NIBS LETTER 2025 JULY No. 636

日生研だより

第 71 巻 第 3 号(通巻 636 号) 2025 年(令和 7 年)7 月

挨拶・巻頭言

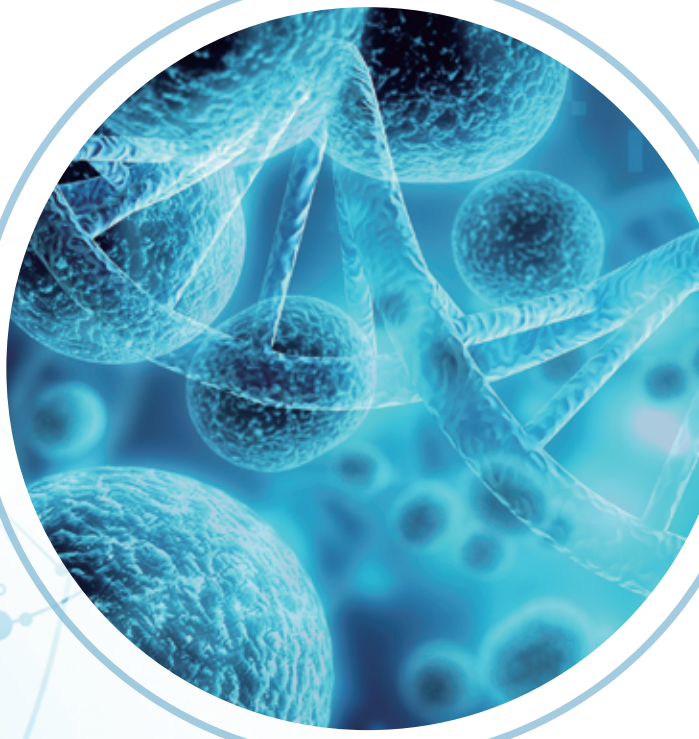
視野を広げた先につながりを
…… 杉 浦 勝 明（2）

レビュー

魚類ウイルス病制御における課題
…… 佐 野 元 彦（3）

おしらせ

第 65 回獣医疫学会学術集会で
優秀発表賞を受賞……（12）



一般財団法人 日本生物科学研究所
NIBS NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

視野を広げた先につながりを

杉浦勝明

初夏の風が緑を揺らし、研究所の周囲にも新しい季節の訪れを感じる頃となりました。皆さまには日頃より当研究所の研究・運営に格別のご理解とご協力を賜り、厚く御礼申し上げます。

この春、私は数日間の休暇をいただき、米国・シカゴを訪れる機会がありました。観光が目的ではありましたが、街の活気、文化、そして人々の暮らしに触れる中で、さまざまな気づきを得ることができました。特に印象深かったのは、ミレニアム・パークにある「クラウド・ゲート（通称：ザ・ビーン）」を訪れたときのことです。湾曲した鏡面に映り込む空と街は、終わりも始まりもない楕円形につながっており、そこに紛れ込む自分自身の姿を確認しながら、世界はつながっているのだということを改めて感じることができました。分断が囁かれて久しい米国の地でもなお、端と端はどこかでつながり、社会は確かに循環しているのです。

もうひとつ忘れがたい体験となったのは、名門リグレー・フィールドで観戦したカブス対ドジャーズのメジャーリーグの試合です。歴史ある球場に響く観客の歓声と、ひとつひとつのプレーに注がれる熱気は、スポーツがいかに地域社会をつなぎ、人々の心を高揚させるかを体感させてくれました。国籍や言語の違いを超えて、同じ瞬間を分かち合う喜びには、研究にも通じる「協働」の力があるように思います。偶然隣り合わせた地元ファンと交わした笑顔と言葉に、科学と同様、対話の大切さを改めて感じました。

また、現地のスーパーに立ち寄った時には、牛肉や卵といった畜産物が日本よりも高価であることに驚かされました。現在、米国では高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）の発生があり、主に鶏卵の供給と価格に深刻な影響を及ぼしています。特に、乳牛への感染も報告されており、畜産業全体への影響が懸念されています。さらに、滞在中にはテレビやニュースで、トランプ大統領の関税政策が再び注目を集めている様子も繰り返し目にしました。米国内外の経済の先行きに不安が広がる中で、物流や飼料のコストが今後さらに変動する可能性もあり、畜産業界全体にとっても無関係ではいられません。

このような国際情勢の変化が、私たちの生活の根幹である「食」に直接的な影響を与え得ることを実感した旅でもありました。そして、動物用ワクチンの研究という私たちの取り組みが、そうした不安定さの中でも家畜の健康を守り、生産現場を支え、ひいては社会全体の安心につながっていることを、改めて深く意識するきっかけにもなりました。今日自分たちが蒔いた種が巡り巡って、違う場所で、あるいは異なる時代に芽吹くことを夢みることは決して馬鹿げたことではないと信じたい今日この頃です。

足元を固めながらも、常に広い視野で課題と向き合う姿勢を忘れず、今後も研究と実装の両輪を確実に進めてまいります。引き続き、皆さまのご指導・ご支援を賜りますよう、何卒よろしくお願い申し上げます。

（所長）

レビュー

魚類ウイルス病制御における課題

佐野元彦（東京海洋大学海洋生物資源学部門水族病理学研究室）

はじめに

水産養殖は、漁船等による漁業の生産を金額では抜き、世界で見れば右肩上がりの成長産業であり、人類 100 億人時代における重要な動物タンパク質供給源として期待されている。しかし、魚病の発生が最も大きな生産障害となっており、その制御は養殖の持続的発展において必須である。畜産動物と異なり、新たな疾病が頻繁に発生し、国際獣疫事務局（WOAH）のリスト疾病にもしばしば新たな疾病が加えられている。このような状況は、地域外から新たな疾病が侵入するリスクが極めて高いことを意味しており、日本においても、過去に伝染性造血器壊死 症（infectious hematopoietic necrosis : IHN）、マダイイリドウイルス病、クルマエビ類のホワイトスポット病、コイヘルペスウイルス（koi herpesvirus : KHV）病などが海外から国内に受精卵や種苗とともに持ち込まれたと考えられている。国内では海面や内水面でいろいろな魚種が養殖されており、それぞれの対象魚種で様々な魚病と戦わなければならない。本稿では、魚価の安い内水面（淡水）養殖におけるウイルス病制御の実態と課題をご紹介する。

