

北海道の養殖ギンザケ *Oncorhynchus kisutch* から分離された *Oncorhynchus masou* virus (OMV) の病原性ならびに腫瘍原性

勝又義友^{1,2,*}・水野伸也³・永田 淳⁴・笠井久会⁴

Pathogenicity and tumorigenicity of *Oncorhynchus masou* virus (OMV) isolated from cultured coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in Hokkaido, Japan

Yoshitomo KATSUMATA^{1,2,*}, Shinya MIZUNO³, Jun NAGATA⁴ and Hisae KASAI⁴

Abstract: In 2017, an outbreak of *Oncorhynchus masou* virus disease (OMVD) caused mass mortality of adult coho salmon *Oncorhynchus kisutch* at an aquaculture farm in Hokkaido, Japan. Our aim was to reveal the pathogenicity and tumorigenicity of OMV strain CSHK-002 isolated from coho salmon reared on the farm. Experimental infection revealed that CSHK-002 caused higher cumulative mortality in coho salmon (66% in fry and 24% in fingerling) than in masu salmon *O. masou* (10% in fry). Meanwhile, infection with OMV OO-7812, an oncogenic strain previously isolated from masu salmon, exhibited contrary results: the viral infection did not affect viability in coho salmon but caused a cumulative mortality of 46% in masu salmon. Similar to OMV OO-7812 (78% cumulative mortality), CSHK-002 caused high cumulative mortalities (50%) in chum salmon *O. keta* fry, indicating that CSHK-002 poses a high risk to the chum salmon industry. Experimental infection of coho salmon with CSHK-002 did not induce formation of tumors. Furthermore, tumor formation was not observed in the aquaculture farm between 2017 and 2022. Therefore, unlike OMV strains previously isolated from coho salmon, CSHK-002 is unlikely to be tumorigenic. These findings suggest that CSHK-002 exhibits characteristics that are distinct from those of previous OMV strains.

Key words: *Oncorhynchus kisutch*; *Oncorhynchus masou* virus; Pathogenicity; Tumorigenicity

日本では、北日本における重要な漁業資源であるサケ科魚類 (Salmonidae) のサケ *Oncorhynchus keta*, カラフトマス *O. gorbuscha*, サクラマス *O. masou*, ベニザケ (ヒメマス) *O. nerka* を対象に、資源の維持や増大を目的とした人工ふ化放流が行われている (野川 2010)。サケ科魚類の養殖も盛んに行われ、内水

面では、伝統的に養殖されていた小型のニジマス *O. mykiss* に加え、生食市場への参入を狙った大型商品が生産されるようになっている (佐野 2018)。海面では、既存の養殖対象種であるギンザケ *O. kisutch* のほかに、ニジマスやサクラマス、サツキマス *O. masou ishikawae* の生産量も増加している (小堀 2018)。し

2023年7月29日受付；2023年10月25日受理。

¹ 地方独立行政法人北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場 (Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Eniwa, Hokkaido 061-1433, Japan).

² 北海道大学大学院水産科学院 (Graduate School of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan).

³ 地方独立行政法人北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場道東センター (Doto Research Branch, Salmon and Freshwater Fisheries Research Institute, Hokkaido Research Organization, Nakashibetsu, Hokkaido 086-1164, Japan).

⁴ 北海道大学大学院水産科学研究所 (Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, Hokkaido 041-8611, Japan).

*連絡先 (Corresponding author): Tel, (+81) 123-32-2137; Fax, (+81) 123-34-7233; E-mail, katsumata-yoshitomo@hro.or.jp (Y. Katsumata).

かし、これらの水産増養殖が急速に発展するにつれ、病原体が関与する感染性の疾病が深刻な問題となってきた（岡本 2014）。日本で飼育されるサケ科魚類に大規模な被害を及ぼす疾病として、伝染性造血器壊死症（Infectious hematopoietic necrosis; IHN）、伝染性膵臓壊死症（Infectious pancreatic necrosis; IPN）、赤血球封入体症候群（Erythrocytic inclusion body syndrome; EIBS）、サケ科魚ヘルペスウイルス病（*Oncorhynchus masou virus disease*; OMVD）等のウイルス性疾病が報告されている（Takahashi et al. 1992; 岡本ら 1992; Kumagai et al. 1994; 降幡ら 2003; 西澤・吉水 2016; 佐野・岡本 2017）。

これらのうち、OMVD はサケ科魚ヘルペスウイルス（*Oncorhynchus masou virus*; OMV）を原因ウイルスとする疾病である。OMV はアロヘルペスウイルス科（*Alloherpesviridae*）に属する 2 本鎖 DNA ウィルスであり、直径 200~250 nm のエンベロープと 80~115 nm の正 20 面体カプシッドを有する（Kimura et al. 1981b; 羽曾部・佐野 1989; Hanson et al. 2011）。1972 年および 1974 年に十和田湖で死亡したヒメマス稚魚から OMV が最初に分離され（Sano 1976）、1978 年には北海道でサクラマス遡上親魚の体腔液から分離された（Kimura et al. 1981b）。当初 OMVD はヒメマスやサクラマスで問題になる疾病と考えられていたが、1987 年から 1991 年にかけて宮城県でギンザケ大型魚（100~1,000 g）が OMVD で死亡したことから、甚大な経済損失が発生した（堀内ら 1989; Kumagai et al. 1994; Kumagai et al. 1997）。さらに 1992 年には北海道、2000 年から 2001 年にかけては長野県において、ニジマスで OMVD が発生し、ギンザケの事例と同様に 100 g 以上の大型個体が死亡した（鈴木 1993; 降幡ら 2003）。2000 年から 2003 年には、これまで OMVD の発生報告がなかった広島県で、ヤマメ（サクラマス）の体腔液から OMV が分離され（永井 2004）、OMVD が全国的に蔓延していることが明らかとなった。また OMV が分離された施設では、感染耐過したサクラマスとギンザケにおいて、口部を中心に腫瘍（基底細胞癌）の形成が確認されたことから（Sano et al. 1983; 中居・森川 1988; 吉水ら 1988; 猪狩ら 1991; 熊谷ら 1995; 永井 2004）、見た目が醜悪となり市場価値が損なわれることが危惧された（吉水 2004）。以上のように 1970 年代から 2000 年代前半にかけ、全国的に OMVD の発生が問題となったが、その後は防疫対策が徹底されたこともあり、OMVD の発生は終息した。ところが、2017 年の 2 月と 4 月に、北海道における養殖場（養殖場 A）で飼育されていたギンザケ成魚に OMVD が発生し、その発生が終息していた OMV が再び全国へ蔓延することが危惧された。

