

(平成2年北海道大学審査学位論文)

長野県におけるサケ科魚類の伝染性すい臓壊死症 (IPN) の防除対策に関する研究

山崎 隆義

目 次

緒 言

第1章 伝染性すい臓壊死症 (IPN) の研究の歴史

- 1 IPNの概要
- 2 IPNウイルスの伝播と発病要因に関する研究
- 3 IPNの防除に関する研究
- 4 今後の研究課題

第2章 わが国におけるIPNの発生経過

- 第1節 わが国におけるIPNの年次別発生経過の解析
 - 第2節 長野県におけるIPNの年次別発生経過の解析
- 小 括

第3章 長野県におけるIPNの発生状況と環境要因との関連

- 第1節 飼育水温とIPNの発症発現の関連について
 - 第2節 ニジマスのIPN発生事例の伝播経路の解析
 - 第3節 ニジマス以外のサケ科魚類のIPN発生事例の調査
- 実験1 アマゴのIPNの発生事例
実験2 その他のサケ科魚類のIPNの発生事例
- 第4節 長野県内で分離されたIPNウイルスの血清型
- 小 括

第4章 IPNの伝播に関する検討

- 第1節 ニジマスのIPNウイルス保有状況
- 実験1 ニジマス稚魚期におけるIPN発病から終息までのIPNウイルス保有状況の変化
実験2 1年魚及び親魚のIPNウイルス保有状況
実験3 IPNの発病未経験の養魚場における飼育魚のIPNウイルス保有状況
- 第2節 IPNウイルスの水平感染についての検討
- 実験1 IPN病死魚の経口感染による感染
実験2 IPNウイルス懸濁液への浸漬による感染
- 小 括

第5章 IPN防除技術に関する検討

- 第1節 マス類の飼育環境下におけるIPNウイルスの生存性
- 実験1 飼育用水中での生存性
実験2 乾燥の影響
実験3 紫外線(殺菌灯)の影響
実験4 加熱の影響
実験5 懸濁液pHの影響
- 第2節 各種消毒剤によるIPNウイルスの不活化効果
 - 第3節 ヨード剤の発眼卵消毒への応用の可能性
 - 第4節 病死魚の廃棄方法の検討
- 実験1 煮沸消毒
実験2 薬物消毒
- 第5節 IPNを防除するための隔離飼育施設について
- 1 施設の概要
 - 2 飼育成績と疾病の発生状況

小 括

総 括

謝 辞

引用文献

緒 言

200 海里体制の定着等、漁業をとりまく世界的な情勢の変化によって、わが国は沿岸域の利用を積極的に開発することが必要となり、人為的に生産された種苗を放流し、天然の生産力を利用して漁獲サイズまで成長した魚介類を収穫する新しい漁業形態として、「つくり育てる漁業」が水産施策として推進される一方、沿岸漁業の中核として水産養殖業が積極的に推進されている。1988 年の水産養殖業生産のうち、魚類養殖は 33 万 9 千ト、3,333 億円余の生産があり、海面養殖ではブリ、タイ類等が、内水面養殖ではウナギ、コイ、マス類、アユ等が主な対象魚種であるが、この主要 6 魚種で生産額の 86.0%、2,867 億円余を占めていた（農林水産省統計情報部, 1989）。なおマス類は、内水面で養殖生産されるサケ科魚類の意であり、マス類にはニジマス及びその他のマス類が含まれている。また近年は高級品を志向する傾向が強く、海面及び内水面養殖ともに養殖対象魚種が、多様化の方向にある。

内水面の魚類養殖における 1988 年の生産量は 97,052 ト、生産額は 994 億円余と海面の魚類養殖に比較すると生産量では 40.1%、生産額では 42.5%であるが、地域の特産品として産業上重要な位置を占めている。内水面養殖の生産量と金額を魚種別にみると、ウナギは 39,558 ト、584 億 27 百万円、コイは 18,130 ト、80 億円、アユは 13,633 ト、167 億 50 百万円及びマス類は 19,132 ト、102 億 74 百万円で、そのうちニジマスが 15,314 ト、その他のマス類すなわち、在来マス類と称されるヤマメ、アマゴ、イワナが 3,818 トであった。また、マス類の主要な生産地は長野県、静岡県、岐阜県、山梨県及び栃木県であるが、近年は規模の大小はあるものの、全国各地で生産されている。

1. 長野県におけるニジマス養殖の経過

長野県のマス類養殖の主体であるニジマスは、1930 年頃から生産がはじめられ、当初は 10 ト程度に過ぎなかったが、1950 年代前半から米国向け冷凍ニジマスの輸出の開始とともに、生産が増強され輸出産業としても成長した。さらに 1960 年代は、わが国の高度経済成長に伴う水産物の需要の多様化、高度化等の社会的背景が内水面養殖業に影響を与え、養殖技術の著しい向上もあってニジマス養殖の発展期となった。

ニジマス養殖は、産業としては海面養殖と比較して小規模ではあるが、養殖の歴史が長いこと、飼育技術、飼料及び魚病等に関する研究が早くから行われてきたこと

もあって、技術開発研究の成果がその他の内水面養殖業をはじめ海面養殖業に与えた影響は大きかった。ニジマス養殖技術の改良経過についてみると、1950 年代後半には、当時の急速な生産量増加に伴う種苗不足が表面化した。採卵時の等調液の使用による卵洗浄法の実用化、光処理による産卵時期の人為的調節技術の開発、発眼卵の輸送容器の改良などによる種苗生産技術の向上等によって多くの問題点が解決され、ニジマス養殖業は順調に発展した。次いで 1960 年代前半に行われた配合飼料の開発は、その後のニジマス養殖の状況を大きく変えている。当時のニジマス養殖用飼料は、養蚕サナギ、冷凍海産魚及び小麦粉などの原料を、それぞれの養魚場が自家製造した飼料が用いられていたことから、飼料の変質や栄養的欠陥を原因とした疾病による被害が多かったが、1965 年頃からは栄養的に完備した配合飼料が市販されたことにより、栄養性疾病は大幅に減少した。このため長野県のマス類生産は、1950 年 13 ト、1960 年 608 ト、1970 年 2,432 ト、さらに 1980 年には 4,605 トと急速な伸展を示した。

2. 長野県におけるマス類養殖の現況

長野県のマス類養殖地域は、県中央部の明科町、穂高町、豊科町が豊富な湧水を用いたニジマスの主要生産地で県生産量の約 60%を占めている。次いで県東部の佐久市、臼田町が河川水を利用した第二のニジマスの生産地で約 15%を生産している。その他のマス類では、釣り人口の増加や高級魚嗜好の傾向から在来マス類のヤマメ、アマゴ、イワナへの需要が高まり、1960 年代後半から養殖技術研究が進められ、年々生産が増加して 1988 年には約 450 トの生産があった。これらの魚種は山村振興や水田転作などの施策とともに、在来マス類の養殖に適した用水が容易に得られる飼育適地として主に山間地域で飼育され、地域の特産品として流通している。近年における、長野県のマス類の養殖経営体数は 170~185 ヲ所、養殖場数は 224~285 ヲ所で推移している。さらに、長野県のマス類生産の特徴は種苗の生産量が多いことで、マス類の発眼卵は年間 1 億 4 千万粒販売され、全国の流通量の約 40%を占めている。また稚魚は 3 千万尾で同じく約 20%を占める等、長野県のマス類の種苗生産の動向が全国のマス類の生産に及ぼす影響は極めて大きい。

しかしながらこのように、順調に発展した長野県のマス類養殖が、1970 年代以降は生産量の伸びが鈍化し、1978 年の 4,697 トを最高に停滞している。その理由としては、魚価の低迷や、生産コストの上昇、新たな飼育用水の確保が困難であることや、魚病の多発等による養殖

経営の悪化等があげられるが、中でも特に魚病による被害が大きく生産額の6～8%に及んでいる。また治療用に使用する医薬品の魚体内残留が、食品衛生上の問題として取り上げられたこと等もあって魚病の問題は、養殖業全般の最重要課題である。マス類の主要な疾病には、細菌性のピブリオ病並びにウイルス性の伝染性すい臓壊死症（IPN）及び伝染性造血器壊死症（IHN）などで、いずれもそれによる被害が大きい。わが国の養殖業にとって魚類のウイルス性疾病の激しい流行は、1960年頃から発生したIPNが最初の経験で、伝染病に対する防疫体制がなかったことから、IPNはあたかも遼原の火の如く短期間に広域に伝播した。IPNによる直接の被害額は1億円程度と推定されるが、稚魚のへい死による種苗不足がもたらしたニジマス養殖経営上の被害は図り知れない大きさであった。

3. ニジマスの魚病研究組織

その後、IPNがマス類養殖業に与えたこのような重大な被害が契機となって、わが国における魚類のウイルス性疾病の研究が多くの研究者によって進められ、マス類養殖の現場においても飼育管理者が防除、防疫対策の必要性を認識しはじめ、さらにはIPNをはじめIHN及び細菌性腎臓病（BKD）が国外から侵入したと推測されることから、未侵入魚病のわが国への侵入の阻止をも含めて、魚類防疫についての認識が高まり防疫の重要性が論議されるようになった。

長野県をはじめマス類養殖に関する水産試験場は、IPNの全国的な蔓延と被害の拡大に対して、1965年に全国湖沼河川養殖研究会の養鱒部会に魚病分科会を設けてその対応を検討した。魚病分科会は診断技術統一のために魚病診断カードを作成し、発眼卵の消毒方法などのIPN対策連絡試験を実施し、さらに1970年からはマス類の疾病の実態調査を行っている。

一方、国においても1966年に水産庁が、指定調査研究総合助成事業に魚病対策をとり上げ、その後は魚病対策技術開発事業、さらには主要魚病防疫対策事業等にと事業名は変わったが、マス類の疾病対策研究が継続して行われている。

IPNの研究は、Wolf *et al.* (1960)が病原ウイルスを確認して以来、他の魚類ウイルスとは比較にならぬほど

多くの研究がなされ、その内容も宿主範囲からウイルスの性状に関するもの、さらに近年はウイルス粒子の分子生物学的性状についてまで多岐に及んでいるが、少なからずウイルス学的分野に偏重している。従って、疫学的研究並びに防除、防疫に関する研究は養殖業の振興のためには重要であるにもかかわらず、組織的な研究がなく、IPNの効果的な防除技術は今日に至るも完全に確立されたとはいえない状況にある。

本研究はニジマス等のサケ科魚類の種苗生産の安定化を目標として、養殖現場で実用化できるIPN防除技術の開発を主眼に置いたことから、IPNを病原体であるウイルスの側からとらえるだけでなく、その流行に関わる諸現象について検討し、また養魚場あるいは地域を一つの単位として、そこで養殖されるサケ科魚類を対象として疫学的検討を行ったものである。

本論文では以上の観点から、長野県におけるサケ科魚類のIPN防除対策の確立を意図して主に1970年から行ってきたIPNの流行調査及び野外調査並びに応用実験の成果をとりまとめた。第1章においてはIPN研究の歴史を概説し、第2章では、わが国におけるIPN発生状況調査に基づく全国及び長野県のIPNの年次別発生経過を概説し、IPN流行の動態を考察した。次に第3章においては、長野県でのIPN発生例をもとに疫学的な検討を行い、症状発現と飼育水温との関係で示し、さらに症状を3タイプに類別した。また県内のIPNの伝染源と、伝染経路の解析を行った。さらに、アマゴにおける発病と、その他のサケ科魚類のIPNウイルスの感染状況を調べ、IPNの宿主要因を検討した。第4章においてはIPNウイルスの魚群内での動態を、魚の成長段階を通じて明らかにし、また経口感染が重要な感染経路であることを感染実験で検証してIPN伝播の主要因を検討した。最後に第5章では、以上の知見を踏まえて、IPNウイルスの飼育環境下における特性を明らかにして、防除の手がかりを検討するとともに、各種消毒薬のIPNウイルス不活性化効果を検討した。次いで消毒効果の認められたヨード剤の卵消毒への応用、病死魚の廃棄方法等養魚場で実用できる具体的な防除技術、さらには一連の研究成果をもとにして建設したIPNをはじめとした魚類伝染病を防除するための隔離飼育施設の有効性についても検討した。

第1章 伝染性すい臓病壊死症(I P N)の研究の歴史

1. I P Nの概要

古くから北アメリカの養魚場で、餌付け後間もないマス類の幼稚魚にへい死率の高い腸炎が知られており、この疾病は細菌などの病原体が検出されないことから原因不明とされていたが、腸管内に原虫類の *Hexamita* (当時は *Octomitas*) の寄生が認められたこともあって、*Hexamita* が原因の1つとも考えられた時代があった。

M' Gonigle(1941)は、カナダのMartine地方のカワマス *Salvelinus fontinalis* 稚魚が旋回狂奔の異常な泳ぎと、その後の急激なへい死を伴う特徴的な症状が原虫類の寄生の有無に関係なく見られたことから、原因として栄養的或いは飼育管理技術上の欠陥を疑い、急性カタル性腸炎 (acute catarrhal enteritis) と名付けた。

その後、Wood et al. (1955)が、アメリカ東海岸のカワマスふ化場で発生した疾病に関する研究において、それが感染試験によって伝染性があり、病理組織学的研究の結果から膵臓に著しい壊死のみられることを明らかにし“*Infectious pancreatic necrosis; I P N*”と名付けた。また病理組織像が mice のコクサッキー症に類似することから、コクサッキー群ウイルス(Coxsackie group virus)によるウイルス性疾病の可能性を示唆した。さらに彼らは臨床症状から M' Gonigle(1941)が急性カタル性腸炎として報告した疾病も I P Nであると述べている。

Wolf et al. (1960)は、アメリカ東部魚病研究所で魚類の組織培養の研究を行い、カワマス及びニジマス *Salmo*

gairdneri の尾鰭由来の培養細胞を用いてウイルスを分離し、分離ウイルスによるカワマス稚魚への感染試験に成功したことから、I P Nはウイルス性疾病であることが確認された。その後、Wolf and Quimby(1962)はニジマスの生殖腺の繊維芽細胞由来の RTG-2 細胞を樹立し、RTG-2 細胞が I P Nウイルスに感受性を有することを明らかにした。これによってその後の I P N研究は、飛躍的に進展した。

I P Nの地理的分布

I P Nは、当初アメリカ東海岸(Wood et al., 1955)ではカワマスの疾病とみられていたが、その後西部地方(Parisot et al., 1963)及びカナダ(MacKelvie and Artsob, 1969)にも発生し、北アメリカ全域での分布が認められた。現在ヨーロッパではフランス(Besse and de Kinkelin, 1965)、デンマーク(Jorgensen and Bregnballe, 1969)、イタリア(Ghittino, 1972)、イギリス(Ball et al., 1971; Hill, 1982)、スウェーデン(Ljungberg and Jorgensen, 1972)、西ドイツ(Schlotfeldt et al., 1975)、ユーゴスラビア(Fijan, 1974)及びノルウエー(Hastein and Krogsrud, 1976)にも広く分布することが知られている(表-1)。

日本では、1960年代に「不明病」と名づけられた疾病がニジマス稚魚に流行し被害が大きかったが、Sano(1971a)が I P Nであることを明らかにし、日本各地に分布していることを報告した(Sano, 1972a)。

表-1 I P Nの発病が確認されている国

北アメリカ	
アメリカ	Wood et al. (1955)、Parisot et al. (1963)
カナダ	MacKelvie and Artsob(1969)
ヨーロッパ	
フランス	Besse and de Kinkelin(1965)
デンマーク	Jorgensen and Bregnballe(1969)
イギリス	Ball et al., 1971; Hill(1982)
イタリア	Ghittino(1972)
スウェーデン	Ljungberg and Jorgensen(1972)
ユーゴスラビア	Fijan(1974)
西ドイツ	Schlotfeldt et al. (1975)
ノルウエー	Hastein and Krogsrud(1976)
アジア	
日本	Sano(1971a)

なお I P N の発病例はないが、台湾 (Hedrick *et al.*, 1983)、韓国 (Hah *et al.*, 1984)、チリ (McAllister and Reyes, 1984) 及び南アフリカ (Bragg and Combrink, 1987) のニジマスからも I P N ウイルスが分離されており、各報告ともニジマス発眼卵の移入にともなって侵入した可能性を示唆している。また、これらの報告でニジマスからも I P N ウイルスが分離されたことを考えるならば I P N の発生は十分考えられる。いずれにしてもニジマス等のサケ科魚類を養殖する地域が拡大するなかで、I P N ウイルスに汚染された発眼卵の移動により I P N の地理的分布が今後さらに拡大することが予想される。

宿主範囲

I P N ウイルス或いは I P N 様ウイルスは、サケ科魚類をはじめとして淡水魚、海水魚など多くの魚類 (Wolf, 1988; 表-2) 並びに貝類 (Hill, 1976ab) から分離されており、宿主範囲が極めて広いことが特徴で今後さらに宿主域が拡大すると考えられる。しかし、発病が認められた魚類は限られており多くの魚種では不顕性感染で、流行病として産業的に被害の大きいのは養殖場で飼育されているサケ科魚類の一部に限られていることも特徴である。

サケ科魚類：I P N ウイルスに感受性を有するサケ科魚類は表-3 に示すとおりであるが、このような流行病として激しい被害が見られるのはカワマス (Wolf *et al.*, 1960)、ニジマス (Parisot *et al.*, 1963) 及びアマゴ *Oncorhynchus rhodurus* (Sano, 1973) の 3 魚種である。Brown trout *Salmo trutta* (Wolf *et al.*, 1960) 及びヒメマス *O. nerka* (Sano, 1973) では、感染試験で発病が認められているが、大きな被害は報告されていない。

その他、Danube salmon *Hucho hucho* (Ahne, 1985)、

表-3 I P N ウイルスが分離されたサケ科魚類*

魚種名 (和名)	学名	文献
Danubue salmon	<i>Hucho hucho</i>	Ahne (1985)
Brook trout (カワマス)	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Wolf et al. (1960)
Arctic char	<i>Salvelinus alpinus</i>	Ljungberg and jorgensen (1973)
Rainbow trout (ニジマス)	<i>Salmo gairdneri</i>	Parisot et al. (1963)
Brown trout (ブラウンマス)	<i>Salmo trutta</i>	Wolf et al. (1960)
Cutthroat trout (カッツスロート)	<i>Salmo clarki</i>	Parisot et al. (1963)
Atlantic salmon (大西洋サケ)	<i>Salmo salar</i>	Mackelvie and Artsob (1969)
Amago salmon (アマゴ)	<i>Oncorhynchus rhodurus macrostomus</i>	Sano (1973)
Chum salmon (サケ)	<i>Oncorhynchus keta</i>	Ahne (1985)
Coho salmon (ギンザケ)	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Wolf and Pettijohn (1970)
Chinook salmon (マスノスケ)	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Hill (1977)
Sockeye salmon (陸封、ヒメマス)	<i>Oncorhynchus nerka</i>	Sano (1973)
Mountain whitefish	<i>Prosopium williamsoni</i>	Yamamoto and Kilistoff (1979)
Grayling	<i>Thymallus thymallus</i>	Ahne (1978)

* Wolf (1988) 一部改

Arctic char *Salvelinus alpinus* (Ljungberg and Jogensen, 1972)、Cutthroat trout *S. clarki* (Parisot *et al.*, 1963)、Atlantic salmon *S. salar* (Mackelvie and Artsob, 1969)、Chum salmon *O. keta* (Ahne, 1985)、Coho salmon *O. kisutch* (Wolf and Pettijohn, 1970)、Chinook salmon *O. tshawytscha* (Hill, 1977)、masu salmon *O. masou* (Yoshimizu and Kimura, 1990)、Mountain whitefish *Prosopium williamsoni* (Yamamoto and Kilistoff, 1979) 及び Grayling *Thymallus thymallus* (Ahne, 1978) が感受性をもつことが報告されている。

表-2 I P N ウイルスが分離された魚種*

科名	一般名
Petromyzonidae	ヤツメウナギ
Clupeidae	ニシン
Salmonidae	サケ・マス
Coregonidae	Whitefishes (シロマス)
Thymallidae	グレーリング
Anguillidae	ウナギ
Catostomidae	Suckers (サッカー)
Cyprinidae	コイ
Cobitidae	ドジョウ
Esocidae	パイク
Poecilidae	Top minnows (カダヤシ、グッピー)
Bothidae	ヒラメ
Paralichthyidae	カレイ
Soleidae	ウシノシタ
Atherinidae	トウゴロイワシ
Carangidae	ブリ
Percidae	パーチ
Moronidae	White bass (ホワイトバス)
Sciaenidae	Drums (ドラム)
Cichlidae	Cichlids (シクリッド)

* Wolf (1988)

サケ科以外の魚類： I P Nウイルスに感受性を有するサケ科以外の魚類は表-2に示した20科のうち、17科に及んでいる(Wolf, 1988)。

I P Nウイルスは外観上正常と見られる野生魚から分離されることが多く、white sucker *Catostomus commersoni*(Sonstegard *et al.*, 1972)、lamprey *Lampetra fluviatilis*(Munro *et al.*, 1976)、コイ *Cyprinus carpio*(Ahne, 1980)その他の魚種からの分離報告例がある。

次に、野生の病魚からI P Nウイルスが分離された例としては、Stephens *et al.* (1980)が、米国で Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus*の脳から分離したウイルスを menhaden に接種して感染を認めている。一方 Ahne(1978, 1979)は、ドイツで出血症状を呈するひん死の pike *Esox lucius* 稚魚からI P Nウイルスを分離したが pike 稚魚及びニジマス稚魚への感染試験は成立せず、分離ウイルスが原因であるか否かについては明らかにされていない。

さらに、サケ科以外の養殖魚の病魚から分離されたI P Nウイルスについてみると、Bonami *et al.* (1983)が sea bass *Dicentrarchus labrax*のひん死魚から分離したウイルスは、血清学的にSP株と同一ニジマス稚魚には病原性を示さなかったことを報告している。Sano(1976), Sano *et al.* (1981a)は、日本で飼育されたヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* からI P Nウイルス様ウイルス(EVE)を分離し、血清学的にはフランス株に近いと同一したが、本ウイルスはウナギ稚魚には病原性を示したが、ニジマス稚魚には病原性を示さなかったことを報告している。さらに、反町・原(1985)は、腹水症を呈するブリ *Seriola quinqueradiata* 稚魚からI P N様ウイルスを分離し、ブリ稚魚への感染が成立したことを報告している。

これまでI P Nウイルスは、自然条件下では変温動物にのみ感染するとみられていたが、I P Nウイルスの温度耐性から考えるならば、恒温動物の体温にも十分耐え、事実 Eskildsen and Jorgensen(1973)や Sonstegard and McDermott(1972)は鳥類や哺乳動物の腸を通過したI P Nウイルスが、感染力を失っていないことを報告している。

I P Nウイルスの分類

I P Nウイルスの分類学的位置については Malsberger and Cerini(1963)が Picornvirus 群に、さらに Mos and Gravell(1969)は Reo-like virus 群に属すると分類してきた。その後、I P Nウイルスの分類学上の

論議は、RNA構造が1本鎖(Nicholson, 1971; Kelly and Loh, 1972)とする説と、2本鎖(Moss and Gravell, 1969; Argot and Malsberger, 1972)とする説に分かれていたが、Dobos *et al.* (1979)が、I P Nウイルスは2本鎖RNAを有することを明らかにし、Reovirusではなく新たな科を設けて Birnaviridae と呼称することを提唱し、I C T V(International Committee on Taxonomy of Viruses)が1984年にこの科の新説を認めている。Birnaviridaeには、現在5種類のウイルスが包含されており、水棲動物である魚類と貝類(Tellina virus・Hill, 1976a; Oyster virus・Hill, 1976b)のI P Nウイルス、さらには陸上動物のニワトリ(Infected bursal disease virus・Hirai and Simakura, 1974)と、ハエ(Dorosophila X virus・Teninges *et al.*, 1979)のウイルスなどが知られている。

ウイルスの性状

1) I P Nウイルスの形態的及び化学的性状

Moss and Gravell(1969)は、培養細胞に接種したI P Nウイルスの燐タングステン酸ネガティブ染色標本の電子顕微鏡観察により、ウイルス粒子は外観的には六角形で平均直径65nm、92のキャプソメアで構成されており、レオウイルス群に近いと報告した。

また工藤ら(1973, 1975)は、ニジマス病稚魚のすい臓細胞を用いたネガティブ染色標本の電子顕微鏡観察により、ウイルス粒子は平均直径66nm、総数162のキャプソメアを有し、外見上六角形あるいは円形輪郭を呈し正20面体の構造で、レオウイルス群に属するものと考えられると報告する等、いずれもウイルス粒子は形態学的にはレオウイルス群に近いことを指摘している。ウイルス粒子は430~440sの沈降係数を有し、分子量は約 55×10^6 ダルトンで、CsCl中での浮遊密度は1.32~1.33g/mlである(Dobos, 1977)。ゲノム核酸は、RNA二本鎖を有し(Moss and Gravell, 1969)14sの沈降係数で、CsCl中での浮遊密度は1.60~1.615g/mlである(Dobos, 1976)。I P Nウイルスは核酸成分として、全ウイルス粒子の8.7%に相当するRNAを有している。RNAは二分節した二本鎖であり、分子量は 2.3×10^6 ダルトンでGC含有の割合はそれぞれ54%とされている(Moss and Gravell, 1969; Argot and Malsberger, 1972; Dobos *et al.*, 1977)。

2) 環境要因並びに物理的・化学的因子に対するI P Nウイルスの抵抗性

I P Nウイルスは水中(淡水、海水)で長期間感染性を失わないことをはじめとして(Desautels and MacKelvie 1975; Ahne, 1982)、池泥(Ahne, 1982)、乾燥(Jorgensen, 1973b; Ahne, 1982)、熱(MacKelvie and

Desautels, 1975)、凍結(McMichael *et al.*, 1975)、pH (Jorgensen, 1973b; MacKelvie and Desautels, 1975)、紫外線(吉水ら, 1986a)、放射線(Ahne, 1982)等の環境要因並びに物理的・化学的因子に対する抵抗性(表-4)が魚類のウイルス中最も強いウイルスであることは、IPN防除対策上の問題点でもある。水中におけるIPNウイルスの抵抗性に関しては、IPNウイルスを濾過滅菌水に懸濁させて保存した場合は、5~6ヵ月後でも感染性が認められているが(Desautels and MacKelvie, 1975; MacKelvie and Desautels, 1975)、濾過滅菌処理をしない河川水にIPNウイルスを懸濁させて保存した場合には、14日後にはウイルスは検出されない(Ahne, 1982)ことが報告されている。また、河川水等では無処理の水に比べ、濾過または加圧滅菌処理水中では、IPNウイルスの感染性が4倍以上長く残存した(Toranzo *et al.*, 1983)との報告もあり、水中の微生物類がIPNウイルスの生存性に影響を与えるものとみられる(吉水ら, 1986)。

乾燥状態における、IPNウイルスの抵抗性に関しては、室内に放置した場合には5週間後に一部に感染性が認められ、デシケータに入れたものは8週間後にも感染性が認められている(Desautels and MacKelvie, 1975)。

IPNウイルスの紫外線耐性は、他の魚類のウイルスに

比べて強く、吉水ら(1986a)は、紫外線照射によるID₉₉を $1.0\sim 1.5\times 10^5\mu\text{Wsec/cm}^2$ であると報告し、IHNVウイルスのID₉₉が $1.0\sim 3.0\times 10^3\mu\text{Wsec/cm}^2$ であることから、IPNウイルスはIHNVウイルスに比較すると、紫外線に対し50~150倍の耐性を有していることになると述べている。

多くの魚類ウイルスが熱に不安定なのに対し、IPNウイルスは比較的安定で、MacKelvie and Desautels (1975)は60℃の加熱で5時間後にも感染性が認められたと報告している。

IPNウイルスのその他の性状については、エーテル(Malsberger and Cerini, 1963)、クロロホルム(Parisot *et al.*, 1965)及びグリセリンに安定で、50%グリセリン中では長期間安定であることが知られている(Wolf *et al.*, 1960)。IPNウイルスを長期間保存するには-20℃あるいはそれ以下の低温で保存すること、凍結乾燥の場合にはスキムミルク、乳糖、ラクトアルブミン水分解物等を添加することにより良好な結果の得られることが知られている(Wolf *et al.*, 1969; 木村・吉水, 1988)。しかしIPNウイルスの株によっては凍結に耐えられないものがある(McMichael *et al.*, 1975)。

表-4 ウイルスの環境要因並びに、物理的・生物的因子に対する抵抗性

条 件	作用時間・結果	文 献
養魚場用水(濾過、4℃)	24 週後、活性残存	Desautels and MacKelvie(1975)
水道水(10℃)	231 日後、 $< 1\text{ TCID}_{50}/\text{ml}$	Ahne(1982)
河川水(10℃)	14 日後、活性残存せず	Ahne(1982)
海水(4℃、10℃)	25 週後、1%以上の活性残存	Desautels and MacKelvie(1975)
PBS(4℃)	1 年、0.1%活性残存	MacKelvie and Desautels(1975)
池泥(10℃)	70 日後、 $< 1\text{ TCID}_{50}/\text{ml}$	Ahne(1982)
乾燥(4℃)	4 週後、0.4%の活性残存	Jorgensen(1973b)
乾燥(1℃)	4 週後、活性残存	Ahne(1982)
熱(60℃)	30 分、0.1%の活性残存	MacKelvie and Desautels(1975)
熱(60℃)	5 時間、0.0001%の活性残存	MacKelvie and Desautels(1975)
凍結(-60℃、VR-299)	2 ヶ月、安定	McMichael <i>et al.</i> (1975)
凍結(-60℃、CTT)	2 ヶ月、1%の活性残存	McMichael <i>et al.</i> (1975)
pH 2.5	60 分、活性残存	
12.5	10 分、不活化	Jorgensen(1973b)
pH 2	5 日、安定	
7	5 週、安定	MacKelvie and Desautels(1975)
9	5 週、0.001%活性残存	
U. V ($1.0\sim 1.5\times 10^5\mu\text{Wsec/cm}^2$)	1%の活性残存	吉水ら(1986)
ガンマ線(10^6rads)	10%の活性残存	Ahne(1982)

3) 血清学的性状

IPNウイルスが、血清学的に極めて多型であることが特徴としてあげられている。現在、VR-299, Sp 及び Ab 株で代表される3つの血清タイプに分けられているが

(Macdonald and Gower, 1981; Okamoto *et al.*, 1983)、各血清型の間においても相互に交叉性が認められること、また同じ血清型に含まれる株間でもかなり血清学的変異がみられるなど(Wolf and Quimby, 1971; Jorgensen and

Kehlet, 1971) 未だ不明確な点が残されている。

症状

I P Nは、サケ・マス類の稚仔魚にへい死をひき起こす急性疾病である。へい死率が高い場合のひん死魚の特徴的な行動としては、体の長軸に沿って回転する旋回狂奔があり、旋回と水底で静かに横たわる動作をくり返して死に至る。外観症状では、体表全体の黒化、眼球突出、腹部膨満が一般的であるが、鱗基部を含む腹部の充血が時にみられ、鰓は退色して貧血症状を呈し、肛門には糸状の粘液便を懸着するものがある (Amos, 1985)。内部症状については、心臓、肝臓、腎臓の貧血と、幽門垂及びその周辺の脂肪組織に多数の点状出血がみられる。消化管には餌が入っておらず、胃や腸の前部に透明ないし乳白色の粘液が貯溜し、胃は白く見える (Wood *et al.*, 1955; Snieszko *et al.*, 1959; Wolf and Quimby, 1967)。病理組織学的には、病名が示すようにすい臓の壊死が特徴的で核濃縮、核崩壊、時には細胞質封入体を伴ったすい臓腺房細胞の著しい壊死がみられる。さらに、ランゲルハンス氏島組織が冒され、すい臓周辺の脂肪組織にも壊死が認められることがある。幽門垂や腸管は、上皮の壊死と脱落がみられ急性腸炎の様相を呈する (Wood *et al.*, 1955; Snieszko *et al.*, 1959)。腎臓の造血組織と細尿管に壊死を認めることがある (Yasutake *et al.*, 1965)。McKnight and Roberts (1976) は、ニジマス稚魚で I P N の自然発生について、病理組織学的に連続して調査を行ったところ、ひん死魚におけるすい臓腺房細胞の壊死は、個体によって程度の差が認められるが、著しいカタル性

腸炎が必ず観察され、I P N ウイルスによる消化管の病変が重要であることを指摘している。Sano (1971b) は、ニジマスの肝臓に部分的な壊死をみている。Snieszko *et al.* (1957) が、体側筋の硝子変性を報告しているが、このことは I P N に限らないことが知られている (Yasutake, 1970)。工藤ら (1973) は、I P N に罹病したニジマス稚魚のすい臓及び肝臓を電子顕微鏡で観察し、I P N ウイルスはすい臓の腺房細胞及び肝臓細胞の細胞質内にみられるが、核質内には存在しないこと及び細胞質内ではライソゾームやチトリゾーム中に存在し、六角形或いは円形輪郭を呈することを明らかにした。さらに工藤ら (1973) は、ライソゾームやチトリゾーム内に、輪郭が不明瞭なウイルス粒子とミエリン像の物質塊が多数含まれることを観察して、ウイルス粒子がライソゾームやチトリゾーム内で消化されることを示唆している。

I P N ウイルスの培養

魚類のウイルスの培養法が Wolf and Quimby (1967) によって確立されて以来、I P N の診断とウイルスの同定に培養細胞を用いる方法が広く行われている。I P N ウイルスは、RTG-2 (Wolf and Quimby, 1962)、FHM (Gravel and Malsberger, 1965)、CHSE-214 (Fryer *et al.*, 1965)、As (Nicholson and Byrne, 1973) 及び PG (Ahne, 1979) などの各種魚類由来培養細胞で増殖し (表-5)、感染細胞に細胞変性効果 (cytopathic effect; CPE) を生じ、 $10^6 \sim 10^9$ PFU/ml のウイルス感染価を示すが、Ab 株は FHM では CPE を発現しない (Jorgensen and Kehlet, 1971)。

表-5 I P N ウイルスの分離・培養に用いられる株化細胞

細胞株名	魚種名	発育温度域 °C (適温)	文 献
RTG-2	<i>Salmo gairdneri</i> (ニジマス)	4-26 (20)	Wolf and Quimby (1962)
AS	<i>Salmo salar</i> (大西洋サケ)	4-28 (20)	Nicholson and Byrne (1973)
CHSE-214	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i> (マスノスケ)	4-27 (21)	Fryer <i>et al.</i> (1965)
PG	<i>Esox lucius</i> (バイク)	15-25 (20-22)	Ahne (1979)
FHM	<i>Pimephles promelas</i> (fathead minnow)	0-36 (34)	Gravel and Malsberger (1965)

I P N ウイルスの感染によって RTG-2 細胞は、細胞質の退縮による細胞間の空間を生じて、典型的な紡錘形の線維芽細胞の形態を失って羽毛状となり、核濃縮を伴った特徴的な CPE を発現するが、最終的には培養容器の壁

から剥離する (Malsberger and Cerini, 1963)。RTG-2 細胞における CPE の発現に要する時間は、培養温度によって異なるが、4 °C では数日間、20 °C では 48 時間、26 °C では 9 時間である。感受性細胞が I P N ウイルスに感染し

た場合でも、細胞にCPEが生じないことも知られており、持続感染の一種と考えられている(Moewusand Sigel, 1963)。これは、欠陥干渉(defectiv interfering;DI)ウイルス粒子が感染性ウイルス粒子の産生を干渉し、細胞の持続感染に関与するものとされている(Hedrick and Fryer, 1982;Macdonald and Kennedy, 1979;Nicholson and Dunn, 1974)。

I P Nの診断

1) I P Nウイルスの分離

病魚をはじめキャリアーなど不顕性感染魚からも、前述のRTG-2細胞をはじめとする培養細胞を用いたウイルス培養法によって、比較的容易にウイルスが分離される。I P Nウイルスを分離するための試料として、Amos (1985)によれば、稚仔魚は全魚体を、4～6cmの稚魚では腎臓を含む内臓全体を、6cm以上の大きな稚魚では心臓、腎臓等の組織を用い、大型魚では体腔液、精液及び糞を用いることを推奨している。試料を乳鉢などで磨砕し、pH7.0～7.8の緩衝液に懸濁し、3,000rpmで10分間遠心分離後、その上清を0.45μm孔径のフィルターで濾過する。濾液をRTG-2細胞等のI P Nウイルスに感受性を有する培養細胞に接種し、15～20℃で培養してCPEの発現によって、ウイルスの存在を確認することができる。なお、1回の接種によってCPEが発現しない場合でも、1～2回の盲継代を行うことによってCPEの発現がみられることもある。

