

魚病委託研究報告(昭和63年度～平成2年度)総括集

昭和60年頃から養殖ゴイに感染し、コイの商品価値を著しく低下させ、あるいは稚魚期において急激なへい死被害をもたらした次の3種類の魚病について、昭和63年度から平成2年度までの3か年間、東京大学並びに東京水産大学にその原因、感染経路、対策等についての調査研究を委託した。本報告はこれらの3ケ年の結果をまとめて掲載するものである。

1. コイ筋肉ミクソボルス症対策試験

東京大学農学部 教授 若林 久嗣
助手 小川 和夫

- 昭和63年度
- 1) 種の同定
 - 2) コイ体内での寄生体の発育
 - 3) 感染期の推定
- 平成元年度
- 1) 魚体内における寄生体の発達と宿種の反応
 - 2) 寄生の季節的変動
 - 3) 寄生体の魚体への侵入時期の推定
- 平成2年度
- 1) 自然感染魚における血清中抗体の検出
 - 2) 免疫実験
 - 3) 抗体の反応性
 - 4) ワクチン実験

2. コイ乳頭腫ならびに稚魚期の不明病に関する研究

東京水産大学資源育成学科

教授 佐野 徳夫
助教授 福田 穎穂

- 昭和63年度
- 1) マゴイの皮膚腫瘍に関する研究
 - ① 病理組織学的検討
 - ② ウイルス分離
 - 2) コイ稚魚期不明病の病因学的研究
 - ① 本疾病が感染症であるか否かの確認
 - ② ウイルス分離の試み
 - ③ 細菌分離の試み-1, 2
 - 3) まとめ

平成元年度

1) コイ乳頭腫症に関する研究

- ① CHVのコイ科魚類稚魚に対する感染実験と腫瘍誘発について
- ② 乳頭腫の自然退行についての推定
- ③ 加温処理による乳頭腫の退行について
- ④ 本年度霞ヶ浦で発生した乳頭腫の調査について

2) まとめ

平成2年度

1) コイ乳頭腫に関する研究

- ① 加温による乳頭腫の退行について
- ② ヨード剤処理によるCHVの不活化について
- ③ コイ発眼卵に対するヨード剤の安全性

2) コイ稚魚の大量死について

- ① 感染実験
- ② ウイルス分離
- ③ 電子顕微鏡観察

3) 総括

1. コイ筋肉ミクソボルス症対策試験・委託研究報告

東京大学農学部 教授 若林久嗣

助手 小川和夫

— 昭和63年度成果報告 —

1. 研究の背景

数年前より、霞ヶ浦の網イケス養殖のコイの軀幹筋に粘液胞子虫ミクソボルスが寄生する事例が認められ始めた。感染魚は外観からでは診断できないが、調理の際、そのシストが肉眼でも目に付くため、出荷先からクレームがつく例があった。現在、その侵入経路、感染環、感染防除対策などほとんど判明していない。

2. 本年度の研究の目的

コイ筋肉ミクソボルス症（以下、本症）に有効な対策を確立することが最終的な目的である。しかし、養殖環境での感染を防除することは、本症の感染環が未知であるため、当面、実現困難と思われる。本症は比較的新しい疾病であり、知見が乏しい。従って初年度の研究課題として、寄生体の種名を確定し、寄生体がいづコイへ侵入するか、侵入した寄生体がどのように発育して胞子を形成し、また、その発育に対し、宿主であるコイがどのような反応を示すかといった基礎的なことから選んだ。なかでも中心的課題は、コイへの感染期の特定、コイ筋肉組織内での寄生体の発育の検討である。

3. 材料および方法

コイ体内での寄生体の発育を調べるために、霞ヶ浦に隣接する稚魚池（野原幸一氏所有）から昭和63年7月6日、7月29日、8月26日、9月22日、平成元年3月14日に各回60尾ずつを採集し、肉眼で感染魚を検査し、筋肉内のシスト、その他の臓器を10%フォルマリンまたはブアン液で固定した。組織の一部は塗抹して直接検鏡した。

感染期の推定をするため、2群のコイを用いた。即ち、霞ヶ浦での感染の有無を調べるために、茨城県内水面水産試験場で地下水で飼育され、ミクソボルスに感染していない1才のコイ約500尾を

5月9日に網イケスに入れ、以降、5月27日、6月18日、7月7日、7月29日、8月30日、9月23日、10月27日に各回約60尾を無作為に取上げ、さらに水試内で約25℃に保った地下水中で少なくとも2ヵ月飼育した後、解剖してシストの有無を肉眼で検査した。また、稚魚池での感染を調べるために、前記の寄生体の発育を調査したのと同じ池で、0才のコイを、5月27日、6月18日、7月6日、7月29日、8月26日、9月22日、10月27日に各回約60尾を無作為に取上げ、以降、霞ヶ浦での1才魚の調査と同じ方法で、水試内で飼育後、解剖して調べた。

4. 結果

1) 種の同定

ミクソボルスは胞子の形態によって同定される。本胞子は長さよりも幅の方が広い（即ち、上から押し潰したような形）のが特徴で、長さ約7.5ミクロン、幅約12.5ミクロンであった。2つの極嚢は同型同大で、長さ約4.9ミクロン、幅約2.5ミクロンであった。

2) コイ体内での寄生体の発育

肉眼的に筋肉内に白く見えるものは、組織学的に2つのタイプがあった。ひとつは周囲をコイの組織で囲まれた、いわゆるシストで、コイの筋繊維の間に形成されていた。シストは通常紡錘形で、大きさは変異に富み、組織切片で測定して直径15-2500ミクロンであった。もうひとつは、シスト壁のみられないタイプであった。その場合、ミクソボルスの栄養体や胞子はコイ筋肉組織中に瀰漫的に散在していた。2つのタイプを同時に持っている魚もあった。3月に見られたシストは、前年の8、9月のものと比べて固く萎縮、変性したようなものが多かった。そうしたシストのなかには胞子のみが見られた。3月でも通常のシストは認められたが、それらではまだ胞子形成が終了していなかつた。9月に寄生の認められた0才魚の内臓諸器官を塗抹して検鏡したところ、5尾中4尾の腎臓、肝臓、脾臓に胞子が認められた（8月までの寄生魚では内臓は未検査）。これらの胞子はマクロファージによつての寄生と考えられた。3月の感染魚では、上記の内臓の他に腸管も塗抹した。11尾中6尾に胞子が認められた。腸管の胞子はKOHの作用で、極糸を弾出したところから生きていたものとも判断された。組織学的には、その他に心筋内、鰓の毛細血管内にも胞子が認められた。粗幹筋以外はその部位の胞子は、通常数個あるいはそれ以上の塊として存在していた。

3) 感染期の推定

無感染の1才魚を霞ヶ浦で飼育した場合、5月22日に霞ヶ浦から移動させた群で既にその11%が感染していた。6月18日群で感染のピークに達した(17%)が、以降暫減し、8月30日群では、64尾中1尾のみに寄生がみられた。9月23日群では24尾中2尾、10月27日群では60尾中3尾と寄生率は低いままであった。

稚魚池の場合は、5月27日群は病気であったため、感染があったかどうかは確かめられなかった。次の6月18日群で8%、7月6日群で20%(最高値)を記録してから、1才魚の場合と同様に、10月27日群まで寄生率は減少し続けた。

0才魚、1才魚とも寄生率の高いときにはシスト数も多い傾向があった。

5. 考察

1) 種の同定

本胞子はミクソボルスの既知種の中では、ソ連のマゴイとアムールゴイの腸管にシストを形成する *Myxobolus artus* Achmerov, 1960 に最も類似しているが、幅が9-12ミクロンとやや小さいこと、日本の場合は腸管には寄生しないこと等で差があり、別種と思われる。本症と極めて類似した疾病がかつて台湾の養殖コイに見られた (Chung & Kou, 1977)。胞子の形態および測定値は、日本で見られるものとはほとんど差はなく、同種と考えられる。なお、台湾の例では、寄生体は未同定のままである。インドネシアの養殖コイにも類似の例が報告されている。これも同種の可能性が高い。

2) コイ体内での寄生体の発育

組織内寄生の粘液胞子虫の多くはシスト壁を持つことが知られている。粘液胞子虫 *Kudoa thyrstitis* と *K. paniformis* に感染した *Merluccius productus* では、通常はシスト壁の形成がみられるが、宿主反応の全く起こらない場合が小型魚に認められる (Morado & Sparks, 1986)。本症で、宿主由来の壁の形成がないという理由は不明であるが、上記の例の様に、宿主が幼魚であったために宿主反応が十分に発揮されなかったのかもしれない。

組織内寄生の粘液胞子虫では、胞子の魚体外への脱出は宿主が死んで、組織が崩壊してからというのが通説である (Lom, 1987)。江草・中島 (1980) は、アマミクドア症においては、ブリは寄生を受けたスズメダイ類を捕食することによって感染すると考えた。しかし、宿主がまだ生きているうちに、感染した組織内から胞子が体外に出ていく例も報告されている (Molnar & Kovacs-Gayer, 1985)。

本症において、腎臓などのメラノマクロファージセンターに蓄積された胞子はそこで処理されてしまいう可能性が高いが、腸管や鰓の組織内の胞子はそこから体外へ活きたまま排出されていると考えられる。このことは、本症の感染環を考える上できわめて注目すべき現象と思われる。

3) 感染期の推定

当初、コイの筋肉組織内でいったん形成されたシストは宿主が生きている限りそのままの状態では保持されると想定していた。しかし、多くの場合、胞子形成が終了してから宿主の反応が始まり、マクロファージによって積極的に胞子が感染部位から運び出されていく結果、シストは萎縮し、肉眼でも認めがたくなった。このことが夏以降のみかけ上の感染率の低下となったと考えられる。同時に、感染率の低下は夏以降の新たな感染がなかったということも示唆している。昭和63年度の研究では、5-7月が感染体が魚に侵入する時期であると想定されたが、宿主反応のために感染期を厳密に特定することは出来なかった。

6. 文献

- Chung, H.-Y. and Kou, G.-H. (鍾 虎雲・郭 光雄) (1977): A preliminary report on a Myxosoma disease of the scale carp (Cyprinus carpio). JCRF Fishereis Series, 29, 34-39. (in Chinese)
- Dana, D. (1988): Morphology and host specificity of Myxosporea from cultured fishes in West Java. BIOTROP Spec. Publ., 28, 71-84.
- 江草周三・中島健次 (1978): プリのアマミクドア症. 魚病研究, 13, 1-7.
- Lom, J. (1987): Myxosporea: a new look at long-known parasites of fish. Parasitology Today, 3, 327-332.
- Molnar, K. and Kovacs-Gayer, E. (1985): The pathogenicity and development within the host tissue of Myxobolus cyprini. Parasitology, 90, 549-555.
- Morado, J. F. and Sparks, A. (1986): Observations on the host-parasite relations of the Pacific whiting, Merluccius productus (Ayres), and two myxosporean parasites, Kudoa thyrstitis (Gilchrist, 1924) and K. paniformis Kabata & Whitaker, 1981. J. Fish. Dis., 9, 445-455.

1. 研究の目的

前年度のコイ筋肉ミクソボルス症（以下、本症）では、コイ体内での寄生体の発達とコイへの侵入時期の推定を行った。寄生体の発達に関しては、シスト壁のある通常のタイプとシストの形成されないタイプがあること、孢子形成が終ると宿主側の反応によって、孢子が感染部位から運び出され、一部は魚体外へ出ること、コイへの侵入時期に関しては、5月には既に侵入のみられることなどを明らかにした。これらの点に関しては、まだ解明すべきことが多く残されている。特に、侵入時期に関しては、いつまで侵入が続くのが依然不明のままである。従って、今年度の研究では、これらの点を中心にさらに詳しく検討した。

2. 材料と方法

魚体内における寄生体の発達と宿主の反応：霞ヶ浦に隣接する養殖池の0才魚を材料とし、適宜採材した。常法にしたがって組織学的に検査した。

寄生の季節的変動：霞ヶ浦に隣接する養殖池から5月に孵化した0才魚を、平成元年7月から2年1月まで毎月60尾採材し、体側筋肉部のシストを肉眼で探し、組織学的に検査した。なお、冬期は稚魚池から魚の採集は困難であったので、11月4日に約500尾を無作為に池から取上げ、以降は試験場内のコンクリート水槽で地下水を流水にして飼育した。12月と1月の材料はこの水槽から得た。2月以降は事故によりこの魚を失ったため、調査を行わなかった。

寄生体の魚体への侵入時期の推定：地下水で飼育した無感染の1才コイを毎月60尾、3月から11月まで1ヵ月ずつ霞ヶ浦の湖水にさらし、約25℃の地下水でさらに3ヵ月飼育して感染魚の孢子形成を促し、体側筋肉部に形成されるシストを肉眼で探した。さらに、本症においては、孢子はマクロファージセンター（特に腎臓）に集積する。この性質を利用すると、体側筋肉部を観察するよりも鋭敏に寄生の有無を検査できる。従って、実験魚は全て腎臓をホモジネートして孢子の有無を検鏡した。

3. 結果

1) 魚体内における寄生体の発達と宿主の反応

通常、寄生体は体側筋の筋繊維の間に定着し、外側を宿主由来の結合組織で被包され、いわゆる「シスト」を形成していた。宿主の結合組織は毛細血管に富み、さらに外側に

向って樹根状に伸張していた。寄生体は伸張した被包を通して宿主から栄養を吸収していると考えられた。周辺の筋肉組織には、萎縮像も認められた。最も若い寄生体は多核の栄養体であった。発達が進むと、寄生体内で生殖細胞が分化して周辺部に並び、そこでパンスポロプラストとなって胞子が形成された。胞子形成が進むと魚の外観からシストが分る場合が多かった。これは、0才魚では多くの場合、シストが大きく成長することと周辺の宿主組織が萎縮するため、体表に凹凸ができることが主な理由である。発達の最終段階では、シスト内は胞子で充満し、外側に伸張した突起は消失し、被包も薄く萎縮した。

