

TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

ウイルス性コイ浮腫症の病理学

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-03-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 瀬野, 龍一郎 メールアドレス: 所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/716

ウイルス性コイ浮腫症の病理学

平成 15 年度

(2003)



東京水産大学大学院

水産学研究科

資源育成学専攻

水族病理学

瀬野 龍一郎

目次

要旨	1
序論	3
第1章 ウイルス性コイ浮腫症発病魚の死因および塩水浴治療メカニズムの解明	6
第1節 0.5%塩水浴開始直後の浮腫症病魚の血液性状の変化	8
第2節 異なる塩分を用いた塩水浴による CEV 感染魚の死亡率の比較	15
第3節 早期 0.5%塩水浴による CEV 感染魚の死亡率	18
第2章 ウイルス性コイ浮腫症とニシキゴイの眠り病との関連性	22
第1節 冬季に発生したニシキゴイの疾病	24
第2節 種々温度における CEV の感染実験と眠り病症状の再現	27
第3節 浮腫症病魚と眠り病病魚の組織学的比較	31
第4節 CEV 感染耐過魚の CEV ゲノム長期保有の可能性	36
総合考察	41
実験の部	
(1) 本研究で行った実験方法	45
(2) 本研究で用いた試薬、実験器具及び実験機器	48
謝辞	51
引用文献	52
参考文献	55

要旨

「ウイルス性コイ浮腫症の病理学」

ウイルス性コイ浮腫症は、1974 年に新潟県及び広島県で初めて報告されて以来、毎年梅雨時期に発生を繰り返している。本症はポックスウイルス科に属する CEV (carp edema virus) がコイの鰓及び体表上皮細胞に感染することにより発生する疾病である(親松,1996)。本症は発生当時から 0.5%塩水浴が顕著な治療効果を示している。魚類感染症において細菌性疾患や寄生虫症においては古くから塩水浴の治療効果が知られているが、ウイルス性疾患においてはほとんど例を見ない。なぜ本症において塩水浴が顕著な治療効果を示すのかに着目し、その効果を血液学的に調査し、本症における塩水浴治療のメカニズム及び死因を解明することを第一の目的とした。

一方、ニシキゴイの眠り病は水温の低い冬季に発生する疾病であり、浮腫症と同じ頃から発生しニシキゴイ養殖において問題となっている。浮腫症と眠り病は発病サイズ、発病時期(水温)が異なり、眠り病は病原体が特定されていないためこれまで異なる疾病と考えられてきた。しかし近年になって、眠り病魚の鰓より高率に CEV ゲノムが検出されたことから、眠り病が CEV によって引き起こされている可能性が考えられた。また、CEV の感染環は現在のところ不明であるが、冬季にも CEV の存在が明らかとなり通年コイが保有している可能性も考えられた。そこで、浮腫症と眠り病との関係を解明することを第二の目的とした。

1) 浮腫症病魚における 0.5%塩水浴治療のメカニズムおよび死因の推定

CEV 感染魚に 0.5%塩水浴を行うと、血漿浸透圧および Ht 値は 1.5 時間後に、酸素不足を示す血漿乳酸値は 6 時間後には正常レベルまで回復し、本症発病魚に対して 0.5%塩水浴を行うと 6 時間後には全ての生理的変化が正常レベルまで回復し、塩水浴は本症に対して即効性があることが明らかとなった。また、他の実験において病魚の MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration)が低下していたことから、Ht 値の上昇は赤血球の膨張によるものであり、病魚の浸透圧および Ht 値が同時に回復したことは、塩水浴により浸透圧の回復と同時に、膨張した赤血球が正常に戻ったためと推察した。これらのことから本症の死因として、ウイルス感染により鰓及び体表上皮細胞が脱落し、浸透圧が低下した後に赤血球が膨張し (Ht 値の上昇)、末梢への血液循環不全に陥り、酸素不足(乳酸値の上昇)に陥り死亡すると推定した。そして死亡する前に塩水浴を行うと、浸透圧がまず回復し、同時に膨張した赤血球が正常に戻り血流が回復し、酸素不足が解消(乳酸値の低下)

されるというメカニズムが考えられた。

2) 浮腫症と眠り病との関連性

2002 年 2 月に発生した眠り病の症状を示すニシキゴイを調査したところ、全ての個体の鰓より CEV ゲノムを検出した。CEV は低温でもコイを死亡させるほどの起病力を持っていることが予想されたため、感染時の温度を変え CEV をコイに暴露した。その結果、11℃～20℃ではほぼ全てのコイが死亡し、20℃で感染させ 8℃で飼育していた魚群でも約 50%の個体が死亡した。また 14℃～20℃で飼育した個体では、感染魚は鼻上げをし浮腫症の症状を示したが、11℃以下で飼育した個体は全て底で横たわり遊泳不活発になる眠り病の症状を示した。これら症状を示した個体の組織学的比較を行った結果、どちらにも鰓においては二次鰓弁の浮腫、上皮細胞の増生等が観察されたが浮腫症の方が損傷度合いが重度であり、脳においては脳浮腫が観察されたが眠り病の方が重度であった。これらのことから、CEV は低温でもコイを死亡させることが明らかとなり、浮腫症と眠り病は同一の病原体によって引き起こされ、感染（飼育）温度の違いにより症状が異なることが明らかとなった。

3) CEV 感染耐過魚の長期ウイルスゲノム保有の可能性

CEV による自然感染魚を 0.5%塩水浴により治療し、経時的に魚体内のウイルスゲノムを調査した結果、発生から 1 年 7 ヶ月経過した個体でもウイルスゲノムを保有し続け、感染耐過魚は長期にわたってウイルスゲノムを保有し続けることが明らかとなった。また、鰓では検出されないが他の臓器でウイルスゲノムが検出されたことから、耐過魚の診断には全臓器を検査する必要がある。一方、2 年魚の産卵期の雌の卵巣から高頻度にウイルスゲノムが検出されたことから、本症の感染源として、感染耐過魚からのウイルス伝播が起こる可能性が考えられた。

本研究では、本症における死因及び塩水浴治療のメカニズムの解明を目的とし、血液学的調査からそれらを推定した。また、本症とニシキゴイの眠り病との関連性について研究を行い、両疾病が同一のウイルスにより引き起こされることを明らかにし、CEV 耐過魚は長期間ウイルスゲノムを保有し、コイ同士で感染源が成立している可能性が考えられた。

序論

ウイルス性コイ浮腫症は、1974 年に新潟県及び広島県で初めて報告されて以来(細谷・鈴木, 1975 ; 村上ら, 1976)、毎年梅雨期及び梅雨明け期に発症を繰り返している。本疾病は突発的に大部分のニシキゴイ稚魚に発症し、高い致死性を有するためニシキゴイ養殖において重大な問題となっている。本疾病は鰓薄板上皮に感染するボックスウイルスが原因であり、その原因ウイルスは CEV (carp edema virus) と提唱されている (Oyamatsu et al., 1997)。本ウイルスに感染したコイは、遊泳が不活発になり、水面に浮上し池の壁や隅に集まる傾向があり、外観症状としては体のむくみ、鰓弁の癒着、棍棒状化等が挙げられる (村上ら, 1976)。病理組織学的には鰓薄板上皮の増生、体表の海綿状化、腭外分泌細胞の細胞内空胞形成等の病変が観察され、実験感染魚では更に腎臓及び脾臓における赤血球の貪食、後部消化管管腔内にエオシン好染性の変性細胞の存在も見られるが、鰓薄板の癒着及び鰓弁の棍棒状化は軽微であることが報告されている (親松, 1996)。このような症状を示す疾病は、埼玉、富山、愛知、岐阜、兵庫、岡山、鳥取、島根、山口、高知、大分 (村上・根本, 1982)、茨城 (佐野・福田, 1992) 等の広範囲にわたって報告されていた。現在においても新潟及び広島、静岡および兵庫において、疾病の発生もしくはウイルスゲノムが検出されている。また木村 (1998) は本ウイルスの感染環解明を目的として、コイ養殖池に生息する生物から PCR 法により CEV ゲノムの検出を試み、昆虫であるフサカ幼生、線虫等より本ウイルスゲノムを検出し、コイ以外の生物が本症感染環の一端を担っている可能性を示唆している。

本症の治療法として、クロラムフェニコール、トリクロルホン、ニフルプラジン、ホルマリン等の薬剤に治療効果は認められないが、唯一 0.5% 塩水浴が顕著な治療効果を示すことが知られており (村上ら, 1976, 1977 ; 細谷・鈴木, 1975 ; 須貝・小池, 1980)、実験感染においても塩水浴の有効性が証明されている (畑, 1996)。0.5% 塩水中でウイルスは若干の感染価低下はあるものの、3% 塩水においても完全には失活させることができないため、本症発病魚に対する塩水浴の効果は、ウイルスの感染拡大を防ぐのではなく、病魚の生理的变化を正常に戻す働きによってもたらされると考えられている (Seno et al., 2003)。しかし本疾病の発病サイズは、主に 0.1~3g 程度が主体で (須貝, 1985)、病魚が小型であるため死因及び塩水浴による回復メカニズムの解明に重要な手段である血液学的研究がほとんど行われていない。瀬野 (1999) は修士研究の中で、浮腫症の病態生理について血液

学的側面から各種の実験を行い、病魚体内における酸素不足、浸透圧低下を示唆し、病魚に塩水浴を施すと血液性状が翌日には全て回復するという結果も得た。

人間においても浮腫を引き起こす疾病に、リンパ浮腫がある。リンパ浮腫とは、乳癌や子宮癌の術後などに見られることが多く、リンパ節を除去することによりリンパ液の流れが悪くなり腕や脚がむくむ症状である。原因としては、通常血液は動脈から毛細血管に流れ、そこで水分と蛋白成分は毛細血管の外に流れだし、組織中の細胞に取り込まれ使用された水分はそのまま静脈に戻るが、蛋白成分は静脈に戻らずリンパ管に入っていく。しかし、リンパ管の切除や詰まりにより蛋白は血管外の組織間隙に留まり、その部分の蛋白濃度が上昇する。毛細血管中の蛋白量より上昇すると膠質浸透圧が上昇し、水分が組織間隙に流入し、浮腫を引き起こす。治療法としては、リンパ浮腫に効く薬はほとんどなく、唯一メリロートエキス（商品名エスリベン）は組織間隙中蛋白分解を促し、リンパ循環に有効であることが確かめられているが、即効性はなく長期服用が必要である。また、リンパ浮腫は下肢または腕にだけ蛋白と水分が貯留しているため全身の水分が多いわけではないので、利尿剤を用いた治療は行われていない。このように、人間においては組織間隙中の蛋白の貯留、それに伴う水分の増加により浮腫が生じ、その蛋白を分解もしくはリンパ液の循環を回復させることで治癒する。ウイルス性コイ浮腫症の場合、自然感染においては浮腫の症状を示すが、実験感染において浮腫を確認することはほとんどなく、浮腫という症状だけで病態を説明することができず、また酸素不足を示す鼻上げの症状も見られ、塩分の補充によって治療可能であることから人間の浮腫との違いが見られる。本症においては、病魚の酸素欠乏、浸透圧低下等がみられるが、これら生理的変化がどのように関与して浮腫症病魚が死亡するのか、また 0.5%塩水浴によりなぜ回復していくのか解明するに至っておらず、死因及び塩水浴治療のメカニズムに関して更に明らかにする必要がある

一方近年になって、冬季に発生するニシキゴイの眠り病病魚より CEV ゲノムが検出された（的山 私信：網田ら, 2002）。ニシキゴイの眠り病とは、1975 年頃からみられるようになり、水温の低い 10 月以降ニシキゴイの当歳魚、希に二歳魚にも発生し、症状としては横臥、眼球の陥没、体表粘膜の剥離等が観察され、数日から 2~3 週間横臥が続き、横臥魚の 50%以上が死亡する。病理組織学的には、鰓薄板上皮の癒着、鰓弁の棍棒状化、体の浮腫等が観察され、ウイルス性コイ浮腫症と同様の症状を示す（村上・根本, 1982）。眠り病の病原体は現在まで明らかにされていないが、眠り病魚の鰓磨碎濾液（450nm）を

健康魚に接種すると 100%死亡するが内臓の磨砕濾液では死亡しないことから（新潟県内水面試験場, 1994）、濾過性病原体による感染症と指摘されている。治療法としては、クロラムフェニコール、塩酸オキシテトラサイクリン、トリクロルホン、ホルマリン等の薬剤では有効性が示されなかったが、長期の 0.5%塩水浴により顕著な治療効果を示す（村上・根本, 1982）。眠り病と浮腫症は、発病サイズ、発症時期、症状等が異なるものの、CEV ゲノムの検出、病理組織像、病原体は主に鰓に存在、0.5%塩水浴による治療効果など類似している点も存在し、両疾病は症状は異なるが同一の病原体によって引き起こされている可能性が考えられてきた。CEV の感染源は未だ未解明であり昆虫等の他生物からの伝播も疑われているが、コイ自体でサイクルが完結している可能性も考えられた。本ウイルスの感染源を解明するためにも、まずは本症と眠り病との関連性を調べていく必要がある。

本研究では、ウイルス性コイ浮腫症の未解明部分である死因に関する研究を行い、本疾病発病魚の死因及び塩水浴治療メカニズムを明らかにすると共に、感染源研究の一環としてこれまで別の疾病と考えられてきた本疾病と眠り病との関連性を実験感染において明らかにした。

本研究で得られた成果を、博士論文として報告する。

第1章 ウイルス性コイ浮腫症発病魚の死因および塩水浴治療メカニズムの解明

ウイルス性コイ浮腫症は、1974年に新潟県および広島県で初めて報告されて以来（細谷・鈴木, 1975; 村上ら, 1976）、毎年梅雨時期に発生するニシキゴイ稚魚の疾病である。本疾病病原体である CEV(carp edema virus)に感染したコイは、発症後数日の内に 80~100%死亡するため、ニシキゴイ養殖において重要な問題となっている。病理組織学的には鰓薄板上皮細胞の増生、2次鰓弁上皮細胞の浮腫、2次鰓弁の癒着、体表上皮細胞のスポンジ化等が挙げられる。また自然発病魚では、腭外分泌細胞の細胞内空胞化、腎臓においては脱核した赤血球が観察されるが、実験感染魚ではこのような病理像は示されず、また鰓薄板上皮細胞の増生、2次鰓弁の癒着等の症状は自然感染魚に比べて軽微である（親松, 1996）。このように、自然発病魚と実験感染魚とでは、病理組織学的に差異が見られるが、両者に共通して観察されるのは、鰓薄板上皮細胞の増生、2次鰓弁上皮細胞の浮腫、2次鰓弁の癒着、鼻上げである。

本疾病が発生した当初から、0.5%塩水浴が顕著な治療効果を示すことが知られており（村上ら, 1976, 1977; 細谷・鈴木, 1975; 須貝・小池, 1980）、実験感染においてもこれが証明されている（畑, 1996）。魚類感染症において 0.5%塩水浴の治療効果は古くから知られており、寄生虫感染症では、塩水浴により魚体から粘液が放出され付着している寄生虫が除去されるといったことが知られており、細菌感染症に関しては、近年になって一部の細菌は塩水浴により増殖は阻害されないが魚体への付着能を阻害するという報告がなされている（Altinok, I. and J. M. Grizzle, 2001a; Altinok, I. and J. M. Grizzle, 2001b）。しかし、ウイルス感染症における塩水浴治療の報告はほとんど無い。