これまでの知見から、OMV は分離株により病原性および腫瘍原性が異なることが示唆されている。例えば、1970 年代に分離されたヒメマス由来株（OMV NeVTA 株）とサクラマス由来株（OMV OO-7812 株）は、サケ科魚類全般に病原性を有し、特にサケ、サクラマス、ヒメマスに強い病原性を示した（木村ら 1983; 羽曾部・佐野 1989）。一方、1990 年に分離されたギンザケ由来株（OMV CSH9003 株）は、ギンザケに対する病原性は強いが、サクラマスに対しては弱く、ニジマスにおける死亡個体は認められなかった（熊谷ら 1995）。1992 年に分離されたニジマス由来株（OMV RKV 株）は、ニジマスとサクラマスに強い病原性を示したが、ギンザケに対しては弱い病原性を示した（鈴木 1993）。また、サクラマス由来株に対する病原性は稚魚期に限定されているのに対し（木村ら 1983）、ギンザケ、ニジマス由来株では 100 g 以上の大型魚にも病原性を示した（鈴木 1993; 熊谷ら 1995）。腫瘍原性については、OMV OO-7812 株はサケ、サクラマス、ニジマス、ギンザケに、CSH9003 株はギンザケに対して腫瘍原性を有することが証明されている（Kimura et al. 1981a; Yoshimizu et al. 1987; 熊谷ら 1995）。OMV RKV 株など、ニジマス由来株の腫瘍原性は未だ実験的に検証されていないが、OMVD が発生した生産現場でニジマスに腫瘍が確認された報告はない（鈴木 1993; 降幡ら 2003）。以上のことから、OMV は分離株によって病原性や腫瘍原性が大きく異なり、最初の分離報告からウイルスの性状が変化した可能性が考えられている。このようなウイルスの性状変化は、伝染性造血器壊死症ウイルス（*Infectious hematopoietic necrosis virus*; IHNV）において報告されている。Nishizawa et al. (2006) は、日本で分離される IHNV の遺伝的多様性が米国で分離される株と比較して有意に大きく、日本の養殖環境下で急速に変異が進んだことを報告している。さらに Mochizuki et al. (2009) は、1976 年に北海道のサケから分離された IHNV ChAb 株と 1996 年および 2006 年に長野県と静岡県で分離された 4 株（IHNV RtNag96 株、IHNV RtNag06a 株、IHNV RtShiz06a 株、IHNV RtShiz06s 株）を用いて、ニジマスに対する病原性を検討した。その結果、IHNV ChAb 株と比較して、1996 年以降に分離された 4 株は病原性が増加していること、2006 年に分離された RtShiz06a 株と RtShiz06s 株はより強い病原性を示し、時代とともに病原性が変遷したことを報告している。一方、OMV は最後の分離報告から既に 10 年以上が経過しており、従来分離された株と比較して、病原性や腫瘍原性といった性状が変化している可能性は否定できない。

そこで本研究では、養殖場 A で分離された OMV

と過去に北海道内で分離された OMV (OO-7812株) を用いた感染実験により、ギンザケ、サケ、サクラマスに対する病原性を比較検討し、国内で生産されるサケ科魚類に対する病原性リスクを評価した。加えて、今回分離された OMV を用いた感染実験と、養殖場 A におけるギンザケの OMV 感染率と腫瘍形成率の関係性を調査し、腫瘍原性を評価した。

材料および方法

OMVD が発生した養殖場におけるギンザケ成魚の OMV 保有率と腫瘍形成率の評価

養殖場 A では、自家採卵によるギンザケ生産を基本としており、OMVD が発生した2017年およびその前年について、本州からのギンザケ移入は行っていない。養殖場 A で、2017年から2022年にかけて死亡したギンザケ成魚 (2018年4~7月に回収した16個体は3歳魚、それ以外の死亡魚は2歳魚) とギンザケ雌親魚 (3歳魚) の一部を回収し、本試験に用いた。ギンザケ死亡魚のうち、2017年2月、4月、10月に回収した計14個体 (2月:6個体、4月:6個体、10月:2個体) は、最大2日間冷蔵で保管後、直ちに後述の試験に用いた。2017年の5月から7月と、2018年から2022年の各年4月から7月に回収した計63個体 (2017年:10個体、2018年:16個体、2019年:6個体、2020年:10個体、2021年:10個体、2022年11個体) は、使用まで-20℃で保管した。ギンザケ雌親魚は、毎年11月に60個体ずつ、計360個体分を採取し、以下の試験に用いた。

供試魚の、口部、鰓、鰭、体表を目視で観察し、腫瘍の有無を観察した。さらにギンザケ死亡魚において、外部および体腔内の内部症状を観察し、体表の潰瘍や肝臓への白斑形成といった OMVD の症状 (Kumagai et al. 1994) を確認した。観察後の供試魚について腎臓を採取し、後述する OMV の分離培養を行った。凍結試料は未凍結試料と比較して OMV の分離率が低下することが報告されているため (熊谷ら 1994)、凍結保存した個体は、OMV の分離培養に加え、腎臓を後述する PCR による OMV 特異遺伝子の検出に供した。