養殖現場での日常的な診断としては、培養細胞に発現した特徴的なCPEの観察によりI P Nの推定的な診断が行われているが、ウイルス学的に確定するためには抗血清を用いた中和試験の結果からI P Nウイルスを同定しなければならない。さらにI P Nウイルスは、宿主範囲が広く魚類をはじめ他の水棲動物からも分離されており、また魚類では前述したように不顕性感染している場合が多いことから、I P Nウイルスが分離されたことによって直ちに、病因がI P Nであると判断出来ない場合があるので、確定診断のためには、ウイルス学的な検討結果ばかりでなく、臨床症状並びに病理組織学的所見などを加味して判定することが必要である。

2) 血清学的診断

I P Nウイルスの血清学的検査法としては中和試験法及び蛍光抗体法が多く用いられ、この他Coagglutination法、ELISA法、免疫peroxidase法、補体結合反応法等の応用が検討されているが、I P Nウイルスは前述のように血清学的には多型を示すので、養殖現場でI P Nを診断するためには、多価抗血清が用いら

れている。

中和試験法：I P Nウイルスの同定法として、もっとも広く用いられている。中和試験法は、実験室でのウイルス同定のためには優れた方法であるが、養殖現場での診断のためには結果を得るのに時間を要し、迅速性に欠ける。

蛍光抗体法：直接法と間接法とがあり、I P Nウイルスの血清学的診断・同定手法として広く用いられている。直接蛍光抗体法を用いた事例としては、感染培養細胞におけるI P Nウイルスの増殖経過を観察した研究(Piper *et al.*, 1973)がある。間接蛍光抗体法は直接法に比べ応用範囲が広く、Swanson and Gillespie(1981)及びSwanson(1981)は実験感染魚でI P Nウイルスの存在場所を調べるために、凍結切片を用いた間接法によって90分以内で結果を得ている。Hedrick *et al.* (1978)も間接法によって、感染培養細胞で同様にI P Nウイルスの存在場所を調べており、このように蛍光抗体法は抗原の存在場所を観察できるため、感染発病機序の研究にも利用されている。

Coagglutination法：Kimura *et al.* (1984)は抗I P Nウイルス血清を感作させた*Staphylococcus aureus*を用いて、養殖現場におけるI P Nウイルス同定の血清学的診断法として、Coagglutination法が優れていることを報告した。検査結果が2時間以内に得られ、精度がウイルス分離法に比べても高く、I P NウイルスのVR-299株とSP株及びAb株が識別でき、現場における簡単な加熱処理でサンプルの郵送が可能であること、さらに特別な器具を要しないこと、病魚の組織を直接用いられること等の利点を有し、迅速抗原検出法として効果的な方法である。

ELISA法：1.5～7時間で結果が得られ、I P Nウイルスの同定に用いられている(Dixon and Hill, 1983a;Hattori *et al.*, 1984;Nicholson and Caswell, 1982)。検出感度は、 $10^{3.5} \sim 10^{5.5}$ TCID₅₀/mlとウイルス分離法に比べて低いが、短時間で結果が得られるので病魚の診断に適している(Dixon and Hill, 1983a)。

免疫peroxidase法：主に、感染培養細胞中のI P Nウイルスの光顕的、電顕的抗原検出法として用いられている(Faisal and Ahne, 1980;Nicholson and Henchal, 1978)。数時間で結果が得られること、蛍光抗体法と異なり普通の光学顕微鏡で観察できること、標本の保存が可能であること等の利点がある。

補体結合反応：Finlay and Hill(1975)は、I P NウイルスのVR-299株、SP株、Ab株の3株が識別できることを報告しているが、中和試験法に比べ感度は低い。

その他の方法として、Cleator and Burney(1980)が赤血球凝集試験法、Isiguro *et al.*(1984)が I P N ウイルスと抗血清による免疫拡散法を報告しているが広くは用いられていない。

これらの血清学的診断法のうち、養殖現場の診断技法として実用化するためには、特別の器具を必要としない簡便性と数時間以内に結果が得られる迅速性が必須の要件である。Coagglutination 法(Kimura *et al.*1984)、あるいは病魚の組織を直接用いた ELISA 法の応用(Dixon and Hill, 1983a)が適切とみられ、これらの技術が広く実用化されることによってさらに一層的確な I P N の診断と早期の対応が期待される。また近年、各県の水産試験場に蛍光顕微鏡が設備されていることから、病魚組織の塗抹標本を用いた蛍光抗体法が現場でも実用化できる方法である。

2. I P N ウイルスの伝播と発病要因に関する研究 伝染源

I P N の重要な伝染源としては、ウイルスに汚染した卵、発病稚魚及びウイルスを保有する成魚(キャリアー・Carrier)がある。

1) ウイルスに汚染した卵

Wolf *et al.*(1963)は、カワマス親魚から搾出した卵のホモジネートから $10^{0.625} \sim 1.75$ ID₅₀/ml のウイルスを検出している。

2) 発病稚魚

Sano(1972a)は、わが国の各地で発生したニジマスの I P N について、病死魚から $10^{5.8 \sim 8.2}$ TCID₅₀/ml のウイルスを検出している。さらに、Sano(1973)は、ニジマス、アマゴ、及びヒメマス稚魚を用いた感染試験 5 日後に $10^{4.8} \sim 5.2$ TCID₅₀/ml、へい死の増加した 15 日後に $10^{6.8} \sim 7.1$ TCID₅₀/ml、さらに 40 日後にも $10^{3.8 \sim 4.8}$ TCID₅₀/ml の I P N ウイルスを検出している。このように自然発病魚から I P N ウイルスが分離され、感染試験によって容易に感染が成立するので、発病稚魚は伝染源として最も重要視されなければならない。

3) キャリアー・Carrier

I P N に罹病して生き残った魚は、外見は健康と見られながら I P N ウイルスを終生、持続的に保有するものがあり、一般にキャリアーと呼ばれている。ニジマス、カワマスの I P N ウイルスキャリアーの腎臓、心臓、肝臓及び幽門垂などの内臓組織から I P N ウイルスが検出されており、腎臓からの検出率が最も高い(Frantsi and Savan, 1971a; Yamamoto, 1974)。Billi and Wolf(1969)は、カワマスの 18 月齢のキャリアーの糞中から $10^{1.7} \sim$

7.1 TCID₅₀/ml の I P N ウイルスを検出し、糞とともにウイルスも水中へ排出されることから、キャリアーは I P N の伝染源として重要であることを報告している。Wolf *et al.*(1963)は、カワマスで採卵時の体腔液中から I P N ウイルス $10^{4.75 \sim 6.5}$ TCID₅₀/ml を検出しており、キャリアー親魚から採卵された卵は、I P N に汚染されていると考えなければならない。一般に、糞中からのウイルスの検出率は腎臓に比べ低いが、低酸素状態などのストレスが魚に与えられると検出率が高くなる(Frantsi and Savan, 1971a)。Yamamoto(1975a, b)は、カワマスではニジマスよりもキャリアーの出現率が高かったことについて、カワマスの抗体産生能がニジマスに比して劣ることによるためと説明しているが、Reno *et al.*(1978)は、カワマスとニジマスのキャリアーの血清の抗体価と、内臓組織のウイルス感染価との間には何らの関連もないことを示している。

I P N ウイルスに感受性の高いカワマス、ニジマスの感染稚魚が発病せずに不顕性感染状態で終わる場合が多いが、これらが伝染源になるか否かについては明らかにされていない。またサケ科以外の魚類では Sonstegard *et al.*(1972)が、white sucker(*Catostomus commersoni*)から 10^3 TCID₅₀/ml の I P N ウイルスを検出したように、多くの魚種が I P N ウイルスを保有することは知られているが、これらがサケ科魚類の I P N の伝染源となり得るか否かについても、今のところ明らかにされていない。

その他に、魚食性の鳥類や哺乳動物の消化管から、I P N ウイルスが検出されており(Sonstegard and McDerott, 1972)、I P N の伝染源となる可能性が指摘されているが、I P N の発病の原因となったという証明は今のところない。

伝染経路

1) 水平伝播 (horizontal transmission)

I P N ウイルスの伝播の様式は水平伝播で、これにより一群の中の同世代間に感染が拡大する。実験的には、I P N ウイルスを飼料に混ぜて、感受性を有する稚魚に与えることにより(Wolf *et al.*1960)、また I P N ウイルス懸濁液に稚魚を浸漬することで感染発病(Reno *et al.*1978)することから、消化管及び鰓が感染の重要な門戸と考えられている(Wolf *et al.*, 1961)。

岡本ら(1987b)は、餌付け 33 日後のニジマス稚魚を用いて、ウイルス感染価を $10^{5.0}$ 、 $10^{4.0}$ 、 $10^{3.0}$ 及び $10^{2.0}$ TCID₅₀/ml に変えて浸漬した場合の累積へい死率は、それぞれ 61%、38%、26%及び 0%であり、感染価が高いほどへい死率が高いことを報告している。感染あるい

は発病に必要な水中のウイルス量に関して Hill(1982)は、感染試験時の攻撃ウイルス量が 10^3 pfu/ml か、それ以下では不顕性感染状態となり、発病が見られなかったことを報告している。養魚場では、日常的にはキャリア一魚が、また発病時には罹病稚魚がそれぞれ多量のウイルスを水中に排出することにより、養魚用水中に I P N ウイルスが多数存在すると考えられており、Desautels and MacKelvie(1975)は、発病池の排水路の用水中で 10^5 TCID₅₀/ml の多量のウイルスを検出している。

2) 垂直伝播 (vertical transmission)

I P N ウイルスの伝播様式としては水平伝播のほか垂直伝播があり、I P N ウイルスを保有する親魚から採取した卵が、I P N ウイルスに汚染されたまま孵化し稚魚が感染する垂直伝播(経卵感染)が防疫対策上からも関心が持たれているが、その成立機序等についての実態は不明な点が多く残されている。まず、I P N ウイルスの垂直伝播に関しては、Snieszko *et al.* (1957)が、I P N の発病が卵の由来に関係があることから卵を介した感染の可能性を示唆した。その後、Wolf *et al.* (1963)はカワマス親魚の卵液(体腔液)から $10^{4.75} \sim 10^{6.5}$ TCID₅₀/ml の I P N ウイルスを検出した。

I P N ウイルスがヨード剤の 30ppm, 5 分間の消毒で不活化される (Amend and Pietsch, 1972) にもかかわらず、カワマスのキャリアー親魚由来の卵をヨード剤 (100ppm, 15 分) で消毒しても発病したことから (Bullock *et al.*, 1976)、卵を介した I P N ウイルスの垂直伝播が疑われる根拠とされてきた。また、長野県の養魚場でも発眼卵をヨード剤で消毒し、隔離飼育池に収容し、汚染されていない用水によってふ化飼育した場合にも I P N が発病する事例を経験しており、経卵感染が成立すると考えなければ説明できないことが多くみられている (未報告)。最近、ウイルスの垂直伝播の成立に関するいくつかの報告があり、Mulcahy and Pascho(1984)は、I P N ウイルスが精子に付着し受精の際に垂直伝播が起きることを述べ、Dorson and Torchy(1985)は、精子を介した I P N ウイルス感染を実験的に確認している。これらの報告例からみると、I P N ウイルスは卵の中に侵入しふ化とともに仔魚に引き継がれて、垂直伝播(経卵感染)が成立すると考えられる。一方、経卵感染を疑問とする報告もあり、Wolf *et al.* (1968)は、キャリアー親魚由来の稚魚であっても必ずしも発病しないことを明らかにし、Dorson(1983)は同様にキャリアー親魚由来の稚魚が発病しないことを確認するとともに、実験的に I P N ウイルスを腹腔に接種して、体腔液に I P N ウイルスが認められた親魚から採取した卵とふ化した稚魚にも、発病が観

察されなかった事を報告している。Ahne and Negele (1985)は、未受精卵に I P N ウイルスを加えて受精させた場合は、短期間でウイルスが検出されなくなり稚魚への感染も認められないのに対して、発眼卵にウイルスを接触させた場合には、3 週間以上にわたって卵殻からウイルスが検出されること、ふ化後間もない稚魚にウイルスが検出されないが、18 日後の稚魚からウイルスが分離されたことから、稚魚が卵殻に付着したウイルスに接触することで、感染すると推論している。

発病要因

I P N の感染によりカワマス、ニジマスなどの稚魚に急激なへい死がみられ、90%以上の高い累積へい死亡率となる場合とへい死がほとんどなく不顕性感染で終わる場合とがあり、I P N の発病は宿主、環境及びウイルスに関わる多くの要因の影響を受けると考えられる。

1) 宿主要因

Parisot *et al.* (1963)は、カワマス、ニジマス、カクトスロートに病原性を有する I P N ウイルスをマスノスケ、ベニザケ、ギンザケの稚魚に接種したが、発病しなかったことを報告している。Sano(1973a)は、ニジマス、ヤマメ (*Oncorhynchus masou masou*)、アマゴ及びヒメマスを用いた感染試験でニジマス、アマゴ及びヒメマスでは発病したが、ヤマメでは発病せず、感染も認められなかったことを報告している。

I P N ウイルスの病原性の発現には魚齢が重要であることを、M' Gonigle(1941)が報告している。Frantsi and Savan(1971b)は、ふ化後 1 ヶ月齢のカワマスの稚魚では累積へい死亡率が 83%であるが、6 ヶ月齢ではへい死がほとんどないことを実験的に示している。Dorson and Torchy(1981)は、ふ化後 1 ~ 2 週齢のニジマスの稚魚では累積へい死亡率が 70%、20 週齢ではへい死がほとんどないことを示しており、カワマス及びニジマスではいずれも 5 ~ 6 ヶ月齢で、I P N ウイルスに対する感受性が低下するものと考えられる。Wolf and Quimby(1969)は、I P N ウイルスをニジマス成魚に経口投与し、カワマス成魚には腹腔接種を行って、いずれも感染は認められたが発病することはなく、成魚は I P N ウイルスに対する抵抗力を有していることを報告している。

2) 環境要因

Frantsi and Savan(1971b)は、カナダで分離した I P N ウイルスのカワマス稚魚への感染試験で、水温 10°C では累積へい死亡率が 74%、15.5°C では 46%、4.5°C では 0%であったことを報告し、Dorson and Torchy(1981)は I P N ウイルス SP 株がニジマス稚魚に対して、水温 10°C で

は累積へい死率が 90%以上、16℃では 0%、5.5℃では 40%であったことを報告している。Sano(1972b)は日本で分離した I P N ウイルスによるニジマス稚魚を用いた実験で、水温 10℃では累積へい死率が 15%、14℃では 78%、6℃では 25%であったことを報告している。このように I P N は飼育水温が 10~15℃でのへい死率が高く、へい死率と水温の間には密接な関係があると考えられる。

Sonstegard and McDermott(1971)は、カワマスの不顕性感染魚から分離した I P N ウイルスのカワマス稚魚への感染実験で病原性を認めている。また、Hill(1982)は大量へい死を経験していない養魚場のニジマスから分離した I P N ウイルスが、ニジマス稚魚に病原性を有することを認め、感受性魚であっても発病することなく、感染状態のまま経過することを示した。Hill はその理由として低濃度の I P N ウイルスに感染することによって、ある程度の抵抗性を獲得したものと推論している。一方、低酸素状態で飼育されたことにより糞中からのウイルス検出率が高まること (Frantsi and Savan, 1971b)、活魚輸送がキャリアー魚のウイルス増殖を促すこと (Roberts and McKnight, 1976) 等が報告されており、環境や飼育条件が良好でない場合はこれらがストレスとなって健康度が低下し、魚体内のウイルス増殖が加速され、その結果としてウイルスの検出率が増加するものとみられ、魚類養殖のウイルス病対策としては飼育管理技術の検討が重要と考えられる。

3) ウイルス株による病原性の相違

ヨーロッパの養魚場では、I P N ウイルスの SP 株は Ab 株に比べて、ニジマス稚魚に対し常に高いへい死率をもたらすことが、広く認められている (Jorgensen and Kehlet, 1971)。Hill and Dixson(1977)は、イギリスで罹病稚魚、不顕性感染の稚魚あるいは高年齢キャリアー魚等から分離した SP 株は、8~10 週齢のニジマス稚魚に対し累積へい死率が 43~50%で、ほぼ等しい病原性を示したが、養魚場で軽症の I P N 罹病魚から分離した Ab 株は、累積へい死率が 15%で病原性が低かったことを報告している。また、Sano(1971b)は、日本で分離された血清型の異なる 4 株の I P N ウイルスについて、10 週齢のニジマス稚魚を用いた感染実験で、累積へい死率が 15~58%とウイルス株によって差があることを報告している。

Dorson *et al.* (1978)は、培養細胞によるウイルスの多回継代により I P N ウイルスの病原性が失われることをニジマスを用いて示した。

I P N ウイルスでは SP 株、Ab 株をはじめとしていくつかの血清型の異なる株が報告されており、血清型が異なれば病原性に差があること、同じ血清型であっても株

によって、病原性が異なるものと考えられる。

3. I P N 防除に関する研究

1) I P N ウイルス-free 系魚の飼育

Wolf and Quimby(1967)は、I P N を予防するためには、I P N ウイルス-free 系親魚を得ることが、最も望ましい方法であることを提唱した。そして、Wolf *et al.* (1968)は、カワマスのキャリアー親魚群から I P N ウイルス-free 魚を選抜するため、採卵前に親魚のウイルス検査を行ってウイルス保有魚を除去し、さらにふ化稚魚についてウイルス検査を行うなど完全な管理によって I P N ウイルス-free 系親魚を得、この選抜された魚群ではその後 I P N が発病しなかったと述べており、I P N ウイルス-free 系親魚の飼育は予防上重要な手段であることを示している。しかし米国においても、I P N ウイルス-free 系親魚を得ることは困難で、特に民間養魚場では I P N は回避し難い疾病として、I P N でへい死する魚を見込んだ数量の卵をふ化する方法が採用されているのが現状である。また一部の養魚場では、I P N ウイルスフリーの環境で稚魚を飼育し、感受性がなくなる魚齢に達した段階で一般飼育池に移す方法等 (Wolf, 1988)、I P N による経済的な損失を少なくする努力が行われている。

2) 水温によるへい死率の相違

I P N の発病要因の項で述べたように I P N ウイルスの病原性は水温に影響され、低水温下におけるふ化飼育によって一般にへい死率を低く抑えることが可能である。Frantsi and Savan(1971b)は、I P N ウイルスの VR-299 株と Pem-P1 株について、カワマス稚魚を用い、水温条件を 15.5、10 及び 4.5℃として感染試験を行ったところ、VR-299 株では 15.5℃で 31%、10℃で 10%、4.5℃では 12%の累積へい死率を示し、Pem-P1 株については、15.5℃で 46%、10℃で 74%、4.5℃では 10%の累積へい死率であったことを報告している。岡本ら(1987a)も、Buhl 株についてニジマス稚魚を用いた浸漬法による感染試験を行い、飼育水温が 20℃から 10℃へ下がるにしたがってへい死の開始が遅くなり、日間へい死率も低く、しかもへい死が長期化することを報告している。一方、Sano(1972b)は、ニジマス稚魚の自然発病例について、14℃で 80%、10.5℃で 20%、6℃では 43%の累積へい死率を示し、低水温下でも比較的へい死率の高い場合があることを報告している。しかし、わが国では一般に低水温で飼育することによってへい死率を低くすることができるために、ニジマス養殖ではふ化稚魚を 10℃前後で飼育することが多い。

3) I P Nの化学療法

I P Nの予防を目的とした薬剤投与の最初の試みは、Snieszko *et al.* (1959)がヨード剤 (ルゴール液) 及びサイクロイドホルモン (Cytomel) をカワマス稚魚に餌付け時から投与して、予防効果を試験したことにはじまるが、自然発病群のへい死率の軽減を図ることはできなかった。Economon (1963, 1973)は、カワマス稚魚の I P Nの予防と治療を目的として、PVP-ヨード剤 (Polyvinylpyrrolidone-Iodine, PVP-I) の経口投与を試みた。すなわち、予防としては PVP-I を魚体重 1 kg あたり 1 日量として 1.64~1.91g を I P N発病前から与えたところ、対照区の累積へい死率が 33~34%であったのに対して、投与区では 16~17%と明らかに低くなったことを報告した (Economon, 1973)。次に、治療を目的とした場合には、I P N発病中の稚魚に、同様に 1.73~0.55g を数段階に分けて投与したところ、対照区の累積へい死率が 9.5%であったのに対して、実験区では 5.5~8.3%となり、投与効果が認められることを報告した (Economon, 1973)。東京水試 (1973)は、I P Nの予防を目的として、ニジマス稚魚に抗炎症剤のメピリゾールを魚体重 1 kg あたり、1 日量として 10mg を 90 日間投与したところ対照区よりも生産率が高いこと、さらには抗プラスミン剤のトラネキサム酸 10mg、 ϵ -アミノカプロン酸 100mg をそれぞれ投与した場合も、生残率が高かったことを報告している。

Savan and Dobos (1980)は、他の動物ウイルスに対して効果が認められている合成 nucleoside, Virazole (1-D ribofluranosyl-1, 2, 4-triazole-3carboxamide) (10 μ g/ml) が、*in vitro*では I P Nウイルスに効果が認められたことから、I P Nに人為感染させたニジマス稚魚を薬液に浸漬しながら飼育したが、*in vitro*では予防治療効果を認めていない。

一般に細菌性疾病と異なりウイルス性疾病は、発病後に薬剤を投与して治療することは不可能と考えられてお

り、I P Nの場合にも治療効果の知られている薬剤はない。また、予防を目的として、PVP-I を投与した場合には、対照区よりも累積へい死率が低くなったとの報告もあるが (Economon, 1963)、研究事例も少なく追試も行われていない。従って現在では、産業上の予防効果を期待できる薬剤はないと考えても、間違いのないと思われる。

4) 消毒による I P Nの防除

卵の消毒剤としては PVP-I の 35ppm 溶液で 5 分 (Desautels and MacKelvie, 1975)、16ppm 溶液での 5 分間処理 (Elliott and Amend, 1978) によって、I P Nウイルスが不活化されることが報告されている。また、養魚池や飼育器具の消毒用としては、塩素の 16~40ppm 溶液による 30 分間処理 (Desautels and MacKelvie, 1975; Elliott and Amend, 1978) 及びホルマリンの 20,000~30,000ppm 溶液による、5 分間の処理 (Jorgensen, 1973b; Ahne, 1982) によって不活化されることが認められている。さらに、Wedemeyer *et al.* (1978)はオゾンの 90ppm、0.5~10 分間の処理で、I P Nウイルスが不活化されることを報告した (表-6)。長野水試 (1973)によると、ハロゲン化合物の次亜塩素酸ナトリウム、イソジン[®]、クリンナップ[®]及びアルデヒド類のホルマリンには I P Nウイルスの不活化効果が認められたが、フェノール類のクレゾール石けん液及び界面活性剤のオスバンには効果が認められないことが報告され、これに基づいて養魚場における消毒指針が作成され、養殖業者への指導普及が図られた。このように、*in vitro*の検討では I P Nウイルスを不活化する消毒剤はいくつか報告されているが、I P Nウイルスのように卵殻内に存在するウイルスには効果が及ばないと考えられ、消毒が I P Nに対する確実な処置とはいえない。しかし、原因ウイルスを減少させることは防疫上大きな意味があるので、ヨード剤による卵の消毒と塩素剤等による池、器材の消毒による、環境の清浄化に努めるべきである。

表-6 I P Nウイルスに対する消毒剤の効果

消毒方法	濃度 (ppm)	時間 (分)	効果	文献
塩素	40	30	不活化	Elliott and Amend (1978)
塩素	16	30	不活化	Desautels and MacKelvie (1975)
塩素	0.7	2	不活化	Wedemeyer <i>et al.</i> (1978)
塩素	520	<2	99%不活化	Ahne (1982)
ホルマリン	20,000	5	不活化	Jorgensen (1973b)
ホルマリン	2,000	60	一部不活化	Elliott and Amend (1978)
ホルマリン	30,000	5	不活化	Ahne (1982)
ヨード剤	35	5	不活化	Desautels and MacKelvie (1975)
ヨード剤	16	5	不活化	Elliott and Amend (1978)
オゾン	90	0.5~10	不活化	Wedemeyer <i>et al.</i> (1978)

5) ワクチン投与による I P N の防御

I P N ウイルス及び不活化した I P N ウイルスの投与によって、ニジマス及びカワマス成魚の血しょう中に、中和抗体が産生され、免疫応答の成立することが確かめられており (Wolf and Quimby, 1969)、Jorgensen (1974a) は、この中和抗体は IgM 様の高分子グロブリンであることを報告している。Agniel (1975) は、I P N ウイルスで免疫したカワマス成魚の血清をニジマス稚魚に腹腔内接種して受動免疫の成立を認めている。さらに、Dorson (1977) によってホルマリン不活化 I P N ウイルス投与による予防効果が明らかにされたが、その後 β -プロピオラクトン不活化 I P N ウイルスの投与による免疫効果も認められている (Hill *et al.*, 1980 ; Dixon and Hill, 1983b)。Dorson (1977) は、培養細胞で弱毒化した Ab 株ウイルスで生ワクチンの投与効果を試験したが、免疫効果は得られなかったことを報告している。I P N ウイルスあるいは不活化した I P N ウイルスをサケ科魚類に投与して、中和抗体が産生されることは、I P N の免疫学的防御が可能であることを示しているが、現在までにワクチン等予防剤はまったく開発されていない。I P N はふ化して間もない稚魚に発生するため、抗原を投与してから抗体が産生される以前にウイルスの攻撃を受けることになり、ふ化稚魚に対する免疫の効果はかなり疑問視される。

4. 今後の研究課題

I P N に関する研究は、他の魚類ウイルス性疾病に比べて多く、その内容も宿主範囲、ウイルスの分類や性状に関するものから血清学的研究、さらにはウイルスの分子生物学的性状の研究等と、多岐にわたっているがウイルス学的研究領域に偏重しており、防疫等養殖場で応用できる防除処置に関する研究は少ない。また I P N ウイルスの特徴として、地理的分布及び宿主範囲が広いこと、血清学的に多型であること、不顕性感染が多いこと等か

ら、極めて多様性を有するウイルスと考えられること、さらに I P N の発病は魚齢、宿主の生理的条件、水温などの影響を受けること等から、病原体のみでなく宿主及び環境の三要因の相互の関係が重要なウイルス病で、今後は疫学的・流行病学的な分野の研究の推進によって、I P N 防除対策技術の開発が望まれる。

これまでの研究結果を応用した養魚場での対策としては第一に I P N 感染耐過魚の一部がウイルスを終生継続して保有するキャリアー魚となり重要な伝染源となることから、キャリアー魚の駆除が考えられる。具体的方法として、Wolf and Quimby (1967) は I P N ウイルス-free 系親魚を提唱したが、米国でも I P N ウイルス-free 系親魚を得ることは困難で、I P N ウイルスフリーの環境で稚魚を飼育し、感受性がなくなる魚齢に達した魚を一般飼育池に移す方法が行われている。また Sano *et al.* (1981b) は、ホルマリン不活化した I P N ウイルスで免疫した 500~800g のニジマスに、I P N ウイルスを接種したところ中和抗体価の高い個体の体腔液からはウイルスが分離されなかったことを報告しており、親魚を免疫することによって、I P N ウイルス-free 魚が得られる可能性を示しているが、養殖現場ではかなり高い抗体価を有しているにもかかわらず、キャリアーが存在することがあり、未解決なところも多く残されている。次に、8~13℃の飼育水温範囲における発病が多く、I P N の発病要因として水温の影響が大きいことから I P N に感受性を有する期間は、水温を制御した環境で稚魚を飼育する方法が考えられる。さらに発症の認められる魚種がサケ科魚類の一部に限られており、わが国ではニジマス、アマゴでは発病するが、他のサケ科魚類では不顕性感染の場合が多く、魚種によって I P N ウイルスに対する感受性が異なることから、将来バイオテクノロジーの応用によって、耐病性をもった系統群を作出すること等が考えられる。

第2章 わが国におけるIPNの発生経過

わが国では、IPNはサケ科魚類のうちニジマス(Sano, 1971b)及びアマゴ(Sano and Yamazaki, 1973)の二魚種で発病が報告されており、産業的な被害が大きい流行性疾患である。当初、ニジマスで大量へい死が起こり、病因が明確にされないまま「不明病」として取り扱われるなど、混乱した時期が長かったために、その発生経過についての詳しい報告はない。なお、IPNの研究が数多く行われている米国をはじめとする諸外国では、IPNの発生に関する報告は多いが(Wood *et al.*, 1955; MacKelvie and Artsob, 1969; Besse and de Kinkelin, 1965a; Ball *et al.*, 1971; Fijan, 1974; Jorgensen and Bregenballe, 1969)、IPNの発生経過を長期間にわたって継続的に、しかも広域に及ぶ調査を行った報告は見当たらない。

第1節 わが国におけるIPNの年次別発生経過の解析

本節では、わが国のニジマス及びアマゴを主体としたサケ科魚類のIPNについて、流行初期から現在までの約30年間の発生経過の概要をまとめ、IPN流行の実態を解析することを目的とした。

材料と方法

IPNの発生と地理的分布：全国の水産試験場等によって組織された全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会（以下養鱒部会と略す）及びこれが発展的に改組された全国養鱒技術協議会において、両研究会に参加している約30機関を対象に実施されたニジマス、在来マス等の疾病実態調査結果を、年次別に取りまとめた。当初は魚病に対する養殖業者の知識が低く、診断をほとんど水産試験場に依存していたこと、また最近では養殖業者の自己診断に加えて水産試験場による発病期の巡回指導等によって得られた診断件数も加えられていることから、これらの結果は実態を反映していると考えられる。さらに、わが国のサケ科魚類の疾病に関する全国規模の調査資料としては、この研究会で行ったものが唯一のものであり、信頼性も高い。

調査期間と調査時期：1960年から1988年までの29年間に発生したIPNについて調査し、いずれの年次においても疾病の多発するふ化直後から約2gの稚魚に成長するまでを調査時期とした。なお、採卵時期が年々早まる傾向が認められるほか、光処理によって1978年以降はほぼ周年にわたって採卵が行われている。

IPNの診断：1960年から1969年までの間は、症状(Wood *et al.*, 1955; Snieszko *et al.*, 1959; Wolf and Quimby, 1967)の観察によるが、一部の事例については病理組織学的調査により、すい臓の線房細胞における壊死像(Wood *et al.*, 1955; Snieszko *et al.*, 1959; Yasutake *et al.*, 1965)の確認によって診断された。さらに1970年以降は、症状診断とともに培養細胞(RTG-2, CHSE-214)を用いたウイルス培養法による。

結 果

1970年以前のニジマスのIPN発生経過：病魚の症状から「不明病」と診断し、養鱒部会に報告した県の数を表-7に示した。

この期間におけるIPNの発生件数は明らかでないことから、IPNが発生した県の数及び非発生県の数についてみると、1960～1964年の間に発生した県は6県、非発生県は21県である。1965～1969年には、発生県は7～12県、非発生県は19～24県で、特に1968年には12県に発生が認められ、この年次の発生県の数が最も多かった。

1970年以降のニジマスのIPN発生経過：病魚の症状及び培養細胞を用いたウイルス培養法による診断によって、IPNと診断された件数をニジマスのIPN発生件数として表-7及び図-1に示した。

1970年には、発生県と非発生県はともに16県で、発生件数は133件であった。1971年には発生件数が154件に増加し、1972年には171件で流行の最盛期であった。その後、1973年から1988年の間は、発生県が、7～21県、非発生県が11～23県で、発生件数は12～100件と減少し、特に1984年以降の発生件数は12～23件で、発生県の数も7～8県と著しく減少した。

1972年から1988年をとおして、発生件数は増加と減少を繰り返しているが、全体としてみると発生件数は減少傾向を示している。発生件数の増加がみられた年は1972年、1975年、1979年、1982年及び1986年の5回ピークがあり、その間隔は3～4年であった。一方、発生件数の減少がみられた年は、1973年、1977年、1981年及び1984年の4回で、その間隔は3～4年と、ある一定の周期性を持って流行する傾向がみられた。

アマゴのIPN発生経過：年ごとの発生件数を表-7及び図-1に示した。

1971年から1979年の間は1～10件の発生数であったが、1980年以降は9～29件と増加の傾向を示し、1987年には29件で最も発生件数が多かった。

表-7 ニジマス・アマゴの I P N の発生件数

採卵年次	ニジマス			アマゴ		
	発生件数	発生県数	非発生県数	発生件数	発生県数	非発生県数
1960						
1964		6	21			
1965		8	23			
1966		8	23			
1967		9	22			
1968		12	19			
1969		7	24			
1970	133	16	16			
1971	154	16	16	1	1	14
1972	171	17	15	3	2	13
1973	88	17	15	2	1	14
1974	97	21	11	6	1	14
1975	100	20	12	5	1	14
1976	74	18	13	10	1	14
1977	45	16	15	3	2	13
1978	51	13	18	8	2	13
1979	89	15	16	4	1	14
1980	65	12	19	18	2	13
1981	48	15	16	19	5	10
1982	66	9	22	12	3	12
1983	35	8	23	14	3	17
1984	19	9	21	15	4	16
1985	22	8	22	9	3	17
1986	23	8	22	9	2	18
1987	16	7	23	29	4	16
1988	12	7	23	12	4	16

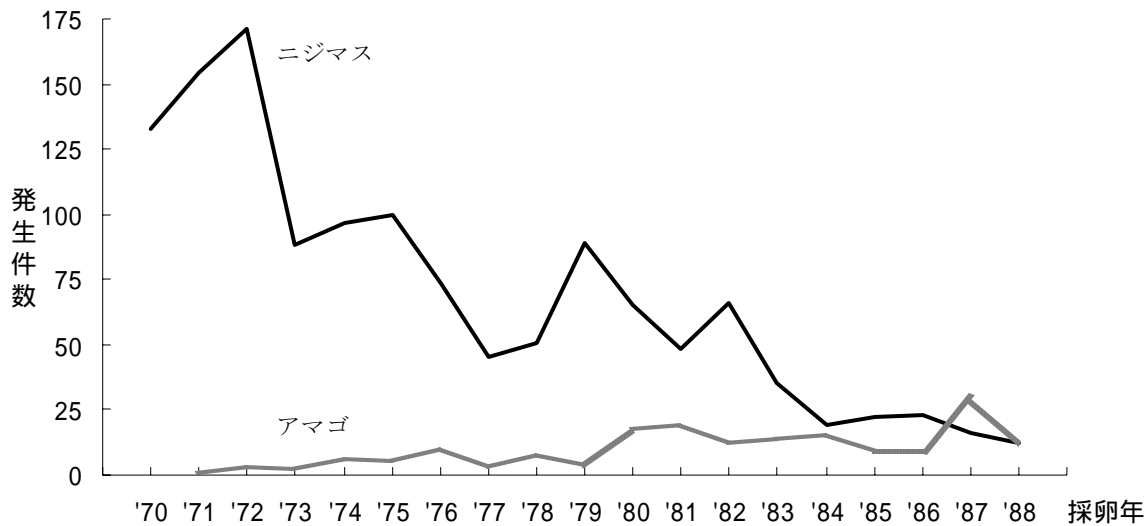


図-1 全国のニジマス・アマゴの I P N 発生件数の年次変化

考 察

わが国におけるニジマスの I P N 発生経過を検討する場合には、1960 年頃から 1969 年間の病因が不明或いは未確定であった時期と、1970 年以降の培養細胞を用いて I P N ウイルスが分離培養され、I P N と確認された時期とに区分して考察することが適当と考えられる。

