHNV で、DE KINKELIN and DORSON (1973) が VHSV でインターフェロンの産生を報告していることから HRV を感染させたニジマスでも免疫系の他にインターフェロン等の生体防御機構が働き、魚体重に関係なくウイルス感染に対する抵抗力を有するものの、接種ウイルス量を増やすことにより魚体の防御機能が及ばなくなった結果発病するものと推察される。

HRV のニジマスに対する病原性を、同じラブドウイルス科に属しニジマスに強い病原性を有す IHNV と比較検討したところ、HRV の病原性は魚体重が少ない場合には IHNV より低いものの、魚体重が増加するにつれ IHNV とほぼ同程度となることが明らかになり、HRV の病原性は宿主の魚体重による影響を受けにくい点で IHNV と相違していた。ところで IHNV は主に稚魚期に感染し、1 年魚で発病する場合は死亡率が低く 2 年魚では発病しないとされているが (AMEND *et al.* 1973)、VHSV は稚魚から商品サイズ (250~300g) の成魚にまで被害が報告され、罹病する魚体サイズが広範囲に及ぶことが知られている (GHITTINO 1965)。したがってこれらの病原性を魚体重の面から類別すると HRV は IHNV よりむしろ VHSV に近い病原ウイルスである可能性が示唆された。

HRV 人工感染ニジマスの病理組織像を IHNV 人工感染ニジマスの組織像と比較すると、IHNV 感染ニジマスでは腎臓および脾臓の壊死が観察され、これらの組織像は HRV 感染魚と類似していたが、IHNV 感染魚では腎臓・脾臓および筋肉の出血が顕著でなく、肝臓では全個体に壊死や出血が観察された。さらに腸管では粘膜下結合組織や緻密層中のエオシン好性顆粒細胞に核濃縮、核崩壊を伴う細胞壊死が認められた点 HRV 感染症の組織像と異なっていた。この様に IHNV 感染症の特徴とされている緻密層の好酸性顆粒細胞の壊死変性が HRV 感染ニジマスでは観察されなかったことから、HRV は病理組織像の面からも IHNV と明瞭に区別された。

ところで魚類病原ラブドウイルスとしては HRV の他に IHNV、VHSV、PFRV、EVA および EVEX 等が知られている。HRV の増殖過程および増殖の場を他のラブドウイルスと比較す

る目的で、まずこれらラブドウイルスの *in vitro* における RTG-2 細胞での増殖過程、増殖様式を検討し、ついで感染魚の臓器内でのウイルス増殖の場およびその様式を検討を行なった。培養細胞においては各ウイルスともに接種後12時間目にウイルス粒子の出芽像が観察された。HRV と IHNV では8~10時間目に細胞質の電子密度が低下し、ミトコンドリアは電子密度が高くなる特徴を示した。BARONI *et al.* (1982) は VHSV 感染 RTG-2 細胞において、ウイルス接種後8時間目に細胞質中に顆粒状繊維構造の束やゴルジ体様の空胞の出現を、また12時間目には顆粒状繊維構造周辺で電子密度の高いリング状構造物および細胞膜表面に中空なウイルス粒子のエンベロープ様構造を観察し、DE KINKELIN and SCHERRER (1970) もウイルス接種後12時間目に VHSV の出芽像を観察している。この様に HRV を含め魚類ラブドウイルスの多くはウイルス接種後12時間目前後がウイルス粒子の出芽初期と考えられる。なお光顕観察で感染細胞の球形化および核の変性が観察された時期は最も早い EVA, EVEX でも16時間目以降であり、ウイルスの増殖は細胞の形態変化以前に既に始まっていることが明らかとなった。また VHSV で観察されている顆粒状繊維およびリング状構造物はウイルス粒子形成に関与することが指摘されているが、本節で観察した供試ウイルス感染細胞にはこれらの構造物は観察されなかった。ウイルスの出芽期に PFRV, EVEX では電子密度の高い緑で囲まれた中空の竿状および袋状構造物が観察されたが、類似した構造物は VHSV でも観察され、エンベロープのみの空のウイルス粒子とされている。したがって PFRV および EVEX で見られたこれらの構造物も変形した空のエンベロープとも考えられるが、この点に関しては今後さらに検討する必要がある。一方、HRV 感染細胞に比較的電子密度が高く内部に微小繊維構造を持つ突起状の構造物が細胞膜表面上に観察され、その表面に多くのウイルス粒子の出芽像が観察されたが、この突起状構造物は IHNV では極く希にしか観察されず、観察した他のウイルスでは全く見られず VHSV にも報告例がないことから HRV に特徴的なものと考えられた。HRV と同じ *Rhabdovirus* 科 *Lyssavirus* 属の狂犬病ウイルスでは細胞質内に特有な封入体、ネグリ小体を形成することが知られ、HRV 感染細胞の表面に観察された突起状構造物はその表面に多くのウイルス粒子の形成が見られたことから、ネグリ小体の一種である可能性も示唆された。また、現在狂犬病ウイルスの診断に蛍光抗体法や酵素抗体法によるネグリ小体の検出が実施されていることから、この構造物が HRV の迅速診断に応用できる可能性が示唆され、この点に関しても今後さらに検討する必要があると考える。

次に HRV 感染発症魚の臓器内でのウイルス増殖の場およびその様式を検討したが、自然発症ヒラメおよび人工感染ニジマスの腎臓の造血組織中の細網細胞の膜表面上に HRV 感染培養細胞で観察されたウイルス粒子の出芽像と同様な像が観察され、造血組織の細網細胞が HRV の主な増殖場所であると考えられた。特に HRV 人工感染ニジマスの腎臓では造血組織の細網細胞の細胞膜上に *in vitro* の RTG-2 細胞で見られたような突起状の構造物が観察され、その表面にはウイルス粒子の出芽像が認められた。この様な突起状構造物は IHNV や VHSV 感染魚では報告例がなく HRV に特有の構造物であることが強く示唆された。

ところで HRV はヒラメはもとよりニジマスに対して強い病原性を有し、今後ヒラメ養殖場



のみならずサケマス養殖場においても HRV の伝播に十分に留意する必要があることが示唆されたが、ウイルス性疾病に関しては現在までのところ効果的な治療法がなく、病原体の伝播の防止、すなわち防疫に頼らざるを得ない現状にある。魚類病原ラブドウィルスの防疫対策としては、幼稚魚の飼育水温を調節する方法をはじめ、ワクチンの開発や化学療法剤の検討等の研究が為されている。ワクチンに関しては IHNV の弱毒化生ワクチンの開発およびその有効性に関する報告がみられるものの (AMEND 1976, FRYER *et al.* 1976, 福田ら1989), 他魚種への安全性や遺伝学的な安定性の面から実現にはまだ多くの問題が残されている。一方、飼育水温に関しては IHN の場合、18~20℃と水温が高くなるにつれ死亡率が減少すること、また VHS では自然発症例の水温の上限が15℃付近であり、人工感染試験では飼育水温が高いほど魚体内ウィルスの残存期間および量が減少するとされ (JØRGENSEN 1982), 水温制御の有効性が示唆されている。また、現在最も効果的でかつ広く用いられている防疫方法は卵をヨード剤により消毒し、その後ウイルスフリーの環境下で飼育するいわゆる二段階方式である。吉水ら (1986), YOSHIMIZU *et al.* (1990) は U.V. 照射によるウイルス不活化効果を明らかにし、IHNV 汚染水の U.V. 処理による不活化および同処理水を用いたニジマスの飼育例を報告している。HRV の場合も自然発症例ではいずれも水温が15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられ、HRV 感染発症に水温が重大な影響を及ぼしていることが示唆された。

そこで HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を HRV 人工感染ヒラメの累積死亡率および発症魚の病理組織像より検討した。その結果累積死亡率は飼育水温が低い 5℃, 10℃ でそれぞれ 40, 60% と高い値を示した。HRV の *in vitro* での至適発育温度は 15~20℃ であったが、魚体内では 5℃ での高い増殖量、10℃ での速い増殖速度および 20℃ での感染不成立が推察され、生体内での HRV の増殖を考えるうえで免疫系の関与等多くの要因を考慮しなければならないことが示唆された。事実、生残個体の血中中和抗体価は水温が高い試験区でより高い値を示す傾向が観察され、飼育水温の相違による免疫応答の差が上述の魚体内でのウイルスの感染増殖に関与している可能性が示唆された。病理組織学的には 5℃ 群では HRV の自然発症ヒラメ病魚と同様に HRV 感染症の特徴である腎臓の造血組織での血管の充出血、細網細胞の核濃縮を伴う壊死、および脾臓での著しい出血や壊死が瀕死魚、生残魚全てに観察された。10℃ 試験群の瀕死魚では 5℃ 試験群に比べ壊死の程度は軽く、発症した生残魚ではその程度は瀕死魚よりさらに軽度であった。10℃ 試験群の非発症魚、15℃ 試験群、20℃ 試験群では腎臓および脾臓組織に変化は認められなかった。また、10℃ 試験群の生残個体には脾臓組織中にマクロファージの浸潤像が見られ、20℃ 試験群の腎臓および 15, 20℃ 試験群の脾臓に黒色大食細胞の増殖と考えられる像が認められた。さらに血球塗抹標本の観察で、5℃ 試験群の個体に明らかな幼若赤血球の増加が観察されたが、これは発病個体が体内の各所に生じた出血や造血組織の壊死による極度の貧血に対応した補修作用であると考えられた。また、小型のリンパ球様細胞が水温の高い群で顕著に観察され、15℃ 試験群の個体には好中球数が著しく多い個体も認められた。このように HRV 感染症はウイルスの増殖によって腎臓、脾臓などの組織の破壊が主要な病変であることが再確認されたが、飼育水温が高い場合、血中中和抗体の産生、マクロファージによる貪食

や黒色大食細胞の防御的役割, さらに破壊された組織の再生等の活性が高まり発症および死亡にまで至らないのではないかと推察された。IHNV と VHSV の人工感染試験における水温の影響について, IHNV では飼育水温の上昇が IHNV 防御に有効であるとされ, 抗体産生やインターフェロンの関与が示唆されている (AMEND 1970)。また VHSV に関しては, 一般的に感染魚の死に至る水温の上限が15℃付近とされ, 人工感染試験でも15, 20℃での飼育個体からはウイルスは分離されず, その理由としてインターフェロンの産生が挙げられている (JØRGENSEN 1982)。したがって, HRV に関しても高水温飼育によるウイルス感染症の発症抑制に免疫応答に加えてインターフェロンも関与している可能性が考えられた。この様にヒラメの飼育水温が高い場合免疫系その他の防御作用が強まることが考えられ, HRV の防疫対策として飼育水温の制御, すなわち15℃以上での飼育が有効であることが明らかとなった。

一方, HRV の伝播防止対策として感染魚から放出されるウイルスによる飼育用水, 飼育器具などの汚染の防止を計る必要が考えられる。そこで HRV を対象にその紫外線感受性を検討し, ついで市販の各種消毒薬の HRV 不活化効果を検討した。まず紫外線の HRV 不活化効果については, 供試した分離地の異なる 4 株の HRV の紫外線感受性は株間で差が認められず, ウイルス感染価を90%以上減少させるのに要する U.V. 照射量 ( $ID_{90}$ ) は,  $6.0 \sim 7.8 \times 10^3 \mu W \cdot sec/cm^2$  であった。魚類病原ウイルスの IPNV および CSV の U.V. 感受性はその  $ID_{90}$  が約  $3.0 \sim 9.0 \times 10^4 \mu W \cdot sec/cm^2$ , IHNV, OMV, *Herpesvirus salmonis*, CCV では  $0.3 \sim 1.5 \times 10^3 \mu W \cdot sec/cm^2$  とグラム陰性菌と同程度であるとされている (MCKELVIE and DESANTOLS 1975, 吉水ら1986)。したがって HRV の紫外線感受性は IPNV, CSV の約10倍, IHNV, OMV, *H. salmonis*, CCV の約1/5~1/10であり, 市販の流水式紫外線殺菌装置の公称処理能力における紫外線照射量  $5.0 \sim 6.8 \times 10^4 \mu W \cdot sec/cm^2$  は HRV の  $ID_{90}$  値の約10倍であり, HRV は IHNV に比べ若干紫外線感受性は低いものの, 市販の紫外線殺菌装置によって充分不活化できるものと考えられる。

つぎに市販の消毒剤の HRV 不活化効果を90%以上のプラーク減少率を示す消毒薬の濃度として求めたところ, 公称有効濃度が5000~10000ppm (原液の100~50倍希釈) であるフェノール系消毒剤のクレゾール石鹼液は HRV に対して公称有効濃度の1/10~1/20 量でウイルス不活化効果を示し, 界面活性剤であるオスバンは, 公称有効濃度500~1000ppm (原液の200~1000倍希釈量) の1/2~1/3程度の濃度, さらにハロゲン系の消毒剤であるイソジンと次亜塩素酸ナトリウムは反応温度に関係なく反応時間が20分の場合に 5~10ppm, また30秒の場合でも50~100ppmの濃度で有効であった。これらは共に公称有効濃度の1/4~1/10の濃度でありイソジンおよび次亜塩素酸ナトリウムでは原液の1000倍の濃度で効果があることが明らかとなった。この様に本研究で供試した4種の消毒剤はいずれも公称有効濃度よりも低い濃度で十分な HRV 不活化効果を示した。ところで片岡ら (口頭発表) は IHNV や IPNV に対する各種消毒剤のウイルス不活化効果を検討し, ハロゲン系消毒剤およびオスバンは低温 (0℃) 下でもその効果が維持されていたと報告している。HRV でも供試した消毒剤の中ではハロゲン系の消毒剤のイソジンや次亜塩素酸ナトリウムが, 反応温度に関係なく低温 (0℃) 下でも比較的低い濃度で HRV の不活化効果を示したことから, 比較的低温下でも感染発症を引き起こすことが

可能な HRV の消毒にはイソジンまたは次亜塩素酸ナトリウムを使用することがより効果的であると考える。

以上本研究では HRV 感染症においては腎臓、脾臓の壊死および出血、筋肉の出血を主特徴とし、サケ科魚類に対する病原性の検討でニジマスに対しても病原性を示すなど VHSV 感染症と多くの点で共通することが明らかとなった。さらに VHSV では、サケ科魚種の他のウイルス病とは異なり体重が200~300gのニジマスの成魚においても感染し被害を及ぼすことが知られているが、HRV も自然発症例で体重100~700gのヒラメにも感染し、人工感染試験ニジマスに対しても魚体重18gの供試魚に強い病原性を示し、感染し得る魚体サイズの点でも HRV と VHSV は類似していた。HRV 感染症が VHSV と類似し、特にニジマスなどのサケ科の魚類にも病原性を有することが確認されたことおよび HRV がヒラメは勿論クロダイをはじめ多くの海産魚にも病原性を有することが明らかにされており、HRV は養殖魚類において今後十分注意する必要があるウイルスと考えられる。

最後に本研究では HRV の防除対策を検討し、水温の制御により HRV 感染発症の抑制が可能であることを明らかにし得た。事実、HRV の感染防除策としては水温を15℃以上で飼育することが効果的であるとの吉水ら (1987)、大迫ら (1988b) の報告以来、各地のヒラメ養殖場では15℃以上での飼育が励行され、1988年以降ヒラメでの HRV 感染症の発症例はほとんど報告されていない。今後は本研究で得られた成果を基礎にして HRV 感染症を未然に防止する具体的方法の確立を計ると共に、ワクチンの開発やインターフェロンの応用を検討してゆく必要があると考える。

## 要 約

本研究では養殖ヒラメに発生した新種の病原ウイルス *Rhabdovirus olivaceus* (hirame rhabdovirus : HRV) による感染症の発症過程、発病機構を病理組織学的に究明し、かつ感染防除対策の基礎を確立することを目的に種々の検討を行なった。

まずヒラメの HRV 感染症の発生経過および HRV 感染ヒラメの病理組織像を検討した。1984年3月の兵庫県での発生例をはじめ、翌年1月から3月にかけての兵庫県、北海道および香川県の養殖ヒラメでの発生例はいずれも体表および鰭の充出血、腹部膨満、生殖腺のうっ血、筋肉内出血を主徴とする疾病であった。飼育水温は2~18℃、罹病魚の魚体重は100~700g、累積死亡率は3.3%~92%、いずれの場合も水温が15℃前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられた。また病魚からは RTG-2 細胞に IHNV と類似の細胞変性 (CPE) を発現するウイルスが分離されたが、これらのウイルスの性状はラブドウイルスの特徴を示し、KIMURA *et al.* (1986) 命名のヒラメラブドウイルス (*Rhabdovirus olivaceus*, HRV) と同定された。HRV において自然発症したヒラメ病魚の病理組織像を検討したところ、腎臓の造血組織や脾臓の脾髄組織に著しい壊死や出血が認められた。さらに体側筋繊維間および精巢、卵巢の間質組織中に

充・出血が、また消化管の粘膜層および筋層中にも出血が観察された。

数種のサケ科魚類に対する HRV の病原性を検討したところ、腹腔内接種法ではニジマスが 55% と高い死亡率を示し、死亡魚からは高いウィルス感染価が得られた。次ぎに HRV と IHNV のニジマスに対する病原性を比較検討したところ、HRV では供試したニジマスの魚体重範囲内 (0.2~18.2g) で接種ウィルス量を供試魚 1g 当りで換算した場合、死亡率に魚体重による影響はほとんど認められなかった。一方 IHNV ではニジマスの魚体重の増加と共に病原性が低下し、両ウィルスの病原性に差が認められた。HRV 感染ニジマスの組織像を IHNV 感染ニジマスの組織像と比較すると、腎臓および脾臓の壊死像は両ウィルス感染魚共に類似していたが、IHNV 感染症の特徴とされている腸管の緻密層の好酸性顆粒細胞の壊死変性が HRV 感染魚には観察されなかったことから、病理組織像の面からも両ウィルス感染症は明瞭に区別された。

HRV の増殖過程および増殖の場を知る目的で、まず魚類病原ラブドウィルス、HRV、IHNV、PFRV、EVA、EVEX の *in vitro* における RTG-2 細胞での増殖過程、増殖様式を検討した。RTG-2 感染細胞では各ウィルスともに接種後 12 時間目にウィルス粒子の出芽像が観察され、HRV 感染細胞の細胞膜表面には電子密度が高く内部に微小繊維構造を持つ突起状の構造物とその表面にウィルス粒子の出芽が観察された。つぎにヒラメおよびニジマスの腎臓の電顕観察を行い、造血組織中にウィルス粒子の出芽像を観察し、ここが HRV の主な増殖場所であると考えられた。特に HRV 人工感染ニジマスの腎臓では細網細胞上に RTG-2 感染細胞で見られた様な突起状の構造物が観察され、この構造物は HRV に特有であることが示唆された。

