

キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症における水温と発病の関係



東京都立田園調布高等学校 相良勇太 新田凜香 前田香織

目的

ヘルペスウイルス性造血器壊死症 (HVHN) における飼育水温と発病の関係についてキンギョを用いて調査し、キンギョ養殖の最適な方法を考察する。

背景

1992年に愛知県と奈良県の養殖キンギョでキンギョヘルペスウイルス (CyHV-2) を原因とするヘルペスウイルス性造血器壊死症 (HVHN) が発生し^[1]、それ以降全国の主要な養殖生産地域に広がった。本病は抗生物質等の薬品の効果がなく、死亡率も80%以上となることから、金魚養殖において非常に深刻な病気である。このキンギョヘルペスウイルスは、温度によって培養細胞における増殖性が変わることが報告されている^[2]。そこで、本実験では水温と発病の関係を調査し、本病の防疫における適切な水温について考察する。

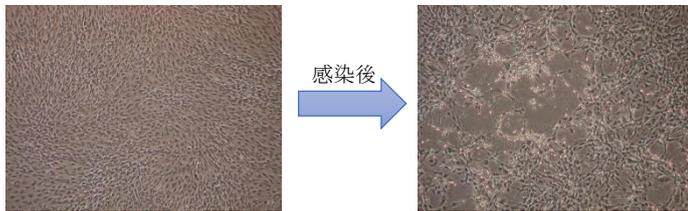


図1. キンギョヘルペスウイルス (CyHV-2) を感染させたキンギョ鱗由来 RyuF-2 細胞。ウイルスによって細胞が変性・壊死するため、細胞層に隙間が見られる。

材料および方法

供試魚

供試魚には東京海洋大学吉田ステーションで飼育されたキンギョ (和金) を用いた。(図2)



図2. 実験に用いたキンギョ

供試ウイルス

東京海洋大学で保管されていたキンギョヘルペスウイルス (CyHV-2) を RyuF-2 細胞で培養したものを用いた。(図3)

材料

- ・水槽 8個
- ・キンギョ 80尾
- ・キンギョヘルペスウイルス (CyHV-2)

感染実験

キンギョにウイルスを感染させ、各水温の死亡率、死亡魚の内臓症状の観察、間接蛍光抗体法によるウイルス検出を行った。

ウイルス接種

水 1L に対して 1mL のキンギョヘルペスウイルス (CyHV-2) を入れ、一時間半浸漬感染させた。

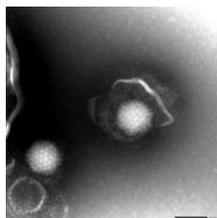


図3. キンギョヘルペスウイルス (CyHV-2) 粒子

飼育条件

実験期間は15日間。水槽のサイズは約30Lであった。陰性対照区と攻撃区をそれぞれ4つずつ用意し、自然水温区、18°C、25°C、32°Cに設定した。(表1) 自然水温区の水槽はヒーターを使用せず、18°C、25°C、32°Cはヒーターを用いて加温し、キンギョは各水槽で10尾ずつ止水飼育した。自然水温区は14°C~18°C (平均15.9°C) であった。フィルター、ヒーターはそれぞれ同じ機種のものを使用し、水温計はヒーターの対角線に設置した。

表1. 観察区と水温

	水槽名	水温 [°C]
陰性対照区	A水槽	14~18
	B水槽	18
	C水槽	25
	D水槽	32
攻撃区	E水槽	14~18
	F水槽	18
	G水槽	25
	H水槽	32