本疾病における塩水浴の治療効果のメカニズムとして、ウイルスにより影響を受ける組織に関係すると考えられた。上記したが、CEVは鰓および体表上皮細胞に感染し、その影響として上皮細胞の剥離や増生が生じる。魚における鰓の役割は、主に浸透圧調節機能およびガス交換が挙げられ、体表においては、体内の浸透圧を維持していく上で重要なバリアーとなっており、ウイルス感染によりこれら機能が冒され、上記症状が現れると考えられた。そこで著者は修士論文として、本疾病における塩水浴の治療効果を浸透圧、ガス交換機能を主に測定し、本疾病の病態生理学的研究を行った。結果として、CEV感染魚の生理的变化として、ヘマトクリット値（Hematocrit:Ht）が上昇、乳酸値の上昇から酸素不足が考えられ、浸透圧の低下、Cl濃度の低下から、浸透圧調節機能の低下が考えられた。またこれら以外にも、ウイルス感染魚体では膨張した赤血球が多く観察された。これら

病的変化が 0.5%塩水浴を行うと、翌日には健康魚レベルまで回復し、それ以降 2 週間の塩水浴期間中を経て真水飼育に移行しても各パラメーターに変化は見られず、血液学的にも本疾病における 0.5%塩水浴の治療効果を証明した。

しかし、死因に関しては言及するには至らなかった。修士研究でウイルス感染魚の酸素不足および浸透圧調節機能の低下が示唆されたが、これら生理的变化がどのように死因に関与するか、つまりどちらが死因に関与するのか、また両者が死因に関与するのかを明らかにすることが出来なかった。また、塩水浴による CEV 感染魚の浸透圧の回復は、強制的な塩類の補充によるものと考えられたが、塩水浴による酸素不足の回復、つまり Ht 値と乳酸値の回復メカニズムについては明らかにすることが出来なかった。魚類ウイルス感染症において、病原体が鰓および体表上皮細胞のみに感染する疾病はほとんど無く、また 0.5%塩水浴で治療できるということは極めて珍しく、本疾病の死因を解明することは魚類感染症のみならず、魚類生理学的においても重要な知見を与えるものである。

本章では、これらを明らかにし本疾病における死のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

第1節 0.5%塩水浴開始直後の浮腫症病魚の血液性状の変化

先に述べたが、本疾病における 0.5%塩水浴の効果として、酸素不足および浸透圧の低下の症状が塩水浴により翌日には健康魚レベルまで回復するという結果が得られている（瀬野, 1999）。しかし、魚類の生理的变化は 1 日単位で変化するものではなく、数時間単位で変化する。本疾病における塩水浴の効果も、開始直後より数時間単位で血液性状を測定すれば治療メカニズムをより詳しく知ることができ、また各パラメーターの回復には順序があるのではないかと考えた。

本節では、コイにウイルスを感染させ、修士研究と同様にウイルス感染魚と非感染魚とで Ht 値に差が見られた時点で 0.5%塩水浴を開始し、直後から血液性状を測定した。

材料と方法

【血液性状測定用の供試魚の作製】

〈供試魚〉

本研究室で採卵、孵化、飼育したマゴイ (*Cyprinus carpio*)、魚体重 $3.56 \pm 0.81\text{g}$ を実験に供試した。なお本研究で用いるマゴイは、PCR 法（親松, 1996）にて CEV ゲノムの検出を行った結果、陰性であり、CEV に対して SPF (specific pathogen free) であると判断された。以後の実験に供試するマゴイは、本節で用いる供試魚と同一ロットのものを供試した。ロットとは、同一親魚群から同時期に採卵し、同一条件で飼育した子孫を示す。

〈実験区〉

実験区にはウイルス接種区および非接種区を設け、それぞれの区に 0.5%塩水浴処理区、塩水浴非処理区を設けた。各々の区に数個の 2L 容ディスポーザブルカップを用意しその中に飼育水 500mL を入れ、供試魚を 5 尾ずつ収容した。なお、飼育水とは、水道水を鉄除去フィルター装置に通し、活性炭で脱塩素した水のことで、断りのない限り、以後の実験ではこれを飼育水として用いた。

〈接種源の調製〉

本実験に供試するウイルス液は、著者が 1997 年に作製し、約 4 年間 -80°C に保存しておいたものを用いた。なお以後の実験にはこのウイルス液を用いた。ウイルス液の調製方法は、実験の部で記す。

〈ウイルス接種〉

供試魚を一旦実験水槽に収容し 3 日間馴致した。馴致後、ウイルス接種区に関してはウイルス液を 500 μ L 加え、20℃、1 時間の浸漬接種を行った。ウイルス非接種区に関しては、健康なコイの鰓磨碎液を同様の方法で接種した。接種後、実験水槽に飼育水 400mL を加え、エアレーションを行いながら無給餌、無換水で飼育を行った。飼育期間中の水温は、19.5～20.0℃であった。

【血液性状測定】

〈塩水浴開始時期〉

塩水浴開始は、ウイルス接種魚の Ht 値が非接種魚のそれに比べ、上昇した時点で開始した。本実験では、ウイルス接種後 6 日目で両者に差が見られたので、塩水浴を開始した。

〈0.5%塩水浴〉

0.5%塩水浴には、並塩を用い、実験水槽に 5%塩水 100mL を加えることで、0.5%塩水浴処理とした(合計 1L)。また塩水浴非処理区に対しては、新鮮な飼育水 100mL を加えた。

〈採血方法および採血時期〉

供試魚を実験水槽より取り上げ、キムワイプ等で体表の水分を取り除き、尾部をハサミで切断し、ヘパリン処理されたヘマトクリット毛細管にて採血を行った。採血時期として、ウイルス接種魚と非接種魚とで Ht 値に差が見られたときを塩水浴直前を開始 0 時間とし、その後 0.5、1.5、3、6、12、24 時間後に採血した。

〈血液性状測定項目〉

本実験では、Ht 値、血漿浸透圧、乳酸値を測定した。供試魚からヘマトクリット管にて採血後、ヘマトクリット管専用遠心器で 15000rpm、10 分の遠心を行い、ヘマトクリットリーダーにて Ht 値を測定した。その後、ヘマトクリット管の血漿と血球の境界部分を折り、血漿を回収した。回収した血漿は、浸透圧および乳酸値を測定するまで-20℃で保存した。血漿浸透圧の測定には、氷点降下法を用いた浸透圧測定器(VOGEL Osmometer OM-801)を用いた。乳酸値は、市販の乳酸測定キット(デタミナー LA ; 協和メデックス)を用いて分光光度計にて測定を行った。

結果および考察

ウイルス接種後 6 日目からウイルス接種魚において Ht 値の上昇が確認されたので、0.5%塩水浴を開始した。発症に伴って低下した血漿浸透圧は、Fig.1 に示すように塩水浴開始後急速に上昇し開始 1.5 時間後には対照群（塩水浴処理したウイルス非接種群）と有意な差が認められなくなった（t-検定： $p=0.1$ ）。Ht 値では塩水浴開始後急速に低下し、開始 1.5 時間で対照群と有意な差がなくなった（ $p=0.05$, Fig.2）。血漿浸透圧、Ht 値ともに、それ以降対照群とほぼ同様の数値が維持された。乳酸値に関しては、血漿浸透圧および Ht 値の変動より緩慢に低下し、6 時間後に対照群との有意な差は認められなくなったものの（ $p=0.05$ ）、12 時間後までは平均値が対照群より高い傾向にあった（Fig.3）。

このように、血漿浸透圧および Ht 値は塩水浴開始 1.5 時間後には、乳酸値に関しては塩水浴開始 6 時間後には健康魚レベルまで回復するという結果が得られた。この結果により、本疾病に対する塩水浴の効果は極めて短時間で現れることが明らかとなった。また、塩水浴開始後まず浸透圧および Ht 値が回復し、その後酸素不足の指標となる乳酸値が回復し、本疾病における塩水浴の回復順序も明らかになった。他の実験ではあるが、ウイルス感染魚の MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentration)が低下していることから、病魚の Ht 値の上昇は赤血球容積の増大によるものである（Fig.4）。従って、塩水浴後に病魚の血漿浸透圧および Ht 値が同時に回復していたことは、塩水浴により病魚の浸透圧がまずはじめに回復し、これによって膨張した赤血球が正常に戻ったためと推察した。動物細胞は細胞壁を持たないため、そのサイズは浸透圧によって左右される。本実験での血漿浸透圧と Ht 値の変動が同期していることは極めて自然なことである。

これらのことから、本疾病における塩水浴治療のメカニズムとして、ウイルス感染魚は 0.5%塩水浴によりまず浸透圧が回復し、これと同時に膨張した赤血球が正常な形に戻り（Ht 値の回復）、血流が回復し酸素不足が解消される（乳酸値が回復）と推察した。そして本症の死因として、コイにウイルスが感染することにより、鰓（Fig.5）および体表上皮細胞（Fig.6）の損傷によりまず浸透圧が低下し、これにより赤血球が膨張し（Ht 値の上昇）、血流が悪くなり、酸素不足に陥り（乳酸値の上昇）、死亡すると推察した。

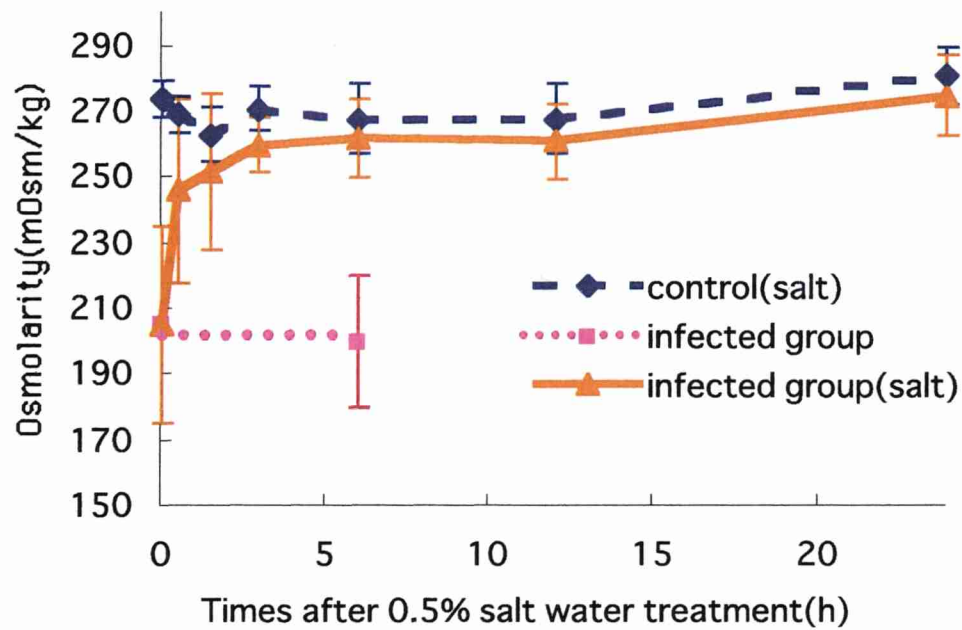


Fig.1 Reversion of plasma osmolarity of CEV infected fish by 0.5% salt water treatment.

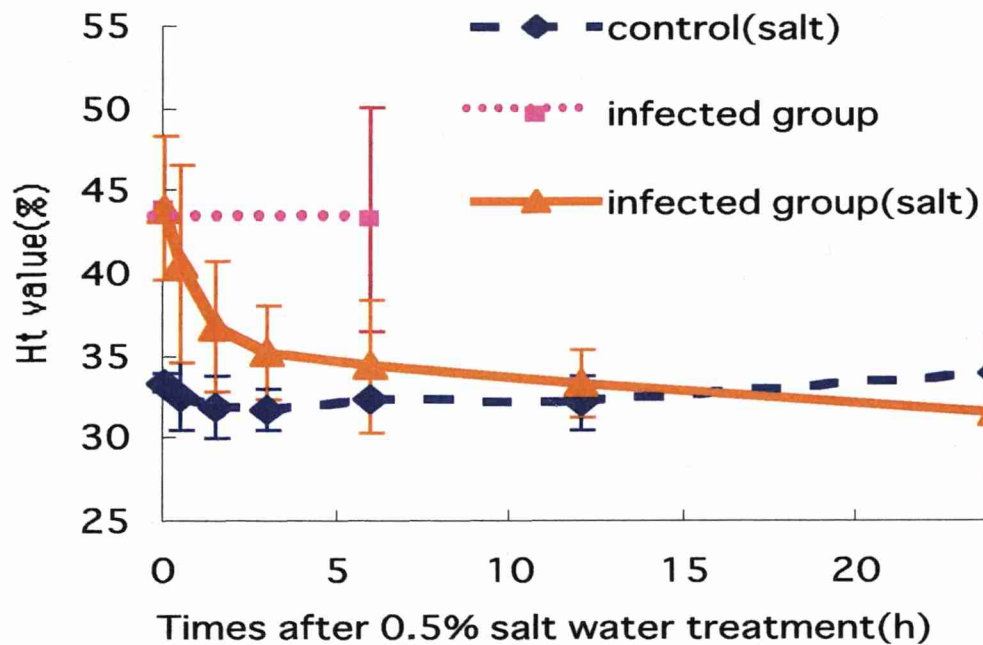


Fig.2 Reversion of Ht value of CEV infected fish by 0.5% salt water treatment.

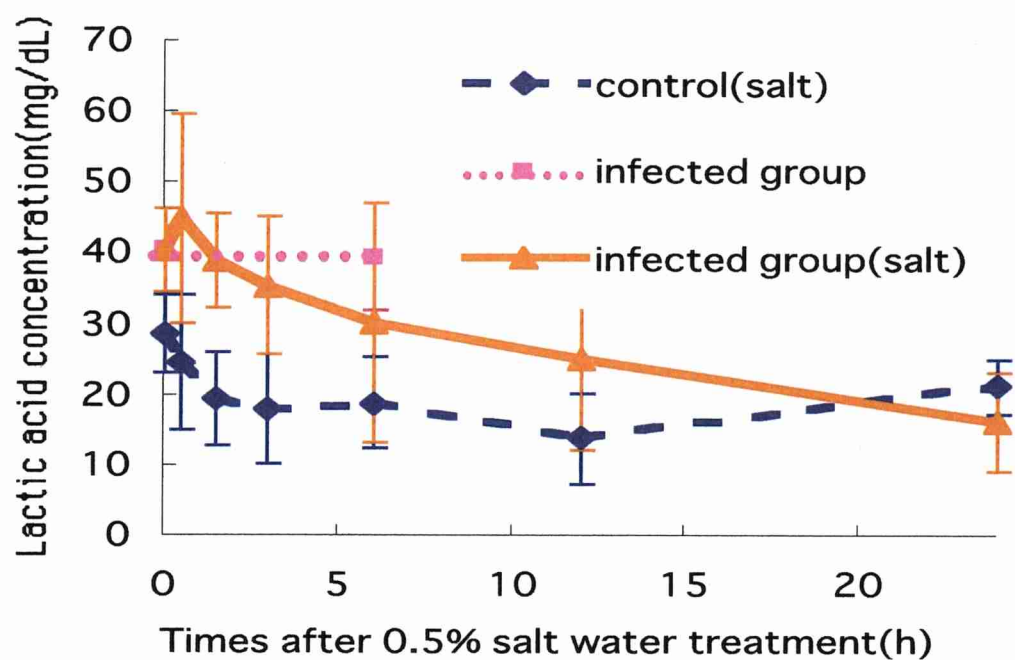


Fig.3 Reversion of lactic acid concentration of CEV infected fish by 0.5% salt water treatment.

