

ウイルス性出血性敗血症

VHS : Viral Hemorrhagic Septicemia

1. 疫学

(1) 病名と病原体

① 病名：ウイルス性出血性敗血症

英名：Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS)

本病はいろいろな名前で知られており、エグトベド (Egtved) 病や伝染性腎臓腫脹・肝臓変性病 (INuL) とも呼ばれる。

② 病原体：VHS ウイルス (写真 1)

ラドウイルス科に属する。VHSV には 3 つのサブタイプが知られている。ウイルスの系統により病原性の強さに変異のあることが報告されている。VHSV は血清型は一つであるが、ポリクローナル抗体および単クローン抗体による中和反応の結果から 3 つのサブタイプに分けられる。また、VHSV は分離される地域と関連する 4 つの主な遺伝子型に分けられる。

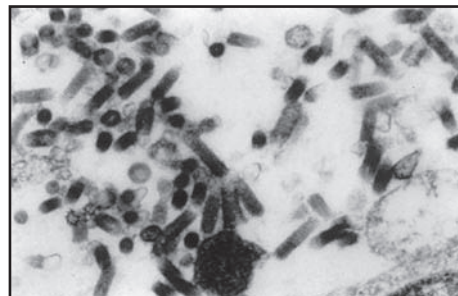


写真 1 VHS ウイルス粒子の電子顕微鏡像。本ウイルスはラドウイルス科に属し、弾丸型を呈する。
(J. R. Winton 博士提供)

(2) 発生地域

VHS はヨーロッパ大陸の大部分の国において、サケ科魚類を中心に風土病的に発生しており、スウェーデンやフィンランドのニジマスでも報告されている。VHSV は、アメリカ合衆国ワシントン州のピュージェットサウンド水域のマスノスケやギンザケ、アラスカ湾およびカナダの太平洋沿岸のタイヘイヨウニシンやタイヘイヨウタラからも分離されている。また、日本においても 1996 年に養殖ヒラメにおいて初めて VHS が発生し、それ以降、養殖ヒラメを中心にほぼ毎年発生している。

(3) 宿主域

ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*)、ブラウントラウト (*Salmo trutta*)、グレイリング (*Thymallus thymallus*)、ホワイトフィッシュ (*Coregonus* sp.)、パイク (*Esox lucius*)、ターボット (*Scophthalmus maximus*) などで報告されている。近年では太平洋の北米沿岸のマスノスケ (*O. tshawytscha*)、ギンザケ (*O. kisutch*)、タイヘイヨウニシン (*Clupea pallasii*)、タイヘイヨウタラ (*Gadus macrocephalus*)、北大西洋およびバルチック海のタイセイヨウタラ (*G. morhua*)、など 10 種類以上の野生の海産魚からも VHSV が分離されている。血清学的には野生の海産魚から分離した株と淡水魚から分離した株との区別ができない。また、太平洋産のサケ、タラ、ヒラメ類から検出される VHSV は、ニジマスに対する病原性が弱いという遺伝的特徴をもつ。日本においては、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)、マアジ (*Trachurus japonicus*)、イカナゴ (*Ammodytes personatus*)、メバル (*Sebastes inermis*)、タケノコメバル (*S. oblongus*)、マダイ (*Pagrus major*) から分離されている。

(4) 発生の特徴

VHSV は、あらゆる年齢の魚にも容易に伝染し、感染後の生残魚は長期間ウイルスキャリアになる。本ウイルスは、鰓を通して魚に侵入すると思われる。VHSV の感染源は、養殖魚や野生魚中の顕性感染魚ならびに不顕性キャリアである。VHSV は糞、尿、生殖液中からも検出されるが、ウイルスが最も大量に存在するのは腎臓、脾臓、脳、消化管である。一旦、VHSV がある養殖魚群ないしは水系に定着すると、キャリアのために本病は地方病的流行をするようになる。

VHSV に対する感受性は、同一魚種においても異なり、若齢魚ほど顕性感染を受けやすい。本病の発生には水温が大きく関与し、一般に低水温 (1~5℃) では、日間死亡率は低いが累積死亡率は高く、高水温 (15~18℃) では、急激な死亡を示すが累積死亡率は高くない。VHS は年間を通して発生するが、特に水温が上昇したり、不規則に変化する春に多く発生する。

