

コイヘルペスウイルス病発症群中で生残したコイの特性

荒井将人・渡辺直樹*¹・野内孝則・高島葉二*¹

Characterization of Fish that Survived after Infection of Koi Herpesvirus (KHV)

Masahito ARAI, Naoki WATANABE*¹, Takanori YANAI and Yoji TAKASHIMA*¹

Key Words : Koi Herpesvirus, KHV, Kasumigaura, Kitaura

はじめに

コイヘルペスウイルス(以下「KHV」という)病は1998年にイスラエルと米国のニシキゴイもしくは養殖コイにおいて初めて確認され(Hedrick *et al.*, 2000),その後アジアにおいては2002年にインドネシアで発生した(Sunarto, 2004)。日本ではKHV病の侵入を防ぐため2003年6月に「持続的養殖生産確保法」の「特定疾病」に指定されたが,同年10月に霞ヶ浦北浦において発生した網いけす養殖コイの大量死がKHV病によるものであることが確認された(Sano *et al.*, 2004)。

霞ヶ浦北浦におけるKHV病の発生では,2003年10月上旬に養殖コイの死亡が始まり,10月中旬以降に被害が拡大した。11月上旬までの累積死亡量は年間生産量の1/4に当たる約1,200トンであった。その後11月中下旬の水温低下に伴い死亡は概ね終息したが,特定疾病のまん延防止を図るため,網いけすに生残していたコイは水温上昇期前の2004年3月末までに全て処分された(高島ら 2004)。

KHV病の発症と水温の関係についてはGilad *et al.* (2003)により水温13以下では発症しないことが報告されている。しかし,KHV病発生群の中で生残した魚(以下,「KHV生残魚」という)において,その後の発症状況や新たな感染源となるか否かについては未知であり,今後の本疾病対策のためKHV生残魚の発症状況の確認試験を行った。

本研究ではKHV病が発生した網いけす漁場で生残したコイを2004年春季以降,室内池において継続飼育し,KHV病発症の有無を調査した。また,健康魚(KHV未感染魚)との同居飼育試験によりKHV生残魚から健康魚への感染の可能性を検討した。この結果,若干の知見を得たので報告する。

方 法

(1) ウイルスの検出

ウイルスの検出はPCR検査により行った。PCR検査のプライマーセット及びPCR反応プログラムは2004年10月11日まではGray *et al.* (2002),2004年10月12日以降はYuasa *et al.* (2005)に従い,検査部位は鰓(冷凍)とした。

(2) KHV生残魚の継続飼育試験

2003年秋のKHV病発生時に網いけすで飼育され,2004年3月に生残していたコイについて,茨城県内水面水産試験場(以下,内水試)において以下のとおりサイズ別に飼育試験を行った(表1,図1)。

成魚(2kgサイズ)の試験

かずみがうら市(旧,霞ヶ浦町)田伏地区の網いけすで飼育されていた養殖コイ(2kgサイズ,42尾)を2004年3月19日に内水試の屋内池(6m×5m×0.6m深)1面に収容し,2004年5月17日まで飼育を行った。飼育水は地下水,止水とし,飼育水の汚れに応じて池水量の1/2程度の換水を行った。水温は自然水温とした。試験期間中は試験魚の行動観察と水温測定を行い,行動に異常のある魚や死亡魚が確認された場合は取り上げてPCR検査を行った。

なお,本試験魚のうち8尾(雌2,雄6)は,2004年5月2日に耐病性魚の育種を検討する試験のため,人工採卵に用いた。

稚魚(45gサイズ)の試験

かずみがうら市(旧,霞ヶ浦町)田伏地区の網いけすで飼育されていた養殖コイ(45gサイズ,500尾)を2004年3月23日に内水試の屋内池(6m×5m×0.6m深)1面に収容し,2005年12月8日まで飼育を行った。飼育条件は上記成魚の試験と同様にした。飼育期間中の死亡魚についてPCR検査を行い,検査尾数は1日に3尾程度を上限とした。