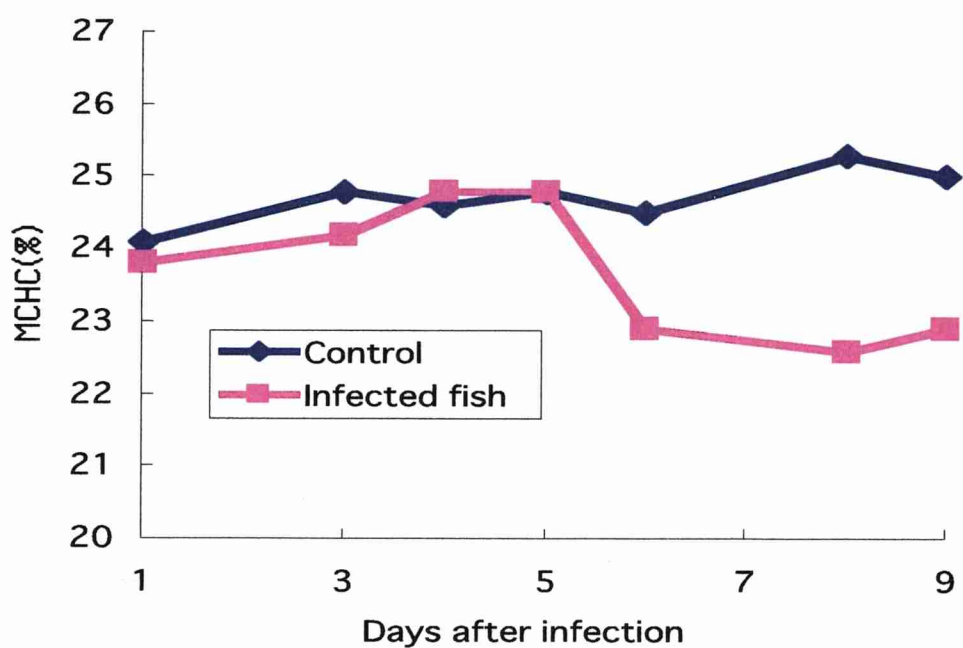


Fig.4 Comparison of MCHC of CEV infected group and control group. Comparing with control group, the decrease of the MCHC was observed in the infected fish.

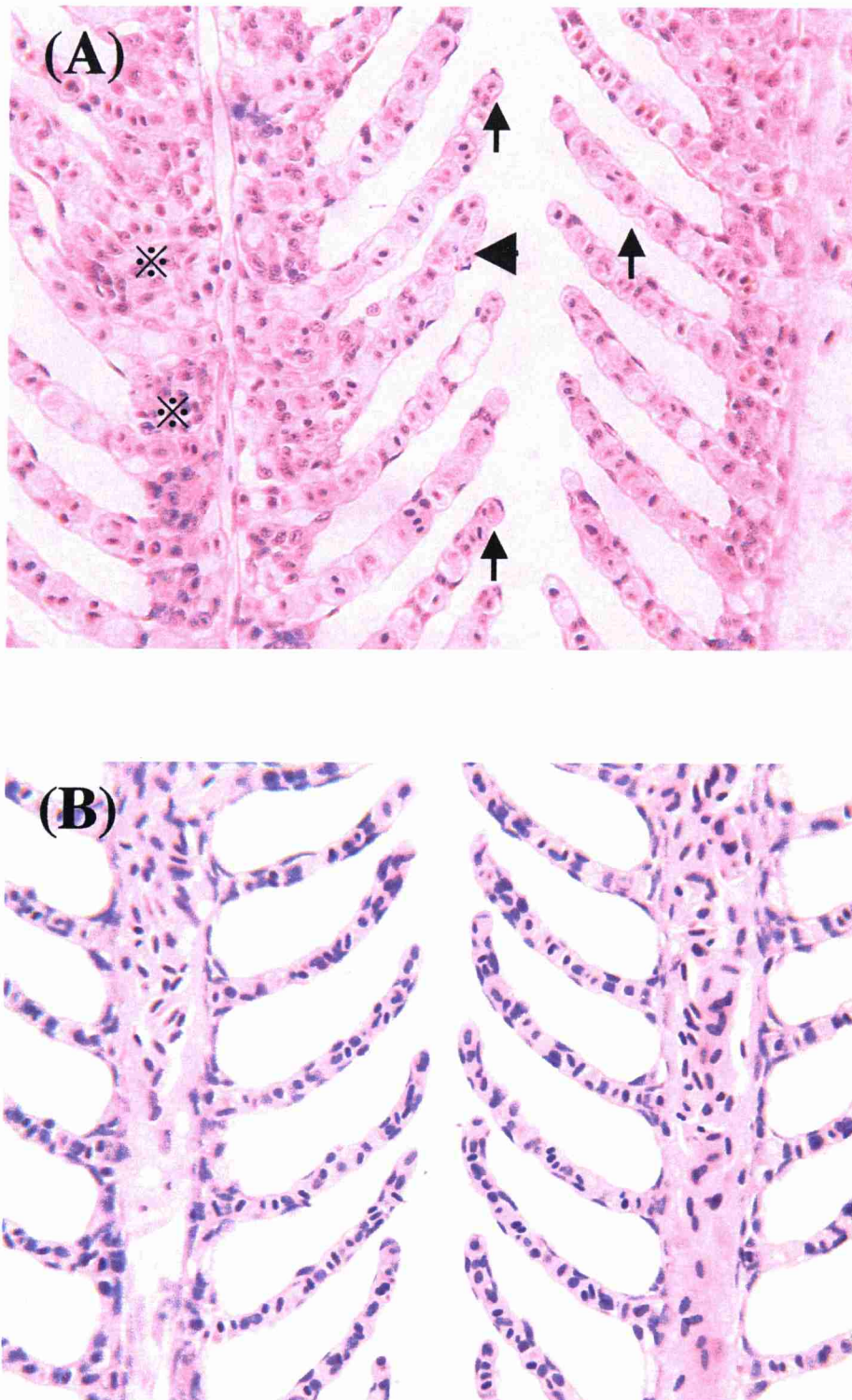
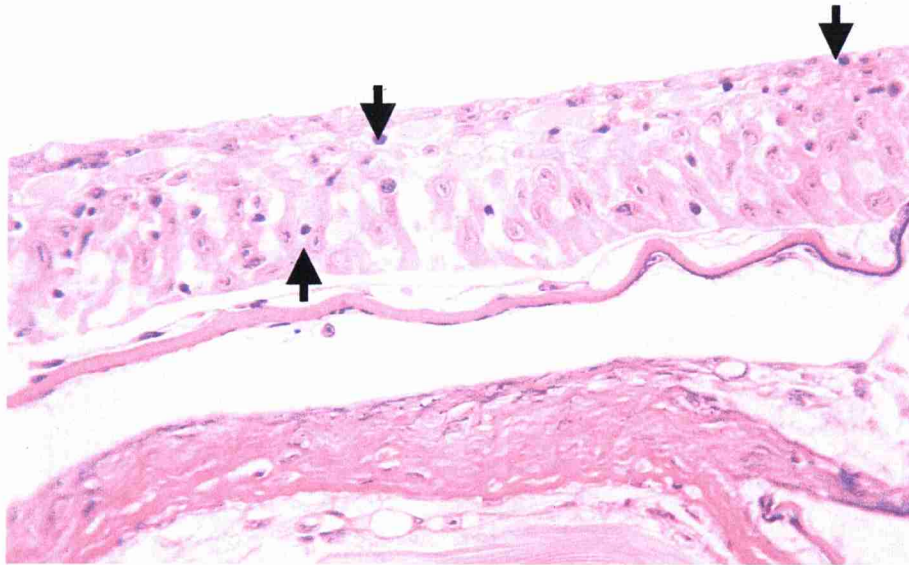


Fig.5 Gill of carp experimentally infected with CEV(H&E stain). In comparison with healthy carp (B), hypertrophy (arrowhead), hyperplasia (※) and degeneration (arrows) of epithelial cell are observed in infected fish (A).

(A)



(B)

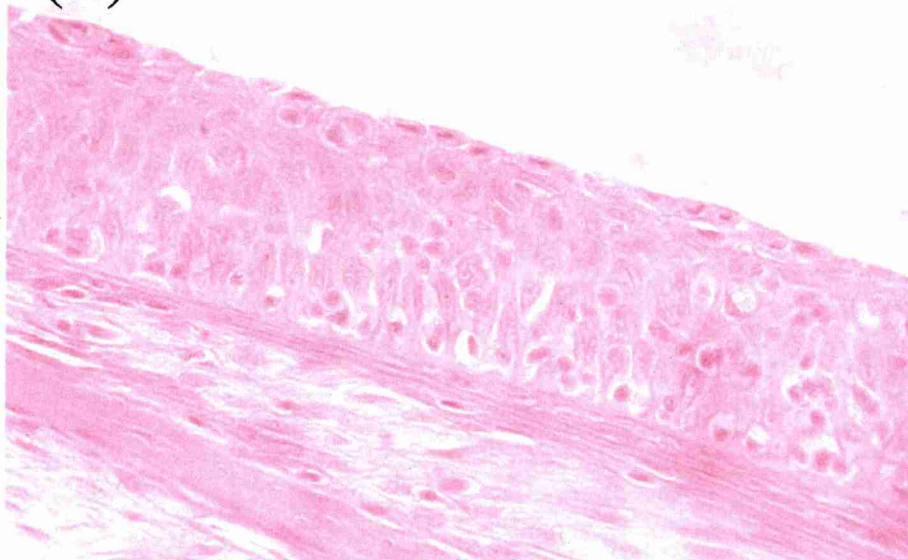


Fig.6 Skin of carp experimentally infected with CEV(H&E stain). In comparison of healthy fish (B), Spongiosis (intercellular edema) and atrophy of epidermal cell (arrows) are observed in infected fish (A).

第2節 異なる塩分を用いた塩水浴による CEV 感染魚の死亡率の比較

これまでの研究の中で、0.5%塩水浴による本疾病に対する治療効果が証明されてきた（畑, 1996：瀬野, 1999）。これら塩水浴には、並塩が用いられてきた。並塩は、海水や岩塩を精製したものであり、これら並塩には、 Na^+ 以外にも Ca^{2+} や Mg^{2+} 、 K^+ 等の他の物質が多く含まれている。本疾病における塩水浴の効果は、浸透圧の回復によるものと考えられるが、塩水浴に用いる塩分が並塩であるため、 Na^+ 以外の物質が本疾病の回復に関係している可能性を否定できない。 Ca^{2+} や Mg^{2+} 、 K^+ 等のイオンは、生体を維持していく上で Na^+ と共に重要であり、塩水浴によりこれら成分が Na^+ と共に魚体に供給され、回復しているとも考えられる。浸透圧測定は、主に Na^+ を測定しており、その他のイオンについての動向を詳しく見ることが出来ないため、本疾病における治療メカニズムとして、浸透圧の回復だけで説明できない可能性がある。これを明らかにするためには、並塩以外の塩分、つまり純粋な NaCl を用いて塩水浴を行い、並塩と比較して効果が異なるかを調べる必要がある。

本実験で用いる塩分として、これまで用いてきた並塩として海水より精製されたナйкаイ塩業株式会社（以下、Crude Salt(CS)と呼称）、純粋な NaCl として市販されている国産化学株式会社の試薬特級（以下、Pure Salt(PS)と呼称）を用いて塩水を作製し、CEV 感染魚に塩水浴を行い死亡率の比較を行った。

材料と方法

〈供試魚〉

本学吉田実験実習場で採卵、飼育されたマゴイ稚魚、平均魚体重 $0.74 \pm 0.09\text{g}$ を用いた。

〈実験区〉

実験区には、ウイルス接種区と非接種区を設け、それぞれに塩水浴処理区、塩水浴非処理区を設けた。また塩水浴処理区には、CS 区、PS 区を設けた。

〈ウイルス接種〉

使用するウイルス液は、第1章第1節で使用したものと同様である。飼育水 500mL 入った 2L 容ディスポーザブルカップに供試魚を 50 尾ずつ収容し、ウイルス液を 500 μL 加え、エアレーションを行いながら、19.5℃、1 時間浸漬接種を行った。

その後、浸漬液と共に供試魚を飼育水槽に移し、エアレーションを行いながら無給餌、無換水で飼育を行った。飼育水槽にはあらかじめ 18 L 容ガラス水槽に飼育水を 8.5 L 入れておき、浸漬液 500mL を加えたので、計 9 L で飼育した。なお、非接種区には、健康なコイの鰓磨碎液を同様の手順で接種し、飼育を行った。飼育期間中の水温は、19.5～20.5℃であった。なお、本実験で使用した飼育水は、地下水を使用した。

〈塩水浴〉

塩水浴は、死亡率が 10% になった時点で塩水を加えた。塩水は、CS および PS をそれぞれ飼育水に 5% となるように作製し、この塩水 1 L を上記の飼育水槽に加えることで、0.5% 塩水浴とした。塩水浴非処理区は、新鮮な飼育水を 1L 加えた。用いた塩分の成分表を以下に記し、値は各会社が独自で調査した数値を示す(Table 1)。

Table 1 Components of salts used for 0.5% salt water treatment

	Sodium chloride (KOKUSAN)	Crude salt (NAIKAI)
NaCl	99.5	97.75
Calcium	0.002	0.052
Magnesium	0.002	0.079
Potassium	0.005	0.118
Barium	0.001	ND
Iron	0.0002	ND
Nitrogen compounds	0.001	ND
Heavy metals	0.0005	-
Sulfate	0.002	ND
Phosphate	0.0005	ND

Unit: %

ND : not determine

結果および考察

本実験では、ウイルス接種後 6 日目からウイルス接種区で死亡が始まり、塩水浴非処理ウイルス接種区では 11 日目に 100% に達した。一方、死亡率が 12% にな

ったウイルス接種6日目にPSを用いた塩水を、10%になったウイルス接種7日目にCSを用いた塩水をそれぞれ加え0.5%塩水浴を施すと、それ以降全く死亡は観察されなかった (Fig.7)。このことから、どちらの塩分を用いても本疾病に対して治療効果があり、塩分の組成により治療効果に差が無いことが明らかとなった。

上記に記した通り、両塩分の主成分はNaClであり、その他に Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 K^{+} が含まれているが、本疾病治療に多く使用される並塩の方がより多く含まれ、これら成分が本疾病治療に対して関与していないことが考えられる。よって本疾病の治療効果に関しては、NaClが重要な意味を示し、単に Na^{+} の補充、つまり浸透圧の回復によりCEV感染魚が治癒に向かうと考えられた。この結果は、これまで推察してきた本症の死因および塩水浴治療メカニズムを支持するものである。