(5) 症状

感染魚には様々な症状や病理組織学的変化がみられる。激しい症状を示すものもあるが、ほとんど正常にみえるものもある。歴史的に VHS の病状および組織学的変化は、急性、慢性および潜伏型に分類されてきた。これらの記載は、本病の進行状況や過程ではなく、症状の激しさの程度を表している。病魚には遊泳不活発や異常遊泳がみられる。外観症状としては、眼球突出、腹部膨満、貧血、および眼球・皮膚・鰓・鰭基部の出血がみられる (写真 2)。剖検すると、腹膜・腸管膜・内臓脂肪組織の広範囲の出血、腎臓と肝臓の充血・腫脹・褪色、骨格筋の点状出血 (写真 3) などがみられる。病理組織学的変化は、一般に肝臓、腎臓、脾臓および骨格筋に限定してみられ、肝臓、腎臓、脾臓においては壊死的変化、すなわち空胞化、核濃縮、核融解、リンパ球浸潤、時には封入体形成が局部的ないしは広範に起こる。腎臓および脾臓の造血組織に初期感染病巣が形成される。骨格筋においては、血液細胞 (主として赤血球) が筋束および筋繊維中にうっ滞するが、傷害はほとんど起こらない。



写真 2 VHS に冒されたニジマス。鰓と肝臓は褪色し、躯幹筋肉には出血点が観察される。限球突出もみられる。
(P. Ghittino 博士提供)



写真 3 VHS に罹病したニジマス。躯幹筋肉に強い点状出血がみられる。(ヨーロッパ魚病学会誌 Vol. 15, No. 4 増補版 "What should do?" より)

(6) 防除法

現在のところ、行政的防除手段を含む公的な健康監視計画の実施と遺伝的手法による選抜・属間雑種作出などによるほかはない。ワクチンは実験段階であり、実用には至っていない。

2. 試料採取

(1) 被検魚の収集

- ① 少なくとも 10 尾の瀕死魚または当該疾病の外観症状を示す生存魚を採取する。
- ② 被検魚の収集から採材までではできるだけ速やかに行うことが望ましく、できれば発生現場で臓器試料を摘出する。
- ③ 被検魚を検査機関まで輸送する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングし、水温変動に注意して搬送するか、検査対象魚を発生現場で即殺後、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に收容し、氷冷または冷蔵状態で 48 時間以内に搬送する。搬送の際、被検魚が凍結することのないよう注意する。
- ④ 被検魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール

袋などで密閉包装して氷冷または冷蔵状態で搬送する。

- ⑤ 臓器試料または被検魚には採取場所および日時を明記したラベルを添付する。

(2) 外観症状および剖検所見の記載

- ① 0.5% MS222(Tricaine; 3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate) などの麻酔剤で麻酔するか、または大型魚では撲殺する。
- ② 外観症状を記載する。
- ③ 魚体表面を70%アルコール綿またはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミ、ピンセットなどで解剖する(被検魚採取から遅くとも48時間以内に行う)。
- ④ 内臓の異常を調べ、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採取する。

(3) ウイルス検査のための臓器試料の採材

- ① 明らかに病徴を呈している魚
- (a) 全長4cm以下の仔魚
魚全体を試料とする。体表を消毒後、卵黄嚢がある場合は除去する。
- (b) 全長4cm~6cmの魚
腎臓を含む内臓全体を試料とする。
- (c) 全長6cm以上の魚
腎臓、脾臓および脳を試料とする。
- ② 病徴の見られない魚(不顕性感染が疑われる魚)
- (a) 未成熟魚
腎臓、脾臓および脳を試料とする。
- (b) 成熟親魚
上記の臓器の他に卵巣腔液*¹を試料とする。

*¹ 卵巣腔液は、必ず開腹前に滅菌したピペットなどで泌尿生殖孔より採取し、他の組織試料とは別の容器に入れる。サンプル量は5尾を1検体とし、合計で約1mL以内とする。