雌親魚からは、Yoshimizu et al. (1985) の方法に従い、体腔液を採取した。体腔液を採取した個体について、上述した手法により、外部および体腔内部における OMVD の症状を確認した。体腔液は、後述する OMV の分離培養と同定に供した。

OMV の分離培養

腎臓に9倍量の Hanks' BSS (日水製薬) を加え磨砕後、4,000×g で10分間遠心分離に供した。体腔液

は、1,600 IU/ml ペニシリン G、1,600 µg/ml 硫酸ストレプトマイシン、800 unit/ml ナイスタチン (MP Biomedicals) を含む Hanks' BSS を等量加え、一晚4℃で放置した。上述したように抗生物質と反応させた体腔液を、4,000×g で10分間の遠心分離に供した。遠心後の各上清を48ウェルマイクロプレート (AGC テクノグラス) で培養した RTG-2 細胞に50 µl ずつ接種し、15℃で14日間培養した。CPE が確認できた検体について、培養液を回収し、後述する PCR による OMV 特異遺伝子の検出に供した。

PCR による OMV 特異遺伝子の検出

培養液および腎臓から ISOGENOME (ニッポンジーン) を用いて DNA を抽出した。DNA の抽出方法はキット付属のマニュアルに従った。OMV 特異遺伝子の検出には、PCR の酵素として、EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ) を使用し、プライマーは Aso et al. (2001) に記載された F10 (5'-GTACCGAAACTCCCGAGTC-3') と R05 (5'-AACTTGAAGTACTCCGGGG-3') の2種類を用いた。抽出した DNA 溶液1.0 µl、EmeraldAmp PCR Master Mix (2× Premix) 12.5 µl、プライマー各0.1 µl (終濃度 0.2 µM)、滅菌蒸留水11.3 µl を混合、総量 25 µl とした。PCR の反応条件は、98℃ 10秒 (熱変性)、56℃ 30秒 (アニーリング)、72℃ 30秒 (伸長反応) を1サイクルとし、これを35サイクル繰り返した後、4℃でインキュベートした。続けて1.5%アガロースゲルを用いた電気泳動により、標的配列の増幅を確認した。

感染実験に供試したウイルス

2017年2月に養殖場 A で OMVD を発症した後、死亡したギンザケ2歳魚 (体重:420 g) の腎臓を採取し、前述の方法により OMV を分離・同定した。分離された株を OMV CSHK-002株とし、以降の感染実験に供試した。加えて、1978年に道内のサクラマス遡上親魚の体腔液から分離された OMV OO-7812株 (木村ら 1983) も供試した。各株は、10% (v/v) ウシ胎児血清 (BioWest)、100 IU/ml ペニシリン G (富士フィルム和光純薬)、100 µg/ml 硫酸ストレプトマイシン (富士フィルム和光純薬) を含む Eagle's Minimum Essential Medium (MEM₁₀, Gibco) で培養した RTG-2 細胞 (Wolf and Quimby 1962) に接種した。15℃で培養し、細胞変性効果 (CPE) を確認した後、ウイルスと細胞の混合液を回収した。ウイルス液は4,000×g の遠心分離によって細胞残渣を除去した後、使用するまで-80℃で保存した。ウイルス液の力価は、50% Tissue Culture Infectious Dose (TCID₅₀) 法により測定した。

OMV CSHK-002株および OMV OO-7812株の各種サケ科魚類に対する病原性の比較

感染試験に供試したサケ科魚類のうち、ギンザケ稚魚 (1.6 ± 0.3 g: 平均 \pm 標準偏差, $n = 10$), ギンザケ幼魚 (15.3 ± 3.1 g), サクラマス稚魚 (1.2 ± 0.3 g) は, 北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場 (さけます内水試) で継代飼育していたものを用いた。サケ稚魚 (1.4 ± 0.2 g) は, 北海道内の民間ふ化場から試験研究用に分与された受精卵をさけます内水試でふ化・飼育したものを供試した。供試魚は, 水温 8.5°C の湧水をかけ流した 60 l 水槽で飼育し, 供試魚の総魚体重に対して日間 3% の給餌を行った。

OMV CSHK-002株および OMV OO-7812株の培養液を MEM₁₀ で $10^{3.5}$ TCID₅₀/ml に希釈し, これをギンザケ稚魚, ギンザケ幼魚, サクラマス稚魚ならびにサケ稚魚に $100 \mu\text{l}$ 毎腹腔内に接種した ($10^{2.5}$ TCID₅₀/fish)。対照区の供試魚には, MEM₁₀ を $100 \mu\text{l}$ 腹腔内に接種した。各水槽に稚魚は 50 個体, 幼魚は 25 個体収容し, 60 日間飼育した。飼育魚の生死は毎日観察し, 死亡個体は全て回収した。回収した死亡魚から, 幼魚は腎臓のみを, 稚魚からは消化管を除く臓器全体をそれぞれ摘出し, 以降は前述した OMV の分離培養に従い, OMV の再分離を行った。

OMV CSHK-002株のギンザケに対する病原性および腫瘍原性評価

供試魚として, さけます内水試で継代飼育していたギンザケ稚魚 (2.6 ± 0.4 g: 平均 \pm 標準偏差, $n = 10$) を用いた。ギンザケ稚魚を 60 l 水槽に 50 個体ずつ収容し, 止水状態にした後, 感染力価が $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml となるように OMV CSHK-002株培養液を添加した。対照区には MEM₁₀ を OMV CSHK-002株培養液と同量添加した。培養液添加開始 1 時間後, 流水状態に戻した。その後, 供試魚は 327 日間飼育し,