また,2004年3月~12月の期間中,同じ飼育池内に囲い網(トリカルネット製,1m×1m×1m)を設置し,同一群のKHV生残魚100尾を飼育し,1回あたり5尾を検査対象として定期的にPCR検査を行った(以下,「稚魚囲い網区」)。PCR検査は2004年3月~5月は毎週1回,6月~7月は2週間に1回,8月~12月は毎月1回,計19回行った。なお,2004年3月~7月の検査では供試魚を解剖し,各器官の異常等の観察を行った。8月~12月にはPCR検査用に鰓の一部を採取し,再び囲い網に戻した。

*1 茨城県水産試験場

(3)KHV 生残魚と健康魚の同居感染試験

前述のKHV生残魚(稚魚)の飼育池に稚魚囲い網区とは別の囲い網を設置し、その中で健康魚(KHV未感染魚)を飼育し、KHV生残魚から健康魚へのKHV病感染の有無を調査した。水温やKHVに感染してからの期間による感染性の違いを検討するため、同居感染試験は時期を変えて3回行った(表2, 図1)。

1回目の試験(2004年3月23日~6月1日)は、KHV生残魚の継続飼育試験開始時から行った。なお、KHV生残魚には2004年5~6月にKHV病の発症が確認された。

2回目の試験は、KHV生残魚が2004年5~6月にKHV

病を発症後、死亡が終息し、死亡魚のPCR検査で最後に陽性が確認(2004年6月16日)されてから1ヶ月程度経過した2004年7月22日に開始し、2005年12月8日まで行った。

3回目の試験は、KHV生残魚のKHV病終息後11ヶ月経過した2005年5月9日に開始し、同年12月8日まで行った。

試験期間中は健康魚に異常や死亡が確認された場合に取り上げてPCR検査を行った。また2回目及び3回目の試験においては、試験終了時に囲い網で生残していた魚のPCR検査を行った。

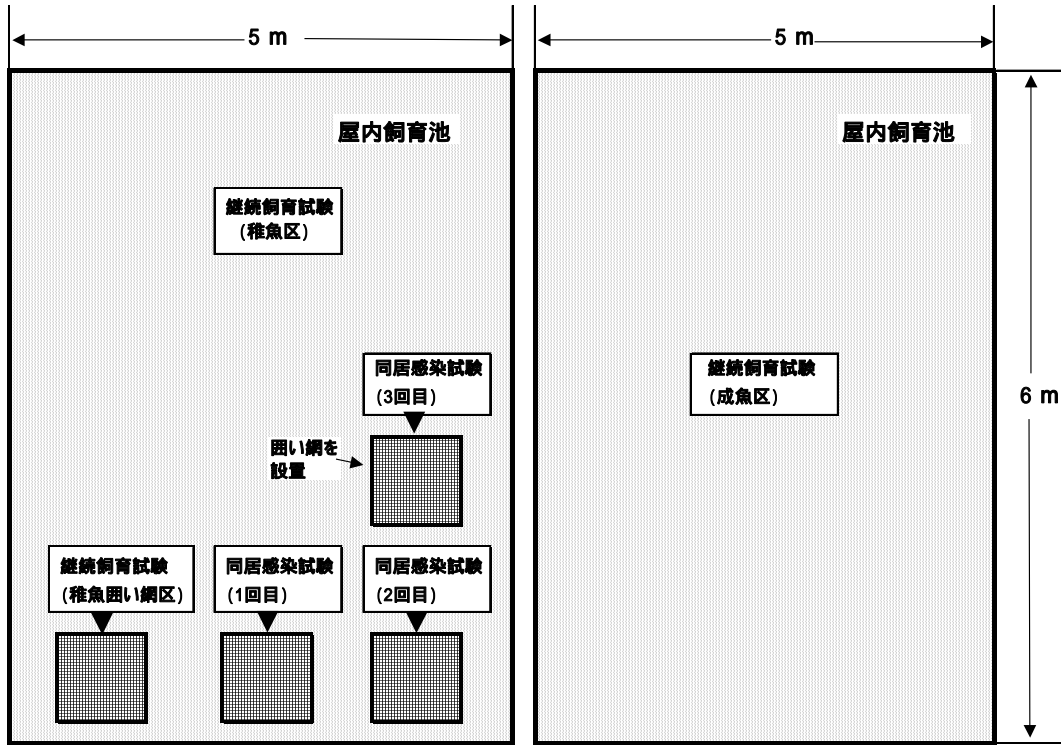


図1 試験概要

表1 KHV生残魚の継続飼育試験

試験区	試験期間	供試魚(KHV生残魚)		
		尾数	サイズ	由来
成魚	2004.3.19 ~ 2004.5.17	42	2kg	霞ヶ浦網いけす
稚魚	2004.3.23 ~ 2005.12.8	500	45g	霞ヶ浦網いけす
稚魚囲い網	2004.3.23 ~ 2004.12.14	100	45g	霞ヶ浦網いけす