(4) ウイルス検査のための臓器試料/液体試料の一般的調製法

① 試料の輸送と抗生物質処理

プールした臓器または卵巣腔液は、ウイルス分離を行うまで滅菌したガラス容器に入れ、4℃に保存する。臓器試料は混入した雑菌の繁殖を抑えるため、抗生物質を添加した輸送液*²(少なくとも試料の5容量)の入ったガラス容器に入れて研究室に送ることもある。

*² 輸送液: イーグル最少必須培地(MEM)またはハンクス基礎塩類溶液(HBSS)に、ゲンタマイシン1000μg/mLまたはペニシリン800IU/mLとジヒドロストレプトマイシン800μg/mLの併用が適当である。合成抗菌剤のマイコスタチンまたはファンギゾンを最終濃度400IU/mLで、輸送液に加えてもよい。輸送時間が12時間を超えるようであれば、ウイルスを安定化するために血清または卵白を5~10%加えてもよい。pHを7.3~7.6に保つため、予め滅菌した2M トリス緩衝液で調製する。

② 臓器試料のホモジネートの調製

- (a) 操作は氷冷下(0~4℃)で行うことが望ましい。
- (b) 臓器試料が予め抗生物質処理されていない場合は、試料を抗生物質を添加した培地に再懸濁し、15℃、2~4時間、または4℃で一晩放置する。
- (c) 試料容器を傾けて抗生物質添加培地を捨てる。
- (d) プールされた臓器を乳鉢または電気ミキサーでホモジナイズして、ペースト状にし、これを輸送液に再懸濁して最終的には1:10のホモジネート液とする。

- (e) ホモジネート液を 2000 g で 15 分間遠心分離し、上清を回収する。
- (f) 卵巣腔液は、臓器試料と同様の方法で遠心し、その上清を直接、次の段階に供試する。

③ 試料等の処理

検査試料および解剖器具などは、病原体による汚染・伝播を防ぐために以下の処置を施す必要がある。被検魚、臓器試料の残りは焼却処分、輸送用コンテナおよび水は次亜塩素酸ソーダなどで消毒する。解剖器具、微生物培養器具(以下同様)は再使用、廃棄の前にオートクレーブによる滅菌を行う。

3. 診断手順

(1) 培養細胞による VHSV の分離

① 培養細胞への接種

使用する株化細胞:BF-2 または EPC 細胞(写真 7)

細胞培養液:牛胎児血清(FCS)10%を含むイーグルの最少必須培地(MEM)に、抗生物質(ペニシリン 100IU/mL とストレプトマイシン 100 μg/mL)を添加したものを使用する。

(a) 予め 24 ウェルの細胞培養用プレートに、BF-2 細胞または EPC 細胞を 20°C で培養しておく。接種する細胞は、分散後 24 時間程度経過したものをを用いる。希釈液を接種する場合は、直前に細胞培養液を除去する。

(b) ホモジネート上清の 10 倍段階希釈液を 3 列作り、BF-2 または EPC 細胞単層に各列の各希釈液の適当量(100 μL/2cm²の細胞単層)を接種する。

(c) 10~15°C で 0.5~1 時間吸着させた後、接種液はそのままにして、FCS を 2% 添加した細胞培養液(pH7.6)を 24 ウェル細胞培養プレートに 1mL/ウェルずつ加え、15°C で培養する。

② 培養および観察

(a) 40~100 倍の倍率で 7~10 日間毎日顕微鏡観察し、接種細胞と陽性対照培養細胞における感染経過を追う。位相差顕微鏡の使用を薦める。

(b) 細胞培養液の pH は全培養期間を通して 7.3 と 7.6 の間に保つ。そのためには、細胞培養液に滅菌した重炭酸塩緩衝液(密閉した細胞培養フラスコ用)または 2M のトリス緩衝液(細胞培養プレート用)を加えるか、ヘペス液緩衝培地を用いるとよい。