死亡魚のサンプリング

死亡魚は発見次第回収、記録をして可能な限りすぐに解剖を行った。発見日に解剖が出来ない場合は冷蔵庫で保存をし、翌日に解剖を行った。

感染確認

死亡魚の腎臓塗抹標本からウイルス検出を行った。検出はウイルス粒子に対する抗体を用いた間接蛍光抗体法で行った。

結果

死亡率の観察

図4に攻撃区における死亡率を示した。各試験区の死亡率はF水槽で50%、G水槽で80%、H水槽で30%、その他の水槽は0%であった。

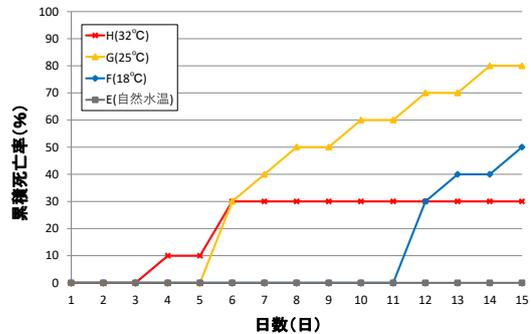


図4. 攻撃区における累積死亡率

死亡魚の感染確認

全ての死亡魚からウイルスが検出され、本病により死亡したものであることが確認された。(図5)

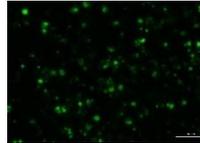


図5. 腎臓塗抹標本の抗 CyHV-2 抗体を用いた間接蛍光抗体法の染色像。抗ウイルス抗体が反応するウイルス増殖細胞が多数観察される。

考察

この実験では F 水槽、G 水槽、H 水槽に CyHV-2 感染による死亡魚を確認することができた。以下3点を考察する。

ウイルスの増殖と水温の関係

最初に死亡したのは4日目、最も水温の高い H 水槽のキンギョであった。その後 G 水槽、F 水槽の順に死亡魚が確認できたが、E 水槽に死亡魚は見られなかった。したがって、培養細胞と同様にキンギョにおいても水温が高いほうがウイルスの増殖が速くなると考えられる。

水温の違いから生まれる免疫力の差

20~25°Cの水温の時、養殖場で最も被害が大きいことが知られ、25°CのG水槽の死亡は長く続き80%となった。一方、32°CのH水槽では7日目以降死亡魚が見られなかった。このことから、4~6日目に見られたH水槽での死亡は、急激なウイルス増殖によるものであり、それ以降は誘起した免疫がウイルスの増殖を抑えたため生き残ったと考えられる。以上より、一定温度を超えると免疫力がウイルスに勝りキンギョが生残できることが示唆された。また、低水温である自然水温区では死亡はなく、ウイルス増殖が少ないことにより、臓器の損傷が軽微であったと推測される。低水温ではキンギョの免疫活性が低く、その後の水温の上昇とともにウイルスが増殖し、死亡が発生することが懸念される^[3]。

キンギョ養殖での成果の活用

水温を33~34°C以上にすることでウイルスの増殖を抑制することが可能となり^[1]、感染魚は免疫を獲得して生存する^[4]。しかし、未感染魚は免疫を獲得していないため水温を下げるとウイルスが増殖し、発病する可能性がある。水温を32°Cに保って飼育することで、ウイルスの増殖と免疫の誘起が併発し、生存する全ての個体に免疫を獲得させることができる。したがって、感染魚を発見した際に速やかに32°Cの水温で飼育することで、ある程度の被害は生じるものの、全ての生存魚が免疫を獲得し、最終的な生存率を増加させることが可能になると考える。

謝辞

本実験は、東京海洋大学海洋生物資源学部門の佐野元彦教授、大学院生の坪井豪亮氏の助言のもとに行われた。ここに深謝の意を表します。

参考文献

- [1] JUNG S. J. and T. MIYAZAKI (1995): Journal of Fish Diseases, 18, p211-220
- [2] T. Shibata and others (2015): Diseases of aquatic organisms, 115, p223-232
- [3] St-Hilaire and others (2005): Diseases of aquatic organisms, 67, p15-23
- [4] 田中深貴男 (2005): 埼玉県農林総合研究センター研究報告, 5, p37-43