1970 年以前におけるニジマスの I P N 発生経過: 餌付け間もないニジマス稚魚が旋回狂奔、腹部膨満、眼球突出及び腹水の貯留等の症状を呈して急激にへい死する疾病が、1960 年頃から群馬県及び岐阜県で、続いて栃木、静岡、滋賀及び宮崎県で発生して春稚魚の大量へい死として問題となった。病魚からは細菌及び寄生虫等病因となる病原体が検出されないこと、抗菌剤の投与効果がないこと等、原因が明らかではなかったことから「不明病」と称され、種々の角度から研究が行われた。ニジマスの罹病稚魚の主要な症状としては、胃と腸の炎症を伴うことなどから、当時はへい死に原因として飼料及び飼育管理技術の欠陥を疑う意見が強かった。こうした状況下で、「不明病」と呼ばれる疾病は米国の I P N (Wood *et al.*, 1955) と症状が一致すること、病理組織学的調査からすい臓に著しい壊死像が観察され、細胞内に封入体様構造物が認められること、へい死魚を磨砕して試料と混合して経口投与したところ、7～8 日後からへい死が始まり感染発病が確認されたこと等から(群馬県, 1966; 岐阜県, 1966)、養鱒部会における討議ではウイルス性のすい臓壊死症が疑われるとの結論に達した。1965～1969 年の間には、さらに青森、岩手、東京、神奈川、新潟、山梨、長野、愛知、三重、島根、鳥取、広島及び愛媛の都県で発病が認められた(山崎・原, 1976)。またこの時期には、不明病でへい死したニジマス稚魚の消化管に、鞭毛虫 *Hexamita salmonis* (当時は *Octomitas*) が寄生する事例があったことから、不明病との関連が疑われたが、佐野・牛山(1970)は *Hexamita* の病原性に疑問を持ち、すい臓に壊死が認められたことから、高いへい死率は *Hexamita* によるものではなく、ウイルス性疾病に起因するものであろうと報告した。

1970 年以降におけるニジマスの I P N 発生経過: わが国のニジマスの I P N 発生件数は、1972 年の 171 件をピークとして、その後は減少傾向が続き、1987 年に 16 件、1988 年には 12 件となり著しい減少傾向を示し、発生件数の減少に伴って被害量も軽微となった。この時期までに発生が認められたのは、1970 年以前に発生があった県の他に北海道、秋田、山形、福島、兵庫、岡山、徳島、及び熊本各県で、全国の主なニジマス生産地に広く伝播していることが明らかとなった。

I P N の発生件数を年次別にみると、全国的には年々減少傾向を示しているが、直線的な減少ではなく増減を繰り返しながら減少する傾向であった(図-1)。1970 年以降の I P N の流行の変化をみると、ピークを示した年が 5 回あり、その間隔が 3～4 年であること、また減少を示した年が 4 回ありその間隔が 3～4 年であることから、いずれも規則的な周期性があることが分かった。医学分野では、このような疾病流行の周期的な変化を循環変化(epidemic cycle; cyclic fluctuation; cyclic variation)と呼んでいることから(金子, 1964; 松田, 1964; 重松他, 1985)、本研究では、I P N の年次別発生件数の規則的な周期変化を、I P N の流行における循環変化と考える。

また図-1 において、発生件数が増加してピークを示した年と、次に減少して谷を示した年の発生件数を比較すると、1972 年の 171 件と 1973 年の 88 件、1975 年の 100 件と 1977 年の 45 件、1979 年の 88 件と 1981 年の 48 件、1982 年の 66 件と 1984 年の 19 件のようにピークを示した年の発生件数は、谷を示した年の発生件数の約 2 倍で、変動の幅が大きいことから、発生件数の変動を支配する要因はかなり強いものであることが推察される。

I P N 流行における、周期変化の要因を解析するためには、I P N ウイルスの病原性或いは宿主側の感受性の年次的な変化の動向を検討しなければならないが、これまでのところそのような研究は見当たらない。しかし、I P N の発生件数の年次変化をみると、ピークを示した年と谷を示した年の間隔が、ニジマスの成熟年齢である 3～4 年と一致していることは、発生件数のピークの年に得られた稚魚が、I P N を耐過して成長し、親魚となって次世代に I P N ウイルスを伝達することによって、次の流行に大きく寄与している可能性が高い。これは、I P N を耐過した魚の一部がキャリアーとなること(Wolf *et al.* 1963)、親魚から卵を介した垂直感染がみられること(Bullock *et al.* 1976)、親魚の抗体は卵を経由して稚仔魚に伝え難いこと(Agniel, 1975)等がその理由として考えられる。養鱒部会では、I P N に抵抗性を有する系統を作出する目的で、I P N 耐過群を飼育することを試みたが(養鱒部会, 1966)、以上の I P N の疫学的解析結果から見限りでは、予期した成果は得られなかった。

また一方、I P N の発生件数が年々減少傾向にあることは、I P N の発生が繰り返されることによって感受性魚が淘汰された結果として、子孫では I P N に対する抵抗性を有する魚の比率が高くなるものと考えられる。花田・牛山(1985)は、I P N の発生経験の全くない養魚場

由来のニジマス稚魚と、激しい発病を繰り返し経験した養魚場由来の稚魚を用いて感染試験を行ったところ、前者の生残率が19.3～25.1%であったのに対して、後者の生残率は89.3～98.7%であったことから、I P Nの発生が代々繰り返されることによって、抵抗性を有する割合が高くなることを報告している。以上のことから、ニジマスのI P N発生件数の年次変化における発生件数の減少は、I P N感受性魚の淘汰及び抵抗性の獲得によるもので、他方発生件数が周期的に変化する循環変化は、I P Nキャリアーからの採卵によって繰り返されているものと考えられる。

他のサケ科魚類のI P Nの発生経過：アマゴのI P N流行の経過は、1971年から1979年の間は1～10件と低い発生件数であったが、1980年以降は9～29件と増加して1987年にピークを示し、岐阜、兵庫及び岡山県等在来マスの主要生産県での発生件数が多かった。ニジマスのI P Nが全般的には減少傾向であるのに対して、アマゴのI P Nが増加傾向を示していることは、アマゴ養殖生産の阻害要因となっている可能性もあり、今後の発生傾向を注目する必要がある。

第2節 長野県におけるI P Nの年次別発生経過の解析

前節では、全国の水産試験場が行ったI P Nの発生状況の調査結果を基に、ニジマスのI P Nの発生件数が1972年を最盛期としてその後は減少傾向を示していること、発生件数の増減には3～4年の規則的な周期があり、I P Nの流行が循環変化であることを明らかにした。

本節では、ニジマス養殖の主生産県である長野県における、I P Nの年次別発生件数の変化を検討し、地域的な特徴を解析することを目的とした。

材料と方法

I P Nの発生件数：長野県下のマス養殖場で飼育しているニジマス及びアマゴに発生した疾病のうち、長野県水産試験場がI P Nと診断した件数を発生件数とした。また、発生した地域を基にして県内分布も調査した。

調査期間と調査時期：1965年から1988年までの24年間で、調査時期は第2章第1節と同様である。

I P Nの診断：第2章第1節に述べた方法と同じである。

結 果

1965～1988年の間に長野県下のマス養殖場で発生したニジマス及びアマゴのI P N発生件数を表-8及び図-2に示した。

表-8 長野県におけるニジマス・アマゴのI P N発生件数

採卵年	ニジマス	アマゴ
1965	3	
1966	9	
1967	6	
1968	14	
1969	14	
1970	27	
1971	13	1
1972	16	
1973	10	
1974	7	
1975	1	
1976	3	
1977	3	
1978	3	
1979	6	
1980	3	
1981	9	2
1982	18	
1983	4	
1984	1	
1985	4	
1986	3	
1987	3	
1988	2	

ニジマスでは、1965年に長野県における最初のI P N発生事例として、3件が確認されて以来、1966～1969年には6～14件と年ごとに増加傾向を示し、1970年には27件の発生が認められ流行の最盛期であった。その後、1971～1974年には発生件数は7～16件であるが、年々減少傾向を示し、1975年の発生件数は1件で著しく減少した。さらに、1976～1980年には3～6件と発生件数の少ない年が続いたが、その後再び増加して1981年には9件、1982年には18件と第二の流行の盛期が現れた。第二の流行の盛期は、第一の流行の盛期であった1970年からは12年経過していた。そして、1983～1988年は1～4件と、再び発生が少ない年が続いた。この期間にニジマスを飼育した養魚場は160～165カ所であった。

1965～1969年にニジマスに発生したI P Nは、原因となるウイルスの確認はされていないが旋回狂奔、腹部膨満等の特徴的な症状及び病理組織学的研究の結果により、すい臓の腺房細胞に著しい壊死像(図-3)が認められたこと等、Wood *et al.* (1955)が報告しているI P Nと一致することからI P Nと診断された。1965年に長野県で最初のI P Nとして確認された3件は、いずれも当時長野県のニジマス生産の中心地である明科町の養魚場で発生したものであったが、その後1965～1970年の間の伝播

の経過を長野県の地域図に示すと、図-4のとおりである。初めは、局地的な発生であったものが1969年までに発生地域が拡大して、1970年には県中央部の明科町、松本市、穂高町、豊科町、池田町、県北部の須坂市、信濃町、県東部の佐久市、八千穂村及び県南部の南木曾町と、県内のニジマス生産地域のうち伊那地方を除くほぼ全域で発生が認められ、短期間に広く伝播した経過をうかが

うことができる。県内で最初のIPNが認められた明科町では、1970年には6件の発生があった。

アマゴでは、1971年に長野県須坂市のマス養魚場で、わが国最初のアマゴのIPNの発生が確認されて以来、1981年に2件発生した他は認められていない(表-8)。この期間にアマゴを飼育した養魚場は60~65カ所であった。

図-2 長野県におけるニジマスのIPN発生件数の年次変化

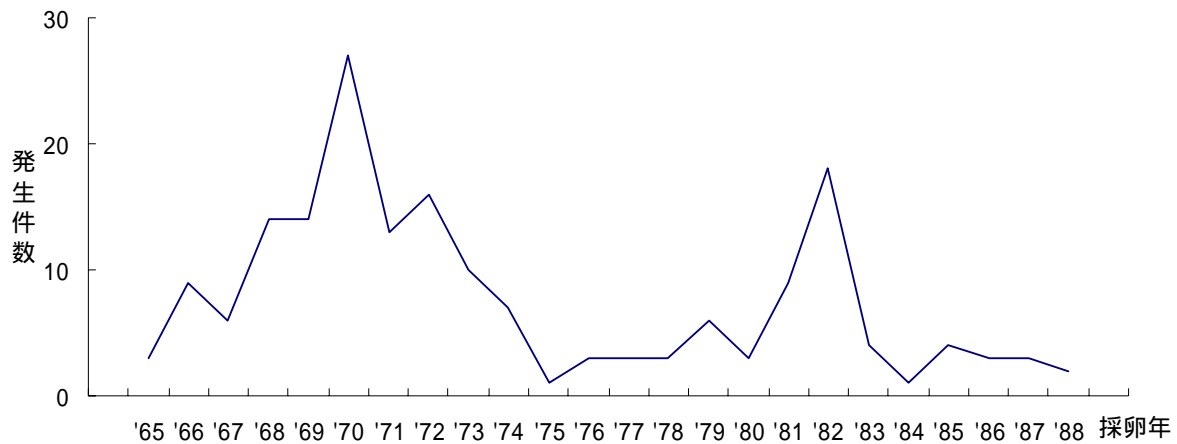


図-3 長野県における1965年の発病事例

本病例ですい腺房細胞の核濃縮をともなう壊死が認められたことから、長野県におけるIPNの発病が確認された。



1965年



1969年



1970年

--- 主な養鱒地域
* 発病養魚場

図-4 長野県におけるニジマスのIPNの発生地域

考 察

ニジマス

I P Nの発病要因として、飼育水温の影響が知られているが(Frantsi and Savan, 1971 b ; Dorson and Torchy, 1981; Sano, 1972b)、長野県におけるI P Nの発病と飼育水温との関係についてみると、水温が10~13℃の養魚場でI P Nの発生が多く、1965~1970年に発生した73件のうち53件(72.6%)の養魚場はこの水温範囲であったことから、水温との関係が非常に強いと推察される。さらに地域的にみると明科町、穂高町、豊科町はI P Nの発生が県内の他の地域に比べて極めて多いが、これは各養魚場とも用水として湧水を使用しているため、水温は11~13.5℃で年間をとおして変化が少なく、I P Nの発病に好適な水温の範囲内で養殖が行われている結果と考えられる。社会経済学的にみると、1960年代はニジマス養殖業界が成長期であったこと、一方穂高町を中心としたワサビ栽培が低迷していたことから、豊富な湧水を利用して、ワサビからニジマス養殖への転換が図られ、この地域に新たなニジマス養魚場が新設されたことが、長野県全体のニジマスのI P N発生件数の増加を間接的に促したことになるものと考えられた。すなわち、ワサビからニジマス養殖への転換が、長野県におけるI P Nの発生件数を増加させた社会的要因として、働いたものといえる。

長野県のI P Nの流行は、1970年の発生件数27件をピークとする第一の群と、1982年の発生件数18件をピークとする第二の群からなる二峰性を示し(図-2)、さらに小さな発生件数の増減があり、その間隔は2~7年である。前節で述べたように、全国のI P Nの発生件数は年々減少傾向にあったこと(図-1)、流行は規則的な3~4年の周期がみられたこととは異なり、長野県の発生件数は二峰性を示し、発生のピークの間隔も2~7年で、規則的な周期性を示さない点でも大きく相違していた。このように長野県のI P Nの流行形態が、全国の流行形態とは著しく相違するようにみられたが、主産地の1つである栃木県も、1970年及び1982年に発生件数が大きく増加している点で、長野県の状況と共通していることから両県の比較を行った(図-5)(長野水試, 1982・1983・1984・1985・1986・1987・1988)。

その結果、I P Nの発生傾向は1974~1980年を除くと非常によく一致していることがわかったが、両県の発生件数で異なる点は1975年と1979年に栃木県ではピークを形成しているのに対して、長野県では1975年は最低の発生件数で、1979年は発生のピークが小さかったことで

ある。この原因については、養殖用種苗の供給源に変化が起こったためか、他の疾病等の要因が強く作用したために、I P Nの発生が結果的に抑制されたと考えられる。

長野県における養殖ニジマスの種苗は、県内産発眼卵が主として用いられており、これはI P Nの発病以前からであり供給源に原因を求めることはできない。長野県では1973年産ニジマス稚魚において、伝染性造血器壊死症(Infected Hematopoietic Necrosis; I H N)の最初の発生があり、(長野水試, 1975; Sano *et al.*, 1977)、その後1974~1980年の間に年間13~45件I H Nの発生があったことが、1974~1980年におけるI P Nの発生件数を減少させたものとも考えられる。すなわち、I P Nの発生件数の年次傾向が、全国のそれと完全には一致していなかった理由としては、次のような事項が考えられる。まずI P Nの発病が餌付け後のふ化稚魚からである(第3章第1節)のに対して、I H Nはふ化直後或いは餌付け前の稚魚にも発病した(長野水試, 1975)ことから、I H Nの発病がI P Nの発病に先行したことによって生産された稚魚数が激減し、例年に比較すると単位面積当たりの飼育尾数が少なくなり、へい死魚の早期除去等の飼育管理が徹底したこと、次に飼育密度の低下による環境改善が図られたことによって、病原体と宿主の関係は変化がなくても、良好な環境下で飼育されたことによって発病には至らなかったこと(Snieszko, 1974)、さらに、I P N対策として7~8℃の低水温の用水で稚魚飼育が行われたことによって、発病が抑制されたこと等があげられる。

全国的に流行したI H Nではあるが、長野県では種苗の生産が著しい影響を被ったことは、1973年に発眼卵が1.1億粒、稚魚が1.9千万尾の生産であったものが、1974年には発眼卵が8千万粒、稚魚が1.3千万尾、さらに1975年には、発眼卵が5千万粒、稚魚が1.2千万尾に減少したことからみても明らかである。このように、ニジマス種苗生産県である長野県にI H Nが発生した影響は、成魚を主に生産する他県に比べて著しく大きく、1975年と1979年に現れるべきI P Nの発生のピークが、I H Nの流行によって変化したものと解釈され、I H Nの発生がなければ長野県におけるニジマスのI P Nの流行形態は、基本的には全国のI P Nの流行形態と相似したものになったと考えられる。なお、1980年頃からは、ヨード剤による発眼卵の消毒及び器具の消毒等の日常的な防疫処置の徹底、さらには稚魚の隔離飼育の普及により、ふ化稚魚期のI H Nの発生が減少した。

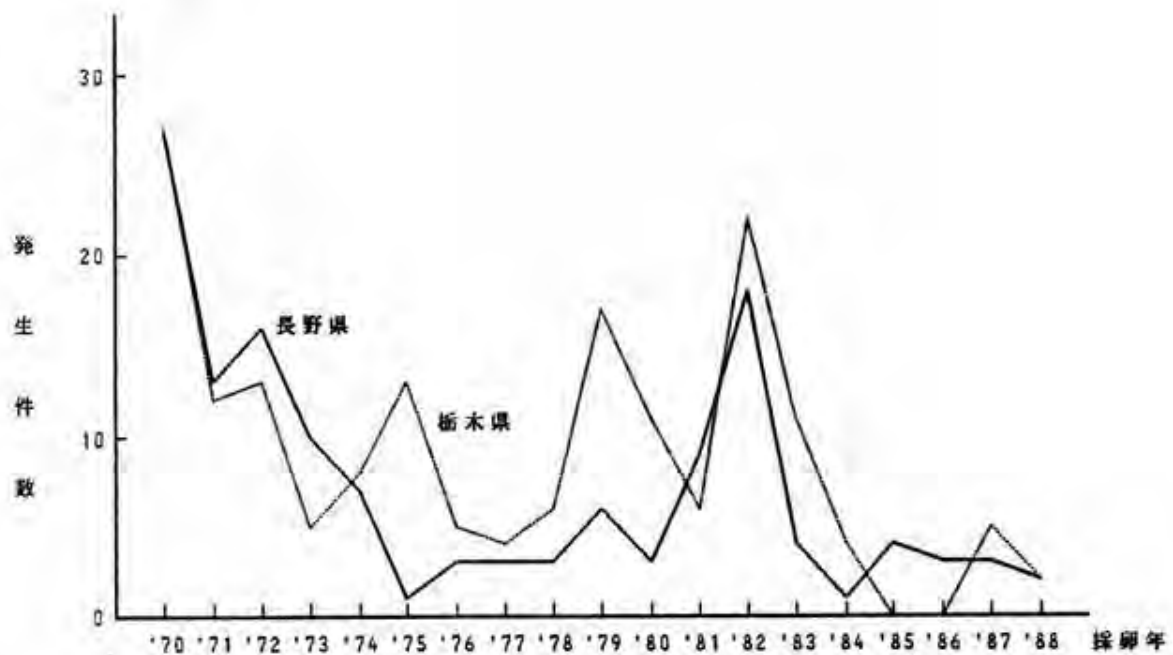


図-5 長野県と栃木県におけるニジマスの子ノ病の流行形態の比較

アマゴ

養鱒技術研究協議会の調査(1989)によれば、長野県のアマゴ生産養魚場の数は65カ所で、岐阜県の76カ所に次いで多く、兵庫県は20カ所、岡山県は43カ所であるが、各県の発生件数の最も多かった年を比較すると、岐阜県の1980年と1982年の9件、兵庫県の1987年の20件及び岡山県の1980年の9件に対して、長野県は1981年の2件で、アマゴ生産養魚場の数と比較し

て発生件数が少ない。長野県におけるアマゴの子ノ病の発生件数が他のアマゴ生産県に比べて少ないのは、アマゴ養魚場のほとんどが山間地に散在していること、種苗については他県との交流がないこと、稚魚の飼育には水温の低い河川水が使用されていること等が理由として考えられる。アマゴの養殖の歴史がニジマスに比較して浅いので、子ノ病に関する研究も少なく、今後解決しなければならない問題が多いと考えられる。

小 括

1960～1988 年の間に全国及び長野県の I P N の発生経過を調べ、以下の結果を得た。

(1) 1970 年以前は主に病魚の症状から診断されていたが、その後病理組織学的知見が加えられるようになり、1970 年以降は培養細胞を用いたウイルス学的診断法が導入された。当初は原因が不明のため「不明病」と呼ばれていたが、I P N であることが病魚の症状及び病理組織学的所見によって明らかにされた。

(2) ニジマスにおける全国の I P N 発生件数の年次変化を、1970 年以降についてみると、1972 年をピークにその後は減少傾向にあり、これは I P N 感受性魚の淘汰及び I P N ウイルスに対する抵抗性の獲得によるものと考えられる。また、発生件数の増減は 3～4 年を周期として規則的に繰り返されていることから、循環変化 epidemic cycle と一致すると考えられた。

さらに、発生件数の増減の周期とニジマスの成熟年齢とが一致することから、I P N を耐過した魚が成長して成熟しキャリアーとなって次世代に I P N を伝えている可能性が示唆された。

(3) 長野県においては、1965 年以降にニジマスの I P

N の発生が確認されており、水温 10～13℃の湧水を使用する養魚場の多い明科町、穂高町、及び豊科町地区での発病例が多く、8℃以下の水温域では発病がみられないことがわかった。1965～1988 年までの間の I P N 発生件数の年次変化をみると、1970 年と 1982 年の 2 回流行のピークをもつ二峰性を示し、その間隔が 2～7 年で規則的な周期性を示さないこと等、全国の I P N の流行形態とは異なっていた。

(4) 長野県では、1974～1980 年の間に I P N の発生件数が減少したが、この原因として 1973 年産ニジマス稚魚に初めて発生し、その後例年発生が続いている伝染性造血器壊死症 (I H N) の影響が考えられた。I H N の発生がなければ、長野県におけるニジマスの I P N の流行形態は、基本的には全国の I P N の流行形態と相似したものと考えられる。

(5) アマゴの I P N の全国における発生経過は、1971 年に初発生が確認されて以来発生数が少なかったが、1987 年の 29 件をピークにして近年はやや増加の傾向にあり、養殖生産の阻害要因となるか否か今後の動向を見守る必要のあることを指摘した。

第3章 長野県におけるIPNの発生と環境要因との関係

前章において、わが国ならびに長野県における約30年間にわたるIPN発生の動態を解析したが、一般に伝染性疾患の流行は病原体と宿主及び環境の三要因の相互の均衡がくずれることによって、現れることが知られていることから(Sniaszko, 1974)病原体の排除あるいはこれらの要因の均衡を保つことが、養殖管理技術であるといえることができる。

本章では長野県におけるIPNの発病事例の調査を基に、IPNの発病流行を病原体の存在だけでなく、環境要因をはじめ宿主との相互関係について分析して疫学的に検討した。まず第1節では飼育水温がIPN症状の発現に及ぼす影響について検討し、第2節では発眼卵の由来などによる伝染源及び伝播経路を疫学的に検討し、第3節ではIPNの宿主要因としての魚種が重要と考えられることから、ニジマス以外に発病のみられた魚種として、アマゴの発病事例を検討し、さらに第4節では病原体そのものについて、長野県で分離されたIPNウイルスの血清型について検討した。

第1節 飼育水温とIPN症状発現の関連について

IPNは稚仔魚期に発生して病勢が急激であること、広く伝播すること、被害が大きいこと等から、養殖現場では推定的な情報より得られないとはいえ症状診断による速やかな当面对応が必要で、病魚の症状の把握が極めて重要となっている。IPNの主な症状としては、魚の行動及び外部所見として、旋回遊泳、体表全体の黒化、眼球突出、腹部膨満、鰭基部を含む腹部の出血、鰓の貧血、肛門から糸状の粘液便の懸着などで、さらに内部所見としては心臓、肝臓及び腎臓の貧血と幽門垂及びその周辺の脂肪組織にみられる多数の点状出血などの他に消化管には餌が入っておらず、胃や腸の前部に透明ないしは乳状の粘液が貯溜し、胃は白く見える等の症状が報告されているが(Wood *et al.*, 1955; Sniaszko *et al.*, 1959; Wolf and Quimby, 1967)、症状と水温との関係についての研究はほとんど行われていない。そこで、本節では、発病時の飼育水温条件の違いと、IPNの症状の発現傾向の関係について発生事例をもとに検討した。

材料と方法

ニジマス稚魚の疾病調査: 1970年12月から1971年7月の間に、長野県下のニジマス養魚場に発生した稚魚のへ

い死事例について、発病時と終息時に2回の現地調査を行った。発病時の調査は発病5~10日後でへい死数の増加が認められた時点から最盛期とみられる時期に行い、餌付け後の週齢(発病週齢)、飼育魚数、へい死魚数等を調査した。終息時の調査では、へい死魚の状況と経過、へい死魚数を調べた。なお、Frantsi and Savan (1971b); Dorson and Torchy (1981)は、発病時の魚の大きさとして、ふ化後の週齢を用いているが、IPNでは発病が餌付け以降であること、養魚場の管理作業上では餌付けの月日が正確に記録されていること等の理由から、本研究では特に明記しない場合は、餌付け後の週齢によった。

飼育水温の測定: 発病期間中の飼育水温を正確に記録するため、二重管標準温度計(東亜計器製作所)で補正したアルコール棒温度計を用いて、養魚場の飼育担当者が毎日午前9時と午後3時の2回測定した。

病状の調査: 症状の調査は、発病がみられた魚群を対象に飼育池での魚の行動及び外部所見を観察した。特にIPNについては、観察された症状をIPNの主な症状17項目を記載した調査用紙にマークする方法により行い、調査担当者の個人差を少なくするよう努力した。

病原体調査: ひん死魚を採取して細菌、寄生虫及びウイルス検査を行った。細菌検査は、組織の塗抹標本の観察及び菌の分離を行い、菌の分離は患部及び腎臓をTS寒天培地或いは普通寒天培地に接種し、20~25°C、48時間培養により行った。外部寄生虫は体表面よりかき取った粘液及び鰓弁を、内部寄生虫は内臓諸器官の組織或いは内容を湿潤封入標本として、光学顕微鏡の10~500倍で観察した。

IPNウイルスの分離・培養: IPNウイルスの分離は、ひん死の稚仔魚は全魚体を、4~6cmの稚魚では腎臓を含む内臓全体を、6cm以上の大きな稚魚では心臓、腎臓を、また親魚では体腔液、精液及び糞を分離試料として用いた。試料は5尾分を1検体として、魚体及び臓器は乳鉢で磨砕してpH7.0~7.3のHanks' BSSに懸濁し、3,000rpmで10分間遠心分離を行い、その上澄を0.45µm孔径のフィルターでろ過して、接種ろ液を調整し、これをRTG-2或いはCHSE-214細胞に接種し、15°Cで10日間培養して細胞変性効果(cytopathic effect; CPE)の発現により、ウイルスの存在を確認した。体腔液及び精液ではHanks' BSSに懸濁して、遠心分離を行って接種ろ液を調整し、以下は魚体及び臓器と同様に培養細胞に接種した。培養細胞は、10%牛胎児血清(Gibco)、100IU/ml ペニシリン及び100µg/ml ストレプトマイシンを添加したEagleのMinimam Essential Medium; MEM (Gibco)を用いて培養した。

長野県産種卵の他県における発病状況調査：長野県産のニジマス発眼卵が他県の養魚場で飼育された場合の稚魚のへい死事例のうち、1971年12月から1972年5月の間に北海道、栃木、群馬、新潟、静岡及び宮崎県で発生した疾病について、各県の水産試験場の協力を得て、長野県で実施したと同様の方法によって調査した。

結 果

ニジマス稚魚のへい死事例：1970～1972年の調査期間中に発生したニジマス稚魚のへい死事例を表-9に示した。長野県では67例、その他北海道17例、栃木県22例、

群馬県18例、新潟県39例、静岡県34例及び宮崎県13例の合計210例で、そのうち112例がIPNと診断された。長野県産発眼卵からの稚魚に発生したIPNの症例は、長野県の30例、その他北海道1例、栃木県6例、群馬県4例、新潟県2例、静岡県8例及び宮崎県10例の合計61症例であった。IPN以外の疾病によるものは長野県では細菌性鰓病13例、ビブリオ病2例、原虫症10例、細菌性鰓病と原虫症の合併症が5例及び原因不明が7例の合計37例であった。長野県以外では細菌性鰓病14例、ビブリオ病7例、原虫症8例、細菌性鰓病と原虫症の合併症が20例及び原因不明が12例の合計143例であった。

表-9 1970～1972年における長野県及びその他の道県におけるニジマス稚魚のへい死事例

	長 野	長 野 県 以 外 の 県						小計	計
		北海道	栃木	群馬	新潟	静岡	宮崎		
IPN	30 (30)	3 (1)	12 (6)	11 (4)	27 (2)	19 (8)	10 (10)	82 (31)	112 (61)
細菌性鰓病	13	5	1	4	2		2	14	27
ビブリオ病	2		2			5		7	9
原虫病	10	1	1	2	3	1		8	18
細菌性鰓病+原虫病	5		4	1	5	9	1	20	25
不 明	7	8	2		2			12	19
計	67	17	22	18	39	34	13	143	210

() 長野県産発眼卵由来の稚魚に発生したIPN

長野県のIPNの症例：長野県のIPN症例の発病時の飼育条件と症状の発現傾向の関係を表-10に示した。

発病時期は12～5月、発病時の水温は8～14℃、発病週齢は1～10週、最大日間へい死率は0.1～8%、累積へい死率は20～85%であった。症状としては消化管内の粘液、腹部突出、体色黒化及び旋回狂奔が観察される頻度が高く、続いて鰭のすれ、糞の懸着、肝臓の白化・黄化、眼球突出がみられ、さらに頻度の低い症状としてはピンヘッド、幽門垂の出血斑、鰓の貧血、動きの鈍化、腹部膨満、腹水の貯溜、鰓の膨潤及び成長の良い魚のへい死等であった。

長野県以外のIPN症例：長野県以外のIPN症例の症状と発病時の飼育条件を表-11に示した。

発病時期は12～5月、発病時の水温は8.9～16.7℃、発病週齢は1～9週、最大日間へい死率は0.3～6.5%、累積へい死率は23～96%であった。症状としては旋回狂奔、消化管内の粘液、動きの鈍化、腹部突出及び体色黒化が観察される頻度が高く、続いて糞の懸着、成長の良い魚のへい死、肝臓の白化・黄化がみられ、さらに頻度の低い症状としてはピンヘッド、眼球突出、鰭のすれ、鰓の貧血、腹部膨満、腹水の貯溜、鰓の膨潤、体表粘液の異常及び幽門すい出血斑等であった。

考 察

ニジマス養殖の適水温は、10～20℃とされている(谷崎他, 1967)。長野県では明科、穂高、豊科地区が豊富な湧水に恵まれ、主産地を形成しており、このため調査した30カ所の養魚場のうち、70%に当たる21カ所が10～13℃の水温であり、水温範囲の偏った傾向があることから、他の水温におけるIPNの発生状況を詳細に調査するためには、長野県以外の発病事例を比較検討することが必要である。そこで、長野県で生産された種卵が他の県へ出荷されたものを含めた長野県での30例、北海道他4県の31例の合計61症例をもとに、発病時の飼育水温とIPN症状の発現との関連を検討した。発病時の水温を長野県で養殖が行われている10～13℃を中心として8～10℃、13～15℃及び15℃以上の4段階に区分した場合に、8～10℃、10～13℃、13～15℃及び15℃以上の4水温区分での発生数はそれぞれ10、26、15及び10例で(表-12)、これによりIPNの発病水温のほぼ全般について把握できると考えた。まず水温区別に発病週齢、最大日間へい死率及び累積へい死率を比較すると表-13に示すようになる。

発病時の水温と発病週齢の関係についてみると、8～10℃では6週齢以上での発病が40%、10～13℃では4～

表-10 長野県の養魚場におけるニジマス I P N の症状と発病時の条件

養魚場名	発病時期 年.月	発病時水温 (°C)	発病週齢	最大日間へい死率 (%/日)	累積へい死率 (%)	回旋狂奔	腹部突出*1	腹部膨満*2	腹水の貯留	眼球突出	成長の良い魚のへい死	ピンヘッド	体色黒化	鰓貧血	鰓膨潤	鰭のすれ	糞の懸着	動きの鈍化	体表粘液の異常	消化管内に粘液	肝臓の白化・黄化	幽門垂の出血斑
N-1	71.1	8.5 ~9	4	0.5	50	○		○	○	○		○	○	○						○	○	
N-2	71.2	8	2	0.7	70			○	○			○	○							○		
N-3	71.2	8	4	0.7	75			○				○	○							○		
N-4	71.3	9	6	1	50			○	○	○		○	○				○	○		○	○	
N-5	71.1	12.5	1	5.5	70	○	○					○	○							○		
N-6	71.1	10	2	4.5	70	○	○					○	○							○		
N-7	71.1	12.3	3	5.5	70	○	○					○	○					○		○	○	
N-8	71.5	12.5	3	0.1	40			○	○							○		○			○	○
N-9	71.1	11	4	0.3	60	○	○					○	○								○	○
N-10	71.2	11.5	4	5.5	60	○	○					○	○				○			○		
N-11	71.2	12.5	4	1	40			○	○	○			○					○		○		
N-12	71.3	12.5	4	1		○	○			○			○	○		○	○			○	○	
N-13	71.3	12.5	4	1	60	○	○			○			○							○		
N-14	71.1	12.5	5	0.1	20			○	○	○		○	○				○	○		○		
N-15	71.2	11.5	5	1.5	80	○	○					○	○		○					○		
N-16	71.3	12.5	5	1.5	65	○	○							○						○		○
N-17	71.3	12.5	6	2.5	60			○	○						○	○	○	○		○	○	○
N-18	71.2	11.5	7	2	70	○	○							○	○		○			○		○
N-19	71.4	11.5	7	1	75	○	○							○	○					○		○
N-20	71.5	12	7	0.7	60			○	○	○		○	○		○		○			○		○
N-21	71.5	12	7	0.7	30						○	○	○							○		○
N-22	71.3	11	9	1	80	○	○						○							○		○
N-23	71.3	10.7	9	0.1	40			○	○			○				○				○		○
N-24	71.3	11	9	0.2	40			○	○				○			○				○	○	○
N-25	71.7	11.5	10	0.5	40										○					○	○	○
N-26	70.12	13.5	1	8	80	○	○								○	○	○	○		○		○
N-27	70.12	13.5	3	2	75					○					○	○	○	○		○		○
N-28	71.1	14	3	5	85			○	○						○	○	○	○		○		○
N-29	71.5	13	4	1	80	○	○				○				○	○	○	○		○		○
N-30	71.3	13.5	7	1	60			○	○						○	○	○	○		○		○

(養魚場名 N:長野県)

*1 腹の前部が突出し、胃に粘液が貯留する。

*2 腹の全体が膨張し、腹水が貯留する。

表-11 長野県以外の養魚場におけるニジマス I P N の症状と発病時の条件

養魚場名	発病時期 年.月	発病時水温 (°C)	発病週齢	最大日間へい死率 (%/日)	累積へい死率 (%)	回旋狂奔	腹部突出*1	腹部膨満*2	腹水の貯留	眼球突出	成長の良い魚のへい死	ピンヘッド	体色黒化	鰓貧血	鰓膨潤	鱗のすれ	糞の懸着	動きの鈍化	体表粘液の異常	消化管内に粘液	肝臓の白化・黄化	幽門垂の出血斑
H-1	72.4	9.5	6	2.5	90	○		○	○	○						○	○					
T-1	72.2	8.9	4	1.6	23	○		○				○	○			○	○	○		○		
T-2	72.2	9.5	6	5.8	77	○		○	○	○		○	○			○	○	○		○		
T-3	72.1	10	5	3	70	○	○			○	○		○			○	○	○		○		
T-4	71.12	13.2	1	2	62	○	○			○			○			○	○	○		○		
T-5	72.3	14.1	4	3	48	○	○					○	○				○	○		○		
T-6	72.4	15	6	0.3	51	○	○				○						○	○		○		
G-1	71.12	12.5	2	1	80	○	○		○	○	○	○	○				○	○		○		
G-2	72.2	11.7	4	6.3		○	○				○	○	○				○	○		○	○	
G-3	72.1	13.5	3	1.7	40	○	○			○			○	○			○	○		○		
G-4	72.2	14	3	4	96	○	○				○		○				○	○		○		
Ni-1	72.3	9.5	9	0.4												○	○			○	○	
Ni-2	72.3	11	4	0.7	30											○	○			○	○	
S-1	72.2	9	3	2.5	40	○		○	○	○			○			○	○	○		○		
S-2	72.3	9.5	3	5	90	○		○				○	○		○		○	○		○		
S-3	72.1	11.5	2	5	80	○	○			○			○				○	○	○	○		
S-4	72.1	13.6	3	3.3	60	○	○				○		○	○				○	○	○		
S-5	72.1	14	3	5	95	○	○						○					○	○	○		
S-6	72.1	14	3	3.3	60	○	○				○		○					○	○	○		
S-7	72.5	13.5	6	6.5	70	○	○					○	○			○	○	○		○		
S-8	72.4	13.5	6	5.5	62	○	○				○		○				○	○		○		
M-1	72.1	13.2	1	3	69	○	○						○					○	○	○		
M-2	72.2	15.5	1	3.6	67	○	○						○					○	○	○		
M-3	72.1	16.2	1	2.5	69	○	○						○					○	○	○		
M-4	71.12	16.6	1	3.9	77	○	○				○							○	○	○	○	○
M-5	72.1	16.4	1	5	58	○	○											○	○	○		
M-6	72.1	16.7	1	3.7	57	○	○						○					○	○	○		
M-7	72.2	16.1	2	4.2	76	○	○				○			○				○	○	○		
M-8	72.2	16.4	2	1	53	○	○						○					○	○	○		
M-9	72.1	16.4	3	2	59	○	○				○		○					○	○	○		
M-10	72.3	16.7	3	5	57	○	○						○					○	○	○		

