

コイヘルペスウイルス病耐過魚の切り身を用いた感染試験 -

野内 孝則 ・ 荒井 将人

Examination for Contracted Fish that Survive Infection of Koi Herpesvirus (KHV) - 1

Takanori YANAI, Masahito ARAI

Key Words : **Koi Herpesvirus**

はじめに

霞ヶ浦北浦では、2003年10月のコイヘルペスウイルス(KHV)病発生時に養殖コイばかりでなく、天然コイの異常も発生(高島ら, 2004)し、同年11月にはきたうら広域漁業協同組合等によって天然コイのへい死が確認された(漁協:私信)。しかし、その後も霞ヶ浦北浦に生息する天然コイのPCR検査結果ではKHV陽性個体が確認されているものの、2004年以降の霞ヶ浦北浦における天然コイの大量へい死は確認されていない(荒井ら, 2006)。このことから、霞ヶ浦北浦の天然域のコイはKHVに感染し耐過したと考えられた。しかし、KHVに感染し耐過したコイは、ウイルスの保菌魚(キャリア)と考えられる(飯田, 2005; 福田, 2005)。従って、KHV病が「持続的養殖生産確保法」に基づく「特定疾病」である限り、コイの移動ばかりでなく食用としての利用にも制限が加えられることとなる。今回、KHVに感染した群の生残個体(KHV感染耐過魚)を用いてこれらの切り身がKHVの感染源となるかを検討し、若干の知見を得たので報告する。

方 法

切り身感染試験 - 1 (KHV耐過魚の切り身から未感染魚に対する感染の可能性)

(1) 供試魚

a. 飼育試験魚

東京海洋大学・吉田ステーション由来のコイ(KHV未感染魚), サイズ:約7g

14 飼育魚を23で3日間馴致し、試験に供した。

b. 感染源作出魚(切り身等作成魚)

KHV感染試験の生残魚:耐過魚(2005年11月2日に感染試験を行い、発症群の中で生残していた個体で、発症後約2ヶ月経過魚), サイズ:約90g

(2) 飼育条件

感染試験は、以下の条件の下で行った。

飼育水槽:60 ガラス水槽に50の地下水を入れ、止水で飼育

水温:温度調節器により、23に設定した。

収容数:各試験区,(1)aのコイを10尾ずつ収容した。

給餌等:試験期間中は、無給餌とした。

(3) 試験区

各試験区の条件は、下記のとおりである。

1区:対照区

(1)aのコイ,10尾飼育のみ

2区:筋肉収容区-1

フィレー(スキンレス):15g収容,

(1)bのコイ, No.1~3(表1)を各5g使用

3区:筋肉収容区-2

鱗,骨付き肉:15g収容,

(1)bのコイ, No.1~3(表1)を各5g使用

4区:内臓収容区

心臓,鰓,肝臓,脾臓,腎臓:6g収容,

(1)bのコイ, No.1~3(表1)を各2g使用

5区:同居試験区

(1)bのコイ, No.4を供試魚と同居

* ~ 区については、魚肉等の浸漬は、3日間(2006年1月24日~27日まで)行った。

(4) 試験期間

2006年1月24日~同年2月24日まで行った。

切り身感染試験 - 2 (KHV発症魚の切り身からの感染の可能性)

(1) 供試魚

a. 飼育試験魚

東京海洋大学・吉田ステーション由来のコイ(KHV未感染魚), サイズ:約7g

b. 感染源作出魚(切り身等作成魚)

KHV感染試験の生残魚:耐過魚(2005年11月2日に感染試験を行い、発症群の中で生残していた個体で、発症後約5ヶ月経過魚), サイズ:約70g

c. KHV発症魚(鰓使用)

2006年5月1日にKHV感染液(KHV発症魚の鰓10倍液を2500倍に希釈した液)に3時間浸漬させ、5月10日にKHVを発症したコイ

(2) 飼育条件

試験は、以下の条件で行った。

飼育水槽：60 ガラス水槽に50の地下水を入れ、止水で飼育

水温：温度調節器により、23 に設定した。

収容数：各試験区、海洋大学由来コイを10尾ずつ収容した。

給餌等：試験期間中は、無給餌とした。

(3) 試験区

各試験区の条件は下記のとおりである。

1区：対照区

(1) aのコイ, 10尾飼育のみ

2区：筋肉収容区 - 1

フィレー((1) bのコイ): 6.0g 収容, No.1~3 (表3) を各2g使用

3区：筋肉収容区 - 2

鱈付き魚肉((1) bのコイ): 6g 収容, No.1~3 (表3) を各2g使用

4区：内臓収容区

鰓((1) bのコイ): 4.4g 収容, No.1~3 (表3) の鰓を使用

5区：KHV発症魚・鰓収容区

鰓((1) cのコイ): 3.1g 収容, No.4~6 (表3) の鰓を使用

* 魚肉等の浸漬は、3日間(2006年5月10日~13日まで)行った。

(4) 試験期間

2006年5月10日~同年6月30日まで、途中30日後(6月9日)に供試魚の半数(5尾)を取り上げ、検査を行った。その際、飼育水を全換水し水温を23 から18 に急変させた。その後は、供試魚を23 で飼育した。試験終了時の6月30日には、残り全数を取り上げて検査を行った。