表2 KHV生残魚と健康魚の同居感染試験

試験回数	試験期間	供試魚(健康魚)		
		尾数	体重g	由来
1	2004.3.23 ~ 2004.6.1	20	50	内水試
2	2004.7.22 ~ 2005.12.8	25	60	熊本県養殖業者
3	2005.5.9 ~ 2005.12.8	20	100	熊本県養殖業者

表3 KHV 生残魚の継続飼育試験
成魚(2kg サイズ)の死亡状況及び PCR 検査結果

月日	死亡 個体数	検査数	PCR結果	
			陰性	陽性
2004/5/5	1	1	1	0
5/10	2	2	2	0
5/12	1	1	1	0
5/14	7	3	3	0
5/15	27	25	20	5
5/17	4	0		
計	42	32	27	5

結 果

(1) KHV 生残魚の継続飼育試験
成魚(2kg サイズ)

死亡状況及び PCR 検査結果を表3に示した。

試験開始47日後の2004年5月5日に1尾がひん死状態となったため、取り上げて検査したところ、鰓への *Chilodonella* 類の寄生が観察され、PCR 検査結果は陰性であった。その後、5月10日から供試魚の死亡が始まり、5月15日には27尾が死亡し、5月17日までに42尾全てが死亡した。死亡魚の特徴的な症状として、鰓粘液の過剰分泌や鰓ぐされ、眼球の落ち窪み等が観察された。また PCR 検査結果は、5月5~14日に検査した7尾は全て陰性、5月15日に検査した25尾中5尾が陽性であった。

稚魚(45g サイズ)

死亡状況及び PCR 検査結果を表4に示した。試験開始8日後の2004年3月31日から死亡が確認され、PCR 検査では4月27日から陽性が確認された。5月10日以降、死亡魚が増加し、5月15日~6月3日には1日当たり10尾以上死亡する日が多く、5月18日には47尾が死亡した。試験開始から6月28日までに328尾(全体の66%)が死亡した。死亡魚には鰓の膨潤や退色、鰓ぐされ、眼球の落ち窪み等の症状が観察され、このうち57尾を PCR 検査したところ、33尾が陽性であった。また、1日10尾以上が死亡した期間(5月15日~6月3日)の水温は15.8~25.5であった(図2)。

その後、2004年7月~2005年12月まで計26尾が死亡し、このうち21尾を検査したところ全て陰性であった。2005年12月8日に試験終了し、試験開始時からの死亡率は75%(375尾)であった。

また、稚魚囲い網区の KHV 生残魚の PCR 検査では、2004年4月15日4尾(5尾中、以下同様)、5月27日1尾、7月1日2尾、11月18日1尾に KHV 陽性が確認された(表5)。

表4 KHV 生残魚の継続飼育試験
稚魚(45g サイズ)の死亡状況及び PCR 検査結果

月日	死亡 個体数	検査数	PCR結果	
			陰性	陽性
2004/3/31	1	1	1	0
4/4	2	0		
4/12	1	1	1	0
4/16	1	1	1	0
4/27	3	2	1	1
4/28	1	1	1	0
5/10	5	1	1	0
5/11	5	1	1	0
5/12	5	0		
5/13	4	3	3	0
5/14	4	1	1	0
5/15	16	2	1	1
5/17	32	0		
5/18	47	3	1	2
5/19	15	2	1	1
5/20	25	3	0	3
5/21	19	3	2	1
5/22	1	0		
5/24	19	3	0	3
5/25	8	3	2	1
5/26	14	3	1	2
5/27	9	3	0	3
5/28	21	3	0	3
5/31	28	3	0	3
6/1	6	3	0	3
6/2	5	3	0	3
6/3	12	3	1	2
6/4	1	1	1	0
6/7	6	0		
6/8	4	3	3	0
6/10	1	0		
6/11	1	0		
6/14	1	0		
6/16	1	1	0	1
6/21	2	0		
6/24	1	0		
6/28	1	0		
7/13	1	1	1	0
10/25	1	1	1	0
12/10	1	1	1	0
12/21	2	2	2	0
2005/3/8	1	1	1	0
3/25	1	1	1	0
3/28	1	1	1	0
4/5	2	2	2	0
4/7	2	2	2	0
4/15	1	1	1	0
4/18	1	1	1	0
4/27	1	1	1	0
5/6	3	1	1	0
5/9	1	1	1	0
5/13	1	1	1	0
5/16	1	1	1	0
6/2	1	0		
6/13	1	0		
10/18	1	1	1	0
11/9	1	1	1	0
12/8	1	0		
計	354	78	45	33

