

フナ属稚仔魚に対するヘルペスウイルス造血器壊死症ウイルスの影響

湯口真実・SAITO Hiroaki・南俊伍・佐野元彦

(2024 年 12 月 27 日受付, 2025 年 1 月 17 日受理)

Effect to juvenile *Carassius* species with goldfish hematopoietic necrosis virus (CyHV-2)

YUGUCHI Manami^{*1}, SAITO Hiroaki^{*2}, MINAMI Shungo^{*3}, and SANO Motohiko^{*2}

キーワード: GFHNV, ニゴロブナ, ゲンゴロウブナ, 稚仔魚

キンギョヘルペスウイルス性造血器壊死症（以下、GFHN）は非常に死亡率が高く、100%に達することもある疾病である。キンギョ養殖において1990年頃から、不明病によるへい死が発生し、Jung and Miyazaki¹⁾により、1992、1993年に愛知県と奈良県で発生した事例からこの原因がウイルス（以下、GFHNV）であることが明らかとなった。その後、現在に至るまで本疾病は生産、流通、小売り段階のキンギョに蔓延しており、経済的に大きな影響を及ぼしている。

Saito *et al.*²⁾はGFHNVを予防する手段として弱毒生ワクチンを開発した。このワクチンは接種方法が浸漬法であることから、注射による接種を行う従来の不活化ワクチンと比べ、接種にかかる労働コストが飛躍的に軽減される。また、有効率も80%以上と非常に予防効果が高い。しかし、現在、国内において認可された水産用生ワクチンはまだない。³⁾不活化ワクチンと異なり、生ワクチンは活性のある弱毒化したウイルス株を接種するため、自然環境へ漏出した場合の影響評価等クリアすべき課題がある。

これまでにGFHNVはキンギョのほか、ギベリオブナ等に感染することが分かっている。⁴⁾一方、ギンブナ、ナガブナ、ニゴロブナではほとんど感受性がないとされている。⁵⁾ただし、稚仔魚期におけるGFHNVの影響についてはいまだ報告がない。そこで、本研究では孵化直後か

ら5カ月後までのゲンゴロウブナ *Carassius cuvieri* 及びニゴロブナ *Carassius auratus grandoculis* に対するGFHNV及びワクチン株の病害性の影響について検討した。

供試魚には2023年5月15日に採卵したニゴロブナ、6月1日に採卵したゲンゴロウブナ及び対照区として6月3、4日及び6月21日に採卵したGFHNV感受性系統のリュウキン *Carassius auratus* を使用した。供試魚は孵化から1カ月後まではブラインシュリンプを飽食給餌し、孵化後1週間から徐々に配合飼料も併せて給餌し、1カ月以降は配合飼料に切り替えて給餌率1%で給餌した。給餌は試験中も継続した。孵化後1カ月までは容積50Lのコンテナでろ過井水を使用し、1カ月以降は容積500Lのコンテナで井水を使用して飼育した。供試魚は試験までは自然水温で飼育し、試験時には空調で室温を25℃に設定した室内に水槽を設置した。試験中は孵化直後から2カ月後までは3L、3カ月後は15Lの水槽に供試魚を収容し、水温連続記録計（株式会社ティアンドデイ社TR-52i）で水温を記録した。このキンギョは愛知県水産試験場動物実験規程に基づいて試験に供した。

試験は孵化直後、1、2、3及び5カ月後に実施した。供試魚はワクチン接種を行う前に全長(TL)を測定した。供試魚は、20尾ずつとした。ただし、リュウキンについては十分な尾数を確保できなかったことから、孵化直後は15尾ずつ、1カ月後以降は20尾ずつとし、2カ月後

^{*1} 愛知県水産試験場 内水面漁業研究所 弥富指導所 (Yatomi Station, Freshwater Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Yatomi, Aichi 498-0017, Japan)

^{*2} 東京海洋大学 大学院海洋科学技術研究科 (Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108-8477, Japan)

^{*3} 埼玉県水産研究所 (Saitama Fisheries Research Institute, Kazo, Saitama 347-0011, Japan)