KHV感染液についての確認試験(供試魚のKHV感受性の確認)

(1) 供試魚と感染液の調整

a. 飼育試験魚

東京海洋大学・吉田ステーションで採卵し飼育したKHV未感染コイ(サイズ:約50g)を使用した。

b. KHV感染液調整

(切り身感染試験-2)のKHV発症魚の鰓投入区と同じ群の発症魚の鰓を取り出し、乳鉢でケイ砂を入れて磨砕し、細胞培養液(MEM-2)により10倍希釈し、遠心分離(10分間3000回転)を行った上澄を-80 で保管した液を感染液とした。

(2) 飼育条件

飼育条件は、以下のとおりである。

飼育水槽：60 ガラス水槽に50の地下水を入れ、流水

で飼育(2時間/回転)した。

水温：温度調節器により、23 に設定した。

収容数：各試験区、(1) aのコイを20尾収容した。

給餌等：試験期間中は、無給餌とした。

(3) 試験概要

前項(1) aの供試魚をb液を2500倍に希釈した感染液中に3時間浸漬させ、飼育水槽に収容し感染状況の確認を行った。

(4) 試験期間

2006年8月24日から同年9月3日まで行った。

結 果

切り身感染試験 - 1

切り身等を作成したコイの検査結果を表1に示した。

4個体試験に供したが、1個体(No.1)の鰓でPCR陽性となり、KHV保有が確認されたが、No.2,3及び、同居感染試験に用いたNo.4ではPCR検査は陰性であった。

~ 区で、試験終了時に行った供試コイの検査(半数:5尾)結果を表2に示した。

全ての試験区で、供試魚は死亡せず、異常も示さなかった。また、PCR検査では、全ての試験区でKHV陰性となった。

切り身試験 - 2

切り身作成魚(b)及びKHV発症魚(c)の検査結果を表3に示した。

切り身作成魚は、3個体共にPCR陰性となった。また、KHV発症魚では、3個体中2個体でPCR陽性となった。

試験開始30日後(2006年6月9日)及び51日後(2006年6月30日)に供試魚のPCR検査を行った。検査結果は、表4,5に示した。

供試魚のPCR検査結果は、 から 区全て陰性であった。

また、30日後(6月9日)に供試魚の半数(5尾)を検査のために取り上げた。この際、23の飼育水を18の地下水に全て交換し、KHVの発症しやすい条件(水温の急変)としたものの、5試験区全てで試験終了時(51日後、6月30日)まで死亡魚は認められなかった。さらに、試験終了時のPCR検査は5試験区すべて陰性であった。

感染試験

供試魚のへい死状況及び検査結果を表6に示した。

8月24日にKHV発症魚の鰓抽出液を浸漬させたコイは、4日後の8月28日に体表の粘液の異常(白くなる)を示し、7日後の8月31日からへい死個体が確認され、9月3日までに供試魚20個体全てが死亡した。なお、死亡した20個体のPCR検査結果では20個体全てでKHVの陽性反応を示した。このため、供試魚はKHVに感受性を有することと、鰓抽出液がKHVを保持し、感染力を有していたことが確認された。

表1 試験 - 1, 試験開始時検査 (2006.1.24)

No	区分	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	PCR検査結果		
					鰓	鱗	腎臓
1	KHV生残魚	171.0	130.3	61.1	陽性 (+)	陰性 (-)	陰性 (-)
2	KHV生残魚	191.3	152.5	98.5	陰性 (-)	陰性 (-)	陰性 (-)
3	KHV生残魚	194.5	148.5	104.8	陰性 (-)	陰性 (-)	陰性 (-)
4	KHV生残魚	191.5	150.4	101.6	陰性 (-)	陰性 (-)	

感染原作出魚の PCR 検査結果

表2 試験 - 1, 終了時検査 (2006.2.24)