(養魚場名 H:北海道、T:栃木県、G:群馬県、Ni:新潟県、S:静岡県、M:宮崎県)

*1 腹の前部が突出し、胃に粘液が貯留する。

*2 腹の全体が膨張し、腹水が貯留する。

表-12 長野県産ニジマス卵由来の稚魚に発生した I P N の症状調査における症例の水温区分別県別分布

県名 水温	長野	長野県以外の県						小計	計
		北海道	栃木	群馬	新潟	静岡	宮崎		
8～10℃	4	1	2		1	2		6	10
10～13℃	21		1	2	1	1		5	26
13～15℃	5		2	2		5	1	10	15
15℃以上			1				9	10	10
計	30	1	6	4	2	8	10	31	61

表-13 ニジマスの I P N 6 1 症例における水温区分別、発病時の週令とへい死傾向

水温	発病週令 (%)				最大日間へい死率 (%/日)	累積へい死率 (%)
	2週未満	2～4週未満	4～6週未満	6週以上		
8～10℃	0	30	30	40	0.4～5.8	23～90
10～13℃	3.8	19.2	42.3	34.6	0.1～6.3	20～80
13～15℃	20	53.3	6.6	20	1～8	40～96
15℃以上	50	40	0	10	0.3～5	51～77

6週齢未満が42.3%、13～15℃では2～4週齢未満が53.3%、15℃以上では2週齢未満が50%で、水温が低いと高週齢での発病は多く、逆に水温が高くなると若週齢での発病が多くなる傾向がみられた。発病時の魚の週齢が I P N ウイルスの病原性の発現に重要であることは、M' Gonigle(1941)によって最初に報告されており、実験的には Frantsi and Savan(1971b)が、ふ化後1ヵ月齢のカワマスの稚魚の場合に累積へい死率が83%であったのに対して、6ヵ月齢ではへい死がほとんどないこと、Dason and Torchy(1981)はふ化後1～2週齢のニジマス稚魚の累積へい死率が70%であったものが、20週齢ではへい死がほとんどないことを報告している。

次に、発病時の水温と最大日間へい死率との関係は、8～10℃では0.4～5.8%、10～13℃では0.1～6.3%、13～15℃では1～8%、15℃以上では0.3～5%となっており、飼育水温が高いと最大日間へい死率はやや高くなる傾向がみられた。しかし症例による変異幅が大きく、へい死率には水温以外の要因も強く影響しているものと考えられる。

発病時の水温と累積へい死率との関係についても、最大日間へい死率の場合と同様に症例による変異幅が大きく一定の傾向を見出すことはできなかった。しかし、現場の観察によると、10℃未満ではへい死は緩やかで長期間続くのに対して、15℃以上ではへい死が急激に起こり、しかも短期間に終息する傾向を認めている。水温とへい死の関係については、Frantsi and Savan(1971b)がカナ

ダで分離した I P N ウイルス株を用いてカワマス稚魚で検討し、累積へい死率は水温10℃で74%、15.5℃で46%、4.5℃で0%であったと報告している。また、Dorson and Torchy(1981)は Sp 株を用いて、ニジマス稚魚で検討し、累積へい死率は水温10℃で90%以上、16℃で0%、5.5℃で40%であったとしている。さらに Sano(1972b)は、日本で分離した I P N ウイルス株を用いたニジマス稚魚の累積へい死率を検討し、水温10℃で15%、14℃で78%、6℃で25%であったことを報告しており、ウイルス株による差が推定される。

以上のことから、飼育水温と発病週齢及びへい死の傾向については、8～10℃と水温が低い場合には6週齢以上の高週齢での発病が多く、症状の進行は緩やかでへい死が長期間続く慢性的であり、13℃以上の高い水温の場合には、2～4週齢の若週齢での発病が多く症状の進行は急で、へい死が短期間で終わる急性的であること、また10～13℃の水温の場合には、発病週齢が4～6週で、へい死の傾向も慢性的と急性的の中間的な亜急性的と考えられる。

次に、水温区分別に症状の出現率(100×各症状ごとの症例数/症例数)を求めて、表-14に示した。

I P N の症状のうち、出現率が60%以上の症状では8～10℃では腹部膨満、体色黒化、肛門に糞の懸着、消化管内の粘液、旋回狂奔、腹水の貯溜及びピンヘッドで、10～13℃では腹部突出をはじめ、消化管内の粘液、体色黒化及び旋回狂奔である。13～15℃では腹部突出、消化

管内に粘液、巡回狂奔、動きの鈍化及び体色の黒化で、さらに15℃以上では腹部突出、消化管内の粘液、巡回狂奔、動きの鈍化及び体色黒化と13～15℃の場合と同様で

あった。I P Nの水温区分ごとの症状の特徴をより明確にするために、水温と症状の出現率の関係を図-6に示した。

表-14 水温区分別ニジマス I P Nの症状の出現率 (%)

出現率 水温	80%以上	60～80%	40～60%	40%未満
8～10℃	・腹部膨満 (90) ・体色黒化 (80) ・糞の懸着 (80) ・消化管内に粘液 (80)	・巡回狂奔 (60) ・腹水の貯留 (60) ・ピンヘッド (60)	・眼球突出 (50) ・ひれのすれ (50) ・動きの鈍化 (50) ・肝臓の白化・黄化 (40)	・鰓の貧血 (20) ・体表粘液の異常 (10)
10～ 13℃	・腹部突出 (92.3) ・消化管内に粘液 (88.5)	・体色黒化 (65.4) ・巡回狂奔 (61.5)	・動きの鈍化 (52.3) ・糞の懸着 (42.3)	・肝臓の白化・黄化 (38.5) ・眼球突出 (30.8) ・鱗のすれ (26.9) ・ピンヘッド (26.9) ・幽門垂出血斑 (19.2) ・成長の良い魚の死 (15.4) ・体表粘液の異常 (3.8)
13～ 15℃	・腹部突出 (100) ・消化管内に粘液 (86.7) ・巡回狂奔 (80)	・動きの鈍化 (73.3) ・体色黒化 (66.7)	・鱗のすれ (46.7) ・糞の懸着 (40) ・肝臓の白化・黄化 (40)	・成長の良い魚の死 (33.3) ・眼球突出 (20) ・鰓の貧血 (20) ・ピンヘッド (13.3) ・幽門垂出血斑 (13.3) ・体表粘液の異常 (13.3)
15℃以 上	・腹部突出 (100) ・消化管内に粘液 (100) ・巡回狂奔 (100) ・動きの鈍化 (90)	・体色黒化 (60)	・成長の良い魚の死 (40)	・鰓の貧血 (20) ・糞の懸着 (10) ・幽門垂出血斑 (10)

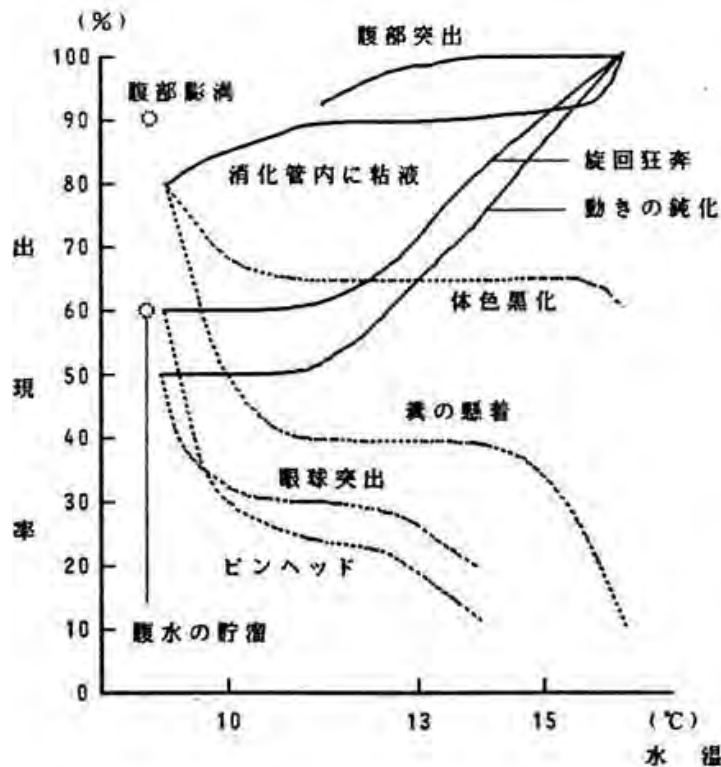


図-6 飼育水温と I P N症状の発現傾向

糞の懸着のように、8～10℃では80%、10～13℃では42.3%、13～15℃では40%、15℃以上では10%と水温が低いと出現率が高い症状と、巡回狂奔のように、8～10℃で60%、10～13℃では61.5%、13～15℃では80%、15℃以上では100%と、水温が高くなると出現率が高くなる症状に分けられた。水温が低いと出現率が高くなる症状としては糞の懸着の他に体色黒化、眼球突出及びピンヘッドがあり、一方、水温が高いと出現率が高くなる症状は巡回狂奔の他に腹部突出、消化管内に粘液及び動きの

鈍化等で、さらに腹部膨満及び腹水の貯溜は低い水温でのみ見られる症状であること等、症状の出現傾向が水温によって異なることが明らかになった。

このように、IPNの症状は水温によって特徴づけられるので、水温10℃以下の発病を慢性型、水温13℃以上の発病を急性型、この両者の中間の水温10～13℃での発病を亜急性型の3タイプに分別することができる。以上を整理して表-15に示した。

表-15 疫学的調査結果にもとづく、IPNの症状型の分別

型別	発病時の		発現の多い症状	症状の経過
	水温	週令		
慢性型	10℃以下	6週以上	腹部膨満 体色黒化 糞の懸着 眼球突出 ピンヘッド 腹水の貯溜	緩やかに進行し、 長期間へい死が続く
亜急性型	10～13℃	4～6週	腹部突出 消化管に粘液の貯溜 巡回狂奔	やや急速
急性型	13～15℃ (15℃以上)	2～4週 (2週未満)	腹部突出 消化管に粘液の貯溜 巡回狂奔 動きの鈍化	急速に進行し、 短期間に終息する

慢性型は、10℃以下の低い水温時における、6週齢以上の高週齢魚にみられ症状の進行は緩やかで、へい死は長期化する。病魚にはいくつかの症状が同時に発現し、腹部膨満、体色黒化、糞の懸着、眼球突出、ピンヘッド及び腹水の貯溜等がみられる。

亜急性型は、10～13℃の水温での4～6週齢魚での発病にみられ、症状の進行はやや急速で、主な症状としては腹部突出、消化管内に粘液の貯溜及び巡回狂奔等である。

急性型は、13～15℃の高い水温時における2～4週の若齢魚の発病にみられ、症状の進行は急速でへい死率が高く、主な症状としては腹部突出、消化管内の粘液、巡回狂奔及び動きの鈍化等の特徴的な症状の発現が一層明確にみられる。また15℃以上では、さらに若齢化して2週齢未満の稚魚に発病が多く、症状の進行がより急激な急性型の一種と考えられる。以上IPNは慢性型、亜急性型及び急性型に区別されるが、これと原因ウイルスの

血清型との関係の解明が今後必要であろう。

症状については、これまでの巡回狂奔、腹部突出や肛門から粘着便の懸着等が報告され(Wood *et al.*, 1955; Snieszko *et al.*, 1959)、IPNの特徴的な症状として知られている。一方、本研究では61症例を基にIPN症状を水温別の出現率で表すことによって、IPN症状を数量的に示した。その結果、腹部突出或いは腹部膨満、消化管の粘液の貯溜、巡回狂奔等の症状は出現率80%以上の高率で、これらをIPNでは多く出現する症状として示すことができる。さらに、10℃未満の低い水温から15℃以上のいずれの水温域においても、消化管内の粘液の貯溜症状の出現率が高いことは、M' Goneigle(1941)が本病に関する最初の報告で急性カタル性腸炎 acute catarrhal enteritis と名づけ、McKnight and Roberts (1976)が消化管の病変に注目しているように、IPNにおける消化管内の粘液の貯溜が、主要な症状であるといえることができる。

第2節 ニジマスの I P N 発生事例の伝播経路の解析

I P N の伝播経路は、親魚から卵を経て稚魚に感染する垂直伝播 (Snieszko *et al.*, 1957) と、ウイルスに汚染した用水或いは汚染物によって感染する水平伝播 (Reno *et al.*, 1960) が知られており、長野県における I P N の流行初期の発生事例について伝染源及び伝染経路を解明するために、種卵の由来等疫学的な検討を行った。

材料と方法

I P N 発生養魚場の調査: 1970 年 11 月～1971 年 5 月に、長野県内の民間養魚場で飼育中のニジマス稚魚に発生した I P N 疾病及び伝播に関する調査を、その終息時に行った。疾病に関する調査は発病時期、発病期間中の飼育水温、魚の大きさ (発病週齢) 及び累積へい死率等について行い、I P N の伝播に関する調査は種卵の由来、前年までの I P N の発病歴、上流にニジマスを飼育する養魚場の有無及び上流の養魚場での I P N の発生の有無、魚の池間の移動或いは人や車による他の養魚場との交流の有無、さらに新設池と発病の関係等を調べた。

種苗用ニジマス卵生産養魚場の調査: 1971 年 12 月に、県内 5 ヶ所の主要ニジマス発眼卵生産養魚場について販売先における I P N 発病の有無、卵生産養魚場における I P N 発病の有無及びふ化時期の飼育水温等の調査並びに飼育親魚のウイルス検査を行った。検査試料は、採卵時の雌親魚の体腔液をほぼ等量ずつ 5 尾分をプールして 1 検体とし、5 検体を採取した。体腔液は、そのまま氷冷して水産試験場に運び、即日ウイルス分離のために Hanks' BSS で 1 ; 10 に希釈し、ろ過除菌後培養細胞に接種し、第 3 章第 1 節同様ウイルス検査した。

結 果

I P N の発病した養魚場の調査によって、1970 年 11 月～1971 年 5 月に発生した I P N は 27 症例確認されたが、そのうち卵の由来と発病の経過が明らかにされた 21 症例について、調査結果の概要を表-16 に示した。

発病期間中の水温は 8～14.7℃、発病週齢は 1～9 週、累積へい死率は 20～85% で、種卵の由来では Su 養魚場産の発眼卵からの稚魚に発病のみられた養魚場が 17 ヶ所で最も多く、Su と Ta 養魚場産の発眼卵の 2 群の発眼卵からの稚魚に発病のみられた養魚場が 1 ヶ所、Su と Tu

養魚場産の発眼卵からの稚魚に発病のみられた養魚場が 1 ヶ所及び To 養魚場産の発眼卵からの稚魚に発病のみられた養魚場が 1 ヶ所であった。

I P N の伝播に関する事項についてみると、上流に養魚場があり発病したものは 21 症例中 6 例であるが、いずれも上流の養魚場でも発病が認められており、上流に養魚場はないが発病した事例は残りの 15 例であった。養魚場間の魚の移動或いは出荷作業等のための人や車の交流についてみると、他の養魚場との交流があった事例は 21 症例中 15 例、交流はないが発病した事例は残りの 6 例であった。I P N の病歴の有無と発病の関係についてみると、1967 年～1969 年に発病経歴がないにもかかわらず発病した事例が 21 症例中 5 例、発病経歴 1 回が 4 例、2 回が 9 例、3 年連続して発病した事例が 3 例であった。新設池における発病が 21 症例中 4 例あったが、これらはいずれも上流には養魚場がなく、発眼卵が導入されて飼育が開始されていたもので、I P N は卵とともに伝播したものと考えられる事例である。さらに 21 症例中 6 例は、1968 年～1969 年に池が新設された年に I P N が発生していることから、新設池における発病は 21 例中計 10 例であった。

種苗用のニジマス卵生産養魚場の調査によって、卵生産養魚場別に販売先の養魚場における I P N の発生状況を調べた概要を表-17 に示した。

Su 養魚場は発眼卵を 104 ヶ所に販売したが、そのうち 20 ヶ所 (19.2%) で発病し、発病件数が最も多かった。次に Tu 養魚場は発眼卵を 38 ヶ所に販売して、そのうち 2 ヶ所 (5.3%) で発病した。To 養魚場は発眼卵を 30 ヶ所に販売して、1 ヶ所 (3.3%) で発病し、さらに Ta 養魚場は発眼卵を 21 ヶ所に販売して、同じく 1 ヶ所 (4.8%) で発病した。一方 Wa 養魚場は発眼卵を 15 ヶ所に販売したが、販売先では発病がみられなかった。

種苗用ニジマス卵生産養魚場における、I P N の発病状況及び採卵親魚のウイルス検査の結果は表-18 に示すとおりで、5 ヶ所の卵生産養魚場のすべてが I P N ウイルス陽性であったが、Su 養魚場の 3～4 月の水温が 10℃以上に上昇した時期に、前節で述べた慢性型の症状を示す I P N の発病が認められた他は、各養魚場とも飼育稚魚に顕著なへい死は認められなかった。Su 養魚場のふ化期の水温は 8～11.5℃で、他の卵生産養魚場では 6～10℃であった。

表-16 長野県内のニジマス養魚場で発生したIPNの疫学調査

No.	養魚場名	発病時期 年・月	発病期間の 水温 (°C)	発病 週令	累積 へい 死率 (%)	種卵の 由来 *1	上流に養 魚場の有 無とその 発病状況	他の養魚 場との交 流の有無	発病経歴			*2
									'67	'68	'69	
1	豊科町 H	70.12	13.5~14.0	3	75	Su, Ta	無	有	—	—	—	
2	豊科町 Hi	70.12	13.0~14.0	1	80	Su	無	有	—	—	—	
3	明科町 O	71. 1	12.5~13.0	5	20	Su	無	有	●	●	●	
4	明科町 T	71. 1	12.5~13.0	1	70	Su, Tu	無	有	●	●	●	
5	松本市 K	71. 1	12.3	3	70	Su	無	無	○	●	●	
6	須坂市 U	71. 1	14.0	3	85	Su	無	無	—	●	●	
7	穂高町 I	71. 1	8.5~9.0	2	50	Su	無	有	—	—	—	
8	松本市 S	71. 1	8.0~10.5	3	70	Su, Tu	無	有	—	●	○	
9	明科町 Se	71. 1	9.5~10.2	2	70	Su	有・発病	有	—	—	●	
10	穂高町 M	71. 1	11.0~11.5	4	60	Su	無	有	—	●	●	
11	須坂市 S	71. 2	11.5	5	80	Su	無	無	●	○	●	
12	八千穂村 S	71. 2	11.5	4	60	Su	無	無	—	●	●	
13	明科町 K	71. 2	11.0~12.0	5	70	Su	有・発病	有	○	○	○	
14	穂高町 S	71. 3	12.0~13.0	4	—	Su	有・発病	有	○	●	○	
15	穂高町 Hn	71. 3	12.0~13.0	5	65	Su	無	有	—	●	●	
16	穂高町 T	71. 3	9.0~12.0	6	80	Su	有・発病	有	○	●	●	
17	明科町 Su	71. 3	8.0~11.0	9	60	Su	有・発病	有	●	●	●	
18	信濃町 T	71. 3	9.0~12.5	9	40	To	無	有	○	●	●	
19	佐久市 O	71. 4	9.0~12.0	6	50	Su	無	無	—	—	—	
20	池田町 K	71. 4	13.5	7	60	Su	無	無	○	○	●	
21	明科町 Tk	71. 4	14.7	2	85	Su	有・発病	有	●	○	●	

*1 種卵生産業者名

*2 ●：発病あり ○：発病なし —：養魚池未造成

表-17 長野県内のニジマス卵生産養魚場別の販売先におけるIPNの発生状況(1970年~1971年)

卵生産養魚場	販売先の養魚場			100×A/C
	発病養魚場数 (A)	非発病養魚場数 (B)	合計 (C)	
明科町 Su	20	84	104	19.2
岡谷市 Tu	2	36	38	5.3
茅野市 To	1	29	30	3.3
大桑村 Ta	1	20	21	4.8
信濃町 Wa	0	15	15	0
計	24	184	208	

表-18 長野県内のニジマス卵生産養魚場別におけるIPNの発生状況と採卵親魚のウイルス検査結果(1971年12月)

	IPNの発病	IPNウイルス検出	ふ化期間の飼育水温 (°C)
明科町 Su	有	+	8~11.5
岡谷市 Tu	無	+	9~10
茅野市 To	無	+	8~10
大桑村 Ta	無	+	6~8.5
信濃町 Wa	無	+	6~8

考 察

長野県内で1970年11月～1971年5月に発生したIPNの症例を疫学的に解析したところ、次のような事項が明らかにされた。

県内の主なニジマス卵生産養魚場で飼育されている採卵親魚は、ウイルス検査の結果IPNウイルス陽性であったこと、新設池で非汚染飼育用水を用いたにもかかわらず発病した事例が10例あり種卵とともにIPNウイルスが持ち込まれたと考えなければならないこと、他の養魚場との交流のない養魚場での発病事例が6例みられたこと等から、長野県のIPNの伝播は、IPNウイルスに汚染されたニジマス発眼卵による垂直伝播が主要な伝染経路であると考えられる。

ニジマス養殖用種苗は発眼卵と稚魚とがあるが、発眼卵は適度な湿度を保てば簡便な箱詰め梱包によって数日間の輸送にも耐えることから、国内はもちろん国外への広域的な移動が可能であることもあって、発眼卵による種苗の流通が主流となっている。長野県では、1970年産の発眼卵は5ヵ所の卵生産養魚場で約6,000万粒生産され、その内の約4,000万粒が、県内の約160ヵ所の養魚場に、1経営体当たり10～50万粒単位で合計208件販売された。ニジマス養殖用種苗生産養魚場の中で、Su養魚場由来の卵は販売件数に対するIPN発病件数の比率が19.2%で、他の養魚場由来の卵の比率が0～5.3%であることに比較して著しく高く、卵の由来によって発病に差がみられた。卵によるIPNの伝播については、経卵感染の可能性がSnieszko *et al.* (1957)をはじめ古くから報告されておりIPN伝播の特徴とされてきたが、経卵感染を疑問とする報告もあり、Wolf *et al.* (1968)はキャリアー親魚由来の稚魚であっても、必ずしも発病しないことを明らかにしている。一方Dorson and Torchy (1985)は精子を介した感染を実験的に確かめているが、確証がなく現在も経卵感染の有無が論議されている。

一方、調査したいずれの事例においても同一養魚場内の連続した池や隣接する池での発病が認められること、上流にIPNの発生する養魚場がある場合に下流で発病していること、魚、人や車等の交流が多い場合に発病した事例が多いこと、過去にIPNの発病経歴がある養魚場では発病しやすいこと等、水平伝播と考えられる事例も多く認められた。実験的にはIPNウイルスを飼料に混ぜて、感受性を有する稚魚に与える(Wolf *et al.* 1960)か、IPNウイルス懸濁液に稚魚を浸漬することで感染発病(Reno *et al.* 1978)することから、消化管及び鰓が感染の重要な門戸と考えられている(Wolf *et al.* 1961)。養魚場では日常的にはキャリアー魚が、発病時には罹病

稚魚が大量のウイルスを水中に排出し、養魚用水中にIPNウイルスが多数存在すると考えられ、Desautels and MacKelvie (1975)は発病池の排水路の用水中で 10^5 TCID₅₀/mlの多量のウイルスが検出されることを報告している。以上のように、長野県内における養魚場のIPN症例の疫学的調査により、IPNが県内に短期間に伝播した要因は、種苗となる発眼卵を供給している主要な養魚場の採卵親魚がIPNウイルスに汚染されていたこと、汚染卵が県内養魚場をはじめとして広く供給されたことによる垂直伝播によって拡大し、その後水平伝播によって養魚場内及び養魚場間が汚染されたものと考えられる。このような事実からIPNの防疫対策としては、まず種卵生産養魚場が保有する採卵親魚を清浄化し、垂直感染経路を遮断することが重要で、次に養魚場における水平感染を防止するために、非汚染水による養殖をはじめ養魚場間の魚、人及び車や器材の交流を断ち切ることが重要と考えられた。

第3節 ニジマス以外のサケ科魚類のIPN発生事例の調査

IPNウイルス或いはIPN様ウイルスは、サケ科魚類をはじめとしてコイ(Ahne, 1980)、ウナギ(Sano *et al.*, 1981a)、ブリ(反町・原, 1985)等の魚類及び貝類(Hill, 1976ab)から分離されていて、宿主範囲が極めて広いことが特徴で今後さらに拡大するとみられている。しかしながら、感染はしていても発病の認められる魚種が限られており、さらにIPNが流行として認められるのは、養魚場で飼育されているサケ科魚類の一部であることもまた特徴的であり(Wolf, 1988)、多くの魚類では不顕性感染で経過する(Sonstegard *et al.*, 1972; Munro *et al.*, 1976; Ahne 1980)。

これまでわが国でIPNの発病流行が認められた魚種はニジマス(Sano, 1971a)であったが、アマゴにおけるIPNの発病が長野県で確認されたことから、その事例の検討及びその他のサケ科魚類のIPNウイルスへの感染の状況について検討した。

実験1 アマゴのIPNの発生事例

材料と方法

供試材料: 1972年5月に長野県須坂市M養魚場において飼育中のふ化後21週齢のアマゴ稚魚のひん死魚を用いた。体重は1.2～2.0g(平均1.8g)、体長4.0～4.5cmで、発病時の飼育水温は10.5～13.0℃であった。

卵の由来: 1971年10月に長野県水産試験場木曾川ふ化

場で採卵し、同年12月に発眼卵でM養魚場に移動したもので、その後はM養魚場でふ化飼育された。

病原体検査: 細菌及び寄生虫検査は30検体について、第3章第1節と同様の方法によった。ウイルス検査は、アマゴ稚魚のひん死魚の腎臓を含む内臓全部を用い、個体別に10検体について、第3章第1節と同様の方法によった。

I P N 抗血清による中和試験: 米国東部魚病研究所で調整され、東京水産大学から分与を受けた抗 I P N ウイルス多価家兎血清を用いた。PBS で 10^{-3} に希釈した抗血清と、アマゴ稚魚のひん死魚の内臓磨砕物を接種し CPE を発現した RTG-2 細胞培養液の上澄を PBS で 10^{-3} に希釈したものとを、等量混和して 20°C で 60 分間中和反応させ、混合液を RTG-2 細胞に接種してウイルス中和の有無を判定した。

感染試験: 2 週齢の長野水試産のニジマス稚魚 (体重 0.14g) 各 100 尾を供試し、1 ml のウイルス培養液を懸濁した 1000ml の飼育用水 ($10^{5.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$) に 60 分間浸漬した後、塩化ビニール製水槽 (20×30×15cm) に収容し、 13°C の流水で 30 日間飼育した。ウイルス培養液は、ミリポアフィルター (0.45 μm) でろ過して供試した。対照区は、ウイルス培養液の代わりに Hanks' BSS を懸濁したもので同様に処理した。へい死魚については、ウイルス検査を第3章第1節と同様の方法により行ない発病感染を確認した。

結 果

アマゴにおける I P N の発病事例を表-19 に示した。日間へい死率の最大は 2% であった。症状は体色黒化、腹部膨満、鰭のすれ、眼球突出及び腹鰭及び尻鰭の充血が著しかった。ひん死魚は、緩やかなキリモミ状の巡回

を繰り返しながらへい死するのが特徴であった。内部所見は、肝臓のうっ血と出血斑、腎臓の出血斑と腫脹、胃腸が透明ないし白色の粘液で充たされており、個体により血液の混じる腹水の貯溜が認められた。

表-19 長野県におけるアマゴの I P N の発病事例

発病時期	1972 年 5 月～6 月
飼育水温	10.5°C ～ 13.0°C
発病週令	ふ化後 21 週
体重	1.2～2.0 g (平均 1.8 g)
最大日間へい死率	2%
累積へい死率	28%
症状	外観所見 体色黒化、腹部膨満 ひれのすれ、眼球突出 腹びれ及び尻びれの充血 緩やかなキリモミ状巡回 内部所見 肝臓のうっ血と出血斑 腎臓の出血斑と腫脹 胃に粘液の貯溜

アマゴ病魚の病原体検査及び分離ウイルスの中和試験の結果を表-20 に示した。発病初期のへい死魚の一部の個体から、TSA 培地上に円形のコロニーを形成し、褐色の色素を産生して、鞭毛がなく、運動性のない短桿菌が検出され、培養性状と色素の産生性から *Aeromonas salmonicida* と同定した。その他へい死の原因となる細菌、寄生虫は検出されなかった。

表-20 アマゴの I P N の発病事例における病原体検査と分離ウイルスの中和試験

細菌検査	寄生虫検査	ウイルス検査	ウイルス中和試験	
			抗 I P N ウイルス血清	対 照
<i>Aeromonas salmonicida</i>				
2/30	0/30	10/10	+	-
検出個体数/検査個体数				

RTG-2 細胞にひん死魚の内臓磨砕物のろ液を接種し、 20°C で 20 時間培養後には、RTG-2 細胞が核濃縮を起こし、細胞は細くなって交互に離れ、糸屑状となって培養容器から離れるなど、ニジマスの I P N 感染試料と同様の特徴的な CPE (Wolfe and Qimby, 1973) が認められた。RTG-2 細胞による培養液のウイルス感染価は $10^{8.5}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ で

あった。中和試験の結果では、培養ウイルス液と抗 I P N ウイルス多価家兎血清との混液を、RTG-2 細胞に接種したところ、5 日後に部分的な CPE の発現がみられたのに対して、対照区では 3 日後に完全な CPE が現れ、一応 I P N ウイルス多価家兎血清によって中和されたと考えられ、分離ウイルスは I P N ウイルスと同定した。

このアマゴから分離した I P N ウイルスを、浸漬法によって人為感染させたニジマス稚魚のへい死状況を図-7 に示した。

ウイルス攻撃後 7 日目からへい死が始まり、腹部膨満、体色の黒化、眼球突出及び腹水の貯溜等の症状がみられ、

30 日間の累積へい死率は 18% となったが、対照区の 30 日間の累積へい死率は 7% であった。試験区のへい死魚からは接種 I P N ウイルスが回収されたが、対照区からは分離されなかった。

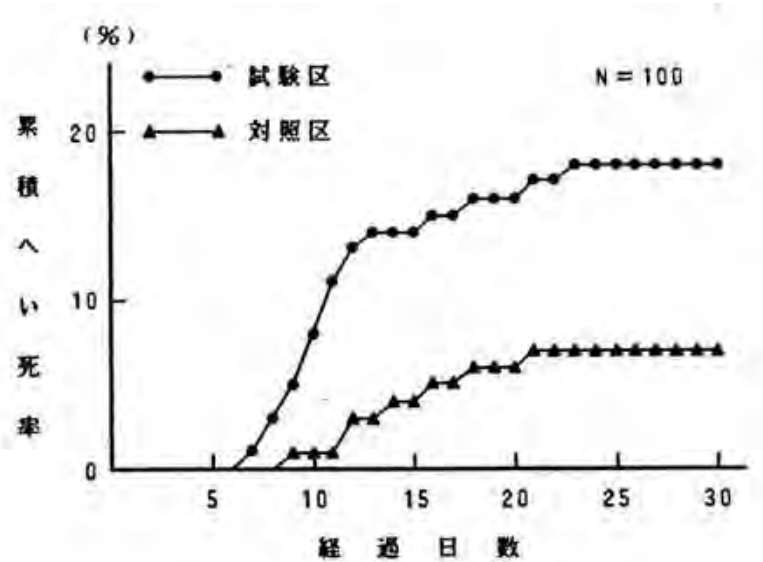


図-7 アマゴ病魚から分離した I P N ウイルスのニジマスに対する病原性

実験 2. その他のサケ科魚類の I P N 発生事例

材料と方法

供試材料：へい死を伴う異常が認められたイワナ、カワマス、ブラウンマス、ヤマメ及びコレゴヌス *Coregonus lavaretus marena* のひん死魚を用いた。ウイルス検査は、各魚種とも腎臓を含む内臓組織の 1 部を採取し、5 尾をプールした 1 検体を用い第 3 章 1 節と同じ方法により、培養温度 20℃とした。細菌及び寄生虫検査は、第 3 章第 1 節と同じ方法によった。

結果

長野県内の民間養魚場で、飼育中に異常へい死の認められた 5 種類のサケ科魚類稚魚のウイルス検査を表-21 に示した。

供試した 5 魚種すべてから I P N ウイルスが分離されたが、他の病原細菌や寄生虫は検出されなかった。イワナでは腹部膨満、腹水の貯溜及び旋回狂奔等の症状がみられ、カワマス、ブラウンマス、ヤマメ及びコレゴヌスでは、一部の供試魚に消化管内の粘液の貯溜や腹水の貯溜があったが、明らかな症状は認められなかった。

表-21 長野県における異常へい死の認められたニジマス以外のサケ科魚類からの IPN ウイルス分離状況

魚種	調査年月	体重 (g)	病原体検査		
			I P N ウイルス	細菌	寄生虫
イワナ <i>Salvelinus leucomaenis</i>	1974. 1	0.1	+	-	-
カワマス <i>S. fontinalis</i>	1987. 4	1~3	+	-	-
ブラウンマス <i>Salmo trutta</i>	1985. 4	0.2~0.3	+	-	-
ヤマメ <i>Oncorhynchus masou masou</i>	1977. 9	3.3	+	-	-
コレゴヌス <i>Coregonus lavaretus maraena</i>	1988. 7	0.5~3	+	-	-

考 察

実験1で、アマゴから分離したウイルスは、RTG-2細胞におけるCPEの形状及び抗IPNウイルス多価血清による中和試験によって中和されたことから、IPNウイルスと同定された。さらに、ニジマス稚魚を用いた感染試験によって、腹部膨満、体色の黒化、眼球突出及び腹水の貯溜等、本章第1節に示したニジマスにおけるIPNの慢性型と同様な症状が観察されたことから、この事例はアマゴのIPN感染発病と診断された。

このアマゴの発眼卵を生産した木曾川ふ化場では、発病した稚魚と同じ親魚群から生産された1971年産のアマゴが飼育されており、症状からはIPNの発生は観察されなかったが、ウイルス検査では稚魚及び親魚からIPNウイルスが検出されたことから、M養魚場に移入された発眼卵は、IPNウイルスに汚染されていた可能性が高い。

発病の初期は、前述のように*A. salmonicida*も分離されたことから、せつそう病を疑いサルファ剤(Sulfamonomethoxin;水産用ダイメトン)を1日当たり100mg/魚体重 7日間投与したが、へい死数は減少しなかった。しかし、腹鰭及び尻鰭の充血をはじめ、肝臓のうっ血と出血斑、腎臓の出血斑と腫大、個体によっては血液が混じる腹水の貯溜がみられる等、ニジマスのIPNでは認められなかった症状がみられたことから、本症例は当初せつそう病とIPNの混合感染であったものが、サルファ剤の投与によってせつそう病が抑制された結果、IPNが顕在化したものと考えられた。アマゴがIPNウイルスに感受性を有することは、Sano(1973)が人為感染実験によって明らかにしており、また反町・佐古(1982)は河川に遡上した降海性アマゴの健康魚からIPNウイルスを分離している事実からも明らかである。なおM養魚場では、発病したアマゴに隣接する池で、同時期にふ化したヤマメが飼育されていたが、ヤマメにはなんら異常は認められず、ウイルス検査の結果も陰性であった。Sano(1973)は、感染実験の結果から、ヤマメはアマゴやヒメマスに比べ、IPNへの感受性が低いことを報告しており、両魚種は分類学上近縁であっても両者のIPNウイルスに対する感受性に差があるのではないかと考えられた。