飼育期間中の死亡個体数を計数するとともに, 死亡個体の口部, 鰓, 鱗, 体表を目視で観察し, 腫瘍形成の有無を確認した。試験終了時には, 全生存個体においても同様に腫瘍の有無を確認した。

結 果

OMVD が発生した養殖場におけるギンザケ成魚の OMV 保有率と腫瘍形成率の評価

ギンザケ成魚死亡個体において, 2017 年に死亡した 24 個体に腫瘍の形成は認められなかった (Table 1)。しかし, 2 月に採取した個体の 83% (5 個体), 4 月に採取した全ての個体においては, 体表の潰瘍と肝臓への白斑形成といった OMVD の症状が認められた。これらの症状を示した全ての個体から OMV が分離された。 2017 年に採取した個体のうち, OMVD の症状が認められなかった 13 個体 (2 月: 1 個体, $5 \sim 7$ 月: 10 個体, 11 月: 2 個体) では OMV が分離されなかった。 2017 年 5 月から 7 月にかけて採取した個体の 10% (1 個体) で OMV 特異遺伝子の増幅が確認された。 2018 年から 2022 年にかけて死亡したギンザケ成魚計 63 個体においては, 腫瘍の形成は認められなかった。これらの個体に OMVD の症状は認められず, 細胞培養で OMV が分離されなかった。しかし, 腎臓より抽出した DNA に対して PCR を行ったところ, 2018 年は 6% (1 個体), 2020 年は 40% (4 個体), 2021 年は 30% (3 個体) の割合で OMV 特異遺伝子の増幅が認められた。 2019 年および 2022 年のギンザケ死亡魚では, OMV 特異遺伝子の増幅は確認されなかった。

採卵用のギンザケ雌親魚においては, いずれの期間も腫瘍の存在は認められず, OMVD の症状は確認されなかった (Table 2)。採集した体腔液は細胞培養に供したが, いずれの検体からも OMV は分離されなかった。

Table 1. Tumor incidence and OMV positive rates of kidney tissue in dead adult coho salmon from the farm where OMVD occurred

Year	Month	No. of fish	Fish age (years old)	Fish with disease signs of OMVD* ¹ /examined fish (Positive rate %)	Fish with tumors /examined fish (Positive rate %)	OMV isolation fish/ examined fish (Positive rate %)	PCR positive fish/ examined fish (Positive rate %)
2017	Feb.	6	2	5/6 (83%)	0/6 (0%)	5/6 (83%)	NT* ²
	Apr.	6	2	6/6 (100%)	0/6 (0%)	6/6 (100%)	NT
	May-Jul.	10	2	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	1/10
	Oct.	2	2	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	NT
2018	Apr.-Jul.	16	3	0/16 (0%)	0/16 (0%)	0/16 (0%)	1/16 (6%)
2019	Apr.-Jul.	6	2	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)	0/6 (0%)
2020	Apr.-Jul.	10	2	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	4/10 (40%)
2021	Apr.-Jul.	10	2	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)
2022	Apr.-Jul.	11	2	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)	0/11 (0%)

*¹Disease signs of OMVD include ulcers on the surface of the body and white spots on the liver.

*²NT: Not tested.

Table 2. Tumor incidence and OMV positive rates of ovarian fluid in mature coho salmon from the farm where OMVD occurred

Year	Month	No. of fish	Fish with disease signs of OMVD* ¹ /examined fish (Positive rate %)	Fish with tumors /examined fish (Positive rate %)	OMV isolation fish/ examined fish (Positive rate %)	PCR positive fish/ examined fish (Positive rate %)
2017	Nov.	60	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	NT* ²
2018	Nov.	60	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	NT
2019	Nov.	60	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	NT
2020	Nov.	60	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	NT
2021	Nov.	60	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	NT
2022	Nov.	60	0/60 (0%)	0/60 (0%)	0/60 (0%)	NT

*¹Disease signs of OMVD include ulcers on the surface of the body and white spots on the liver.

*²NT: Not tested.

OMV CSHK-002株および OMV OO-7812株の各種サケ科魚類に対する病原性の比較

OMV CSHK-002株接種区では、ギンザケ稚魚は、接種12日後から死亡し始め、接種14日後に死亡率が大きく上昇した (Fig. 1A)。その後、死亡率は漸増したが、接種45日以降は死亡が認められなかった。サケ稚魚の死亡率は、接種7日後から上昇し始め、接種52日後まで増加した。サクラマス稚魚の死亡率は接種34日後から上昇したが、飼育期間中、他魚種と比較して低い値を示した。ギンザケ幼魚においては、接種15日後から死亡率の上昇が認められたが、その傾向はギンザケ稚魚の死亡率と比較して、緩やかであり、接種32日以降に死亡個体は認められなかった。OMV OO-7812株接種区においては、サケ稚魚の死亡率は、接種15日後から上昇し始め、接種56日後まで漸増した (Fig. 1B)。サクラマス稚魚においては、接種17日後から死亡率が上昇したが、経時的な死亡率の増加はサケ稚魚のそれと比べて緩やかであった。ギンザケ稚魚と幼魚においては、飼育期間中に死亡は認められなかった。MEM₁₀を投与した対照区では、いずれの魚種においても、試験期間中に死亡は確認されなかった。

各試験区における OMV 再分離率は Table 3 に示した。OMV 各株を接種し死亡個体が認められた群においては OMV が再分離され、再分離率は75%以上の高い値を示した。