魚病被害の発生現状と対策

農林水産省によれば、日本における魚病被害は 100 億円前後で、生産額に対しておよそ 3–5% と推定されている。被害額の内訳をみると、細菌感染症が大半を占めており、生産額の多いブリ類のレンサ球菌症、ノカルジア症やマダイとヒラメのエドワジエラ症などで被害額が大きい。ウイルス病では、ブリ類やマダイのイリドウイルス病で被害が大きい。内水面の養殖では、マス類の IHN が長年被害の第 1 位を占めており、ウナギの血管内皮壊死症、アユの異型細胞性鰓病、コイの KHV 病や浮腫症／眠り病、キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症などのウイルス病の被害がみられるが、養殖生産額自体が小さく、従って魚病被害額も小さい。日本の水産用ワクチンはすべて不活化ワクチンで、海面養殖ではブリ類、マダイ、ハタ類、ヒラメ、カワハギで、内水面養殖ではサケ科魚とアユで承認されている。ウイルス病のワクチンは、イリドウイルス病とウイルス性神経壊死症の 2 種しかなく、ともに注射ワクチンとなっている。内水面養殖では、生産額が小さく、注射ワクチンに対してワクチン自体と注射労働のコストに見合った市場はない。経口投与はブリのレンサ球菌症の 1 製剤のみで、浸漬投与で用いられる不活化ビブリオワクチンはニジマスなどで用いられている。内水面養殖では、労働コストの低い浸漬あるいは経口で投与できるワクチンが求められ、かつ、魚の生産コストを圧迫しない程度にワクチンの価格を抑える必要がある。不活化ワクチンの浸漬投与や経口投与の研究が進められているが、現状ではウイルス病に対して十分な免疫を得ることが難しい。昨年、農林水産省は水産用の DNA ワクチンとサブユニットワクチンの製造承認を受付ける省令改正を行った。生ワクチンについては、まだ許認可の対象とされていない。このような状況の中、内水面養殖では、ウイルス病の制御として、免疫を得た感染耐過魚を養殖種苗として用いられることが多い。感染耐過魚はウイルスキャリアであるため、養殖環境中に常にウイルスが存在するようになる。これによってウイルスフリーの種苗を用いていると大量死を起こすリスクが極めて高いので、現実には感染耐過魚しか使えないというスパイラルに陥ってしまっている。これによってどのようなことが起こっているのか、ニジマス養殖における IHN を例に紹介する。

ニジマス養殖における IHN ウイルスの実態

IHN は、ラブドウイルス科ノビラブドウイルス属の伝染性造血器壊死症ウイルス（現在、国際ウイ

図 1．IHN 病魚
体色黒化、眼球突出が見られる。

ルス分類委員会 ICTV でのウイルス名は *Novirhabdovirus salmonid*）を病原体としている。ウイルス粒子は、長さ 160−180 nm、短径約 80 nm のエンベロープを有する弾丸型である。ゲノムは約 1 万 1 千塩基のマイナス鎖一本鎖 RNA で、6 種類のタンパク質をコードしている［1, 2］。サケ科魚類の養殖、特にニジマス養殖において、最も被害の多い病気の一つである。近年では細菌性冷水病との混合感染によって、その対応はより難しいものとなっている。ニジマスの主に稚魚から若魚が罹患し、1 g 程度の稚魚では累積死亡率が 100% に達することもあるが、成長に伴って死亡率は低下する。発生水温は 20℃ 以下で、15℃ 以下で死亡率が高い。罹患魚は、体色黒化、眼球突出、腹水貯留による腹部膨満などを呈し、筋肉内の出血が見られることもある（図 1）。鰓は貧血のため褪色する。腎臓などの造血組織の壊死、腸管粘膜固有層の壊死が顕著である。対策として、受精卵表面の汚染ウイルスの除去のため卵のポビドンヨード消毒が行われ、ウイルスフリーの状態で受精卵をふ化施設に収容し、井戸水や湧水を用いて隔離飼育を行うことで小さな成長段階の魚の感染・大量死を防ぐことが行われる。日本での承認ワクチンはなく、カナダで DNA ワクチンが実用化されている。原因の IHN ウイルスは、1970 年代にアラスカから輸入された受精卵により日本国内に持ち込まれたと考えられている［2］。その後、このウイルスは国内で独自の遺伝的変異を続け、2000 年以降には新たな遺伝子型が出現したとされ、遺伝的多様性は極めて高い［3］。100 g を超える大型の個体にも感染するなど強毒化が指摘されており［4］、これ以上の変異の拡大と強毒化を阻止することが被害拡大防止のために必要である。感染させて免疫を得た感染耐過魚はウイルスキャリアとなり、このことがウイルスの遺伝的な変異と強毒化を助長する原因ともなっていると推察されるが、そもそも IHN ウイルスが養殖生産の中でどのような動態を示すのか分かっていない。そこで IHN の疫学調査やそれを裏付けるための実験を行った。

ニジマス飼育施設における IHN ウイルスの動態調査

IHN ウイルスは、稚魚期の死亡発生時と産卵期の成熟親魚から分離できることが知られており［1, 2］、この 2 つの時期にウイルスの疫学調査を行った。

稚魚期の IHN 死亡事例：長野県水産試験場において、ウイルスフリーの隔離ふ化施設から外の池に移送した後に発生する IHN の事例を分析した。水産試験場の上流には 2 か所のニジマス養殖場があり、これらの養殖場の飼育排水の一部が流入するため、水産試験場の飼育用水には IHN ウイルスが混入している。2019 年の長野県水産試験場での稚魚期の IHN 死亡事例では、外池に稚魚を移動後、17% の累積死亡があった。死亡魚からウイルスを培養細胞で分離した後、ウイルスを遺伝子塩基配列で識別するため、IHN ウイルスの遺伝子の 2 か所の塩基配列を解読した。その結果、塩基配列の異なる多様なウイルスにより発生していることが判明した（図 2）。稚魚の死亡事例では単一のウイルスが個体間で感染を繰り返し、群全体に流行するものと考えていたが、感染源となっている上流の養殖場の飼育魚から排泄された多様なウイルスを反映しているためと考えられた。さらに、池出し稚魚での IHN 発生事例で分離されたウイルスが年によって異なることも明らかとなった。