HRV の防除対策としてまずヒラメの HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を検討したところ、5、10、15、20℃ 試験群でそれぞれの累積死亡率は 40、60、20、0% を示し、発症個体には HRV 特有の症状が観察された。病理組織学的には 5℃、10℃ 群で腎臓および脾臓に充出血や壊死が観察されたが、10℃ 試験群の充出血や壊死の程度は 5℃ 試験群に比べ軽度であった。加えて、10℃ 試験群の生残個体には脾臓組織中にマクロファージの浸潤像が見られ、20℃ 試験群の腎臓および 15、20℃ 試験群の脾臓に黒色大食細胞の増殖と考えられる像が認められた。また、血液塗抹標本の観察では、5℃ 試験群の個体に明らかな幼若赤血球の増加が認められ、水温の高い群ではリンパ系の細胞が顕著に観察された。つぎに HRV を対象にその紫外線感受性および市販の消毒剤による不活化効果を検討したところ、HRV のウィルス感染価を 90% 以上減少させるのに要する U.V. 照射量 ( $ID_{90}$ ) は、 $6.0\sim 7.8\times 10^3 \mu W\cdot sec/cm^2$  であり、消毒剤の濃度はクレゾール石鹼液の場合 500ppm (原液の 1000 倍希釈濃度) 以上、塩化ベンザルコニウムでは 200ppm (原液の 100 倍) 以上、イソジンと次亜塩素酸ナトリウムはそれぞれ 100ppm (原液の 1000 倍)、50ppm (原液の 1000 倍) 以上であった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり終始懇篤なる指導と鞭撻を賜った北海道大学水産学部微生物学講座教授木村喬久博士（現北海道大学名誉教授）に深大なる謝意を表すると共に、種々有益な助言と指導を賜った北海道大学水産学部発生学遺伝学講座教授山崎文雄博士，ならびに北海道大学微生物学講座助教授絵面良男博士（現北海道大学教授）に深く感謝申し上げる。また病理組織の観察に際して、有益なる助言を賜った三重大学水産学部助教授宮崎照雄博士に厚くお礼申し上げるとともに、本研究遂行上、適切な助言と指導を頂いた北海道大学水産学部微生物学講座助手田島研一博士（現北海道大学助教授）ならびに吉水 守博士（現北海道大学講師）に心から感謝申し上げる。さらに本稿作製にあたり校閲ならびに指導を賜った水産庁南西海区水産研究所資源増殖部部長森岡泰啓博士，同部魚類増殖研究室室長佐古 浩氏に厚く感謝申し上げる。また研究試料の供与等種々の便宜を戴いた兵庫県水産試験場の五利江重昭氏，香川県水産試験場松本紀男氏および東京水産学部助教授福田穎穂博士にそのご厚情に対し深謝の意を表する。さらに実験上の助言また協力を戴いた北海道大学水産学部微生物講座学生諸氏，南西海区水産研究所資源増殖部主任研究官鈴木伸洋博士にも厚くお礼申し上げる。

## 文 献

- AMEND,D.F., 1970: Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. *J.Fish Res.Board Can.*,**27**,265-270.
- AMEND,D.F., 1976: Prevention and control of viral diseases of salmonids. *J.Fish Res.Board Can.*,**33**,1059-1066.
- AMEND,D.F., and V.C.CHAMBERS, 1970 : Morphology of certain viruses of salmonid fishes. II. In vivo studies of some viruses causing infectious hematopoietic necrosis. *J. Fish Res.Board Can.*,**27**,1385-1388.
- AMEND,D.F., and K.A.JOHNSON, 1981: Current status and further needs of *Vibrio anguillarum* bacterins. In *International symposium on fish biologics, Serrodiagnostics and Vaccines*, Leetown, W.Va.Dev. Biol. Standard, 49pp.403-417.
- AMEND,D.F., and J.P.PIETSCH, 1972: An improved method for isolating viruses from asymptomatic carrier fish. *Trans.Amer.Fish Soc.*,**101**,267-269.
- AMEND,D.F., W.T.YASUTAKE, and R.W.MEAD,1969: A hematopoietic virus disease in rainbow trout and sockeye salmon. *Trans.Amer.Fish.Soc.*,**98**,796-804.
- AMEND,D.F., W.T.YASUTAKE, J.L.FRYER, K.S.PILCHER, and W.H. WINGFIELD, 1973: Infectious hematopoietic necrosis (IHN). In W.A.Dill (ed.) *Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control*. FAO, EIFAC Tech. Rap. No.17, Suppl.2. pp.80-87.
- AMLACHER,E., J.UDE, CHRISTIANE RUDOLPH, and G.ERNST, 1980: Direct electron microscopical visualization of the presumptive virus of viral haemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and additional histopathological and haematological observations. *J. Fish Dis.*,**3**,55-62.
- AVTALIN, R. R., A. WOJDANI, Z. MALIK,R.SHAHRABANI, and M. DUCZYMINER,1973: Influence of environmental temperature on the immune response in fish. *Curr.Topics Microbiol. Immun.*,

- 61,1-35.
- BACHMANN, P.A., and W.AHNE, 1974 : Biological properties and identification of the agent causing swimbladder inflammation in carp. *Arch.ges. Virusforsch.*, **44**, 261-269.
- BARONI, A., R.GALESSO, and G.BOVO, 1982: Ultrastructural observation on the viral haemorrhage septicemia in culture. *J.Fish Dis.*, **5**, 439-444.
- BELLET, 1965: Viral hemorrhagic septicemia (VHS) of the rainbow trout bred in France. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, **126** (Art.1), 194-98.
- BISSET, 1948: The effect of temperature on antibody production in cold-blooded vertebrates. *J. Pathol. Bact.*, **60**, 87-92.
- BOOTSMA, 1971 : Hydrocephalus and red-disease in pike fry (*Esox lucius* L.). *J. Fish Biol.*, **3**, 417-419.
- CARLISLE K.A.SCHAT R.ELSTON, 1979: Infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in a semi-closed (*Salmo gairdneri*) reared in sea-water. *J.Fish.Dis.*, **2**, 511-517.
- CASTRIC and P.DE KINKELIN, 1980: Occurrence of viral haemorrhagic septicemia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) reared in sea-water. *J.Fish.Dis.*, **3**, 21-27.
- CASTRIC and P.DE KINKELIN, 1984: Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) to viral haemorrhagic septicemia. *Aquaculture*, **41**, 203-212.
- COHEN, J. and G.LENOIR, 1974: Ultrastructure et morphologie de quatre rhabdovirus de poissons. *Ann.Rech.vétér.*, **5** (4), 443-450.
- COONS, A.H., and M.H.KAPLAN, 1950: Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody. *J.Exp.Med.*, **91**, 1-13.
- DARLINGTON, R.W., R.TRAFFORD, and K.WOLF, 1972 : Fish rhabdovirus : morphology and ultrastructure of North American salmonid isolates. *Arch. ges. Virusforsch.*, **39**, 257-264.
- DORSON, M. and P.DE KINKELIN, 1974: Mortality and Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus; role of temperature. *Ann. Rech.vétér.*, **5**, 365-372.
- EDELSTEIN, L.M., 1971: Melanin: a unique biopolymer. In Pathology. Annual, ed.H.L. Ioachim, pp. 309-324. New York: Appleton-Century-Crofts.
- EIGER, B., and H.HENTSCHEL, 1983: Glomerular disease in cultured rainbow trout (*Salmo gairdneri*) suffering from presumptive chronic viral haemorrhagic septicemia. *J.Fish Dis.*, **6**, 211-229.
- ELGER, B., M.NEUKIRCH, and H.HENTSCHEL, 1986: The kidney of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in the acute phase of viral haemorrhagic septicaemia : in vivo experiments on the renal excretion of fluid, electrolytes and protein. *J.Fish Dis.*, **9**, 381-392.
- FIJIAN, N.N., 1968: Progress report on acute mortality of channel catfish fingerlings caused by a virus. *Bull. Off. int. Epizoot.*, **69**, 1167-1168.
- FIJIAN, N.N., 1972: Infectious dropsy in carp - a disease complex. In *Diseases of Fish*, Proceedings of symposium no.30, Zoological Society, London, May, 1971, ed. L. E.MAWDESLEY-THOMAS, pp. 39-51. New York and London: Academic Press and the Zoological Society.
- FIJIAN, N.N., Z.PETRINCE, D.SULIMANOVIC and L.O.ZWILLENBERG, 1971: Isolation of viral causative agent from the acute form of infectious dropsy in carp. *Vet. Archiv.*, **41**, 125-135.
- FRYER, J.L., J.S.ROHOVEC, G.I.TEBBID, J.S.MCMICHAEL, and K.S.PILCHER, 1976 : Vaccination for control of infectious diseases in Pacific salmon. *Fish Pathol.*, **10**, 155-164.
- 福田穎穂・加藤宜昭・周 信佑・保田義博・佐野徳夫, 1989: IHN弱毒クローニングのニジマス稚魚に対する病原性について. *日本水誌*, **55**(2), 267-271.
- GHITTINO, P., 1965: Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in the rainbow trout in Italy. *Ann.N.Y. Acad.Sci.*, **126**(Art.1), 468-478.
- GHITTINO, P., 1973: Viral hemorrhagic septicemia (VHS). In W.A.Dill (ed.) *Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control*. pp.4-11.
- 五利江重昭・中本幸一, 1986: ヒラメより分離されたウイルスの病原性. *魚病研究*, **21**, 177-180.

- HASOBE, M., and M. SANEYOSHI, 1985a: A New method for the evaluation of antiviral agents against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) on microtiter plates: CPE spot reduction method. *Bull. Jap. Sci. Soc. Fish.*, **51**, 1079-1084.
- HASOBE, M., and M. SANEYOSHI, 1985b: On the approach to the viral chemotherapy against infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in vitro and in vivo on salmonid fishes. *Fish Pathol.*, **20**, 343-351.
- 井上 潔・安元 進・安永統男・高見生雄, 1986: 養殖トラフグの口白症の病原体分離と復元実験. *魚病研究*, **21**, 129-130.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史, 1990: IPNウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. *魚病研究*, **25**(2), 81-86.
- 井上 潔・池谷文夫・山崎隆義・原 武史, 1991: IHNVウイルスに対する市販消毒剤の殺ウイルス効果. *魚病研究*, **26**(4), 189-194.
- 井上 潔・山野恵祐・前野幸男・中島員洋・松岡 学・和田有二・反町 稔, 1992: 養殖マダイのイリドウイルス感染症. *魚病研究*, **27**(1), 19-27.
- JENSEN, M. H., 1963: Preparation of fish tissue cultures for virus research. *Bull. Off. Int. epizoot.*, **59**, 131-134.
- JØRGENSEN, P. E. V., 1982: Egtved virus: temperature-dependent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish Dis.*, **5**, 47-55.
- KAMEI, U., M. YOSHIMIZU, and T. KIMURA, 1987: Plaque assay of *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *J. Fish Dis.*, **22**(3), 147-152.
- KIMURA, T., and T. AWAKURA, 1977: Current status of disease of cultured salmonids in Hokkaido, Japan. In *International Symposium on Diseases of Cultured Salmonids*, Tavolek Inc., Seattle, pp.124.
- KIMURA, T., M. YOSHIMIZU, and S. GORIE, 1986: A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Dis. Aquat. Org.*, **1**, 209-217.
- KIMURA, T., M. YOSHIMIZU, and M. TANAKA, 1981: Studies on a New Virus (OMV) from *Oncorhynchus masou* - I. Characteristics and pathogenicity. *Fish pathol.*, **15** (3/4), 143-147.
- 木村喬久・吉水 守・佐見 学・野村哲一, 1989: サケ科魚類の伝染性造血器壊死症 (IHNV) の垂直感染の可能性, 大型別枠研究, サクラマス研究グループレポート, 8, 近海漁業資源の家魚化システムの開発に関する研究 (マリーナランニング計画) プロGRESSレポート, 北海道さけ・ます孵化場, 9-22.
- 木村喬久・吉水 守・田島研一・絵面良男・坂井 稔, 1976: 養殖用水の紫外線殺菌について - I. 魚類病原細菌ならびに養魚水中生存菌の紫外線感受性. *日水誌*, **42**, 207-211.
- DE KINKELIN, P., and M. B. LE BERRE, 1974: Necrose hematopoietique infectieuse des salmonides: production d'interferon circulante induite apres l'infection experimentale de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). *C.R. Acad. Sci. Paris, Serie D*, **279**, 445-448.
- DE KINKELIN, P., and J. CASTRIC, 1982: An experimental study of the susceptibility of Atlantic salmon fry (*Salmo salar* L.) to viral hemorrhagic septicemia. *J. Fish Dis.*, **5**, 57-65.
- DE KINKELIN, P., and M. DORSON, 1973: Interferon production in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) experimentally infected with Egtved virus. *J. Gen. Virol.*, **19**, 125-127.
- DE KINKELIN, P., and R. SCHERRER, 1970: Le virus d'Egtved. I - Stabilité, développement et structure du virus de la souche danois F1. *Annales de Recherche Vétérinaire*, **1**, 17-30.
- DE KINKELIN, P., B. GALIMARD, and R. BOOTSMA, 1973: Isolation and identification of the causative organism of "Red Disease" of pike (*Esox lucius* L. 1766). *Nature*, **241**, 465-467.
- 松里寿彦, 1975: 養殖ハマチのリンホシスチス病について. *魚病研究*, **10**, 90-101.
- MATUMOTO, S., 1962: Electron microscopy of nerve cells infected with street rabies virus. *Virology*, **17**, 198.
- MATUMOTO, S., L. G. SCHNEIDER, A. KAWAI, and T. YONEZAWA, 1974: Further studies on the replication of rabies-like viruses in or ganized cultures of mammalian neural tissues. *J. Vitol.*,

14,981.

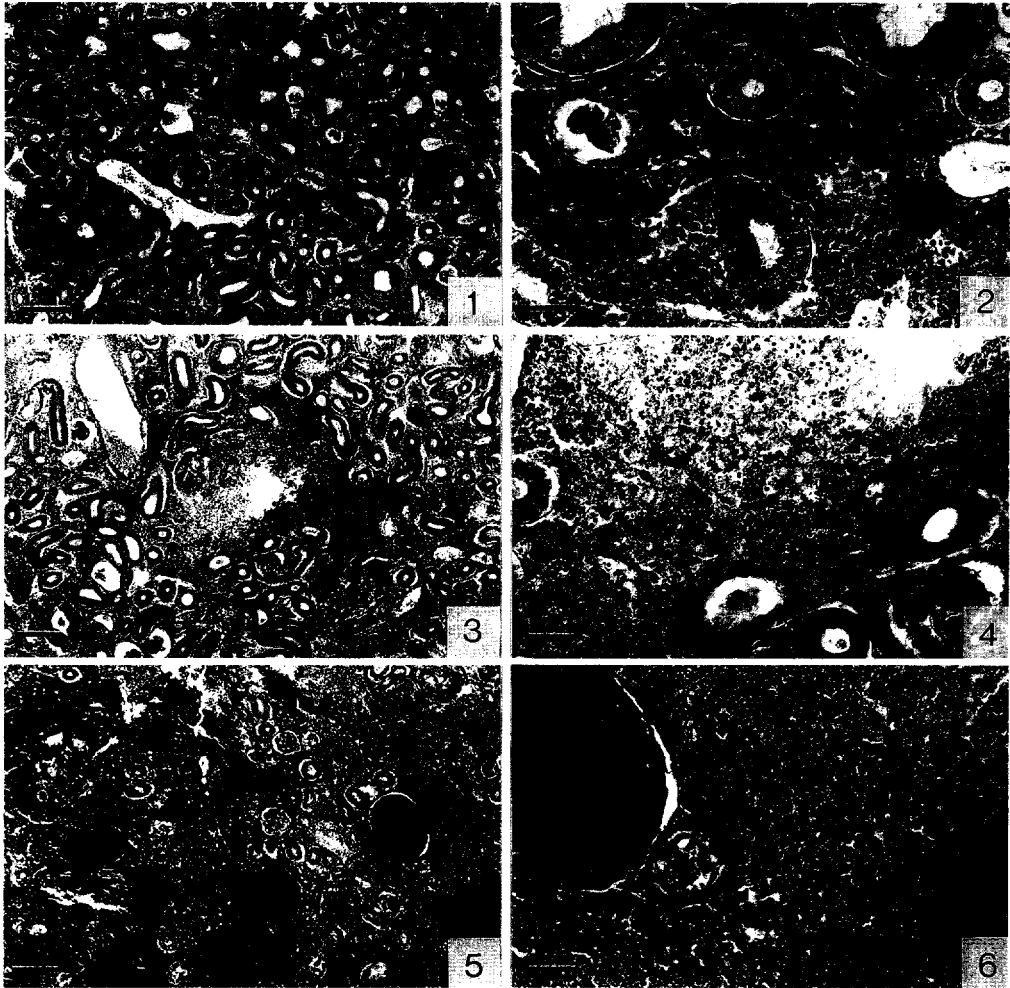
- MCKELVIE, R.M., and D. DESANTOLS, 1975: Fish virus - Survival and inactivation of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Res. Board Can.*, **32**, 1267-1273.
- MOROI, K., T. NAKAI, K. MUROGA, M. ARIMOTO, K. MUSHIAKE and I. FURUSAWA, 1992: Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology*, **187**, 368-371.
- 森実庸男, 1984: ヒラメ養殖に関する基礎的研究 - I 異なった水温で飼育した若年魚の成長. 水産増殖 **32**(3), 127-131.
- MULKAHY, D., 1983: Control of mortality caused by infectious haematopoietic necrosis virus. In (ed. by J.C. Leong and T.Y. Barila) proceeding of *viral diseases of salmonid fishes in the Columbia River basin*. Bonnesville Power Administration, Portland, Oregon. pp.51-81.
- MULKAHY, D., and J. WOOD, 1986: A natural epizootic of infectious haematopoietic necrosis virus in imported Atlantic salmon, *Salmo salar* L., reared in the enzootic region. *J. Fish Dis.*, **9**, 173-175.
- OLBERDING, K.P., and J.W. FROST, 1975: Electron microscopical observations of the structure of the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. gen. Virol.*, **27**, 305-312.
- 大迫典久・吉水 守・木村喬久, 1988a: HRV (Hirame rhabdovirus; *Rhabdovirus olivaceus*) 感染ヒラメの病理組織学的検討. 魚病研究, **23**(2), 117-123.
- 大迫典久・吉水 守・木村喬久, 1988b: *Rhabdovirus olivaceus* (HRV) 人工感染に及ぼす水温の影響. 魚病研究, **23**(2), 125-132.
- OSEKO, N., YOSHIMIZU, M. and T. KIMURA, 1990: Pathogenicity of *Rhabdovirus olivaceus* (Hirame rhabdovirus; HRV) to hirame and salmonid fish. In *The Second Asian Fisheries Forum*, 1989. 5, The Asian Fisheries Society, Tokyo, Japan, 150-154.
- ÖZEL, M., and I. SCHWANZ-PFITZNER, 1975: Vergleichende elektronmikroskopische Untersuchungen an Rhabdoviren pflanzlicher und tierischer Herkunft. III. Egtved - Virus (VHS) der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) und Rickettsienähnliche Organismen. *Zentralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene I. Originale*, **A 230**, 1-14.
- RASMUSSEN, C.J., 1965: A biological study of the Egtved disease (INuL). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126** (Art.1), 427-460.
- ROBERTS, R.J., 1975: The effect of temperature on diseases and their histopathological manifestations in fish. In *The Pathology of Fishes*, ed. W.E. RIBELIN and G. MIGAKI, pp.477-496. Madison, Wis.: University of Wisconsin Press.
- ROSS, A.I., J. PELNAR, and R.R. RUCKER, 1960: A virus-like disease of chinook salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **89**, 160-163.
- RUCKER, R.R., W.J. WHIPPLE, J.R. PARVIN, and C.A. EVANS, 1953: A contagious disease of salmon possibly of virus origin. *U.S. Fish, Wildl. Serv., Fish Bull.* **54**, 35-46.
- SANO, T., 1976: Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **10**(2), 221-226.
- SANO, T., and H. FUKUDO, 1987: Principal microbial diseases of mariculture in Japan. *Aquaculture*, **67**, 59-69.
- SANO, T., N. OKAMOTO, and T. NISHIMURA, 1981a: A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temminck and Schlegel. *J. Fish Dis.*, **4**, 127-139.
- SANO, T., T. NISHIMURA, N. OKAMOTO, and H. FUKUDA, 1977: Studies on viral diseases of Japanese fishes. VII. A rhabdovirus isolated from European eel, *Anguilla anguilla*. *Bull. Jap. Sci. Soc. Fish.*, **43**, 491-495.
- SANO, T., T. NISHIMURA, K. OGUMA, K. MOMOYAMA, and N. TAKENO, 1981b: Bacuro virus infection of cultured kuruma shrimp (*Penaeus japonicus*) in Japan. *Fish Pathol.*, **15**, 185-191.
- 反町 稔, 1987: 養殖魚類の種苗生産に影響が危惧されるラプトウイルス, HRV について. FIDIC ニュース, **11**, 41-42.
- 反町 稔・原 武史, 1985: 腹水症を呈するブリ稚魚から分離されたウイルスについて. 魚病研究, **19**,



231-238.