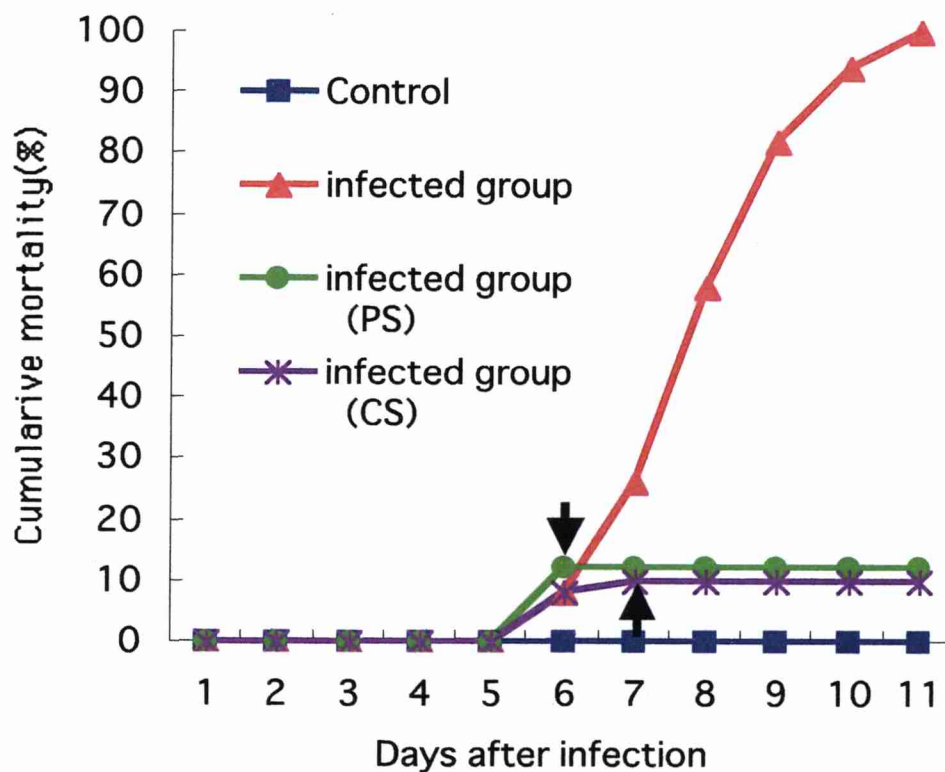


Fig.7 Cumulative mortality of CEV infected group by 0.5% salt water treatment using pure salt(PS) and crude salt(CS). Cumulative mortality of CEV infected group was reached at 100%. However, in salt treated group(PS, CS) cumulative mortality were not changed at starting the salt water treatment. ← : indicates the initiation of salt water treatment.

第3節 早期 0.5%塩水浴による CEV 感染魚の死亡率

これまでの研究の中で、本疾病の死因として浸透圧というものが重要な要素である。本章第1節においては、塩水浴開始 1.5 時間後という短時間で CEV 感染魚の浸透圧が回復し、本章第2節において、試薬特級の NaCl と並塩を用いた塩水浴による本疾病に対する治療効果を調べた結果、どちらの塩分を用いても治療効果を示し、Na⁺の補充が治療効果を示すと考えられた。これらにより、CEV 感染魚の死因および塩水浴治療のメカニズムにおいて、浸透圧というものが重要であると考えられた。

本疾病の死因として、CEV 感染魚の浸透圧の低下が決定的であるなら、常に感染魚の浸透圧を維持していれば死亡しないのではないかと考えた。つまり、健康なコイにウイルスを感染させた後に真水で飼育せずに 0.5% 塩水で飼育すれば、たとえウイルス感染により鰓および体表上皮細胞の損傷が生じて、常に浸透圧を維持していく上で重要な Na⁺を絶えず供給することができ、感染魚は死亡しないはずである。これを明らかにすることにより、本疾病の死因において浸透圧の重要性を更に理解し、死因解明の一助として、また本章第1節の考察で述べた浸透圧と酸素不足の関係に関する知見を得られるのではないかと考えた。

よって本実験では、コイにウイルスを感染させ、翌日から 0.5% 塩水浴を開始し、感染魚が死亡するか調べた。

材料と方法

〈供試魚〉

本学吉田実験実習場で採卵、飼育されたマゴイ稚魚、平均魚体重 $0.74 \pm 0.09\text{g}$ を用いた。

〈実験区〉

実験区には、ウイルス接種区と非接種区を設け、それぞれに 0.5% 塩水浴区と塩水浴非処理区を設けた。

〈ウイルス接種〉

本章第2節と同様の方法で行った。

〈0.5%塩水浴〉

ウイルス接種後翌日に 5%塩水を飼育水槽に加えることで最終濃度を 0.5%とした。用いた塩は、本症第二節で使った並塩を用いた。なお塩水浴非処理区には、新鮮な飼育水を加えた。

〈病理組織像観察〉

塩水浴を行った個体群において、ウイルス感染を証明するために鰓の組織切片を作製し観察した。試料の作成方法は、実験の部で記す。

結果および考察

ウイルス接種後、塩水浴非処理区では 6 日目から死亡が観察され、11 日目の死亡率は 94%であったのに対して、塩水浴処理区では、全く死亡は観察されなかった (Fig.8)。塩水浴処理区においてウイルス感染を証明するために、鰓の組織切片を作成した結果、通常 CEV 感染に観察される鰓上皮細胞の脱落、増生等が観察され、これら個体群は確実にウイルスに感染していた (Fig.9)。このことにより、ウイルスに感染し上皮細胞が傷害を受けていても、常に浸透圧を維持している状態であれば感染魚は死亡しないということが明らかとなった。また本疾病の末期症状としての鼻上げを塩水浴非処理区では示したものの、塩水浴処理区では全く示さなかった。これは、病魚の浸透圧の低下によって酸素不足が生じているというこれまでの推察を支持している。

本実験で早期塩水浴の有効性が示されたが、塩水浴はあくまでもウイルス感染魚の低下した浸透圧を回復させる手段であって、防除手段として日頃から塩水浴を用いることはできず、またコイがいつ感染するかも分からず長期間 0.5%塩水で魚を飼育することは難しく、塩害等の影響もあることからこの方法は養殖現場で使用することは困難である。しかし本実験で得られた結果は、改めて本疾病の死因に対して浸透圧の重要性を示す知見であり、また鼻上げ症状を示さなかったことから浸透圧低下と酸素不足が深く関与していることを裏付けるものである。

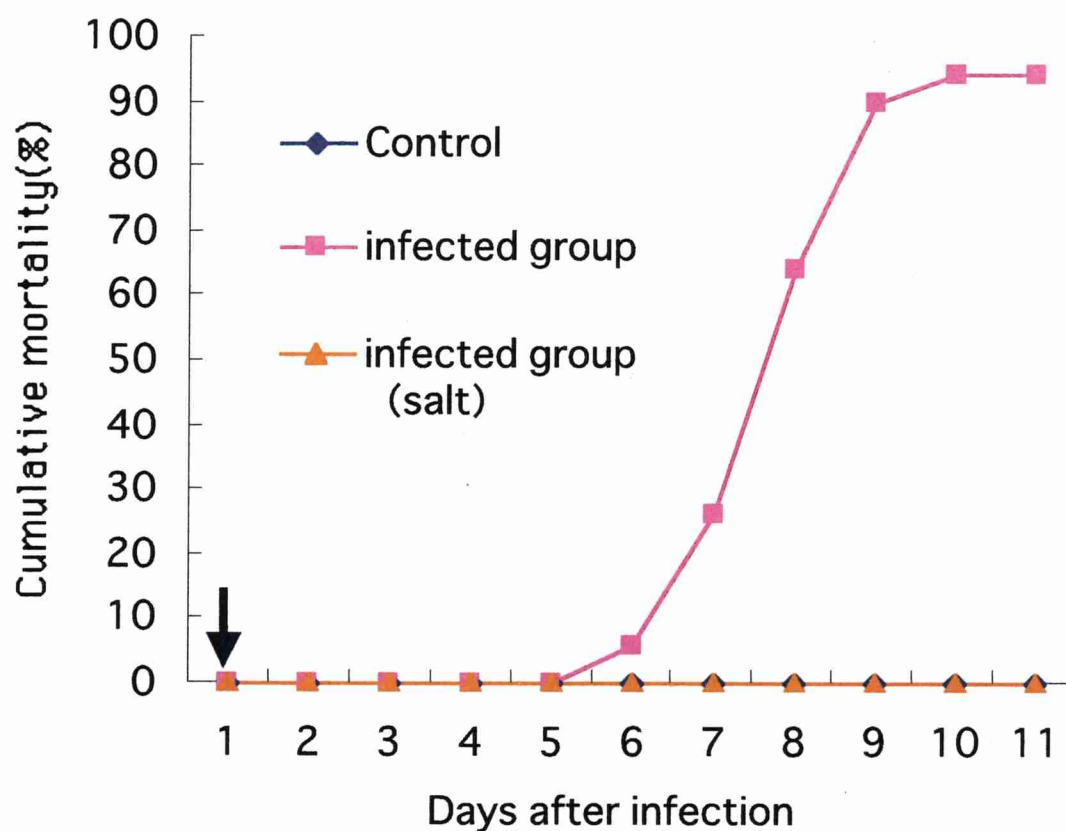


Fig.8 Cumulative mortality of CEV infected group by early 0.5% salt water treatment.

Cumulative mortality of CEV infected group was reached at 94%. However, in early salt treated group(PS, CS) cumulative mortality were 0%. ← : indicates the initiation of salt water treatment.

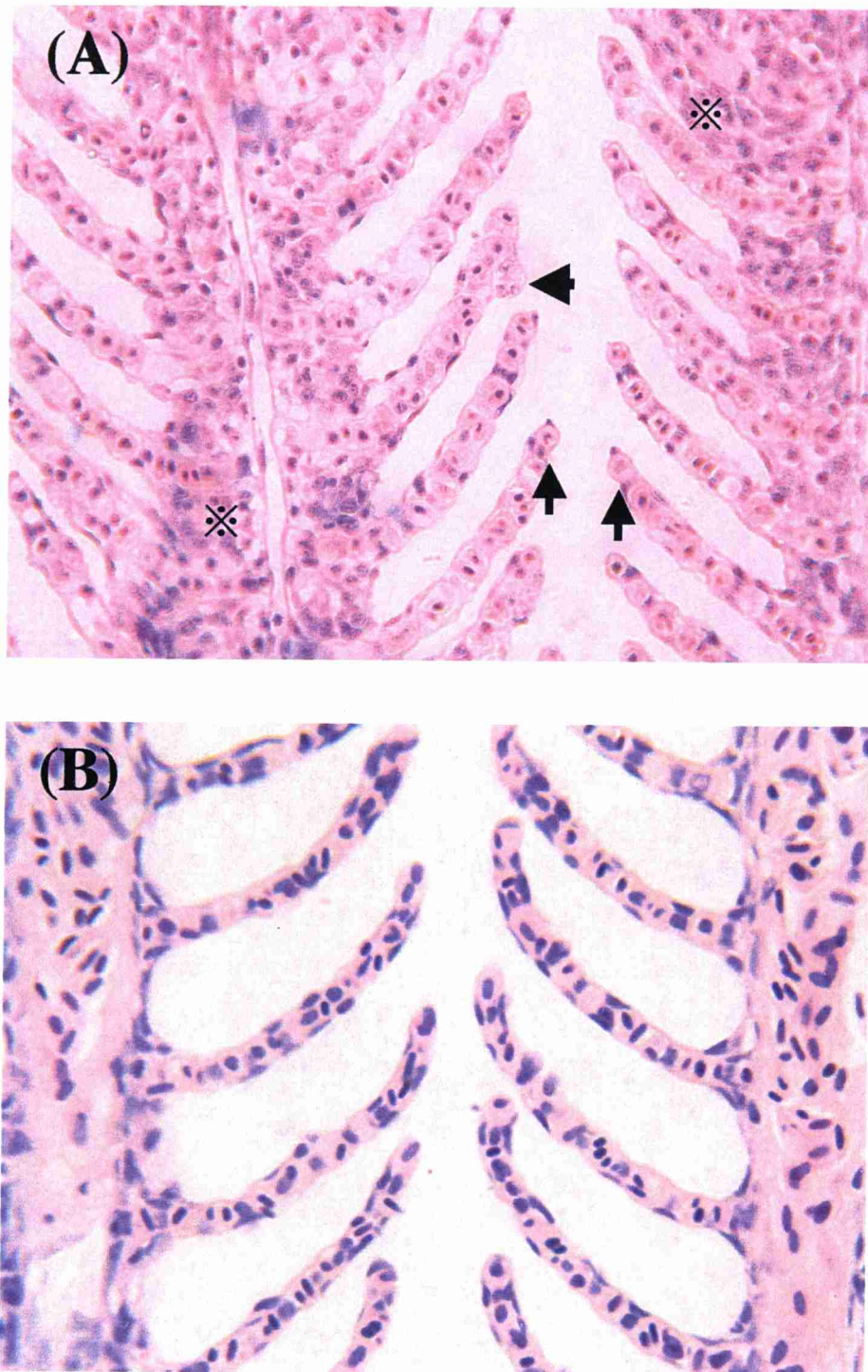


Fig.9 Gill of carp experimentally infected with CEV(H&E stain). In comparison with control fish (B), hypertrophy (arrowhead), hyperplasia (✕) and degeneration (arrows) of epithelial cell are observed in infected fish (A).

