

8) 琵琶湖産アユに対するマリンビルナウイルス検査

二宮浩司

【目的】

近年、他県の人工種苗生産アユでマリンビルナウイルスによる大量死亡事例が報告されている。そのため、県内養殖池または水産試験場における魚病発生時に通常の魚病検査（細菌、カビ、寄生虫）に加えてウイルス検査（ウイルス分離）を実施し、琵琶湖産アユのへい死にマリンビルナウイルスが関与するか検討した。

【方法】

1. 供試魚の採集および試料の採取

養殖池または水産試験場において、表1に示すように感染症的なへい死が発生していた魚群の瀕死魚または新鮮死亡魚（臨床的顕性感染魚）を供試魚とした。供試魚は無菌容器に入れ、氷蔵して水産試験場に持ち帰った。試料には表2に示すように、体重が1g未満の場合は魚体全体を、体重が1g以上の場合は、腎臓と脾臓の混合物、腎臓、脾臓および肝臓の混合物、肝臓、脳を用いた。最大5尾ずつプールしたが、プールした試料が1.5gを越えないようにした。

2. 培養細胞におけるマリンビルナウイルスの分離

ウイルス分離にはCHSE-214細胞を中心に一部、RTG-2細胞を用いた。試料を磨碎してペースト状にし、これを細胞培養液（5%牛胎児血清添加イーグルMEM培地）に懸濁させ、最終的に1/10の希釈液とした。希釈した磨碎液を3000rpmで10分間遠心し、上清液を採った。組織磨碎上清の10倍段階希釈列を作り、各列の希釈液を細胞単層に100 μ L接種した（24ウェル細胞培養プレートを使用）。接種培養細胞に細胞変性（CPE）が現れるか、倍率40から100で14日間毎日顕微鏡観察を行った。接種培養細胞にCPEが生じなければ、さらに14日間継代培養を行い、CPEが生じなければ、検査結果は陰性とした。

3. 細菌、カビおよび寄生虫検査

供試魚はウイルス分離と同時に鰓、体表上を顕微鏡観察し、カビや寄生虫の着生状況を検査するとともに、腎臓を試料にHI（ハートインヒュージョン）寒天培地や改変CY（サイトファーガ）寒天培地による細菌分離を行った。培養条件は前者で25℃、2日間、後者で15℃、7日間とした。

【結果】

2001年12月5日、12月6日、2002年3月18日、4月2日および6月20日に採集した供試魚に対しウイルス分離を行ったが、表2に示すように何れの検査においても、接種培養細胞にCPEが生じることはなく、マリンビルナウイルスを始めとする魚類病原ウイルスは分離されなかった。また、ウイルス検査と同時に実施した細菌検査においては6検査中全ての検査で冷水病原菌が分離され、今回検査を行った全ての症例は冷水病による死亡と判断された。

【成果の活用】

今回の検査では琵琶湖産アユからマリンビルナウイルスは検出されなかったが、今後も病原ウイルスに対する監視は続ける必要がある。

表1. ウイルス検査に用いた供試魚の由来および冷水病菌分離率

検査番号	採集日	供試魚の由来	供試魚の平均体重 (g)	冷水病菌分離率 (%)
1	2001.12.5	11月下旬エリ採捕	0.7	100.0(5/5)※
2	2001.12.6	11月下旬エリ採捕	0.8	100.0(5/5)
3	2002.3.18	3月上旬エリ採捕	1.5	100.0(4/4)
4	2002.4.2	3月下旬エリ採捕	2.5	100.0(5/5)
5	2002.4.2	11月エリ採捕	31.0	75.0(3/4)
6	2002.6.20	6月上旬ヤナ採捕	4.1	80.0(4/5)

※カッコ内は(分離尾数/検査尾数)を示す。

表2. 瀕死または死亡直後の琵琶湖産アユのウイルス保有検査結果

検査番号	検査部位	検体数	培養細胞	ウイルス分離率 (%)
1	魚体全体	2(1検体1尾)	RTG-2	0
2	魚体全体	2(1検体1尾)	RTG-2	0
3	腎臓、脾臓および肝臓を混合	2(1検体5尾)	CHSE-214	0
4	腎臓と脾臓を混合	1(1検体5尾)	CHSE-214	0
5-1	腎臓と脾臓を混合	1(1検体3尾)	CHSE-214	0
5-2	肝臓	1(1検体3尾)	CHSE-214	0
6-1	腎臓と脾臓を混合	1(1検体5尾)	CHSE-214	0
6-2	脳	1(1検体5尾)	CHSE-214	0