まれにはシストが筋繊維内に形成されることもあったが、その場合には、宿主由来の被包の形成はみられなかった。また、寄生体の外層が内部に陥入したり、不規則に発達した結果、被包の形成が不完全なシストもみられた。こうした筋繊維内のシストや被包の不完全なシストでは、胞子形成の途中でシストが破れ、内容物がシスト外に流失し、周辺筋肉組織に著しい融解を引き起こしていた。

シストが破れたり胞子形成が終わると、寄生体に宿主のマクロファージが浸潤し、それと並行して腎臓、脾臓、肝臓のマクロファージセンターに胞子がみられた。特に腎臓における胞子の集積は顕著で、胞子集塊を宿主の結合組織が被包し、しばしば肉眼でも小白点として確認された。胞子は腸管の粘膜上皮、体表上皮、心筋組織内にも認められた。こうした胞子は宿主のマクロファージによって貪食されて体側筋から運び出されたものと考えられる。この他、鰓薄板の毛細血管内には何らかのルートで血管系に入った胞子が単独で存在した。鰓以外では、胞子はマクロファージに貪食された状態で存在した。また、腸管腔内や胆嚢内にも胞子が認められたことから、一部の胞子は腸管や体表などから魚体外に放出されていると考えられる。

2) 寄生の季節的変動

0才魚を7月から翌年1月まで調査した結果、寄生には明瞭な季節性が認められた。即ち、体側筋に可視大のシストがみられたのは8月からで、11、12月には検出率は大きく減少し、1月にはシストはみられなくなった(図1)。1尾当りのシスト数は1~35であった。発達段階で見ると、8月にはシストの約90%が胞子形成前であったが、11月以降は大半が胞子形成を終えていた(図2)。また、腎臓をホモジネートして、集積した胞子を検鏡すると、体側筋のシストを肉眼で探査するのと比べて同じか、より高い頻度で胞子が検出された。腎臓における胞子検出率に減少傾向はみられなかった(図1)。

3) 寄生体の魚体への侵入時期の推定

結果を表1と図3にまとめた。3月と4月に湖水にさらした60尾には、寄生は全く認められなかった(3月2日~5月9日)。体側筋にシストが見出されたのは、5月(正確には5月9日~6月8日)の1尾、10月(10月12日~11月6日)の2尾、11月(11月6日~12月8日)の4尾および12月(12月8日~1月4日)の5尾のみであった。一方、腎臓ホモジネートからの胞子検出率は体側筋のシスト発見率よ

り常に高く、5月以降毎月孢子が検出された。5月のコイでは27%が陽性だったのに対し、6月（6月8日～7月10日）から9月は8%以下と低かった（6月8日～9月6日）。その後、体側筋にシストがみられた10月が23%、11月が38%と検出率は急上昇したが、12月には20%と半減した。

以上の結果からは、寄生体のコイへの侵入時期は5月から少なくとも12月まで続くが、侵入のピークは春と秋にあると言える。

また、体側筋にシストが見出された計12尾のうち、腎臓からも孢子が検出された魚は11月の2尾のみであった。

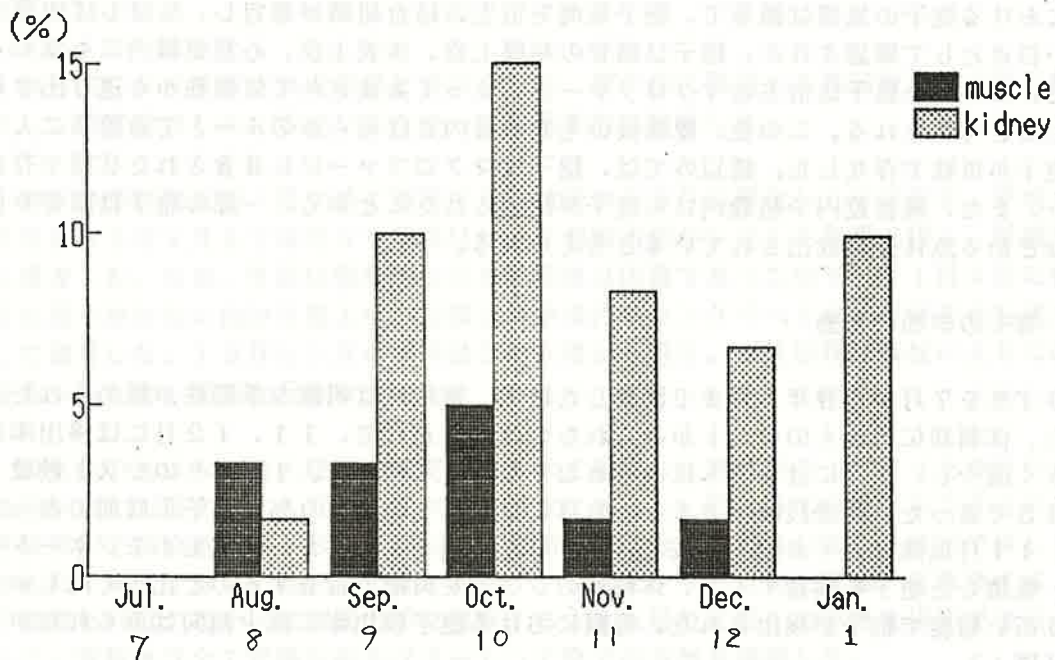


図1. コイオオ魚における *Myxobolus* sp. の体側筋での寄生率と腎臓の孢子検出率

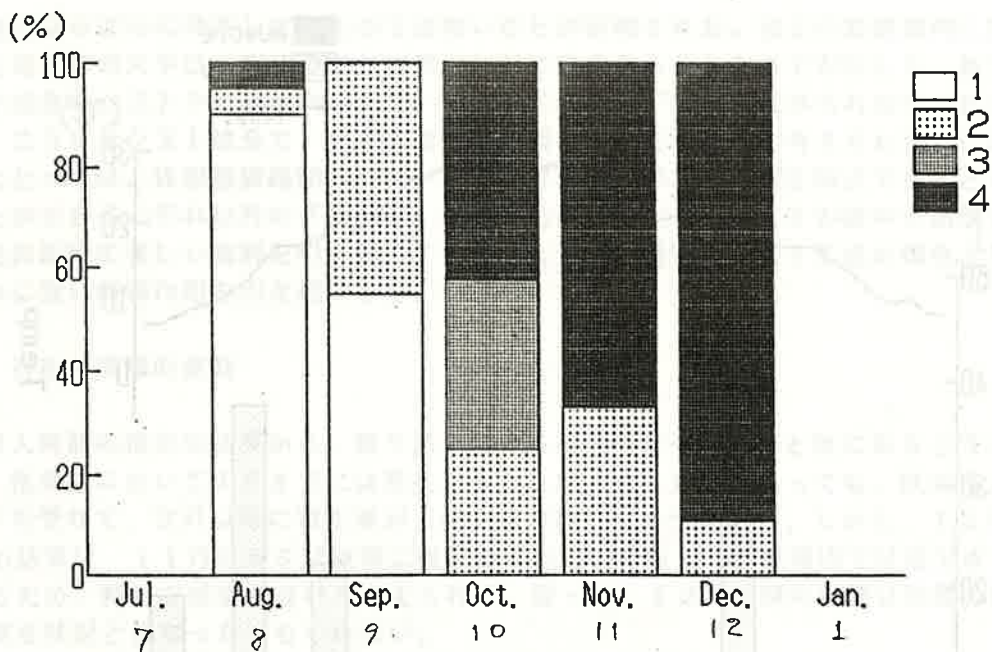


図2. コイ0才魚における *Myxobolus* sp. の体側筋のシストの発達段階

- 1 ; 未成熟 (孢子未形成)
- 2 ; 孢子形成期
- 3 ; 成熟シスト期 (シスト内は孢子で充満)
- 4 ; シスト崩壊期

表1. 体側筋寄生 *Myxobolus* sp. のコイへの侵入時期の推定

霞ヶ浦での 飼育時期	検査 時期	サンプル 数	筋肉可視 寄生 (%)	腎臓孢子 (+) (%)	真の寄生 (%)*
3月 2日 ~ 4月 10日	7月	60	0	0	0
4月 10日 ~ 5月 9日	8月	60	0	0	0
5月 9日 ~ 6月 8日	9月	60	1 (1.7)	16 (26.7)	17 (28.3)
6月 8日 ~ 7月 10日	10月	60	0	3 (5.0)	3 (5.0)
7月 10日 ~ 8月 9日	11月	60	0	5 (8.3)	5 (8.3)
8月 9日 ~ 9月 6日	12月	60	0	1 (1.7)	1 (1.7)
9月 6日 ~ 10月 12日	1月	60	0	5 (8.3)	5 (8.3)
10月 12日 ~ 11月 6日	2月	57	2 (3.5)	13 (22.8)	15 (26.3)
11月 6日 ~ 12月 8日	3月	60	4 (6.7)	23 (38.3)	25 (41.6)
12月 8日 ~ 1月 4日	4月	60	5 (8.3)	12 (20.0)	17 (28.3)

1才魚を平成元年3月2日から2年1月4日まで霞ヶ浦で飼育

* 体側筋のシストか腎臓の孢子の少なくともどちらかが (+) であったもの

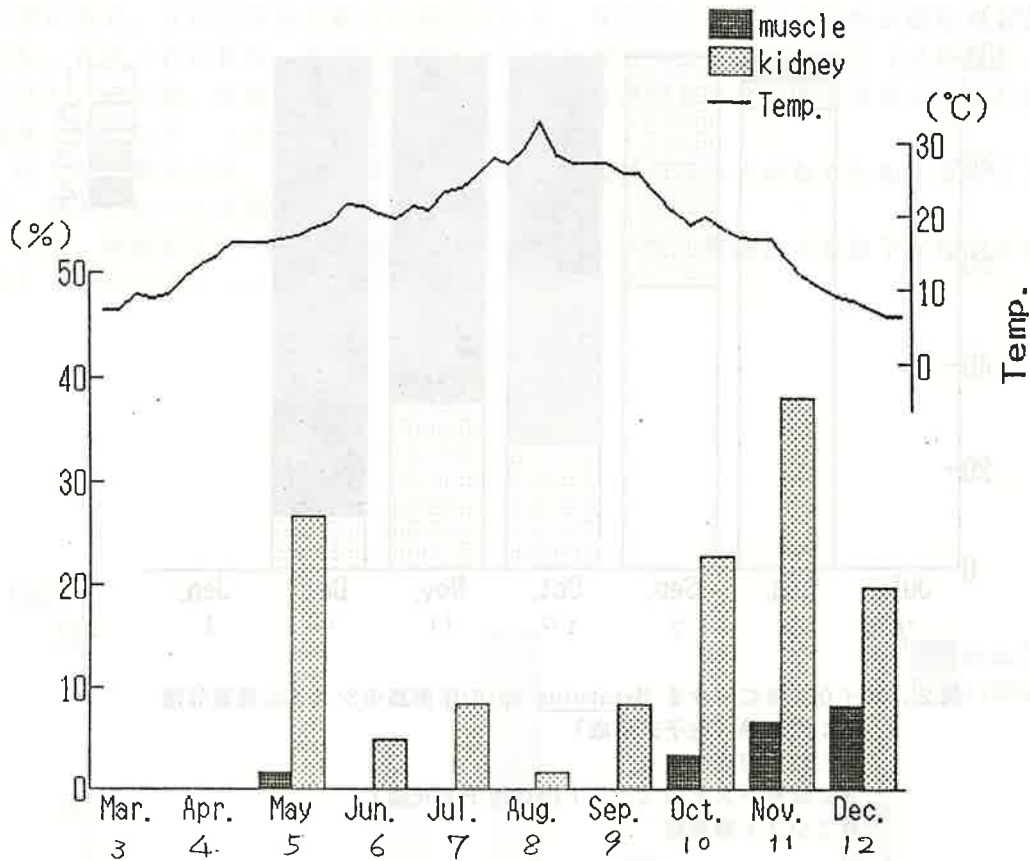


図3. 体側筋寄生 *Myxobolus* sp. のコイへの侵入時期の推定
 1才魚を平成元年3月2日から2年1月4日まで
 約1ヵ月毎、霞ヶ浦で飼育

4. 考察

1) 魚体内における寄生体の発達と宿主の反応

前年度の結果では、コイの体側筋内の寄生体はシスト壁が形成されるタイプとシストをつくらないタイプの2型があるとした。粘液胞子虫はシスト内で胞子を形成するか、胞子芽細胞が個々に胞子を形成する (Lom, 1987)。筋肉組織間寄生種は前者に属し、本症におけるように、発達過程でシストを形成しないというのは、きわめて異例である。今年度では、寄生体の発達過程を追いながら観察したところ、「シストの形成のみられないタイプ」は、実際には、被包形成が不完全なシストや筋繊維内に寄生して被包を形成しないシストが、発達の途中で破れ、内容物がシスト外に流失した結果、シストを形成しないようにみえるのであり、従って、宿主組織内で粘液胞子虫の栄養体が初めから

単独にばらばらに発育していくのではないことが示唆された。宿主の筋組織内に散らばった寄生体の大半は、宿主のマクロファージに貪食されたかたちで存在した。被包形成が不完全なシストや筋繊維内のシストで孢子形成を完了した例はみられなかったことから、こうしたシストは全て、発達の途中で崩壊してしまうものと考えられた。この寄生体にとっては、体側筋繊維間のシスト内で発育するのが本来の寄生様式であるとも言える。それ以外の「異常な」寄生は結局不安定で、シストが途中で崩壊し、周辺筋肉組織に著しい融解を引き起こすことによって、通常のシスト形成の場合よりも明らかに強い病害作用を引き起こした。

2) 寄生の季節的変動

侵入時期の推定の結果から、霞ヶ浦における侵入のピークは春と秋にあると考えられる。稚魚池において1月までには寄生がみられなくなったとはいっても、秋の侵入のピークを受けて、2月以降に寄生率が上昇する可能性は十分にある。しかし、12月と1月の結果は、11月に魚を試験場に移した後のものである。試験場内では地下水で飼育したため、新たな感染はないと考えられる。従って、12月以降の結果は実際の稚魚池の寄生状況と異なったかもしれない。

