

キンギョ稚魚に対するヘルペスウイルス性造血器壊死症弱毒生ワクチン接種時期の検討

湯口真実・SAITO Hiroaki・南 俊伍・佐野元彦

(2023年12月15日受付, 2024年1月30日受理)

Investigation of the timing of inoculation to juvenile goldfish with a live attenuated vaccine against herpesviral hematopoietic necrosis

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

キーワード: キンギョ, P7-P8 株, 病原性, 体重, 予防効果

愛知県弥富市周辺では明治時代からキンギョ養殖が盛んに行われているが, 1990年頃から非常に高い死亡率の疾病が発生した。Jung and Miyazaki¹⁾は1992, 1993年に愛知県と奈良県で発生した事例から, この原因がヘルペスウイルス性造血器壊死症(以下, GFHN)によるものであることを突き止めた。その後も, 本疾病は経済的に大きな影響を及ぼしており, その原因ウイルス(以下, GFHNV)は生産, 流通, 小売り段階のキンギョに蔓延していると考えられている。

魚類養殖におけるウイルス性疾病は治療できないものが多く, その主な防除法は防疫となる。例えばその手段の一つとして, マダイ及びブリ類のマダイイリドウイルス病, マハタ及びクエのウイルス性神経壊死症については, 不活化ワクチンが実用化され, 使用されている。²⁾ GFHNについても, これまでに Ito and Ototake³⁾により, 不活化ワクチンが開発されたが, 海産養殖魚種と比較してキンギョは単価が安く, ワクチン接種にかかるコストに見合わないこともあり, 実用化には至っていない。一方で, Saito *et al.* (2022)⁴⁾はGFHNに対する弱毒生ワクチンを開発した。このワクチンは浸漬法による接種が可能であるため, 注射による接種を行う不活化ワクチンと比較して, 接種にかかる労働コストが飛躍的に軽減される。また, この弱毒生ワクチンは有効率が70%以上と非常に予防効果が高いことが報告されている。^{4, 5)}

キンギョ養殖生産において, 本疾病で大きな被害が出るのは, 当歳魚の秋と1歳魚の春である。このため, 当

歳の秋までに免疫を獲得させることが重要である。キンギョにワクチンを接種するためには, 飼育池からキンギョを回収する必要がある。キンギョの生産過程では, 孵化から約2カ月後(体重(BW)約2g)の5月以降にキンギョを飼育池から回収して選別が行われるが, ワクチン接種は, 飼育池からキンギョを回収する選別の際に同時にできることが望ましい。Saito *et al.* (2022)⁴⁾及びSaito *et al.* (2024)⁵⁾では, BW4.9g以上のキンギョが供試されているが, 上述のように選別サイズのキンギョは, 既報の供試魚のサイズよりも小さく, これまで弱毒生ワクチンによる病害性及び予防効果に関する知見がない。そこで, 本研究では孵化直後から3カ月後までのGFHNV感受性系統のキンギョに対するワクチンの病害性などの影響と疾病予防効果について検討した。

供試魚には2023年6月3, 4日及び6月21日に採卵したGFHNV感受性系統のリウキンを使用した。供試魚は孵化から1カ月後まではブラインシュリンプを飽食給餌し, 孵化から1週間後から徐々に配合飼料も併せて給餌し, 1カ月以降は配合飼料に切り替えて, 試験期間中も給餌率1%で給餌した。孵化から1カ月後までは容積50Lのコンテナでろ過井水を使用し, 1カ月以降は容積500Lのコンテナで井水を使用して自然水温で飼育した。このキンギョは愛知県水産試験場動物実験規程に基づいて試験に供した。試験時には空調で室温を25℃に設定した室内に水槽を設置した。屋外の水温と室内の水温に大きな差がないため, 試験前の馴致期間は設定し

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

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

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

なかった。試験中は孵化直後から2カ月後までは3L(水量2L), 3カ月後は15L(水量12L)の水槽に供試魚を収容し, 水温連続記録計(株式会社ティアンドデイ社TR-52i)で水温を記録した。また, 試験期間中は週に1度半分の量を換水した。試験は孵化直後, 1カ月後, 2カ月後, 3カ月後(それぞれ0, 30, 61, 92日後)に実施した。供試魚はワクチン接種を行う前に全長(TL)を測定した。また, 2カ月後, 3カ月後の野生株攻撃後の死亡魚, 生残魚及び3カ月後の試験開始前の体重(BW)を測定した。供試魚のGFHNV感受性の確認は, 孵化直後には15尾, 1カ月後には20尾に野生株を感染させることで行った。なお, 2カ月後以降は供試魚数が十分に確保できなかったことから, 感受性の確認を行わなかった。ワクチン接種試験の供試魚尾数は, 孵化直後は15尾ずつ, 1カ月後以降は20尾ずつとした。(表1)。