第2章 ウイルス性コイ浮腫症とニシキゴイの眠り病との関連性

2002 年 2 月、本学吉田実験実習場においてニシキゴイで疾病が発生した。外観症状としては、遊泳不活発、浮上し池の縁に集まるなど梅雨時期に発生するウイルス性コイ浮腫症と類似している点があり、またなかには池の底でじっとして横たわるという症状も見られた。冬季にニシキゴイがじっとし横たわる症状が示される疾病に、ニシキゴイの眠り病がある。近年になって、新潟県内水面試験場的山は、眠り病魚の鰓より CEV ゲノムを検出したという（私信）。また、新潟県下で 2002 年に発生した眠り病魚の鰓、脳等の臓器より、CEV 遺伝子が高率で検出された（網田ら, 2002）。このことから、眠り病は、CEV によって引き起こされているという可能性が考えられている。

ここで、ウイルス性コイ浮腫症とニシキゴイの眠り病とのこれまで得られている知見を紹介する（Table 2）。ウイルス性コイ浮腫症に関しては新潟県内水面水産試験場の研究報告及び親松（1996）より、ニシキゴイの眠り病に関しては広島県淡水魚指導研究報告書を基にまとめた。

Table 2 Comparison of viral edema of carp and Nemuri disease

	Viral edema of carp	Nemuri disease
first report	1974	1975
season	Late spring - summer	Late autumn - winter
size of diseased fish	0.1~3g	0~2 years old
mortality	80~100%	≥50%
symptom	surfacing, edema	sleeping symptom, edema
histopathology	hypertrophy, hyperplasia, lamellar fusion and adhesion of gill filament	hypertrophy, hyperplasia, lamellar fusion and adhesion of gill filament
Pathogen	CEV	unknown
Target organ	epithelial cells of gill and skin	gill
treatment	0.5% salt water treatment	0.5% salt water treatment

上記に記す通り両疾病の類似する点としては、病理組織、病原体の感染部位、治療方法である。相違点としては、発生時期、発病サイズ、症状、死亡率、眠り

病の病原体が不明な点である。このように類似点も多いが相違点もあり、両者が同一の疾病であるか現在まで断定することはできなかった。しかしながら、両者の相違点のなかで発症時期、つまり発症水温がある。魚類感染症では、発症水温が重要であり、病原体の増殖至適温度が疾病発生につながる。コイ科魚類のウイルス性疾病において、SVC (Spring viremia of carp) では発症水温が 10~17℃であり (W.Ahne et al., 2002)、KHVD (Koi herpesvirus disease) では 18~25℃で発症する (A.Ronen et al., 2003)。浮腫症では厳密な発症温度域が調べられていないが、主に 20℃付近で発症し、30℃では発症しない (親松, 1992)。眠り病においては、水温が低い冬季に発生し、水温が 10℃以下でも発症するとされている。しかしながら低水温域のどの温度まで CEV 感染が成立するかの知見がなく、また温度によって症状が異なる可能性も考えられ、眠り病との比較を行うためにも温度域を調べる必要がある。

一方感染環に関しては、浮腫症においては昆虫のフサカ幼生、線虫等が CEV 遺伝子を保有しているという報告があるが (木村, 1998)、ゲノム検出のため感染性粒子の存在が明らかにされておらず感染環は未だ不明である。しかし水温の低い冬季に発生する眠り病病魚の鰓から高率で CEV ゲノムが検出されたことから、コイ同士で CEV の感染環が完結している可能性が考えられた。CEV の感染環を知る上でも、眠り病と浮腫症の比較を行っていく必要がある。

本章では、ウイルス性コイ浮腫症とニシキゴイの眠り病との関連性を調べるために、浮腫症病魚より作製した接種源を用い、異なる水温での感染実験を行い、コイに対するウイルスの感染温度域を調査した。また、CEV の感染環解明の一助として、CEV 感染耐過魚の長期にわたるウイルス保有の有無を調査した。

第1節 冬季に発生したニシキゴイの疾病

2002 年 2 月、本学吉田実験実習場でニシキゴイ 1 年魚に疾病が発生した。症状は浮上し池の縁に集まり、なかには池の底で横たわっているものもいた。これら症状が現れてから 0.5% 塩水浴を 48 時間行ったところ、塩水浴期間中の死亡は見られなかったが、塩水浴終了後より再度死亡が確認された。治療のため再度塩水浴を行うと死亡は停止した。これらの症状はニシキゴイの眠り病と類似していた。

そこで、PCR 検査を行い、CEV ゲノム検出を試みた。

材料と方法

〈供試魚〉

本学吉田実験実習場で飼育されていたニシキゴイ (*Cyprinus carpio*) で、魚体重は 30~70g 程度の 1 年魚を 9 尾、PCR 法に供試した。塩水浴 48 時間後に真水飼育に移行したが、死亡が再度確認されたため、2 回目の塩水浴を行い開始後 1 週間目の生残魚についても 5 尾 PCR に供試した。

〈供試魚からの核酸抽出〉

塩水浴 1 回目の個体では鰓を、塩水浴 2 回目のサンプルについては、鰓、心臓、鰾、肝臓、腎臓、脾臓、腸を個体別に摘出し、核酸抽出を行った。抽出方法は、PCI(phenol : chloroform : isoamyl alcohol)抽出を行った。抽出後のテンプレートの核酸量を 100ng/ μ L に調整し、PCR 法に供試した。

〈PCR 法〉

プライマーには、親松(1996)が設計した F1-R1 系にて反応を行った。本プライマーを用いた反応では 548bp の増幅産物が得られる。

結果及び考察

第 1 回目の塩水浴中に採捕した 9 個体において、全ての個体で PCR 陽性であった (Fig.10)。そして、PCR 法の検出感度を上げなくとも CEV ゲノムが検出されたこと、治療には長期間の塩水浴が有効であったことから、この疾病は CEV 感染によって発症している可能性が考えられた。また第 2 回目の塩水浴期間中の検体においても、CEV 遺伝子が多くの個体で検出され、鰓以外の腎臓、肝臓、脾臓、

腸においても陽性反応が得られた (Table 3)。これまでの浮腫症の知見において、CEV を腹腔内に接種してもコイは死亡せず、感染魚の臓器を磨碎し健康魚に浸漬接種しても死亡しないことから、鰓及び体表上皮細胞以外の臓器細胞には CEV に対して感受性を示さないと考えられている。故に、今回各臓器で検出された CEV 遺伝子は、成熟ウイルスではなく遺伝子のみである可能性が高い。しかし、これら臓器に遺伝子が長期にわたり潜伏し、何らかの拍子で成熟ウイルス複製に転じる可能性が考えられるため、今後もこの魚群を用いてどの臓器にいつ頃まで潜伏していくか調べていく必要がある。

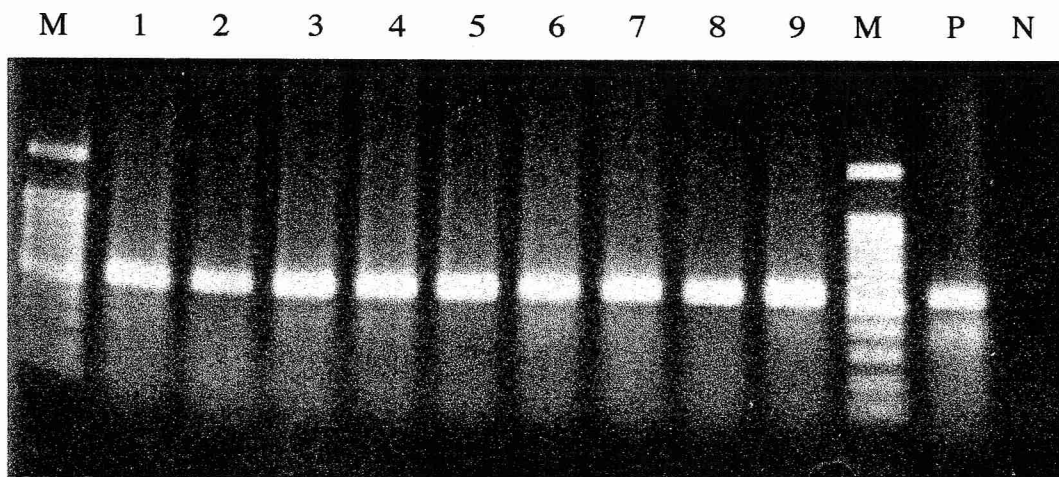


Fig.10 PCR amplification of CEV genome from koi affected with Nemuri disease during first salt water treatment . Lanes (1) ~ (9) : DNAs extracted from gills of diseased fish, (M) 100bp ladder marker, (P) positive control DNA extracted from carp artificially infected with CEV, (N) DNAs extracted from healthy fish.

Table 3 PCR amplification of CEV genome from koi affected with Nemuri disease during second salt water treatment

No.	Tissues						
	GL	SB	BK	HT	PC	SP	IT
1	-	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	+	-
3	+	-	+	-	+	-	-
4	-	-	-	-	+	-	+
5	+	-	-	-	-	-	-

GL: gill, SB: swim bladder, BK: body kidney, HT: heart, PC: pancreas, SP: spleen,
IT: intestine, NT: not tested. +: PCR positive -: PCR negative

第2節 種々温度における CEV の感染実験と眠り病症状の再現

前節において、CEV 感染魚が低温下で飼育されると眠り病を発症する可能性が示された。親松(1992)は、20℃で CEV を感染させた後、種々の温度に移行させ、30℃では発症しないこと、16℃でも 88%が死亡することを報告している。しかし、眠り病はそれより低い温度帯で好発する。より低水温で感染が成立し発症するのなら、越冬池に集められた個体群に含まれる浮腫症耐過魚からの CEV 非感染魚への感染によって眠り病が発生することが考えられる。また、低水温で感染が成立しないのであれば、眠り病病魚は発症よりかなり以前に感染を受け、低水温あるいは何らかの要因によってウイルスが活性化し発症するものと考えられる。

そこで本節では、CEV が感染しコイが死亡する温度帯を詳細に検討するとともに、各温度帯で現れる症状の観察を行った。

材料と方法

〈供試魚〉

本学吉田実験実習場で飼育された当歳魚のニシキゴイ (*Cyprinus carpio*) (0.5±0.12g) を用いた。

〈実験区〉

供試魚は、飼育池から取り上げ 18L 容ガラス水槽に 50 尾ずつ収容し、一旦 20℃で飼育した。その後、通常浮腫症の感染実験を行う 20℃を陽性対照区として、20℃から 3℃ずつ低下させ 8℃まで実験区を設定し、それぞれの温度でウイルスを感染させ同水温で飼育した。コイを低温に馴致させるために温度変化は 1℃/6h とし、一日で 3℃低下させた。全ての温度に到達した時点で各々の水温で供試魚にウイルスを感染させた。また親松 (1994) と同様に、20℃でウイルスを感染させ 8℃で飼育する区も設け。この場合も温度変化は上記と同様に行った。なお陰性対照区として、20℃と 8℃の水槽を設け健康魚鰓磨碎液を接種し飼育した。

〈ウイルス接種〉

飼育水 500mL を入れた 2L 容プラスチック水槽に供試魚 50 尾を収容し、ウイルス液を 500 μ L 加え、エアレーションを行いながら 1 時間、各温度で暴露した。その後、それぞれの水温の飼育水槽に移しエアレーションを行いながら無給餌、無換水で飼育を行った。本実験で用いたウイルス液は、第 1 章第 1 節で用いたウ

イルス液と同一である。

〈感染の確認方法〉

各飼育温度で死亡した個体 10 尾の鰓を個別に摘出し、PCR 検査に供試した。方法は前節と同様に行った。

結果及び考察

各温度における死亡率は 20℃で 94%、17℃で 100%、14℃で 100%、11℃で 96%、8℃で 10%であった。また 20℃で感染させ 8℃飼育していた魚群では 48%であった。なお陰性対照区では 20℃で 0%、8℃で 4%であった (Fig.11)。死亡した個体の一部を PCR 検査に供試したところ、全ての個体で PCR 陽性であった。これにより、CEV は低温域でもコイに感染性を有することが明らかとなった。

また 20℃～14℃区では死亡した魚は全て鼻上げ症状を示し浮腫症であったが (Fig.12)、11℃以下の実験区では、死亡した全ての供試魚はいわゆる眠り病の症状を示した (Fig.13)。症状としては、はじめに全く動かなくなり、2～3 日後に平衡感覚が無くなり横になったり壁にもたれかけたりするようになるが、たまに泳いだりする。それから 2～3 日後には横になった状態で死亡したかに見えるが、取り上げようとするときまた横になる。このころには呼吸数が極端に減り、2 日後ぐらいに死亡する。そして浮腫症に特有の鼻上げ症状は示さなかった。なお上記症状を新潟県内水面水産試験場の大江氏に確認したところ、眠り病と同様の症状であるとの返答であった。

一方、11℃において死亡が始まっている接種後 12 日目の飼育水を一部取り上げ、新鮮な飼育水で 3 倍希釈し、健康なニシキゴイを収容し一つは 11℃で飼育、もう一つは 20℃で飼育を行うと、11℃飼育では眠り病の症状が、20℃では鼻上げの症状を示し供試魚は全て死亡し、20-8℃区においても同様の結果が得られた。

これらの結果から、CEV は 10℃付近でも感染性を有することが明らかとなり、そのような温度になるとねむり病の症状を示し、今まで異なる疾病とされていた浮腫症と眠り病が CEV によって引き起こされることが判明した。

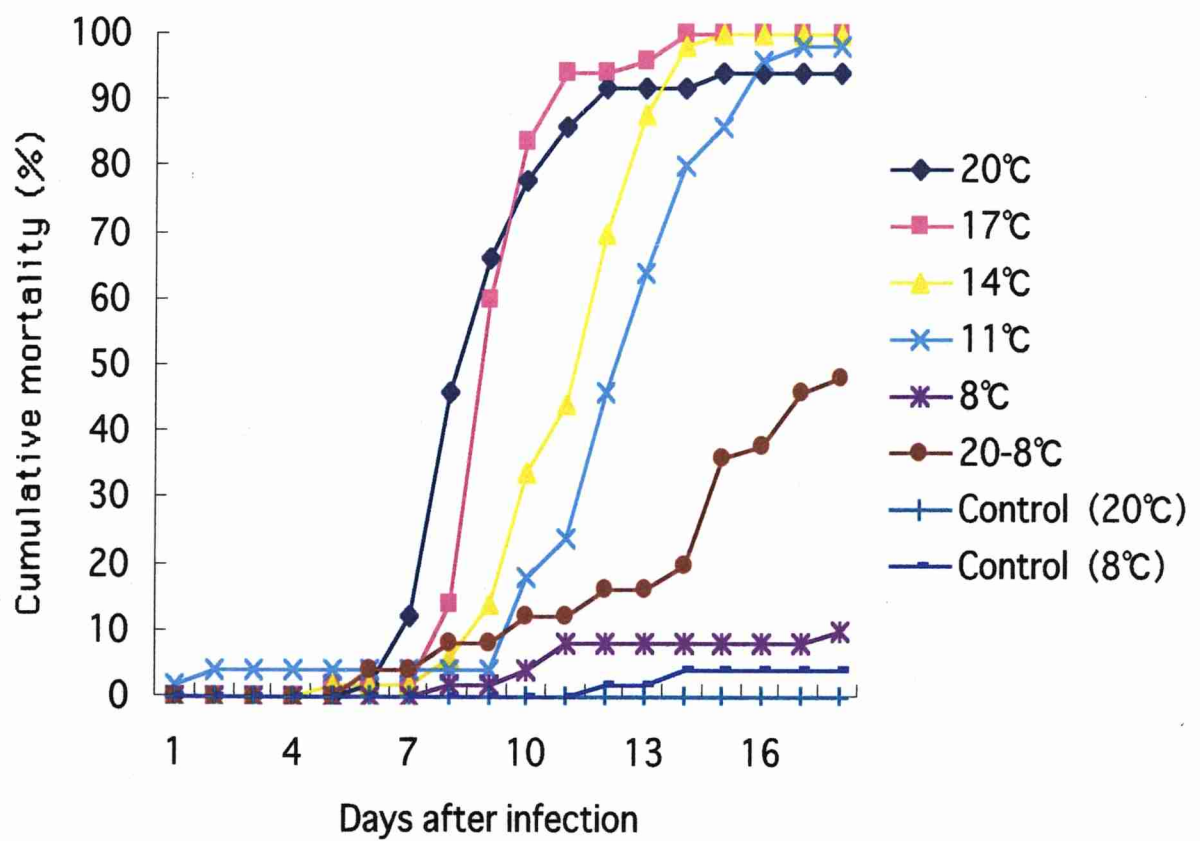


Fig.11 Cumulative mortality curve of carp experimentally infected with CEV at various temperature. 20-8°C indicate that the fish was infected at 20°C and then the water temperature was lowered to 8°C at 3°C/day.