3) 寄生体の魚体への侵入時期の推定

前年度の調査では、実験魚は霞ヶ浦に設置した生簀にいれたままで、毎月、そこから60尾ずつ採材していた。体側筋に形成されたシストは宿主反応によって比較的速やかに処理されてしまうため、この方法では侵入時期の特定は出来なかった。今年度はその点を考慮して霞ヶ浦の生簀に収容するのは1ヵ月のみとした。その結果、主に腎臓における孢子検出の有無から判断して、寄生体の魚体への侵入はかなり長期にわたって続いていることが明らかとなった。水温との関連でみると、特に検出率の高かった5月では、16℃から24℃へと上昇期であった。10月では、20℃から15℃、11月では、17℃から9℃へと、12月では、9℃から6℃へと、5月とは逆に下降期であった。一方、4月では、水温は14℃から18℃に上昇しており、温度変化の範囲は11月とほぼ同じであったが、寄生体の侵入はみられなかった。従って、水温だけではピークの形成は十分には説明できなかった。

体側筋にシストが見出された魚のほとんどは、腎臓から孢子が検出されなかった。逆に、腎臓から孢子が検出された魚のほとんどは、体側筋に肉眼で寄生を認めなかった。体側筋における寄生に関して、被包の形成が不完全なシストや被包の形成されないタイプでは、早いうちに宿主反応が起こることを明らかにした。その場合、霞ヶ浦から試験場内に移して3ヵ月飼育した間に体側筋の寄生体が処理されてしまった可能性がある。従って、これらが腎臓に孢子があるが体側筋に寄生を認めなかったタイプであったのかかもしれない。

粘液孢子虫の生活史については、従来、魚体内で形成された孢子が経口的に魚に取込まれ、消化管から組織内に侵入して感染が成立すると考えられてきた (Lom, 1987)。この考えはまだ完全には否定された訳ではないが、最近、サケ科魚類の旋回病起因種、

Myxobolus cerebralis, カジカの1種に寄生する M. cotti では、魚体外に出た孢子がイトミミズの1種 Tubifex tubifex の体内で放線孢子虫と呼ばれていた寄生体に変態し、それが魚に感染することが報告されている (Wolf and Markiw, 1984; El-Matbouli and Hoffmann, 1989)。本症にみられた春と秋の侵入のピーク形成はイトミミズのような中間宿主の存在を想定するとよく説明される。即ち、「春に感染した寄生体は夏までには孢子形成を終えて魚体から放出され、中間宿主の体内で秋までに魚への感染体に変態する。また、秋に感染した寄生体は冬のうちに孢子形成を終えて、翌春に魚に侵入する」というものである。本寄生体の生活環が中間宿主を要するものかどうかは明らかでない。

5. 今後の課題

業者から入手した1才のコイ63尾と2才のコイ60尾の寄生状況を予備的に平成元年8月に検査したところ、体側筋には全く寄生は認められなかったが、1才のコイ28尾(44%)と2才のコイ32尾(53%)の血清中に本孢子に対し、羊赤血球凝集反応が認められ(抗体価 ≥ 4 ; 最高値256)、抗体が産生されていると考えられた。しかしながら、今のところ、本孢子に対する抗体産生と免疫との関連は明らかではない。そこで、平成2年度は、Myxobolus の感染によって免疫ができるかどうかを検証する予定である。

6. 引用文献

- El-Matbouli, M. and R. Hoffmann (1989): Experimental transmission of two Myxobolus spp. developing bisporogeny via tubificid worms. *Parasitol. Res.*, 75, 461-464.
- Lom, J. (1987): Myxosporea: a new look at long-known parasites of fish. *Parasitol. Today*, 3, 327-332.
- Wolf, K. and M. E. Markiw (1984): Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*, 225, 1149-1152.

1. 研究の目的

コイ筋肉ミクソボルス症（以下、本症）に有効な対策を確立することを目的として、昭和63年度および平成元年度の研究で、コイ体内での寄生体の発達とコイへの侵入時期の推定を行った。

平成元年度の予備的検査として、平成元年8月に業者から入手した1才のコイ63尾と2才のコイ60尾の寄生状況を調査した。体側筋には全く寄生は認められなかったが、1才と2才のコイの一部の血清中に、本孢子に対し羊赤血球凝集反応が認められ（抗体価 ≥ 4 ；最高値256）、抗体が産生されていると考えられ、将来的に本寄生虫症に対して免疫学的な予防の可能性が示唆された。しかしながら、今のところ、本孢子に対する抗体産生と免疫との関連は明らかではない。そこで、本年度は、抗体産生機構と、ワクチン開発の可能性を検討するために、Myxobolus の感染による免疫獲得機能に関する研究を行った。

2. 材料と方法

1) 自然感染魚における血清中抗体の検出

東京都水産試験場（水元）の0才コイのシストから得た精製孢子の懸濁液を孢子が破碎されるまで超音波処理し、遠沈した上清を孢子の抗原液とした。また、若いシストを集め、その内容物を蒸留水に懸濁して浸透圧の差を利用して孢子形成前のステージを破碎し、それを遠沈した上清を孢子形成前のステージの抗原液とした。抗原液の蛋白量は Lowry 法によって測定した。

抗体価の測定には、東京都水産試験場（水元）の0才コイ57尾、霞ヶ浦の1、2才コイそれぞれ60尾と63尾の血清に対し、孢子破碎物および孢子形成前のステージの可溶性部分を抗原とした受身緬羊赤血球凝集反応（図1）を行った。供試魚は採血後に、肉眼によって体側筋内のシストの有無を、また、腎臓を摘出して孢子の有無を検査した。また、試験場内で地下水で飼育されていた1才コイ100尾についても同様の検査をして対照とした。

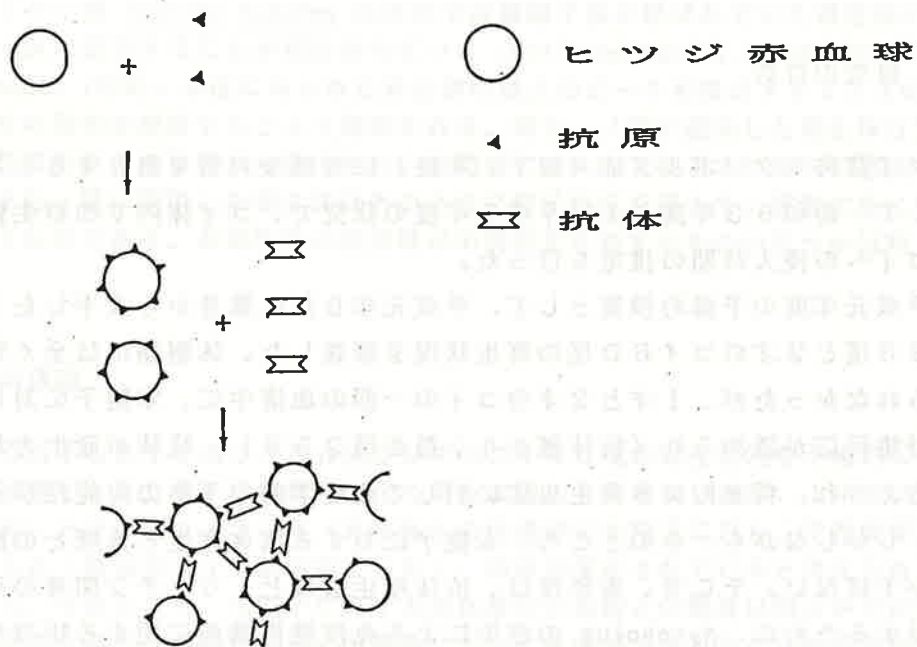


図1. 受身緬羊赤血球凝集反応

2) 免疫実験

コイを寄生体で免疫したときの抗体産生の有無を、孢子、孢子の超音波破砕物あるいは孢子形成前の寄生体を腹腔内接種した後の各血清を受身赤血球凝集反応で調べた。また、孢子破砕物を牛血清アルブミンとともに接種し、孢子破砕物のみを接種した群と凝集反応の違いを比較した。

3) 抗体の反応性

自然感染魚から検出された抗体および免疫実験において産生された抗体の反応性を、孢子形成前から孢子に至る全ての発達段階を含むシスト内容物を抗原とした間接蛍光抗体法(図2)により調べた。また、緬羊赤血球に孢子破砕物を感作させた後に、抗体価が高い血清で処理し、コイの血液中の好中球と混合して、赤血球に対する好中球の貪食作用を調べた(図3)。対照として、血清を反応させないもの、抗体が認められなかった血清を反応させたものを用いた。



FITC 標識 protein A



抗コイ Ig M ウサギ抗体



抗寄生体 コイ抗体



寄生体抗原

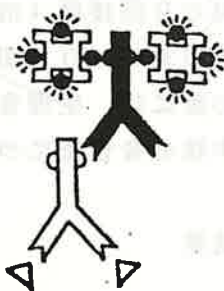


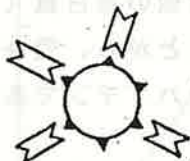
図 2 . 間接蛍光抗体法



寄生体抗原を結合したヒツジ赤血球



好中球



寄生体抗原を結合したヒツジ赤血球
+
抗体

貪食作用促進

図 3 . コイ好中球の緬羊赤血球に対する貪食作用

4) ワクチン実験

平成2年4月に孢子破砕物を感染体フリーの水域の1オコイの腹腔内に14日間隔で2回接種(液相の蛋白量:0.08 mg BSA/fish)し、その後、感染体フリーの水で20日間飼育してから試験場の網生簀内で5ヶ月半飼育した。対照区の魚には、生理食塩水を接種した。飼育後、寄生率、抗体の産生、血液中の好中球の貪食能について検査した。

3. 結果

1) 自然感染魚における血清中抗体の検出

抗原を感作した赤血球に対して凝集反応が認められる個体があった。すなわち、凝集抗体価4以上の個体は0才魚57尾中5尾、1才魚63尾中13尾、2才魚60尾中9尾(最高凝集抗体価128)であり、抗体が産生されていることが確認された。なお、使用した抗原の違いによる凝集抗体価の差は認められなかった。また、地下水飼育の1オコイ100尾の血清については、特異的な凝集反応は認められなかった。しかし、本粘液孢子虫の被寄生魚(孢子が検出された魚)のすべてが抗体保有魚であったのではなく、抗体保有魚でも孢子が検出されない個体もあった。

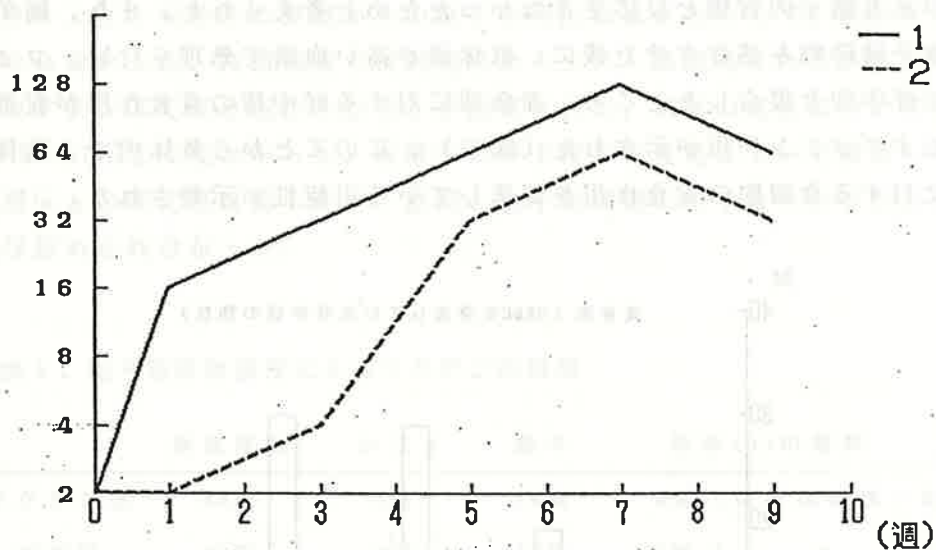
2) 免疫実験

各実験群の血清の受身赤血球凝集反応では、孢子形成前のステージを接種した群と孢子破砕物を牛血清アルブミンとともに接種した群には抗体の産生が認められる個体が出現した(図4、5)が、孢子や孢子の超音波破砕物を接種した魚には抗体産生は認められなかった。これらのことから、本寄生体では孢子形成前には体液性の免疫反応に対する免疫原性を有していたが、孢子形成後にはそれが失われたと考えられた。また、孢子破砕物は他の蛋白質(牛血清アルブミン)と共に接種したときだけ抗体が産生されたことから、受身赤血球凝集反応では抗体との反応性はあるが、抗原性を持たないハプテンであると考えられた。

3) 抗体の反応性

自然感染魚から検出された抗体および免疫実験において産生された抗体の反応性を、全ての発達段階を含むシスト内容物を抗原とした間接蛍光抗体法により調べたところ、どちらの抗体も孢子形成前の寄生体と強く反応することが確

(抗体価)



1 : シスト内容物接種

2 : 胞子形成前のステージ接種

図4. シスト内容物、胞子形成前のステージ接種後の抗体価の変動

(抗体価)