- TACK, E., 1959: Beitrege zur Erforschung der Forellencuche. *Arch. Fishhereiwiss*, **10**, 20-30.
- WEDERMEYER, G., 1970: The role of stress in the disease resistance of fishes. In *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*, ed. S.F. Senieszko, Spec. Publ. No.5, pp.30-35. Amer.Fish. Soc., Washington, D.C. 526pp.
- WINGTON, J.R., C.N.LANNAN, J.L.FRYER, and T.KIMURA, 1981: Isolation of a new reovirus from chum salmon in Japan. *Fish Pathol.*, **15**(3/4), 155-162.
- WOLF, K., 1966: The fish virus. *Adv.virus Research*, **12**, 35-101.
- WOLF, K., and M.C.QUIMBY, 1969: Fish cell and tissue culture. In *Fish Physiology*, ed. W.S.HOAR & D.J.RANDALL, vol.3, pp. 253-305. New York and London, Academic press.
- WOLF, K., and W.G.TAYLAR, 1975: Salmonid viruses: a syncytium forming agent from rainbow trout. *Fish Health News*, **4**, 3.
- WOLF, K., R.L.HERMAN, R.W.DARLINGTON, and W.G.TAYLOR, 1975: Salmonid viruses: effects of *Herpesvirus salmonis* in rainbow trout fry. *Fish Health News*, **4**, 8.
- YASUTAKE, W.T., 1970: Comparative histopathology of epizootic salmonid virus diseases. In *A Symposium on Diseases of Fishes and Shellfishes*. ed. S.F. Senieszko, Spec. Publ. No.5, pp.341-350, Amer.Fish.Soc., Washington, D.C. 526pp.
- YASUTAKE, W.T., and D.F.AMEND, 1972: Some aspect of pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis (IHN). *J. Fish Biol.*, **4**, 261-264.
- YASUTAKE, W.T., and C.J.RASMUSSEN, 1968: Histpathogenesis of experimentally induced viral hemorrhagic septicemia in fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. off. Int. Epiz.*, **69**, 977-984.
- 吉水 守・瀧澤宏子・木村喬久 (1986): 魚類病原ウイルスの紫外線感受性. 魚病研究, **21**(1), 47-52.
- 吉水 守・西沢豊彦・大迫典久・木村喬久, 1987: ヒラメのラブドウイルス病. 魚病研究, **22**(1), 54-55.
- YOSHIMIZU, M., H.TAKIZAWA, M.SAMI, H.KATAOKA, T.KUGO, and T. KIMURA, 1990: Disinfectant effects of ultraviolet irradiation on fish pathogens in hatchery water supply. In *The Second Asian Fisheries Forum*, 1989. 5, The Asian Fisheries Society, Tokyo, Japan, pp.82-86.
- ZWILLENBERG, L.O., M.H.JENSEN, and H.H.L.ZWILLENBERG, 1965: Electron microscopy of the virus of viral hemorrhagic septicemia of rainbow trout (Egtved virus). *Archiv für die gesamte Virusforschung*, **17**, 1-19.

Plate 1. Kidney of diseased hirame



**Fig. 1.** Section of kidney; control fish (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 2.** High magnification of kidney in Fig.1. (bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 3.** Section of kidney ; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 4.** High magnification of kidney in Fig.3, showing the necrosis of hematopoietic cells (bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 5.** Section of kidney; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 6.** High magnification of kidney in Fig.5, showing the hyperemia in the vessel (bar=25 $\mu$ m).

Plate 2. Spleen of diseased hirame

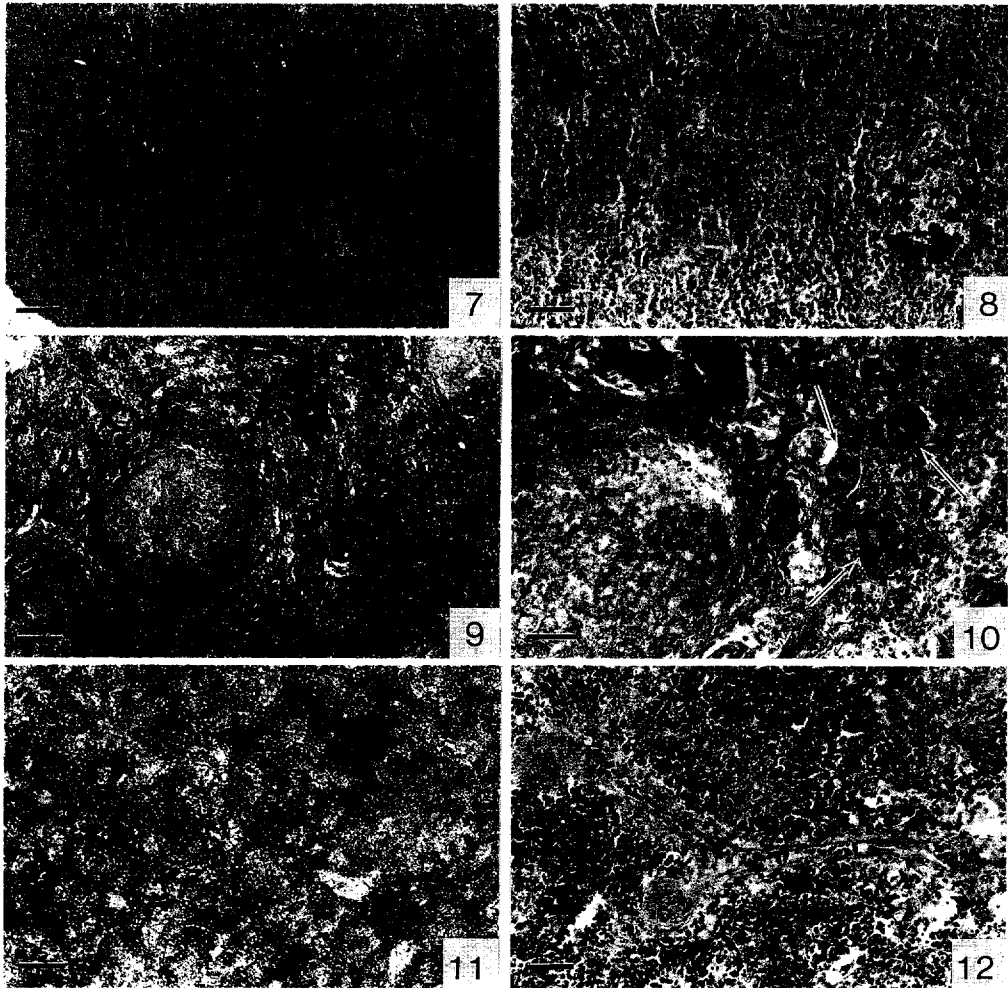


Fig. 7. Section of spleen: control fish (bar=100µm).

Fig. 8. High magnification of the spleen in Fig. 7. (bar=25µm).

Fig. 9. Section of spleen; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100µm).

Fig. 10. High magnification of spleen in Fig. 9, showing the hemorrhage and necrosis of ellipsoid and pulp and degeneration of blood vessel (arrows) (bar=25µm).

Fig. 11. Section of spleen; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100µm).

Fig. 12. High magnification of spleen in Fig. 11, showing the necrosis of ellipsoid and pulp (bar=25µm).

Plate 3. Muscle of diseased hirame

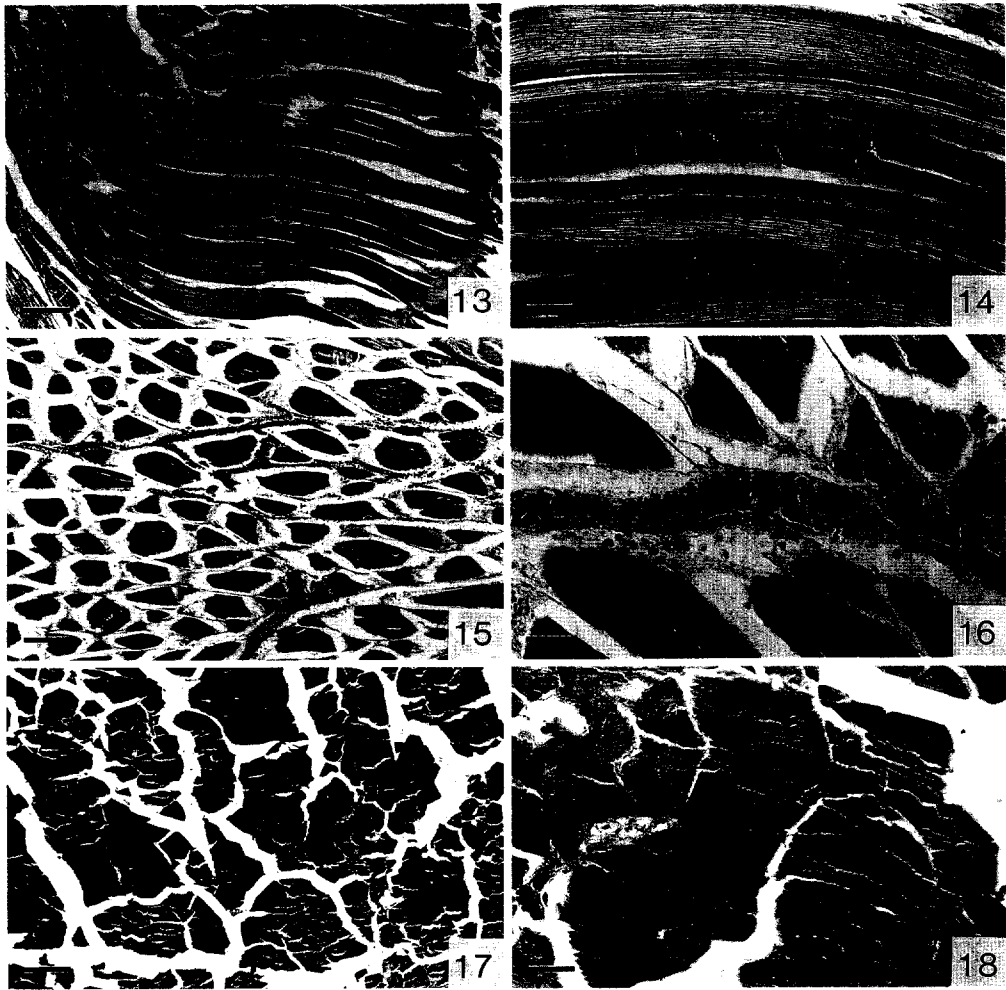


Fig.13. Section of muscle; control fish (bar=100 $\mu$ m).

Fig.14. High magnification of muscle in Fig.13. (bar=25 $\mu$ m).

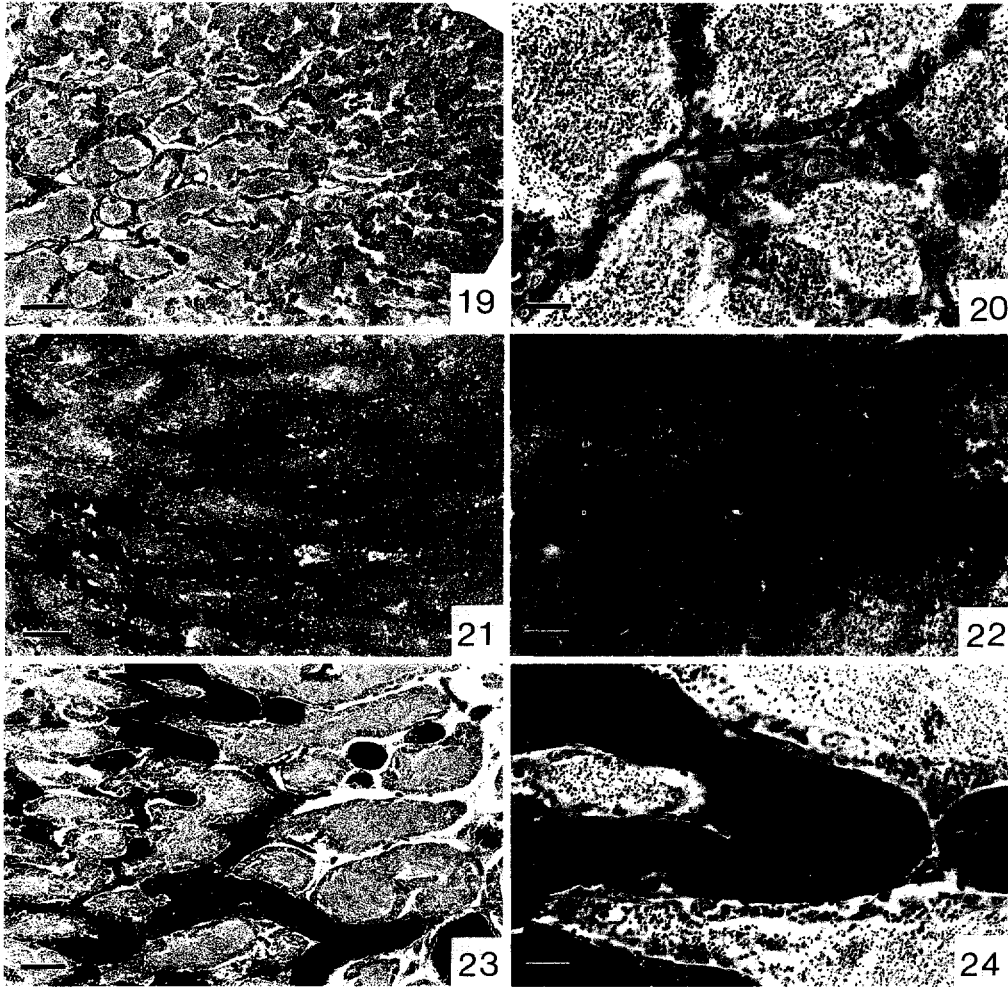
Fig.15. Section of muscle; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100 $\mu$ m).

Fig.16. High magnification of muscle in Fig.15, showing the hyperemia and hemorrhage of capillary vessels (bar=25 $\mu$ m).

Fig.17. Section of muscle; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 $\mu$ m).

Fig.18. High magnification of muscle in Fig.17, showing the hyperemia and hemorrhage in the capillary vessels (bar=25 $\mu$ m).

Plate 4. Testis of diseased hirame



**Fig. 19.** Section of testis: control fish (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 20.** High magnification of testis in Fig.19. (bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 21.** Section of testis: diseased fish, sampled at Awaji Island, Hyogo Prefecture (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 22.** High magnification of testis in Fig.21, showing the hyperemia and hemorrhage in tissue (bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 23.** Section of testis: diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 24.** High magnification of testis in Fig.23, showing the hyperemia in the tissue (bar=25 $\mu$ m).

## Plate 5. Ovary of diseased hirame

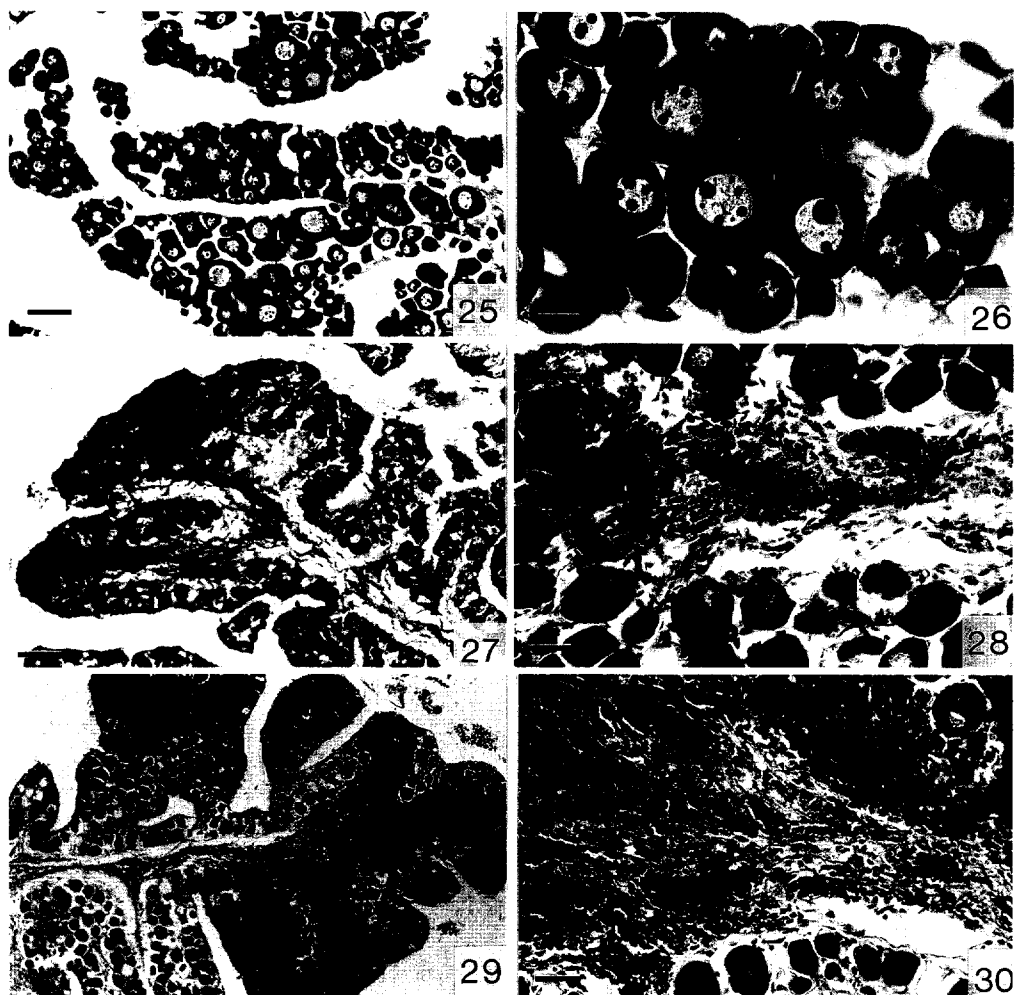


Fig. 25. Section of ovary: control fish (bar=100 $\mu$ m).

Fig. 26. High magnification of a portion of ovarian lamella in Fig.25. (bar=25 $\mu$ m).