実験2では、長野県で飼育されているニジマス以外のサケ科魚類で異常へい死の観察された供試5魚種から、IPNウイルスが分離された。イワナ病魚の症状は腹部膨満、腹水の貯溜及び旋回狂奔等、本章第1節に示したニジマスのIPNにみられる慢性型症状に類似し、長野県内では年間3~4件の症例がその後も観察されており、

今後詳細な検討が行われることによってイワナのIPN被害が明らかにされるものと考ええる。カワマス、ブラウンマス、ヤマメ及びコレゴヌスにおける症状は、消化管内の粘液、腹水の貯溜等、ニジマスのIPNの慢性症状にやや類似すること、他の病原体が検出されないこと等からIPNウイルス感染による発病が疑われたが、飼育尾数が少ないために同様の症例が少なく、十分な観察が行えなかった。

第4節 長野県内で分離されたIPNウイルスの血清型

IPNウイルスには、米国で分離されたVR299(ATCC)、Buhl及びPowder Mill、フランスで分離されたBonnamy、d'Honninethun(Wolf and Quimby, 1971)、やデンマークで分離されたSp及びAb(Jorgensen and Grauballe, 1971)等が代表的な株として知られている。

Okamoto *et al.* (1983)は10種類の代表的IPNウイルス株について、交差中和試験による血清学的な類似性を検討し、VR299株をはじめとする米国株のグループ(I)、デンマークのSp株を含むグループ(II)、さらにデンマークのAb株(III)の3グループに大別したが、相互に交叉性があるなど、IPNウイルスの血清型は必ずしも明瞭に分けることが困難であるとの報告もある(Wolf and Quimby, 1971; Jorgensen and Kehlet, 1971; Lientz and Springer, 1973)。

一方、わが国のIPNの血清型に関する研究はSano(1971a)が静岡県の養魚場のニジマス稚魚から分離した4株について検討し、少なくとも2種類の血清型が存在することを報告しているのみで、それ以後IPNウイルスの血清学的検討はまったく行われていない。そこで長野県内の養魚場から分離されたIPNウイルス株について、中和試験を行い血清学的特性を検討した。

材料と方法

抗血清:水産庁の魚病診断液配布事業により配布を受けた、IPNウイルスのVR299、Sp及びAb株に対する家兎血清を用いた。

供試ウイルス株:1984~1989年に県内の養魚場から分離した19株を用いた(表-22)。供試ウイルス株は、-80℃に凍結保存しておいた分離株を、CHSE-214細胞を用いて培養した後、0.45µmのメンブランフィルターで、細胞片をろ過除去して培養ろ液とし、供試するまで-80℃に保存した。ウイルス感染価の測定は、マイクロタイタープレートを用いたTCID₅₀法により行った。なお、対照として供試したIPNウイルス株のうち抗血清とホモの株

VR-299、Sp 及び Ab の 3 株は、北海道大学から分与されたものである。

供試細胞：CHSE-214 細胞を、5～10%牛胎児血清 (FBS) 加 MEM 培地を用い、15℃で継代培養して、ウイルスの培養、感染価の測定及び中和試験に用いた。

中和試験：VR299、Sp 及び Ab 株に対する各抗血清の 20 倍希釈液を、マイクロタイタープレート上に 0.05ml 宛分注し、Hanks' BSS を用いて自動マイクロピペットで 20～480 倍に、2 段階希釈した。次に 30～1,000TCID₅₀/0.05 ml に希釈調整したウイルス液を、各希釈系列に 0.05ml 宛接種し、20℃の室温で振とうしながら反応させた。反応後、CHSE-214 細胞の分散浮遊液を 0.1ml 宛分注し、15℃で 10 日間培養した。CPE の発現結果から、Kaber 法(北村, 1976)を用いて 50% 中和価を算出した。

表-22 定量的中和試験に用いた I P N 分離株の由来

分離株	分離年月日	分離魚種	(体重 g)
P V 8405	1984. 8. 6	イワナ	(5～8)
P V 8501	1985. 4. 21	ブラウンマス	(1)
P V 8502	" 4. 21	ニジマス	(1～2)
P V 8601	1986. 1. 19	ニジマス	(0.5～0.7)
P V 8602	" 2. 10	ニジマス	(0.5～0.7)
P V 8605	" 5. 19	ニジマス	(1)
P V 8701	1987. 1. 26	ニジマス	(0.13～0.2)
P V 8706	" 4. 10	イワナ	(1.7)
P V 8708	" 4. 10	ニジマス	(0.3～0.5)
P V 8710	" 4. 10	ニジマス	(2.0)
P V 8712	" 8. 27	ニジマス	(0.3～0.5)
P V 8716	" 5. 30	アマゴ	(1.8～2.5)
P V 8717	" 5. 30	アマゴ	(3.7～5.5)
P V 8719	" 3. 9	* 養魚用水より分離	
P V 8730	1988. 1. 9	ニジマス	(0.2)
P V 8801	" 2. 3	ニジマス	(0.1～0.2)
P V 8802	" 7. 8	コレゴマス	(0.5～2.4)
P V 8803	" 11. 28	アマゴ	(5～15)
P V 8901	1989. 3. 12	ニジマス	(0.7～1.8)

結 果

I P N ウイルスの VR299, Sp 及び Ab 株を対象として、抗 VR299, Sp 及び Ab 株血清を用いて行った定量的中和試験結果を表-23 に示した。

抗 I P N ウイルス VR299 及び Sp 株血清の ND₅₀ はともに 1:1788、抗 Ab 株血清の ND₅₀ は 1:7079 であった。抗血清とホモの関係にある株による中和試験では、VR299 株と Sp 及び Ab 株とは血清学的に明らかに型別し得たが、Sp と Ab 株とは相互に交叉性が高く型別することはできなかった。従って供試抗血清では VR299 株と Sp 及び Ab 株の 2 つのグループにのみ型別可能なことになる。

表-23 I P N ウイルス株 (VR299、Sp、Ab) の定量的中和試験

抗血清	I P N ウイルス		
	VR299 (1000) *1	Sp (32)	Ab (56)
抗 VR299	1778 *2	80	56
抗 Sp	56	1778	1280
抗 Ab	<40	1778	7079

*1 中和試験時のウイルス液の感染価 (TCID₅₀/0.05ml)

*2 抗血清の 50% 中和価 (ND₅₀/0.05ml)

次に、長野県内の養魚場から分離された I P N ウイルス 19 株の中和試験の結果を表-24 に示した。供試 19 株のうち抗 VR299 血清の中和価のみが比較的高かった 2 株 (PV8716, 8802)、抗 Ab 血清の中和のみが比較的高かった 2 株 (PV8405, 8730)、並びに抗 VR299 と抗 Sp 及び抗 Ab 血清のいずれでも中和され傾向のはっきりしなかった 15 株 (PV8501, 8502, 8601, 8602, 8605, 8701, 8706, 8708, 8710, 8712, 8717, 8719, 8801, 8803, 8901) とに区分された。従って、3 種の抗血清のいずれでも明瞭な型別は出来なかったが、分離株は血清学的に交差反応性が高いことが分かった。

考 察

標準 I P N 株、VR299 株と Sp 株及び Ab 株の 2 株は中和試験により型別が可能であったが、Sp 株と Ab 株とは血清学的に明らかに型別できることができず、Okamoto(1983)の結果とは異なっていた。これは恐らく供試した抗 Sp 血清の特異性が低かったためと考えられる。

長野県内の養魚場から分離した I P N ウイルス 19 株はいずれも血清学的に交差反応性が高く、抗 VR299 血清或いは抗 Ab 血清と強い反応を示した分離株はそれぞれ 19 株中 2 株ずつで、他の多くの株は交差反応を示し血清型を特定できなかった。

Sano(1971a)は、静岡県県のニジマスから分離した 4 株の I P N ウイルスについて、抗 VR299、Buhl, Powder Mill, Bonnamy 及び d' Honnicthum 株の 5 抗血清を用いて中和試験を行い、3 株は Bohl 株に近く、他の 1 株はフランスの d' Honnicthun 株に近いことを報告している。しかし、抗 Buhl 血清を除き各株とも供試抗血清に対する交差反応性が高く、これら 4 株を明瞭に型別し得なかったとしており、本研究と同様の結果を報告している。

今後 I P N ウイルスの血清学的検討を進めるためには、特異性の高いモノクローナル抗体を用いるなど、精製された抗原を用いた抗血清を調製することにより、再検討されるべきと考える。

表-24 長野県内から分離された I P N ウイルス株の定量的中和試験

抗血清	I P N ウイルス株														
	PV8405 (178)*1	PV8501 (32)	PV8502 (1000)	PV8601 (562)	PV8602 (100)	PV8605 (32)	PV8701 (316)	PV8706 (178)	PV8708 (562)	PV8710 (56)	PV8712 (178)	PV8716 (32)	PV8717 (56)	PV8719 (32)	PV8730 (32)
抗 VR299	224 *2	1778	447	320	891	1778	447	224	160	1280	224	14125	2560	891	320
抗 Sp	320	640	160	160	447	2560	160	56	112	447	447	1778	447	320	224
抗 Ab	891	2560	447	640	1280	3548	320	112	320	891	640	1778	1774	640	1280

*1 中和試験時のウイルス液の感染価(TCID₅₀/0.05ml)

*2 抗血清の 50%中和価(ND₅₀/0.05ml)

抗血清	I P N ウイルス株			
	PV8801 (56)	PV8802 (32)	PV8803 (178)	PV8901 (316)
抗 VR299	891	5120	224	447
抗 Sp	447	320	160	320
抗 Ab	1280	891	160	447

小 括

長野県におけるサケ科魚類の I P N 発生事例をもとに、疫学的な検討を行い以下の結果を得た。

(1) 長野県産ニジマス卵由来の稚魚に発生した I P N の 61 症例について調査し、飼育水温と I P N 症状発現との関係、発病週齢とへい死の傾向との相互関係等から I P N を以下の 3 タイプに類別することができた。

慢性型は、10℃以下の低水温における 6 週齢以上の高週齢魚での発病でみられ、症状の進行は緩やかで、へい死は長期化する。この場合いくつかの症状が同時に発現し、腹部膨満、体色黒化、糞の懸着、眼球突出、ピンヘッド及び腹水の貯溜がみられる。

亜急性型は、10～13℃の水温における 4～6 週齢魚の発病にみられ、症状の進行はやや急速で、主な症状は腹部突出、消化管内に粘液の貯溜及び旋回狂奔であるが、特徴的な症状として旋回狂奔がみられる。

急性型は、13～15℃の高い水温における 2～4 週の若齢魚の発病にみられ、症状の進行は急で、へい死率が高く、へい死は短期間で終息する。主な症状としては腹部突出、消化管内に粘液、旋回狂奔及び動きの鈍化等が一層明確にみられる。また、15℃以上では、さらに若齢な 2 週未満魚の発病が多く、やはり急性型と考えられる。

(2) 長野県内における養魚場の I P N 症例の疫学的調査によって、I P N 流行の伝播様式として、ウイル

スに汚染されたニジマス発眼卵が関与した垂直伝播が明らかになった。また、I P N は同一養魚場において、連続する池や隣接する池での発病が多い、上流に発病した養魚場がある場合に発病する事例が多い、魚、人や車等の他の養魚場と交流が多い場合に発病が多いこと及び発病経歴のある養魚場では発病し易いこと等、水平伝播によりさらに同一地域内で汚染が拡大することが明らかとなった。

(3) 1972 年に、長野県の民間養魚場で、アマゴ稚魚に I P N の発病が初めて確認されたことから、わが国において産業的に被害が認められる魚種は、ニジマスとアマゴの 2 魚種となった。また、その他のサケ科魚類ではイワナ、カワマス、ブラウンマス、ヤマメ及びコレゴヌスから I P N ウイルスが検出され感染発病の可能性が考えられた。

(4) 1984～1989 年に長野県内の養魚場から分離された I P N ウイルス 19 株について、抗 VR299, 抗 Sp 及び抗 Ab 血清を用いて定量的中和試験を試みたところ、抗 VR299 血清により特に高い中和価で中和された 2 株、抗 Ab 血清で同様の傾向がみられた 2 株及び供試 3 種の抗血清のいずれによっても特異な中和傾向を示さなかった 15 株とに群別されたが、これら長野県内で分離されたウイルス株は、相互に交差反応性が高かったことから明瞭な血清型別はし得なかった。

第4章 I P Nの伝播に関する検討

第3章では、長野県内でのI P Nが流行初期に既に多くの養魚場に広く伝播していることを明らかにし、その流行要因としてI P Nウイルスに汚染されたニジマス発眼卵が伝染源として重要な役割を果たしていること、また発眼卵がニジマス種苗の流通の主体であることから、その流通に伴って流行が短期間にかつ広域的に生じたことを、発生事例の野外調査の結果から明らかにした。

本章では、I P Nの伝播の主要因である病原体について、第1節ではI P Nウイルスの魚群内における動態を明らかにするためニジマス稚魚、成魚(1年魚)及び親魚の成長段階別にウイルス保有率の変化を検討し、第2節では人為感染試験の結果から、I P Nウイルスの水平伝播による伝染経路に関する問題点を検討した。

第1節 ニジマスのI P Nウイルス保有状況

I P Nの伝染源として、I P Nウイルスに汚染された発眼卵、発病稚魚及びウイルスを保有する成魚(キャリアー・Carrier)が重要であり、キャリアーはI P N耐過魚をはじめ、外見は正常に見えるがI P Nウイルスを終生持続的に保有し、特に親魚では卵汚染の原因になると考えられている。

キャリアー魚のI P Nウイルス保有状況について、Billi and Wolf(1969)は、I P Nを耐過した18ヵ月齢魚のカワマスのウイルス保有率が約90%であったこと、Yamamoto(1974)はカワマス、ニジマスでは1年魚以上の魚で高い保有率であること、さらにYamamoto(1975b)はI P Nを耐過したニジマス親魚のI P Nウイルス保有率を5ヵ月にわたって調べ、その季節的な変動についても報告している。

本節では、I P Nウイルスの魚群内における動態を魚の成長過程を通じて明らかにするためニジマス稚魚、成魚(1年魚)及び親魚の成長段階別に、I P Nウイルスの保有状況を調べた。すなわち稚魚については、I P Nの発病から終息までの間における、発病魚群のウイルス保有率の経時的変化について(実験1)、また1年魚では県内の主要ニジマス養魚場のウイルス保有状況について(実験2)、さらに親魚では同一養魚場において、産卵期の親魚のウイルス保有率の経年的変化(実験3)を調べた。また発病中或いはI P Nを耐過した魚集団のウイルス保有状況の検討と共に、I P Nの発生

を経験していない養魚場の魚集団についても、ウイルス保有状況調査を行うことによって、長野県におけるニジマスのI P Nウイルス保有状況の実態を検討した。

実験1. ニジマス稚魚期におけるI P N発病から終息までのウイルス保有状況の変化

材料と方法

供試魚: 供試魚は、1971年2～5月に長野県豊科町H養魚場で飼育されていたニジマス稚魚を用いた。これらの稚魚は、長野県水産試験場産で同一親魚群から採卵し採卵日の異なる2群の発眼卵(1970年12月28日及び1971年1月4日採卵)を各10,000粒ずつH養魚場に運び、堅型ふ化槽でふ化させた後、ふ化仔魚を素掘の飼育池(6m², 1.5×4×0.2m)2ヵ所に放養して飼育した。飼育池の間隔は約5mであり、池の側面及び上面を金網で覆い、用具を共用しないこと等、病原体を人為的に伝播させないよう飼育管理を十分に注意をした。

飼育用水: 同養魚場内で自然湧出する地下水を、塩化ビニール製パイプで飼育池に直接入れたが、水温は試験期間中12.8～13.7℃であった。

飼料: ニジマス用クランブル(日配)を与えた。

試験期間: 餌付けから14週間とした。

ウイルス検査: 魚群中で健康状態が外見上良好と見做される魚を毎週1回、週の始めに10尾ずつ採取して試料とした。また、発病時には病魚と考えられても未だ遊泳力があり、外見上良好な魚を選んで採取して試料とした。採取した試料は、蒸留水で体表をよく洗浄し、10検体について個別に魚体をすべて用いて第3章第1節と同様の方法によってウイルス検査を行った。さらに、試験の終了5ヵ月後の10月に、体重10gに成長した同一魚群の稚魚を試料として、10検体について個別に内臓のウイルス検査を行った。

結 果

ニジマス稚魚のI P N発病魚群における、発病から終息までの1週間ごとのウイルス保有率の変化を図-8に示した。

前述のように同一親魚群から採卵し、採卵日が1週間異なる2群のニジマス発眼卵各10,000粒を、同一養魚場の同一条件下で互いに隔離された状態でふ化と飼育を行った。しかし、2群ともにI P Nの自然発病がみられ、採卵日が異なる両群の発病時期、症状の現れ方、へい死傾向などに差が認められなかったことから、主に12月28日採卵群の結果について以下に示す。

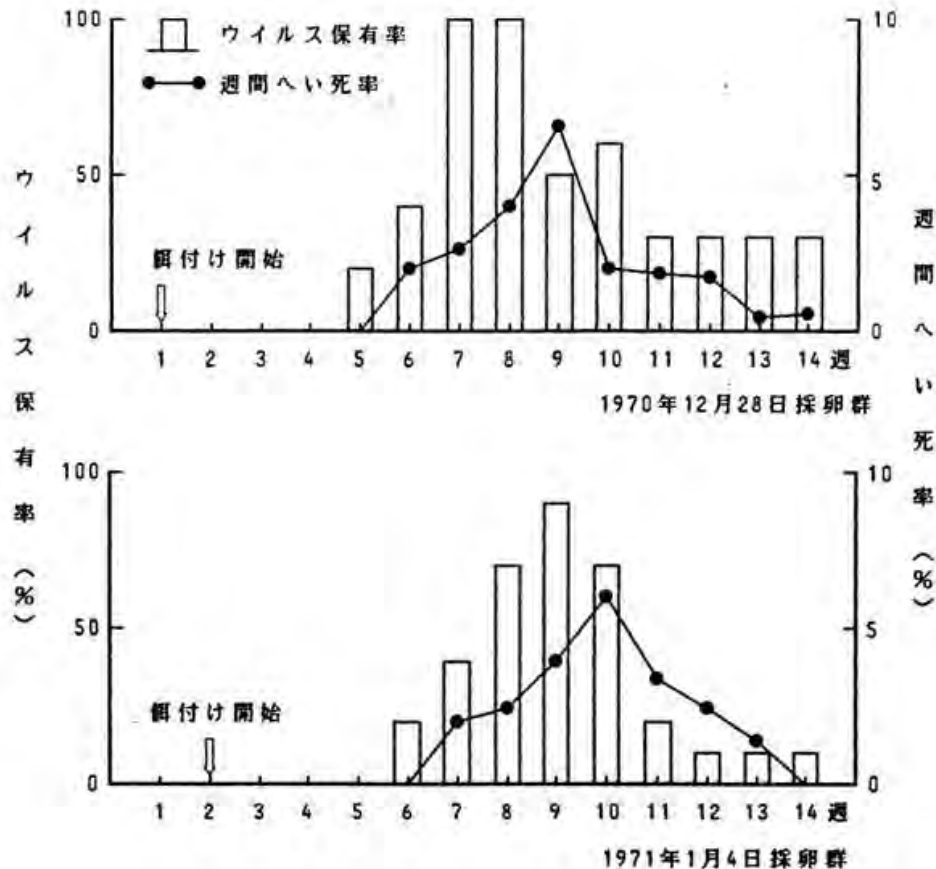


図-8 I P N自然発病ニジマス稚魚群 (10,000尾)における稚魚のウイルス保有率と週間へい死率の変化

最初の兆候は、餌付け後5週目の末に一部の魚の動きがやや鈍くなったが、これは通常の飼育管理では見逃される程度で極めて軽度の変化であった。しかし、その3日後からへい死が始まり、6～8週後にはへい死が増加して、9週後にへい死のピークとなった。症状は腹部突出、消化管内に粘液の貯溜、旋回狂奔及び動きの鈍化等、第3章第1節に述べたI P Nの症状型別では急性型に型別される症状であった。日間へい死率は最大約1%で、急性型としては比較的低いへい死率傾向であった。10週後には、全般的に体色の黒化及び動きの鈍化がみられ、さらに10週から12週にかけてはへい死が減少し始め、13週以後はへい死はほとんどなく、魚の行動も一部を除き再び活発化し、終息期と考えられた。試験終了時の餌付けから14週後には、累積へい死率が23%であった。1月4日採卵群の累積へい死率は22%で、へい死の傾向はほぼ同じ経過で推移した。

次に、この魚群からのウイルス検出状況を見ると、ウイルスが最初に確認されたのは、へい死が始まる1週間前の餌付け5週後であった。魚群のウイルス保有

率の変化をみると、発病前の5週後におけるウイルス保有率は20%であったが、へい死が始まった6週後には40%と高くなり、その後、7～8週後のウイルス保有率は100%に達した。そして、へい死のピーク時の9週後ではウイルス保有率にはむしろ低下傾向がみられ、9週後の保有率は50%となり、へい死のピークを過ぎた11週以降終息期の14週までの間は群のウイルス保有率は30%と一定であった。1月4日採卵群におけるウイルス保有率もほぼ同じ傾向であった。なお実験終了後には、供試魚が同じ養魚場で飼育する他のI P N耐過魚と混合飼育していたが、実験終了後5ヵ月目にウイルス調査を行ったところ、未だ20%の保有率が認められた。

実験2. 1年魚及び親魚のI P Nウイルス保有状況

材料と方法

供試魚：1年魚は1970年、1971年、1974年及び1982年に、長野県内の民間養魚場で飼育されていたニジマス(平均体重70～120g)の健康とみられる魚を供試し、調査対象養魚場は生産量の多い養魚場から任意に

選んだ。親魚は1970～1971年、1974～1981年及び1984年に、さらに1986～1987年に長野県水産試験場で飼育されていたニジマス3～4年魚(平均体重1～2.5kg)を供試した。

ウイルス分離：1年魚では、1養魚場あたり5尾をプールとして5検体計25尾を採取し、腎臓、幽門垂及びひ臓を試料として、第3章第1節と同様の方法によって行った。親魚では、採卵時に採取した体腔液を個別の試料として、第3章第1節と同様の方法によった。

結 果

1年魚及び親魚のIPNウイルス検査結果を表-25に示した。

表-25 長野県における、成魚(1年魚)、親魚(3、4年魚)のIPNウイルス保有状況 (%)

年	1年魚 *1	親魚 *2
1970	15.5(9/58)	1.6(2/126)
1971	12.7(15/118)	3.4(5/145)
1974	13.0(10/76)	2.7(2/72)
1975	NT	1.8(3/164)
1976	NT	1.3(1/76)
1977	NT	0 (0/88)
1978	NT	0 (0/50)
1979	NT	6.7(2/30)
1980	NT	0 (0/30)
1981	NT	0 (0/60)
1982	9.1(2/22)	NT
1984	NT	6.7(2/30)
1986	NT	0 (0/60)
1987	NT	0 (0/30)

*1 1年魚は、長野県内民間養魚場の飼育魚5尾プールで5検体供試

(ウイルス陽性養魚場数/調査養魚場数)

*2 親魚は、長野県水産試験場の飼育魚を採卵時に個別に雌魚の体腔液を供試

(ウイルス陽性尾数/調査尾数)

1年魚では、県内の主な養魚場22～118カ所についてウイルス検査を行ったところ、ウイルスが検出された養魚場数は2～15カ所で、ウイルスが検出された養魚場の率は9.1～15.5%であった。親魚では、長野県水産試験場で飼育している採卵親魚を用いて、ウイルス検査を行ったところ、1977～1978年及び1980～1981年さらに1986～1987年には採卵親魚からIPNウイ

ルスは検出されなかったが、その他の年にはウイルス保有率は1.3～6.7%であった。

実験3. IPNの発病未経験の養魚場における飼育魚のIPNウイルス保有状況

材料と方法

供試魚：1971年に、長野県内のY養魚場で飼育されていた健康とみられるニジマス稚魚(平均体重0.2～1.0g)を用いた。Y養魚場ではそれまでIPNの発生はまったく観察されておらず、飼育用水は湧水で水温は9～11℃であった。

ウイルス分離：ふ化時とふ化1ヵ月後、2ヵ月後及び3ヵ月後の計4回、供試魚群から任意に60尾ずつ採取して、個別別に全魚体或いは大型稚魚では内臓組織を用いて第3章第1節と同様の方法によって行った。

結 果

IPN発病未経験の養魚場における飼育魚のIPNウイルス保有状況を表-26に示した。

表-26 IPNの発病未経験の養魚場におけるニジマス稚魚のIPNウイルス保有状況

検査時期	ふ化後			
	0ヵ月	1ヵ月	2ヵ月	3ヵ月
	0/60	0/60	0/60	6/60

(ウイルス陽性尾数/調査尾数)

供試魚を採取したY養魚場では、試験期間中IPNの症状は認められず、また異常なへい死もなく、ふ化から3ヵ月後までの累積へい死率は約12%であった。しかしこの魚群のウイルス検査の結果、ふ化時から2ヵ月後までの検査ではウイルスが全く検出されなかったが、3ヵ月後には正常な稚魚からIPNウイルスが検出され、その検出率は10%であった。

考 察

IPNの伝播の主な要因である伝染源として、IPNウイルスの魚群内での動態を明らかにするために、ニジマス稚魚、成魚(1年魚)及び親魚の成長段階別に、IPNウイルスの保有状況を調べた。

ニジマス稚魚では、IPN自然発病群について発病前から終息までの間を継続して調べ、疾病の経過とウイルス保有率の変化の関係を明らかにした。

なお実験場所にH養魚場を選定した理由は、長野県内ではH養魚場が他の養魚場に比べてIPNの発生頻

度が高かったこと、さらに供試卵は長野県水産試験場産で、他の卵生産養魚場に比べて発生頻度の高い卵であることによるものである。このように、I P N発生頻度が高い場所と、発生頻度の高い卵を用いて実験したところ自然発病が観察され、しかも実験に用いた採卵日の異なる2群の稚魚において、発生時期と症状の発現状況及びへい死傾向等はほぼ同じ経過をたどったことが観察できた。

I P Nウイルスはへい死の始まる1週間前から検出され、へい死のピークが現れる以前に保有率はほぼ100%に達するが、へい死のピーク時にはむしろ低下した。またへい死の終息期とその後の稚魚のウイルス保有率は10~30%と低下したが、なお継続してウイルスを保有していることが明らかになった。Okamoto *et al.* (1984)も感染試験の結果から、ニジマス稚魚の魚体内のウイルスを調べ、へい死がみられる時期には $\geq 10^{5.1} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 魚体重 のI P Nウイルスが検出され、また潜伏期には $\leq 10^{4.1} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ 魚体重 のI P Nウイルスが検出されたことを報告しており、本実験と同様にへい死が始まる以前からウイルスが検出されることを認めている。

1年魚については、県内の主な養魚場のニジマスのI P Nウイルス保有状況調査を行って、ウイルスが検出された養魚場は9.1~15.5%であった。親魚については、同一養魚場で飼育している採卵親魚のウイルス保有率が、年によって0~6.7%と異なることが明らかになった。なおこの1年魚と親魚については、同一魚群の追跡調査によるものではないが、稚魚の結果と併せて考えるならば、I P N発病を耐過したニジマスの一部は生涯を通じてウイルス保有魚(キャリアー)となり得ること、稚魚から親魚までの全成長段階においてウイルスが保有されているが、保有率は魚の成長とともに減少する傾向がうかがえることがわかった。

一方、I P N未経験の魚群からもI P Nウイルスが分離され、不顕性感染の存在が確認されたが、Sonstegard and McDermott(1971)は、不顕性感染のカワマスから分離したI P Nウイルスに病原性を認めていること、またHill(1982)は、大量へい死を経験していない養魚場のニジマスから分離したI P Nウイルスに病原性を認めていることから、不顕性感染魚もまた伝染源としての役割を担うことが懸念され、I P Nの疫学的側面において重要な意味を持つものと考えられる。

第2節 I P Nウイルスの水平感染についての検討

I P Nウイルスは垂直伝播ばかりでなく、水平感染によっても伝播すると考えられているので、これにより一群の中の同世代間にさらに感染が拡大することが予測される。実験的には、I P Nウイルスを飼料に混ぜて稚魚に与えるか(Wolf *et al.*, 1960)、I P Nウイルス懸濁液に稚魚を浸漬することによって、感染発病することが報告されており(Reno *et al.*, 1978)、消化管及び鰓が感染の門戸とされている(Wolf *et al.*, 1961)。

本節ではふ化稚魚への人為感染試験を行い、I P Nウイルスの水平伝播による伝染経路に関わる問題点を検討した。

実験1. I P N病死魚の経口投与による感染

材料と方法

実験場所: 実験は1971年4月に長野県豊科町H養魚場で行い、水温が11.5~13.5°Cの湧水を用いた。

供試魚: Y養魚場産ニジマス稚魚を用い、餌付け5週齢(平均体重0.3g)の魚を実験開始の1週間前にH養魚場に運び、塩化ビニール製水槽(80×50×43cm)2槽に1,500尾宛収容して供試した。

感染方法: 感染源として、同年3月に実験場所のH養魚場で発病したI P Nひん死魚を-20°Cで凍結保存し、ウイルス感染価が $10^{6.2} \text{TCID}_{50}/\text{g}$ のものを用い、乳鉢で磨砕してペースト状にし、等重量のニジマス稚魚用クランブル(日配)と混ぜ、実験の第1日及び第3日目に、1日1回合計2回投与した。実験期間中の試験区及び対照区の給餌は、市販のクランブルを1日4回与えた。

実験期間: 24日間とした。

ウイルス分離: 実験開始時と9日後及び22日後に、供試魚群から各10尾ずつ採取して、個体別に第3章1節と同じ方法によった。

結 果

I P Nの病死魚を経口投与した後のへい死状況を図-9に示した。

試験区にI P Nの発生が観察され最大日間へい死率は10.2%で、累積へい死率は80.4%であったのに対し、対照区ではI P Nの発生がみられず、累積へい死率は1.4%であった。実験開始5日後から試験区の一部の魚に、対照区と比べて泳ぎが鈍く、体色が黒化する等の軽微な変化が観察され、7日後からへい死が始まり、14日後にはへい死がピークに達して腹部突出、消化管

内の粘液及び旋回狂奔等の第3章第1節に示したIPNの重急性型症状が観察された。ウイルスは実験開始時には検出されず、9日後に検出率が100%、22日後

に30%で試験区の魚からのみIPNウイルスが分離されたが、対照区からはウイルスが分離されなかった。

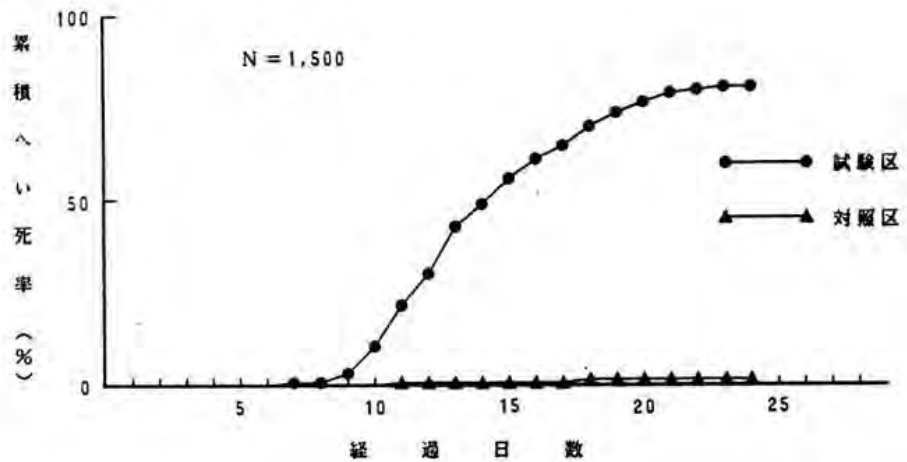


図-9 IPN病死魚の経口投与によって人為感染させたニジマスのへい死状況

実験2. IPNウイルス懸濁液への浸漬による感染

材料と方法

実験場所: 1972年5月に長野県豊科町H養魚場で行い、水温が12.4~13.6°Cの湧水を用いた。

供試魚: Y養魚場産ニジマス稚魚で、餌付け2週齢の魚(平均体重0.15g)を実験開始時にH養魚場へ運び、塩化ビニール製水槽(15×20×7cm)2槽に25尾宛収容して供試した。

供試ウイルス液: 実験1と同じく1971年3月に実験場所のH養魚場で採取したIPNひん死魚を-20°Cに凍結保存したものを用いて磨細ろ液を作り、実験時にRTG-2細胞に接種し細胞にCPEが十分に現れた培養液の上澄を、供試ウイルス液として用いた。

感染方法: 飼育水500mlに供試ウイルス液1mlを添加

して調整したウイルス懸濁液に供試魚25尾を浸漬し、13°Cで60分間置いた後、水槽に収容して流水で飼育した。このウイルス懸濁液の感染価は $10^{5.5}$ TCID₅₀/mlであった。対照区はウイルス液の代わりにHank's BSSを用い同様に浸漬した。

実験期間: 28日間とした。

ウイルス分離: 実験開始時、ウイルス液に浸漬9日後及び実験終了時に、へい死魚あるいは生残魚を各10尾ずつ採取して、個別別に第3章第1節と同様の方法によってウイルス分離を行った。

結果

ウイルス懸濁液に浸漬した後のへい死状況を図-10に示した。

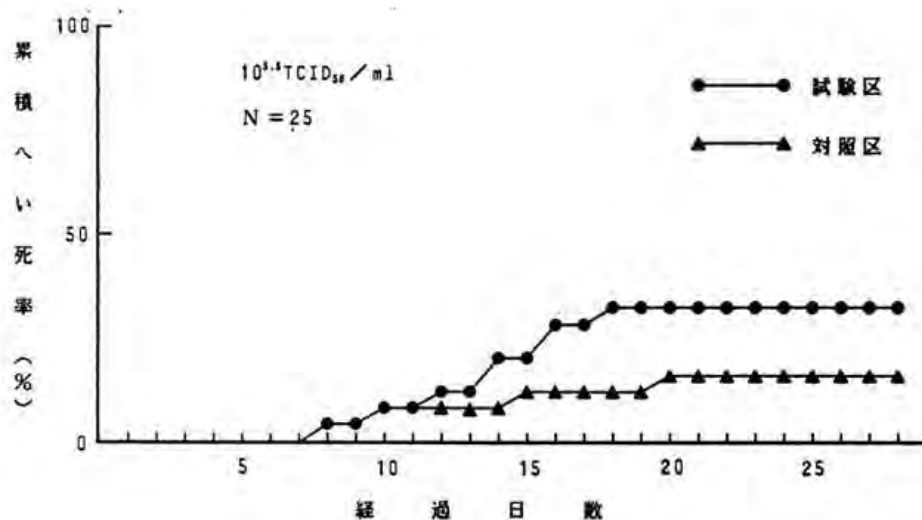


図-10 IPNウイルス懸濁液への浸漬によって人為感染させたニジマスのへい死状況

ウイルス液に浸漬した試験区では I P N の発病が観察され、実験開始 7～10 日後からへい死が始まった。へい死の傾向は緩やかで、症状は腹部突出、体色黒化等第 3 章第 1 節に示した I P N の亜急性型ないしは慢性型を呈し、累積へい死率は 32% であった。対照区では同時期にへい死がみられ、累積へい死率が期間中 16% に達したが、I P N の症状は認められなかった。実験開始時にはウイルスが分離されず、9 日後に検出率は 70%、実験終了時に 20% で試験区の魚からのみ I P N ウイルスが分離されたが、対照区からはウイルスが分離されなかった。

考 察

病死魚の経口投与並びにウイルス懸濁液に浸漬することによって、ニジマスふ化稚魚を I P N に感染発病させ得ることが確かめられた。実験 1 では I P N 病死魚を経口投与することによって、亜急性型の I P N 症状が再現され、累積へい死率が 80.4% と高かったのに対して、実験 2 のウイルス懸濁液に浸漬した場合には、亜急性型ないしは慢性型症状を呈し、累積へい死率が 32% と、両者のへい死傾向に差がみられた。実験 1 及び実験 2 は実験場所、実験用水、供試魚の由来及び供