試験終了時の取り上げ尾数は125尾であったため、死亡尾数は、500尾 - 125尾 = 375尾とした。

表5 KHV 生残魚の継続飼育試験
稚魚囲い網区 生残魚の KHV 検出結果

月日	回次	検査数	PCR結果	
			陰性	陽性
2004/3/25	1	5	5	0
3/31	2	5	5	0
4/8	3	5	5	0
4/15	4	5	1	4
4/22	5	5	5	0
4/30	6	5	5	0
5/6	7	5	5	0
5/13	8	5	5	0
5/20	9	5	5	0
5/27	10	5	4	1
6/3	11	5	5	0
6/10	12	5	5	0
7/1	13	5	3	2
7/22	14	5	5	0
8/12	15	5	5	0
9/16	16	5	5	0
10/21	17	5	5	0
11/18	18	5	4	1
12/14	19	5	5	0
計		95	87	8

(2) KHV 生残魚と健康魚の同居感染試験

1 回目

2004年3月23日に試験を開始し、2004年5月11日～6月1日に健康魚20尾全てが死亡した。このうち16尾をPCR検査したところ15尾が陽性であった(表6)。

2 回目

2004年7月22日に試験を開始し、2004年9月6日～2005年5月2日までに16尾が死亡した。死亡魚のPCR検査は全て陰性であった。その後、2005年11月28日に死亡した1尾をPCR検査したところ、陽性であった。また、2005年12月8日に試験終了し、生残した8尾をPCR検査したところ、2尾が陽性であった(表7)。

3 回目

2005年5月9日に試験を開始し、2005年6月21日～8月19日までに4尾が死亡した。死亡魚のPCR検査は全て陰性であった。その後、2005年11月2日に1尾、11月28日に1尾が死亡し、PCR検査したところ、いずれも陽性であった。また、2005年12月8日に試験終了し、生残した14尾をPCR検査したところ、1尾が陽性であった(表

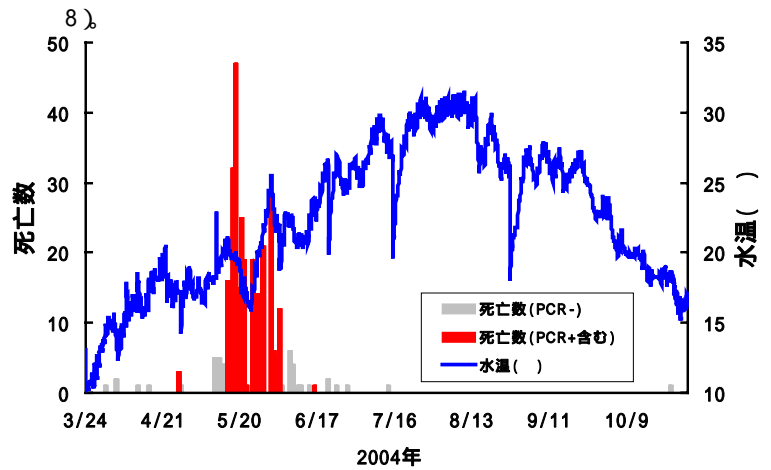


図2 KHV 生残魚の継続飼育試験
水温と死亡状況 稚魚(45g サイズ)

表6 KHV 生残魚と健康魚の同居感染試験

1回目試験 結果

月日	死亡 個体数	検査数	PCR結果	
			陰性	陽性
2004/5/11	1	0		
5/15	1	1	0	1
5/18	1	1	0	1
5/20	1	1	0	1
5/21	4	4	0	4
5/24	2	2	0	2
5/25	3	3	1	2
5/26	1	1	0	1
5/28	1	1	0	1
5/31	3	0		
6/1	2	2	0	2
計	20	16	1	15