(c) ホモジネート上清希釈液を接種した培養細胞に細胞変性効果(CPE)(写真 5)が現れたら、直ちにウイルス同定手順に着手する(下記参照)。

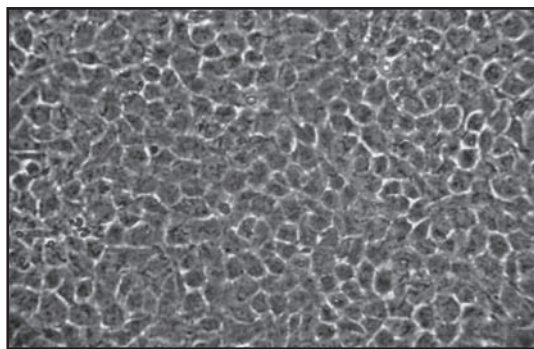


写真 4 VHS ウイルスの分離に使用される EPC 細胞(非感染)

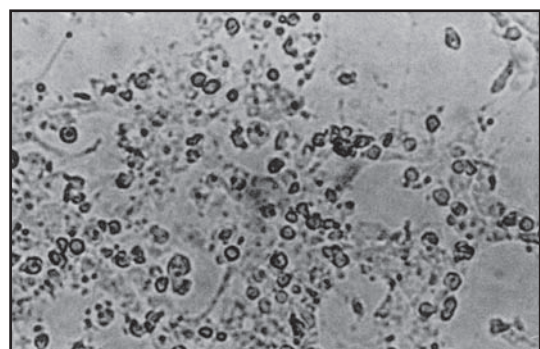


写真 5 VHS ウイルス感染 EPC 細胞。細胞の短縮、球形化を伴う CPE が特徴。(T R Meyers 博士ほか提供)

(d) 陽性対照培養細胞以外に CPE が生じなければ、培養 7 日後にホモジネート接種培養細胞の継代培養を行う。しかし、陽性対照にも CPE が観察されない場合には、感受性細胞を用いて新しいバッチの臓器試料について、もう一度ウイルス検査をやり直さねばならない。

③ 継代培養

- (a) 上清希釈液を接種したすべての細胞単層から、細胞培養液を集める。
- (b) 4℃で 15 分間、2,000 g で遠心分離後、上清を回収する。
- (c) 前述したように、BF-2 または EPC 細胞単層に接種し、観察する。
- (d) CPE が生じなければ、試験結果は陰性である。

(2) ウイルスの同定

Bio-X 社製のキット BIO-FLUO VHS IP5B11 (Bio K 006) を用い説明書に従い診断を行う。

① キットに含まれている検査薬類

- (a) 100mL 洗浄液 1 本
PBS を 900mL 加え、10 倍に希釈して使用する。
- (b) 25mL 固定液 1 本
- (c) 凍結乾燥した抗 VHS モノクローナル抗体 1 本
凍結乾燥した抗体に 500 μ L の蒸留水を加え、1 次抗体原液を調製する。一度に使用しない場合は、分注して -20℃に凍結保存する。使用直前に 10 倍希釈洗浄液で抗体原液を 20 倍に希釈する。
- (d) 凍結乾燥した FITC 標識抗マウス免疫グロブリンに対する抗体 (ヤギ血清)
凍結乾燥した抗体に 500 μ L の蒸留水を加えて、2 次抗体原液を調製する。一度に使用しない場合は、分注して -20℃に凍結保存する。使用直前に抗体原液を標識抗体の希釈液で 20 倍に希釈する。

② 細胞培養用プラスチックプレート (24 ウェルプレート) のウェルにカバーグラスを入れ、25℃で 24 時間以内に約 80% 繁茂となるように BF-2 または EPC の細胞単層 (ウイルス分離株あたり同定用に 6、陽性対照用に 2、陰性対照用に 2 ウェル) を準備する。