表 接種株ごとの供試魚の種名，平均全長，尾数

種名	時期	P7-P8株		Aichi2010株
		平均全長(mm)	供試魚尾数	供試魚尾数
<i>Carassius cuvieri</i>	孵化直後	6.6±0.5	20	20
	1カ月後	12.3±1.2	20	20
	2カ月後	17.6±2.4	20	20
	3カ月後	27.5±3.6	20	20
	5カ月後	61.3±5.0	20	20
<i>Carassius auratus grandoculis</i>	孵化直後	7.5±0.2	20	20
	1カ月後	14.1±1.7	20	20
	2カ月後	16.0±1.6	20	20
	3カ月後	28.0±4.1	20	20
	5カ月後	58.7±10.9	20	20
<i>Carassius auratus</i>	孵化直後	7.5±0.5	15	15
	1カ月後	21.5±2.5	20	20
	2カ月後	31.8±6.6	20	-
	3カ月後	52.4±8.7	20	-

降の病原性株による対照区を設定しなかった。また，期間を通して陰性対照区を設けなかった。(表)

攻撃には弱毒生ワクチン P7-P8 株²⁾ (感染価 107.2 TCID₅₀/mL) 及び病原性 Aichi2010 株 (感染価 102.8 TCID₅₀/mL)⁶⁾ を用いた。供試魚の攻撃は孵化直後から2カ月後までは，飼育水で1,000倍に希釈したワクチン株あるいは病原性株に2時間浸漬して行い，この間，通気を行った。3カ月後については，供試魚のサイズが十分大きくなったことから，シャワー投与法⁶⁾により攻撃を行った。攻撃から21日経過して生き残った個体数を供試魚数で除して生残率を求めた。死亡した個体については，腎臓塗抹標本の特異的抗体 3D3 を用いた間接蛍光抗体法あるいは Waltzek *et al.* のプライマーを用いた PCR 法⁷⁾により GFHN の発症を確認した。

χ^2 独立性の検定により，同種間，同接種株における試験時期ごとの生残率，Fisher の正確確率検定により，同種間，同時期で異なる接種株の生残率あるいは同時期，同接種株で異なる種の生残率に差があるか調べた。

表に試験前に計測した供試魚の平均全長を示した。また，攻撃から21日後の生残率の推移を図に示した。P7-P8 株を接種したゲンゴロウブナの生残率は孵化直後，1，2，3及び5カ月後で85.0，100.0，85.0，95.0，100.0 %，ニゴロブナの生残率は95.0，100.0，80.0，100.0，100.0 %であった。リュウキンの生残率は孵化直後，1，2及び3カ月後で66.7，90.0，85.0，95.0 %であった。一方，Aichi2010 株を接種したゲンゴロウブナの生残率は孵化直後，1，2，3及び5カ月後で100.0，60.0，90.0，100.0，100.0 %，ニゴロブナの生残率は90.0，75.0，75.0，85.0，95.0 %であった。リュウキンの生残率は孵化直後及び1カ月後で0.0，0.0 %であった。

χ^2 独立性の検定により，同じ株を接種した同種内で試験時期による差を調べた結果，P7-P8 株のニゴロブナ ($P<0.05$) と Aichi2010 株のゲンゴロウブナ ($P<0.001$)

で有意な差が認められた。(図) この結果からニゴロブナでは P7-P8 株，ゲンゴロウブナでは Aichi2010 株に暴露した時期によって生残率に差が生じると考えられた。P7-P8 株では2種のフナ属で2カ月後に生残率が低下していた。Aichi2010 株では1から2カ月後に生残率が低下していた。

Fisher の正確確率検定により，同種間で同時期に P7-P8 株と Aichi2010 株の2つの生残率の間で差があるか調べた結果，ゲンゴロウブナの1カ月後 ($P<0.01$)，リュウキンの孵化直後及び1カ月後 (ともに $P<0.001$) で有意な差が認められた。(図) この結果から Aichi2010 株は P7-P8 株と比べてより病害性があると考えられた。さらに，同じ時期に同じ株を接種した異なる種間で生残率に差があるか調べた結果，リュウキンの孵化直後及び1カ月後はフナ属2種よりも有意に生残率が低かった ($P<0.001$)。(図) この結果からリュウキンはフナ属2種よりも Aichi2010 株に対する感受性が高いと考えられた。一方で P7-P8 株ではそれぞれの感受性に差は認められなかった。(図)