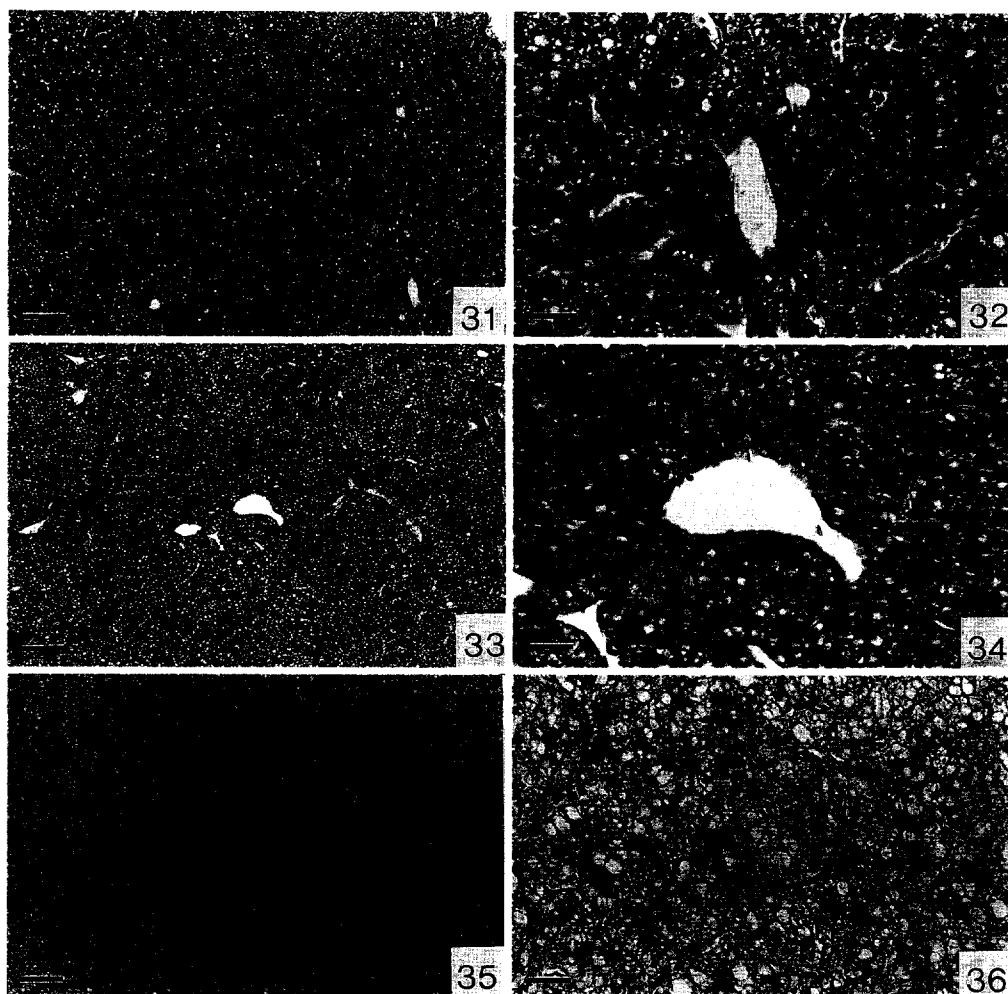
Fig. 27. Section of ovary: diseased fish, sampled at Awaji Island, Hyogo Prefecture (bar=100 $\mu$ m)

Fig. 28. High magnification of ovarian lamella in Fig.27, showing the hyperemia and hemorrhage in interstitial connective tissue of ovarian lamella (bar=25 $\mu$ m).

Fig. 29. Section of ovary: diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 $\mu$ m).

Fig. 30. High magnification of ovarian lamella in Fig.29, showing the hyperemia and hemorrhage in interstitial connective tissue of ovarian lamella (bar=25 $\mu$ m).

Plate 6. Liver of diseased hirame



**Fig. 31.** Section of liver; control fish (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 32.** High magnification of liver in Fig.31. (bar=25 $\mu$ m).

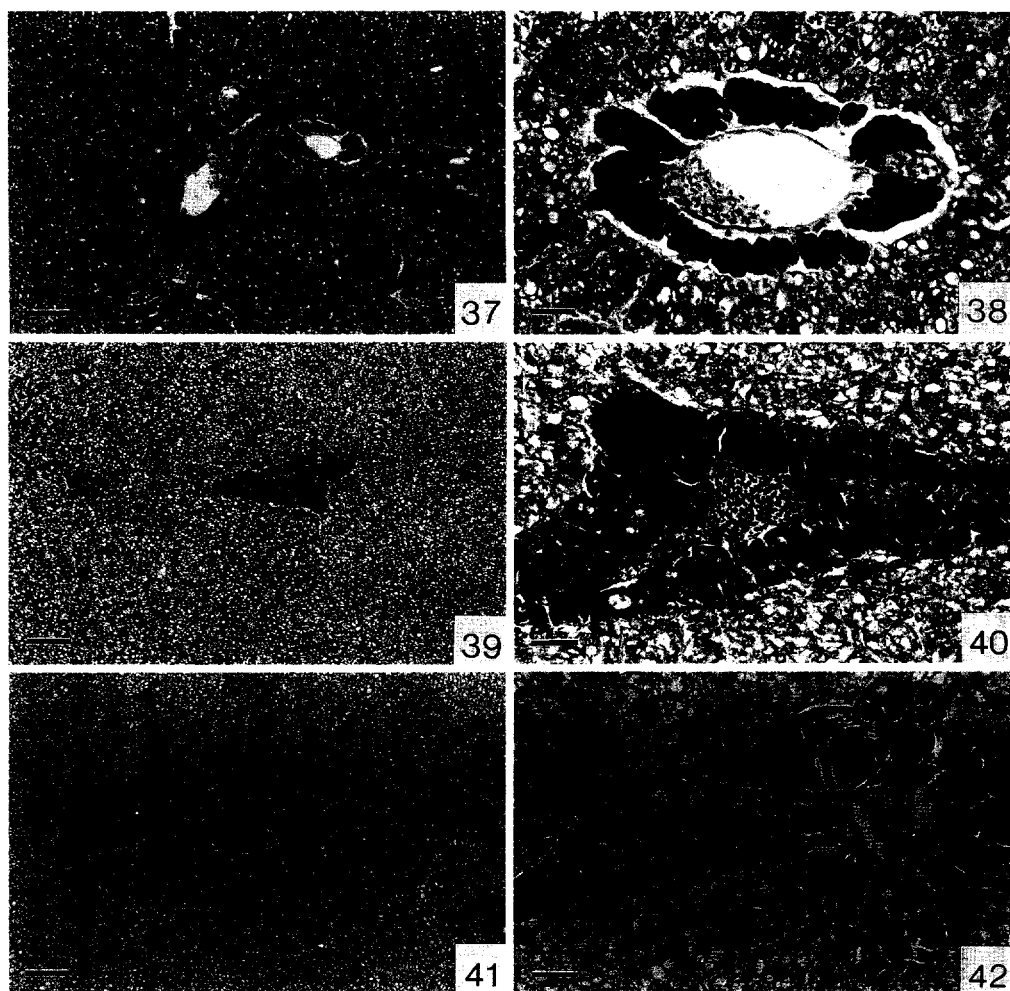
**Fig. 33.** Section of liver ; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 34.** High magnification of liver in Fig.33. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 35.** Section of liver; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 36.** High magnification of liver in Fig.35. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25 $\mu$ m).

Plate 7. Pancreas of diseased hirame



**Fig. 37.** Section of pancreas: control fish (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 38.** High magnification of pancreas in Fig.37. (bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 39.** Section of pancreas: diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 40.** High magnification of pancreas in Fig.39. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 41.** Section of pancreas: diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 42.** High magnification of pancreas in Fig.41. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25 $\mu$ m).



Plate 8. Alimentary tract of diseased hirame

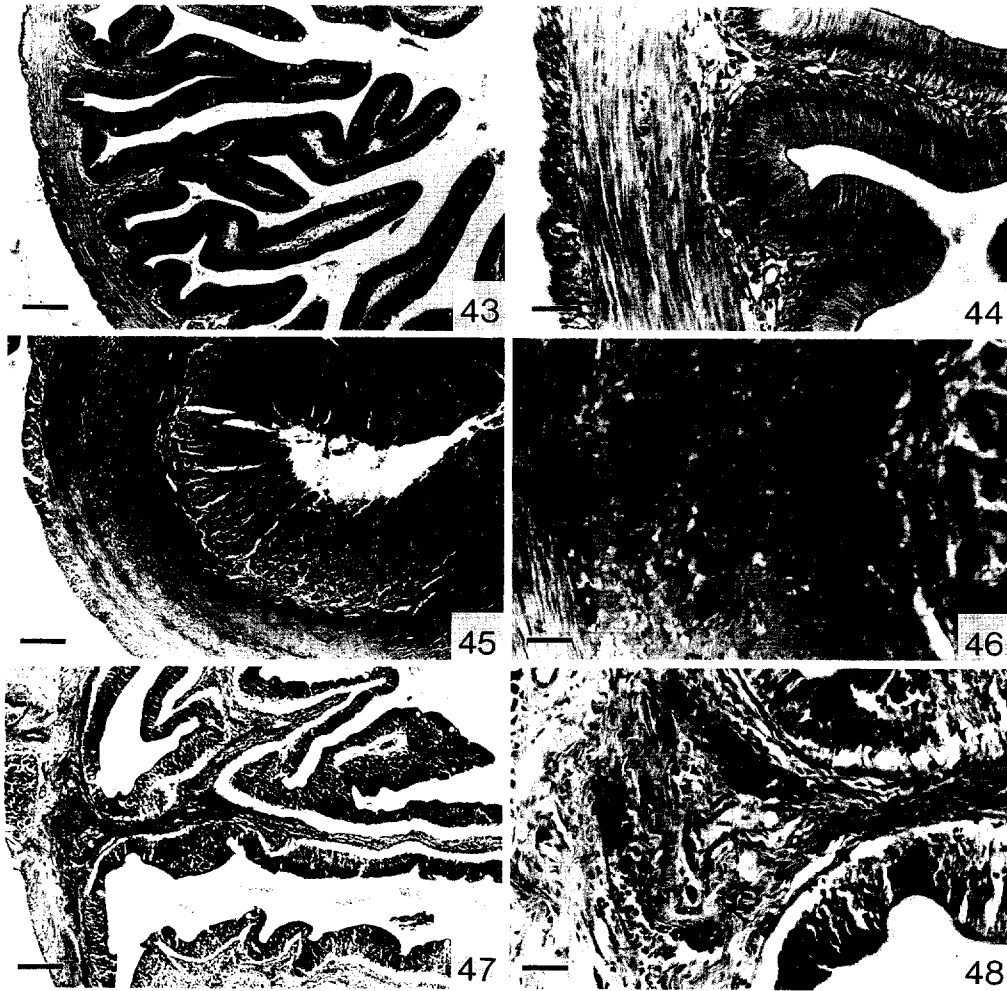


Fig. 43. Section of intestine; control fish (bar=100 $\mu$ m).

Fig. 44. High magnification of intestine in Fig.43. (bar=25 $\mu$ m).

Fig. 45. Section of stomach; diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station (bar=100 $\mu$ m).

Fig. 46. High magnification of stomach in Fig.45, showing the hyperemia and hemorrhage in mucosa (bar=25 $\mu$ m).

Fig. 47. Section of stomach; diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido (bar=100 $\mu$ m).

Fig. 48. High magnification of stomach in Fig.47, showing the hyperemia in mucosa (bar=25 $\mu$ m).

Plate 9. Diseased rainbow trout and masu salmon (body weight 0.5g) infected with HRV by intraperitoneal injection.



Fig. 49. Diseased rainbow trout, showing hemorrhage of skeletal muscle, accumulation of ascitic fluid and bilateral exophthalmus.



Fig. 50. Diseased masu salmon showing the similar signs as infected rainbow trout

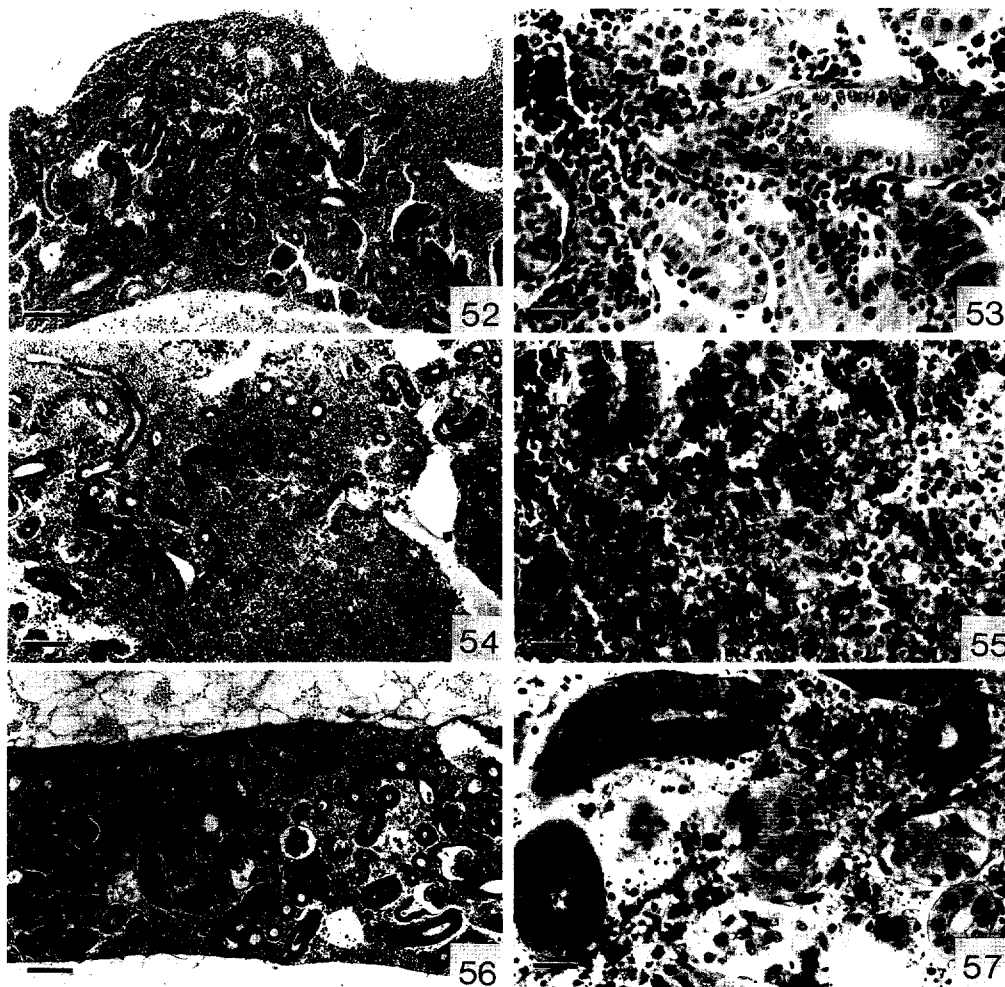


Plate 10. Diseased rainbow trout (body weight 3.0g) infected with HRV by intraperitoneal injection.



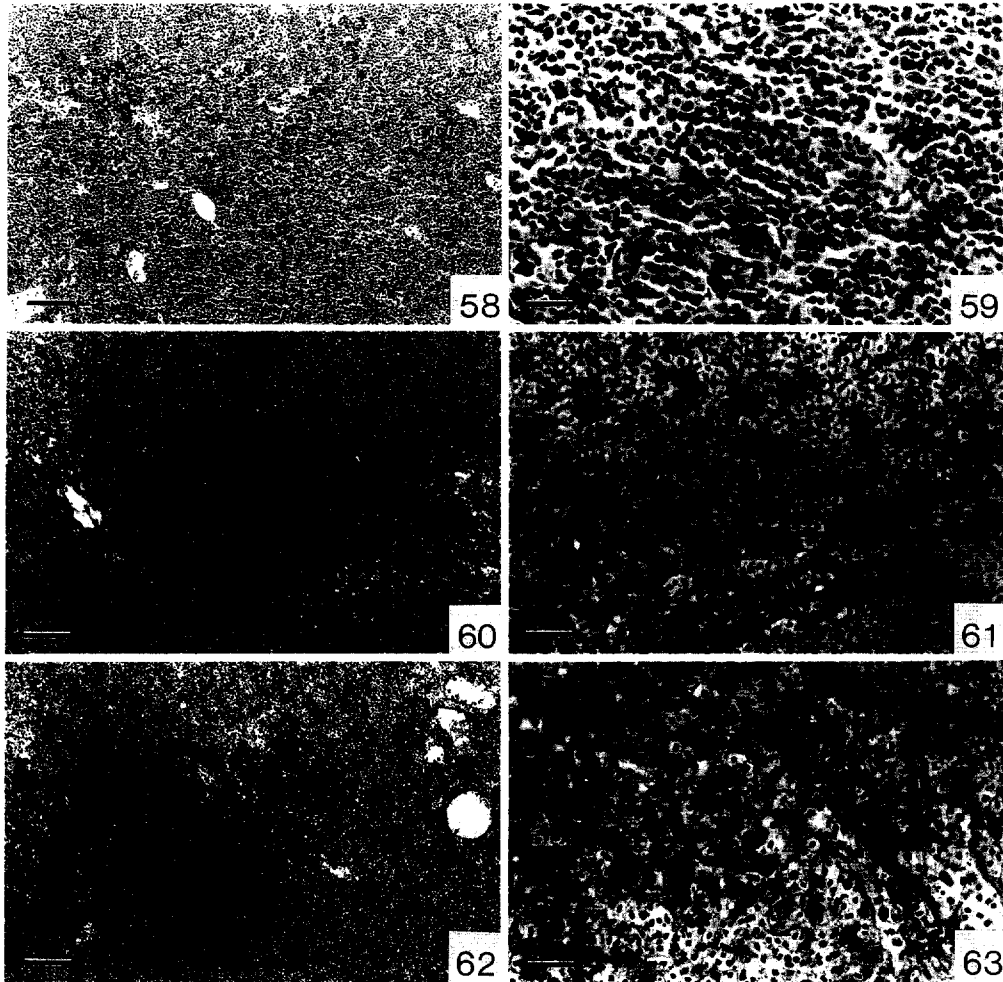
Fig.51. Hemorrhage of skeletal muscle, spleen and kidney; accumulation of ascitic fluid and bilateral exophthalmus were observed.

## Plate 11. Kidney (body kidney) of diseased rainbow trout



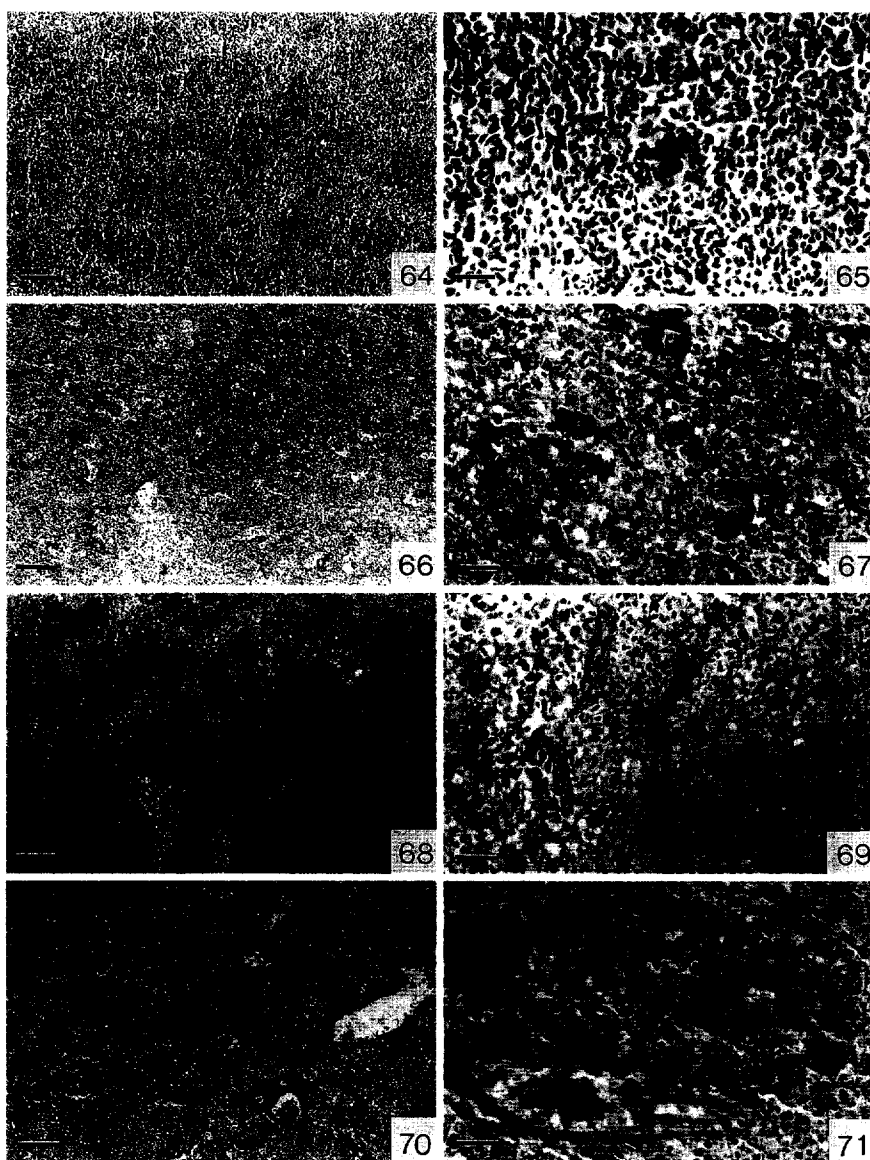
- Fig. 52.** Section of kidney; control fish (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig. 53.** High magnification of kidney in Fig.52. (bar=25 $\mu$ m).  
**Fig. 54.** Section of kidney; diseased fish infected with HRV (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig. 55.** High magnification of kidney in Fig.54, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=25 $\mu$ m).  
**Fig. 56.** Section of kidney; diseased fish infected with IHNV (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig. 57.** High magnification of kidney in Fig.56, showing the necrosis of hematopoietic cells in the interstitial lymphoid tissue and of epithelial cells of urinary tubule (bar=25 $\mu$ m).