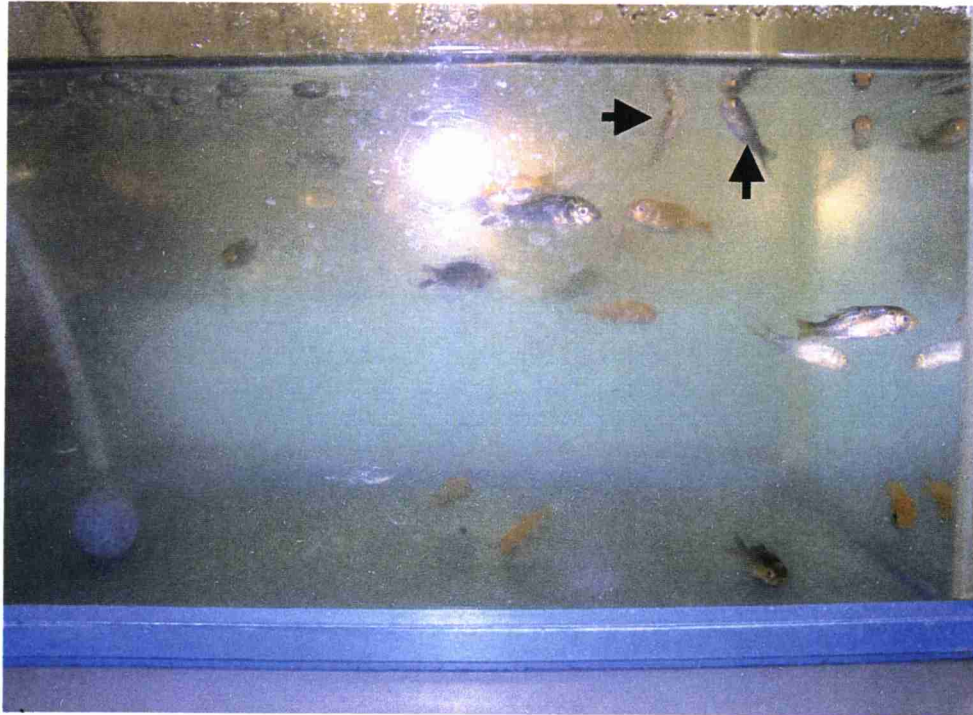


Fig.12 Behavior of carp experimentally infected with CEV at 20°C.

←: surfacing

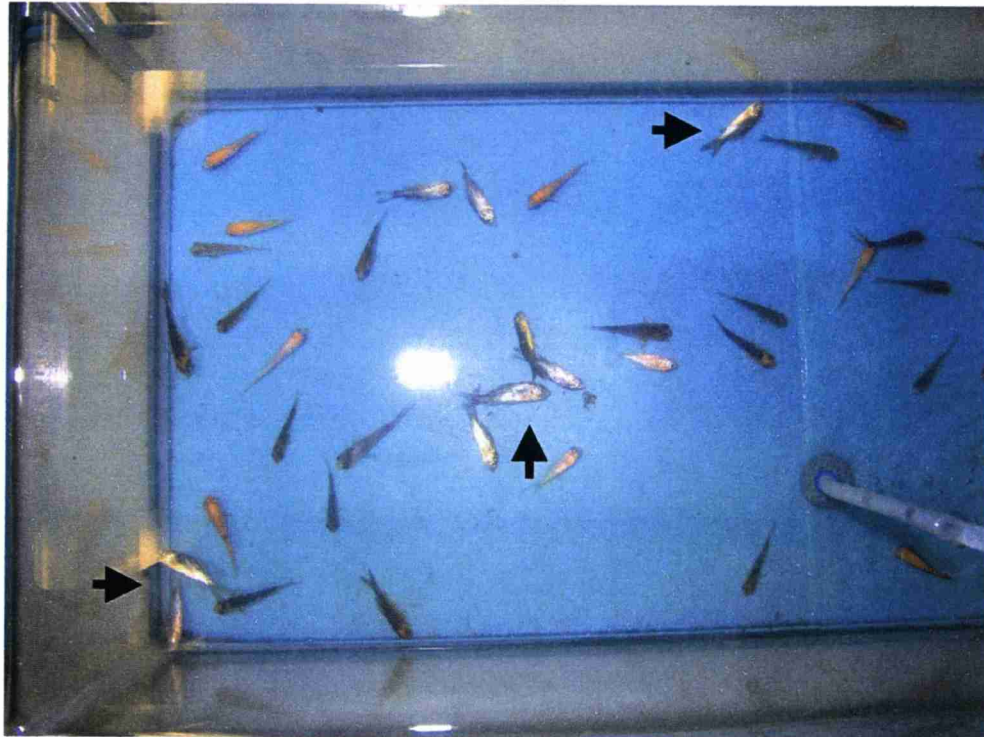


Fig.13 Behavior of carp experimentally infected with CEV at 11°C. Affected fish(↓) lied on the bottom of aqualium, but they have not died yet and alive several days more.

第3節 浮腫症病魚と眠り病病魚の組織学的比較

本章第2節にて、コイにCEVを感染させた後の飼育温度により20℃付近では浮腫症の症状を、10℃付近では眠り病の症状を示し、これまで別の疾病と考えられていた浮腫症と眠り病が、CEVの感染によるものであることが明らかとなった。しかしながら病名の由来通り、両者が示す症状には違いがあり、それを説明するには病理組織学的検討が必要である。

本節では、本章第2節において20℃区と11℃区の死亡直前の個体をホルマリンで固定し、病理組織学的に比較した。

材料と方法

〈供試魚〉

本章第2節の実験の中で20℃接種区で浮腫症の症状を示した死亡直前の個体、及び11℃または8℃接種区の個体で眠り病の症状を示した死亡直前の個体を10%リン酸緩衝中性ホルマリン液にて固定し、10%EDTA (pH7.2) で2週間脱灰した。

〈組織切片作製〉

脱灰後の個体を常法に従ってパラフィン切片を作製した。その後、H&E染色を行い、検鏡した。

結果及び考察

鰓において、20℃感染では鰓上皮細胞の浮腫、鰓上皮細胞の増生が観察された(Fig.14 A)。一方11℃感染においては、20℃と比較すると軽微ではあるが、同様の変化が観察された(Fig.14 B)。CEVは体表上皮細胞にも感染し、体表のスポンジ化が観察されるが、11℃感染においても観察された(Fig.15)。脳組織においては、両個体とも脳浮腫を起こしていたが、眠り病の症状を示していた個体の方が重度であり、脳室内に蛋白性と思われる液体の過度の貯留により、脳が圧迫され眠り症状に至った可能性が考えられた(Fig.16)。親松(1996)によれば、浮腫症の病理組織学的変化として腭外分泌細胞の細胞内空胞形成、腎および脾臓における赤血球の貪食、後部消化管管腔内にエオシン好性の変性細胞の存在等が観察されるが、本実験で用いた個体では全く観察されなかった。

脳浮腫の定義として、最新内科学大系(1996)によれば、血液脳関門の破綻を主因とする血管原性浮腫と、 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ポンプの障害による細胞障害性浮腫、髄液圧の

上昇により髄液が脳室周辺に濾出する間質性浮腫に区別されるが、今回観察された組織像は、間質性脳浮腫であると判断した。本章第 1 節において、CEV 感染個体の脳より CEV ゲノムが検出され、本節では CEV 感染個体の脳浮腫を明らかにしたが、これはウイルスが脳に感染した結果、脳浮腫を引き起こしたのではなく、ウイルス感染による 2 次的影響であると考えた。脳細胞において、ウイルス感染による核濃縮、クロマチンの辺縁化等は観察されず、両疾病とも塩水浴で治療可能であることから、脳浮腫はウイルス感染個体の浸透圧の低下による影響であると判断した。

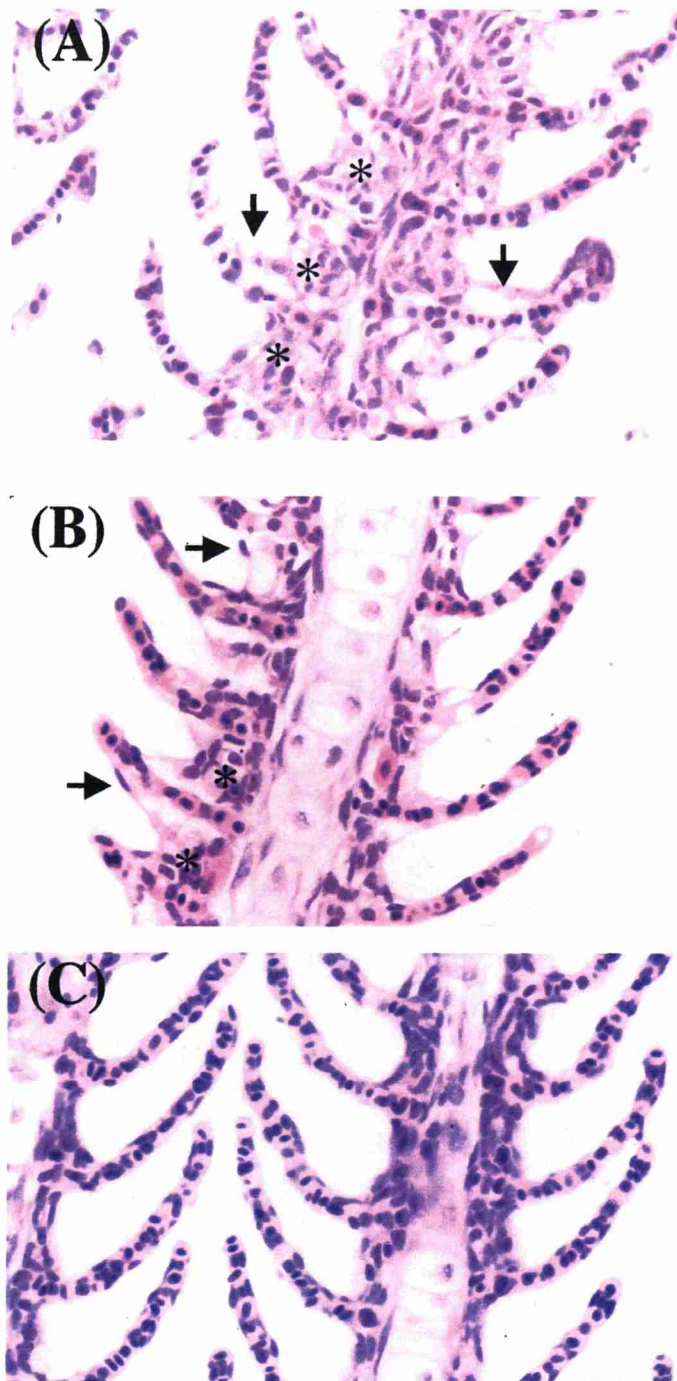


Fig.14 Gill of carp experimentally infected with CEV (H&E stain). In compare with control group(C), hyperplasia (※), edema of the secondary gill lamellae(↓) are observed in infected group (A:20°C, B:11°C).

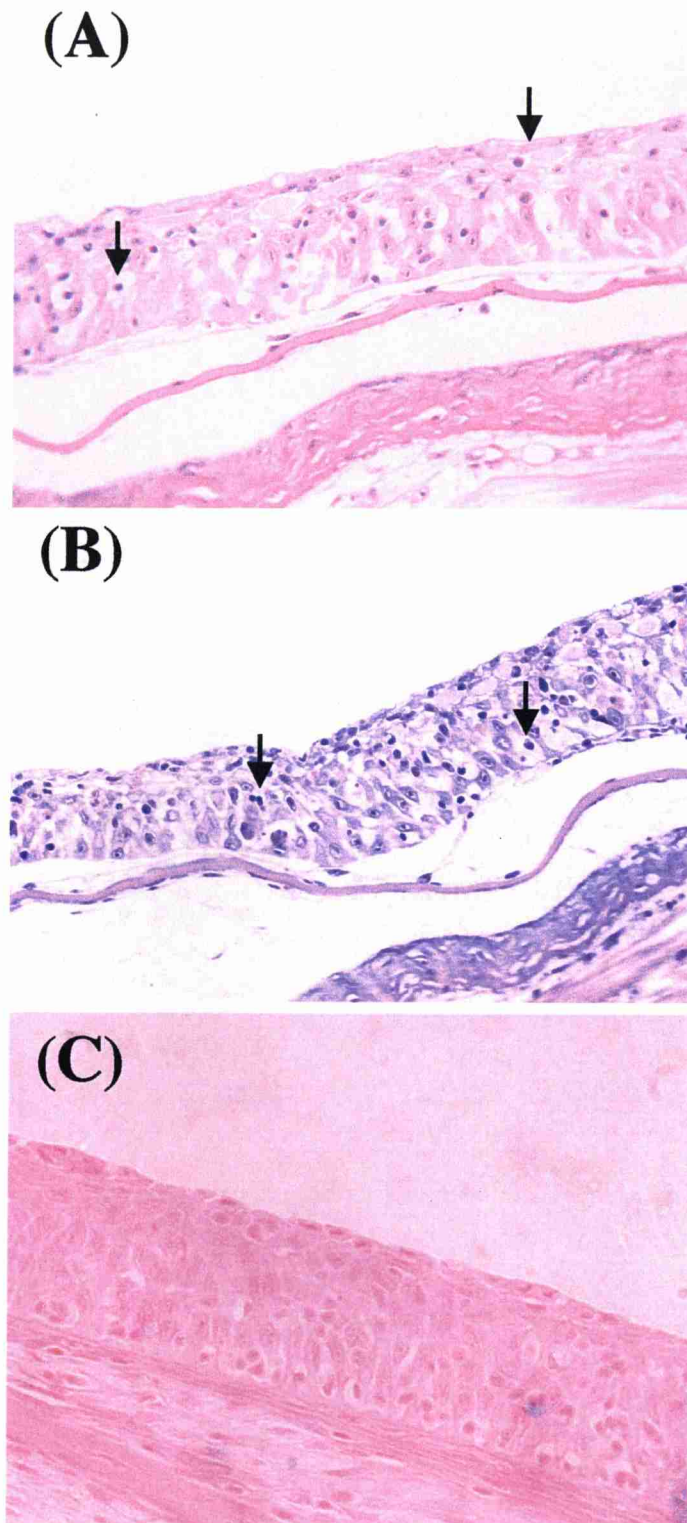


Fig.15 Skin of carp experimentally infected with CEV (H&E stain). In compared with control group(C), spongiosis (intercellular edema) and atrophy of epidermal cell (↓) are noted (A:20°C, B:11°C).



Fig.16 Brain of carp experimentally infected with CEV (H&E stain). In compared with control group(C), brain edema (↓) are observed in infected group (A:20°C, B:11°C).