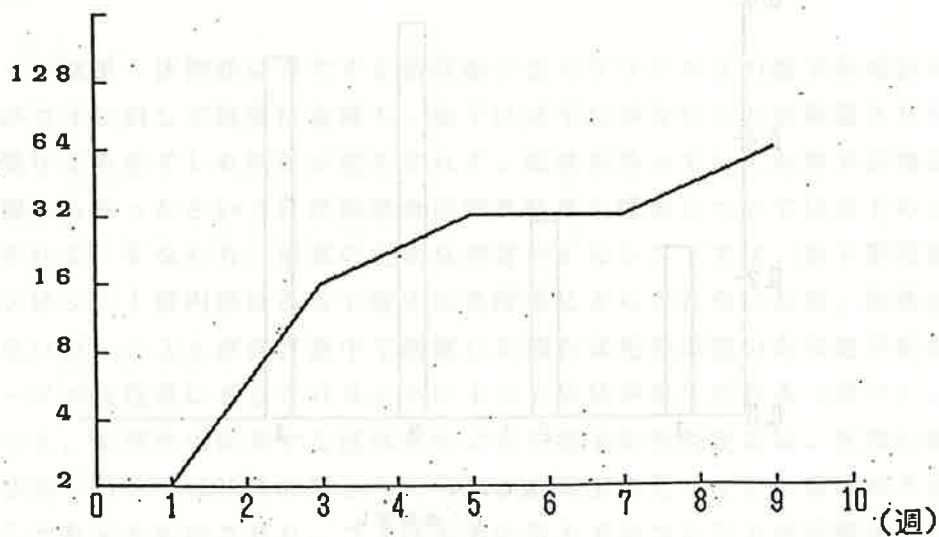


図5. [胞子破砕物+ウシ血清アルブミン] 接種後の抗体価の変動

認された。胞子は蛍光を発しなかったが、これは抗体が胞子殻に妨げられて反応性がある胞子内容物と反応できなかったためと考えられた。また、緬羊赤血球に胞子破砕物を感作させた後に、抗体価が高い血清で処理を行い、コイの血液中の好中球と混合したところ、赤血球に対する好中球の貪食作用が促進され、抗体のオプソニン作用が示された（図6）。このことから魚体内で、抗体が寄生体に対する食細胞の貪食作用を促進している可能性が示唆された。

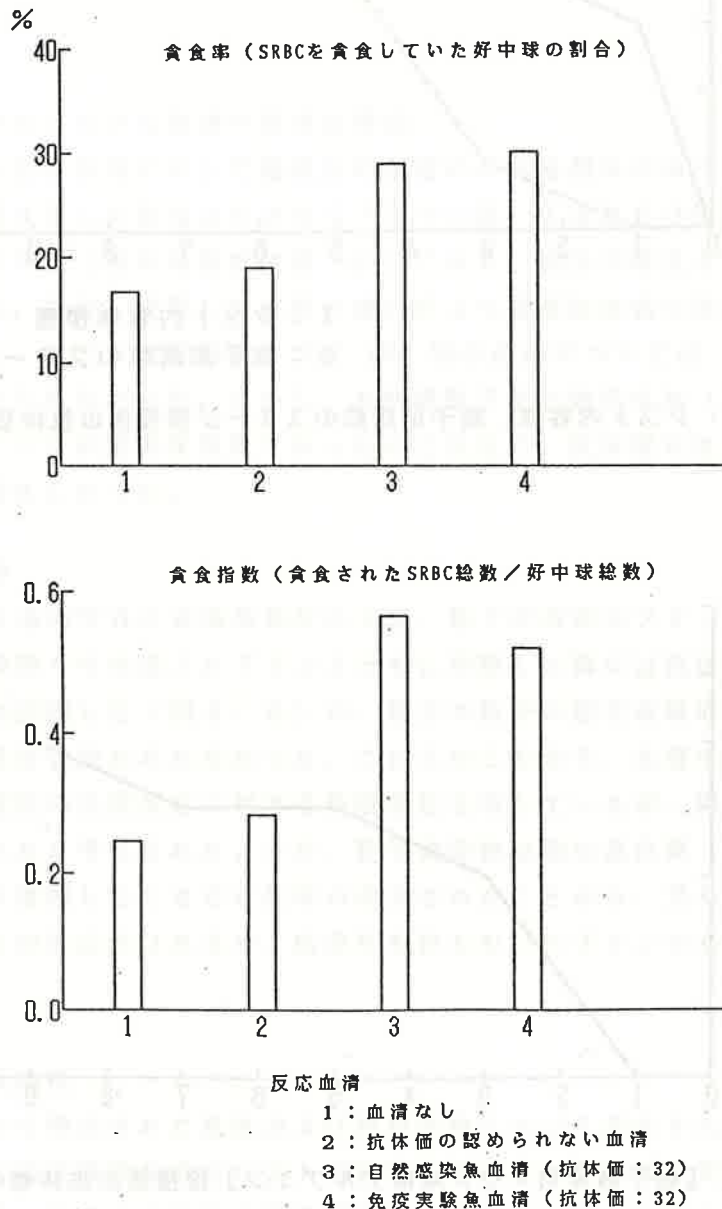


図6. 抗ミクソボルス抗体のオプソニン作用

4) ワクチン実験 (表 1)

ワクチン区と対照区の腎臓からの胞子の検出率はどちらも 30-35%で、差は認められなかった。肉眼検査では対照区からシストは発見されなかったのに対し、ワクチン区では5尾からシストが発見された。抗体の産生についても、両区で 13-17%と大差なかった。血液中の好中球の貪食能について検査した結果も対照区との間に差は見られず、結局、胞子破砕物のみではワクチンとしての効果は認められなかった。

表 1. 胞子破砕物接種によるワクチンの効果

	検査尾数	シスト	胞子	抗体 (+) の個体
ワクチン区	48尾	5尾	16尾	8尾 (最高抗体価 : 32)
対照区	48尾	0尾	18尾	6尾 (" 32)

・両区のそれぞれ 10尾についての貪食能に差異は認められなかった

4. 考察

以上の結果、体側筋に寄生する粘液胞子虫ミクソボルスMixosporusの胞子形成前のステージがコイに対して抗原性を持ち、胞子にはそれがないことが確認された。寄生を受けても必ずしも抗体が産生されず、抗体を持っていても胞子が検出されない個体もあったという自然感染魚の調査結果の理由については以下のように推測される。すなわち、通常の正常な発育をするシストでは、胞子形成前のステージはシスト壁内部にあって宿主の免疫系にさらされないため、抗体は産生されないが、シストが発育途中で崩壊した場合は免疫原性のある胞子形成前のステージが免疫系にさらされることによって抗体が産生される (図 7)。

従って、本寄生虫に対する抗体産生に至る宿主の免疫反応は、魚類の粘液胞子虫感染においては特殊な例と考えられ、本寄生虫とコイとの関係が不安定であることを示すものであり、コイは本来の宿主ではないことが示唆された。また、今後ワクチン開発の可能性を探るためには、*in vitro* 培養を確立して抗原性の高いシスト形成前のステージを大量に得ることが必要と思われる。

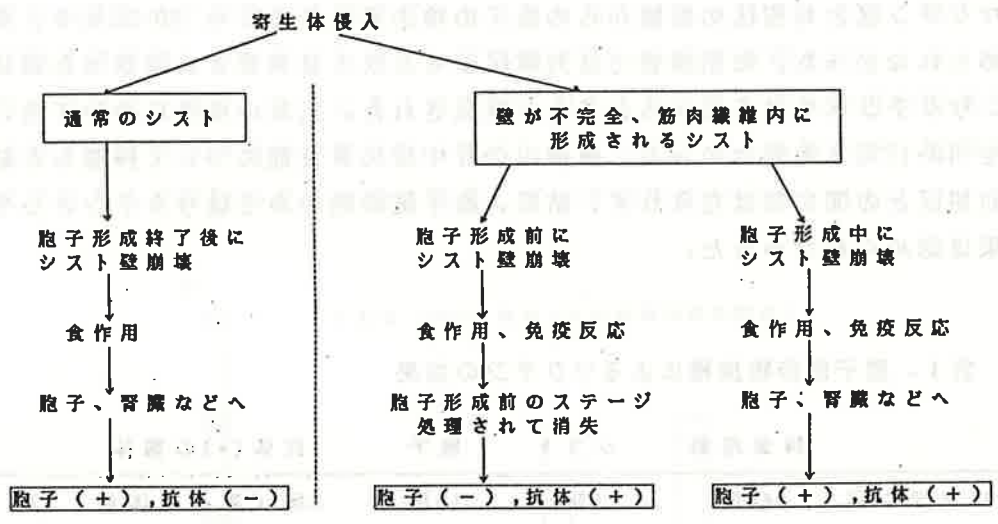


図7. 想定されるコイのミクソボルスに対する抗体産生機構

2. コイ乳頭腫症ならびに稚魚期の不明病に関する研究

東京水産大学資源育成学科 教授 佐野 徳夫

助教授 福田 穎穂

— 昭和63年度成果報告 —

緒言

霞ヶ浦においては、数年前よりマゴイの皮膚腫瘍ならびにマゴイ稚魚の原因不明の大量斃死が認められ、問題となってきた。特に稚魚の不明病は、マゴイ養殖場において、5月から7月上旬にかけて、同年に採卵、ふ化した体長1～3 cm程度までの稚魚が大量斃死し、種苗生産に支障を来すまでに至っている。

コイの乳頭腫はヘルペスウイルス、CHV(Carp herpesvirus)の感染によって発症することが佐野ら(1984)によって明らかにされている。本研究では前記腫瘍の病理組織学、蛍光抗体法によるCHV抗原の証明、さらにウイルス分離を実施し、霞ヶ浦に発生したマゴイの皮膚腫瘍が、以前から知られているCHV感染による乳頭腫であるか否かを検討した。

また、稚魚の大量斃死に関しては、その原因が全く不明で、感染症であるか否かも明らかにされていない状況を踏まえ、先ず、病稚魚の磨碎希釈液による感染実験を行い、本大量斃死が感染性疾病によるものであるか否か明らかにすることを第1の目標とした。さらに、病原体の分離、培養も試みた。

本報告では上記実験の結果をまとめ、それらから導かれる結論について考察する。

第1章 マゴイの皮膚腫瘍に関する研究

腫瘍に関しては、本腫瘍がCHV感染によるものであるか否かを明らかにすることを本年度の目標とした。その目的のために、本腫瘍の病理組織学的検討、蛍光抗体法によるCHV抗原の検出、ならびにウイルス分離を試みた。

材料および方法

1. 供試腫瘍保有魚ならびに供試腫瘍組織

霞ヶ浦手賀地区の1経営体で養殖されていた約1.5Kgのマゴイ3尾で、腫瘍は各鱗ならびに体表に白色の膨隆として形成されていた。特に鱗の腫瘍組織は大きく、その高さも5mm以上に発達していた。また、体側に形成されたものは1枚の鱗を覆うように形成され、鱗の場合よりも小さい傾向にあった。一部の魚では口唇部やひげにも本腫瘍が形成されていた。供試腫瘍組織は鱗および体表から採取し、病理組織標本用には10%ホルマリンで固定し、蛍光抗体法に供試するものについてはドライアイス中で水に包埋凍結した。ウイルス分離用の腫瘍組織材料はペニシリン、ストレプトマイシンおよびマイコスタチンを、それぞれ1,000IU、1,000 μ gおよび430IU/mlに含むMEM-2(牛胎児血清を2%含むイーグルのMEM)に投入し氷冷して東京水産大学まで運搬した。なお、標本採取日は1989年3月18日であった。

2. 病理組織学的検討

常法通りパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し顕微鏡観察した。

3. 蛍光抗体法によるCHV抗原の検出

クリオスタットを用い、厚さ約9 μ mの凍結切片を作成し、風乾後室温に

てアセトンで10分間固定し、抗CHVウサギ抗血清を30℃で60分間反応させた。洗淨後FITC標識プロテインA (FITC-SpA、ファルマシア社製)で染色し、落射式蛍光顕微鏡で特異蛍光を観察した。

4. ウイルス分離

FHM細胞を用い、常法によってウイルス分離を試みた。検体接種後は20℃で培養し、細胞変性効果(CPE)発現の有無を観察した。

結果および考察

病理組織像から本腫瘍が乳頭腫であると判断された。本腫瘍を構成する細胞は明らかに上皮細胞であり、それらの分化の程度は高く、また、増殖した上皮組織中には、血管がよく発達した結合織性基質の陥入が認められた。これらの像は乳頭腫の特徴をよく表しており、また、CHV感染により誘発された乳頭腫のそれと一致するものであった。

蛍光抗体法では供試した3個体全ての腫瘍組織でCHV抗原が明確に観察され、本腫瘍組織中にCHVが存在していることが証明された。

さらに上記3個体の腫瘍組織からFHM細胞を用い個体別に行ったウイルス分離でも、全ての検体でCHVに特徴的なCPEが発現した。

以上の実験結果ならびに現在までに蓄積されたコイ乳頭腫に関する知見から、本腫瘍はCHV感染により誘導された乳頭腫であると判断された。

第2章 コイ稚魚不明病の病因学的研究

1. 背景

茨城県内水試・熊丸氏の私信によると、これら大量斃死する稚魚は、それまでは全く正常であり、むしろ成績のよい群もあつたという。斃死に至る経過は、まず稚魚が池の水面近くをふらふらと遊泳しはじめ、やがて数日のうちに一池の殆ど全ての個体が斃死してしまい、中には急性死する個体もあるとされている。これらの養殖池には霞ヶ浦の水を導入していて、発病時期の水温は20℃前後であつた。病魚は、外観的には浮腫等の傾向は認められず、この点では新潟県等で発生を見ている、コイ稚魚の浮腫症とは異なる病相を呈していた。また、病魚には潰瘍、びらん、出血などの外観症状も認められず、やや痩せている程度の特徴しか認められなかつた。さらに、同内水試によって行われた滑走細菌ならびに寄生虫検査ではいずれも陰性であつたという。

同内水試が手賀地区の調査で把握している昭和63年度の被害状況は、15経営体中5～6経営体で本病が発生し、それら経営体の所有している池の内1/3程度の池に散発的に発生したという。通常感染性疾患では、最初に発生した池から隣接した池へと水平方向に発病が広がっていく傾向があるが、上記のように本病は1経営体の池であつてもとびとびに発生することから、本病が感染性疾患であるか否か不明とされていた。

本研究では、この大量斃死の原因が何であるのかを解明することを主な目的とし、本疾患の伝染性を確認するとともに、病原体の分離・培養を試み、さらに病理組織学的検討を行った。

2. 本疾病が感染性疾患であるか否かの確認

本病が感染性疾患であるか否かを検討するために、病魚磨砕液をコイ稚

魚に接種し、感染実験を行った。

材料および方法

供試病魚（感染源）

霞ヶ浦、手賀地区より持ち込まれ、本疾病に罹患した瀕死の稚魚を感染源として供試した。供試した病魚は平均魚体重 0.15 g で、8尾を合わせ 1 サンプルとして供試した。