Plate 12. Head kidney of diseased rainbow trout



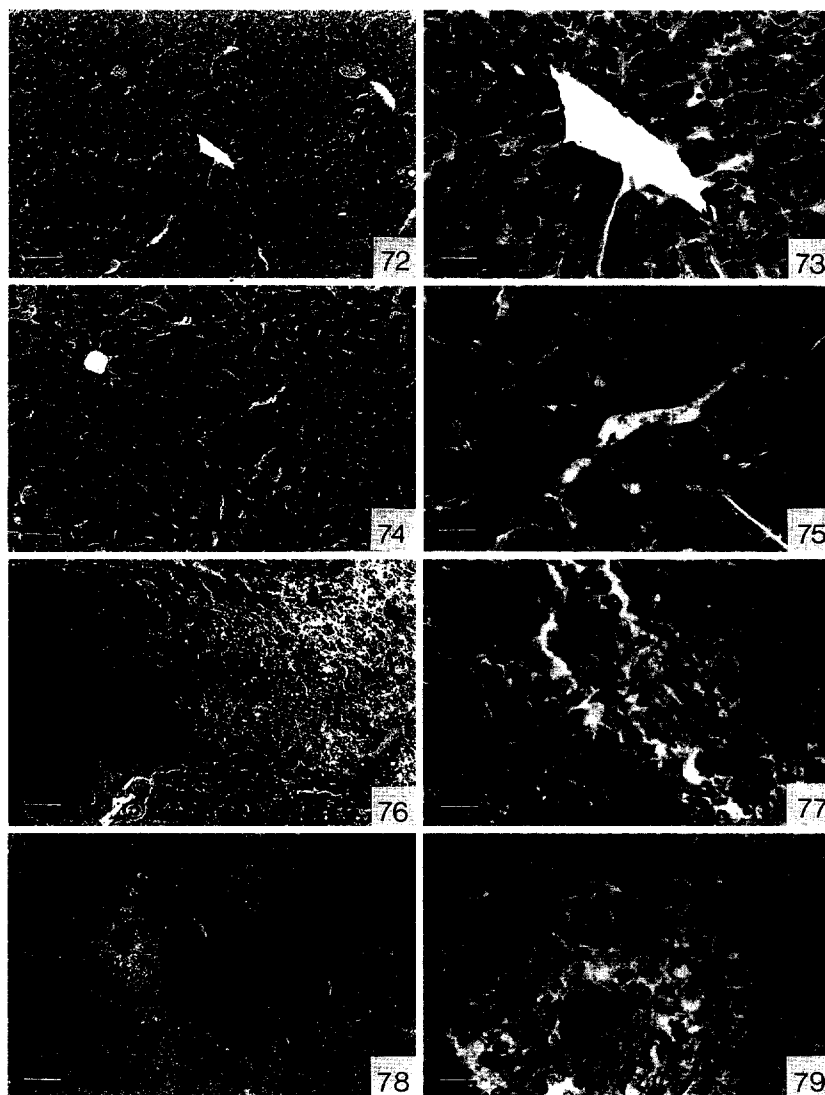
- Fig. 58.** Section of head kidney; control fish (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig. 59.** High magnification of head kidney in Fig.58. (bar=25 $\mu$ m).  
**Fig. 60.** Section of head kidney; diseased fish infected with HRV (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig. 61.** High magnification of head kidney in Fig.60, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=25 $\mu$ m).  
**Fig. 62.** Section of head kidney; diseased fish infected with IHNV (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig. 63.** High magnification of head kidney in Fig.62. Showing the necrosis of hematopoietic cells in the interstitial lymphoid tissue (bar=25 $\mu$ m).

## Plate 13. Spleen of diseased rainbow trout



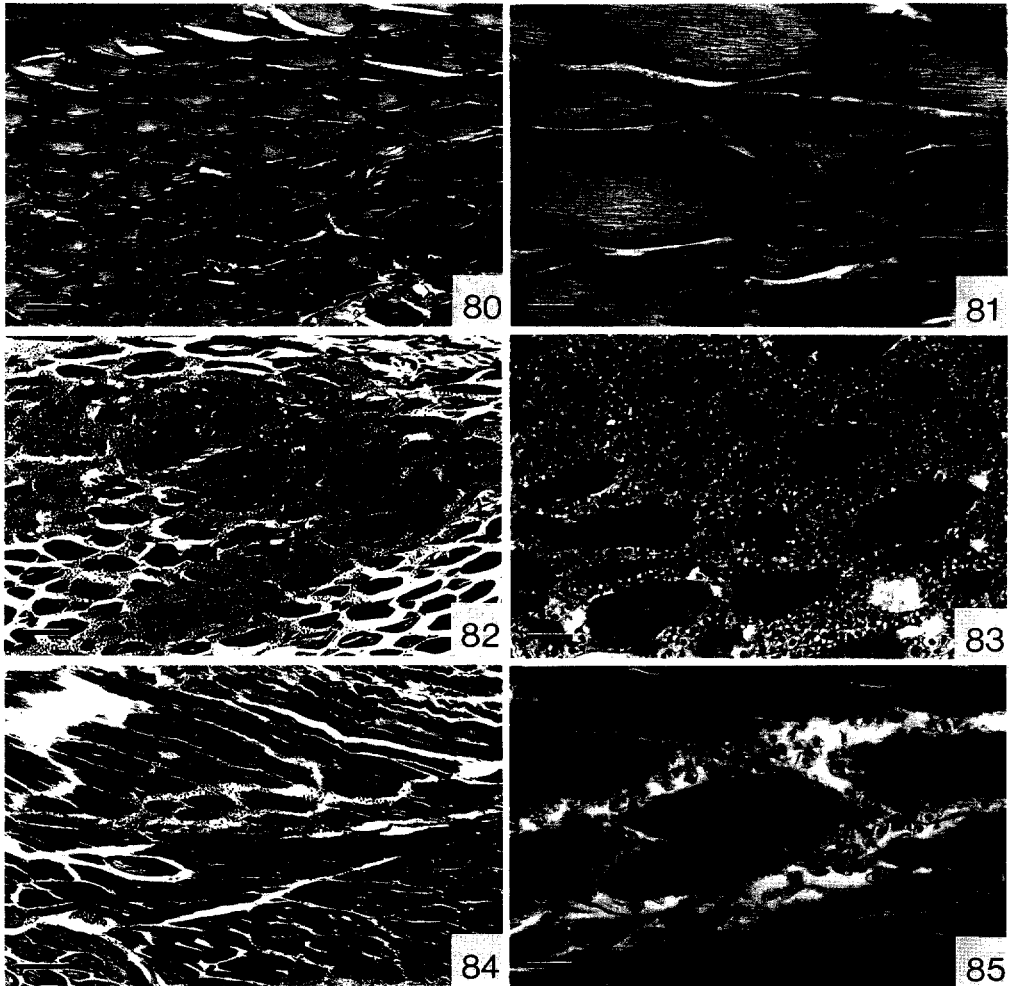
- Fig. 64.** Section of spleen; control fish (bar=100 $\mu$ m).
- Fig. 65.** High magnification of spleen in Fig.64. (bar=25 $\mu$ m).
- Fig. 66.** Section of spleen; diseased fish, 6 days after HRV infection (bar=100 $\mu$ m).
- Fig. 67.** High magnification of the spleen in Fig.66. Showing the necrosis of ellipsoid and pulp (bar=25 $\mu$ m).
- Fig. 68.** Section of spleen; diseased fish, 15 days after HRV infection (bar=100 $\mu$ m).
- Fig. 69.** High magnification of spleen in Fig.68, showing the hemorrhage and necrosis of ellipsoid and pulp (bar=25 $\mu$ m).
- Fig. 70.** Section of spleen; diseased fish infected with IHNV (bar=100 $\mu$ m).
- Fig. 71.** High magnification of the spleen in Fig.70, showing necrosis of ellipsoid and pulp (bar=25 $\mu$ m).

Plate 14. Liver of diseased rainbow trout



- Fig.72.** Section of liver; control fish (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig.73.** High magnification of liver in Fig.72.(bar=25 $\mu$ m).  
**Fig.74.** Section of liver; diseased fish, 5 days after HRV infection (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig.75.** High magnification of liver in Fig.74. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25 $\mu$ m).  
**Fig.76.** Section of liver; diseased fish, 15 days after HRV infection (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig.77.** High magnification of the liver in Fig.76, showing the necrosis of hepatic cells and hemorrhage in the tissue (bar=25 $\mu$ m).  
**Fig.78.** Section of liver; diseased fish infected with IHNV (bar=100 $\mu$ m).  
**Fig.79.** High magnification of liver in Fig.78, showing the necrosis of hepatic cells and hemorrhage in the tissue (bar=25 $\mu$ m).

Plate 15. Muscle of diseased rainbow trout



**Fig. 80.** Section of muscle: control fish (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 81.** High magnification of muscle in Fig.80.(bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 82.** Section of muscle: diseased fish infected with HRV (bar=100 $\mu$ m).

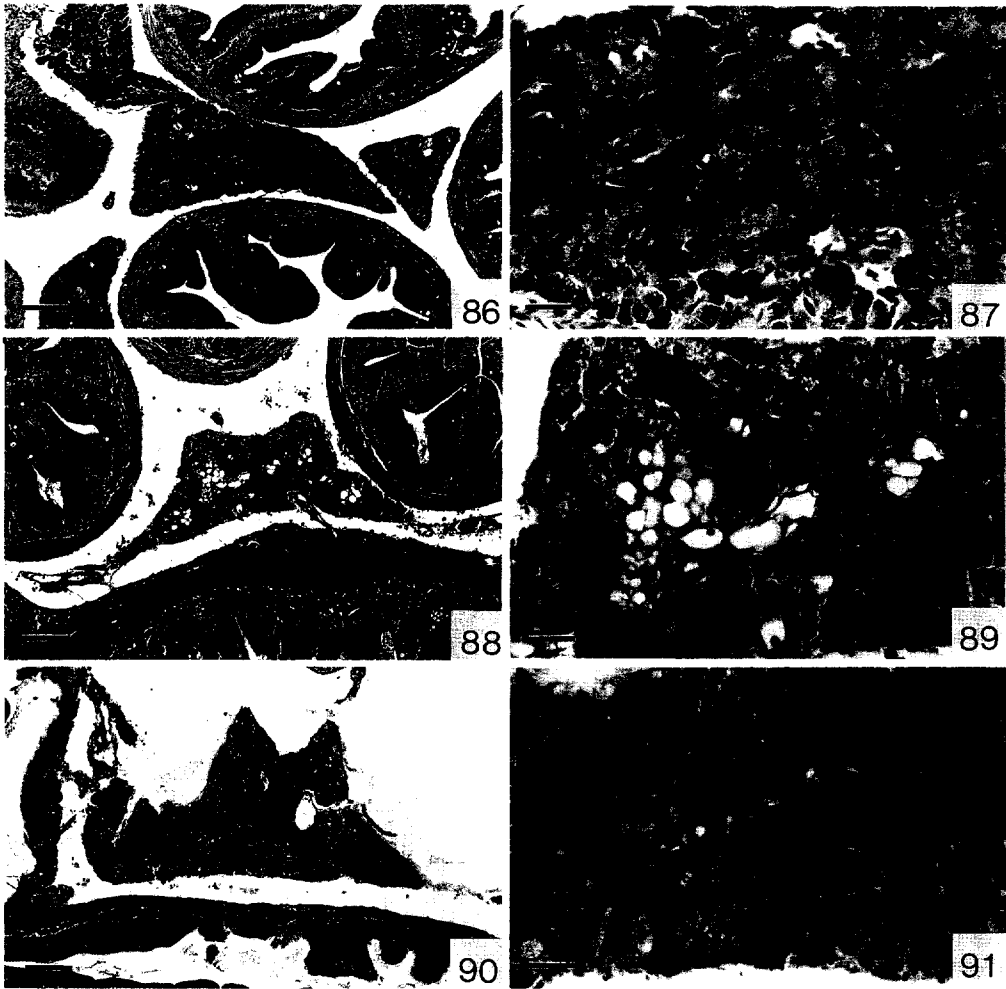
**Fig. 83.** High magnification of muscle in Fig.82, showing the hyperemia and heavy hemorrhage of capillary vessels (bar=25 $\mu$ m).

**Fig. 84.** Section of muscle: diseased fish infected with IHNV (bar=100 $\mu$ m).

**Fig. 85.** High magnification of muscle in Fig.84. No heavy hemorrhage in the capillary vessels was observed (bar=25 $\mu$ m).



Plate 16. Pancreas of diseased rainbow trout



**Fig.86.** Section of pancreas; control fish (bar=100 $\mu$ m).

**Fig.87.** High magnification of pancreas in Fig.86. (bar=25 $\mu$ m).

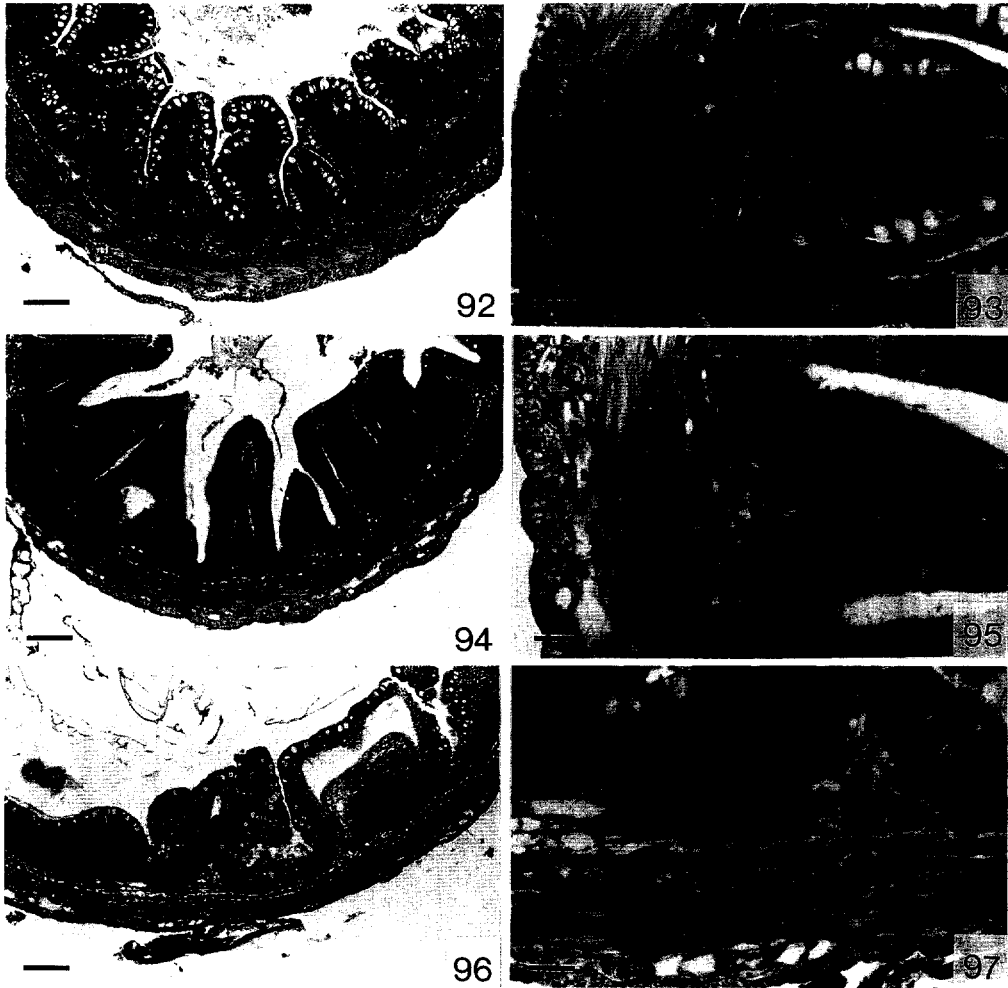
**Fig.88.** Section of pancreas; diseased fish infected with HRV (bar=100 $\mu$ m).