OMV CSHK-002株のギンザケに対する病原性および腫瘍原性評価

ギンザケ稚魚に対して OMV CSHK-002株で浸漬攻撃したところ、攻撃30日後から死亡が認められ、攻撃80日後までに50個体中18個体が死亡した。以後、試験魚に死亡は認められず、攻撃327日後の累積死亡率は36% (18個体) を示した。飼育期間中に死亡したギンザケの口部、鰓、鱗、体表における腫瘍の存在は確認されなかった。試験終了時に、生残個体 (32個体) に対して同様の確認を行ったところ、腫瘍の存在は認め

られなかった。対照区においては、飼育期間中に試験魚の死亡は認められず、試験終了時の生残個体 (50個体) に腫瘍の形成は確認されなかった。

考 察

OMV CSHK-002株を接種したサクラマス稚魚においては、試験終了時、その死亡率は10%と低かったが、ギンザケ稚魚・幼魚においては、それぞれ66%、24%と高い死亡率を示した。このことから、OMV CSHK-002株はギンザケに対して高い病原性を示すことが明らかとなった。比較対照として OMV OO-7812株を接種したサクラマス稚魚においては、46%の死亡率を示したが、ギンザケでは稚魚、幼魚問わず死亡が認められなかった。このことから、OMV CSHK-002株は過去にサクラマスから分離された OMV OO-7812株と比較して、両魚種に対する病原性が明確に異なることが明らかとなった。

熊谷ら (1995) は、1990年に海面養殖ギンザケから分離された OMV CSH9003株と1990年以前にヒメマスおよびサクラマスから分離された OMV (OMV NeVTA 株, OMV OO-7812株, OMV YTV 株) について、ギンザケおよびサクラマスに対する病原性を比較している。この実験において、OMV CSH9003株はギンザケ稚魚においては93%の高い死亡率を示したが、サクラマス稚魚では10%の死亡率に留まっていた。一方、OMV NeVTA 株, OMV OO-7812株, OMV YTV 株は、ギンザケ稚魚においては17~30%、サクラマス稚魚では57~97%の死亡率を示し、ギンザケ由来株とヒメマスおよびサクラマス由来株間で、病原性に大きな相違が認められ、OMV の病原性が短期間に変化している可能性を示唆している (熊谷ら 1995)。本研究で得られたギンザケおよびサクラマスに対する病原性の結果は熊谷ら (1995) の結果と類似しており、OMV CSHK-002株の両魚種に対する病原性は、27年以上前に分離された OMV CSH9003株と比較して、大

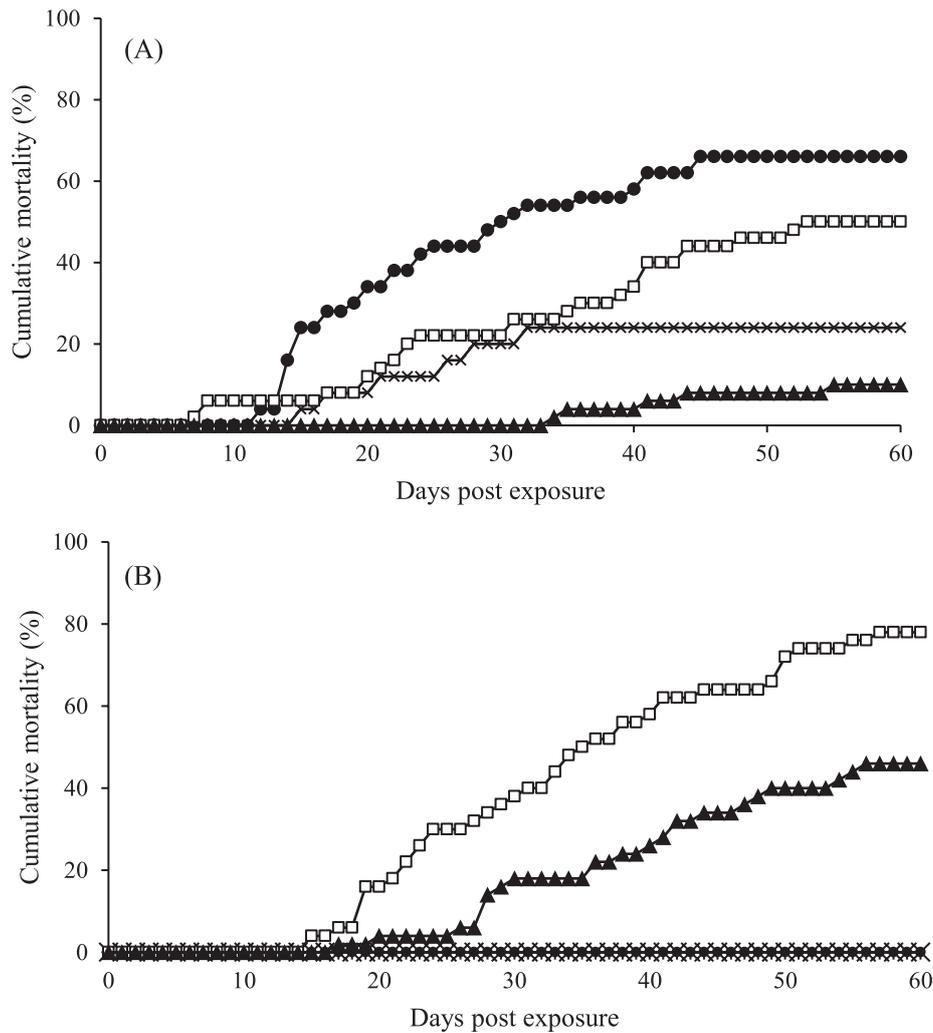


Fig. 1. Daily cumulative mortality of salmonids (\square : chum salmon fry, \blacktriangle : masu salmon fry, \bullet : coho salmon fry, \times : coho salmon fingerling) exposed to *Oncorhynchus masou* virus strains (A: CSHK-002, B: OO-7812). The mortality of solvent control groups remains 0% during experimental period. The number of fish was 50 each for the fry group and 25 each for the fingerling group.