産卵親魚群のウイルス検査：卵巣から卵が腹腔内に落ちると、体外に放卵されるまで、卵は体腔液に浸かった状態となっている。この体腔液を採取すると IHN ウイルスが分離される個体がいる。そこで、稚魚のウイルスと親魚のウイルスのつながりを調べるため、長野県水産試験場において、産卵親魚の体腔液から分離したウイルスの遺伝子塩基配列を分析したところ、同じ産卵親魚群であっても、初産、経産、経々産と年ごとに分離ウイルスの塩基配列が変化すること、また、死亡稚魚のウイルスとは遺伝的

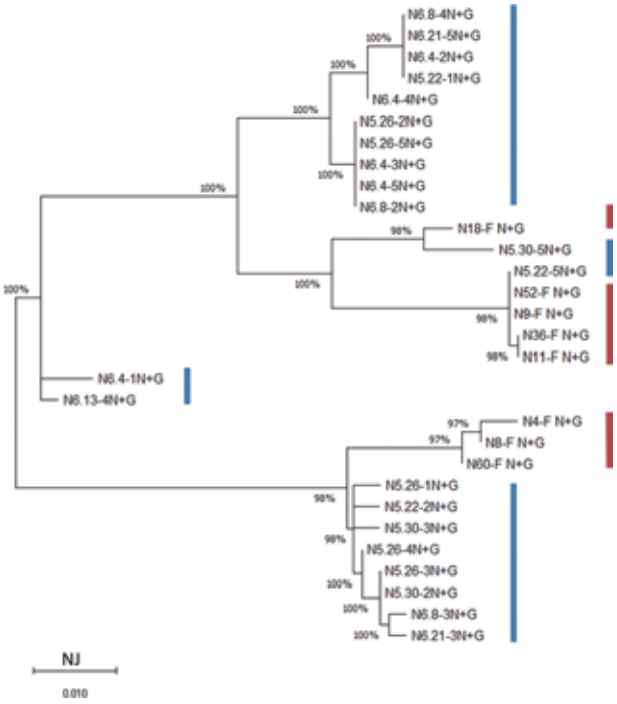


図 2. 2019 年に長野県水産試験場で池出し稚魚に発生した IHN 事例における分離ウイルスの遺伝子配列（N タンパク質と G タンパク質の一部ずつ合計 1,085 bp）解析結果
記号はウイルス分離株名。青の縦線を付したウイルスは死亡魚由来ウイルスを、赤の縦線を付したウイルスは同年 10 月産卵親魚（2017 年池出し）体腔液由来ウイルスを示す。

に異なることが明らかになった（図 2）。さらに、流行株と遺伝子塩基配列で区別できる 2009 年分離株を稚魚に実験感染させ、その稚魚を産卵親魚まで成育して体腔液からウイルスを分離してみると、稚魚に感染させたウイルスは分離されず、その年の親魚群から分離されたウイルスの遺伝子型と一致した。

また、成熟期に入る前の未成熟な状態から産卵までの個体を用いてウイルスの検査をしてみると（図 3）、卵巣重量の大きい排卵間際になってウイルスが分離されるようになることが分かった（2019 年：未成熟魚 0/12 尾陽性、排卵魚 7/12 尾陽性、2020 年：未成熟魚 1/18 尾陽性、排卵魚 4/12 尾陽性）。これらのことから、稚魚に感染したウイルスは、成長とともに一旦、魚体から排除され、免疫力が低下する成熟時に、環境中の死亡稚魚由来ウイルスと異なるウイルスに再感染しているものと推察された。初産、経産、経々産で分離ウイルスが変わることから、産卵から親魚が回復するとウイルスは排除され、翌年に成熟すると再度感染が起こると考えられた。卵に付着したウイルスはヨード剤による卵消毒で排除され、ふ化施設に受精卵を収容するときにはウイルスフリーになるため、ウイルス感染環はここで一旦断ち切ることができる。親魚に感染している時間は短く、また、通常親魚は最下流で飼育されるので、親魚におけるウイルスの変異が養殖サイクルに影響及ぼす可能性は低いと推察される。つまり、IHN ウイルスの変異・強毒化は、感染耐過した稚魚期からほとんどの魚が出荷される育成期（通常の出荷サイズは 100−150 g）までに起こることを示唆している。このことは、長野県水産試験場の感染源である用水上流の 2 つの養殖場では、非常に多数の育成魚が飼育されおり、この中から多様なウイルスが生じると考えると、大きな矛盾はないように思われる。

感染耐過稚魚における持続感染

次に感染耐過魚の持続感染について検討した。池出し稚魚の IHN 事例では、稚魚を殺す、つまり死亡魚に感染しているウイルスと、生残魚に感染している毒力の低いウイルスが存在していると想像される。そこで、強毒株と弱毒株を使って感染実験を行い、死亡終息後にウイルスが分離できるか、つまりウイルスが持続的な感染を起こすかどうか調べた。IHN の死亡が終息するとウイルスは通常の分離培養法では分離できなくなることが知られているため [1]、この実験では、ウイルスの検出を感度良く行うため、魚に免疫抑制剤（デキサメタゾンとシクロスポリン）を数回注射し免疫反応を抑え、持続的に感染しているウイルスを魚体内で増殖させてからウイルス分離操作を行うことにした。その結果、強毒株感染群では、高い死亡がみられた後、死亡が終息

図 3. 産卵直前のニジマス
オレンジ色の部分が卵巣。排卵すると、卵は体腔内に落ちる。

するとすぐにウイルスの分離ができなくなった。一方、死亡率 10% 程度の弱毒株感染群では、感染 44 日後までウイルスが分離された（表 1）。さらに、供試尾数を増やして行った試験でも同様に、死亡率の高い群ではウイルスは分離されず、死亡率の低い群では 4 ヶ月後までの長期にわたって分離されることが分かった（表 2）。つまり、死亡率が高かった群では、生残魚に強い免疫が誘導されてウイルスは排除されるが、死亡率が低かった群では、誘導される免疫が不十分でウイルスの持続的な感染がみられる状況、つまりウイルスキャリアになる個体が現れると推察された。