試ウイルスの由来は同じであったが、供試魚の大きさ及びウイルス液調整法と感染方法は実験により異なっていた。I P N の発病に影響する要因のうち供試魚の大きさについては、餌付け後の週齢が若いほど感受性も高いとされていることから(岡本ら, 1987b)、実験 1 よりも実験 2 の供試魚のほうが週齢が若く、後者のへい死率が高くなるのが妥当であるが結果は逆で、両実験におけるへい死の差はウイルス調整法ないしは感染方法の差によるものと考えられた。

本実験の結果、病死魚の経口投与によってニジマスふ化稚魚への人為感染が容易に成立したことから、養魚場現場においては病死魚を伝染源とした二次感染が、I P N を拡大せしめるための大きな要因となる危険性を指摘することができる。すなわち、I P N が発生している養魚場では、健康な魚がへい死魚をついばむことが日常的に観察され、これによって多量のウイルスが摂取されるため、激しい発病へと発展するものと考えられる。従って新たな感染環を遮断するためにも、飼育池から病死魚を早急に排除することが、I P N ウイルスへの感染機会を減少させることにつながり、日常の飼育管理技術の重要性が I P N の防除対策上からも指摘し得るものとする。

小 括

I P Nウイルスの魚群における動態を、魚の成長過程を通じて明らかにするため、長野県で飼育されたニジマス稚魚、成魚（1年魚）及び親魚の成長段階別に、I P Nウイルスの保有状況を調べて以下の結果を得た。

（1）自然発病群の稚魚では、症状が発現する1週間前から既にウイルスが検出され、病性の進行とともにウイルス保有率は高くなった。そしてへい死のピークが現れる前にウイルス保有率はほぼ100%に達し、へい死のピーク時にはむしろ低下していることがわかった。その後、保有率は低下するものの生残魚のうちの一部はウイルスを保有し続けること、成魚及び親魚にウイルス保有魚が認められたことから、ニジマスは稚魚から親魚までの生涯を通じてI P Nウイルスを保有し、その保有率に変化のあることが明らかになった。

またI P Nの発病経験のない魚群からもI P Nウイルスが検出され、I P Nの不顕性感染の存在が認められた。

（2）ニジマスふ化稚魚を用いて、病死魚の経口投与実験並びにウイルス懸濁液による浸漬実験の結果から、I P N汚染飼料或いは水を介して感染することを確認し得た。さらに病死魚の経口投与の実験で、特にへい死率が高かったことから、養魚池の中で放置された病死魚が健康魚に摂取されることによって新たな感染環を生じ、経口感染が重要な伝染経路となり、防疫対策の上から大きな問題となることが指摘され、I P Nを防除するための日常の飼育管理の重要性が再認識された。

第5章 I P N防除技術に関する検討

前章までに明らかにしたように、I P Nウイルスに汚染された養殖環境下で、I P Nウイルスに感受性を有するマス類の幼稚魚の飼育を行わねばならない現状と、ウイルス性疾病に対する効果的な治療法がないことを考えると、I P Nウイルスによる疾病の防除対策としては養魚環境の清浄化による飼育魚への伝染経路の遮断が考えられ、その対策が急務となっている。さらに日常的には飼育管理の充実と衛生管理を向上させるために、消毒薬の使用をはじめとする防疫の具体的な対策をマス養殖業者に対して広く普及させることが必要と考えられる。

魚類ウイルス病の防疫対策に関しI H Nウイルスについては、Amend and Pietsch(1972)が垂直伝播の防止を目的とした発眼卵のポリビニールピロリドンヨード剤による消毒、幼稚魚の飼育水温の調節によってへい死率を低減させる方法(Amend, 1972)等の研究がすでに報告され、いずれも実用化されてある程度の効果が得られているが、I P Nウイルスについては効果的な方法が報告されていない。さらに、前述のようにわが国のI P N発生初期にはウイルス病の防除対策に関する知見はほとんど明らかにされておらず、細菌性疾病に対する処置として抗菌性物質製剤の投与による化学療法と、稚魚期の寄生虫性疾病に対する化学物質による消毒以外の魚類疾病防除対策は行われていなかった。前述のようにウイルス病は細菌性疾病のように発病してから抗菌性物質製剤の投与、すなわち化学療法によって治療することは不可能であり、伝染経路の遮断を目的とした防疫技術の確立が求められている。そこで本章では、養魚現場に応用することを目的として次のような検討を行った。

まず第1節では、I P Nウイルスの防除対策の基礎となる養魚飼育環境とI P Nウイルスの生存性の関係を検討するとともに、I P Nウイルスの理学的性状を利用した不活化方法についても検討した。第2節では、代表的な消毒薬のI P Nウイルスに対する殺ウイルス効果及び養魚場で実用化するための使用上の留意点について検討した。また第3節では、垂直伝播の防止を目的として、ヨード剤の発眼卵消毒への応用について、第4節では、病死魚及びキャリアー魚が伝染源として重要な位置を占めると考えられることから、その廃棄の方法について検討し、さらに第5節では、I P Nを防除するための隔離飼育施設について検討した。

第1節 マス類の飼育環境下におけるI P Nウイルスの生存性

多くのニジマス養魚場は、一度I P Nウイルスに汚染された種苗等が導入されると、仮にI P Nの発生がみられない場合でもI P Nウイルス保有魚が増加し、このようなキャリアーから排出されるウイルスによって養殖環境が恒常的に汚染されると考えられる。そこで、養魚場において想定される種々の環境条件中のI P Nウイルスの生存性を知ることがI P Nの伝播防止対策上重要な基礎的資料になると考え、飼育用水中と乾燥状態におけるI P Nウイルスの生存性を検討した。またI P Nウイルスの紫外線耐性、熱耐性及びp Hの影響なども検討した。

実験1. 飼育用水中での生存性

材料と方法

供試培養細胞：第3章第1節に用いたものと同様である。

細胞培養条件：第3章第1節に用いたと同様の条件である。

供試ウイルス：1971年に長野県内のニジマス養魚場で発生しへい死率が高く、典型的なI P N症状を呈した病魚から分離したI P Nウイルス(7115株)を、RTG-2細胞で継代したものを供試した。

供試ウイルス液の調整：RTG-2細胞にウイルスを接種し、約1週間後にCPEが発現したものの上清を集め、メンブレンフィルター(0.45 μ m)でろ過し、p H 7に調節して用いた。細胞片混入が多い場合には3,500rpm、15分間遠心分離した後にろ化した。ウイルス感染価は $10^{7.5\sim 8.5}$ TCID₅₀/mlであった。なお一部は-20℃で凍結保存したものを用いた。

I P Nウイルスの飼育用水中におけるウイルス感染価の変化：長野県水産試験場のニジマス飼育池の水を3,500rpm15分間遠心分離し、上清を120℃、15分間高圧滅菌したものを、飼育用水試料として供試した。ウイルス液を飼育用水に懸濁して(1:10及び1,000)ウイルス汚染飼育水を調製し、20℃のインキュベーターに静置した。ウイルス懸濁直後及び1週間毎に、よく振とうしたウイルス汚染飼育水の一部を採取し、メンブレンフィルター(0.45 μ m)でろ過してウイルス感染価を測定した。対照として、飼育水の代わりにPBSを用いて同様の操作を行った。

ウイルス感染価の測定：ローラーチューブ(16×125mm)を主に用い、一部にはマイクロタイタープレートを用

いて、50%感染価 (TCID₅₀) を測定した。TCID₅₀ の計算は Kärber 法によった。

結 果

飼育用水に懸濁して 20℃ に静置した場合の I P N ウイルスの感染価の変化を表-27 に示した。

表-27 I P N ウイルスの飼育用水中における感染価の変化

期間 (週)	感染価 (log TCID ₅₀ /ml)		
	試水 1 *1	試水 2 *1	対 照
0	7.5	5.5	7.5
1	7.5	5.5	7.5
2	7.5	5.5	7.5
3	7.5	4.5	7.5
4	6.8	3.5	7.5
5	6.5	3.2	6.8
8	6.2	2.8	6.8
10	6.2	2.5	6.5
12 *2	+	+	+
14	+	+	+
20	+	-	+

*1 試水 1 : ウイルス液を飼育用水に懸濁 (1:10)

試水 2 : ウイルス液を飼育用水に懸濁 (1:1000)

*2 12~14 週はウイルス感染価は測定せず、感染性の有無のみを判定した。

試水 1 の飼育用水に懸濁した直後のウイルス感染価が 10^{7.5}TCID₅₀/ml の場合には、3 週間後までは感染価に変化が見られず、10 週後に 10^{6.2} となり、20 週後にも一部活性が残存した。試水 2 の場合懸濁した直後のウイルス感染価は 10^{5.5}TCID₅₀/ml の値を示し 2 週間後までは変化が見られなかったが、10 週後には 10^{2.5} となり 99.9% 以上の感染価の減少がみられた。14 週間以上おいた場合でもウイルスが検出でき、I P N ウイルスは飼育用水中かなり長期間生存し得ることが確認された。

実験 2. 乾燥の影響

材料と方法

供試培養細胞 : 第 3 章第 1 節に用いたものと同様である。

細胞培養条件 : 第 3 章第 1 節に用いたと同様の条件である。

供試ウイルス : 実験 1 と同じウイルスを用いた。

供試ウイルス液の調整 : 実験 1 に用いたと同じ方法によった。

I P N ウイルスの乾燥状態における感染価の変化 : I

P N ウイルスの乾燥は滅菌シャーレ 20 枚に 1 枚あたりウイルス液 2.0ml 宛分注し、20℃ の無菌室内で 30 分間静置して I P N ウイルスを乾燥させ、そのうち半数の 10 枚をシリカゲルを入れたデシケーター内に収容して夏期の室温 (18~30℃) に静置し、他の 10 枚はプラスチック容器に収容して 4℃ の冷蔵庫内に静置した。1 週間毎にそれぞれのシャーレ 1 枚ずつを取り出し、ウイルス感染価を測定した。測定にはシャーレ内の乾燥ウイルスを 5.0ml の Hanks' BSS で静かに洗浄し、メンブレンフィルター (0.45 μm) でろ過したものをを用いた。

ウイルス感染価の測定 : 実験 1 に用いたと同様の方法によった。

結 果

シャーレ上で乾燥させた I P N ウイルスを、デシケーターに入れて夏期の室温においた場合と、プラスチック容器に入れて 4℃ の冷蔵庫においた場合の、ウイルス感染価の変化を表-28 に示した。

表-28 I P N ウイルスの乾燥状態における感染価の変化

期間 (週)	感染価 (log TCID ₅₀ /ml)	
	デシケーター内室温 (18~30℃)	4℃
0	7.3	7.3
1	4.2	5.3
2	3.5	4.5
3	3.1	4.1
4	1.5	4.1
5	1.1	3.1
6	- *	2.2
7	-	-

* 検出されず

実験開始時に 10^{7.3}TCID₅₀/ml であったウイルス感染価が、室温及び 4℃ におくと、1 週間後には 10^{4.2} と 10^{5.3}, 2 週後に 10^{3.5} と 10^{4.5}, 3 週後に 10^{3.1} と 10^{4.1}, 4 週後に 10^{1.5} と 10^{4.1} であった。6 週間後には室温においたものでは検出限界以下となり、4℃ の冷蔵庫においたものは未だ 10^{2.2} であったが、7 週間後には検出できなくなった。すなわち、乾燥状態における I P N ウイルスのウイルス感染価の変化は、夏期室温 (18~30℃) と 4℃ ではやや差がみられたが、いずれも 1 週間後に 99~99.9% の減少が認められ、5~6 週間後まではウイルス活性が残存したが、6~7 週間後には活性は認められなくなった。

実験3. 紫外線（殺菌灯）の影響

材料と方法

供試培養細胞：第3章第1節に用いたものと同様である。

細胞培養条件：第3章第1節に用いたと同様の条件である。

供試ウイルス：実験1と同じウイルスを用いた。

供試ウイルスの調整：実験1に用いたと同様の方法によった。

I P Nウイルスの紫外線照射によるウイルス感染価の変化：ウイルス原液を Hanks' BSS によって希釈した各ウイルス希釈液 1.0ml を直径 60mm のシャーレに入れ、市販の 15W 殺菌灯 (TOSIBA GL15) 下に置いた。殺菌灯のウイルス液面からの高さは、紫外線量が $500 \mu \text{W}/\text{cm}^2$ となるように調節した。照射中シャーレを水平振とう機上で振とうさせ、所定時間毎に供試液の一部を採取してウイルス感染価を測定した。対照はシャーレをアルミ箔で覆って同様の処理を行った。

紫外線照射量：UV 計 (TOPCON; UVR-254) で計測した照度値と照射時間から算出した。

ウイルス感染価の測定：実験1に用いたと同様の方法によった。

結 果

I P Nウイルスの紫外線照射によるウイルス感染価の変化の測定結果を表-29 に示した。

表-29 紫外線照射による I P Nウイルス感染価の変化

UV 照射量 *1 ($\mu \text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$)	感染価 (log TCID ₅₀ /ml)		
	ウイルス原液	ウイルス希釈液 *2	対照
0	7.5	2.5	7.5
0.5×10^5	7.0	2.0	NT
1.0×10^5	6.0	1.3	NT
1.5×10^5	5.5	<0.5	7.5
2.0×10^5	5.0	<0.5	NT
4.0×10^5	4.8	<0.5	7.5

*1 $500 \mu \text{W}/\text{cm}^2$

*2 Hanks' BSS 希釈

紫外線照射前のウイルス感染価が $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml であったものが、 $0.5 \times 10^5 \mu \text{Wsec}/\text{cm}^2$ の U. V. 照射によって $10^{7.0}$ に減少し、 $1.0 \times 10^5 \mu \text{Wsec}/\text{cm}^2$ の照射によって $10^{6.0}$ に、 $1.5 \times 10^5 \mu \text{Wsec}/\text{cm}^2$ の照射によって $10^{5.5}$ に、 $2.0 \times 10^5 \mu \text{Wsec}/\text{cm}^2$ の照射によって $10^{5.5}$ に、さらに $4.0 \times 10^5 \mu \text{Wsec}/\text{cm}^2$ の照射によって $10^{4.8}$ に減少した。ま

た、Hanks' BSS によるウイルス希釈液についてみると、紫外線照射前のウイルス感染価が $10^{2.5}$ TCID₅₀/ml であったものが $0.5 \times 10^5 \mu \text{Wsec}/\text{cm}^2$ の U. V. 照射によって $10^{2.0}$ に、 $1.0 \times 10^5 \mu \text{Wsec}/\text{cm}^2$ の照射によって $10^{1.3}$ に減少し、 $1.5 \sim 4.0 \times 10^5 \mu \text{Wsec}/\text{cm}^2$ 以上の照射では、検出限界 ($10^{0.5}$) 以下に減少した。対照は $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml で変化がなかった。

実験4. 加熱の影響

材料と方法

供試培養細胞：第3章第1節に用いたものと同様である。

細胞培養条件：第3章第1節に用いたと同様の条件である。

供試ウイルス：実験1と同じウイルスを用いた。

供試ウイルスの調整：実験1に用いたと同様の方法によった。

加熱による I P Nウイルス感染価の変化：ウイルス原液及びウイルス希釈液 (Hanks' BSS) をキャップ付きガラス試験管に 1.0ml 宛分注し、60℃及び80℃の恒温槽に浸漬して、60℃では 30、60、90、及び 120 分後に、80℃では 1、5 及び 10 分後に取り出し速やかに 20℃まで冷却して、直ちにウイルス感染価を測定した。対照は 20℃で同様の処理を行った。

ウイルス感染価の測定：実験1に用いたと同様の方法によった。

結 果

加熱による I P Nウイルス感染価の変化の測定結果を表-30 に示した。

ウイルス原液及びウイルス希釈液を 60℃に加熱したとき、加熱前に $10^{7.5}$ 及び $10^{2.5}$ TCID₅₀/ml のウイルス感染価であったものが、加熱 30 分後にそれぞれ $10^{6.8}$ 及び $10^{1.3}$ に減少し、60 分後には $10^{5.5}$ 及び $10^{0.5}$ 以下に、90 分後には $10^{5.0}$ 及び $10^{0.5}$ 以下に、さらに 120 分後では $10^{4.5}$ 及び $10^{0.5}$ 以下に減少した。ウイルス感染価を 99% 減少させるために必要な加熱時間は、60 分以上であった。一方、80℃に加熱した場合には加熱前に $10^{7.5}$ 及び $10^{2.5}$ TCID₅₀/ml のウイルス感染価であったものが、加熱 1 分後にはそれぞれ $10^{4.5}$ 及び $10^{0.5}$ 以下に、5 分後には、 $10^{2.8}$ 及び $10^{0.5}$ 以下に、さらに 10 分後には両者とも検出限界 ($10^{0.5}$) 以下に減少した。すなわちウイルス感染価は、加熱 1 分以内に 99.9% 以上減少した。

表-30 加熱による I P Nウイルス感染価の変化

時間 (分)	60℃		80℃		対照
	感染価 (log TCID ₅₀ /ml)		感染価 (log TCID ₅₀ /ml)		感染価 (log TCID ₅₀ /ml)
	ウイルス原液	ウイルス希釈液 *1	ウイルス原液	ウイルス希釈液 *1	ウイルス原液
0	7.5	2.5	7.5	2.5	7.5
1	NT	NT	4.5	<0.5	NT
5	NT	NT	2.8	<0.5	NT
10	NT	NT	<0.5	<0.5	NT
30	6.8	1.3	NT	NT	NT
60	5.5	<0.5	NT	NT	NT
90	5.0	<0.5	NT	NT	NT
120	4.5	<0.5	NT	NT	7.5

*1 Hanks' BSS 希釈

実験 5. 懸濁液 pH の影響

材料と方法

供試培養細胞：第 3 章第 1 節に用いたものと同様である。

細胞培養条件：第 3 章第 1 節に用いたと同様の条件である。

供試ウイルス：実験 1 と同じウイルスを用いた。

供試ウイルスの調整：実験 1 に用いたと同様の方法によった。

I P Nウイルスの pH 相違によるウイルス感染価の変化：0.1M 酸性フタル酸カリウム-0.1M 塩酸溶液及び 0.1M 炭酸ナトリウム-0.1M 塩酸溶液を用いて、pH がそれぞれ 2.0、3.0、4.0、10.0、11.0 及び 12.0 になるように緩衝液を調製した。対照として Hanks' BSS を用い、pH は 7.2 とした。緩衝液及び Hanks' BSS をメンブレンフィルター (0.45 μm) でろ過し、その 9 容にウイルス原液の 1 容を混じてウイルス懸濁液とし、20℃、24 時間静置後ウイルス感染価を測定した。

ウイルス感染価の測定：実験 1 に用いたと同様の方法によった。

結 果

I P Nウイルスの懸濁液 pH の相違によるウイルス感染価の変化の測定結果を表-31 に示した。

対象の pH 7.2 BSS 中では 24 時間後も実験開始時と変化なく、ウイルス感染価が 10^{7.5}TCID₅₀/ml であったのに対して、酸性側の pH 3 及び 2 では 10^{6.2} に減少し、pH 4 では 10^{6.5}、アルカリ側では pH 10 で 10^{6.8}、pH 11 で 10^{6.5} に、pH 12 では 10^{3.2} に減少した。I P Nウイルスは、酸性側ではウイルス感染価はかなり安定であり、またアルカリ側でも pH 11 までは減少が約

90%とかなり安定であったが、pH 12 では 99.99%の減少がみられた。

表-31 pHによる I P Nウイルス感染価の変化

pH	感染価 *1 (log TCID ₅₀ /ml)
2.0	6.2
3.0	6.2
4.0	6.5
7.2 *2	7.5
10.0	6.8
11.0	6.5
12.0	3.2

*1 24 時間静置後に測定

*2 対照、Hanks' BSS

考 察

養殖魚類の疾病発生においては、宿主と病原体との関係のみならず環境要因も大きく関与することが知られており (Snieszko, 1974)、実際に養殖現場では飼育環境の改善によって発生を阻止したり被害が軽減することは、経験的にもかなり知見が集積されている。従って、I P Nウイルスの飼育環境中における生存性を検討することは、I P Nの防除技術の確立にとって非常に重要と考える。すなわち、わが国の養魚場で飼育するマス類の多くが I P Nウイルスのキャリアーとなっている現状を考えると、体外に排泄され水中に放出されたウイルスによって、飼育環境が恒常的に汚染されているとみられることから、その防除策を立案するためには、水中及び乾燥状態における I P Nウイルスの生存性に関する検討が必要と考えられる。

先ず飼育用水中における I P Nウイルスの生存性を

検討した結果、滅菌飼育用水に懸濁したウイルスは10週後も感染価の減少は95~99.0%で、12~14週後にも一部生存することが明らかとなった。すなわちIPNVウイルスは飼育用水（淡水）中で非常に長い期間生存可能で、伝播の危険性の大きいことが確かめられた。Desautels and MacKelvie (1975)は、魚体から水中に排泄されたIPNVウイルスの飼育用水中における生存性について、発病中のマス養魚場の排水を用いて経時的にウイルス感染価の変化を調べ検討したところ、当初 10^5 TCID₅₀/mlの感染価であったものが、10~12週後には99%の減少を示し、24週後にも一部が残存したと報告しており、ウイルス培養液を滅菌飼育用水に懸濁して行った本実験とほぼ同じ傾向を認めている。さらに、Desautels and MacKelvie (1975)は、海水にウイルス液を懸濁した場合には4~10週間はウイルス感染価に変化がなく、5~6ヵ月後に99%の減少を認めており、IPNVウイルスが海水の中では淡水中におけるよりさらに長時間生存性を保持するものとみられる。また吉水ら(1986b)は、飼育用水中におけるIPNVウイルスの生存性を0、5、10及び15℃の温度条件下で調べたところ、いずれの温度条件下でも14日後のウイルス感染価には大きな変化は見られず、安定であったと報告している。

次に、乾燥状態における生存性について検討したところ、1週間後に99~99.9%の感染価の減少が認められ、IPNVウイルスは乾燥状態に置かれた場合のほうが、水中に比べ生存性が低いことが明らかになった。Jorgensen (1973b)は、乾燥状態のIPNVウイルスが4℃で4週間後に0.4%以下に感染価が減少したことを、またDesautels and MacKelvie (1975)も、本研究と同様に乾燥状態のIPNVウイルスをデシケーターに入れた場合には、3日後にウイルス感染価が99%、1週間後には99.9%が減少し、8週間後には残存が認められなかったこと、また実験室内に静置した場合には、1週間後に99.9%が減少し、6週間後にはウイルスの残存がみられなかったことを報告している。

紫外線（殺菌灯）照射によってIPNVウイルスの感染価を99%以上減少させるためには、 $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の線量で5分間、 $1.5 \times 10^5 \mu\text{Wsec}/\text{cm}^2$ の照射が必要であった。この結果は、MacKelvie and Deantols (1975)が $440 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ で4分間の照射によりウイルス感染価は99%以下に減少したと報告していること、吉水ら(1986a)が紫外線照射によるIPNVウイルスのID₉₉は $1.0 \sim 1.5 \times 10^5 \mu\text{Wsec}/\text{cm}^2$ であると報告した値にほぼ一致している。以上のようにIPNVウイルスの紫外線耐性はか

なり強く、吉水ら(1986a)のIPNVウイルスのID₉₉は $1.0 \sim 3.0 \times 10^3 \mu\text{Wsec}/\text{cm}^2$ であったとの報告と比較すると、50~150倍の耐性を有していることになる。また、養殖現場で飼育用水中のIPNVウイルスに紫外線照射を行う場合を考えて、 10^2 TCID₅₀/mlの低い感染価のウイルス懸濁液についても検討を行ったが、不活化には $1.5 \times 10^5 \mu\text{Wsec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射を要し、 $500 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ の線量では5分間の照射に相当することが明らかになった。従って、飼育用水の紫外線照射処理が有効なIPNV対策とされているが、IPNVウイルスについては、飼育用水の紫外線処理による殺菌は現状の方式、殺菌灯の能力では期待できないと考える。

IPNVウイルスの耐熱性について検討した結果、60℃、60分間の加熱では、ウイルス感染価の減少は99%にとどまり、120分加熱でも完全な不活化は認められず極めて強い耐性を示した。しかし、80℃1分の加熱では99.9%以上の感染価の減少がみられ、さらに10分加熱後には残存を認めなかった。MacKelvie and Deantols (1975)も、 10^7 TCID₅₀/mlのウイルス液を60℃で加熱したところ、30分後に99.9%の感染価の減少をみたが、5時間後にも0.0001%の残存を認めたと報告している。養魚場現場では、採卵後の不要となった親魚等を加熱処理して、飼料原料に利用する機会が多くみられるが、ウイルス保有魚の加熱が不十分な場合には以上のようにIPNVウイルスが耐熱性の強いことから、ウイルスが完全に不活化されずに残存し新たな感染源となる可能性を否定できない。また、海産魚にもIPNVウイルスを保有するものがあるといわれていることから(Wolf, 1988)、海産魚類を直接餌料に使用する場合には、生鮮あるいは不完全な加熱状態のまま給飼した場合、これが感染源となる可能性も考えられる。

pHの影響を検討した結果、pH2~11の間ではIPNVウイルスは比較的安定していたが、pH12では99.99%以上の感染価の減少がみられた。MacKelvie and Desautels (1975)も、pH2及び9で5日後に感染価が10%以上減少し、5週間後にも0.001%が残存していたことから、IPNVウイルスはpHに比較的耐性であることを報告している。

以上のように養殖環境条件下及び種々の理化学的条件下におけるIPNVウイルスの生存性について検討したところ、水中或いは乾燥状態でも極めて長時間にわたって生存すること、紫外線下、高い温度或いはpHの変化などの特殊な条件下に置かれた場合でも、強い耐性を示すことが明らかになった。

第2節 各種消毒薬による I P N ウイルスの不活化効果

医学、獣医学分野においても大部分のウイルス性疾病は効果的な治療法が確立されておらず、防疫対策にたよらざるを得ないのが現状であり、魚類のウイルス病についてもその例外ではない。伝染性疾病の伝染源の排除と感染経路の遮断法の一つとして消毒薬の利用があげられる。市販されている一般的消毒薬であるハロゲン化合物の次亜塩素酸ナトリウム（アンチホルミン）とヨード剤（イソジン）、フェノール類のクレゾール石けん液及び界面活性剤の塩化ベンザルコニウム（オスバン）を用いて、I P N ウイルスの不活化効果と消毒薬を使用する場合の留意点等について検討した。

材料と方法

供試培養細胞：第3章第1節に用いたと同様である。

細胞培養条件：第3章第1節に用いたと同様の条件である。

供試ウイルス：第5章第1節に用いたのと同様のウイルスである。

供試ウイルス液の調整：第5章第1節に用いたと同様の方法によった。

供試消毒薬：ハロゲン化合物として次亜塩素酸ナトリ

ウム（アンチホルミン；和光純薬工業）、ポリビニールピロリドンヨード剤（イソジン；明治製菓）、フェノール類としてクレゾール石けん液（丸石製菓）及び界面活性剤として塩化ベンザルコニウム（オスバン；武田薬品工業）を用いた（表-32）。各消毒薬は 50、100、500、1,000、5,000、10,000、50,000 (v/v) 倍に再蒸留水で希釈した後実験に供した。なおクレゾール石けん液及び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表示した。

I P N ウイルス不活化効果の判定：次亜塩素酸ナトリウム、イソジン、クレゾール石けん液及びオスバンについては、所定濃度に希釈した消毒薬と約 2,000PFU/0.1ml に調整した供試ウイルス希釈液を等量混合し 0℃、15℃、及び 25℃ で 30 秒あるいは 20 分間静置した後、混合液に 9 倍量の Hanks' BSS を加えて消毒薬の細胞毒性を軽減した後に細胞に接種し、出現したブラック数を測定した。ブラック法は Kamei *et al.* (1987) の方法に従い、消毒薬のウイルス不活化効果は消毒薬の代わりに Hanks' BSS を用いた対照群に対する実験群のブラック減少率をもって示した。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加えることにより反応を停止させた。

表-32 I P N ウイルスの不活化試験に供試した消毒薬

分類	消毒薬	商品名	有効成分濃度 (%)
ハロゲン化合物	次亜塩素酸ナトリウム	アンチホルミン	5
	ポビドンヨード	イソジン	1.0
フェノール類	クレゾール石けん液	クレゾール石けん液	42~52
界面活性剤	塩化ベンザルコニウム	オスバン	10

結果

次亜塩素酸ナトリウム、イソジン、クレゾール石けん液及びオスバンの I P N ウイルス不活化効果観察結果を表-33~表-36 に示した。

次亜塩素酸ナトリウムは反応温度 0℃、15℃、及び 25℃ともに反応時間 30 秒、20 分にかかわらず 4.5ppm 以上で 90%以上のブラック減少率を示し（表-33）、イソジンも反応温度及び反応時間にかかわらず 10ppm 以上で 90%以上のブラック減少率を示し（表-34）、一方クレゾール石けん液は反応時間 30 秒で反応温度

0、15、25℃の場合、各々 10,000、10,000、5,000ppm 以上で 90%以上のブラック減少率を、また反応時間 20 分の場合には反応温度にかかわらず 1,000ppm で 90%以上のブラック減少率を示した（表-35）。オスバンは反応時間 30 秒で反応温度 0、15、25℃の場合、各々 200、1,000、1,000ppm で 90%以上のブラック減少率を示し、反応時間 20 分の場合には反応温度にかかわらず 200ppm 以上で 90%以上のブラック減少率を示した（表-36）。

表-33 次亜塩素酸ナトリウムの I P N ウイルス不活性化効果

温度 (°C)	時間 (分)	ブラック減少率 (%)				
		希釈率(1:)	1,000	5,000	10,000	50,000
		濃度(ppm)	45	9	4.5	0.9
0	0.5		100	100	100	22
	20		100	100	100	25
15	0.5		100	100	100	29
	20		100	100	100	88
25	0.5		100	100	97	7
	20		100	100	100	21

表-34 イソジンの I P N ウイルス不活性化効果

温度 (°C)	時間 (分)	ブラック減少率 (%)				
		希釈率(1:)	500	1,000	5,000	10,000
		濃度(ppm)	20	10	2	1
0	0.5		100	98	0	0
	20		100	100	19	0
15	0.5		100	100	25	0
	20		100	100	30	0
25	0.5		100	100	40	0
	20		100	100	53	12

表-35 クレゾール石けん液の I P N ウイルス不活性化効果

温度 (°C)	時間 (分)	ブラック減少率 (%)					
		希釈率(1:)	50	100	500	1,000	5,000
		濃度(ppm)	10,000	5,000	1,000	500	100
0	0.5		100	66	14	0	0
	20		100	100	97	25	10
15	0.5		100	73	24	0	0
	20		100	100	96	0	0
25	0.5		100	100	25	0	0
	20		100	100	99	30	0

表-36 オスバンの I P N ウイルス不活性化効果

温度 (°C)	時間 (分)	ブラック減少率 (%)				
		希釈率(1:)	100	500	1,000	5,000
		濃度(ppm)	1,000	200	100	20
0	0.5		100	100	24	0
	20		100	100	26	0
15	0.5		100	72	32	0
	20		100	91	35	25
25	0.5		100	63	46	25
	20		100	93	48	32

考 察

本実験の結果では、0～25℃の温度範囲で30秒間の処理でIPNウイルスのプラック数を100%減少させるに要する消毒薬の最少濃度は次亜塩素酸ナトリウムでは9ppm、イソジンで10ppm、クレゾール石けん液で10,000ppm、オスバンでは1,000ppmであった。Desautels and MacKelvie(1975)は次亜塩素酸ナトリウムが有効塩素16ppmの30分間処理でIPNウイルスを完全に不活化することを認めており、同様にElliott and Amend(1978)は、40ppmの30分間処理で不活化されることを報告している。また東京水試(1983)も、4ppmの2分30秒間の処理でIPNウイルスが不活化され、極めて低濃度で効果があることを報告している。ヨード剤に関しては、Desautels and MacKelvie(1975)はポリビニールピロリドンヨード(PVP-I)の35ppm5分間処理で、Elliott and Amend(1978)は16ppm5分間処理でIPNウイルスが不活化されることを報告しており、東京水試(1983)も、イソジンの5ppm15分間処理で有効であると報告している。以上のようにハロゲン化合物の消毒剤はIPNウイルスの不活化に有効であるがフェノール系のクレゾール石けん液及び界面活性剤のオスバンは十分な不活化効果が期待できないものと考えられる。なおElliott and Amend(1978)は塩素とヨード剤のIPNウイルスに対する不活化効果を調べ、1%以上の血清の添加で不活化効果が低減することを報告していることから有機物を高濃度に含むウイルス培養液や感染魚体などの消毒にはハロゲン系の消毒薬も不活化効果の低減を考慮する必要がある。

第3節 ヨード剤の発眼卵消毒への応用の可能性

IPNウイルスを保有する親魚から採卵した卵の内

部にすでにウイルスが存在し、その卵からふ化した稚魚に新たな発病を引き起こす、いわゆる経卵感染がIPNの伝播様式の特徴とされてきたが(Sniesko *et al.*, 1957; Bullock *et al.*, 1976)、その確証はなく現在でも経卵感染の有無については論議されている(Wolf *et al.*, 1968; Dorson, 1983)。いずれにしても、IPNウイルスに汚染した卵が伝染源となり得ることは、長野県においてIPNの流行初期に行われた調査でも明らかである(第3章第2節)。

本章第2節でヨード剤消毒効果が期待されることから、本節では市販ヨード剤の発眼卵消毒時の安全使用条件を明らかにするため、処理濃度と処理時間の発眼卵への影響について検討した。

材料と方法

供試魚卵：長野県水産試験場産アマゴ発眼卵を実験に供した。

供試ヨード剤：イソジン(明治製菓・有効ヨウ素1%)を実験に供した。

安全性の検討：供試魚卵へのヨード剤の影響については、イソジンをふ化用水で有効ヨウ素濃度が20、50、100ppmとなるように希釈したイソジン溶液500mlにアマゴ発眼卵各300粒を15、30、60、120及び240分間浸漬した。対照はイソジン溶液の代わりにふ化用水で同様の処理を行った。処理後直ちに実験ふ化水槽(7×15×7cm)に収容し、長野水試のふ化場でふ化飼育した。水温は9～13℃である。安全性の判定はふ化率を比較することによって行った。

結 果

ヨード剤の処理濃度と処理時間の発眼卵への影響についての検討結果を図-11に示した。

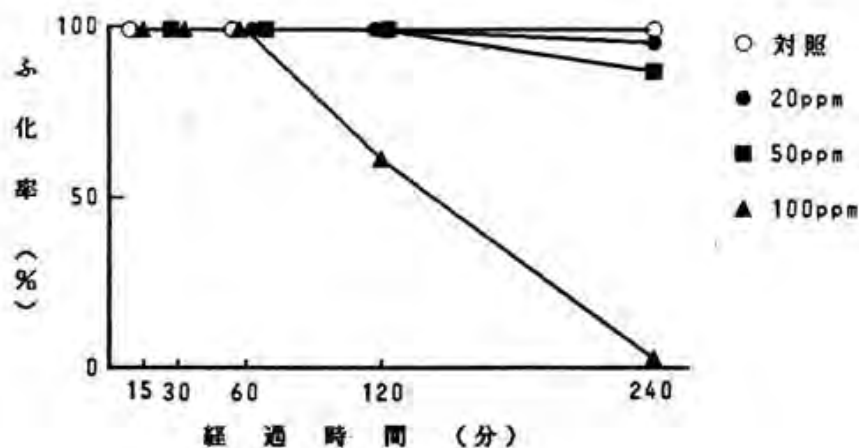


図-11 ヨード剤処理のアマゴ発眼卵ふ化率に及ぼす影響

イソジンの 20ppm 溶液では、浸漬時間に関係なく、アマゴ発眼卵のふ化率は 96~98%で、対照群の 98%に対して差がなかった。次に 50ppm では、浸漬時間が 120 分までは対照群と差がなかったが、240 分では差が認められてふ化率は 86%に低下した。また 100ppm では、浸漬時間が 60 分までは対照群と差がなかったが、120 分ではふ化率は 62%に低下し、240 分では 3%にまで低下した。