Table 3. Cumulative mortality and OMV isolation rate from dead fish of salmonids exposed to OMV CSHK-002 and OO-7812

Fish	Mean body weight (g, mean \pm SD)	No. of fish/tank	OMV strain					
			CSHK-002		OO-7812		Control	
			Cumulative mortality (%)	OMV isolation rate from dead fish (%)	Cumulative mortality (%)	OMV isolation rate from dead fish (%)	Cumulative mortality (%)	OMV isolation rate from dead fish (%)
Coho salmon	1.6 \pm 0.3	50	66	90	0	NA*	0	NA
Coho salmon	15.3 \pm 3.1	25	24	100	0	NA	0	NA
Chum salmon	1.4 \pm 0.2	50	50	75	78	92	0	NA
Masu salmon	1.2 \pm 0.3	50	10	80	46	97	0	NA

*NA: Not available.

きな変化はないと推察された。これは、OMVの病原性が短期間に変化している可能性を示唆している熊谷ら(1995)の仮説と異なる結果であり、OMVの病原性は長期にわたり保持される可能性が考えられた。

これまでに分離されたOMVのうち、サケに対する

病原性の評価は、1970年代から1980年代かけヒメマスおよびサクラマスから分離されたOMVで検討された事例に限られる(Kimura et al. 1981b; Sano et al. 1983; 木村ら 1983; 羽曾部・佐野 1989)。1978年にサクラマスから分離されたOMV OO-7812株は、ふ化後5ヶ月

齢までのサケに対して、35~98%の高い累積死亡率を示したことから、OMVD はサケ人工ふ化放流事業において脅威となり得るウイルス性疾患であると指摘されている(木村ら 1983)。そこで本研究では、ギンザケおよびサクラマスに加え、サケに対する病原性を検討した。その結果、OMV CSHK-002株および OMV OO-7812株接種区とも死亡率は上昇を続け、接種60日後の累積死亡率は、両接種区とも50%以上の値を示した。

過去に分離された OMV OO-7812株以外の OMV について、Sano et al. (1983) は、OMV YTV 株をサケ稚魚に接種し、接種30日後に15%の累積死亡率を示したことを報告している。さらに羽曾部・佐野(1989) は、OMV NeVTA 株について、サケ稚魚に対する累積死亡率が、接種30日後において10~12%であることを示している。本研究において、OMV CSHK-002株および OMV OO-7812株を接種したサケ稚魚における接種30日後の累積死亡率は、それぞれ22%と38%を示した。これらのことから、OMV CSHK-002株は OMV OO-7812株を含め1970年代から1980年代前半にヒメマスやサクラマスから分離された OMV と同様に、サケに対して致死性を有することが明らかとなった。

OMV の腫瘍原性について、Yoshimizu et al. (1987) は、OMV OO-7812株を用いて、ギンザケに対して感染実験を行い、200日後に口部を中心に腫瘍が形成されたことを報告している。さらに熊谷ら(1995)の実験では、OMV CSH9003株をギンザケに接種し、接種後18ヶ月後に生残していた7個体中1個体、20ヶ月後に残りの6個体中1個体にそれぞれ腫瘍形成が認められている。また OMVD が発生した施設では、ギンザケの生残魚に腫瘍が形成されたことから(堀内ら 1989; 猪狩ら 1991; 熊谷ら 1995)、ギンザケから分離された OMV はいずれも腫瘍原性を有するものと考えられてきた。しかし、本研究でギンザケより分離された OMV CSHK-002株をギンザケに対して浸漬攻撃したところ、いずれの個体においても飼育期間中に腫瘍の形成は認められなかった。このことから、本研究で分離した OMV CSHK-002株は、過去にギンザケから分離された株と異なり腫瘍原性を示さないことが示唆された。養殖場 A においては、OMV 感染ギンザケが多数確認されたが、いずれの個体においても腫瘍の形成は確認できなかった。本研究で観察したギンザケ死亡魚のうち、2018年の4月から7月にかけて回収したギンザケ死亡魚は2017年2月から4月に OMVD を発症した群の生残魚となる。2018年に死亡したギンザケ死亡魚16個体のうち1個体から OMV が検出され、この飼育群は1年以上にわたり、OMV を保有していたことが考えられたが、この群においても腫瘍の形成は確

認できなかった。したがって、養殖場 A で発生した OMVD は、これまでギンザケで報告されてきた事例とは異なり、養殖環境下において腫瘍を形成しないものと考えられた。

従来、養殖ギンザケでは OMVD による腫瘍の形成が認められ、商品価値が低下することが問題となっていたが(堀内ら 1989)、本研究で調査対象とした養殖場 A において、腫瘍を形成した個体は確認されなかったことから、今回の OMVD 発生例では、腫瘍形成に伴う商品価値の低下リスクは低いと考えられた。

このような腫瘍原性の変化がどのようなメカニズムで生じているかは依然として不明である。猪狩ら(1991) は、OMV NeVTA 株、1981年に新潟県のヤマメから分離された OMV YTV 株、1985年に宮城県のギンザケから分離された OMV CSTV 株の3株を用いた DNA 制限酵素解析を行い、株間において切断パターンに多様性が認められると報告している。すなわち、OMV は株ごとに DNA の塩基配列に多様性を持つと考えられており、この塩基配列の差異が病原性や腫瘍原性に関与していると推察される。今後は OMV の全ゲノム配列の決定し、腫瘍原性が未だ報告されていないニジマス由来の OMV を含めて、腫瘍形成に関わる分子機構を解明することで、OMV 株間での腫瘍原性の違いを解明できると考えられる。