これら病魚は、外観的には痩せていることだけが外観的特徴で、その他、出血、鱗の欠損、潰瘍等の症状は認められなかった。

感染実験供試魚

東京水産大学吉田実験実習場産のマゴイ 2 週令の健康な稚魚を供試した。

接種方法

供試病魚の全魚体を磨砕し、魚体重に対し 10 倍量のイーグルMEM-2 で希釈した。次にこの磨砕液を 4℃ で 2,000 rpm、15 分間冷却遠心し、上清を採取、その一部を孔径 450 nm のメンブレンフィルターで濾過し、さらにそのろ液の一部を孔径 200 nm のメンブレンフィルターで濾過した。これらの遠心上清、450 nm ろ液、ならびに 200 nm ろ液をそれぞれ 3 ml 用意し、感染実験供試魚を収容した水槽の飼育水中に流し込み浸漬接種した。

飼育方法

18 l 水槽（飼育水は約 11 l）に 1 水槽あたり 30 尾の感染実験供試魚を収容し、飼育水温は 20℃、サイフォンを設置し、半流水系で曝気しつつ飼育した。

結果および考察

結果を図1、2に示す。上清および450nmのメンブレンフィルターで濾過したろ液を接種した水槽ではそれぞれ3および5日目から供試魚の斃死が観察され、翌4日目および6日目には斃死はピークに達し、最終的には90%と86.7%といずれも高い累積斃死率を示した。これに対し、200nmのメンブレンフィルター-のろ液を流し込んだ水槽では、斃死は全く認められなかった。

上記の結果より、本病は感染性の疾病であり、養殖場における環境要因や栄養状態の低下による斃死ではないと考えられた。また、孔径200nmのフィルターを通過しなかったことから、本病の病原体は200nmよりも大きいと考えられる。

3. ウイルス分離の試み

上記感染実験と平行して、魚類株化細胞を用いてウイルスの分離を試みた。

材料および方法

供試病魚

上記感染実験で感染源として用いた魚と同群の、霞ヶ浦より持ち込まれた瀕死の病稚魚を用いた。

供試株化細胞

以下の魚類株化細胞を供試した。

FHM (Fathead minnow, Gravell et al., 1965)

EPC (Epithelioma papulosum carpio, Fijan et al., 1983)

CEA (Carp embryo of Asagi, Fukuda, unpublished)

MCT (Mirror carp tumor, Hill, unpublished)

PG (Pike gonad, Ahne, 1979)

BF-2 (Bluegill fry, Wolf et al., 1966)

実験方法

供試魚を上記感染実験で行ったのと同様の方法で磨碎、遠心分離し、上清を採取した。さらにMEM-2で10倍希釈し孔径450nmのメンブレンフィルタ-で濾過除菌したものを、予め細胞を培養したプラスチックフラスコに200 μ lずつ接種した。接種後20 $^{\circ}$ Cで培養し、2週間にわたってCPE発現の有無を観察した。

結果および考察

2週間にわたる観察の結果、全ての株化細胞においてCPEは認められなかった。また、昭和62年に行った同様のウイルス分離および盲継代操作においてもCPEは認められなかった。

以上の結果より本病の病原体がウイルスである可能性は低くなったと考えられる。しかし今回供試した株化細胞ではウイルスが増殖できず分離できなかったことも考えられる。現にウイルス性赤血球壊死症ウイルスのように、電子顕微鏡では確認されているが、培養細胞による分離・培養が出来ないウイルスも存在するので、本病も電子顕微鏡による観察等の別の方法による確認無しには、ウイルス性疾病ではないと断定することはできないと考える。

4. 細菌分離の試み-1-

ウイルス性疾病の検討とともに本節では細菌性疾病を疑い、寒天培地を用い細菌の分離を試みた。

材料および方法

供試魚

上記の感染実験で得られた瀕死稚魚（平均魚体重量0.31g）を供試魚とした。

供試培地

各種好気性細菌に対し広く感受性を有する寒天平板を用意し使用した。細菌分離には以下の培地を使用した。

トリプトソーヤ寒天培地（TSA:ニッスイ社製）

ブレイン・ハート・インヒュージョン寒天培地（BHI:栄研社製）

ユーゴン寒天培地（ニッスイ社製）

分離方法

感染実験で得た瀕死魚の体表をアルコールで十分滅菌し、次になるべく消化管を傷つけないように顕微鏡下で解剖を行い、肝臓、腎臓、筋肉の一部を取り出し、各寒天平板に塗抹し20℃で24時間培養した。24時間の培養でコロニーの認められないものはさらに24時間培養した。

十分に独立して形成されたコロニーから同じ培地で継代培養し、20℃で24時間培養した後病原性を調べるために、各細菌の2白金耳量を少量のリン酸緩衝液に懸濁させ、その懸濁液を健康なコイ稚魚（平均魚体重量0.2g）を収容した18ℓ水槽（飼育水量は約11ℓ）に接種し、20℃で飼育し観察した。

結果および考察

肝臓、腎臓、筋肉のそれぞれから、黄白色のコロニーと白色の小さなコ

ロニーが観察された。しかしこれら細菌による感染実験では供試魚の斃死は全く認められなかった。従ってこの細菌の同定は行わなかった。

6. 細菌分離の試み-2-

寒天培地の使用と平行して、無菌試験用の液状培地およびコイの血清を用い細菌を増殖させ分離することを試みた。

材料および方法

供試魚

2.の感染実験と同様の感染実験で得られた瀕死稚魚（平均魚体重0.48g）を供試魚とした。

供試培地

チオグリコール酸塩培地ならびに正常コイ血清中で培養を試みた。

無菌試験用培地である液状チオグリコール酸塩培地（TGC培地：ニッスイ社製）を調製し、試験管に分注し高圧蒸気滅菌し使用した。

コイの血清は東京水産大学吉田実験実習場において、健康なマゴイ（約200g）の尾静脈から採血した血液を室温で2時間、4℃で一晩放置した後、3,500rpmで15分冷却遠心し上清を採取した。この上清を一旦-20℃で凍結させた後、解凍しガラス棒で繊維質を取り除き、リン酸緩衝液（PBS(-)）で4倍に希釈し孔径200nmのメンブレンフィルター（Gelman社製）で2回濾過滅菌した。このろ液を1mlずつスクリーンバイアルに分注し供試した。

分離方法

感染実験で得た瀕死魚を用い、上記と同様に無菌解剖を行い、肝臓および腎臓を取り出した。そしてそれらをあらかじめ分注しておいたTGC培地と

コイ血清中に投入し、20℃で24時間培養した。24時間後に細菌の増殖がみられない場合には、さらに20℃に保持し培養を継続した。

細菌の増殖が認められた場合には、健康なコイ稚魚を収容した水槽に培地ごと投入し20℃で飼育し、その細菌の病原性の有無を調べた。

結果および考察

TGC培地および血清ともに細菌の増殖が認められた。しかし感染実験の結果1尾の斃死も見られず病原性は示されなかった。

第3章 コイ稚魚不明病の病理組織学的検討

本章では光学顕微鏡によるパラフィン切片の病理組織学的観察を行った。

材料および方法

供試標本

霞ヶ浦の養殖池で茨城県内水試・熊丸氏によって採取、10%ホルマリンまたはブアン溶液で固定された病魚標本を供試した。

観察方法

供試サンプルを用い常法に従いパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオシン染色を行い検鏡した。

結果および考察

観察の結果を以下に列記する。

- 腎臓の糸球体：一部に壊死が観察され、嚢間腔内に組織が脱落したと思われる細胞様のもやタンパク様物質が認められる。
- 腎尿細管：尿細管上皮細胞の核の染色性の低下および膨化が見られ、また同細胞の硝子滴変性や核崩壊も認められる。
- 尿細管内腔に赤血球様の物質やタンパク様の物質が認められる。
- 肝細胞：核崩壊像が点在してみられる。

病理組織像を写真1-4に示す。

その他鯉に僅かな浮腫が認められる個体があった以外、脾臓、膵臓、筋肉、消化管などにはいずれの個体においても顕著な変化は認められなかつ

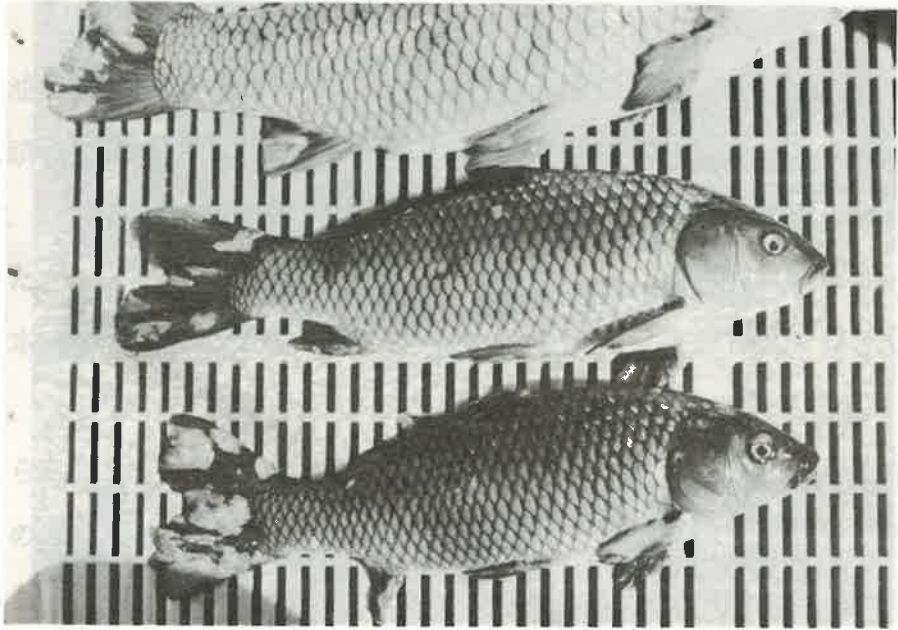


写真1 霞ヶ浦手賀地区養魚場で発生した乳頭腫

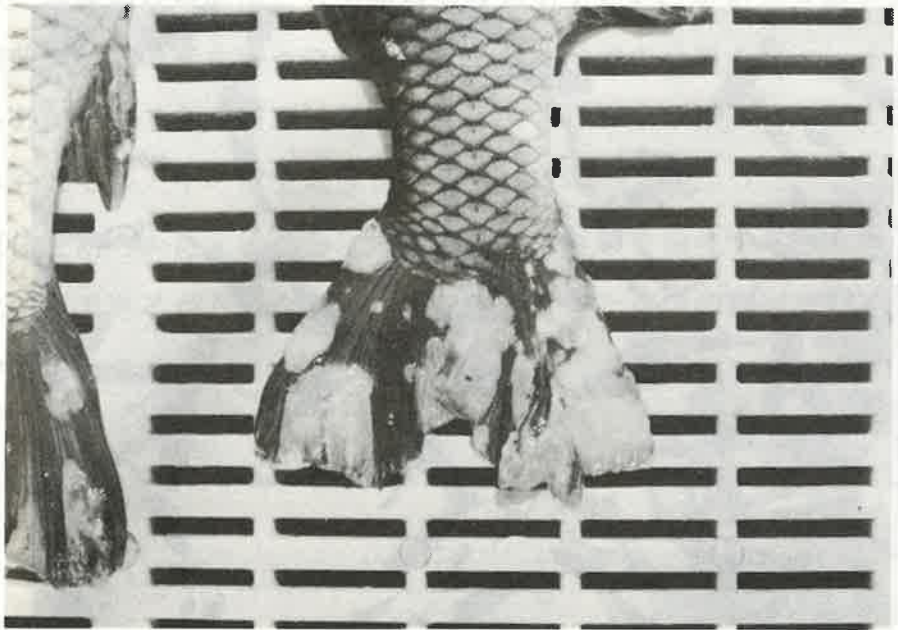


写真2 同乳頭腫拡大像

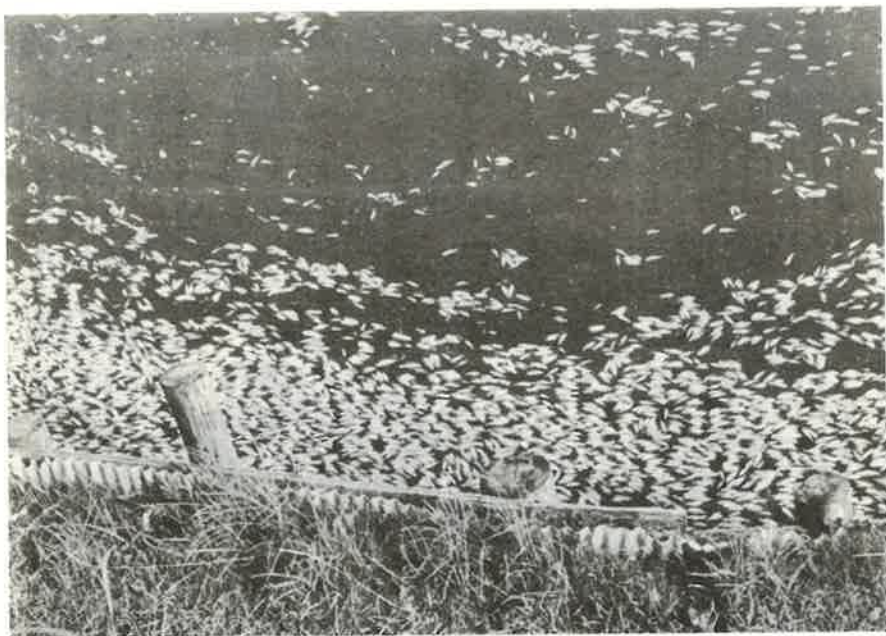


写真3 霞ヶ浦出島地区養魚場で発生したコイ稚魚大量死の状況



写真4 霞ヶ浦出島地区養魚場で発生したコイ稚魚大量死の状況

まとめ

霞ヶ浦のコイ養殖場で発生したマゴイの皮膚腫瘍はCHV感染により誘発された乳頭腫であることが本研究によって明らかにされた。

一方、コイ稚魚の大量斃死の原因は本研究では明らかにすることはできなかったが、本疾病が感染症であることが判明した。濾過性の点から考えると、本病の病原体は200nmよりも大きく、450nmろ液接種区では未濾過区より2, 3日遅れて斃死が起こることから、450nm前後の大きさではないかと考えられ、本病が寄生虫によって発症したものではないことが示唆される。このことは茨城県内水試によって行われた寄生虫検査が陰性であることから支持される。また、今回のウイルス分離の結果は陰性であった。ウイルスに関しては培養細胞で分離できないものや、200nmよりも大きいものが少なからず存在するので、完全には否定できない。病原体の大きさからみると本疾病の病原体として細菌も考えやすいが、本研究では病原性を示す細菌は分離できなかった。今後、嫌気性細菌の分離も試み、さらに検討する必要がある。病理組織学的には糸球体および尿細管の腎実質に病変がみられるが、その他では大きな損傷は認められなかった。