第4節 CEV 感染耐過魚の CEV ゲノム長期保有の可能性

前節までに、冬季に発生する眠り病も、初夏に発生する浮腫症も CEV 感染症であることを明らかにした。両疾病とも感染源が特定されておらず、本症防除のためには感染環の解明が望まれるところである。

浮腫症に関しては、今までに垂直感染を疑わせる事実は見あたらないとのことである（新潟県内水面水産試験場 山田氏私信）。木村（1998）によって、フサカ、線虫等の水棲昆虫から CEV ゲノムが検出され、それら生物からの感染も疑われている。しかし、上記のごとく冬季に発生する眠り病も CEV 感染症であるは、浮腫症が発生したニシキゴイの個体群に長く CEV が保持され、冬季にそれら個体自身あるいはそれら個体から排出されたウイルスが新たな個体に感染する可能性があると考えるのが妥当である。

本節では、浮腫症および眠り病の感染環解明の一助とするため、2002 年 2 月の本学吉田実験実習場で発生し、塩水浴によって治療された眠り病耐過個体群におけるウイルス保有状況を 17 ヶ月にわたって追跡した。なお塩水浴後のこれら魚群では、疾病の再発は確認されなかった。

材料と方法

〈供試魚〉

本章第 1 節で実験に供試した魚群と同一の池で飼育され、塩水浴により回復した個体を毎月 5 尾 PCR 検査に供試した。

〈調査時期〉

2002 年では 4、5、6、7、9 月、2003 年では 6、9 月に調査した。

〈供試魚からの核酸抽出〉

供試魚からの抽出方法は本章第 1 節と同様に行ったが、検査臓器に関しては鰓、心臓、鰾、肝臓、腎臓、脾臓、腸、生殖腺、脳の 9 臓器を個体別に摘出し、核酸抽出を行った。得られたテンプレートを 100ng/ μ L に調整し、PCR 法に供試した。

〈Nested PCR 法〉

PCR 法は、親松（1996）によって開発された Nested PCR 法を用いた。本法は、

プライマーF1-R1 系で反応したものより 100 倍検出感度が高い方法である。

結果及び考察

Nested PCR の結果を Table 4, 5 に示す。疾病発生 2 ヶ月後の 2002 年 4 月においては、全ての個体の鰓で未だ陽性であり、臓器においても陽性反応が得られた。5 月以降の検査では CEV ゲノムが検出されない個体もあらわれたが、全てで陰性になることはなかった。発生から 1 年 7 ヶ月経過した 2003 年 9 月の個体でも CEV ゲノムを保有していたことから、疾病発病後塩水浴で治療したとしても、それら魚群は長期にわたりウイルスゲノムを保有していることが明らかとなった。また、CEV の保有検査に必ず用いられる鰓では陽性は得られないがそれ以外の臓器で陽性が得られた。この結果は、本症の感染環を調べる上で重要である耐過魚の CEV 保有検査や、他魚種の検査において鰓以外の臓器も行わなければならないことを示している。

一方、発生から 1 年以上経過した 2 歳魚の生殖腺において陽性が得られるようになった。しかも雄では全く CEV ゲノムが検出されないが (4 尾中 0 尾)、雌においては 6 尾中 5 尾においてゲノムが検出された。2003 年 6 月の検査に供試した個体においては、PCR 検査の前に魚体重 1kg に対して 10 mg となるようにハクレン脳下垂体を胸鰭基部に接種し、排卵、排精誘導を行った後に受精を行ったが、魚体が未熟なため未成熟卵が多く発眼せず稚魚を獲ることができず、生殖腺における CEV ゲノム保有魚より得られた稚魚の CEV 保有の有無については調べることができなかった。キンギョ造血器壊死症耐過魚においては、生殖液からウイルスゲノムが検出され、生殖液をキンギョに腹腔内接種すると死亡することから生殖腺には成熟ウイルスが存在し、垂直感染の可能性が示唆されている (山口, 2003)。本症においても垂直感染を調べるために、今回の受精は成功しなかったが、生殖能力が十分にある 3 歳魚以降で再度行い、生殖腺、特に卵巣に存在するゲノムが成熟ウイルスのものであるか調査する必要があるであろう。

Table 4 Results of CEV genome detection from carp which recovered from Nemuri disease

No.	4.2002					5.2002					6.2002				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
GL	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
SB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
SP	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
HT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HP	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IT	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
BR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GO	N	-	-	-		-	-	+	-	N	-	-	-	N	-

No.	6.2002					9.2002				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
GL	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
SB	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
BK	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HT	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
HP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IT	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
BR	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
GO	-	-	N	-	N	-	-	-	-	-

GL: gill SB: swim bladder BK: body kidney SP: spleen HT: heart
 HP: hepatopaneas IT: intestine BR: brain GO: gonad
 + : PCR positive - : PCR negative N: not tested

Table 5 Results of CEV genome detection from carp which recovered from Nemuri disease

No.	6.2003					9.2003				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
GL	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-
SB	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
BK	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
SP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HT	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
HP	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
IT	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
BR	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
GO	+ ^{*1}	- ^{*2}	+ ^{*1}	- ^{*2}	- ^{*2}	+ ^{*1}	- ^{*1}	+ ^{*1}	- ^{*2}	+ ^{*1}

GL: gill SB: swim bladder BK: body kidney SP: spleen HT: heart
 HP:hepatopancreas IT: intestine BR: brain GO: gonad
 + : PCR positive - : PCR negative *1:ovary *2:testis

総合考察

ウイルス性コイ浮腫症は、1974 年に発生してから長年にわたって病原体が明らかにされていなかったが、発生当時から 0.5% 塩水浴が顕著な治療効果を示していた（細谷・鈴木, 1975 ; 村上ら, 1976, 1977）。親松（1996）により、コイの鰓薄板上皮に感染するボックスウイルス様粒子によって疾病が引き起こされることが明らかにされ、本症はウイルス感染症にもかかわらず塩水浴が唯一の治療法であった。従来魚類に対する塩水浴の効果は、寄生虫症においては塩水浴により魚体から粘液を放出し、付着している寄生虫を除去することが知られており、一部の細菌性疾病においては塩水により菌の増殖は阻害させないが付着能を阻害することによってもたらされることが明らかにされているが（Altinok, I. and J. M. Grizzle, 2001a ; Altinok, I. and J. M. Grizzle, 2001b）、ウイルス性疾病における塩水浴の効果はほとんど報告例がない。畑（1996）は塩水とウイルスとの関係を調査し、0.5% 塩水によりウイルスは若干は失活するが、3% 塩水でも完全には失活しないことを明らかにし、本症に対する塩水浴の効果は病魚の生理的変化を改善することであると考えた。本症病魚の血液学的研究はすでに自然発病魚で行われていたが（須貝, 1985 ; 須貝・守屋, 1985）、著者は制御された環境における実験感染において経時的に病態生理を調査することにより塩水浴の病魚に対する効果を知ることができ、またそれによって本症病魚の死因の特定にも繋がるのではないかと考えた。そこで修士研究の中で、ウイルスを感染させたコイの血液性状を経時的に調べ、Ht 値及び乳酸値の上昇、浸透圧の低下、赤血球の膨張等を明らかにし、病魚が酸素不足、浸透圧低下に陥っていることを示唆した。また、これら生理的変化が 0.5% 塩水浴を行うと翌日には全てが回復しているという結果も得た。塩水浴により浸透圧が回復することは、低下した浸透圧を強制的に上昇させるために正常に戻るものと推察できた（瀬野, 1999）。しかし、酸素不足が塩水浴により回復することに関しては説明するには至っていない。この部分がまだ未検討であり、これを明らかにすることは死因解明の一助にもなると考えた。

一方、病原体の感染経路解明は防除確立に欠かせない。浮腫症においては木村（1998）によって、水棲昆虫が感染源としての関与の可能性を示唆しているが、未だ解明されるには至っていない。最近になってニシキゴイの眠り病病魚の鰓より CEV ゲノムが検出された。このことは、浮腫症感染耐過魚が冬季に何らかの影響でウイルスを放出、また眠り病耐過魚が梅雨時期にウイルスを放出し、非感染個体へのウイルス伝播が生じ、コイ自身で感染

環が完結している可能性が考えられた。CEV の感染環を解明するためにも、眠り病が CEV 感染によって引き起こされているか明らかにする必要がある。

本研究では、ウイルス性コイ浮腫症の未解明部分である死因及び本症と眠り病との関連性に関する研究を行い、死因及び塩水浴治療のメカニズムを明らかにし、感染環解明の一助となる本症と眠り病との関連性を示した。以下にその概要を要約する。

1. ウイルス性コイ浮腫症発病魚の 0.5% 塩水浴の治療メカニズム

CEV を感染させ、Ht 値が上昇したコイに塩水浴を施し、経時的に血液性状の変化を調べたところ、浸透圧におよび Ht 値に関しては 1.5 時間後に、酸素不足を示す乳酸値は 6 時間後には回復することが明らかとなった。通常、浮腫症病魚に塩水浴を行うと、劇的な効果を示すが、これは塩水浴の即効性によるのもであった。また塩水浴により浸透圧と Ht 値がまず回復し、遅れて酸素不足が解消されており、回復には順序があることが明らかになった。他の実験において CEV 感染魚の MCHC が低下していたことから、病魚の Ht 値の上昇は赤血球の膨張に起因する。従って浸透圧の回復によって膨張していた赤血球が正常な形態に戻り病魚の血流が回復し、各組織に酸素が十分行き渡り、嫌気性代謝から好気的代謝へと移行し乳酸が分解され、酸素不足が解消され、病魚は生残すると推察された。

またこれまで本症に対する塩水処理では、並塩が用いられてきた。並塩は NaCl 以外にも多くの物質(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 等)が含まれているので、並塩と試薬特級の NaCl を用いて浮腫症病魚の死亡率を比較したところ、両者に違いは見られなかった。このことから、NaCl の補充、すなわち体液浸透圧の回復が本症治療に対して有効であることが考えられた。この結果は本症治療メカニズムの推察を支持するものである。

2. ウイルス性コイ浮腫症の死因の推定

本研究では、本症における塩水浴の治療メカニズムとして、病魚に塩水浴を行うことによりまず浸透圧が回復し、これにより膨張した赤血球が同時に回復し (Ht 値の低下)、続いて酸素不足が解消され (乳酸値の低下)、生残すると推察した。このことから、コイの鰓および体表の上皮細胞に CEV が感染し、それら細胞が損傷を受け、一部は組織から脱落し、体内と外界を隔てる機能を失うことにより、無機イオンの流出が生じ病魚の浸透圧が低下する。これによって二次的影響として、赤血球が膨張し血液循環不全に陥り酸素不足になると推定された。

3. ウイルス性コイ浮腫症と眠り病との関連性

最近になって、ニシキゴイの眠り病病魚の鰓より CEV ゲノムが検出されたため、浮腫症と眠り病との関連性を調査した。まず、冬季に発生したニシキゴイで眠り病と思われる自然発病魚に関して PCR 法で CEV ゲノムの検出を試みたところ、全ての個体で CEV ゲノムが検出され、CEV 感染症が疑われた。そのため、低温下による感染実験を行い、感染の成立と発症の有無を調べた。その結果、CEV は 10℃付近でも十分に感染性を示し、11℃以下では死亡した個体全てが眠り病の症状を示し、これら全個体から CEV ゲノムが検出された。さらに、眠り病の症状が見られた時の飼育水（11℃）を健康なコイのいる水槽に導入し、20℃で飼育すると浮腫症の症状が、10℃付近では眠り病の症状が示された。そして、眠り病の症状を示した個体と浮腫症の症状を示した個体との病理組織を比較したところ、鰓においては、両個体とも二次鰓弁の浮腫、鰓上皮細胞の増生が観察されたが、眠り病の方が軽微であった。体表においては、両個体とも上皮層のスポンジ化が観察された。眠る症状は脳神経系が障害を受けていることが予想されたため、脳を観察した結果、両個体とも脳浮腫が確認されたが、眠り症状を示した個体の方が重度であった。他の臓器においては両者に違いは見られず、正常魚と同様であった。これらのことから、浮腫症と眠り病は、CEV 感染によって発生し 20℃付近では浮腫症が、10℃付近では眠り病の症状になることが明らかとなり、飼育温度によって症状が異なることを明らかにした。

また、自然発病した眠り病魚を塩水浴により治療し、経時的に CEV ゲノム保有の調査を行ったところ、1 年 7 ヶ月にわたって CEV ゲノムが検出されたが、特定の臓器には存在しなかった。また生殖腺においては 2 年魚の卵巣にのみ高頻度にウイルスゲノムを保有していた。このことから、本症において水棲昆虫を媒介せずにコイのみで感染環が完結している可能性が考えられた。

魚類感染症において眠るといった症状はニシキゴイの眠り病の他に、粘液胞子虫であるミクソボラス (*Myxobolus sp.*) の脳内感染によるアマゴの眠り病、アルファウイルス科に属する Sleeping Disease Virus または Salmon Pancreas disease Virus の筋肉、心臓、脾臓への感染によって生じるサケ科魚類の Sleeping disease syndrome がある (Boucher et al., 1996 : Jonathan et al., 2002)。本研究における浮腫症病魚と眠り病病魚との病理組織学的比較において、両個体で脳浮腫を確認した。眠り病病魚の方が重度であったことから、眠るといった症状は脳浮腫により脳が圧迫され、運動能力に支障をきたし生じていることが考えられ

た。脳浮腫を生じる原因としては、PCR 検査や魚体内のウイルス濃度検査、さらに組織学的にも見て、ウイルス感染による直接的な変化ではなく、浸透圧の低下による二次的変化であると考えられる。

本研究では、浮腫症の未解明部分である死因及び塩水浴治療のメカニズム、本症と眠り病との関連性に着目して研究を行った。本疾病の治療法が確立していたため、どういうメカニズムで病魚が治癒していくかの観点から死因及び塩水浴治療のメカニズムを推察した。また本病原体の標的器官が鰓及び体表上皮細胞のみであることも解明の一助となった。そして CEV 感染耐過魚が長期にわたってウイルスゲノムを保有していることが明らかとなった。このことは、浮腫症耐過魚が眠り病の、また眠り病耐過魚が浮腫症の感染源になる可能性を想起させるものである。防除の観点から採卵時には卵消毒を行い、感染耐過魚と非感染魚を接触させないことが必要であろう。

実験の部

(1) 本研究で行った実験方法

【接種源の調製】

〈供試魚〉

本研究室で採卵、孵化、育成した SPF マゴイ（平均魚体重 1.2 g 及び 1.45 g）を供試した。

〈接種源の調製〉

ウイルス接種は浸漬法を用いた。2L 容ディスポーザブルカップに飼育水を 500mL 入れたものを 2 つ用意し、その中にコイ稚魚（240 尾及び 186 尾）を収容した。ウイルス接種には、畑により人為感染発病魚の鰓より調製した組織ホモジネートで、約 1 年間-80℃に保存されていたウイルス液（畑, 1996）を用いた。飼育水に対して 10^{40} 濃度となるようにウイルス液を入れ、エアレーションを行いながら 1 時間浸漬接種を行った。接種時の水温は、22.0℃であった。接種後、18L 容の水槽を 2 つ用意し、その中に浸漬液と共に供試魚を移し、エアレーションを行いながら無給餌、無換水で飼育を行った。飼育期間中の水温は、21.2～22.4℃であった。飼育中、それぞれ供試魚の死亡率が約 40% になった時点で生残魚を回収し、一旦-80℃にて保存した。解凍後、鰓組織を摘出し、鰓重量を測定、その後、乳鉢、乳棒で磨砕した。磨砕後、鰓重量に対して 10 倍希釈となるように Hepes 緩衝 Eagle's minimum essential medium で希釈を行い、1500×g、10 分、4℃で遠心を行った。この上清を接種源とし、S1 バイアルに 0.5mL ずつ分注し、実験に供試するまで-80℃にて保存した。