分離 IHN ウイルスの毒力

2 g 程度以下のニジマス稚魚に一定濃度のウイルスを感染させるとほとんど死亡してしまう。そのため、現在、稚魚をある程度大きくしてから隔離ふ化施設から外の池に移動する。そこで、5 g～10 g 程度の大型の稚魚を用いた感染実験での死亡率によってウイルスの毒力を評価することとした（この実験で死亡率が低いウイルス株でも、2 g 程度以下の小型稚魚では高い死亡をもたらす可能性があることに注意）。長野県水産試験場と静岡県水産・海洋技術研究所富士養鱒場における死亡稚魚と親魚体腔液から分離されたウイルス株を用いて感染実験を行い、その毒力を調べた。供試魚には、IHN の死亡による選抜育種を経験していない埼玉県水産試験場由来のニジマス系統（熊谷系）と静岡県富士養鱒場の継代ニジマス（静岡系）を用いた。静岡県富士養鱒場の死亡稚魚から分離したウイルスは静岡系ニジマスに概して高い毒力を示した（表 3）。熊谷系ニジマスで死亡率が低くても、静岡系に高い死亡をもたらす株がある一方で、逆のパターンもみられた。つまり、ニジマス系統が変わると毒力も変化した。一方、親魚体腔液由来のウイルスは、長野水産試験場で分離されたものも含め、概して毒力が低いことも分かった。

感染後	ウイルス分離（陽性個体数/供試個体数）			
日数	強毒株	弱毒株-1	弱毒株-2	弱毒株-3
30	0/5	1/5	2/5	5/5
37	0/5	1/5	0/5	2/5
44	0/5	0/5	0/5	5/5

表 1. 感染実験後の生残魚におけるウイルス分離結果 -1
供試魚：熊谷系ニジマス　平均魚体重 11.8 g
累積死亡率　強毒株：80%、弱毒株 -1：20%、弱毒株 -2：10%、弱毒株 -3：10%
免疫抑制剤投与後、培養細胞によるウイルス分離を実施

感染後	ウイルス分離（陽性個体数/供試個体数）	
	事例 1	事例 2
1.5ヶ月	0/6	0/4
2ヶ月	0/6	1/3
3ヶ月	0/6	0/3
4ヶ月	0/4	1/2
6ヶ月	0/4	0/2

表 2. 感染実験後の生残魚におけるウイルス分離結果 -2
累積死亡率　事例 1：長野系ニジマス（平均 2.8 g）1200 尾中 79%、事例 2：静岡系ニジマス（平均 5.9 g）600 尾中 0.5%
免疫抑制剤投与後、培養細胞によるウイルス分離を実施

養殖場における IHN ウイルスの動態と変異の推定シナリオ

養殖場では、感染耐過魚を給水路の上流に入れて

ウイルス株		累積死亡率(%)	
		熊谷系	静岡系
死亡稚魚由来	静岡1	0	60
	静岡2	0	85
	静岡3	0	55
	静岡4	0	30
	長野1	10	50
	長野2	5	30
	長野3	15	5
	長野4	10	25
体腔液由来	静岡1	0	5
	静岡2	15	0
	長野1	15	0
	長野2	5	15
	長野3	0	0
	長野4	45	0
強毒参照株		70	5
弱毒参照株		30	0

表 3. ２つのニジマス系統を用いた感染実験によるウイルス株の毒性比較

おくことで、ふ化施設からの池出し稚魚を感染させる場合が多い。その感染による IHN による死亡率は 1–3 割程度と聞き及んでいる。養殖場でのウイルス動態を推定すると、池出し時に強毒株に感染した稚魚の 1–3 割程度が死亡し飼育群から排除されるが、生残魚は強い免疫が誘導されるため、持続感染は起こしにくいと想像される。一方、池出し時に弱毒株に感染した稚魚の多くは生残し、持続感染を起こすと推定される。このようにして、養殖育成群では比較的毒力の低いウイルスに持続感染し、魚の成長とともにウイルスへの抵抗性が増す中で、魚体内でウイルスが何とか増殖・残存しようとする。結果、ウイルスは変異し、その中から当該ニジマス系統に強いウイルスが出現すると考えられる（稚魚群を感染させるために上流部に入れておく感染源の感染耐過魚も同様な状況）（図 4）。これが、日本に侵入して以来、IHN ウイルスの毒力が宿主の抵抗性を上回って変異・強毒化し、常に被害の第 1 位となってきた原理と推測される。

これ以上のウイルスの強毒化を阻止するためには、基本的に感染耐過稚魚の作出・利用は止め、そのニジマス系統の稚魚―親魚の生産サイクルの中にウイルスを入れないことが重要と考えられる。現在行われる人為的なウイルス感染と生残魚を用いた養殖生産のスタイルを変えていく必要がある。その際、ウイルス汚染のある河川水を飼育用水に利用する養殖場では、ワクチンの導入が不可欠である。

日本の内水面養殖におけるワクチンの課題

冒頭に記したように、現在、日本では不活化ワクチンしか承認されておらず、それらはほぼ注射投与となっている。世界で見ると、ウイルス病のワクチンは、不活化ワクチンに加え、伝染性膵臓壊死症（infectious pancreatic necrosis : IPN）や伝染性サケ貧血に対してサブユニットワクチンが、IHN とサケアルファーウイルス感染症に対して DNA ワクチンが、KHV 病とソウギョの出血性レオウイルス病に対して生ワクチンが市販されている［5］。

養殖の生産コストは餌代が半分程度となっており、養殖業者に聞き取りを行った感触では、薬剤代は魚価の 1 割程度に抑える必要があるという。日本において、生産額が小さく、1 尾当たりの魚価が安い内水面養殖では、注射型の不活化ワクチンに見合った市場はない。DNA ワクチンとサブユニットワクチンも注射で投与する。注射の労力を考えると、内水面養殖では魚をワクチン液に漬ける浸漬投与あるいは餌に混合する経口投与である必要がある。不活化ワクチンの浸漬投与や経口投与の研究はいろいろと行われているが、細胞性免疫が誘導されないこともあって、ウイルス病に対して十分な効果は得られないのが現状である。効果的な免疫を誘導するためには、浸漬ルートで感染する生ワクチンが最も有望である。しかし、養殖場からの飼育排水が流入する河川・湖沼などの環境中には、養殖対象種と同種や近縁種が生息することから、弱毒といえども感染性の