病原体を明らかにすることは本疾病の防除対策を確立する上で是非とも必要なことであるから、今後とも病原体の追求と疫学的調査を前進させるべきであると考えられる。

緒言

昨年度の本受託研究に於て、霞ヶ浦のコイ養殖場で発生したマゴイの皮膚腫瘍がヘルペスウイルスの一種である CHV (Carp herpesvirus) の感染により誘発された乳頭腫であることを明らかにした。さらに、稚魚の大量斃死に関して、その原因を明らかにすることはできなかつたものの、本疾病が感染症であることを強く示唆する結果を得た。

本年度は昨年に引続き本腫瘍の疫学的調査を目的として、腫瘍組織中の CHV 抗原の検出とウイルス分離を試みるとともに、腫瘍保有魚の血清中の抗 CHV 抗体の検出を試みた。一方、稚魚期の不明病に関しては感染実験に供試するコイ稚魚（健康魚）を準備して疾病発生を待ったが、本年度は同疾病が全く発生しなかつたため、各種実験（細菌分離、ウイルス分離、感染実験、病原体の保存性試験、抗生物質による防除実験、病理学的検討等）の遂行が不可能となった。従つて、本報告ではコイ乳頭腫に関して、本受託研究以前に得た研究結果も一部含め、第 1 章で CHV のコイ科魚類稚魚に対する感染実験と腫瘍誘発について、第 2 章で腫瘍の自然退行について、第 3 章で加温処理による腫瘍の退行について、第 4 章で本年度に霞ヶ浦で発生した乳頭腫の調査結果について記述する。

第1章 CHVのコイ科魚類稚魚に対する感染実験と腫瘍誘発について

コイ乳頭腫は1500年代からヨーロッパにおいて記載されているきわめて長い歴史を持った疾病であり、1904年にはコイのボックス病という病名が与えられている。1960年代には腫瘍組織中にヘルペスウイルス様粒子が電子顕微鏡で観察され、本病がウイルス性の疾病であろうと推定されるに至ったが、ウイルス分離にはいずれの研究者も成功しなかった。一方、わが国でも主としてニシキゴイの乳頭腫が問題となり、1980年代に入り東京水産大学 佐野らによってウイルス分離が試みられ、FHM細胞ならびにEPC細胞でヘルペスウイルスが分離され、CHVと名付けられた。本章ではCHVによるコイ科魚類稚魚に対する感染実験の結果を述べる。

材料および方法

実験1 コイ科魚類稚魚に対する感染実験

供試魚 以下の魚種を供試した。

1. マゴイ：東京水産大学吉田実験実習場産
2. フナ：滋賀県水産試験場産
3. モロコ：滋賀県水産試験場産
4. ソウキョウ：埼玉県水産試験場産

東京水産大学吉田実験実習場でふ化させ、アルテミアによって飼育したふ化後2週令の稚魚を用いた。

供試ウイルス 分離後1回クローン純化しFHM細胞で6回継代したウイルスを供試した。そのウイルス感染価は $10^{4.7}$ TCID₅₀/mlであった。

接種方法 上記ウイルス培養液を飼育水によって $10^{3.7}$ TCID₅₀/mlに希釈し、その中に供試魚を1時間浸漬して接種した。対照区にはMEM-2を同様に希釈して供試魚を浸漬した。

供試尾数ならびに飼育方法 ウイルス接種区、対照区ともに300尾を供試した。浸漬接種終了後18ℓの水槽に100尾ずつそれぞれ3水槽にわけて収容し、井水を注入しつつ20℃で飼育した。

実験2 コイ稚魚に対する感染実験

材料および方法

供試魚 東京水産大学吉田実験実習場でふ化させ、アルテミアによって飼育したふ化後2週令の稚魚約10,000尾を用いた。

供試ウイルス 実験1と同じであるが、ウイルス感染価は $10^{5.2}$ TCID₅₀/mlであった。

接種方法ならびに飼育方法 飼育水で10倍に希釈したウイルス液($10^{4.2}$ TCID₅₀/ml)8ℓに供試魚を1時間浸漬し接種した。接種後200ℓの水槽に収容し、20℃～28℃で注水しつつアルテミアあるいはコイ用配合飼料を与えて飼育した。接種後3週間を斃死率観察期間とし、水温を20℃に制御し、その後は水温制御を解除した。

結果および考察

・実験1におけるマゴイのウイルス接種区では接種後3週間に約86%が斃死した。斃死魚からのウイルス分離結果も陽性であった。また、接種6カ

月後の生残魚の67%に乳頭腫の発症が認められた。

フナ、モロコ、ソウギョでは、接種区と対照区の斃死率がほぼ同程度で、斃死魚からのウイルス分離も陰性であったことから、CHVはこれらの魚種には感染性を有さないものと考えられた。

実験2の、接種後3週間における供試魚の斃死率は約94%であり、接種後14週間から僅かに腫瘍形成が認められ、飼育水温が20℃以下になる20週後からは腫瘍の形成が顕著に認められ、24週間後の生残魚における肉眼的腫瘍発生率は約70%に至った。本実験における接種後3週間以内の急性発病魚は退色黒化、不活発、腹部膨満、眼球突出などの外観的特徴を有し、さらに、眼球周囲、頭蓋部、鰓蓋部、体側筋あるいは腹部体表における出血も特徴的であった。瀕死魚では腎尿細管上皮細胞の空胞化と壊死のほかに肝臓、脾組織、心臓、筋肉、腸管上皮細胞ならびに粘膜固有層の壊死、さらに鰓の浮腫に伴う上皮の剥離などが観察され、全身感染の様相を呈していた。

また、形成された腫瘍中には蛍光抗体法でCHV抗原が証明されたが、腫瘍を有する個体の上皮以外の組織中にはCHV抗原は全く認められず、本ウイルスは全身感染に陥った急性発病期以外、すなわち腫瘍を形成するに至った魚体中では体表の上皮組織にのみ存在するものと考えられた。

上記結果から、CHVはコイに対して特に感染性が強く、稚魚期のコイに感染した場合、全身感染を起こし高い致死病的病原性を示すウイルスで、CHV感染による斃死を免れた生残魚に高率に乳頭腫を発症せしめるウイルスであるといえる。

第2章 乳頭腫の自然退行について

コイのボックス病すなわちコイの乳頭腫が自然に退行し治癒する現象が報告され、我々もそれをしばしば観察している。本章では実験的にCHVを感染させ、腫瘍の発現をみたコイ稚魚における腫瘍退行現象の観察結果を示す。

材料および方法

東京水産大学吉田実験実習場で採卵し、東京水産大学でふ化後2週間飼育した稚魚に、第1章の実験2と同様にしてCHVを接種し、生残した供試魚について45週間にわたり腫瘍の観察を行った。

結果および考察

腫瘍の形成は、CHV接種後24週間後に生残魚の約70%に認められた。その後飼育水温が最低（2月上旬、約5℃）になる僅か以前のCHV接種34週間後には腫瘍の退行する個体が認められはじめ、水温が上昇する接種41週間後（約10℃）には多くの個体で急速な腫瘍退行が認められた。

病理組織学的検討の結果、退行期の腫瘍には核濃縮を呈する類壊死ならびに壊死が観察され、さらに壊死巣の空隙化が観察された。このようにして組織の欠損が生じ、腫瘍組織の崩壊・脱落に至るものと考えられた。

第3章 加温処理による腫瘍の退行について

ニシキゴイの養殖現場では乳頭腫は加温することによって治癒するとの経験に基づき、加温処理を実行しているところもあり、また、我々も自然発病のニシキゴイを20℃以上で飼育し腫瘍の退行・脱落を観察している。本章実験の目的は、実験感染によって発症した乳頭腫が加温処理によって退行するか否かを確認し、コイ乳頭腫の治療実験のモデルとして利用できるか否か、あるいは退行現象を研究する上での実験系となり得るか否かを検討するところにある。

材料および方法

供試魚 ふ化後2週令でCHVを接種したことにより乳頭腫が形成されたCHV接種後31週間のコイ稚魚を用いた。供試魚はCHV接種後温度制御を行わず飼育し、本実験供試時の飼育水温は約9℃であった。

供試尾数および加温方法 腫瘍の退行・消失の観察区として加温区、対照区それぞれ10尾、組織サンプリング区としてそれぞれ30尾を供試し、加温区では約9℃の水温から20℃まで10時間かけて水温を上昇させた。実験期間中の対照区における水温は8.2℃～10.0℃（平均9.2℃）であった。

結果および考察

加温区においては水温上昇2日後に腫瘍組織が海綿状になり、退行が観察された。加温開始7日後には10尾中9尾に肉眼的な乳頭腫が認められなくなった。これに対して、対照区では実験開始後12日目に1尾、16日目に2尾において腫瘍が認められなくなったのみであり、明らかに乳頭腫退行に加

温が有効であることが確認された。病理組織学的には、退行時の腫瘍組織に核濃縮を伴う壊死と壊死巣の空隙化が認められ、自然退行時の病理組織像と全く一致していた。従って、実験感染に耐過し腫瘍が形成されたコイは、腫瘍の自然退行の実験系として利用が可能であり、また、各種の治療実験に利用し得るものと判断された。本実験結果はコイの乳頭腫を加温という簡単な操作によって治療できることを明確に示している。温度上昇による腫瘍の退行はきわめて興味ある現象であり、その機構解明が今後の重要な課題であろう。

第4章 本年度霞ヶ浦で発生した乳頭腫の調査について

昨年度の本受託研究において、霞ヶ浦手賀地区で発生したマゴイの乳頭腫がCHV感染によって誘発されたものであることが明らかになった。本年度はさらに本腫瘍の疫学的調査を目的として、本腫瘍中におけるCHV抗原の検出、ウイルス分離、さらに、腫瘍保有魚血清中の抗CHV抗体の検出を試みた。

材料および方法

供試魚、供試腫瘍組織ならびに供試コイ血清 霞ヶ浦出島町の1経営体で養殖されていた1.1~1.4 Kgのマゴイ5尾で、腫瘍は各鱗ならびに体表に白色の膨隆として形成されていた。供試腫瘍組織は鱗から採取し、PBS(-)に投入し、氷冷しつつ東京水産大学まで運搬した。採血は尾部静脈から行い、同様に運搬した。なお、標本採取は1989年12月25日に行った。

蛍光抗体法によるCHV抗原の検出 約9 μ mの凍結切片を作成し、風乾後室温で10分間のアセトン固定し、抗CHVウサギ血清を30℃で60分間反応させた。PBSで洗浄の後FITC標識プロテインAで染色し、B励起系で観察した。

ウイルス分離 FHM細胞を用い、常法で行った。検体接種後は20℃で培養し、CPE発現の有無を観察した。

抗CHV抗体の検出 検体血清を加熱(42℃、30分間)により非働化し、CHVを接種し、アセトン固定したFHM細胞と反応させた。反応後洗浄し、抗コイ免疫グロブリンウサギ血清と反応させた。続いてFITC標識プロテインAによる染色を施し、蛍光顕微鏡によって観察した。

結果および考察

各供試個体の体重、腫瘍の観察された部位、および CHV抗原検出、ウイルス分離、抗 CHV抗体検出の結果を表に示す。蛍光抗体法では全ての個体でCHV抗原が観察され、ウイルス分離では2個体が陽性を示した。これらの結果から、昨年度の手賀地区における調査結果と同じく、本腫瘍がCHVの感染によって誘発された腫瘍であると判断された。

供試魚5尾のうち4尾で血清中に抗CHV抗体が検出された。現在までに我々は、実験的にCHVを感染させたコイ、CHV抗原が検出された自然感染マゴイ、さらに、乳頭腫と推定される腫瘍を有しているもののCHV抗原が検出されないマゴイの血清中にそれぞれ抗CHV抗体を検出している。本実験結果はこれらの観察結果を補強するものであり、今後このような血清診断により腫瘍形成の有無にかかわらずコイのCHV汚染状況を調査する可能性を示したものである。

表1 1989年12月に手賀地区で採取された乳頭腫のCHV調査結果

個体 No.	体重 (Kg)	腫瘍が観察された部位	CHV抗原	ウイルス分離	抗CHV抗体 (血清の希釈率)
1	1.1	左胸鰭	+	+	32
2	1.3	尾鰭上方	+	-	32
3	1.2	尾鰭下方	+	-	16
4	1.2	尾鰭上方	+	-	32
5	1.2	尾鰭上方	+	+	-

まとめ

本年度は乳頭腫のみについて調査した。本研究の結果から、乳頭腫の病原体であるCHVは、稚魚期のコイ（毛仔）にはきわめて高い致死病的病原性を有し、感染に耐過したコイにきわめて高率に乳頭腫を形成させることが明らかになった。また、この乳頭腫は水温の上昇に伴って自然に退行・脱落し、さらに実験的にも飼育水温を上昇させることによって迅速に退行させることが明らかにされた。コイ血清中の抗CHV抗体の検出試験ではウイルスが分離できなかつた個体の血清中にも蛍光抗体法によって抗CHV抗体が証明され、疫学的調査に利用できる可能性が示唆された。

マゴイは云うまでもなく食用魚であるので、CHVのヒトに対する病原性が懸念されるところであるが、CHVが胃におけるpH 3に耐え得ないこと、37℃では急速に失活し、かつ、30℃以上では増殖できないこと、さらにウサギに生ウイルスを大量に静脈注射しても何等異常を来さなかつたこと等、現在までに得られているデータはCHVの温血動物に対する病原性を否定するもののみである。