**Fig.89.** High magnification of pancreas in Fig.88, showing the focal necrosis of acinar cells (bar=25 $\mu$ m).

**Fig.90.** Section of pancreas; diseased fish infected with IHNV (bar=100 $\mu$ m).

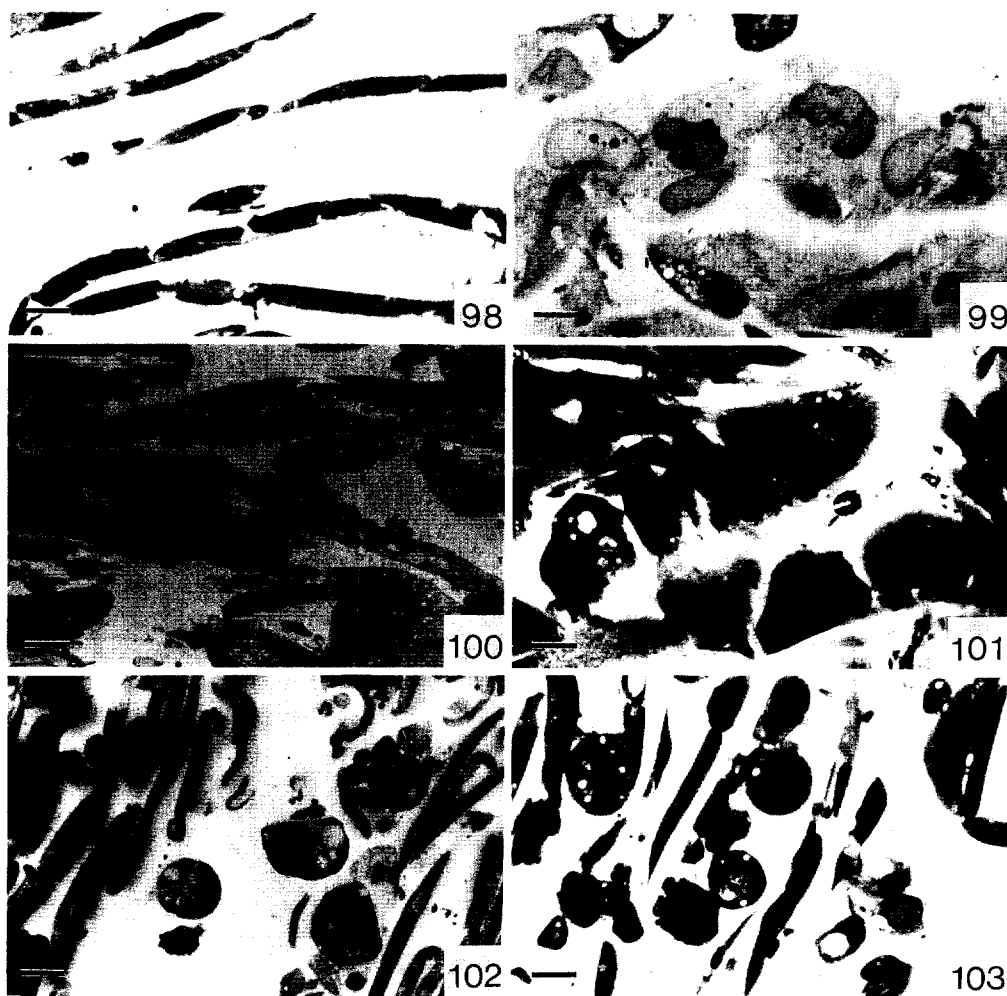
**Fig.91.** High magnification of pancreas in Fig.90, showing the focal necrosis of acinar cells (bar=25 $\mu$ m).

Plate 17. Intestine of diseased rainbow trout



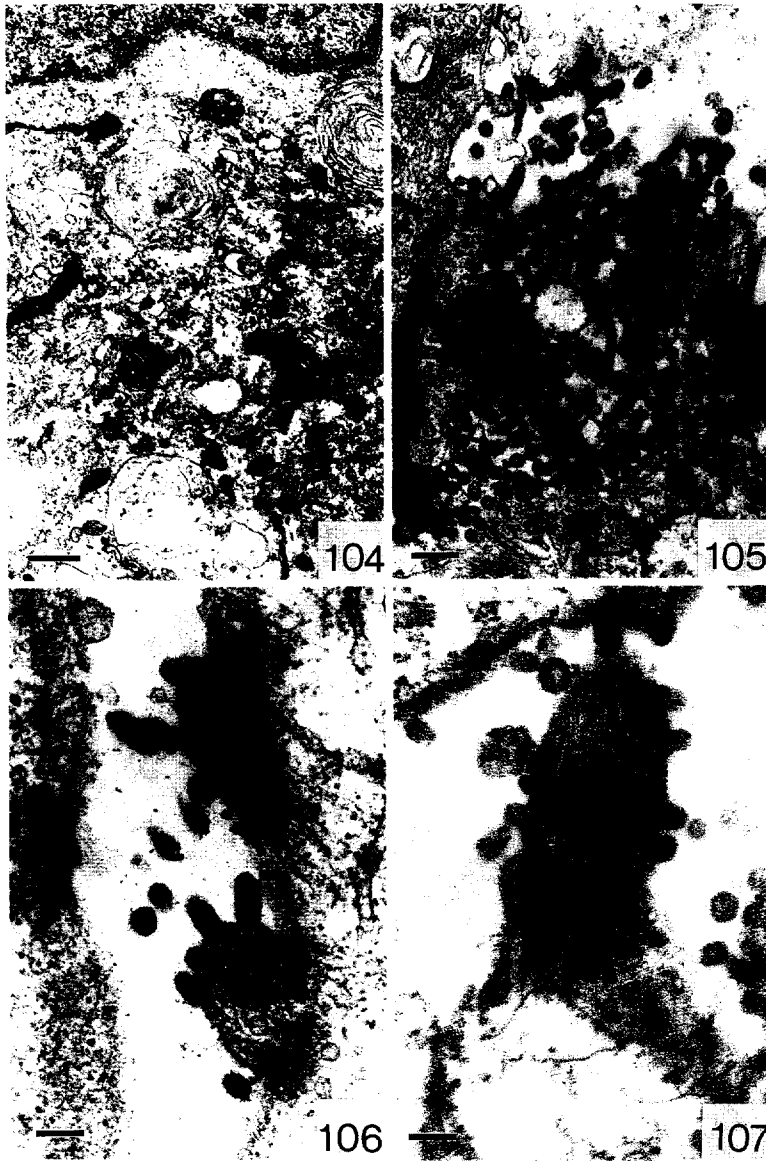
- Fig. 92. Section of intestine; control fish (bar=100 $\mu$ m)  
 Fig. 93. High magnification of intestine in Fig.92. (bar=25 $\mu$ m).  
 Fig. 94. Section of intestine; diseased fish infected with HRV (bar=100 $\mu$ m).  
 Fig. 95. High magnification of intestine in Fig.94. No histo pathological changes were found in the tissue (bar=25 $\mu$ m).  
 Fig. 96. Section of intestine; diseased fish infected with IHNV. (bar=100 $\mu$ m).  
 Fig. 97. High magnification of intestine in Fig.96, showing the necrosis of eosinophilic granular cells (EGC) in stratum compactum and of submucosa (bar = 25 $\mu$ m).

Plate 18. Microscopical observation of RTG-2 cells infected with HRV, IHNV, PFRV, EVA and EVEX.



- Fig. 98. Section of control cells (Toluidine Blue, bar= $8\mu\text{m}$ ).
- Fig. 99. Section of HRV infected cells, at 22 hr post-infection, showing the rounded cells and hypertrophy of nuclei in their cells (Toluidine Blue, bar= $8\mu\text{m}$ ).
- Fig. 100. Section of IHNV infected cells, at 20 hr post-infection, showing the rounded cells and hypertrophy of nuclei in their cells (Toluidine Blue, bar= $8\mu\text{m}$ ).
- Fig. 101. Section of PFRV infected cells, at 20 hr post-infection, showing the hypertrophy of nuclei and cells (Toluidine Blue, bar= $8\mu\text{m}$ ).
- Fig. 102. Section of EVA infected cells, at 16 hr post-infection, showing the rounded cells and nuclear degeneration. (Toluidine Blue, bar= $8\mu\text{m}$ ).
- Fig. 103. Section of EVEX infected cells, at 16 hr post-infection, showing the rounded cells and nuclear degeneration. (Toluidine Blue, bar= $8\mu\text{m}$ ).

Plate 19. Ultrastructural observation on HRV in RTG-2 cells.



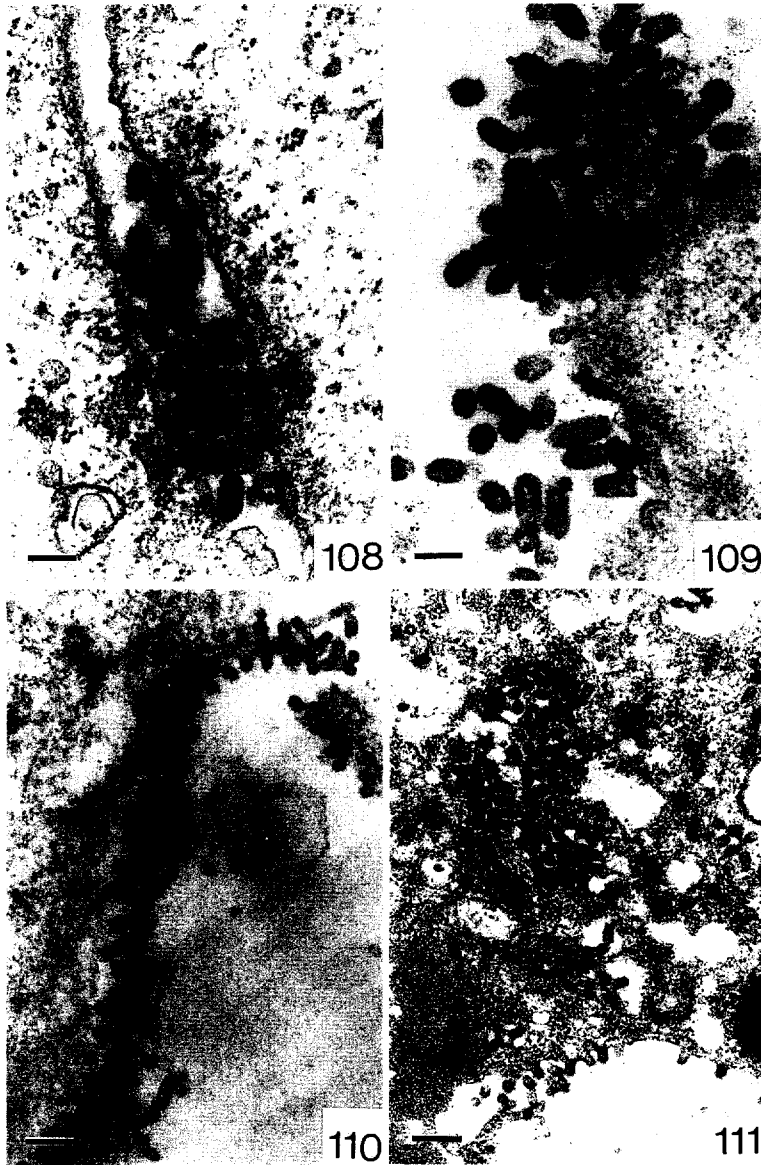
**Fig.104.** Electron micrograph of HRV infected cells, at 10 hr post-infection, showing lower electron density of cytoplasm and degeneration of mitochondria (bar=500nm).

**Fig.105.** Viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).

**Fig.106.** Club-like protuberance on the surface of cell, including the microfilament-like structure, 12 hr post-infection (bar=150nm).

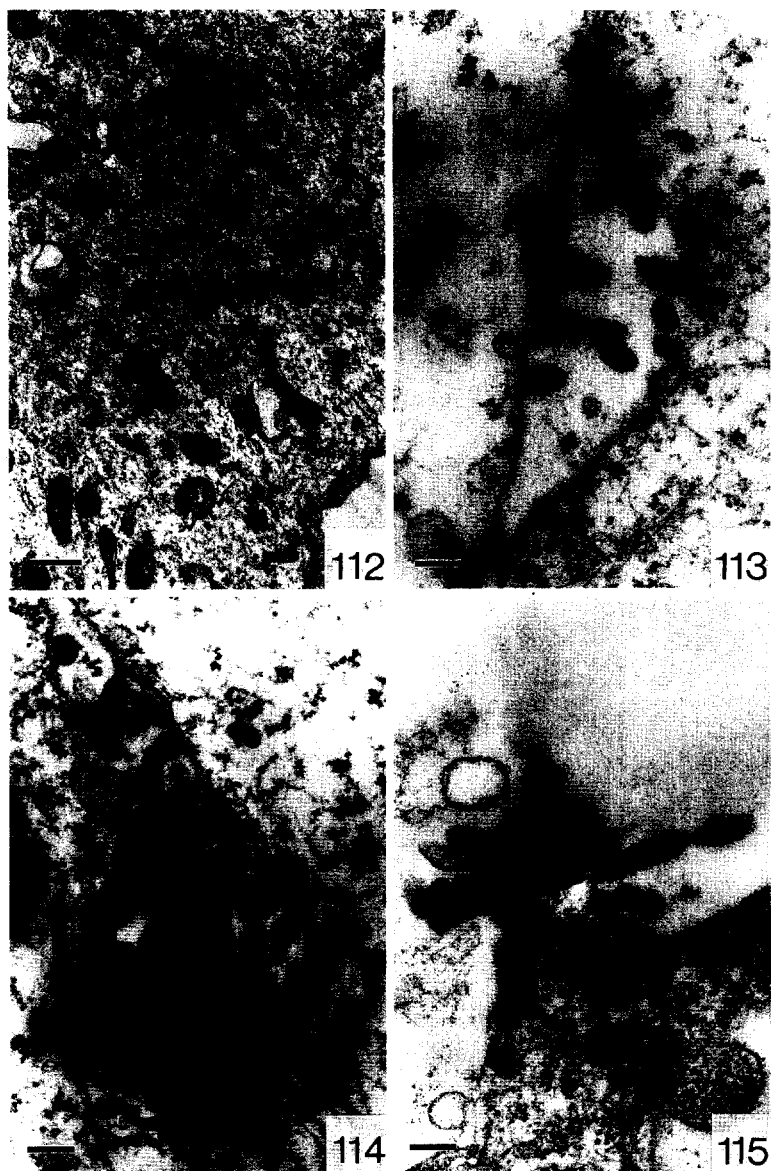
**Fig.107.** Club-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 12 hr post-infection (bar=150nm).

Plate 20. Ultrastructural observation on HRV in RTG-2 cells.



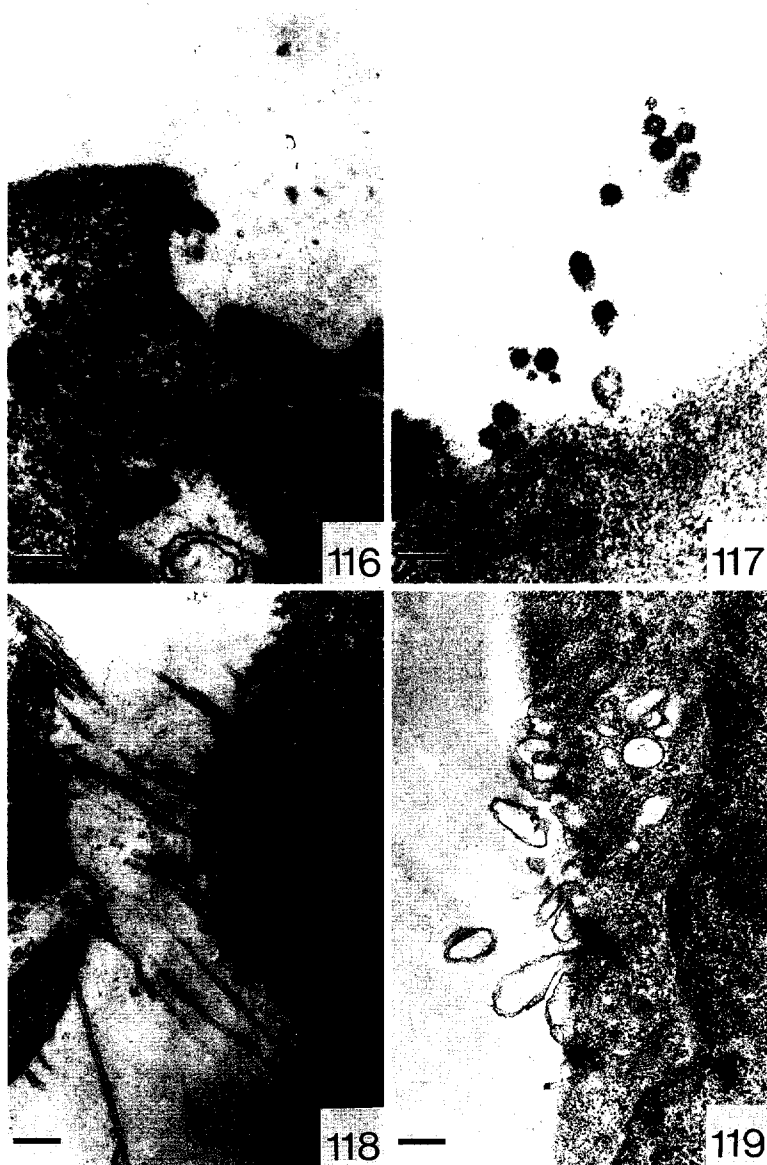
- Fig.108.** Electron micrograph of club-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 20 hr post-infection (bar=150nm).
- Fig.109.** Club-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 20 hr post-infection (bar=150nm).
- Fig.110.** Long cord-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 20 hr post-infection, (bar=300nm).
- Fig.111.** Degenerated cell and viral particles within a cellular vacuole, 24 hr post-infection. Showing higher electron density of cytoplasm (bar=300nm).

Plate 21. Ultrastructural observation on IHNV in RTG-2 cells.



- Fig.112.** Electron micrograph of IHNV infected cells, 10 hr post-infection. Showing lower electron density of cytoplasm and degeneration of mitochondria (bar=500nm).
- Fig.113.** Viral particles budding from cell membrane and many other particles outside the cell, 12hr post-infection (bar=150nm).
- Fig.114.** Many viral particles at the outside of cell, 12 hr post-infection (bar=150nm).
- Fig.115.** Club-like protuberance on the surface of cell and viral particles budding from this protuberance, 12 hr post-infection (bar=150nm).

Plate 22. Ultrastructural observation on PFRV in RTG-2 cells.



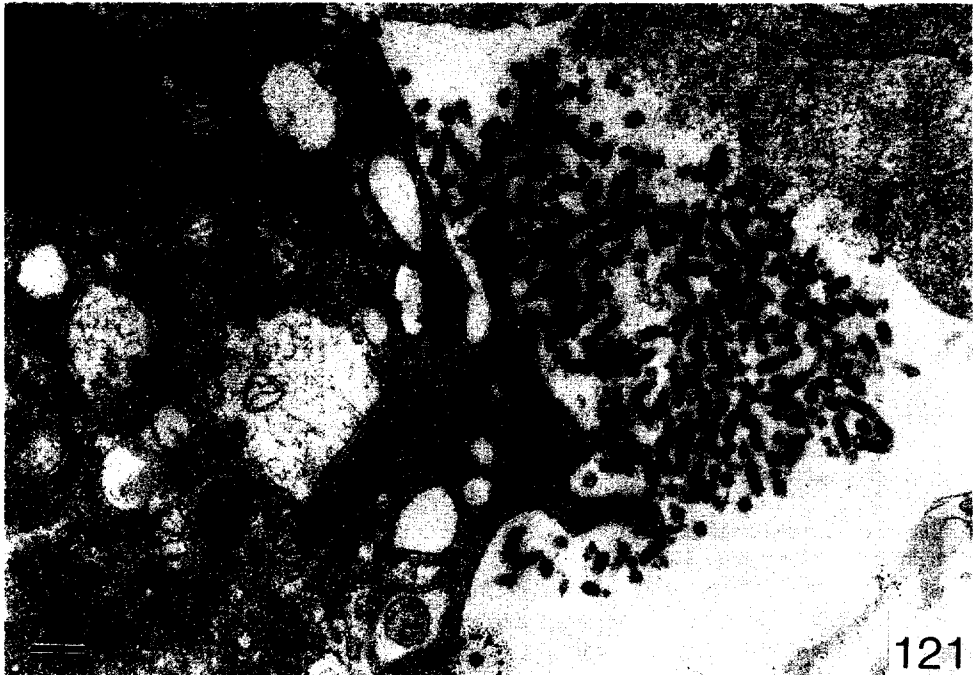
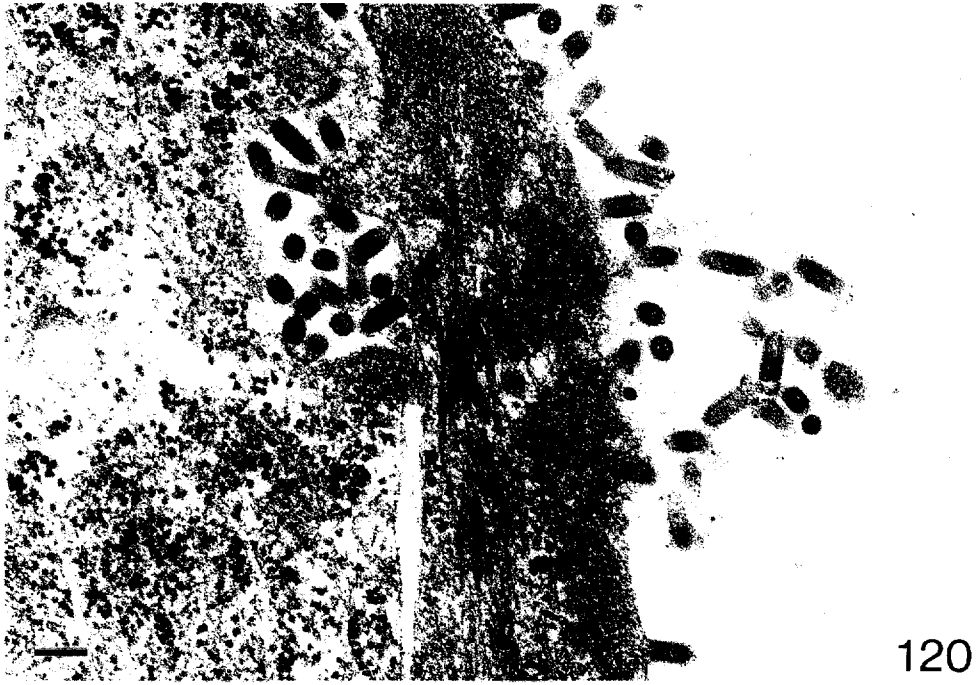
**Fig.116.** Electron micrograph of viral particles budding from the cell membrane, 12 hr post-infection (bar=150nm).