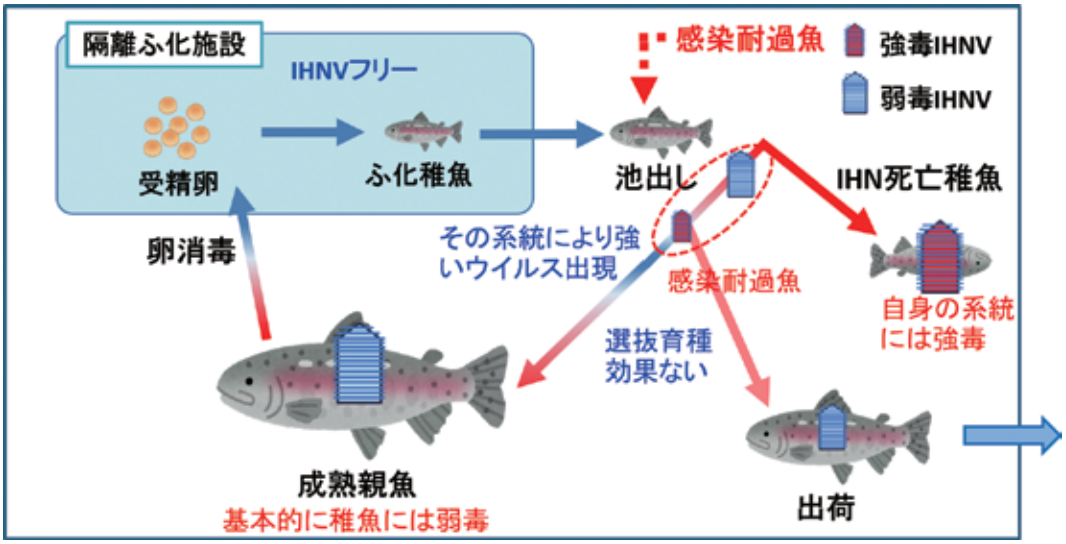


図 4. 研究結果から推定される養殖生産施設における IHN ウイルス動態と変異（模式図）
感染耐過魚を感染源として感染した稚魚を養殖種苗として、一部の育成魚では持続感染を起こし、魚体内でウイルス変異が起きて、強毒化を含むウイルスの遺伝的な多様性を生んでいると推定される。赤のウイルスは強毒を、水色は弱毒ウイルスを、また、大きさは量を示す。

ある生ワクチンは環境生物へのリスクが懸念される。このため、農林水産省は生ワクチンをまだ許認可の対象としていない。一方、内水面養殖では、感染耐過魚を利用している現状もある。感染耐過魚の利用として、上述のニジマスの IHN に加え、KHV 病（霞ヶ浦の食用ゴイ）、ニシキゴイの浮腫症／眠り病、アユの異形細胞性鰓病やキンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症などが挙げられる。これを考えれば、リスクが許容範囲であれば、生ワクチンの実用化は可能と思われる。

そこで、すでに日本の生産地にまん延し、例年発生する疾病を対象とし、生ワクチン自体が環境中に定着しないことを、日本の生ワクチン使用の条件とすることを考えた。この点を考慮し、水産第 1 号のブレークスルーとなる生ワクチンとしてキンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症を選定し、開発を進めてきた。次に、その生ワクチンについて紹介する。

キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症

ヘルペスウイルス性造血器壊死症は、アロヘルペスウイルス科サイウイルス属の *Cyvirus cyprinidallo 2*（旧名称は cyprinid herpesvirus 2［CyHV−2］）を病原体としている。ウイルス粒子は、直径約 110 nm の正二十面体のヌクレオカプシドをエンベロープで包んだ直径約 200 nm の球形である。ゲノムは約 29 万塩基対の二本鎖 DNA で、150 以上のタンパク質をコードしている。キンギョ、ギベリオブナおよびヨーロッパブナで発病が認められており、ほぼ世界中のキンギョ養殖生産地にまん延していると推測されている［6］。どの大きさのキンギョでも罹患し、累積死亡率が 100% に達することもある。好発水温は 15℃ から 25℃ で、12℃ 以下あるいは 33℃ 以上ではウイルスは増殖できない［7, 8, 9］。罹患魚の特徴的な病徴はないが、不活発に遊泳し、時に激しく呼吸し、鰭などの上皮の増生による白斑形成や腹水貯留による腹部膨満がみられる。鰓は貧血のため褪色する（図 5）。腎臓などの造血組織や脾臓、膵腺房細胞の壊死が顕著である［7］。対策として、発病群を 33℃ 以上に 4 日間程度で飼育する昇温治療が可能であるが、ボイラーによる昇温施設が必要であり、あまり普及していない［10］。また、感染による選抜育種に効果が認められ、抗病性が高い系統も作られているが［11］、多数あるキンギョ品種ごとに作出しなければならない。日本のキンギョや中国のギベリオブナに対する不活化ワクチン、DNA ワクチンやサブユニットワクチンが論文で報告されているが、ほぼすべて注射投与によるものである［13］。

図 5. ヘルペスウイルス性造血器壊死症病魚
鰓の褪色、腹水貯留による腹部膨満が見られる。

弱毒生ワクチンの開発

イスラエルで市販される KHV の生ワクチンの開発例に倣って［14］、培養細胞を用いた連続継代による CyHV−2 Sat−1 株の弱毒化を目指し、キンギョ鰭由来の RyuF−2 細胞での連続継代を行ったが、致死性は消失しなかった。そのため、本来宿主ではないギンブナ由来の CFS 細胞を用いて継代を行った。すると致死性は消失したが、体表に出血がみられることがあったことから、さらなる弱毒化が必要であった。しかし CFS 細胞での継代を続けると免疫原性が低下したことから、CFS 細胞での継代が 7 回のウイルスについて、さらにコイ由来の KF−1 細胞で継代を行った。ウイルス攻撃によるワクチン効果試験での生残率と継代数のより多いものとして、最終的に KF−1 細胞で 8 回継代したウイルスをワクチン候補（P7−P8 株）として選定した。P7−P8 株のワクチン効果試験では投与魚に異常はなく、ウイルス攻撃による生残率が 90% 以上と高い防御効果を示した。農林水産省による動物用医薬品における生ワクチン承認申請のためのガイドライン に準じて病原性復帰否定試験をキンギョで実施したところ、合計 6 回の魚体通過によっても魚の死亡や異常はなく、病原性復帰の兆候はみられなかった［15］。