緒 言

過去2年間の研究成果は前記したとおりであるが、本年度は加温による乳頭腫の退行現象をより広い温度域で調べるとともに、CHVの感染環を遮断することによるコイ乳頭腫の防除法を開発する目的で、CHVに対するヨード剤の効果について検討し、さらに、稚魚期不明病の病原体探索も試みた。

第1章 コイ乳頭腫に関する研究

第1節 加温による乳頭腫の退行について

平成元年度には、飼育水温を20℃に上昇させることによって、コイ乳頭腫が退行することを報告したが、本年度は7.5℃で飼育されていた担腫瘍魚を、15℃、20℃、25℃ならびに30℃の飼育条件に移し、各水温下における腫瘍退行の観察を行った。

材料および方法

供試魚 供試魚は、東京水産大学吉田実験実習場にて採卵し、東京水産大学水族病理学研究室でふ化・飼育し2週齢時にCHVを浸漬接種して乳頭腫を誘発させたマゴイ稚魚とした。昇温試験に供する時点の飼育水温は7.5℃であった。

昇温試験 上記供試魚を4区に分け、各区にそれぞれ5尾をあて、水温を15℃、20℃、25℃および30℃に上昇させた。昇温には15℃および20℃区では24時間をかけ、25℃および30℃区では48時間をかけて行った。

腫瘍退行の観察は、毎日1回、目視によって行った。

結果および考察

7.5℃で飼育を継続した個体においては腫瘍の退行が認められなかったのに対し、

15℃では実験開始後腫瘍が小さくなり20日間で2個体(5個体中)の腫瘍が消滅した。20℃以上では温度が高いほど速やかな腫瘍の崩壊・消滅が認められ、30℃では7日後、25℃では9日後に全ての個体(各5個体)の腫瘍が消滅した。また、20℃においても、9日後には5個体中4個体で腫瘍の消滅が観察された。これらの結果は、昨年度の治癒試験の結果を再確認するとともに、より高温、すなわち25℃あるいは30℃の処理によって、より短時間で治癒させることができることを示している。結果を図1に示し、腫瘍退行の状況を写真5~8に示す。

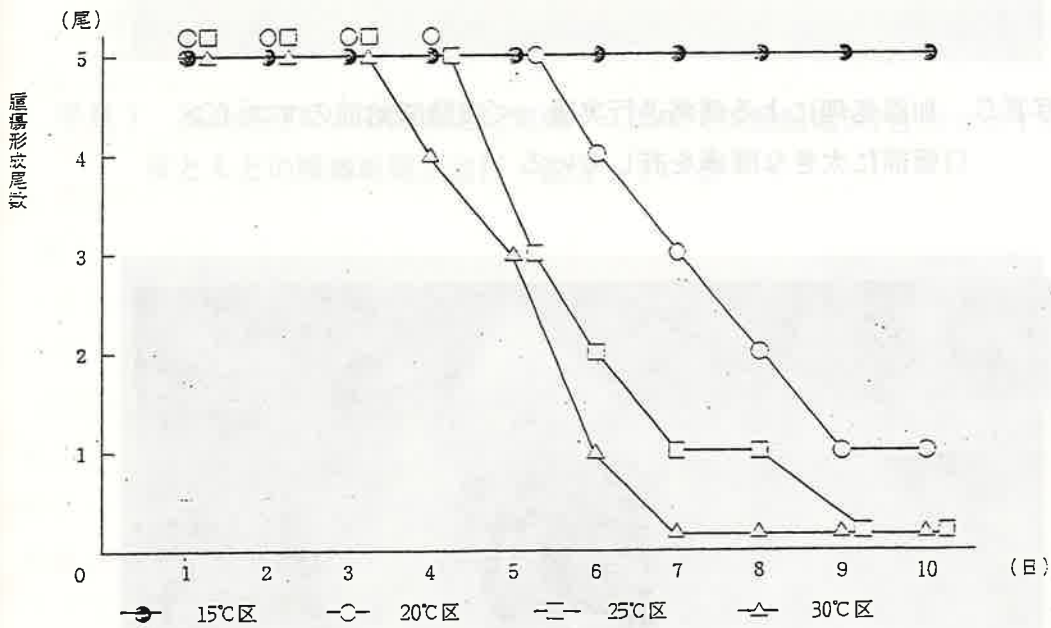


図. 1 各温度区における腫瘍退行の変化



写真5 加温処理による腫瘍退行実験 <実験開始前のマゴイ>
口唇部に大きな腫瘍を有している

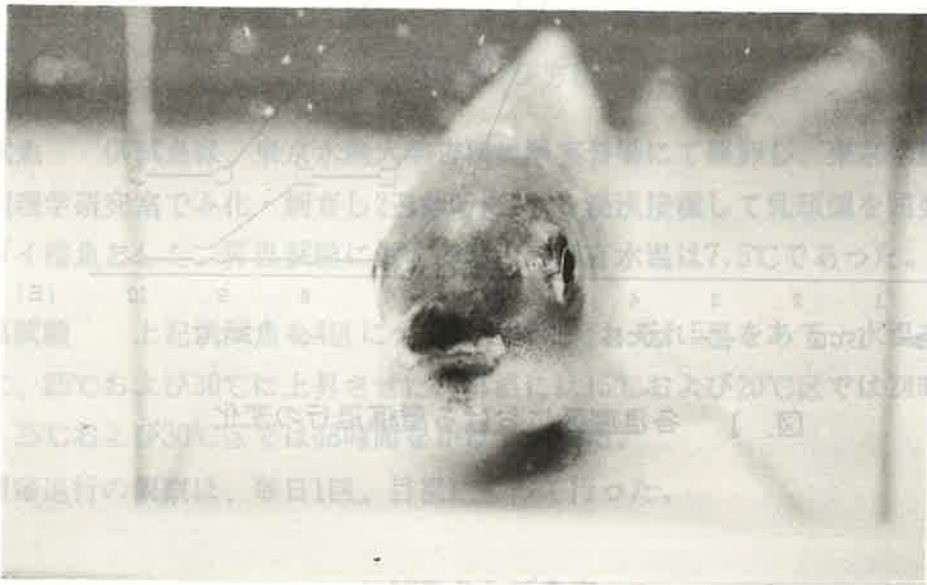


写真6 加温処理による腫瘍退行実験 <25℃で実験開始1日目のマゴイ>
写真5の個体と同一個体で、腫瘍組織が膨化してかさぶたのようになった。



写真7 加温処理による腫瘍退行実験 <25℃で実験開始5日目のマゴイ>
ほとんどの腫瘍組織が退行・脱落している



写真8 加温処理による腫瘍退行実験 <25℃で実験開始9日目のマゴイ>
腫瘍は完全に治癒した

第2節 ヨード剤処理によるCHVの不活化について

サケ科魚類では、発眼卵をヨード剤で消毒し、卵表面に付着している病原ウイルスを不活化することによって、ウイルスの感染環を遮断することが、ウイルス病防除に大きく貢献している。CHVの感染環は未だ解明されていないが、他の魚類ウイルス病の例から、親魚の排卵液あるいは飼育水から稚魚に感染する可能性はあるものと考えられる。そこで、本実験では、コイの発眼卵をヨード剤で消毒するための条件を検討した。

材料および方法

ウイルス FHM細胞にCHVを接種し、20℃で培養後、CPEが完結した時点で培養液を回収し、1000gで10分間の遠心を施した。得られた上清を100,000g、60分間遠心して得た沈澱を初発液量と同量の滅菌水道水に再懸濁し、これをウイルス液として供試した。供試ウイルス液として超遠心したウイルス液を使用した理由は、有機物の存在により、ヨードの効力が低下する可能性があったためである。なお、供試ウイルス液の感染価は、 $10^{4.75}$ TCID₅₀/mlであった。

ヨード剤による処理 ポビドンヨード(イソジン; 明治製菓)を、有効ヨード濃度 6、12.5、25、50、100および200ppmになるよう滅菌水道水で希釈し、上記ウイルス液と等量混合した。処理時間を各濃度につきそれぞれ、0秒、30秒、1分、5分、15分、30分および60分として検定した。各処理時間が経過した時点で、滅菌済みの0.0004% チオ硫酸ナトリウム(ハイポ)溶液を上記混合液と等量加えることによってヨードを中和し、その後FHM細胞に接種し活性ウイルスが残存するか否かを調べた。0秒の区では、予めハイポで中和した各濃度のイソジンをウイルス液と混合した。接種後FHM細胞を15℃で培養し、CPE発現の有無を観察した。

結果および考察

3ppmでは1時間の処理でもウイルス活性が残るが、6ppmでは30秒の処理でもCHVの活性は検出されなくなった。当然、それ以上の濃度、時間による処理ではCHVによるCPEはいつさい観察されなかった。結果を表1に示す。

第3節 コイ発眼卵に対するヨード剤の安全性

本章第2節で、CHVがヨード剤処理によって容易に不活化されることをあきらかにした。本節実験では、コイ発眼卵に対するヨード剤処理の安全性について検討した。本実験は東京水産大学と茨城県内水試の両者で検討した。

材料および方法

イソジンを有効よう素濃度が50および100ppm(東京水産大学における実験)あるいは25、50、100および200ppm(茨城県内水試における実験)になるよう飼育水で希釈し、30および60分間(東京水産大学)あるいは5、10、15、20、30および60分間(茨城県内水試)コイ発眼卵を浸漬し、ふ化率を求めた。

結果および考察

東京水産大学における実験結果ならびに茨城県内水試における結果とも使用した濃度範囲および処理時間の範囲内ではコイ発眼卵のふ化率に全く影響はなかった。

東京水産大学で行われた安全性試験では、50および100ppm、30および60分間の処理でふ化率は82%~90%(正常なふ化個体は71.5~82.0%)の範囲にあり、無処理対照区と変わることはなかった。一方、熊丸および柳田によって行われた安全性試験では、供試した発眼卵のふ化率は、無処理の区も含め、全体的に低かったものの、ヨード剤処理による影響は全く認められず、本実験の範囲内では、100ppmで60分あるいは200ppmで30分の処理を行っても安全であることが判明した。東京水産大学において得られた結果を表2に、柳田氏および熊丸氏によって得られた結果を表3に示す。

以上の結果から、卵表面に付着して、あるいは飼育水中に存在するCHVはヨード剤によって安全にかつ容易に不活化できるものと判断された。今後、ふ化場での応用がなされることを期待する。

表1 ポビドンヨードの殺CHV効果

有効よう素濃度	CPE 発 現 の 有 無							
	0秒	30秒	処 理 時 間 1分	5分	10分	15分	30分	60分
3 ppm	+	+	+	+	+	+	+	+
6 ppm	+	-	-	-	-	-	-	-
12 ppm	+	-	-	-	-	-	-	-
25 ppm	+	-	-	-	-	-	-	-
50 ppm	+	-	-	-	-	-	-	-
100 ppm	+	-	-	-	-	-	-	-

供試ウイルス液は超遠心後滅菌水道水に再浮遊させたCHV溶液で、ウイルス感染価は $10^{4.75}$ TCID₅₀/mlであった。また、処理中の温度は約16℃で、FHM細胞を用いて感染価と残存ウイルス活性の測定を行った。本実験の条件でCPEが観察されなかった場合、CHVの感染価が $10^{-4.75}$ 、すなわち約60,000分の1以下に低下したことを示している。

表2 コイ発眼卵に対するヨード剤の安全性試験 (東京水産大学分)

		正常にふ化	異常な仔魚	ふ化せず	ふ化率	正常ふ化率
100ppm	60分間	164	15	21	89.5 %	82.0 %
100ppm	30分間	159	21	20	90.0 %	79.5 %
50ppm	60分間	143	21	36	82.0 %	71.5 %
50ppm	30分間	155	16	29	85.5 %	77.5 %
対照区		154	16	30	85.0 %	77.0 %

産卵後2日目の発眼卵に対して浸漬処理した。

表3 コイ発眼卵に対するヨード剤の安全性試験（茨城県内水試分）

有効ヨウ素濃度 (ppm)	浸漬時間 (min.)	供試卵数	発眼卵数	発眼率 (%)	孵化仔魚数	*孵化率 (%)
0	0	312	192	61.5	47	24.5
25	5	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-
	15	202	155	76.7	41	26.5
	20	181	112	61.8	29	25.9
	30	143	97	67.8	24	24.7
	60	162	48	29.6	31	64.6
50	5	-	-	-	-	-
	10	246	75	30.5	44	58.7
	15	182	43	23.6	12	27.9
	20	212	178	84.0	36	20.2
	30	258	220	85.3	60	27.3
	60	303	220	72.6	58	26.4
100	5	384	351	91.4	67	19.1
	10	285	102	35.8	59	32.2
	15	167	60	35.9	31	51.7
	20	325	66	20.3	40	60.6
	30	189	71	37.6	20	28.6
	60	144	18	12.5	7	38.9
200	5	238	46	19.3	26	56.5
	10	266	93	35.0	53	57.0
	15	145	57	39.3	34	59.6
	20	220	67	30.5	25	37.3
	30	292	72	24.7	35	48.6
	60	-	-	-	-	-

*孵化率 = 孵化仔魚数 / 発眼卵数 × 100

第2章 コイ稚魚の大量死について

本研究では、霞ヶ浦で発生したコイ稚魚大量斃死の原因を明らかにすることを主な目的として、感染実験、ウイルス分離、電顕観察等を行った。

第1節 感染実験

本病が感染性のものであるか否か、また、病原体がろ過性のものであるか否かを検討するため、霞ヶ浦出島地区で発生した大量死病魚を感染源とした感染実験を行った。

材料および方法

感染源 1990年6月19日あるいは7月3日に大量斃死が発生した養殖池(霞ヶ浦出島地区)で採取した未斃死のマゴイ稚魚を供試した。病魚磨砕液は、滅菌した乳鉢を用い、珪砂を加え、病魚材料(全魚体)を磨砕した。磨砕した材料はカナマイシンを含まないイーグルMEM(Minimum Essential Medium)で10倍に希釈して感染源とした。遠心上清は前記した磨砕液に3,000rpmで10分間遠心を施して得た。この上清を450nmのメンブランフィルターでろ過し、得られたろ液を感染実験に供試した。