**Fig.117.** Viral particles at the outside of cell, 12 hr post-infection (bar=150nm).

**Fig.118.** Rod-like structure on the surface of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).

**Fig.119.** Bubble-like structure on the surface of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).

Plate 23. Ultrastructural observation on EVA in RTG-2 cells.

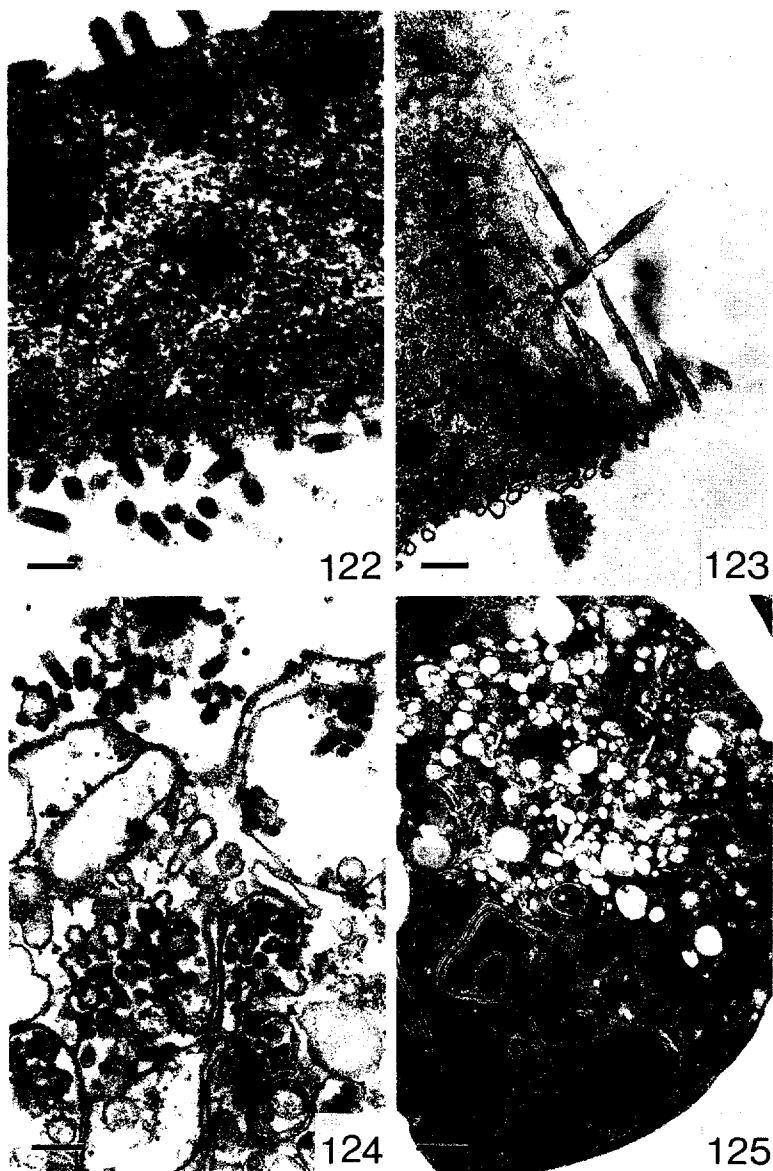


**Fig.120.** Electron micrograph of viral particles budding from the cell membrane, 12 hr post-infection (bar=150nm).

**Fig.121.** Many viral particles are observed at the outside of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).



Plate 24. Ultrastructural observation on EVEX in RTG-2 cells.



**Fig.122.** Electron micrograph of viral particles budding from the cell membrane, 12 hr post-infection (bar=150nm).

**Fig.123.** Rod-like structure on the surface of cell, 12 hr post-infection (bar=300nm).

**Fig.124.** Degenerated cell, 16 hr post-infection, showing many vacuoles and higher electron density of cytoplasm (bar=250nm).

**Fig.125.** Degenerated cell, 24 hr post-infection, showing many viral particles within a cellular vacuole and on the bended cell membrane (bar=1 $\mu$ m).

Plate 25. Ultrastructural observation on the kidney of hirame naturally infected with HRV.

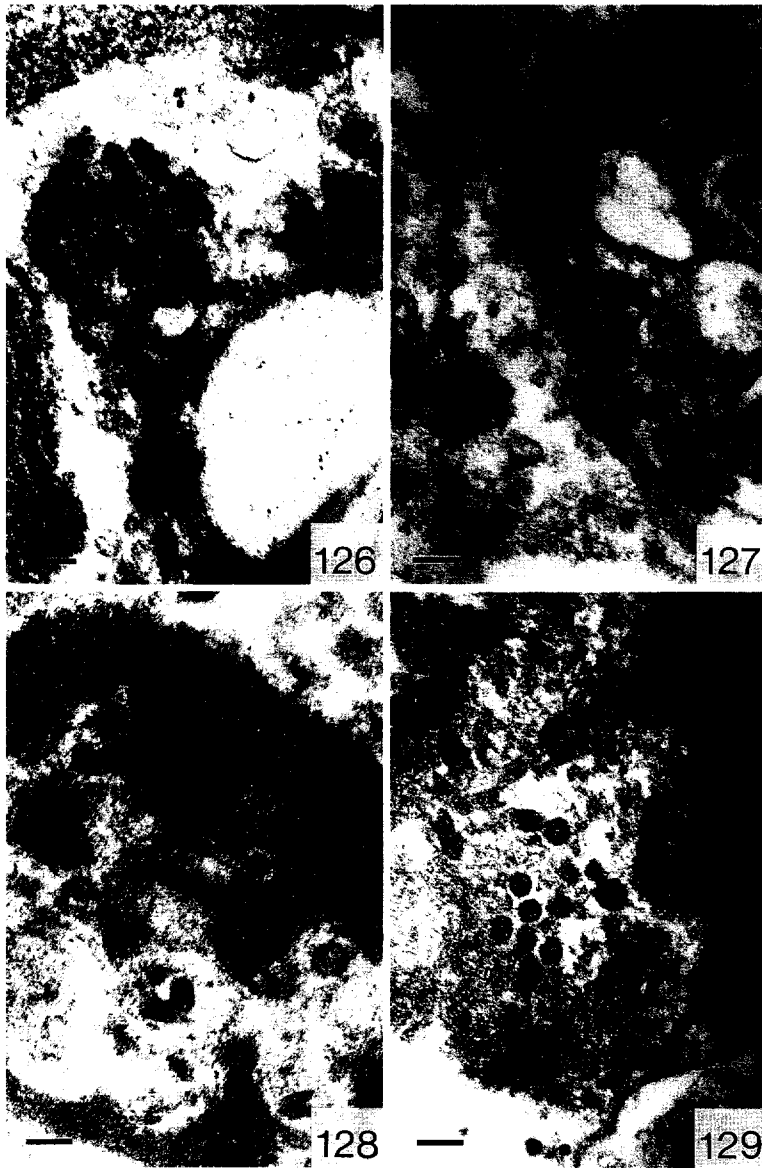


Fig.126.~129. Electron micrograph of retothelial cell in the kidney, showing viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell (bar=150nm).

Plate 26. Ultrastructural observation on the kidney of rainbow trout artificially infected with HRV.

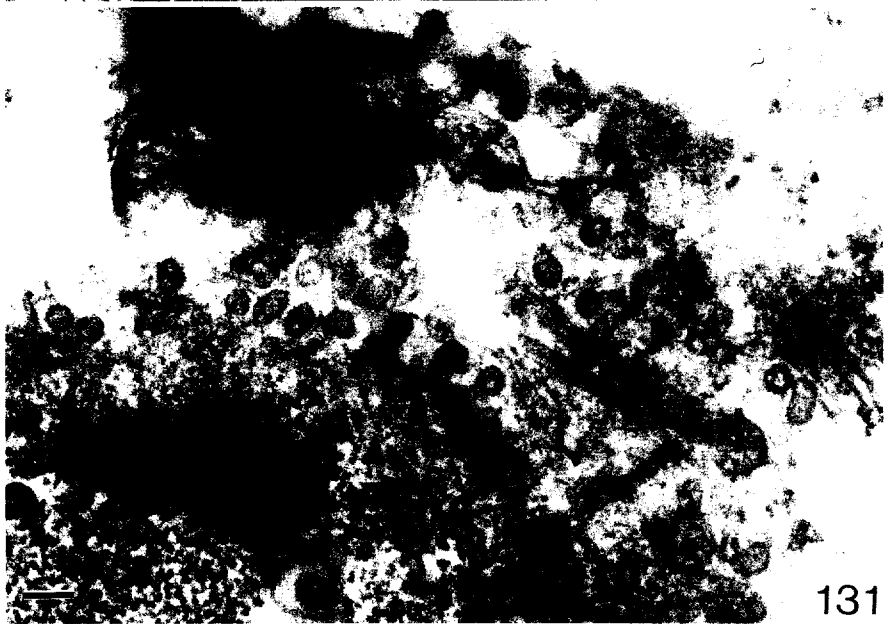
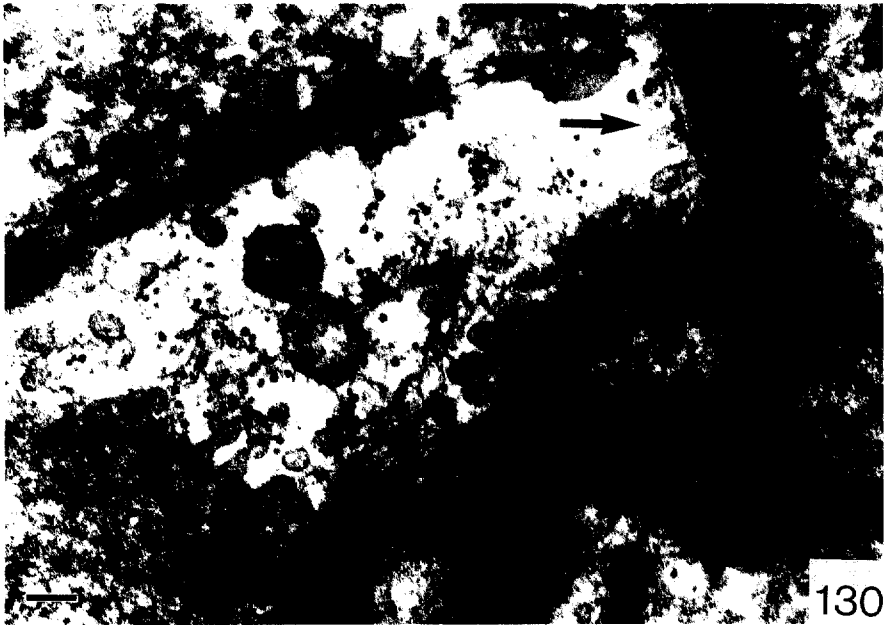


Fig.130, 131. Electron micrograph of rethelial cell in the kidney, showing viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell. Club-like protuberance on the surface of cell (arrow) and viral particles budding from this protuberance were observed (bar=150nm).

Plate 27. Ultrastructural observation on the kidney of rainbow trout artificially infected with HRV.

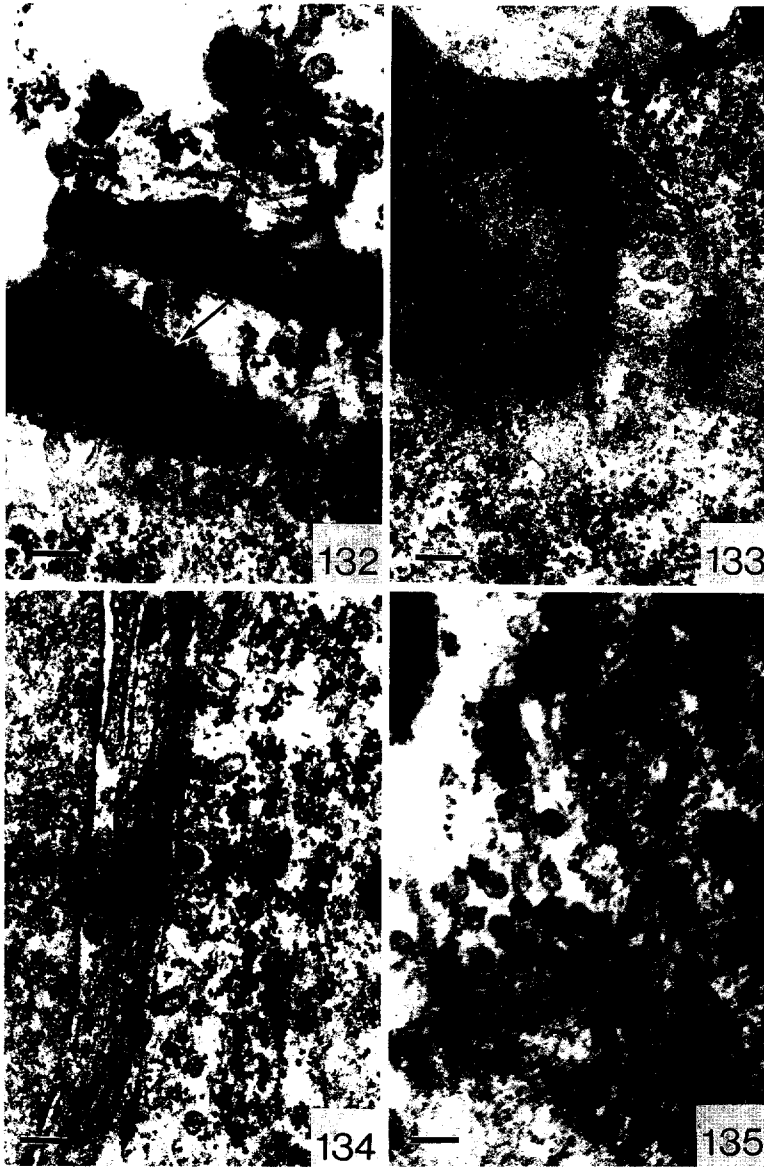


Fig.132.~135. Electron micrograph of rethelial cell in the kidney, showing viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell. Club-like protuberance on the surface of cell (arrow) and viral particles budding from this protuberance were observed (bar=150nm).



Plate 28. Signs of diseased hirame of test group, reared at 10°C.

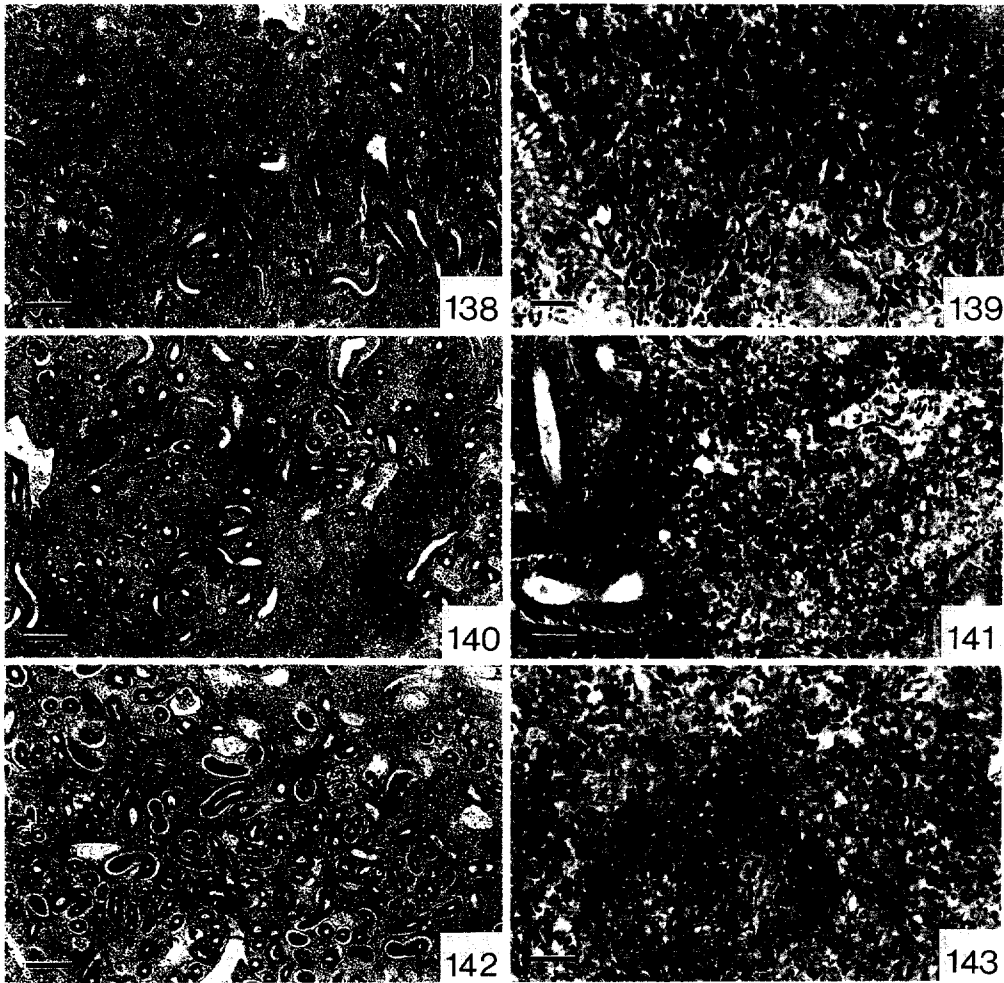


Fig.136. Focal hemorrhage in skeletal muscle and fins was observed.



Fig.137. Hemorrhage of skeletal muscle, accumulation of ascitic fluid and congestion of gonad were observed.

Plate 29. Kidney lesions of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.