以上のワクチン開発では、飼育水 1L に P7−P8 ワ

クチン培養液（原液）を 1/1,000 量（1 mL）添加して、魚 20 尾を 1 時間から 2 時間程度浸漬させるものであった。つまり、1 尾当たりのワクチン原液量は 0.05 mL となり、養殖場レベルで 1 万尾を処理する場合には、ワクチン原液が 500 mL も必要になってしまうことに加え、500 L ものワクチン処理廃液が出ることになる。前述の通り、生産魚価の 1 割程度のワクチン処理コストとすると、琉金、東錦や黒出目金といった主流のキンギョ品種が 100 円～150 円であることから、ワクチンの価格は 10 円程度以下を目指さなければならない。そのため、コストダウンが必要であった。単純に原液の添加量を少なくすると、ワクチン効果は急激に低下することが分かり、その原因は感染効率が低下するためと考えられた。そのため、ワクチン原液の希釈率を 1/100 としてワクチンウイルス濃度を高め、さらに試験を進めたところ、1/100 にしたワクチン液 1 mL を網ですくったキンギョに振りかけ、10 秒間維持するだけで、十分に高い防御効果が得られることが判明した。保持時間や投与液量の再現性を考え、20 尾あたり 1/100 ワクチン液を 3 mL 振りかけ、1 分間維持する操作を標準的な投与法とした。この方法では、1 万尾を処理するためのワクチン原液は 15 mL（0.0015 mL/尾）ですむので大きくコストダウンができ、廃液量（1.5 L）も少なく、ごく短時間で実施可能となった［16］。現在、生ワクチン実用化に向け、研究を継続している。

弱毒ワクチンの特性

CyHV−2 の強毒株では、感染 7 日後頃から死亡が始まり、瀕死魚では腎臓中のウイルス DNA 量は 10^8 copies/mg レベル以上に達する。一方、P7−P8 ワクチンは投与魚体内で増殖し、投与 5−7 日後に腎臓でウイルス DNA 量 が 10^6 copies/mg レベルでピークを迎え、その後減少して、投与 21 日後には不検出となった。また、投与魚を経時的に取り上げ、未接種魚を 4 日間同居飼育し、未接種魚への伝播について検討したところ、接種 17 日以降の投与魚からは伝播がみられなかった。これらの結果から、ワクチン投与魚の隔離飼育期間は 3 週間が適当と考えられた。ワクチンのキンギョ由来 RyuF−2 細胞での増殖は 15℃～30℃ でみられ、25℃ が最も高かった。これらの温度におけるワクチンの効果試験では、15℃、20℃、25℃ および 30℃ において相対生残率（RPS）が 70% 以上と高い防御効果が得られたが、15℃ では若干効果が低かった［17］。日本では、30℃ 以上となる盛夏と 15℃ 以下となる冬季以外の時期に使用可能と考えられる。ワクチンの持続期間を調査したところ、投与 1 年後以上の魚でも高い防御効果が得られた。キンギョの生産は、稚魚期に色柄や体形で選別が行われるため、このような選別で魚を集めるときにワクチン処理するのが良いと思われる。

弱毒化の原理を解明するため、一連の弱毒過程のウイルス株のゲノム塩基配列の解読を行ったところ、非同義置換となる大きな欠損や倒置、一塩基多型などの変異が認められた。これらの中には、アポトーシスを阻害するウイルスタンパク質遺伝子において確認された変異もあった。ワクチン投与 3−5 日後に造血組織におけるアポトーシス細胞が増加することが観察されたことから、この投与初期にワクチン感染細胞がアポトーシスを起こすことにより、魚体内のウイルス量があまり増えず、投与 7 日後をピークに減少に転じるものと推察される。P7−P8 株の弱毒化には、感染細胞のアポトーシスが関連している可能性が高いと考えられる。

ワクチン以外のウイルス病の積極的な制御法

ウイルス病の制御には、普段の衛生管理が重要であることはもちろんであるが、それ以外の積極的な制御法について簡単に紹介しておきたい。

まずは、飼育水温をウイルスが増殖できない温度あるいは発病しない温度まで上昇させる昇温治療が挙げられる。ウイルス病では、KHV 病（霞ヶ浦の食用ゴイ）、ニシキゴイの浮腫症／眠り病、アユの異形細胞性鰓病やキンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症などで行われる場合がある。診断で感染を確認後、数日間昇温すると死亡が止まり、その後、元の水温に戻すと生残魚は免疫を得る。キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症において、昇温治療による感染魚の死亡率低下と免疫獲得の効果が報告されている［10］。ただし、昇温で生残した感染耐過魚はウイルスキャリアとなり、新たな感染源となりえることも判明している［18, 19］。昇温前に感

染していない魚は昇温しても免疫を得ることはないため、昇温後、未感染魚が多く残っていると、昇温処理群で再発がみられる。昇温前にいかに飼育群全体の感染率を高め、かつ、昇温で死亡が止まるような感染度合に抑えるかが重要となる。つまり、感染後の経過時間が重要であり、一度にウイルスに感染させる実験では 48 時間程度で昇温すると全体の死亡数が少ないことが判明した。しかし、実際の養殖飼育群では、感染の広がりは事例によって様々であり、決まったプロトコルによる処理は難しく、死亡の推移や感染魚の割合などを見ながら行わなければならない。

もう一つは、耐病性育種が挙げられる。これは持続的な養殖産業の発展には欠かせないものであるが、水産分野では積極的に育種は行われてこなかった。卵から親を作り、さらに卵を取るという完全養殖ができている魚種が多くなかったことが大きな原因である。近年、魚介類のゲノム解読が進み、ゲノム情報に基づいた育種ができるようになってきている。例えば、サケ科魚の IPN 耐性やヒラメのリンホシスチス症耐性が育種成果として挙げられる［20, 21］。キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症でも選抜育種が行われている。埼玉県水産研究所では、ウイルス攻撃による生残魚を用い、数世代の交配により耐病性東錦系統が確立された［11］。この耐病性