考 察

市販のヨード剤イソジンの発眼卵消毒における安全使用条件を明らかにするため、処理濃度と処理時間を変えて発眼卵への影響を検討したところ、50ppm では 120 分間まで発眼卵に影響のないこと、100ppm でも 60 分間以内であれば影響がみられず、発眼卵に対して安全性の高い消毒薬であることが明らかにされた。

発眼卵の消毒については、Blake(1930)により Acriflavine 1:2000 倍液で 20~30 分間処理による消毒法が推奨されて以来、Sulfamerthiolate(Gee and Sarles, 1942)などの使用も試みられ、McFadden(1969)も PVP-I 1%溶液に 10 分間浸漬することによって、有効な消毒が可能であることを報告している。その後、Amend and Pietsch(1972)はヨード剤の Wescodyne、Betadine の 25ppm (有効ヨウ素) 5 分間浸漬によって I HN ウイルス、I PN ウイルス及び VHS ウイルスを完全に不活化し得ることを報告している。わが国ではマス類のせつそう病菌防除のため、種卵の移動に際して出荷時の発眼卵消毒に Acriflavine が使用されたが(山崎・原, 1976)、I HN が各地に流行した 1974 年以降はヨード剤が発眼卵消毒に使用されている。I PN ウイルスのように卵殻内に存在するウイルスには効果が及ばないとみられるので、消毒が I PN に対する絶対的な処置ということとはできない。しかし、原因ウイルスを減少させることは防疫上大きな意味があるので、ヨード剤による卵の消毒に努めるべきである。

第 4 節 病死魚の廃棄方法の検討

病死魚及びキャリアー魚は伝染源として重要である。事実 Sano(1972a)は、各地で発生したニジマスの I PN について、病死魚から $10^{5.8\sim 8.2}$ TCID₅₀/ml のウイルスを検出しており、また Billi and Wolf(1969)はカワマスの 18 月令のキャリアーの糞中から $10^{1.7\sim 7.1}$ TCID₅₀/ml、Wolf et al.(1963)は、カワマス親魚で採卵時の体腔液中から $10^{4.75\sim 6.5}$ TCID₅₀/ml の I PN ウイ

ルスを検出している。養魚現場ではウイルスを保有するへい死魚を取り上げた場合、これをどのように処理するかは防疫対策上きわめて重要と考えられる。そこで本節では、ウイルス保有病死魚の廃棄のため一般的でまたどこでも容易に行える処理方法として、煮沸殺菌及び薬物消毒法について検討した。

実験 1. 煮沸殺菌

材料と方法

供試魚：体重 40、100、300 及び 1,000 g のニジマスを用いたが、1,000 g の供試魚は産卵期の雌親魚で、腹腔は卵で満たされていた。

煮沸方法：5 l の水を加熱用容器で沸騰後、撲殺した供試魚 1 尾を入れ沸騰状態を保った。

魚体内の温度測定：1 分毎に魚体内温度を測定した。温度計はデジタル温度計(宝工業、D411 型)にカテーター型のサーミスタセンサー(宝工業、XK 型)を接続して用いた。魚体内温度は肛門からセンサーを挿入し、胃に近い部分の腸管内で測定した。実験は 3 回行って測定値の平均で示した。

結 果

煮沸消毒によるニジマス体内温度(腸管内)の経時的变化を図-12 に示した。

魚体内温度が 60℃以上に達するための所要時間は、体重 40 g で 1.5 分、100 g では 4 分、300 g では 7 分、1,000 g では 14 分であった。また魚体内温度が 80℃以上に達するための所要時間はそれぞれ 2、6、10 及び 21 分で魚体が大きくなるに従って、体内温度が上昇するために要する時間は長くなった。さらに沸騰点近くまで昇温させるためには、それぞれ 7、12、19 及び 36 分以上が必要であった。

実験 2. 薬物消毒

材料と方法

供試魚：体重 45 g のニジマスを各消毒薬とも 12 尾ずつ用いた。

供試消毒薬：クレゾール石けん液(吉田製薬; 42~52V/V%) 3%溶液、サラシ粉(日本曹達; 有効塩素 60%) 5%溶液、それぞれ 100 を用いた。

実験薬剤濃度設定は、家畜伝染病予防法施行規則の薬物消毒基準によった。消毒薬剤の代わりに、飼育用水を用いて対照区とした。

消毒薬の魚体内への浸透状況の判定法：供試魚にせつそう病菌 *Aeromonas salmonicida* を接種して、5 日後

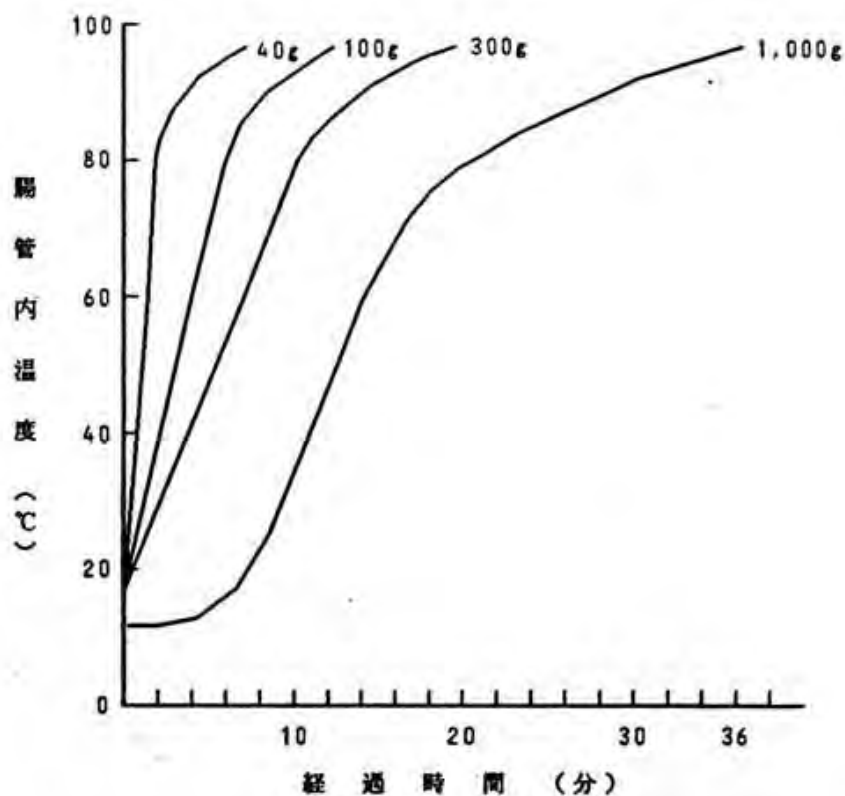


図-12 煮沸時のニジマス魚体内温度(腸管内)の経時的変化

のせつそう病魚を供試消毒薬液に浸漬し、24、48、72 及び 168 時間後に各 3 尾の供試魚を消毒薬液から取り出し、腎臓の組織から 1 白金耳を TS 寒天培地に塗抹して、20℃48 時間培養により、*A. salmonicida* の発育の有無によって、消毒薬の魚体内への浸透の有無を判定した。

結 果

消毒薬の魚体内への浸透状況の判定のために、せつ

そう病魚を消毒薬液に浸漬して、経時的に腎臓から *A. salmonicida* の分離を行いその結果を表-37 に示した。

クレゾール石けん 3% 溶液では、浸漬 24 時間後にも *A. salmonicida* が対照区と同等に分離されたが、48 時間後には一部の魚に、72 時間後にはすべての魚から菌が分離されなくなった。一方、サラシ粉 5% 溶液では 168 時間後も腎臓から *A. salmonicida* が分離された。飼育用水を用いた対照区では、168 時間後にも *A. salmonicida* が分離された。

表-37 *Aeromonas salmonicida* を接種したニジマス (45 g) を消毒薬に浸漬した場合の腎臓からの菌の分離状況

	経 過 時 間			
	24	48	72	168
クレゾール石けん液 3% 溶液	+++	+-	---	---
サラシ粉 5% 溶液	+++	+++	+++	+++
対 照	+++	+++	+++	+++

+ : 分離陽性 - : 分離陰性

考 察

I PN ウイルスは熱耐性が強く、第 5 章第 1 節の実験によると 60℃120 分の加熱処理では活性が残存し、

80℃10 分以上の処理で不活化されることが明らかにされている。煮沸によって、ウイルスを保有する病魚の殺菌処理を行う場合は、魚体内温度を 80℃以上に

保つことが必要と考えられる。沸騰水中での魚体内温度が80℃以上に達する時間を測定したところ、ニジマスの体重40gでは2分、100gでは6分、300gでは10分、1,000gでは21分であった。このことから、IPNウイルス保有魚を煮沸殺菌するためには、体重40gでは12分、100gでは16分、300gでは20分、1,000gでは31分以上煮沸しなければならないことが明らかとなった。煮沸殺菌は日常的にも使用される最も一般的な殺菌方法であって、沸騰水中で煮沸することにより、芽胞を除くほとんどの微生物を短時間に不活化し得ること、使用にあたっては危険性が少ないこと、毒性の残存がないことが知られている。従って、病死魚の廃棄のための殺菌だけではなく、高温で変質するもの以外は、ほとんどすべての器具、器材の殺菌に有効に応用できると考える。

薬物消毒によるIPNウイルス汚染魚排気のための処理については、一定のウイルスを保有する成魚を供試魚とすることが技術的に困難であったことから、分離培養が容易な*A. salmonicida*を指示菌として実験を行ったところ、クレゾール石けん液はサラシ粉に比べ魚体内への浸透性が高いことがわかった。しかし、病死魚を消毒薬で消毒処理後廃棄するためには、45gのニジマスの場合でクレゾール石けん3%溶液に72時間以上浸漬しなければならないと考えられ、親魚ではさらに長い時間を要するとみられることから、実用上には問題のあることが示唆された。

第5節 IPNを防除するための隔離飼育施設について

前章では長野県内における養魚場のIPN症例の疫学的調査によって、ウイルスに汚染した発眼卵による垂直伝播により急速に拡大したと考えられること、また同一養魚場内での連続する池や隣接する池での発病が多いこと、他の養魚場との魚、人や車の交流の多い場合に発病が多いこと等、水平伝播による地域内の養魚場間あるいは養魚場内での伝播の実態を明らかにした。このような事実からIPNの防疫対策としては、まず稚卵生産養魚場が保有する採卵親魚を清浄化し、垂直伝播の経路を遮断することが重要であり、次に養魚場における水平伝播を防止するために、非汚染水による養殖をはじめ養魚場間の魚、人及び車や器材の交流を断ち切ることが重要であることを指摘した(第3章第2節)。また本章では、IPNウイルスを殺菌するための消毒剤として、ハロゲン化合物の次亜塩素酸ナ

トリウム及びイソジンが有効であること、さらにイソジンによる発眼卵の消毒が可能であることを明らかにした。長野水試では本研究で得られたこれらの研究結果に基づいて、事業規模の隔離飼育施設を建設して稚魚生産が試みられている。本節ではその施設のIPN防除効果について検討した。

1. 施設の概要

IPNの防除を目的とした隔離飼育施設の概要を表-38及び図-13に示した。

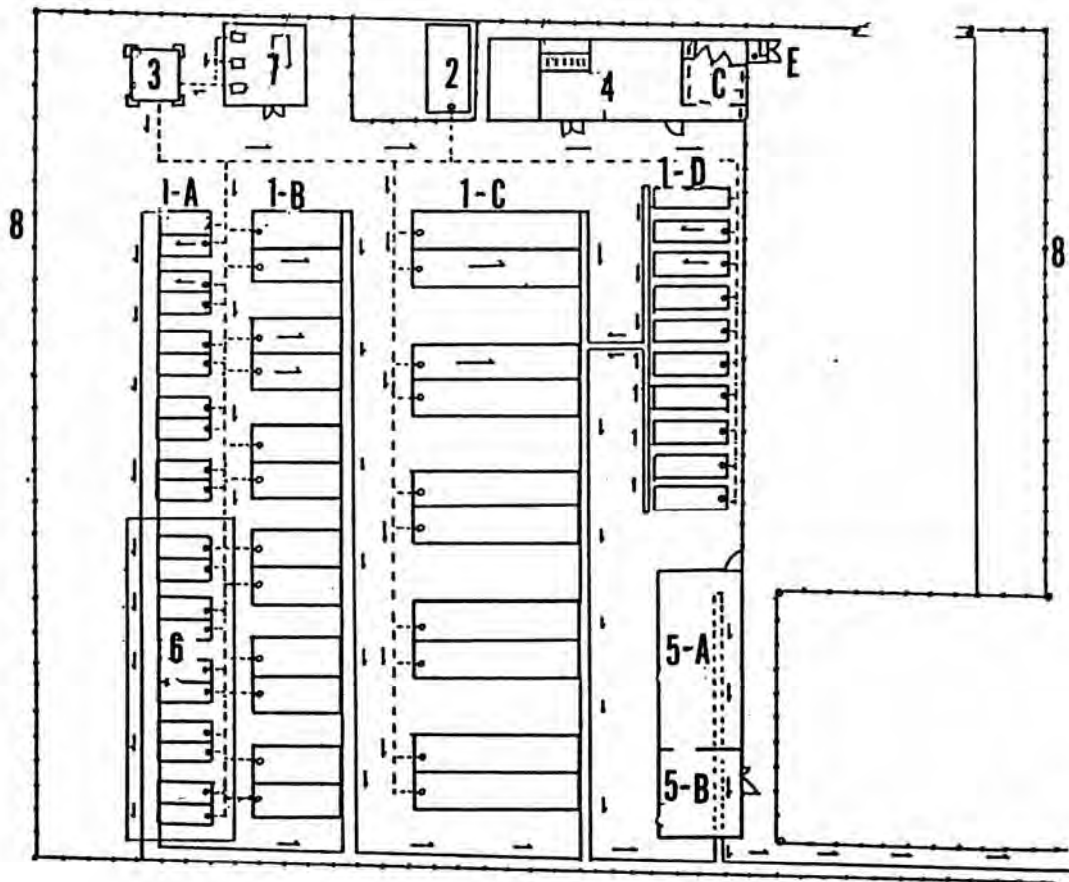
表-38 IPNを防除するための隔離飼育施設の概要

施設の名称	長野県水産試験場押野試験池
場所	長野県東筑摩郡明科町七貴
建設時期	1980年
敷地面積	3,073.3 m ²
規模	養魚池 52面、450 m ² (3 m ² 20面、6 m ² 10面、 10 m ² 12面、20 m ² 10面) 出荷池 1面、10 m ²
用水、水量、水温	地下水のポンプ揚水 最大600ℓ/秒、12.0±1.0℃
建物	315 m ² (管理棟82 m ² 、ふ化場83 m ² 、 稚魚棟127 m ² 、ポンプ棟23 m ²)
機械設備	揚水ポンプ 7.5 k w 1台 3.75 k w 2台 自家発電機 17 k v A 1台

長野県水産試験場押野試験池はニジマス、サケ、サクラマス等サケ科魚類の稚魚生産施設として1980年に建設され、敷地総面積は3,073.3 m²、池の総面積は460 m²で、養魚池は52面で450 m²及び出荷池は1面で10 m²である。飼育用水は敷地内において地下水をポンプ揚水し、内容積18トンの高架水槽から各池に配水パイプで供給され、水量は最大毎秒600ℓ、水温は年間をとおして12±1℃である。建物の総面積は315 m²で管理棟82 m²、ふ化場83 m²、稚魚飼育棟127 m²及びポンプ棟23 m²である。機械設備として揚水ポンプは7.5 k wが1台、3.75 k w 2台の計3台、自家発電機は17 k v Aが1台である。受精卵から発眼卵の期間に用いられるふ化場(図-13の5-B)及び出荷池を除いたすべての養魚池、建物及び機械設備は、高さ126cmの金網製フェンスで囲まれた内部に配置して外部とは隔離した。飼育管理者等は、管理棟の更衣室で専用の作業

衣に着替えて施設内に入るが、出入り口は1ヵ所のみである。飼料及び器具類の施設内への持ち込みは直接行わず、棚の上下に15Wの殺菌灯を各5本設置した殺菌灯照射室でU・V照射をした後に施設内に入れるように設計されている。隔離飼育施設には、病原体を保

有する恐れのある稚魚をはじめとした魚の持ち込みは行わず、ヨード剤で消毒した発眼卵からの飼育のみに限られている。2g以上に成長した稚魚は出荷池に収容の後に出荷されることから、活魚輸送車等は施設内に入ることはない。



1-A	養魚池	1m × 3m, 20面	5-A	ふ化場
1-B	養魚池	2m × 5m, 12面	5-B	ふ化場
1-C	養魚池	2m × 10m, 10面	6	稚魚飼育棟
1-D	養魚池	1.2m × 5m, 10面	7	ポンプ棟
2	出荷池	2m × 5m, 1面	8	フェンス
3	高架水槽		E	出入口
4	管理棟		C	更衣室

図-13 長野県水産試験場押野試験池に建設した隔離飼育施設

2, 飼育成績と疾病の発生状況

材料と方法

調査期間：1980～1988年（採卵年次）について調査した。

飼育成績：イソジン 50ppm、15分間消毒した長野県水産試験場産のニジマス及びサクラマスの発眼卵、北海道千歳川産のサケ発眼卵を施設内のふ化場（5-A）でふ化し、出荷或いは一般飼育池に移動する約2gサイズに達するまで養魚池で飼育した。

疾病の発生状況：飼育期間中に発生した疾病については、細菌及び寄生虫検査は第3章第1節と同様の方法により、ウイルス検査は第3章第1節と同様の方法によって行った。

結 果

1980年から1988年間の、長野水試押野試験池における飼育成績と疾病の発生状況は表-39のとおり

である。

ニジマス、サケ、サクラマスの発眼卵を年間118.7～183.9万粒ふ化して、約2gの稚魚を67.8～131.1万尾生産したが、発眼卵からの歩留まりは41.9～79.1%（平均64.6%）であった。疾病の発生状況をみると、窒素ガス病及び細菌性鰓病が毎年発生した。窒素ガス病は窒素ガスを含んだ地下水の使用に起因したが、主にサクラマスに発生しニジマス、サケの被害は少ない。細菌性鰓病は稚魚の成長とともに、用水量が不足する時期にいずれの魚種にも発生した。ニジマスではIPNが1985年に1件、1986年に2件発生し、一般飼育池に移して飼育したところへい死亡率が高まり32%～37%に達した。IHNは1987年に7件、1988年に3件発生し一般飼育池に移して飼育したところへい死亡率は38～86%であった。サケ及びサクラマスではIPN、IHNは発生しなかった。

表-39 長野県水産試験場押野試験池に建設した隔離飼育施設による飼育成績及び疾病の発生状況

採卵年次	飼育成績			疾病の発生状況			
	A 発眼卵数 万粒	B 稚魚生産数 万尾	B/A %	窒素ガス病	細菌性鰓病	IPN	IHN
1980	159.5	95.0	59.6		ニジマス、サケ		
1981	183.9	116.0	63.1		〃		
1982	183.9	121.8	66.2		〃		
1983	120.0	86.7	72.3	サクラマス	ニジマス、サケ、サクラマス		
1984	162.3	101.1	62.3	〃	〃		
1985	118.7	80.6	67.9	〃	〃	ニジマス	
1986	177.4	126.4	71.3	〃	〃	〃	
1987	161.9	67.8	41.9	〃	〃		ニジマス
1988	165.7	131.1	79.1	〃	〃		〃
計	1,433.3	926.5	64.6				

考 察

Wolf(1988)は、米国の一部の養魚場ではIPNウイルスフリーの環境で稚魚を飼育し、抵抗性を得る魚齢に達した段階で一般飼育池に移す防疫方法が行われていると報告しているが、養魚場における防疫のための隔離飼育施設に関する研究は、これまでまったく行われていない。長野水試の押野試験池は、IPNをはじめとした魚類伝染病を防除するために、垂直伝播の対策としての発眼卵のヨード剤による消毒と、水平伝播としての非汚染用水の使用及び飼育施設の隔離の三技

術を基本的な対策としている。

人、動物の伝染性疾病における隔離は、感染した個体を伝染可能な期間中他の感受性者から引き離すこと、つまり病原体の封じ込めが目的である。しかし魚類では病原体が一般に広く環境中に存在して封じ込めが困難であると考えられることから、逆に感受性魚を隔離飼育することによって、病原体から隔離する以外には効果的な方法がないと考えられる。本施設による9ヵ年間の飼育経過によれば、飼育用水に起因すると考えられる窒素ガス病と細菌性鰓病の発生及び1986年以降IPN、IHN等のウイルス性疾病の発生がそれぞ

れ2ヵ年あったことなど、完全な無病化はできなかつたが、年間約100万尾の事業規模の稚魚生産において生残率は平均64.6%を示した。隔離飼育施設が建設される以前には一般飼育池でふ化稚魚を飼育し、生残率は1973年と1974年は0%、1975年は8.9%、1976～1977年には稚魚生産を中止したこと(表-40)に比べて、本施設では安定した飼育が行われている。また伝染性疾病の発生があった場合にも伝播防止が容易で、被害を最小限にできること等が実証された。隔離飼育

施設はサケ科魚類の稚魚生産には極めて有効な対策と判断される。本施設はIPNの対策研究に基づいて建設された防疫施設で、現場において研究成果の実証がなされたことから、稚魚の隔離飼育は長野県内の民間養魚場で広く普及し、事業として取り入れられて利用されている。現在ではヨード剤による発眼卵の消毒、非汚染飼育用水の使用とともに、サケ科魚類の稚魚生産に必須の技術として普及している。

表-40 一般飼育池における飼育成績及び疾病の発生状況

採卵 年次	飼育成績			疾病の発生状況		備 考
	A 発眼卵数 万粒	B 稚魚生産数 万尾	B/A %	IPN	IHN	
1973	199.9	0	0	ニジマス	ニジマス	長野県水産試験場構内飼育
1974	1,026.5	0	0		ニジマス	大町市地籍のふ化施設で飼育、発眼卵出荷なし
1975	168.6	15.0	8.9		ニジマス	大町市地籍のふ化施設で飼育
1976	—	—	—			
1977	—	—	—			
1978	—	—	—			
1979	—	—	—			
計	1,395.0	15.0	1.1			

* 1976～1979は発眼卵及び稚魚の生産を中止した。

小 括

I P Nの防除を目的としてI P Nウイルスの飼育環境下における生存性、消毒剤による不活化高架、ヨード剤による発眼卵の消毒の安全性、病死魚の廃棄方法及び隔離飼育施設の効果について検討し以下の結果を得た。

(1) I P Nウイルスは淡水中で14週間以上活性を持続すること、他方ウイルスを乾燥させて室温に静置した場合、5～6週間後も活性が認められること等、I P Nウイルスが水中さらには陸上の乾燥条件下でも、強い生存性を有することが明らかになった。

I P Nウイルスに対する理化学的條件の影響について検討し、殺菌灯による紫外線の照射によって、I P Nウイルスを99%以上減少させるために必要な照射量は、 $1.5 \times 10^5 \mu \text{Wsec/cm}^2$ で、これは $500 \mu \text{w/cm}^2$ の強度で5分間の照射を要するなど、I P Nウイルスが紫外線に比較的強い耐性を示すことがわかった。また熱に対して比較的耐性を有し、 60°C の60分間の加熱処理では完全に不活化されず、完全に不活化するためには 80°C 以上で、10分以上加熱処理することが必要と考えられた。同様にpHに対しても耐性を示し、pH2からpH11まで比較的安定であることが明らかにされた。

(2) ハロゲン化合物の次亜塩素酸ナトリウム及びイソジン等市販の消毒薬によって、I P Nウイルスは不活化されるが、フェノール類のクレゾール石けん液及び界面活性剤のオスバンでは、I P Nウイルスの十分な不活化効果は期待できなかった。

(3) 市販のヨード剤消毒薬イソジンの発眼卵に対する安全性は高く、50ppmでは120分まで発眼卵に影響がないこと、100ppmでも60分以内であれば影響がなく、発眼卵に対して安全性の高い消毒薬であることが明らかにされた。

(4) I P Nの病死魚の廃棄のための煮沸殺菌について検討し、魚体内温度を 80°C 以上に上昇させるのに要する時間が、体重40gのニジマスでは1.5分、100gでは6分、300gでは10分、1,000gでは21分以上であったことから、さらに 80°C でI P Nウイルスを不活化させるに必要な時間である10分間をそれぞれ加えた時間、煮沸することが必要と考えられた。薬物消毒については*A. salmonicida*を指示菌として検討した結果、クレゾール石けん液はサラシ粉に比べ、魚体内への浸透性が高いことがわかった。しかし、病死魚を消毒薬で処理して廃棄するためには、クレゾール石けん液3%溶液に72時間以上浸漬しなければならないことになり、実用的ではないことが明らかになった。

(5) サケ科魚類の稚魚のI P Nを防除して、安定した稚魚生産を行うためには、隔離飼育施設を設備し、ヨード剤で消毒した発眼卵を導入して、非汚染用水を用いて飼育することが有効な対策であることを、長野水試押野試験池において事業規模の稚魚生産で実証し、得られた成果を県内の民間養魚場に広く普及させた。

総 括

I PN (infectious pancreatic necrosis、伝染性すい臓壊死症)は、ニジマスをはじめ養魚場で飼育する種々のサケ科魚類の稚仔魚期に発生して、産業上の被害が大きいウイルス性疾病である。罹病魚は、体の縦軸にそってキリモミ状に回転する旋回狂奔の異常な泳ぎをすること、外観症状は体色黒化、眼球突出、腹部膨満及び肛門に粘液便の懸着等がみられ、内部症状は幽門垂及びその周辺の点状出血、胃と腸に乳白色の粘液の貯留等のみられることが特徴である。本病は北アメリカで古くから知られており、M'Gonigle(1941)がカナダでカワマス稚魚の症例を急性カタル腸炎と報告し、Wood *et al.* (1955)は病理組織学的研究によってすい臓の線房細胞に壊死を認めてI PNと名付けた。Wolf *et al.* (1960)はカワマス稚魚の尾鰭の培養細胞を用いてウイルスを分離して、I PNがウイルス病であることを確認し、当初コクサッキーウイルスとも考えられたが、現在ではビルナウイルス(Dobos *et al.* 1979)に分類されている。さらにWolf and Qinmy (1962)がニジマスの生殖腺由来のRTG-2細胞系を樹立しI PNウイルスに感受性を有することを明らかにしたことから、その後のI PNの研究は飛躍的に発展した。

わが国では、1960年頃から各地の養魚場でニジマス稚魚に高率ののへい死を伴う激しい疾病が流行し当時は細菌、寄生虫などの検索が行われたが原因不明のため「不明病」と呼ばれ、症状と病理組織学的研究からI PNが疑われていた。その後Sano(1971a)が、RTG-2細胞を用いてウイルスを分離し、I PNであることを明らかにした。I PNは長野県をはじめ全国のニジマス生産地に広く分布しており、またアマゴでの発病も認められている。

本研究では、長野県におけるサケ科魚類の種苗生産の安定化を目標に、I PN防除に関する検討を行った。第1章ではI PN研究の歴史を概説して、従来の研究の多くがウイルス学的分野に偏重していること、養殖現場で実用化できる防除対策技術に関する研究がほとんどみられないことから、疫学的研究及びそれに基づいた防除対策技術の開発が養殖業の振興のために重要であることを指摘した。次に第2章では全国及び長野県のI PNの発生経過を検討して、ニジマスにおける全国のI PNの発生件数の年次変化が、1972年をピークにその後は減少傾向を示し、これはI PNに対する抵抗性の獲得(花田・牛山, 1985)によるものと考えられた。また、発生件数の増減の変化が3~4年を周期として、規則的に繰り返されていることから、I PNの流行はヒトなどの疫学的調査

において、一般にいわれている循環変化 epidemic cycle (金子, 1964; 松田, 1964; 重松他, 1985)に一致すると推論した。さらに、発生件数の増減の周期とニジマスの成熟年齢とが一致することから、I PNを耐過した魚が成長して成熟し、キャリアーとなって次世代にI PNを伝えている可能性が高く、発生件数の増加した年の魚群を親魚とすることによって、I PNの循環変化が維持されていることを明らかにした。

長野県では、1965年以降ニジマスのI PNの発生が確認されており、水温10~13℃の湧水を使用している養魚場の多い明科町、穂高町及び豊科町での発病例が多く、8℃以下の水温域では発病はみられないことがわかった。また1965~1988年間のI PNの発生件数の年次変化をみると、1970年と1982年に流行のピークを持つ二峰性を示すこと、その間隔が2~7年で規則的な周期性を示さないこと等から、全国のI PNの流行形態とは著しく異なっていた。長野県では、1974~1980年間にI PNの発生件数が減少したが、これは1973年産ニジマス稚魚に初発生し、その後に発生が続いている伝染性造血器壊死症(I HN)の影響と考えられ、I HNの発病がI PNの発病に先行したためと、I HNによって稚魚の生産数量が減少したことから、飼育密度の低下による環境改善が図られたこと及び飼育管理が徹底したこと等によって、I PNの発生件数が著しく減少したものと考えられる。長野県は種苗の生産量が他の県に比べて極めて多いことから、稚魚期に発生したI HNの影響を強く受けたが、もしI HNの発生がなければ長野県におけるニジマスのI PNの流行形態は、基本的には全国のI PNの流行形態と相似するものと考えられた。このように、I PNの流行の時間的経過を検討することによって、I PNの流行のパターンが変化することを示し、それが循環変化であることを推論した。

第3章では、長野県産ニジマス卵由来の稚魚に発生したI PNの61症例について、飼育水温及びI PN症状の発現の関係と発病週齢とへい死の傾向との相互関係を検討した。10℃以下の低水温における発病は症状の進行が慢性的であること、13℃以上の高い水温における発病は急性的であること、またそれらの中間の10~13℃の水温では亜急性的に進行することを明らかにした。このようにI PNの発生とへい死の傾向の違いから、I PN症状の発現は水温によって特徴づけられ、水温10℃以下の発病を慢性型、水温13℃以上の発病を急性型、この両者の中間の10~13℃の発病を亜急性型の3タイプに類別し

た。

慢性型は 10℃以下の低い水温時における 6 週齢以上の高週齢魚にみられ症状の進行は緩やかで、へい死は長期化する。病魚にはいくつかの症状が同時に発現し、腹部膨満、体色黒化、糞の懸着、眼球突出、ピンヘッド及び腹水の貯留等がみられる。

亜急性型は、10～13℃の水温における 4～6 週齢魚にみられ症状の進行はやや急速で、主な症状としては腹部突出、消化管内に粘液の貯留及び旋回狂奔等であるが、特徴的な症状としては旋回狂奔がみられる。

急性型は、13～15℃の高い水温時における 2～4 週の若齢魚にみられ症状の進行は急速で、へい死率が高く、へい死は短期間で終息する。主な症状としては腹部突出、消化管内に粘液、旋回狂奔及び動きの鈍化等の特徴的な症状の発現が一層明確にみられる。また 15℃以上では、さらに若齢化して 2 週未満の稚魚に発病が多く、症状の進行が急激な急性型の一種となる。I P N の症状としては、旋回狂奔、腹部膨満、肛門に粘液便の懸着等が報告され(Wood *et al.*, 1955; Snieszko *et al.*, 1959)、これらは I P N の特徴的な症状として知られている。本研究では症状の発現をその出現頻度で表すことによって、I P N 症状を数量的に示すことができた。その結果、腹部突出または腹部膨満、消化管内に粘液の貯留、旋回狂奔等の症状が出現率 80%以上の高率で、これらが I P N に多く出現する症状であることがわかった。殊に 10℃未満の低い水温から 15℃までのいずれの水温においても、消化管内に粘液を貯留する症状の出現率が高いことは、M'Gonigle(1941)が本病に関する最初の報告で急性カタル性腸炎と名付けているように、I P N を消化管の疾病として考えることが重要であろう。長野県内における養魚場の I P N 症例の疫学的調査では、I P N 流行の伝播様式として、ウイルスに汚染されたニジマス発眼卵が関与した垂直伝播の可能性が示唆され、I P N が短期間に伝播した要因は、種苗となる発眼卵を供給している主要な養魚場の採卵親魚が I P N ウイルスに汚染されていたこと、汚染卵が県内の養魚場をはじめとして広く供給されたことによるものと考えられた。このように、発眼卵は簡易な容器を用いた通常の小貨物などの輸送手段によって遠隔地への数日間の輸送にも耐えることが、I P N 伝播を容易にし広域化させる一因となったものと考えられる。また、I P N は同一養魚場における連続する池や隣接する池での発病が多いこと、発病した養魚場が上流にある場合に発病する事例が多いこと、魚、人や車等の他の養魚場と交流が多い場合に発病が多いこと及び発病経歴のある養魚場では発病し易いこと等、水平伝播によ

り同一養魚場内をはじめ地域内で拡大したことが確認された。

このような事実から I P N の防疫対策としては、まず種卵生産養魚場が保有する採卵親魚を清浄化し垂直伝播経路を遮断することが重要であり、次に養魚場における水平伝播を防止するために、非汚染水による養殖をはじめ、養魚場間の魚、人及び車や器材の交流を断ち切ることが必須の条件であることを指摘した。

1972 年に長野県の民間養魚場で、アマゴ稚魚に I P N の発病が初めて確認されたことから、わが国において産業上の被害が認められる魚種はニジマスとアマゴの 2 魚種となった。また、その他のサケ科魚類ではイワナ、カワマス、ブラウンマス、ヤマメ及びコレゴヌスから I P N ウイルスが分離され感染が認められた。

1984～1989 年の間に、長野県内の養魚場から分離された I P N ウイルス 19 株について、抗 VR299、抗 Sp 及び抗 Ab 血清を用いて、中和試験を行ったところ、抗 VR299 血清で中和された 2 株、抗 Ab 血清で中和された 2 株及び 3 種の抗血清のいずれによっても中和された 15 株とに一応型別されるが、長野県内で分離された株は相互に交差性が高く供試血清による明確な血清型別はなし得なかった。今後疫学的諸現象と血清型との関係を検討するためには、より特異性の高い抗血清を調整しなければならないことが示唆された。

第 4 章では、魚群内における I P N ウイルスの動態を魚の成長過程を通じて明らかにするため、長野県で飼育されているニジマス稚魚、成魚（1 年魚）及び親魚の成長段階別に、I P N ウイルスの保有状況を調べたところ、自家発病群の稚魚では、症状が発現する 1 週間前から既にウイルスが検出され、病勢の進行とともにウイルス保有率は高くなった。そしてへい死のピークが現れる前に、ウイルス保有率はほぼ 100%に達し、ピーク時にはむしろ低下していることがわかった。その後、保有率は低下するものの生残魚のうちの一部はウイルスを保有し続けること、成魚及び親魚にウイルス保有魚が認められたことから、ニジマスは稚魚から親魚までの生涯を通じて I P N ウイルスを保有し、その保有率には変化があることを明らかにした。また、I P N の発病経験のない魚群から I P N ウイルスが検出されたことから、I P N の不顕性感染が認められ、防疫を講ずる上で重要であると考えられた。

ニジマスふ化稚魚を用いた病死魚の経口投与実験並びにウイルス懸濁液による浸漬実験の結果から、I P N ウイルスの摂取あるいは水を介して感染発病することが認められた。さらに病死魚の経口投与の実験でへい死率が

高かったことは、養魚池の中に放置された病死魚が健康魚に摂取されることによって新たな感染環を生ずること、さらには経口感染が重要な伝染経路で、防疫対策上大きな問題となることが指摘され、I P Nを防除するためには日常の飼育管理の重要性が再認識された。

第5章では、I P Nウイルスを防除するため、I P Nウイルスの各種飼育環境条件下における生存性、消毒剤による不活化効果、ヨード剤による発眼卵の消毒の安全性、病死魚の廃棄方法及び隔離飼育施設の効果について検討したところ、I P Nウイルスは淡水中で14週間以上活性を持続し得ること、他方ウイルスを乾燥させて室温に静置した場合には、5～6週間後に活性が認められること等、I P Nウイルスが水中さらには陸上の乾燥条件下でも、強い生存性を有することが明らかとなった。また、殺菌灯による紫外線の照射によって、I P Nウイルスを99%以上減少させるために必要な照射量は、 $1.5 \times 10^5 \mu \text{Wsec/cm}^2$ で、これは $500 \mu \text{W/cm}^2$ の紫外線照度下で5分間の照射を要することになり、紫外線に比較的強い耐性を示すことがわかった。I P Nウイルスはまた熱に対しても耐性を有し、60℃の60分間の加熱処理では完全に不活化されず、完全な不活化のためには80℃以上で、10分以上加熱処理することが必要であることがわかった。同様にpHに対しても耐性を示し、pH2からpH11まで比較的安定であることが明らかにされ、I P Nウイルスは種々の理化学的條件に耐性を有するウイルスであることが再確認された。