供試魚 東京水産大学吉田実験実習場で採卵し、発眼卵の状態東京水産大学キャンパスに搬入の後、脱塩素した水道水で飼育したマゴイおよびカガミゴイの健康な稚魚を供試魚とした。供試魚はアルテミアおよび人工餌料で飼育し、感染実験に供試する時点での魚齢は5~7週齢であった。

感染方法 同居感染区では、水槽をステンレス製金網で2~3区画に仕切り、それぞれに、自然発生病魚、マゴイあるいは(および)カガミゴイ供試魚を収容し、注水しつつ飼育し、観察を行った。他の実験区では約14ℓの飼育水を入れた水槽に供試魚を所定の尾数収容し、それぞれの感染源溶液15mlを加え、翌日から注水を行い飼育した。

結果および考察

出島地区の養殖池で採取した病魚について、同居感染、病魚磨碎液、同磨碎液の遠心上清(3,000rpm、10分)、450nmフィルターろ液の浸漬接種による感染実験を行った。その結果、同居感染および病魚磨碎液接種区のみ供試魚の斃死が認められ、その他の実験区では全く斃死はなかった。また、供試魚としてマゴイおよびカガミゴイを用いたが、両品種とも本病に対する感受性は高く、約10日で全ての供試魚が斃死した。感染実験の結果を表4に示す。以上の結果は、本症の病原体が低速の遠心で容易に沈澱してしまうが、品種にかかわらずコイ稚魚を斃死させることを示している。また、本症が感染症であることは、流水中で飼育したにもかかわらず、実験感染魚群に新たな供試魚を加えると、発病を継続できることによつて明らかに証明された。

現在までにコイの稚魚に大量死をもたらす疾病として、ニシキゴイの浮腫症が知られているが、浮腫症は遠心上清あるいはメンブランフィルターろ液の接種によつてニシキゴイに対して容易に感染が成立し、その病原体として、ボックス様ウイルスの関与が指摘されている。これらの事実と今回霞ヶ浦病魚について我々が検討した結果とは明らかに異なっている。霞ヶ浦病魚においても、後述するように我々の電子顕微鏡観察によつて、上記ボックスウイルス様粒子が検出され、また、感染実験によつて斃死した供試魚の鰓上皮細胞にも同粒子が観察された。ただし、本大量死病原体のろ過性を証明し得なかったことを考慮すると、ボックス様ウイルスの本症への関与にも疑問が残る。さらに、今回の研究材料には先の写真に示したように、浮腫はほとんど認められなかった。浮腫症病原体のろ過性試験はニシキゴイを供試魚として用いているのに対して、今回の我々の感染実験ではニシキゴイを供試していない。したがつて、ろ過性について浮腫症病原体との厳密な比較はできないが、上記の結果を総合すると、マゴイ稚魚の大量死とニシキゴイ稚魚の浮腫症は異なつた疾病である可能性があると判断される。本研究では本病の病原体を特定することができなかつたが、今後、供試魚としてニシキゴイも用いて、さらに病原体特定の努力を継続して行きたいと考えている。

第2節 ウイルス分離

ニシキゴイの浮腫症では、病原体としてポックスウイルス様粒子の存在が指摘されている。また、マゴイ不明病の病原体が浸漬接種で極めて強い感染性を有することなどを考慮すると、ウイルスの関与が疑われる。そこで、病魚からのウイルス分離を試みた。

材料および方法

病魚材料 病魚材料は前節と同じとした。

供試細胞 FHM(Fathead Minnow由来)、EPC(Epithelioma Papulosum Cyprini由来)、BF-2(Bluegill Fry由来)、BB(Brown Bullhead由来)の各株化細胞を用いた。各供試細胞を、カナマイシン不含のMEM(5% FBSおよび 14mM HEPES を含む)で24wellのプレートに24時間培養した後、供試した。

接種原の調製 全魚体を乳鉢で硅砂とともに磨砕し、前記MEMで約100倍に希釈して、3,000rpmで10分間の遠心を施した後、孔径450nmのメンブランフィルターによりろ過除菌した。こうして調製した接種原を各供試細胞に0.1ml/well接種した後、25℃で培養しCPE発現の有無を観察した。

結果および考察

いずれの細胞においてもCPEは観察されず、ウイルス分離は不成功に終わった。本章第1節のろ過性試験結果から、本病病原体はかなり大きいものと推定されていたが、本実験においてもウイルスを証明し得なかった。

第3節 電子顕微鏡観察

前述したように、1990年に発生した大量斃死病魚材料の接種によって、マゴイおよびカガミゴイに急性な斃死がもたらされ、本病が明らかに感染症であることが示された。しかしながら、病原他の特定には至らなかった。本節では寄生虫が全く観察されなかった自然発病病魚および感染実験での瀕死あるいは斃死魚の鰓の電子顕微鏡観察を行った。

材料および方法

霞ヶ浦出島地区で発生(1990年7月3日)した大量死病魚および同病魚との同居感染によって発病したマゴイ実験感染魚の鰓を切り出し、供試材料とした。また、無接種対照区のマゴイ稚魚の鰓も供試した。切り出した鰓を2.5%グルタルアルデヒドおよび1%オスミウム酸で2重固定し、昇順アルコールによる脱水とn-Butyl glycidyl etherによる置換を経た後エポン樹脂に包埋した。常法通り薄切し、2%酢酸ウランおよび酢酸鉛による2重染色を施し、電子顕微鏡観察に供した。

結果および考察

自然発病魚、実験感染魚ともに鰓の上皮細胞中に、先に永井らが報告したボックスウイルス様粒子が検出された。本粒子は大きさ約270nmの半球形をしており、半球部分の外側に粒状に観察される構造物を有している。この形態は典型的なボックスウイルスのものとはことなるが、現在知られているウイルスの中ではボックスウイルスに最も近い。写真9に本粒子の電頭像を示す。

今回、電子顕微鏡観察により、ウイルス様粒子を検出し、さらに実験感染魚においても検出されたことは、本粒子が感染性を有することを示している。しかしながら、本章第1節で、本病病原体のろ過性について検討し、病魚磨碎液の遠心(3,000rpm、10分間)上清や、450nmフィルターによるろ液に感染性が認められなかったことを述べた。上記ウイルス様粒子が、たとえ感染性を有していたとしても、この粒子が450nmのメンブランフィルターを全く通過できず、また、3,000rpmという低速の遠心で沈澱してしまうとも想定しがたい。したがって、霞ヶ浦で発生し

たマゴイ稚魚大量死の病原体であるとの結論は、現在のところできず、現在も本病の病原体は特定できていない。



写真9 霞ヶ浦出島地区で採取した病魚の鰓上皮細胞中に見いだされたウイルス様粒子

総括

本受託研究は、霞ヶ浦のコイ腫瘍の病原体を明らかにすることと、その防疫対策を確立すること、ならびに稚魚期の大量死の原因を究明することを目的として行った。

コイの乳頭腫は、欧州において約400年以前より皮膚の膨隆患部として認識され、コイのボックス病あるいは魚類ボックス病と呼称されてきた。組織学的には、上皮細胞が増殖し、それら増殖した上皮組織中に基底膜ならびに血管系の発達した結合織の陥入が認められ、典型的な乳頭腫の組織像を呈する。本症の原因として、例えばSchubertsやSchperkrausらの電顕観察結果により、ヘルペスウイルスの関与が疑われ、ウイルス分離の努力が繰り返されたが、いずれも不成功に終わった。最近になってわが国のニシキゴイで乳頭腫の発生が問題となり、東京水産大学資源育成学科水族病理学研究室では、コイ乳頭腫の疫学を確立するため、ウイルス学的、病理学的、ならびに腫瘍学的研究を重ねてきた。コイ乳頭腫組織からのウイルス分離の努力の結果、我々は1980年代の約2か年間に合計8個体のコイの乳頭腫組織からヘルペスウイルスの分離に成功した。そして、このウイルスをCyprinid Herpesvirus(CHV)あるいはHerpesvirus cypriniと命名した。さらに、我々は、本ウイルスによる感染実験により本ウイルスがコイ乳頭腫の病原体であることも証明した。ウイルスが初めて分離されたのは、新潟県で養殖されていたニシキゴイ(浅黄)から採取した腫瘍組織からで、その後、他の品種のニシキゴイ腫瘍組織から、さらに本受託研究においてマゴイの自然発病魚からも分離された。

本ウイルスは、乳頭腫組織の磨砕ろ液を株化細胞 FHM(コイ科魚類のFathead Minnow由来)あるいはコイ乳頭腫由来のEPC細胞に接種し、15℃あるいは20℃で約3週間培養することによってCPEを発現し、感染細胞にはCowdry A型の封入体を形成する。本ウイルスがヘルペスウイルスであることは、ビリオンの形態・大きさ、ヌクレオカプシッドのキャプソメア配列、酸および脂質溶剤に対して感受性であること、核内でヌクレオカプシッドを形成すること、遺伝子としてDNAを有することなどから確認された。

CHV($10^{4.2}$ TCID₅₀/ml)を20℃で1時間の浸漬法によりコイ稚魚に接種した場合、強い致死的病原性が示された。この感染実験に供試したコイ稚魚の斃死率は、2週

齡マゴイで85.7%、4週齡ニシキゴイで20%であったが、8週齡の稚魚ではマゴイ、ニシキゴイ両者とも0%であった。一方、CHVはフナ、草魚をはじめ他のコイ科魚類に対しては斃死をもたらさなかった。CHVはコイに対して腫瘍原性も有し、実験感染耐過魚に、マゴイで60.8%、ニシキゴイで55.0%と高率で乳頭腫を誘発した。腫瘍はウイルスを浸漬法により接種後、5ないし6ヶ月で形成され、この最初に形成された腫瘍が自然脱落した7.5ヶ月後に、83%の個体で同腫瘍の再発が観察された。感染実験における全ての瀕死魚からCHVが再分離された。腹腔内接種(10^5 TCID₅₀)した場合には、成魚にも約5ヶ月後に腫瘍が誘発された。このときの腫瘍発生率はカガミゴイで13.3%、ニシキゴイでは9.8%であった。CHVは腫瘍組織のみから再分離され、内臓諸器官からは分離されなかった。腫瘍は鱗、表皮、顎部、腹腔内接種部に形成され、さらに頻度は低いが食道にも形成された。2週齡稚魚にCHVを接種した後、3~21日間、蛍光抗体法によって魚体内ウイルス抗原の存在部位を観察したところ、抗原は鰓、肝臓、腎臓ならびに腸管に高頻度で観察された。さらに、ウイルス抗原は自然発症の腫瘍組織よりも、2週齡稚魚にCHVを接種し、24週後に形成された腫瘍組織中でより高濃度に存在することも判明した。

ヘルペスウイルスに属するウイルスが、免疫系が十分に発達する以前の、すなわち幼少期のヒトおよび動物に対して病原性を示すことはよく知られた事実である。Herpesvirus cypriniは、8週齡よりも4週齡、4週齡よりも2週齡のコイ稚魚に対してより強い病原性を示した。このようにCHVの病原性は、他の魚類ヘルペスウイルス、CCV、NeVTA、Herpesvirus salmonis、OMVおよびYTVに類似している。

以上の結果をまとめると、CHVによるマゴイ稚魚に対する感染実験では、ふ化後2週齡時の稚魚を供試した場合、斃死率は90%以上にのぼることがあり、週齡がすすむと斃死率は低下し、一方、2週齡の稚魚の本ウイルス感染耐過魚には数カ月後に約70%近くの高率で乳頭腫が形成され、本ウイルスの腫瘍原性を確認し得た、となる。

本受託研究の期間は昭和63年4月より、平成3年3月までで、その研究期間中に、上記したように、霞ヶ浦で養殖されていたコイの腫瘍が乳頭腫であることを確認し、腫瘍組織中にCHVの抗原を検出し、さらにウイルス分離にも成功し、霞ヶ浦のコイ乳頭腫がCHV感染によって誘発されたものであることを証明した。

また、本研究では、乳頭腫治療の対策として、飼育水温を上昇させることが極

めて有効であることを明らかにし得た。さらに、CHVの感染環を遮断し、本病の防除に役立てることを目的として、ヨード剤によるCHVの不活化と、その発眼卵に対する安全性について検討し、約6ppmの有効沃素濃度でCHVが完全に不活化され、一方、発眼卵に対しては200ppm、30分間の処理も安全に行えることが明かとなった。したがって、サケ科魚類で広く行われ防除効果を発揮している、発眼卵に対するヨード剤処理をコイ養殖業者に普及させることによって、本腫瘍の防除を期待できるものとする。

次に、稚魚期の大量死に関しては、その病原体が強い感染力を有することを明らかにした。また、本症病原体が3,000rpm、10分間の遠心で沈澱してしまうこと、さらに、450nmのフィルターでろ別されてしまうことも明らかにした。これらの事実は、本病原体がかなり大型であることを示唆し、本研究の中で病魚鰓上皮細胞中に見いだしたボックスウイルス様粒子の本病に対する関与に疑問を抱かせた。

また、ニシキゴイ稚魚期の大量斃死(浮腫症)の病原体として、ボックス様ウイルスが指摘されているが、ニシキゴイ浮腫症では450nmのフィルターを通過させた病魚磨砕ろ液に感染性が証明されており、この点で本研究で扱ったマゴイ大量死の病原体とはことなる可能性がある。

この様に、稚魚期の大量斃死原因病原体については現在に至ってもなお不明の部分が残されたが、1991年度に行った感染実験斃死魚では、腸管に激しい病変が病理組織学的に認められたことから、今後も引続き、病原体の体内濃度分布を、各臓器別に感染実験系を用いて測定することによって、標的組織を特定するとともに病原体の特定、分離・培養を行いたいと考えている。

なお、霞ヶ浦で観察されたマゴイ乳頭腫および稚魚大量死の発生状況を、写真1~4に示す。