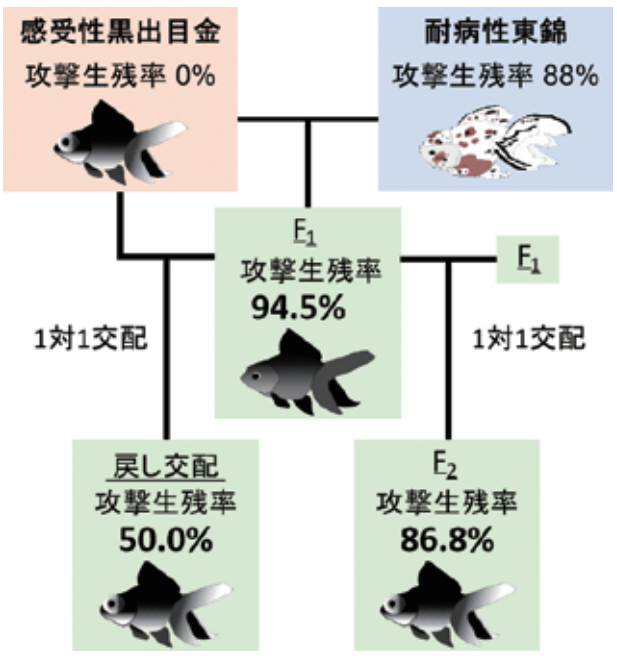


図 6. 耐病性東錦を用いた黒出目金の耐病系統の作出
ウイルス攻撃による感染実験により耐病性を評価した。耐病形質は、メンデルの優性遺伝パターンを示した。

系統は、感受性魚を全数死亡させる 10,000 倍のウイルス量を腹腔内接種しても 30% の死亡しかなかった。さらに、非常にウイルスに弱く、選抜育種ができなかった黒出目金について、耐病性東錦の親との交配を行うことにより、耐病性の黒出目金の作出に成功した［12］。一連の交配群におけるウイルス攻撃による死亡率の結果から、耐病形質は、メンデルの優性遺伝パターンを示すことが判明し、1 遺伝子座で決まっている可能性が示唆された［12］（図 6）。また、この東錦と黒出目金の家系内において、耐病形質とリンクする SNP マーカーを開発し、このマーカーを用いることでウイルス攻撃をすることなしに耐病形質が判定可能となった。ウイルス攻撃による形質評価では、生残魚はウイルスキャリアになるため親魚が感染源となってしまうが、SNP マーカーを用いればその心配はない。今後、耐病性の責任遺伝子が判明すれば、全ての家系・品種で耐病形質の作出が可能になる。耐病性系統魚の特性を感染試験で調べると、感染 5−7 日後にウイルス DNA 量のピークを迎え、その後減少した。これは、感受性魚に生ワクチン P7−P8 を投与した時のウイルス量の変動と同様な傾向である。アポトーシスについて調べると、腎臓において、陽性シグナルは耐病性魚で観察されるが、感受性魚ではほとんど観察されなかった。耐病性東錦系統の耐病性形質にアポトーシスが関連していると考えられ、生ワクチンの弱毒化と同様の原理である可能性がある。CyHV−2 の病原性発揮には、アポトーシスという宿主反応からの逃避機構が重要であると思われ、KHV などの他の魚類ヘルペスウイルスでも同様な機構があるか大変興味がもたれる。

おわりに

魚価の安い内水面養殖魚では、ウイルス病に対して有効な対策がないため、人為的な感染耐過により免疫獲得した感染耐過魚を養殖種苗として利用されているが、環境中でのウイルスの常在化、ウイルス変異の助長・強毒化の原因ともなっている。ウイルスキャリアである感染耐過魚の利用は、抜け出せないスパイラルとなっており、業界をあげて断ち切る必要があると考える。そのためには、有効な対策も提示する必要があり、簡便に投与できる安価なワク

チンとして、弱毒生ワクチンの利用も一つの手段となる。現在、水産用生ワクチンは認可の対象となっていないが、認可の対象とするためには、懸念される環境への安全性を評価するガイドラインが必要であろう。キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症の弱毒生ワクチンを突破口に、水産用生ワクチンの実用化に目途をつけたいと考えている。

謝辞

IHN の研究は、農林水産省戦略的プロジェクト研究推進事業「国内主要養殖魚の重要疾病のリスク管理技術の開発」（JPJ00867.19190702）および科学研究費補助金による東京海洋大学、長野県水産試験場、静岡県水産・海洋技術研究所 富士養鱒場との共同研究として実施された。また、キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症の研究は、科学研究費補助金および JST・A−STEP（育成型）（JPMJTR20U5）による東京海洋大学、埼玉県水産研究所、愛知県水産試験場との共同研究として実施された。