表7 KHV 生残魚と健康魚の同居感染試験

2回目試験 結果

月日	死亡 個体数	検査数	PCR結果	
			陰性	陽性
2004/9/6	1	1	1	0
9/14	1	1	1	0
10/18	1	1	1	0
12/13	1	1	1	0
2005/1/31	2	2	2	0
2/23	1	1	1	0
3/22	1	1	1	0
3/28	1	1	1	0
4/4	3	3	3	0
4/8	1	1	1	0
4/13	1	1	1	0
4/22	1	1	1	0
5/2	1	1	1	0
11/28	1	1	0	1
計	17	17	16	1

2005年12月8日 終了時生残魚のPCR検査結果：
8尾中2尾陽性

表 8 KHV 生残魚と健康魚の同居感染試験

月日	死亡 個体数	検査数	PCR結果	
			陰性	陽性
2005/6/21	1	1	1	0
8/4	1	1	1	0
8/17	1	1	1	0
8/19	1	1	1	0
11/2	1	1	0	1
11/28	1	1	0	1
計	6	6	4	2

2005年12月8日 終了時生残魚のPCR検査結果：
14尾中1尾陽性

考 察

(1) KHV 生残魚の継続飼育試験

2003年10月にKHV病が発生した霞ヶ浦の網いけす養殖場で生残したコイについて、成魚、稚魚のサイズ別に屋内池に収容し2004年3月以降継続して飼育したところ、2004年5～6月に成魚、稚魚ともにKHV病による死亡が認められた。なお、成魚の試験については試験魚の全数が死亡したが、死亡魚のPCR検査で陽性の割合が低かったことから(25尾中5尾陽性、5月15日検査分)、KHV病以外に寄生虫やハンドリングによる死亡があるものと考えられた。

KHV感染源については、KHV生残魚は隔離された屋内池で飼育され、飼育用水は地下水であることから、実験系外からの感染の可能性は極めて低く、KHV生残魚が保有していたKHVが水温の上昇等の要因で活性化したものと考えられた。

KHVによる感染を耐過した個体はKHVに対する免疫を獲得すると考えられるが(飯田2005)本試験ではKHV生残魚群において再びKHV病の発生が確認された。この原因については、霞ヶ浦におけるKHV病発生時期(2003年10～11月)の水温条件によるものと考えられる。KHV病の死亡率に及ぼす水温の影響については、感染実験において供試魚を感染後水温13で飼育したところ死亡は生じなかったが、その後30日目及び64日目に23に移動したところ30日目に移動した供試魚でKHV病による死亡が生じたことが報告されている(Gilad *et al.*, 2003)。霞ヶ浦での発生事例では2003年10月上旬(水温18)に死亡が生じ、11月中下旬(水温12～14)以降には概ね終息していることから(高島ら, 2004)、網いけす養殖コイの生残魚の中にはKHVによる感染を耐過して耐性を獲得した個体と、KHVに感染したがその後の水温低下でKHVの病勢が弱まり、十分な耐性獲得に至らなかった個体があると推察された。このことから、KHV生残魚群であっても感染時期や感染の強さ、感染後の水温条件等の影響によりKHV耐性を獲得していない個体が含まれ、これらが後に水温条件等により発症・死亡すると考えられた。

(2) KHV 生残魚と健康魚の同居感染試験

本試験は、水温による影響やKHV生残魚のKHVに感染してからの期間による感染性の違いを検討するため、時期を変え3回を行った。

1回目の試験(2004年3月23日～6月1日)では、KHV生残魚のKHV病発生時期(2004年5～6月)と同時期に健康魚が全て死亡し、PCR検査で陽性が確認されたことから、KHV病を発症したKHV生残魚から健康魚が感染したものと考えられた。

2回目(2004年7月22日～2005年12月8日)、及び3回目(2005年5月9日～12月8日)の試験において、KHV生残魚については同居期間中にKHV病による死亡は認められず、これらはKHV感染を耐過したものと考えられた。一方、健康魚については、同居開始後16ヶ月(2回目試験)及び6ヶ月(3回目試験)を経過した2005年11月に死亡した1尾(2回目試験)及び2尾(3回目試験)からPCR検査で陽性が確認された。健康魚は隔離された屋内池で飼育され、飼育用水は地下水であることから、実験系外からの感染の可能性は極めて低く、KHV発症の見られない生残魚(感染耐過魚)がKHVの感染源になったと推察された。