以上、本研究により、ギンザケより分離された OMV CSHK-002株は、ギンザケに高い病原性を示し、サケにも病原性を示すことが明らかとなった。また、本株はこれまでギンザケより分離された株と異なり、腫瘍原性を示さないことが明らかとなった。OMV は2003年に広島県でサクラマスから分離された事例を最後に、その後報告例がなかったが(永井 2004)、本研究では2017年以降複数年にわたり OMVD の発生を確認した。このことから、OMVD は未だ根絶できておらず、引き続き発生状況に留意する必要がある疾病であると考えられた。また、養殖場 A ではウイルス性疾患対策として、OMVD 発生以前からポビドンヨードによる卵消毒を実施しており、OMVD の発生以降も、これをギンザケ採卵群全体に徹底している。今後、OMV の全国拡大を防ぐためには、ポビドンヨードによる卵消毒を含め、更なる防疫対策の徹底が重要であると考えられた。

要 約

2017年に北海道の養殖場で飼育されるギンザケ成魚において、サケ科魚ヘルペスウイルス病(OMVD)が発生し、甚大な死亡被害が生じた。死亡したギンザケから分離した OMV CSHK-002株と1978年にサクラ

マスから分離された OMV OO-7812株は、ギンザケおよびサクラマスに対する病原性において明確に異なった。さらに、CSHK-002株はサケに対して50%以上の累積死亡率を示し、サケに対して高い致死性を示すことが明らかとなった。これまでギンザケから分離された OMV は腫瘍原性を有すると考えられていたが、感染実験において OMV CSHK-002株のギンザケに対する腫瘍原性は認められなかった。また当該の養殖場でも2017年から2022年にかけてギンザケの腫瘍形成が認められなかった。以上により、OMV CSHK-002株はこれまで分離された OMV とは異なる特性を有することが示唆された。

謝 辞

本研究の遂行に必要なサケ受精卵を供与いただいた、公益財団法人北海道さけ・ます増殖事業協会の関係各位に深く感謝申し上げます。

参考文献

- Aso, Y., J. Wani, D. A. S. Klenner and M. Yoshimizu (2001) Detection and Identification of *Oncorhynchus masou* virus (OMV) by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Bull. Fish. Sci. Hokkaido Univ.*, **52**, 111-116.
- 降幡 充・細江 昭・武居 薫・小原昌和・中村 淳・本西 晃・吉水 守 (2003) ニジマスにおけるヘルペスウイルス病の発生. *魚病研究*, **38**, 23-25. [Furihata, M., A. Hosoe., K. Takei, M. Kohara, J. Nakamura, A. Motonishi and M. Yoshimizu (2003) Outbreak of salmonid herpesviral disease in cultured rainbow trout. *Fish Pathol.*, **38**, 23-25 (In Japanese with English abstract).]
- Hanson, L., A. Dishon and M. Kotler (2011) Herpesviruses that infect fish. *Viruses*, **3**, 2160-2191.
- 羽曾部正豪・佐野徳夫 (1989) ヒメマスのヘルペスウイルス NeVTA の細胞病理, ウイルス粒子形態および病原性. *日水誌*, **55**, 1197-1201. [Hasobe, M. and T. Sano (1989) Studies on cytopathology, morphology and pathogenicity of a nerka herpesvirus NeVTA. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **55**, 1197-1201 (In Japanese with English abstract).]
- 堀内三津幸・宮澤真紀・中田 実・飯田九州男・西村伸一郎 (1989) 淡水養殖ギンザケのヘルペスウイルス感染例. *水産増殖*, **36**, 297-305. [Horiuchi, M., M. Miyazawa, M. Nakata, K. Iida and S. Nishimura (1989) A case of herpesvirus infection on freshwater-reared coho salmon *Oncorhynchus kisutch* in Japan. *Aquacult. Sci.*, **36**, 297-305 (In Japanese with English abstract).]
- 猪狩忠光・福田穎穂・佐野徳夫 (1991) サケ科魚類ヘルペスウイルス分離株 DNA の制限酵素切断パターンについて. *魚病研究*, **26**, 45-46.
- Kimura, T., M. Yoshimizu and M. Tanaka (1981a) Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*-II. Oncogenic nature. *Fish Pathol.*, **15**, 149-153.
- Kimura, T., M. Yoshimizu, M. Tanaka and H. Sannohe (1981b) Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*-I. Characteristics and pathogenicity. *Fish Pathol.*, **15**, 143-147.
- 木村喬久・吉水 守・田中 真 (1983) サケ科魚類の稚仔魚期における OMV 感受性魚令と魚種間による相違. *魚病研究*, **17**, 251-258. [Kimura, T., M. Yoshimizu and M. Tanaka (1983) Susceptibility of different fry stages of representative salmonid species to *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Fish Pathol.*, **17**, 251-258 (in Japanese with English abstract).]
- 小堀彰彦 (2018) 海面サーモン養殖用種苗供給増産の課題と解決策. *月刊養殖ビジネス*, **55**, 21-25.
- 熊谷 明・福田穎穂・高橋清孝 (1994) ギンザケのヘルペスウイルス病における原因ウイルスの分離法の検討. *魚病研究*, **29**, 205-209. [Kumagai, A., H. Fukuda and K. Takahashi (1994) Optimal conditions for isolation of salmonid herpesvirus type2 from maricultured coho salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 205-209 (in Japanese with English abstract).]
- Kumagai, A., K. Takahashi and H. Fukuda (1994) Epizootics caused by salmonid herpesvirus type 2 infection in maricultured coho salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 127-134.
- 熊谷 明・高橋清孝・福田穎穂 (1995) 海面養殖ギンザケから分離されたヘルペスウイルスの病原性. *魚病研究*, **30**, 215-220. [Kumagai, A., K. Takahashi and H. Fukuda (1995) Pathogenicity of salmonid herpesvirus 2 from maricultured coho salmon to salmonids. *Fish Pathol.*, **30**, 215-220 (in Japanese with English abstract).]
- Kumagai, A., K. Takahashi and H. Fukuda (1997) Infection source of herpesvirus disease in coho salmon culture and its control. *Fish Pathol.*, **32**, 103-108.
- Mochizuki, M., H. J. Kim, H. Kasai, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2009) Virulence change of infectious hematopoietic necrosis virus against rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral molecular evolution. *Fish Pathol.*, **44**, 159-165.
- 永井崇裕 (2004) 広島県の養殖ヤマメからの *Oncorhynchus masou* virus (OMV) の検出. 広島県水産試験場研究報告, **22**, 1-4. [Nagai, T. (2004) Detection of *Oncorhynchus masou* virus (OMV) from masou salmon *Oncorhynchus masou* cultured in Hiroshima Prefecture. *Bull. Hiroshima Fish. Exp. Stn.*, **22**, 1-4 (in Japanese with English abstract).]
- 中居 裕・森川 進 (1988) *Oncorhynchus masou* virus (OMV) に関する研究-I 岐阜県内で飼育中のサクラマス (*Oncorhynchus masou*) より分離された OMV について. 岐阜県水産試験場研究報告, **33**, 45-48. [Nakai, Y. and S. Morikawa (1988) Studies on *Oncorhynchus masou* virus (OMV)-I. Isolation of OMV from cultured masu salmon (*Oncorhynchus masou*) in Gifu prefecture. *Rep. Gifu Prefect. Fish. Exp. Stn.*, **33**, 45-48 (in Japanese).]
- 西澤豊彦・吉水 守 (2016) 伝染性造血器壊死症. *魚病研究*, **52**, 1-5. [Nishizawa, T. and M. Yoshimizu (2016)