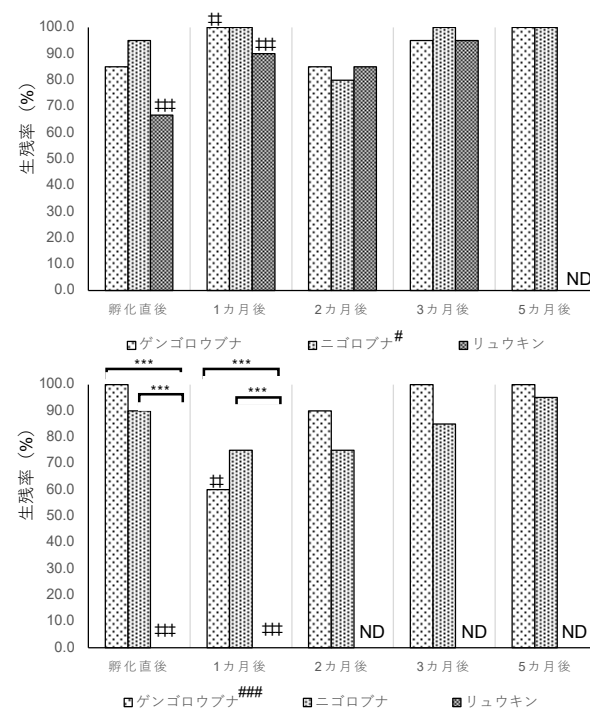


図 上段：P7-P8 株区，下段：Aichi2010 株区の生残率の推移

*：種間で有意差あり (** $P<0.01$)

‡：株間で有意差あり (‡‡ $P<0.01$ ，‡‡‡ $P<0.001$)

#：孵化直後から5カ月後までの期間間で有意差あり (# $P<0.05$ ，### $P<0.001$)

ND：データなし

孵化直後から稚魚期のゲンゴロウブナ、ニゴロブナ、リュウキンに P7-P8 株を接種した場合、いずれもわずかに死亡が見られ、孵化から 2 カ月後で生残率がやや低かった。この結果から、P7-P8 株のフナ属 2 種及びリュウキンに対する病害性は限定的であるが、特定の時期に感受性が高くなる可能性が示唆された。わずかとはいえ、仔魚から稚魚期に死亡が認められたことから、ワクチンを接種する場合には環境への漏出がないようにするか、あるいはこの感受性のある稚仔魚がいない時期に接種を行うのが妥当であると考えられた。一方で、陽性対照区として病原性のある Aichi2010 株を接種した試験区では、フナ属 2 種でも死亡が見られた。フナ属 2 種は孵化から 1 カ月後の生残率がゲンゴロウブナで 60 %、ニゴロブナで 75 % と試験時期の中で最も低くなり、成長とともに生残率は高くなった。Ito・Maeno (2014) はフナ属の 3 種において GFHNV に対する感受性がほとんどないと報告している。⁵⁾ しかし、本研究では稚仔魚期のゲンゴロウブナ及びニゴロブナを対象に試験を行ったところ、病原性のある株及び弱毒化した生ワクチン株を接種した場合には月齢の早い時期にへい死が見られた。このことから、このフナ属 2 種は仔魚から稚魚の時期には GFHNV に対してわずかに感受性がある可能性が高いと考えられた。

本研究では、生残率が低下した孵化直後から 1 カ月後の間に試験を行っていない。今後、この間の GFHNV に対する感受性について検討し、影響評価の基礎的知見をさらに収集する必要がある。

謝 辞

本研究では滋賀県水産試験場にニゴロブナの受精卵を提供していただいた。また、本研究は国立研究開発法人

科学技術振興機構 (JST) の A-STEP (グラント番号 JPMJTR20U5) の一部として実施された。ここに記して感謝の意を表する。

文 献

- 1) Jung S J・Miyazaki T (1995) Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). Journal of Fish Diseases, 18, 211-220
- 2) Saito H・Okamura T・Shibata T・Kato G・Sano M (2022) Development of a live attenuated vaccine candidate against herpesviral hematopoietic necrosis of goldfish. Aquaculture, 552
- 3) 水産用医薬品について第 36 報 (2023) 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課, 東京. 2023
- 4) Raja S W・Sundar R N・Arthi D・Raj K・Pravata K P・Sumithra T G・Neeraj S (2020) Cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2): a comprehensive review. Reviews in Aquaculture, 1-26
- 5) Ito T・Maeno Y (2014) Susceptibility of Japanese Cyprininae fish species to cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2). Veterinary Microbiology, 169, 128-134
- 6) Saito H・Minami S・Yuguchi M・Shitara A・Kondo H・Kato G・Sano M (2024) Efficient showering vaccination with a live attenuated vaccine against herpesviral hematopoietic necrosis in goldfish. Aquaculture, 578, 740140
- 7) Waltzek T B・Kurobe T・Goodwin A E・Hedrick R P (2009) Development of a Polymerase Chain Reaction Assay to Detect Cyprinid Herpesvirus 2 in Goldfish. Journal of Aquatic Animal Health, 21, 60-67