引用文献

1. Bootland, L. M. and Leong, J. C. 2011. Infectious hematopoietic necrosis virus. pp. 66−109. In : Fish Diseases and Disorders.（Woo, P. T. K. and Bruno, D. W. eds.）, CAB International, Wallingford, UK.
2. 西澤 豊彦，吉水 守．2017．伝染性造血器壊死症．魚病研究．**52** : 1−5.
3. Namba, A., Minakami, K., Takee, T., Shiibashi, K., Sugino, M., Yasuda, S., Takeuchi, H., Ishikawa, T., Matsubara, T., Arai, H., Nakanishi, T. and Mano, N. 2021. Temporal change in genetical lineages of infectious hematopoietic necrosis virus（IHNV）in the North Kanto region of Japan from 1981 to 2015. *Fish Pathol.* **56** : 35−42.
4. Mochizuki, M., Kim, H. J., Kasai, H., Nishizawa, T. and Yoshimizu, M. 2009. Virulence change of infectious hematopoietic necrosis virus against rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral molecular evolution. *Fish Pathol.* **44** : 159−165.
5. Du, Y., Hu, X., Miao, L. and Chen, J. 2022. Current status and development prospects of aquatic vaccines. *Front. Immunol.* **13** : 1040336.
6. Thangaraj, R. S., Nithianantham, S. R., Dharmaratnam, A., Kumar, R., Pradhan, P. K., Gopakumar, S. T., and Sood, N. 2021. Cyprinid herpesvirus−2（CyHV−2）: A comprehensive review. *Rev. Aquacult.* **13** : 796−821.
7. Jung, S. J. and Miyazaki, T. 1995. Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus*（L.）. *J. Fish Dis.* **18** : 211−220.
8. Ito, T. and Maeno, Y. 2014. Effects of experimentally induced infections of goldfish *Carassius auratus* with cyprinid herpesvirus 2（CyHV−2）at various water temperatures. *Dis. Aquat. Organ.* **110** : 193−200.
9. Shibata, T., Nanjo, A., Saito, M., Yoshii, K., Ito, T., Nakanishi, T., Sakamoto, T. and Sano, M. 2015. *In vitro* characteristics of cyprinid herpesvirus 2 : effect of kidney extract supplementation on growth. *Dis. Aquat. Organ.* **115** : 223−232.
10. 田中深貴男．2005．キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症の昇温治療について．埼玉県農林総合研究センター研究報告書．**5** : 37−43.
11. 田中深貴男．2005．ヘルペスウイルス性造血器壊死症を生残したキンギョ産出仔の耐病性について．埼玉県農林総合研究センター研究報告書．**5** : 88−90.
12. 田中深貴男，大力圭太郎，中島真結理，加藤豪司，坂本崇，佐野元彦．2018．キンギョにおけるヘルペスウイルス性造血器壊死症に対する耐病性の遺伝．魚病研究．**53** : 117−123.
13. Su, H. and Su, J. 2018. Cyprinid viral diseases and vaccine development. *Fish Shellfish Immunol.* **83** : 84−95.
14. Ronen, A., Perelberg, A., Abramowitz, J., Hutoran, M., Tinman, S., Bejerano, I., Steinitz, M. and Kotler, M. 2003. Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine* **21**: 4677−4684.
15. Saito, H., Okamura, T., Shibata, T., Kato, G. and Sano, M. 2022. Development of a live attenuated vaccine candidate against herpesviral hematopoietic necrosis of goldfish. *Aquaculture.* **552** : 737974.
16. Saito, H., Minami, S., Yuguchi, M., Shitara, A., Kondo, H., Kato, G. and Sano, M. 2024. Efficient showering vaccination with a live attenuated vaccine against herpesviral hematopoietic necrosis in goldfish. *Aquaculture.* **578** : 740140.
17. Saito, H., Minami, S., Yuguchi, M., Shitara, A., Kondo, H., Kato, G. and Sano, M. 2024. Effect of temperature on the protective efficacy of a live attenuated vaccine against herpesviral haematopoietic necrosis in goldfish. *J. Fish Dis.* **47** : e13906.
18. Wei, C., Iida, H., Chuah, Q., Tanaka, M., Kato, G. and Sano, M. 2019. Persistence of cyprinid herpesvirus 2 in asymptomatic goldfish *Carassius auratus*（L.）that survived an experimental infection. *J. Fish Dis.* **42** : 913−921.
19. Wei, C., Kakazu, T., Chuah, Q. Y., Tanaka, M., Kato, G. and Sano, M. 2020. Reactivation of cyprinid herpesvirus 2（CyHV−2）in asymptomatic surviving goldfish *Carassius auratus*（L.）under immunosuppression. *Fish Shellfish Immunol.* **103** : 302−309.
20. Ozaki, A., Sakamoto, T., Khoo, S. K., Nakamura, K., Coimbra, M. R. M., Kitada, S. and Okamoto N. 2000. Quantitative trait loci（QTLs）associated with resistance/susceptibility of infectious pancreatic necrosis（IPN）in rainbow trout（*Oncorhynchus mykiss*）. *Mol. Genet. Genomics.* **265** : 23−31.

おしらせ

第 65 回獣医疫学会学術集会で優秀発表賞を受賞

2025 年 3 月 9 日に開催された第 65 回獣医疫学会学術集会において、日生研の米澤世利子が演題「2020～2023 年における国内の豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの遺伝的多様性」の発表で優秀発表賞を受賞したので御報告申し上げます。

受賞対象

2020～2023 年における国内の豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの遺伝的多様性

○米澤世利子[1,3]、平修[2]、加藤篤[2]、髙井亮輔[2]、松山亮太[3]、蒔田浩平[3]

[1]日生研株式会社、[2]一般財団法人 日本生物科学研究所、[3]酪農学園大学

講演概要

PRRS ウイルス（PRRSV）は欧州型（PRRSV1）と北米型（PRRSV2）の 2 種に分類されます。PRRSV のオープンリーディングフレーム（ORF）5 遺伝子は遺伝的変異が多い領域であるため疫学的解析によく用いられ、この遺伝子解析によって日本国内に浸潤する PRRSV2 は 5 つのクラスター（Ⅰ～Ⅴ）に分類されています。2020～2023 年に検出された日本国内の PRRSV2 の解析により、地域ごとにクラスター分布に偏りが認められました。各地域の主要なクラスターは、北海道でクラスターⅡ、東北及び四国でクラスターⅠ、関東、東海及び九州ではクラスターⅢでした。また、本研究のクラスターⅢは 1992-1993 年に検出されたクラスターⅢよりも参照株（EDRD-1）との塩基配列相同性が低下していることが明らかとなり、時間経過とともに遺伝的変化があることが示唆されました。続いて、関東地域の農場から得られた配列について生ワクチンの使用歴の情報を収集し、生ワクチンの使用歴の有無でクラスター分布を比較したところ、使用歴のある農場ではクラスターⅠ～Ⅳが検出され、使用歴がない農場ではクラスターⅢまたはⅣが検出される傾向が見られました。この結果により、生ワクチンの使用歴が流行株のクラスター分布に影響を与えている可能性が示唆されました。

本講演の講演要旨は、当該学術集会の講演要旨集を御参照ください。

NIBS

―― テーマは「生命の連鎖」 ――

生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士による揮毫です。

日生研たより　昭和 30 年 9 月 1 日創刊（年 4 回発行）
（通巻 636 号）　令和 7 年 6 月 25 日印刷　令和 7 年 7 月 1 日発行（第 71 巻第 3 号）
発行所　一般財団法人日本生物科学研究所
〒 198-0024　東京都青梅市新町九丁目 2221 番地の 1
TEL：0428(33)1520（経営企画部）　FAX：0428(31)6166
URL：https://nibs.or.jp
発行人　土屋耕太郎
編集室　委　員／伊藤宗磨（委員長）、髙井亮輔、湯本道葉
事　務／経営企画部
印刷所　株式会社 精興社
（無断転載を禁ず）