市販消毒薬のハロゲン化合物の次亜塩素酸ナトリウム、イソジンによってI P Nウイルスの消毒が可能であるが、フェノール類のクレゾール石けん液及び界面活性剤のオスパンでは、I P Nウイルスの十分な不活化効果が期待できないことがわかった。またイソジンの安全性は高く、500ppmで120分間まで発眼卵に影響のないこと、100ppmでも60分間以内であれば影響がなく、発眼卵に対して安全性の高い消毒薬であることが確認された。

I P Nの病死魚の廃棄方法を検討し、煮沸殺菌のために魚体内温度を80℃以上に上昇させるのに要する時間は体重40gのニジマスでは2分、100gでは6分、300gでは10分、1,000gでは21分以上であることから、これに80℃の温度でI P Nウイルスを不活化させるに要す

る時間の10分間をそれぞれ加えた時間の煮沸が必要と考えられた。

また、*A. salmonicida*を指示菌として消毒薬の魚体内効果を検討したところ、クレゾール石けん液はサラシ粉に比べ、魚体内への浸透性が高いことがわかった。しかし、病死魚を消毒薬で処理して廃棄するためにはクレゾール石けん3%溶液に72時間以上浸漬しなければならず、実用的でないことが示唆された。

以上、得られた知見を総合するとサケ科魚類養殖においてI P Nを防除し、安定した稚魚生産を行うためには、隔離飼育施設を設備し、ヨード剤で消毒した発眼卵を導入して、非汚染用水を用いて飼育することが有効な対策であると考えた。そこでこれらの要件を満たしたモデル施設を長野水試押野試験池に設置し、事業的規模で稚魚の安定的生産が可能であることを実証し、得られた成果を県内の民間養魚場に広く普及した。

以上の本研究で得られた成果から、ニジマスをはじめとしたサケ科魚類の種苗生産の安定化を図るためI P Nの防除対策としては次の事項を遵守する必要があることを提案する。

- 1)採卵親魚を清浄化して、垂直伝播経路を遮断する。
- 2)ヨード剤による発眼卵の消毒を実施する。
- 3)隔離飼育及び非汚染水の飼育により水平伝播防止する。
- 4)適正飼育密度を厳守して、飼育環境の改善を図る。
- 5)池の清掃とへい死魚の除去など、飼育管理を徹底する。

終りに、最近I P Nの発生は総体的には減少傾向にあり、殊に1984年以降の発生件数は最盛期の10%以下で、流行の衰退期であるということが出来る。しかしI P Nウイルスは宿主範囲が極めて広いこと、環境条件等の諸条件に耐性が強いことから推察すると、将来的にもわが国のサケ科養殖魚類からI P Nを根絶することは極めて困難と考えられ、日常的な防疫対策が必要であること、さらには感受性魚の新たな増加や近年増加している国外からの魚卵移入に伴う血清型、病原性などの異なるウイルス株の侵入等、I P Nの流行が強まる要因が想定されるため、これら諸要因の恒常的な監視の重要性が指摘される。

謝 辞

稿を終わるにあたり、終始ご懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、さらに加えて細密なご校閲をいただいた北海道大学水産学部教授木村喬久博士に謹んで感謝の意を表す。また北海道大学水産学部教授信濃晴雄博士、同助教授松面良雄博士には本稿のご校閲を頂いたことに衷心よりお礼申し上げます。

本研究の遂行にあたってご指導とご助言、また供試培養細胞、抗血清を分与いただいた東京水産大学教授佐野徳夫博士に厚くお礼申し上げます。

また、かすかすの有益なご助言とご指導を賜った水産庁研究部参事官原武史博士と、北海道大学水産学部吉水守博士に心から感謝申し上げます。

さらに、長野県水産試験場佐々木治雄、小原昌和、長野県農政部本西晃の諸氏には研究の遂行にあたって援助と協力にあずかることが大きく、また田原偉成、山本聡両氏には原稿作成に協力頂き、ここにあらためて謝意を表す次第である。

引 用 文 献

1. Agniel, L. D. (1975): An assessment of passive transfer of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in trout. M. S. thesis. American university, Washington D. C.
2. Ahne, W. (1985): Virusinfektionen bei Fishen: Aetiologie, Diagnose und Bekämpfung, Veterinarmed. [B] 32: 237-264.
3. Ahne, W. (1978): Isolation and characterization of infectious pancreatic necrosis virus from pike (*Esox lucius*). *Arch. Viol.* 58, 65-69.
4. Ahne, W. (1979): Fish cell culture: A fibroblast line (PG) from ovaries of juvenile pike (*Esox lucius*). *In vitro* 15, 839-840.
5. Ahne, W. (1980): Vorkommen des Virus der Infektiosen Pankreasnekrose der Forellen (IPN) bei verschiedenen fishcharten. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr. 93, 14-16.
6. Ahne, W. (1982): Vergleichende Untersuchungen über die stabilität von vier fischpathogenen Viren (VHSV, PFR, SVCV, IPNV). *Zentralbl. Veterinarmed.* [B] 29, 457-476.
7. Ahne, W. and R. D. Negele (1985): Studies on transmission of infectious pancreatic necrosis virus via eyed eggs and sexual products of salmonid fish. In "Fish and Shell fish Pathology" (ed. by A. E. Ellis). Academic press, London, pp. 261-269.
8. Amend, D. F. and J. P. Pietsch (1972): An improved method for isolating viruses from asymptomatic carrier fish. *Trans. Am. Fish. soc.* 101: 267-269.
9. Amend, D. F. (1970): Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. *J. Fish. Res. Board. Can.* 27, 265-270.
10. Amos, Kevin, H. 編 (1985): 魚類病原体の検出法ならびに同定法, 第3版. アメリカ水産学会, 魚類保健部会, Corvallis, Oregon.
11. Argot, J. and R. G. Malsberger (1972): Intracellular replication of infectious pancreatic necrosis virus. *Can. J. Microbiol.* 18, 865-867.
12. Ball, H. J. , A. L. S. Munro, A. Ellis, K. G. R. Elson, W. Hodgkiss and I. S. McFarlane (1971): Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout in Scotland. *Nature* (London) 234, 417-418.
13. Besse, P. and de P. Kinkelin (1965): Sur l'existence en France de la necrose pancreatique de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). *Bull. Acad. Vet. Fr.* 38, 185-190.
14. Billi, J. L. and K. Wolf (1969): Quantitative comparison of peritoneal washes and faces for detecting infectious pancreatic necrosis (IPN) virus in carrier brook trout. *J. Fish. Res. Board. Can.* 26, 1459-1465.
15. Blake, Isobel (1930): The external disinfection of fish ova with reference to the prophylaxis of furunculosis. Fisheries, Scotland, Salmon Fish. , 2, H. M. Stationery Office, Edinburgh.
16. Bonami, J. R. , F. Cousserans, M. Weppe and B. J. Hill (1983): Mortalities in hatchery-reared sea bass fry associated with a birnavirus. *Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol.* 3, 41-42.
17. Bragg, R. G. and M. E. Combrink (1987): Isolation and identification of infectious pancreatic necrosis (IPN) virus from rainbow trout in South Africa. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.* 3, 41-42.
18. Bullock, G. L. , R. R. Rucker, D. F. Amend, K. Wolf and H. M. Stuckey (1976): Infectious pancreatic necrosis: transmission with iodine-treated and non treated eggs of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Board. Can.* 33, 1197-1198.
19. Cleator, G. M. and L. A. Burney (1980): The haemagglutinating properties of infectious pancreatic necrosis virus. *Arch. Virol.* 63, 81-85.
20. Desautels, D. and R. M. MacKelvie (1975): Practical aspects of survival and destruction of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board. Can.* 32, 523-531.
21. Dixon, J. and B. J. Hill (1983a): Rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.* 64, 321-330.
22. Dixon, J. and B. J. Hill (1983b): Inactivation of

- infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use. *J. Fish Dis.* 6, 399-409.
23. Dobos, P., B. J. Hill, R. Hallett, D. T. C. Kells, H. Becht and D. Teninges (1979): Biophysical and biochemical characterization of five animal virusis with bisegmented double-stranded RNA genomes. *J. Virol.* 32, 593-605.
 24. Dobos, P. (1976): Size and structure of the genome of Infectious pancreatic necrosis virus. *Nucleic Acids Res.* 3, 1903-1924.
 25. Dobos, P., R. Hallett, D. T. C. Kells, O. Sorensen and D. Rowe (1977): Biophysical studies of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 22, 150-159.
 26. Dorson, M. (1983): Infectious pancreatic necrosis of salmonids: Overview of current problems. in "Antigens of Fish Pathogens" (ed by D. P. Anderson). Collection Foundation Marcel Merieux. pp. 7-31.
 27. Drosen, M. and C. Torchy (1985): Experimental transmission of Infectious pancreatic necrosis virus *via* the sexual products. in "Fish and Shellfish Pathology" (ed. by A. E. Ellis). Academic Press, Lond. pp. 251-260.
 28. Drosen, M. and C. Torchy (1981): The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, caused by a European strain of Infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 4, 213-221.
 29. Dorson, M., J. Castric and C. Torchy (1978): Infectious pancreatic necrosis virus of salmonids: biological and antigenic features of a pathogenic strain and of a non-pathogenic variant selected in RTG-2 cells. *J. Fish Dis.* 1, 309-320.
 30. Dorson, M. (1977): Vaccination of rainbow trout fry against Infectious pancreatic necrosis. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 87, 405.
 31. Economon, P. P. (1963): Experimental treatment of infectious pancreatic necrosis of brook trout with polyvinylpyrrolidone-iodin. *Trans. Am. Fish. Soc.* 92, 180-182.
 32. Economon, P. P. (1973): polyvinylpyrrolidone-iodin as a control for infectious pancreatic necrosis of brook trout. P. 59-66 in W. A. Dill, ed. Symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control. EIFAC. Tech. paper 17, Suppl. 2.
 33. Elliott, D. G. and D. F. Amend (1978): Efficacy of certain disinfectants against infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish. Biol.* 12, 277-286.
 34. Eskildsen, U. K. and P. E. V. Jorgensen (1973): On the possible transfer of trout pathogenic viruses by gulls. *Riv. Ital. Piscicol. Ittiopatol.* 8, 104-405.
 35. Faisal, M. and W. Ahne (1980): Use of immunoperoxidase technique for detection of fish virus antigens. 186-192 in W. Ahne, ed. Fish diseases. Third COPRAQ Session. Springer-Verlag, New York.
 36. Fijian, N. (1974): Zarazna nekroza Gusterace pastrva: prvi nalaz virusa u Jugoslaviji. (IPN of salmonids: the first isolation of virus in Yugoslavia). *Vet. Arch.* 44, 187-192.
 37. Finlay, J. and B. J. Hill (1975): The use of the complement fixation test for rapid typing of Infectious pancreatic necrosis virus. *Aquaculture* 5, 305-310.
 38. Frantsi, C. and M. Savan (1971a): Infectious pancreatic necrosis virus: comparative frequencies of isolation from feces and organs of brook trout (*Solubelinus fontinalis*). *J. fish. Res. Board Can.* 28, 1064-1065.
 39. Frantsi, C. and M. Savan (1971b): Infectious pancreatic necrosis virus: temperature and age factors in mortality. *J. Wildl. Dis.* 7, 249-255.
 40. Fryer, J. L., A. Yusha and K. S. Pilcher (1965): The *in vitro* cultivation of tissue and cells of Pacific Salmon and steelhead trout. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126, 566-586.
 41. Gee, L. L. and W. B. Sarles (1942): The disinfection of trout eggs contaminated with *Bacterium salmonicida*. *J. Bact.*, Vol. 44, pp. 111-126.
 42. 岐阜県水産試験場 (1966): 春稚魚の疾病に関する研究。昭和41年度指定調査研究総合助成事業「魚病研究」報告書。
 43. Ghittino, P. (1972): Malattie esotiche dei pesci che minacciano trotilcoltura e carpicoltura e carpicoltura italiane. *Riv. Ital. Piscicol. Ittiopatol.* 7, 53-62.
 44. Gravell, M. and R. G. Malsberger (1965): A Permanent cell line from the fathead minnow (*Pimephales*

- promelas*). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126, 555-565.
45. 群馬県水産試験場(1966):ニジマス春稚魚の異常斃死に関する研究. 昭和41年度指定調査研究総合助成事業「魚病研究」報告書.
 46. Hah, Y., S. Hong, M. Kim, J. L. Fryer and J. R. Winton (1984): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from goldfish (*Carassius auratus*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) in Korea. *Korean J. Microbiol.* 22, 85-90.
 47. 花田 博, 牛山宗弘(1985): IPN 耐病性ニジマスの発現について. 静岡水試研報(20), 51-57.
 48. 原 武史(1979): サケ科魚のせつそう病の防除に関する研究, 東京大学審査学位論文.
 49. Hastein, T. and J. Krogsrud(1976): Infectious pancreatic necrosis. First isolation of virus from fish in Norway. *Acta vet. Scand.* 17, 109-111.
 50. Hattori, M., H. Kodama, S. Ishigro, A. Honda, T. Mikami and H. Izawa(1984): *In vitro* and *in vivo* detection of infectious pancreatic necrosis virus in fish by enzyme-linked immunosorbent assay. *Am. J. Vet. Res.* 45, 1976-1979.
 51. Hedrick, R. P., J. L. Fryer, S. N. Chen and G. H. Kou (1983): Characteristics of four birnaviruses isolated from fish in Taiwan. *Fish Pathol.* 18, 91-97.
 52. Hedrick, R. P., J. L. fryer(1982): Persistent infectious in salmonid fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV): A model for the carrier state in trout. *Fish Pathol.* 16, 163-172.
 53. Hedrick, R. P., J. C. Leong and J. L. fryer(1978): Persistent infectious in salmonid fish cells with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *J. Fish Dis.* 1, 297-308.
 54. Hill. B. J. (1982): Infectious pancreatic necrosis virus and its virulence. In" Microbial Diseases of Fish" (ed. by R. J. Roberts), Academic Press, pp. 91-114.
 55. Hill. B. J. (1976a): Properties of a virus isolated from the bi-valve mollusk *Tellina tenuis* (DaCosta). In" Wildlife Diseases" (ed by L. A. Page), Plenum Press, New York and London. pp. 445-452.
 56. Hill. B. J. (1976b): Molluscan viruses: their occurrence, culture and relationships. In" Proceedings of the First International Colloquium on Invertebrate Pathology", Queens Univ. Press, Kingston, Canada. PP. 25-29.
 57. Hill. B. J. (1977): Present status of IPN virus. in Proceedings of the international symposium on diseases of cultured salmonids. Tavolek, Inc., Seattle, Washington, pp. 116-119.
 58. Hill. B. J. and P. F. Dixon(1977): Studies on IPN virulence and immunization. *Bull. Off. Int. Epiz.* 87, 425-47.
 59. Hill. B. J., M. Dorson and O. F. Dixon(1980): Studies on immunization of trout against IPN. in" Fish Diseases" (ed. by W. Ahne), Third COPRAQ session, Springer-Verlag. N. Y. pp. 29-36.
 60. Hirai, K. and S. Shimakura(1974): Structure of infectious bursal disease virus. *J. Viol.* 14, 957-964.
 61. Ishigro, S., H. Izawa, H. Kodama, M. Onuma and T. Mikami(1984): Serological relationships among five strains of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Fish Dis.* 7, 127-135.
 62. Jorgensen, P. E. V. and F. Bregnballe(1969): Infectious pancreatic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Denmark. *Nord. Vet. Med.* 23, 568-575.
 63. Jorgensen, P. E. V. (1973b): Inactivation of IPN and Egtved virus. *Riv. Ital. Piscicol. Ittiopatol.* 8, 107-108.
 64. Jorgensen, P. E. V. and Kehlt, N. P. (1971): Infectious pancreatic necrosis (IPN) viruses in Danish rainbow trout: their serological and pathogenic properties. *Nord. Vet. Med.* 23, 568-575.
 65. Jorgensen, P. E. V. (1973a): The nature and activity of IPN virus neutralizing antibodies in normal and immunized rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Arch. Gesamte Virusforsch.* 42, 9-20.
 66. Jorgensen, P. E. V. and P. C. Grauballe(1971): Problems in the serological typing of IPN virus. *Acta Vet. Scand.* 12, 145-147.
 67. 金子生次(1964): ウイルスの生態学と疫学, 「ウイルス学」朝倉書店, 東京, 197-215.
 68. 工藤重治, 黒沢団, 国峰一声, 信沢邦宏, 小林茂(1973): IPN 症のニジマスにおけるすい臓及び肝臓の電子顕微鏡による観察. 魚類学雑誌 20, 163-177.
 69. 工藤重治, 黒沢団, 国峰一声, 信沢邦宏, 小林茂

- (1975): IPN ウイルスの微細構造に関する超微細細胞化学的観察. 魚類学雑誌 21, 203-212.
70. Kelly, R. K. and P. C. Loh(1972): Electron microscopical and characterization of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 10, 824-834.
71. Kimura, T., M. Yoshimizu and H. Yasuda(1984): Rapid, simple serological diagnosis of infectious pancreatic necrosis by coagglutination test using antibody sensitized staphylococci. *Fish Pathol.* 19, 25-33.
72. 木村喬久, 吉水守(1988): 魚病病原ウイルスの保存法. *Bull. JFCC*, 4, 1-8.
73. 北村敬(1976): 組織培養を用いたウイルスの免疫学的検査. ウイルス検査のための組織培養技術. 近代出版, 東京. 242-283.
74. Lientz, J. C. and Springer, J. e. (1973): Neutralization tests on infectious pancreatic necrosis virus with polyvalent antiserum. *J. Wildl. Dis.* 9, 120-124.
75. Lightner, D. and G. Post(1969): Morphological characteristics of infectious pancreatic necrosis virus in trout pancreatic tissue. *J. Fish. Res. Board Can.* 26, 2247-2250.
76. Ljungberg, O. and P. E. V. Jorgensen(1972): Infectious pancreatic necrosis of salmonids in Swedish fish farms. EIFAC 72/SC II-Symposium 14.
77. MacDonald, R. D. and D. A. Gower(1981): Genomic and Phenotypic divergence among three serotypes of aquatic Birnaviruses(Infectious Pancreatic Necrosis Virus). *Virology* 114, 187-195.
78. MacDonald, R. D. and J. C. Kennedy(1979): Infectious pancreatic necrosis virus persistently infects chinook salmon embryo cells independent of interferon. *Virology* 95, 260-264.
79. M'Gonigle, R. H. (1941): Acute catarrhal enteritis of salmonid fingerlings. *Trans. Am. Fish. Soc.* 70, 297-303.
80. MacKelvie, R. M. and H. Artsob(1969): Infectious pancreatic necrosis virus in young salmonids of the Canadian Maritime Provinces. *J. Fish. Board Can.* 26, 3259-3262.
81. MacKelvie, R. M. and D. Desautels(1975): Fish viruses. Survival and inactivation of Infectious Pancreatic Necrosis Virus. *J. Fish. Res. Board Can.* 32, 1267-1273.
82. Malsberger, R. G. and C. P. Cerini(1963): Characteristics of Infectious pancreatic necrosis virus. *J. Bacteriol.* 86, 1283-1287.
83. 松田心一(1964): 「疫学と疾病予防」, 第一出版, 東京.
84. McAllister, P. E. and X. Reyes(1984): Infectious pancreatic necrosis virus: Isolation from rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, imported into Chile. *J. Fish Dis.* 7, 319-322.
85. McFadden, T. W. (1969): Effective disinfection of trout eggs to prevent egg transmission of *Aeromonas liquefaciens*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 26, 2311-2318.
86. McKnight, I. J. and R. J. Roberts(1976): The pathology of infectious pancreatic necrosis. I. The sequential histopathology of the naturally occurring condition. *Br. Vet. J.* 132, 76-85.
87. McMichael, J., J. L. Fryer and K. S. Pilcher(1975): An antigenic comparison of three strains of Infectious pancreatic necrosis virus of salmonid fishes. *Aquaculture*, 6, 203-210.
88. Moewus, L. and M. M. Sigel(1963): *In vivo* and *in vitro* cultivation of a fresh water fish virus in marine host systems. *Proc.* 26, 26-135.
89. Moss, L. H. and Gravell(1969): Ultrastructure and sequential development of infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virol.* 3, 52-58.
90. Mulcahy, D. and R. J. Pascho(1984): Adsorption to fish sperm of vertically transmitted fish viruses. *Science* 225, 333-335.
91. Munro, A. L. S., Liversidge and K. G. R. Elson(1976): The distribution and prevalence of infectious pancreatic necrosis virus in wild fish in Loch Awe. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 75, (B) 223-232.
92. 長野県水産試験場(1982): ニジマス稚魚の疾病調査, 昭和45~55年の県別発生状況, 第7回全国養鱒技術協議会要録.
93. 長野県水産試験場(1982): ニジマス・在来マス等の疾病実態調査, 昭和56年の県別発生状況, 第7回全国養鱒技術協議会要録.
94. 長野県水産試験場(1983): ニジマス・在来マス等の疾病実態調査, 昭和57年の県別発生状況, 第8回全国養鱒技術協議会要録.
95. 長野県水産試験場(1984): ニジマス・在来マス等の

- 疾病実態調査, 昭和 58 年の県別発生状況, 第 9 回全国養鱒技術協議会要録.
96. 長野県水産試験場 (1985) : ニジマス・在来マス等の疾病実態調査, 昭和 59 年の県別発生状況, 第 10 回全国養鱒技術協議会要録.
97. 長野県水産試験場 (1986) : ニジマス・在来マス等の疾病実態調査, 昭和 60 年の県別発生状況, 第 11 回全国養鱒技術協議会要録.
98. 長野県水産試験場 (1987) : ニジマス・在来マス等の疾病実態調査, 昭和 61 年の県別発生状況, 第 12 回全国養鱒技術協議会要録.
99. 長野県水産試験場 (1988) : ニジマス・在来マス等の疾病実態調査, 昭和 62 年の県別発生状況, 第 13 回全国養鱒技術協議会要録.
100. 長野県水産試験場 (1989) : ニジマス・在来マス等の疾病実態調査, 昭和 63 年の県別発生状況, 第 14 回全国養鱒技術協議会要録.
101. 長野県水産試験場 (1971) : ニジマスの IPN 症, 昭和 46 年度指定調査研究総合助成事業「魚病研究」中間報告書.
102. 長野県水産試験場 (1972a) : ニジマスの IPN 症, 昭和 46 年度指定調査研究総合助成事業「魚病研究」報告書.
103. 長野県水産試験場 (1972b) : ニジマスの IPN 症, 昭和 47 年度指定調査研究総合助成事業「魚病研究」中間報告書.
104. 長野県水産試験場 (1973) : ニジマスの IPN 症, 昭和 47 年度指定調査研究総合助成事業「魚病研究」報告書.
105. 長野県水産試験場 (1975) : ニジマスのウイルス性疾病, 昭和 49 年度指定調査研究総合助成事業「魚病研究」中間報告書.
106. Nicholson, B. L. (1971) : Macromolecule synthesis in RTG-2 cells following infection with infectious pancreatic necrosis (IPN) virus. *Gen. Virool.* 13, 369-372.
107. Nicholson, B. L. and C. Byrne (1973) : An established cell line from Atlantic salmon (*salmo salar*). *J. Fish. Res. Board Can.* 30, 913-916.
108. Nicholson, B. L. and J. Dunn (1974) : Homologous interference in trout and Atlantic salmon cell cultures infectious pancreatic necrosis virus. *J. Virool.* 14, 180-182.
109. Nicholson, B. L. and P. Caswell (1982) : Enzyme-linked immunosorbent assay for identification of infectious necrosis virus. *J. Clin. Microbiol.* 16, 469-47.
110. Nicholson, B. L. and E. A. Henchal (1978) : Rapid identification of infectious pancreatic necrosis virus in infected cell cultures by immunoperoxidase techniques. *J. Wildl. Dis.* 14, 465-469.
111. 農林水産省統計情報部 (1989) : 昭和 63 年漁業・養殖業生産統計年報, 142-229.
112. Okamoto, N., T. Sano, R. P. Hedric and J. L. Fryer (1983) : Antigenic relationships of selected strains of infectious pancreatic necrosis virus and European eel virus. *J. Fish Dis.* 6, 19-25.
113. Okamoto, N., N. Taniguchi, Y. Seno and T. Sano (1984) : The relation between the change of quantities of infectious pancreatic necrosis virus rainbow trout fry and the disease process. *Fish Pathol.* 19, 1-4.
114. 岡本信明, 妹尾良雄, 谷口則彦, 佐野徳夫 (1987b) : IPN ウイルス接種量とニジマス稚魚のへい死との関係. *日水誌*, 53 (11), 1975-1978.
115. 岡本信明, 富亮平, 柴崎弘之, 半沢貞彦, 佐野徳夫 (1987a) : IPN ウイルス接種時水温と飼育水温がニジマス稚魚のへい死に及ぼす影響. *日水誌*, 53 (7), 1125-1128.
116. 尾崎良克 (1964) : ポリオウイルス, 「ウイルス学」, 東昇・石田名香雄編, 朝倉書店. 東京. pp768-773.
117. Parisot, T. J., W. t. Yasutake and V. Bressler (1963) : A new geographic and host record for infectious pancreatic necrosis. *Trans. Am. Fish. Soc.* 92, 63-66.
118. Parisot, T. J., W. T. Yasutake and G. W. Klontz (1965) : Virus diseases of the Salmonidae in western United States. I. Etiology and epizootiology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126, 502-519.
119. Piper, D., B. L. Nicholson and J. Dunn (1973) : Immunofluorescent study of the replication of infectious pancreatic necrosis in trout and Atlantic salmon cell cultures. *Infect. Immun.* 8, 249-254.
120. Reno, P. W., S. Darley and M. Savan (1978) : Infectious pancreatic necrosis: experimental induction of the carrier state in trout. *J. Fish. Res. Board Can.* 35, 1451-1456.
121. Roberts, R. J. and McKnight, I. J. (1976) :

- The pathology of infectious pancreatic necrosis. II. Stress-mediated recurrence. *Br. Vet. J.* 132, 209-213.
122. Sano, T. (1971a): Studies on viral diseases of Japanese fishes. I. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: first isolation from epizootics in Japan. *Soc. Sci. Fish.* 37, 495-498.
123. Sano, T. (1972a): Studies on viral diseases of Japanese fishes. III. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: geographical and seasonal distribution in Japan. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 38, 313-316.
124. Sano, T. (1973): Studies on viral diseases of Japanese fishes. IV. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: susceptibility of fresh water salmonids of genus *Oncorhynchus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 39, 117-120.
125. Sano, T., N. Okamoto and T. Nishimura (1981a): A new viral epizootic of *Anguilla japonica* Temmink and Schlegel. *J. Fish. Dis.* 4, 127-139.
126. Sano, T. (1971b): Studies on viral diseases of Japanese fishes. II. Infectious pancreatic necrosis of rainbow trout: pathogenicity of the isolants. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 37, 499-503.
127. Sano, T., K. Suzuki and S. Fukuzaki (1981b): Immune response in adult trout against formalin killed concentrated IPNV. *Develop. Biol. Standard.* 49, 63-70.
128. Sano, T. (1976): Viral diseases of cultured fishes in Japan. *Fish Pathol.* 10, 221-226.
129. Sano, T. (1972b): Possibility to reduce the high mortality: Effect of low temperature rearing. Exp. paper pp. 1-3. In symposium on the major communicable fish diseases in Europe and their control. Organized by FAO/EIFAC, 22-April, Amsterdam, the Netherlands.
130. 佐野徳夫, 牛山宗弘 (1970): ニジマス稚魚の流行病, 特にヘキサミタ症及び IPN 類似症について. *魚病研究*, 4, 119-124.
131. Sano, T., N. Nishimura, T. Okamoto, T. Yamazaki and H. Hanada (1977): Studies on viral diseases of Japanese fishes. VI. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the midland of Japan. *J. Tokyo Univ. Fish.* 63, 81-85.
132. Sano, T. and T. Yamazaki (1973): Studies on viral diseases of Japanese fishes V. Infectious pancreatic necrosis of Amago trout. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 39, 477-480.
133. Schlotfeldt, H. J., B. Liess and J. W. Frost (1975): Erst isolierung und Identifizierung des Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPN) der Salmoniden in der Bundesrepublik Deutschland. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 88, 109-111.
134. 重松逸造他 (1985): 「伝染病予防必携」第3版, 重松逸造他編, 日本公衆衛生協会.
135. Snieszko, S. F., E. M. Wood and W. T. Yasutaka (1957): Infectious pancreatic necrosis in trout. *Am. Med. Ass. Arch. Path.* 63, 229-233.
136. Snieszko, S. F., K. Wolf, J. E. Camper and L. L. Pettijohn (1959): Infectious nature of pancreatic necrosis. *Trans. Am. Fish. Soc.* 88, 289-293.
137. Snieszko, S. F. (1974): The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. *J. Fish. Biol.* 6, 167-208.
138. Sonstegard, R. A., L. A. McDermott and K. S. Sonstegard (1972): Isolation of infectious pancreatic necrosis virus from white suckers (*Catostomus commersoni*). *Nature (London)* 236, 174-175.
139. Sonstegard, R. A. and L. A. McDermott (1972): Epidemiological model for passive transfer of IPNV by homeotherms. *Nature (London)* 237, 104-105.
140. Sonstegard, R. A. and McDermott, L. A. (1971): Infectious pancreatic necrosis of salmonids in Ontario. *J. Fish. Res. Board Can.* 28, 1350-1351.
141. 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.
142. 反町稔, 佐古浩 (1982): 降海性アマゴから分離された IPN ウイルス. *魚病研究*, 17, 115-118.
143. Stephens, E. B., M. W. Newman, A. L. Zachary and F. R. Hedrick (1980): A viral etiology for the annual spring epizootics of Atlantic menhaden, *Brevoortia tyrannus* (Latrobe) in Chesapeake Bay. *J. Fish Dis.* 3, 387-398.
144. Swanson, R. N. and J. H. Gillespie (1981): An indirect fluorescent antibody test for the rapid detection of infectious pancreatic necrosis virus in tissue. *J. Fish Dis.* 4, 309-315.

145. Swanson, R. N. (1981): Use of the indirect fluorescent antibody test to study the pathogenesis of infectious pancreatic necrosis virus infection in trout. pp. 71-77. in (ed. by D. P. Anderson and W. Hennessen) Proceeding of the international symposium on fish biologics: serodiagnostic and vaccine, National Fish Health Research Laboratory, Leetown, west Virginia.
146. 谷崎正生, 田代文男, 小林正典(1967): ニジマス, 「養魚学各論」川本信之編, 恒星社厚生閣, 東京, p. 312-409.
147. Tenings, D., A. Ohanessian, C. Richard-Moland and D. Contamine(1979): Isolation and biological properties of Drosophila X virus. *J. Gen. Virol.* 42, 241-254.
148. 東京都水産試験場(1973): ニジマスの病害研究, 昭和47年度指定調査研究総合助成事業「魚病研究」報告書.
149. 東京都水産試験場(1983): マス類の伝染性病原体に関する研究, 昭和57年度魚病対策技術開発研究報告書.
150. Toranzo, A. E., J. L. Barja, M. L. Lemos and F. M. Hetric (1983): Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 3, 51-53.
151. Wedsmeyer, G. A., Nelson N. C. and Smith C. A. (1978): Survival of the salmonid viruses infectious hematopoietic necrosis (IHN) and infectious pancreatic necrosis (IPNV) in ozonated, chlorinated and untreated waters. *J. Fish Res. Board Can.* 35, 875-879.
152. Wolf, K., S. F. Snieszko, C. E. Dunbar and E. Pyle (1960): Virus nature of infectious pancreatic necrosis in trout. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 104, 105-108.
153. Wolf, K. and M. C. Quimby(1962): Established eurythermic line of fish cells *in vitro*. *Science* 135, 1065-1066.
154. Wolf, K. (1988): Infectious Pancreatic Necrosis. in *Fish Viruses and Fish Viral Diseases*, Comstock Publishing Associates, Cornell Univ. Press, London. pp. 115-157.
155. Wolf, K. and L. L. Pettijohn(1970): Infectious pancreatic necrosis virus isolated from coho salmon fingerlings. *Prog. Fish-Cult.* 32, 17-18.
156. Wolf, K., M. C. Quimby and C. P. Carlson(1969): Infectious pancreatic necrosis virus: Iyophilization and subsequent stability in storage at 4 °C. *Appl. Microbiol.* 17, 623-624.
157. Wolf, K. and M. C. Quimby(1971): Salmonid viruses: Infectious pancreatic necrosis virus. Morphology, pathology and serology of first European isolations. *Arch. ges. virusforsch.* 34, 144-156.
158. Wolf, K. and M. C. Quimby(1967): Infectious pancreatic necrosis (IPN): its diagnosis, identification, detection and control. *Riv. Ital. Piscicol. Ittiopatol.* 2, 76-78.
159. Wolf, K., C. E. Dunbar and E. A. Pyke(1961): Infectious pancreatic necrosis of trout. II. Experimental infections with eastern brook trout. *Prog. Fish-Cult.* 23, 61-65.
160. Wolf, K., M. C. Quimby and A. D. Bradford(1963): Egg-associated transmission of IPN virus of trouts. *Virol.* 21, 317-321.
161. Wolf, K., M. C. Quimby, C. P. Carlson and G. L. Bullock (1968): Infectious pancreatic necrosis, selection of virus-free stock from a population of carrier trout. *J. Fish. Res. Board Can.* 25, 383-391.
162. Wolf, K. and M. C. Quimby(1969): Infectious pancreatic necrosis: clinical and immune response of adult trouts to inoculation with live virus. *J. Fish. Res. Board Can.* 26, 2511-2516.
163. Wolf, K. and M. C. Quimby(1973): Fish viruses: Buffers and Methods for plaquing eight agents under normal atmosphere. *Appl. Microbiol.* 25, 659-664.
164. Wood, E. M., S. F. Snieszko and W. T. Yasutake(1955): Infectious pancreatic necrosis in brook trout. *Am. Med. Arch. Path.* 60, 26-28.
165. Yamamoto, T. and J. Kilistoff(1979): Infectious pancreatic necrosis virus: quantification of carriers in lake populations during a six year period. *J. Fish. Res. Board Can.* 36, 562-567.
166. Yamamoto, T. (1974): Infectious pancreatic necrosis virus occurrence at a hatchery in Alberta. *J. Fish. Res. Board Can.* 31, 397-402.
167. Yamamoto, T. (1975a): Frequency of detection and survival of infectious pancreatic necrosis virus

- in a carrier population of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) in a lake. *J. Fish. Res. Board Can.* 32, 568-570.
168. Yamamoto, T. (1975b): Infectious pancreatic necrosis (IPN) virus carriers and antibody production in a population of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canad. J. Microbiol.* 21, 1343-1347.
169. 山崎隆義, 原武史 (1976): 疾病, 「養鱒の研究」, 全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会編, 緑書房, 東京, p. 48-94.
170. Yasutake, W. T., T. J. Parisot and G. W. Klontz (1965): Virus diseases of the Salmonidae in western United States. II. Aspects of pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 126, 520-530.
171. Yasutake, W. T. (1970): Comparative histopathology of epizootic salmonid virus disease. in A symposium on disease of fishes and shellfishes (ed. By S. F. Snieszko). *Am. Fish Soc. Spec. Publ.* 5. pp. 341-350.
172. 吉水守, 瀧沢宏子, 木村喬久 (1986a): 魚類病原ウイルスの紫外線感受性. *魚病研究*, 21, 47-52.
173. 吉水守, 瀧沢宏子, 亀井勇統, 木村喬久 (1986b): 魚類病原ウイルスと環境由来微生物との相互作用: 飼育用水中での生存性. *魚病研究*, 21, 223-231.
174. Yoshimizu, M. and T. Kimura (1990): Viral infections of cultured fish in Japan. p959-962, In Hirano, R. and I. Hanyu (ed), The second Asian Fisheries Forum, Asian Fisheries Society.
175. 養鱒部会 (1966): 魚病分科会, 第 22 回全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会要録.