③ 細胞単層が接種可能に増殖したら、同定すべきウイルスの 10 倍段階希釈液を培養細胞の入ったウェルに直接接種する。

④ 陽性対照の VHSV 液を同様に細胞培養液で希釈して、5,000~10,000PFU/mL のウイルス抗体価希釈液を得よう接種する。

⑤ 15℃で、CPE が出現するまで培養する。

⑥ 各ウェルの細胞培養液を除去した後、500 μ L の固定液を加えて 4℃で 20 分間固定する。

⑦ 固定液を除去した後、洗浄液を各ウェルに 1mL ずつ加え、数分間放置後洗浄液を除く。再度、同様の操作を繰り返す。

⑧ 200 μ L の希釈した 1 次抗体液を各ウェルに加え、室温で 1 時間反応させる。

⑨ 洗浄液を各ウェルに 1mL ずつ加え、数分間放置後洗浄液を除く。再度、同様の操作を繰り返す。

⑩ 200 μ L の希釈した 2 次抗体液を加え、室温で 1 時間反応させる。

⑪ 洗浄液を各ウェルに 1mL ずつ加え、数分間放置後洗浄液を除く。再度、同様の操作を繰り返す。

⑫ カバーグラスをウェルより取り出し、無蛍光スライドグラスにグリセリン塩類溶液 (pH8.5) を滴下し、細胞面を傷つけないように注意して細胞面を下にして封入し、蛍光顕微鏡で観察する。

⑬ VHSV が存在する場合は、蛍光緑色を呈したプラークが観察される。また、観察に先立ち、陽性および陰性対照が期待している結果を出していることを確認する。

(3) 間接蛍光抗体法

- ① 上記(2)②～⑤の操作を行う。
- ⑥ 細胞培養液を除去した後、0.01M PBS(pH7.2)で1回、さらにカバーガラスに対しては冷却したアセトン(-20℃保存)、プラスチックのウェルではアセトン30%とエタノール70%(容量/容量)の混合液で、軽く3回洗浄する。混合液も-20℃で、保存したものをを用いる。
- ⑦ 細胞単層2cm²当たり500μLの固定液を加え、15分間作用させる。
- ⑧ 細胞単層は少なくとも30分間風乾し、直ちに次の処理に移るか、-20℃で凍結保存する。
- ⑨ Tween80を0.05%含む0.01M PBS溶液(PBS-Tween、pH7.2)で、VHSVに対する精製抗体または抗血清を希釈する(希釈液は予め用意しておく)。
- ⑩ PBS-Tweenで4回洗浄後、この緩衝液を完全に除去する。
- ⑪ 37℃の湿潤箱中で、単層細胞を⑨で用意した抗体溶液(0.25mL/2cm²ウェル)と1時間反応させる。この際細胞単層が乾燥しないように注意する。
- ⑫ 反応終了後、PBS-Tweenで4回洗浄する。
- ⑬ 細胞単層を37℃で1時間、FITCで標識した免疫グロブリンに対する抗体(2次抗体)と反応させる。
- ⑭ PBS-Tweenで4回洗浄する。
- ⑮ 処理した細胞単層は、プラスチックプレート上で直ちに観察するか、顕微鏡観察に先立って、カバーガラスをウェルより取り出し、グリセリン塩類溶液(pH8.5)を用いて、無蛍光スライドグラスに封入して観察する。緑色蛍光が観察されれば判定は陽性である。
- ⑯ 観察に先立ち、陽性および陰性対照が期待している結果を出していることを確認する。

(4) RT-PCR法

① 準備

- (a) 採取した病魚試料(腎臓、脾臓、脳磨碎液または卵巣漿液)あるいは分離ウイルス培養上清からの抽出RNA
- (b) RT-PCR法使用機器および試薬：サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類など
- (c) プライマー

Forward primer : 5'-GGG GAC CCC AGA CTG T-3'

Reverse primer : 5'-TCT CTG TCA CCT TGA TCC-3'

増幅産物サイズ :811bp

② 手技

- (a) 採取した病魚試料を適当なRNA抽出キットにより核酸抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。
- (b) 抽出した核酸および陽性対照RNAをテンプレートとして、上記のプライマーを用いてPCR反応を行う。反応は、最初に50℃で30分間、続いて94℃で2分間、その後94℃で30秒間、52℃で30秒間、68℃で1分間を35サイクル、最後に68℃で7分間行う。
- (c) PCR終了後、増幅産物を適当なDNA分子量マーカータとも1%程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- (d) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量811bpのバンドの有無を観察する。

③ 判定

目的のバンドが検出された個体を陽性、検出されなかった個体を陰性と判定する。

4. 参考文献

Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2006, CHAPTER 2.1.5., OIE (http://www.oie.int/eng/normes/fmanual/A_00022.htm)