【血液性状測定方法】

〈Ht 値〉

ヘマトクリット毛細管を用いて、ヘマトクリット毛細管専用遠心器にて 12000rpm、5 分間の遠心を行い、血球層と血漿に分離した。その後、ヘマトクリットリーダーにて Ht 値を測定した。

〈浸透圧〉

浸透圧の測定には、氷点降下法を用いた。全血を遠心し得られた血漿は、新鮮な蒸留水で 5 倍または 10 倍希釈し、浸透圧計にて測定した。

〈乳酸値〉

乳酸の測定には、乳酸測定用キット（デタミナーLA）を用いた。血漿5 μ Lと前処理液200 μ Lを混ぜ、37℃で3分間加温した。その後酵素液200 μ Lを加え、37℃で4.5分間加温した。加温後、分光光度計にて波長600nmの吸光度で測定し乳酸値を算出した。なお前処理液、酵素液は、使用説明書に従い、キット付属の試薬を調製した。

【PCR法】

核酸抽出及びPCR反応に用いるDWは、全てミリQ水（二次蒸留水を超純水製造装置で処理したもの）である。

〈核酸抽出〉

核酸抽出は、臓器を摘出しDW 500 μ L、10%SDS 16.6 μ L、10mg/mL プロテイナーゼ K 1 μ Lを加え、55℃で加温し、プロテイナーゼ K 処理を行った。処理後、250 μ LのP溶液（Tris飽和フェノール溶液）、250 μ LのCI溶液（クロロホルム：イソアミルアルコール=24：1）を加え、転倒混和後5分間静置した。静置後、20400 $\times$ g、10分間遠心を行い、上清を回収した。この作業をもう一度行い、回収した上清に3M酢酸ナトリウム50 μ Lを加え攪拌し、その後100%エタノールを800 μ L加え、-80℃にて15～30分間静置した。静置後、20400 $\times$ g、20分間遠心を行い、核酸を沈殿させた。遠心後の上清を除去し、このチューブに70%エタノールを加え、20400 $\times$ g、5分の遠心を行い、核酸を洗浄し、50 μ LのDWでペレット化した核酸を再懸濁した。これをテンプレートとして、PCR反応を行うまで-20℃に保存した。PCRに供試する前に、吸光度を測定し、核酸量を100ng/ μ Lに調整し、PCR反応を行った。

〈PCR法〉

宝酒造株式会社 *rTaq* DNA polymerase に付属している 10 $\times$ PCR buffer、dNTP mixture、MgCl₂、プライマーには増幅産物が548bpとなるF1（5'-GCTGTTGCAACCATTTGAGA-3'）プライマーとR1（5'-TGCAGGTTGCTCCTAATCCT-3'）プライマーを用い、臓器より抽出したテンプレート、DWを混合し、計10 μ Lで反応を行った。プライマー濃度は、4 μ mol/tubeで反応を行った。反応サイクルは、親松(1996)に従い、94℃、2分を1サイクル、60℃を1分、72℃を1分、94℃、0.5分を35サイクル、60℃を2分、72℃、5分を1サイクル行った。反応後、2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、EtBr(エチジウム・ブロマイド)染色を行い、紫外線下で観察した。

〈Nested PCR〉

本研究で行った Nested PCR は、一旦 F1-R1 系で反応を行った後、それをテンプレートとして F1-R1 領域内側の 181bp を増幅する F2 (5'-GCTGCTGCACTTTTAGGAGG-3') プライマーと R2 (5'-TGCAAGTTAT-TTCGATGCCA-3') プライマーを用いて反応を行った。Nested PCR で得られる増幅産物は 181bp (F2-R2) であるが、これ以外にも 248bp (F2-R1)、481bp (F1-R2)、548bp (F1-R1) の増幅産物が得られる。反応サイクルは通常の PCR と同様である。Nested PCR は、通常の PCR に比べると、100 倍検出感度が高い。なお、positive control には、他の感染実験で得た死亡個体の鰓より抽出したサンプル、negative control には、他の実験で得た非接種区の鰓より抽出したサンプルを用いた。

〈組織切片作製〉

臓器に対して 30~50 倍となるようにリン酸緩衝中性ホルマリンにて 1 週間以上組織を固定した。その後、5%EDTA 溶液(pH 7.0)で 1 日 1 回液替えを行い約 1 週間脱灰した。その後、自動包埋器にてアルコール系列 (70~100%アルコール) で脱水後、キシレンに置換し、パラフィンで包埋した。その後、ミクロトームにて厚さ 4 μ m で切片を作製した。作製した切片を脱パラフィン、親水化処理を行い、ヘマトキシリンで 10 分間染色を行い水洗後、エオシンで 1 秒間染色を行いアルコールにて脱水処理し、キシレンに置換後ビオライトにて切片を封入した。その後、顕微鏡下にて観察を行った。

(2) 本研究で用いた試薬、実験器具及び実験機器

【試薬】

- ・ デタミナーLA : 協和メデックス株式会社
- ・ PCR 反応液 : 宝酒造株式会社
- ・ PCR Markers, 100bp ladder : Novagen
- ・ 並塩 : ナイカイ塩業 KK
- ・ 試薬特級 NaCl : 国産化学株式会社

【試薬の調製法】

〈組織切片作製〉

- ・ 10%リン酸緩衝中性ホルマリン
DW に $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 123 g、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 4.5g 加え 900 mL とし、これに 100 mL のホルマリン原液(37%)を加えた。

- ・ 脱灰液 (10% EDTA 溶液)
EDTA $\cdot 2\text{Na}$ を最終濃度 10%となるように DW に溶解する(pH 7.0)。

〈PCR 反応に用いた試薬の調製法〉

- ・ 10%SDS
ドデシル硫酸ナトリウムを最終濃度が 10%となるように DW に溶解させた。
- ・ プロテインアーゼ K 溶液
プロテインアーゼ K 溶液 (BOREHRINGER MANNHEIM 製) を用いた。
- ・ Tris 飽和フェノール溶液 (P 溶液)
フェノール (WAKO 製) 500g に 0.5g の 8-キノリノール (WAKO 製) を加え、50℃で溶解した。等量の TE (pH8.0) を加え、よく攪拌後静置した。水層とフェノール層が分かれたら、上層の TE を捨てる。この作業を 3 回行い、フェノールに TE を飽和させた。最後に、フェノールの酸化を防止するために TE を重層させ、4℃に保存した。
- ・ TE 溶液
1M Tris-HCl (pH8.0) 2mL と、0.5M EDTA (pH8.0) 0.4mL を最終量 200mL となるように DW で調製し、室温に保存した。

- ・CI 溶液

クロロホルム（和光純薬工業）とイソアミルアルコール（国産化学）を 24 : 1 で混合し、常温で保存した。

- ・3M 酢酸ナトリウム

40mL の DW に酢酸ナトリウム（国産化学）を 16.3g 加えて、3M 酢酸ナトリウムとした。

- ・10×TBE buffer

Tris-Base 104g、ホウ酸 55g、0.5M EDTA (pH8.0) 40mL を蒸留水 1L に溶解し、10×TBE buffer とした。使用時に 10 倍希釈して用いた。

- ・2%アガロースゲル

アガロース（SIGMA）を TBE buffer に最終濃度が 2%となるように加え電子レンジ等で加温、溶解し、型に流し込み 2%アガロースゲルとした。

- ・エチジウム・ブロマイド (EtBr) 溶液

10 mg/mL EtBr 溶液（和光純薬株式会社）を最終濃度 0.5 μ g/mL となるように TBE 溶液で希釈した。

【実験器具】

- | | |
|-------------------|----------------------|
| ・ヘマトクリット毛細管（ヘパリン） | : テルモ株式会社 |
| ・ヘマトクリット リーダー | : TOMY SEIKO CO.,LTD |
| ・スライドガラス | : MATSUNAMI |
| ・カバーガラス | : MATSUMANI |

【実験機器】

- | | |
|------------------|--------------------------|
| ・ヘマトクリット毛細管専用遠心器 | : TOMY HC-12A |
| ・浸透圧計 | : VOGEL Osmometer OM-801 |
| ・分光光度計 | : BECKMAN DU 640 |
| ・微量遠心器 | : TOMY MC-150 |

- ・サーマルサイクラー : ABI GeneAmp PCRSystem-9700
- ・電気泳動槽 : Mupid
- ・紫外線照射器 : TS-15 UVP, INC

謝辞

本研究を遂行するに当たり、終始寛大にご指導、御鞭撻してくださいました水族病理学研究室教授 福田穎穂博士に厚く御礼申し上げます。また、研究を進める上で終始有益かつ適切なご指導とご助言を頂いた同研究室助教授 羽曾部正豪博士ならびに坂本崇博士に心より感謝いたします。さらに厳密なる校正を賜った先端魚類防疫講座教授 延東 真博士ならびに同講座助教授 舞田正志博士にお礼申し上げます。本学吉田実験実習場技官 保田義弘氏ならびに同場技官 原川昭宏氏には供試魚の分与および実習場の設備を使わせて頂き、深く感謝いたします。本学先端魚類防疫講座助教授 舞田正志博士には、著者が博士前期課程在籍時から魚類病態生理学に関して教授して頂き、特に期して謝意を表します。最後に常に議論に加わり、貴重な助言を惜しまなかった本研究室の先輩諸氏と大学院生ならびに学部学生、特に松岡悠介君、日吉大貴君に対し深く感謝いたします。

引用文献

- Altinok, I. and J. M. Grizzle (2001a) : Effects of salinity on *Yersinia ruckeri* infection of rainbow trout and brown trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, **13**, 334-339.
- Altinok, I. and J. M. Grizzle (2001b) : Effects of low salinities on *Flavobacterium columnare* infection of euryhaline and freshwater stenohaline fish. *Journal of Fish Disease*, **24**, 361-367.
- Ariel Ronen, A. Perelberg, J. Abramowitz, M. Hutoran, S. Tinman, I. Bejerano, M. Steinitz and M. Kotler (2003) : Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*, *Vaccine*, **21**, 4677-4684.
- 網田健次郎・大江貢弘・的山央人・山口典子・福田穎穂 (2002) : 新潟県下の養殖ニシキゴイにおけるコイヘルペスウイルス (KHV) および浮腫症ウイルス (CEV) の調査, *Fish pathol* **37**(4), 197-198.
- Boucher, P., and F. Baudin (1996) : Sleeping disease and pancreas disease: comparative histopathology and acquired cross-protection. *J. Fish Dis.* **19**, 303-310.
- 畑直亜 (1996) : コイ浮腫症病原体の疫学的検証と塩水浴治療に関する基礎的研究, 東京水産大学修士論文.
- 細谷久信・鈴木三也 (1975) : 梅雨期に発生し、且つ大量斃死を伴う錦鯉稚魚の疾病に対する食塩水浴の効果 (速報) , 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, **4**, 69-70.
- Jonathan Weston, S. Villoing, M. Bremont, J. Castric, M. Pfeffer, V. Jewhurst, M. McLoughlin, O. Rodseth, K. E. Christie, J. Koumans, and D. Todd (2002) : Comparison of two aquatic alphaviruses, salmon pancreas disease and sleeping disease virus, by using genome sequence analysis, monoclonal reactivity, and cross-infection, *J. Virol*, **76**(12), 6155-6163.

木村弘毅 (1998) : コイ浮腫症の感染環に関する基礎的研究, 東京水産大学修士論文.

木下真男 他著 (1996) : 最新内科学大系 第71巻 -ミオパチー-, 中山書店, 42.

村上恭祥・下中元信・利田舜史・松里寿彦 (1976) : コイ稚魚の大量死に関する-浮腫をと
もなう大量死について-, 昭和 50 年度病害研究報告書 , 広島県淡水魚指導所研究報告増
刊, 19-33.

村上恭祥・根本 半 (1982) : 魚病および薬害, 「ニシキゴイ養殖技術に関する近年の知
見と問題点[水産増養殖叢書 31], 鈴木 亮編, 水産資源保護協会, 東京」, 103-124.

親松剛 (1992) : コイ稚魚浮腫症 (仮称) に関する基礎的研究, 東京水産大学修士論文.

親松剛 (1996) : コイの浮腫症に関する研究, 東京水産大学博士論文.

Oyamatsu, T., N. Hata, K., Yamada, T. Sano and H. Fukuda (1997) : An etiological study on mass m-
ortality of cultured colorcarp juveniles showing edema. *Fish Patho.* **32**(2), 81-88.

佐野徳夫・福田穎穂 (1992) : コイ乳頭症ならびに稚魚期の不明病に関する研究, 茨城県
内水面水産試験場調査研究報告, **28**, 69-109.

瀬野龍一郎 (1997) : コイのウイルス性浮腫症の病態生理学的研究, 東京水産大学修士論
文.

須貝憲明・小池利通 (1980) : 梅雨期に発生するニシキゴイ 0 年魚の大量斃死に関する 2, 3
の知見-感染実験-, 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, **8**, 58-63.

須貝憲明 (1985) : 梅雨期に発生するニシキゴイ稚魚の急性な大量死のヘマトクリット値
の変化, 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, **12**, 59-61.

須貝憲明・守屋義秀 (1985) : 食塩浴によるニシキゴイ稚魚の血しょうナトリウム・カリウムおよび塩化物量の変化, 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, **12**, 51-58.

山口典子 (2002) : キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症の感染環に関する研究, 東京水産大学修士論文.

山田和雄 (1994) : ニシキゴイの浮腫症、眠り病などに関する研究, 新潟県内水面試験場事業報告, 68-71.

Ryuichiro, Seno, N. Hata, T. Oyamatsu and H. Fukuda (2003) : Curative effect of salt water treatment on carp, *Cyprinus carpio*, infected with carp edema virus (CEV) results mainly from reviving the physiological condition of the host. *SUISANZOSHOKU*, **51**(1), 123-124.

W. Ahne, H. V. Bjorklund, S. Essbauer, N. Fijan, G. Kurath, J. R. Winton (2002) : Spring viremia of carp (SVC). *Dis Aquat Org*, **52**, 261-272.

参考文献

A.D.Pickering (1981) : STRESS AND FISH, ACADEMIC PRESS, 103-120.

赤尾信吉 他著 (1984) : 月刊 MEDICAL TECHNOLOGY 別冊 染色法のすべて, 医歯薬出版株式会社, 2-7.

David H.Evans (1998) : The Physiology of Fishes –Second Edition, CRC press, 101-127.

池田彌生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎 (1986) : 魚類血液図鑑, 緑書房, 238-323.

板沢靖男・小栗幹郎・田村保・羽生功 (1991) : 魚類生理学概論, 恒星社厚生閣, 34-62, 104-127.

板沢靖男・羽生功 編 (1991) : 魚類生理学, 恒星社厚生閣, 35-65, 125-150.

尾崎久雄 (1968) : 魚類生理学講座 I, 緑書房, 1-118.

中山広樹・西方敬人 (1996) : バイオ実験イラストレイテッド ①分子生物学実験の基礎, 秀潤社.

中山広樹 (1996) : バイオ実験イラストレイテッド ③本当にふえる PCR, 秀潤社.