感受性の確認及びワクチン後の生残魚に対する攻撃では病原性のある野生株に感染させたキンギョから調製した腎臓摩砕液(Aichi2010)(感染価102.8 TCID₅₀/mL)⁵⁾(以下, 腎臓摩砕液)を用いて攻撃を行った。ワクチン接種には弱毒生ワクチンP7-P8株(感染価107.2 TCID₅₀/mL)⁴⁾を用いた。供試魚のワクチン接種及び攻撃は孵化直後から2カ月後までは, 飼育水で1,000倍に希釈した弱毒生ワクチンあるいは腎臓摩砕液にエアレーションをかけて2時間浸漬して行った。希釈したワクチン液及び腎臓摩砕液の量は孵化直後, 1カ月後, 2カ月後でそれぞれ50, 100, 1,000 mLで, 収容尾数はそれぞれ15, 20, 20尾であった。3カ月後の試験では, 供試魚がハンドリングに耐えうるサイズになったことから, ワクチン原液及び腎臓摩砕液を約1/100に節約できるシャワー投与方法⁵⁾により接種・攻撃を行った。

ワクチン接種後21日経過して生残した個体は, 腎臓摩砕液を用いて, 浸漬あるいはシャワー投与方法で病原性のある野生株による攻撃を行った。攻撃後に死亡した個体は, 腎臓を摘出し, 特異的抗体3D3を用いた塗抹標本の間接蛍光抗体法あるいはWaltzek *et al.*のプライマーを用いたPCR法⁶⁾によりGFHNVの発症を確認した。

野生株による攻撃後に死亡した個体と生残した個体は, 試験後に体重を測定し, *t*検定による解析に供した。

試験前に計測した供試魚の平均全長は孵化直後, 1カ月後, 2カ月後, 3カ月後でそれぞれ, 7.5±0.5, 21.5±2.5, 31.8±6.6, 52.4±8.7 mm(平均±標準偏差)であった(表1)。孵化から3カ月後の体重は4.6±2.1 gであった。試験中の平均水温は孵化直後, 1カ月後, 2カ月後, 3カ月後でそれぞれ, 22.7, 23.9, 22.8, 22.9 °Cであった。

表1に病原性の野生株を接種した感受性確認試験及び

表1 供試魚のGFHNV感受性の確認及びワクチン接種21日後まで及び攻撃21日後までの生残尾数及び生残率

試験実施時期	供試魚		感受性確認		ワクチン接種		攻撃試験	
	尾数	TL(mm)	生残尾数	生残率	生残尾数	生残率	生残尾数	生残率
孵化直後(0日後)	15	7.5±0.5	0/15	0%	10/15	67%	0/10	0%
1カ月後(30日後)	20	21.5±2.5	0/20	0%	18/20	90%	0/18	0%
2カ月後(61日後)	20	31.8±6.6	-	-	17/20	85%	5/17	29%
3カ月後(92日後)	20	52.4±8.7	-	-	19/20	95%	17/19	89%

ワクチン接種から21日後の生残尾数及び生残率, また, 生残個体への攻撃から21日後の生残尾数及び生残率を示した。感受性確認試験の生残率は孵化直後及び1カ月後ともに0%であった。弱毒生ワクチン接種後の生残率は孵化直後, 1カ月後, 2カ月後, 3カ月後でそれぞれ67, 90, 85, 95%であった。ワクチン接種後の生残魚に対する野生株攻撃21日後の生残率はそれぞれ0, 0, 29, 89%であった。攻撃後に死亡した個体のPCR法及び蛍光抗体法による検査はすべて陽性であった。攻撃後に死亡した個体及び生残した個体の平均体重は, 2カ月後の試験で死亡した個体の平均体重では0.7±0.2 gであったのに対し, 生残した個体は1.2±0.4 gであった。3カ月後の試験で野生株による攻撃後に死亡した個体の平均体重は2.8±1.7 gであったのに対し, 生残した個体は3.7±1.8 gであった(図1)。この2回の試験における死亡群と生残群の体重について, *t*検定を行ったところ, 2カ月後の*p*値は0.002で体重の差は有意であった。一方, 3カ月後の*p*値は0.25で有意な差は認められなかった。

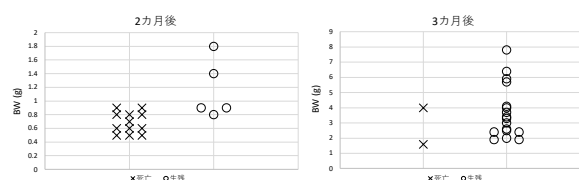


図1 攻撃後死亡個体と生残個体の体重の比較(左:2カ月後, 右:3カ月後)

Saito *et al.* (2022)⁴⁾が開発したGFHNVに対する弱毒生ワクチン(P7-P8株)は本疾病に対する有効率が70%以上と非常に高い予防効果があり,^{4, 5)}また, これまでに12品種のキンギョでこのワクチンの有効性が確認されている(未発表)。本ワクチンの効果を十分に発揮するためには, 接種後の飼育温度は15~30 °C, 特に20~25 °C程度の水温帯が好ましいとされている。⁷⁾ただし, これらの効果が確認されたのは, BW4.9 g以上のキンギョであった。ワクチン接種時には飼育池からキンギョを回収する必要があるが, 飼育池からの回収には労力コスト, ハンドリングによる衰弱や疾病のリスクが伴う。キ