**Fig.138.** Section of kidney; control fish (bar=100 $\mu$ m).

**Fig.139.** High magnification of kidney in Fig.138. (bar=25 $\mu$ m).

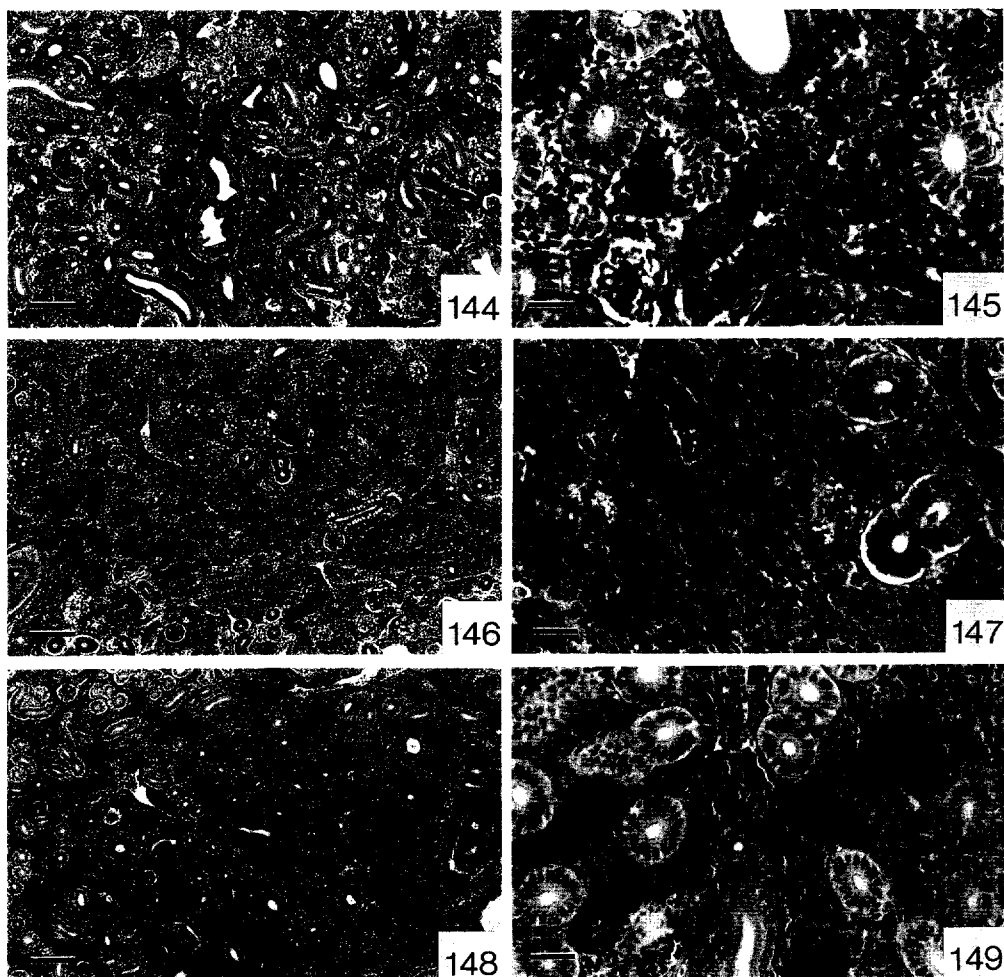
**Fig.140.** Section of kidney; moribund fish, reared at 5 $^{\circ}$ C, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=100 $\mu$ m).

**Fig.141.** High magnification of kidney in Fig.140, Swelling of nucleus is found in hematopoietic cells (bar=25 $\mu$ m).

**Fig.142.** Section of kidney; moribund fish, reared at 10 $^{\circ}$ C (bar=100 $\mu$ m).

**Fig.143.** High magnification of kidney in Fig.142, showing the necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue (bar=25 $\mu$ m).

Plate 30. Kidney lesions of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.



- Fig.144.** Section of kidney; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 10°C (bar=100  $\mu$ m).
- Fig.145.** High magnification of kidney in Fig.144. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25 $\mu$ m).
- Fig.146.** Section of kidney; asymptomatic fish infected with HRV, rear at 15°C (bar=100 $\mu$ m).
- Fig.147.** High magnification of kidney in Fig.146. No histopathological changes were found in the tissue (bar=25 $\mu$ m).
- Fig.148.** Section of kidney; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 20°C (bar=100  $\mu$ m).
- Fig.149.** High magnification of kidney in Fig.148. Hyperplasia of melanomacrophage was found in hematopoietic tissue (bar=25 $\mu$ m).

Plate 31. Spleen lesions of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.

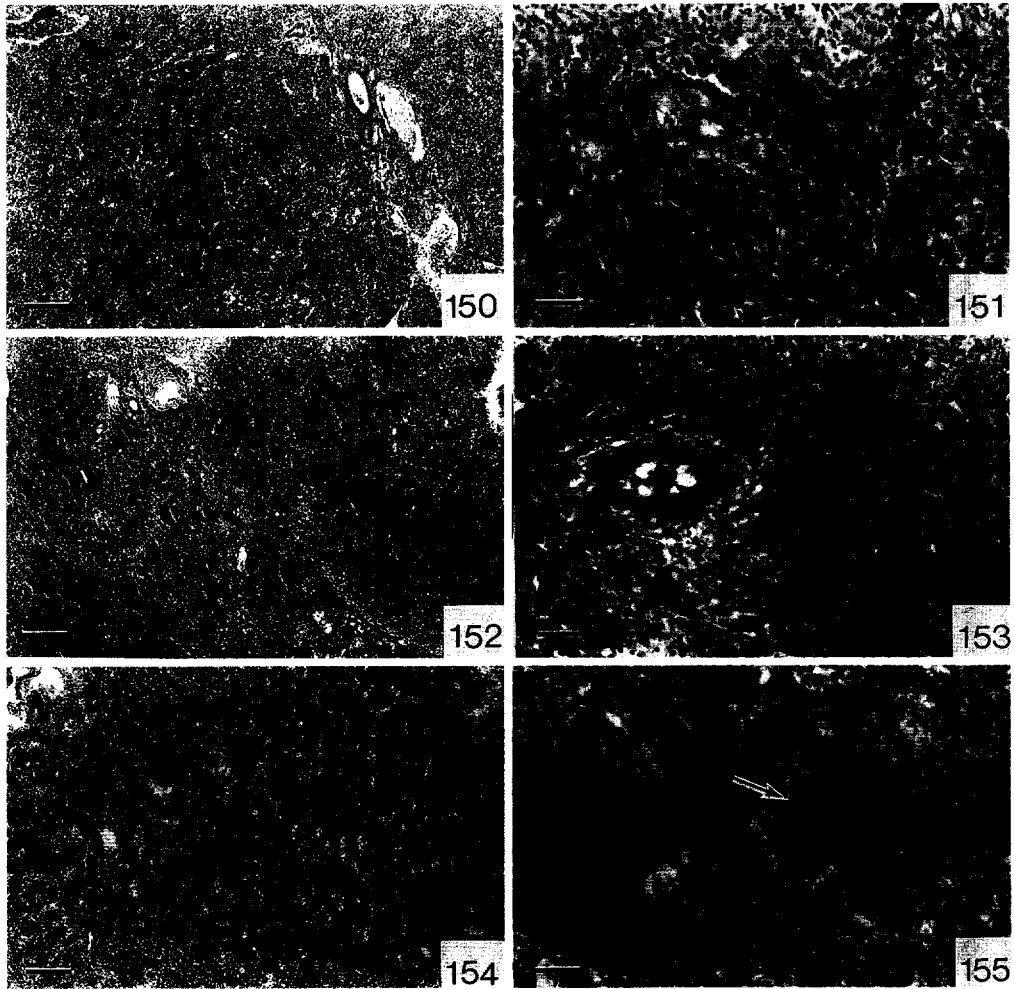


Fig.150. Section of spleen; control fish (bar=100 $\mu$ m).

Fig.151. High magnification of spleen in Fig.150. (bar=25 $\mu$ m).

Fig.152. Section of spleen; moribund fish, reared at 5°C, showing the necrosis of ellipsoid and hemorrhage in tissue (bar=100 $\mu$ m).

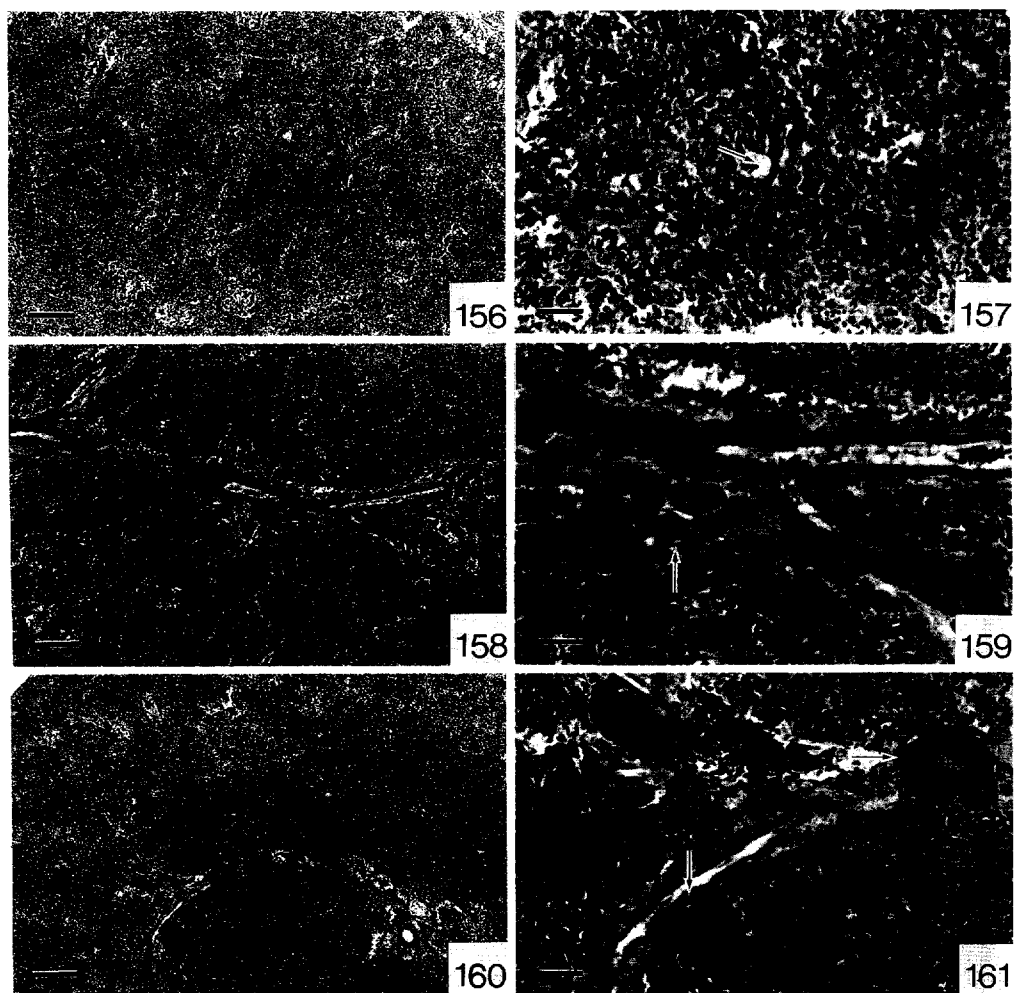
Fig.153. High magnification of spleen in Fig.152. Swelling of nucleus were found in the cells of pulp (bar=25 $\mu$ m).

Fig.154. Section of spleen; moribund fish, reared at 10°C, showing necrosis of pulp (bar=100 $\mu$ m).

Fig.155. High magnification of spleen in Fig.154, showing the degeneration of sheathed artery, arrow (bar=25 $\mu$ m).



Plate 32. Spleen lesions of HRV-infected hirage reared at various water temperatures.



**Fig.156.** Section of spleen; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 10°C (bar=100  $\mu$ m).

**Fig.157.** High magnification of spleen in Fig.156, showing the degeneration of blood vessel, arrow (bar=25 $\mu$ m).

**Fig.158.** Section of spleen; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 15°C (bar=100  $\mu$ m).

**Fig.159.** High magnification of spleen in Fig.158, showing the infiltration of macrophage, arrow (bar=25 $\mu$ m).

**Fig.160.** Section of spleen; asymptomatic fish infected with HRV, reared at 20 °C. Hyperplasia of melanomacrophage are recognized in hematopoietic tissue (bar=100 $\mu$ m).

**Fig.161.** High magnification of spleen in Fig.160, showing the melanomacrophage in hematopoietic tissue, arrows (bar=25 $\mu$ m).

Plate 33. Ultrastructural observation on the kidney of hirame artificially infected with HRV.

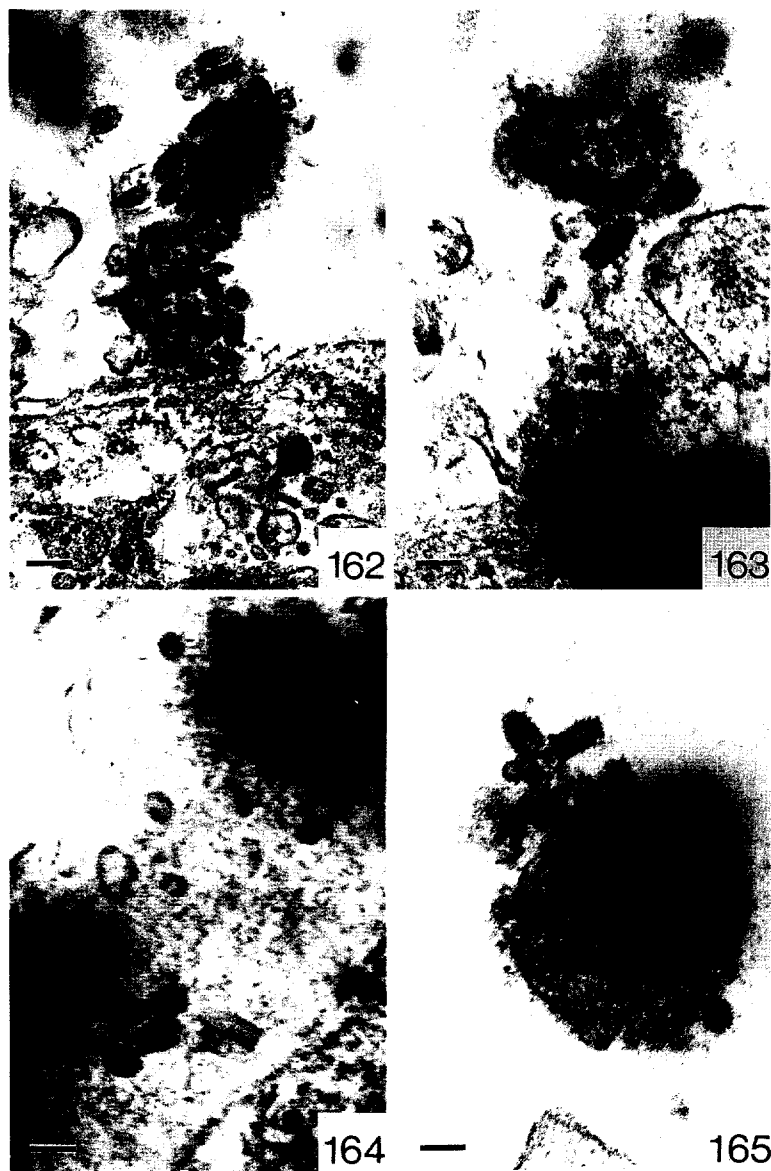
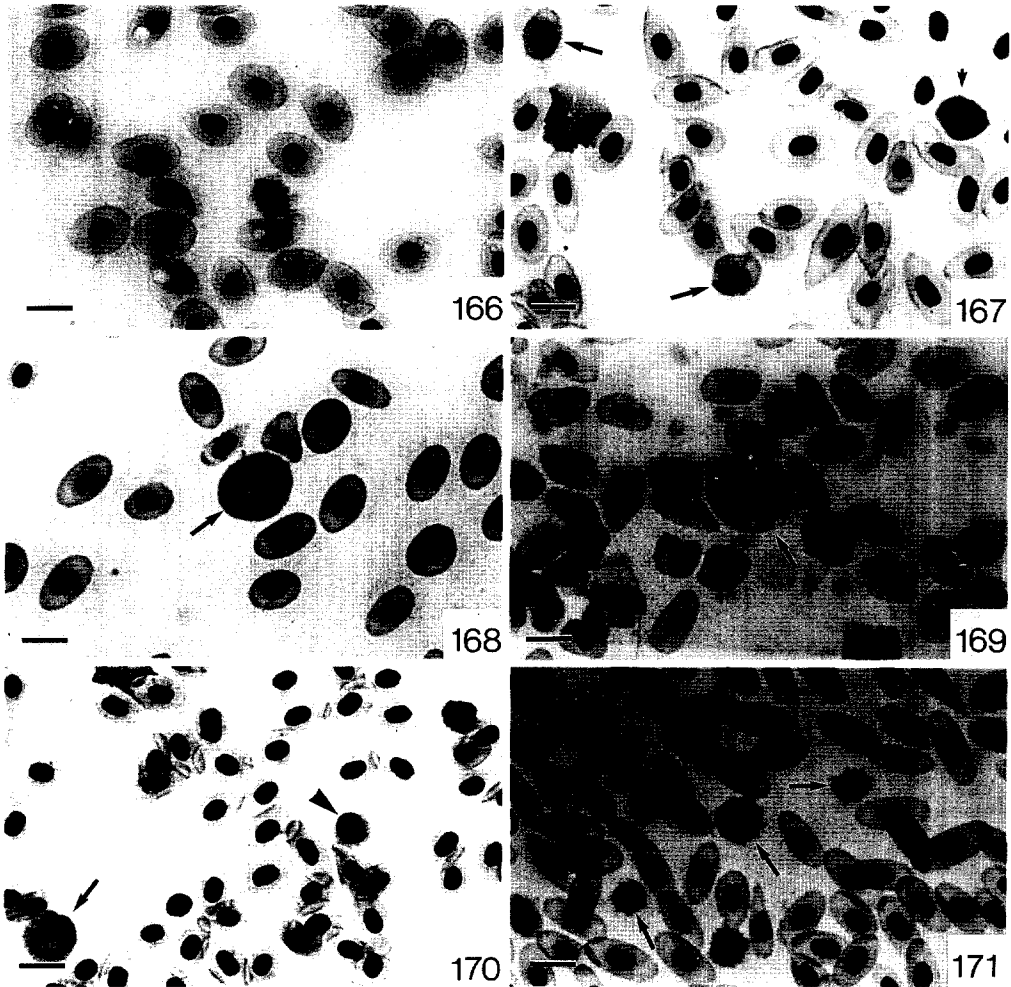


Fig. 162~165. Electron micrograph of rethelial cell in the kidney. Showing viral particles budding from the cell membrane and many other particles at the outside of cell. Club-like protuberance on the surface of cell (arrow) and viral particles budding from this protuberance were observed (bar = 150 nm).

Plate 34. Blood smears of HRV-infected hirame reared at various water temperatures.



**Fig.166.** Blood cells of control fish, reared at 10°C (May-Giemsa, bar=6 $\mu$ m).

**Fig.167.** Blood cells of diseased fish, reared at 5°C. Many immature erythrocytes (arrows) and small lymphocyte-like cells (arrow head) are found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar=6 $\mu$ m).

**Fig.168.** Blood cells of an asymptomatic fish, reared at 10°C. Neutrophile (arrow) is found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar=6 $\mu$ m).

**Fig.169.** Blood cells of diseased fish, reared at 10°C. Large lymphocyte-like cell (arrow) is found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar=6 $\mu$ m).

**Fig.170.** Blood cells of an asymptomatic fish, reared at 15°C. Neutrophile (arrow) and lymphocyte-like cell (arrow head) are found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar=6 $\mu$ m).

**Fig.171.** Blood cells of an asymptomatic fish, reared at 20°C. Many lymphocyte-like cells (arrows) are found among the erythrocytes (May-Giemsa, bar= 6 $\mu$ m).