KHV感染魚からの同居感染の経時的可否については、人為感染試験において、水温23においてマゴイをKHVに感染させ、1, 3, 5, 7, 14, 21, 27, 40日後に健康ニシキゴイを24時間同居したところ、感染1～14日後のマゴイと同居させた健康ニシキゴイは全てKHV病を発症し死亡したが、21日以降のマゴイと同居したニシキゴイは死亡せず、KHVも検出されなかったとの報告がある(湯浅ら, 2006)。本研究では、KHV生残魚(感染耐過魚)と健康魚を同居させ6～16ヶ月後に健康魚がKHV病を発症したことから、これよりも長期間に渡りウイルスが放出される可能性が示唆された。ウイルスが放出される期間は、感染条件(人為感染、自然感染)や同居期間、飼育条件(水温等)などによって異なると推察され、今後はKHV感染耐過魚がウイルスを放出する期間や条件について検討が必要である。

要 約

(1) 2003年秋にKHV病が発生した霞ヶ浦の網いけすで生残したコイ(成魚、稚魚)を2004年3月から内水試の室内池で継続飼育し、水温上昇期以降のKHV病の発生等について検討した。

(2) この結果、成魚、稚魚ともに2004年5～6月に死亡が生じ、PCR検査で陽性が確認された。室内隔離池で使用水は地下水であることから、実験系外からの感染の可能性は極めて低く、KHV生残魚が保有していたKHVが水温上昇等により活性化したと考えられた。

(3) KHV生残魚(稚魚)と健康魚(KHV未感染魚)の同居感染試験を時期を変え3回行ったところ、いずれも健康魚からKHVが確認された。感染源はKHV生残魚と考えられた。

(4) 同居感染試験のうち2回目、3回目の試験では、試験

期間中(17ヶ月~7ヶ月間)にKHV生残魚でKHV発症は確認されず,これらは感染を耐過したものと考えられたが,同居させた健康魚がKHVに感染したことから,KHV病が発症していない生残魚(感染耐過魚)がKHVの感染源となることが示唆された。

文 献

- Gilad, O., S. Yun, M. A. Adkison, K. Way, N. H. Willits, H. Bercovier and R. P. Hedrick (2003): Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. *J. Gen. Virol.*, 84, 2661-2668.
- Gray W. L., L. Mullis, S. E. LaPatra, J. M. Groff and A. Goodwin (2002): Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. *J. Fish Dis.*, 25, 171-178.
- Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. V. Spangenberg, G. D. Marty, R. W. Nordhausen, M. J. Kebus, H. Bercovier and A. Eldar (2000): A Herpesvirus Associated with Mass Mortality of Juvenile and Adult Koi, a Strain of Common Carp. *J. Aquat. Anim. Health*, 12, 44-57.
- 飯田貴次 (2005): コイヘルペスウイルス病. *日本水産学会誌*, 71, 632-635.
- Sano M., T. Ito, J. Kurita, T. Yanai, N. Watanabe, S. Miwa and T. Iida (2004): First Detection of Koi Herpesvirus in Cultured Common Carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, 39, 165-167.
- Sunarto A. (2004): Epidemiology, diagnostic and preventive practices for koi herpesvirus (KHV) in Indonesia. Abstract in "KHV infectin: Present status and future prospects for prevention", 13-16.
- 高島葉二・渡辺直樹・野内孝則・中村丈夫 (2004): 霞ヶ浦・北浦におけるコイヘルペスウイルス病の発生. *茨城内水試調研報*, 39, 1-8.
- 湯浅啓・大迫典久・伊東尚史・飯田貴次 (2006): コイヘルペスウイルス (KHV) 人為感染魚からの同居感染の経時的可否. 平成 18 年度日本水産学会大会講演要旨集, 81.
- Yuasa, K., M. Sano, J. Kurita, T. Ito and T. Iida (2005): Improvement of a PCR Method with the Sph I-5 Primer Set for the Detection of Koi Herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, 40, 37-39.