キングョ養殖生産者に聴き取りを行ったところ、当歳の初夏以降、飼育池からキングョを回収して行われる選別のタイミングでワクチン接種できれば実用的であるとの回答があった。ワクチン接種後の飼育温度や飼育池からの回収という条件を考慮すると、初夏以降の選別のサイズ・タイミングにおけるワクチンの効果や病害性を確認することは、弱毒生ワクチンの実用化に向けて極めて重要な意義を持つ。本研究では孵化直後から3カ月後にかけて弱毒生ワクチンの接種とこれに引き続いて野生株による攻撃を行った。その結果、孵化直後及び1カ月後では、弱毒生ワクチン接種により一部が死亡し、その後の攻撃では全数が死亡した。このことは、孵化後1カ月までのキングョにワクチン接種したとしても、GFHNVに対する免疫が獲得されない可能性を示している。一方で2カ月後以降の試験では弱毒生ワクチンの接種後85%以上が生残し、野生株による攻撃後の生残率は2カ月後、3カ月後はそれぞれ29, 89%であった。本研究では陽性対照区を設定できなかったため確定的ではないが、孵化から2カ月以降にはワクチンの予防効果が現れ始めると考えられる。2カ月後の死亡群と生残群を比較したところ、生残した群は有意に体重が重かった。 $(p<0.01)$ このことから、ワクチンによる免疫獲得には、接種のタイミングだけでなく接種時の体重も影響している可能性が高い。供試魚の体重分布は離散的であるものの、生残魚と死亡魚の体重分布から推察すると、ワクチンによる免疫獲得には、およそ1gに閾値が存在する可能性がある。(図1)一方、全供試魚が1.6g以上であった3カ月後の試験では、死亡群と生残群で体重に有意差はなかったことから、この時の死亡はランダムであり、免疫獲得の閾値は1.6g以下にあると思われる。以上から、この弱毒生ワクチン株(P7-P8株)を使用してワクチンを接種する条件として、孵化から2カ月以上経過し、体重がおよそ1g以上であれば、免疫を獲得できる可能性が高いと考えられた。キングョ養殖生産過程における選別は、孵化後約2カ月、体重約2gで行われるが、この選別のタイミングで浸漬法あるいはシャワー法で接種することで、低コストでGFHNVに対する免疫を付与できると考えられ、本ワクチンには高い実用性が期待される。

GFHNVに対する感受性はキングョの系統ごとに差があると考えられており、⁸⁾ワクチンの効果も同様に系統により異なる可能性が考えられる。本弱毒生ワクチンの実用化に向けては、今後、複数の系統で同様の試験を行い、ワクチン接種に最適な時期をさらに検討する必要がある。また、今回の試験では、体重と孵化後の経過日数のいずれがワクチンの予防効果に影響を与えるかまでは

明らかにすることができなかった。加えて、供試魚数の制限のため、2カ月後、3カ月後の試験では陽性対照区を設定できなかったことから、今後、細分化した試験区及び対照区を設けて追試を行い、稚魚期において獲得免疫を得る要因を調べる必要がある。

謝 辞

弥富金魚漁業協同組合長伊藤恵造氏及び同組合所属の生産者深見泰範氏、深見雄基氏、八木英保氏及び服部崇氏にはキングョの養殖に関する聴き取りに協力していただいた。また、本研究は国立研究開発法人科学技術振興機構(JST)のA-STEP(グラント番号JPMJTR20U5)の一部として実施された。ここに記して感謝の意を表す。

文 献

- 1) Jung S J・Miyazaki T (1995) Herpesviral haematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 18, 211-220
- 2) 水産用医薬品について第36報(2023)農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課, 東京, 2023
- 3) Ito T・Ototake M (2013) Vaccination against cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) infection in goldfish *Carassius auratus*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 33 (5), 158-164
- 4) Saito H・Okamura T・Shibata T・Kato G・Sano M (2022) Development of a live attenuated vaccine candidate against herpesviral hematopoietic necrosis of goldfish. *Aquaculture*, 552
- 5) Saito H・Minami S・Yuguchi M・Shitara A・Kondo H・Kato G・Sano M (2024) Efficient showering vaccination with a live attenuated vaccine against herpesviral hematopoietic necrosis in goldfish. *Aquaculture*, 578, 740140
- 6) Waltzek T B・Kurobe T・Goodwin A E・Hedrick R P (2009) Development of a Polymerase Chain Reaction Assay to Detect Cyprinid Herpesvirus 2 in Goldfish. *Journal of Aquatic Animal Health*, 21, 60-67
- 7) Saito H・Minami S・Yuguchi M・Shitara A・Kondo H・Kato G・Sano M (2023) Effect of temperature on the protective efficacy of a live attenuated vaccine against herpesviral haematopoietic necrosis in goldfish. *Journal of Fish Disease*, e13906 <https://doi.org/10.1111/jfd.13906>
- 8) 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)キング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 (4), 117-123