- Infectious hematopoietic necrosis. *Fish Pathol.*, **52**, 1-5 (In Japanese with English abstract).]
- Nishizawa, T., S. Kinoshita, W.-S. Kim, S. Higashi and M. Yoshimizu (2006) Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 267-272.
- 野川秀樹 (2010) さけます類の人工ふ化放流に関する技術小史 (序説). 水産技術, **3**, 1-8. [Nogawa, H. (2010) Development of artificial salmon propagation in Japan – a foreword–. *J. Fish. Tech.*, **3**, 1-8 (in Japanese with English abstract).]
- 岡本信明 (2014) 魚類ウイルス病の防除に関する研究. 日水誌, **80**, 658-662. [Okamoto, N. (2014) Studies on control of viral diseases in fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **80**, 658-662 (in Japanese).]
- 岡本信明・高橋清孝・熊谷 明・紫崎弘之・舞田正志・田中 真・J. S. Rohovec・池田彌生 (1992) 本邦淡水養殖ギンザケにおける EIBS の発生. 魚病研究, **27**, 207-212. [Okamoto, N., K. Takahashi, A. Kumagai, H. Shibazaki, M. Maita, M. Tanaka, J. S. Rohovec and Y. Ikeda (1992) Erythrocytic inclusion body syndrome: First report of a natural infection in juvenile coho salmon reared in freshwater in Japan. *Fish Pathol.*, **27**, 207-212 (In Japanese with English abstract).]
- 佐野雅昭 (2018) 種別・形態別サケ類商材の特徴と「ジャパンサーモン」創出に向けた課題. 月刊養殖ビジネス, **55**, 8-13.
- 佐野元彦・岡本信明 (2017) 伝染性膵臓壊死症. 魚病研究, **52**, 177-180. [Sano, M. and N. Okamoto (2017) Infectious pancreatic necrosis. *Fish Pathol.*, **52**, 177-180 (In Japanese with English abstract).]
- Sano, T. (1976) Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **10**, 221-226.
- Sano, T., H. Fukuda, N. Okamoto and F. Kaneko (1983) Yamame tumor virus: Lethality and oncogenicity. *Bull. Japanese Soc. Sci. Fish.*, **49**, 1159-1163.
- 鈴木邦夫 (1993) ニジマスの新しいウイルス病. 試験研究は今, **165**, 1-2.
- Takahashi, K., N. Okamoto, A. Kumagai, M. Maita, Y. Ikeda and J. S. Rohovec (1992) Epizootics of erythrocytic inclusion body syndrome in coho salmon cultured in seawater in Japan. *J. Aquat. Anim. Health*, **4**, 174-181.
- Wolf, K. and M. C. Quimby (1962) Established eurythermic line of fish cells in vitro. *Science*, **135**, 1065-1066.
- 吉水 守 (2004) サケ科魚類のヘルペスウイルス病. 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 48-53.
- Yoshimizu, M., T. Kimura and J. R. Winton (1985) An improved technique for collecting reproductive fluid samples from salmonid fishes. *Prog. Fish-Cult.*, **47**, 199-200.
- 吉水 守・野村哲一・粟倉輝彦・木村喬久 (1988) 北日本におけるサケ科魚類採卵親魚の魚類病原ウイルス保有状況について-昭和51年~昭和61年-. 北海道さけ・ますふ化場研究報告, **42**, 1-20. [Yoshimizu, M., T. Nomura, T. Awakura and T. Kimura (1988) Incidence of fish pathogenic viruses among anadromous salmonid in northern part of Japan (1976-1986). *Sci. Rep. Hokkaido Salmon Hatchery*, **42**, 1-20 (in Japanese with English abstract).]
- Yoshimizu, M., M. Tanaka and T. Kimura (1987) *Oncorhynchus masou* virus (OMV): Incidence of tumor development among experimentally infected representative salmonid species. *Fish Pathol.*, **22**, 7-10.