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症状	PCR検査結果 鰓
1 対照区	1	61.3	47.7	2.7	なし	陰性 (-)
	2	73.6	58.2	4.5	なし	陰性 (-)
	3	82.8	63.0	7.0	なし	陰性 (-)
	4	86.8	69.4	7.7	なし	陰性 (-)
	5	91.1	68.9	10.3	なし	陰性 (-)
2 生残魚 筋肉区 (鱗なし) (15g)	1	72.8	56.8	4.2	なし	陰性 (-)
	2	74.2	58.9	4.9	なし	陰性 (-)
	3	77.0	58.1	5.6	なし	陰性 (-)
	4	79.0	61.9	5.8	なし	陰性 (-)
	5	85.4	67.2	7.0	なし	陰性 (-)
3 生残魚鱗, 骨付き肉区 (鱗, 骨付き) (15g)	1	65.7	50.7	3.5	なし	陰性 (-)
	2	77.3	55.6	4.4	なし	陰性 (-)
	3	75.8	58.4	5.4	なし	陰性 (-)
	4	83.3	64.6	7.0	なし	陰性 (-)
	5	99.0	73.6	10.8	なし	陰性 (-)
4 生残魚 内臓区 (6g)	1	85.5	65.9	6.9	なし	陰性 (-)
	2	84.5	65.3	7.7	なし	陰性 (-)
	3	89.6	68.6	8.5	なし	陰性 (-)
	4	89.6	68.7	9.1	なし	陰性 (-)
	5	96.0	72.5	11.4	なし	陰性 (-)
5 同居試験区	1	73.9	57.2	4.4	なし	陰性 (-)
	2	72.2	56.2	4.4	なし	陰性 (-)
	3	74.2	57.0	5.2	なし	陰性 (-)
	4	90.2	70.1	8.6	なし	陰性 (-)
	5	93.7	71.5	9.3	なし	陰性 (-)

表3 試験 - 2, 開始時検査 (2006.5.10)

No	区分	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症状	PCR検査結果 鰓
1	KHV生残魚	146.4	114.4	47.3	特に異常なし	陰性 (-)
2	KHV生残魚	164.5	129.8	63.3	特に異常なし	陰性 (-)
3	KHV生残魚	194.5	160.6	104.7	特に異常なし	陰性 (-)
4	KHV発症魚	173.0	131.0	92.2	鰓弁: 膨潤	陰性 (-)
5	KHV発症魚	186.4	148.8	95.9	鰓弁: 膨潤	陽性 (+)
6	KHV発症魚	149.5	115.5	46.3	体表: スレ	陽性 (+)

* 感染原作出魚の PCR 検査結果

表4 試験 - 2, 30日目検査(2006.6.9)

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症状	PCR検査結果 鰓
1 対照区	1	98.2	76.3	10.7	特に異常なし	陰性(-)
	2	96.3	74.3	9.8	特に異常なし	陰性(-)
	3	88.6	67.7	8.0	特に異常なし	陰性(-)
	4	94.8	72.9	9.7	特に異常なし	陰性(-)
	5	80.0	61.2	5.3	特に異常なし	陰性(-)
2 生残魚 筋肉区 (鱗なし)	1	97.5	72.6	9.9	特に異常なし	陰性(-)
	2	99.3	76.8	11.1	特に異常なし	陰性(-)
	3	94.3	73.0	8.4	特に異常なし	陰性(-)
	4	92.5	69.8	8.5	特に異常なし	陰性(-)
	5	86.7	66.7	7.3	特に異常なし	陰性(-)
3 生残魚鱗, 骨付き肉区	1	87.4	68.2	7.1	特に異常なし	陰性(-)
	2	92.0	71.6	9.2	特に異常なし	陰性(-)
	3	94.4	74.9	10.1	特に異常なし	陰性(-)
	4	86.5	66.9	7.9	特に異常なし	陰性(-)
	5	91.9	69.8	9.3	特に異常なし	陰性(-)
4 生残魚鰓区	1	97.8	74.3	10.5	やせ	陰性(-)
	2	101.4	75.6	11.7	やせ	陰性(-)
	3	86.8	67.2	7.2	やせ	陰性(-)
	4	92.7	69.5	8.9	やせ	陰性(-)
	5	92.8	71.9	9.0	特にやせ	陰性(-)
5 発症魚鰓区	1	80.6	63.6	4.7	やせ	陰性(-)
	2	98.0	78.2	10.2	やせ, 鰓弁膨潤	陰性(-)
	3	91.8	70.3	8.9	なし	陰性(-)
	4	89.5	70.1	6.8	やせ, 肝臓: 退色, 鰓弁: 膨潤	陰性(-)
	5	90.4	69.8	8.2	鰓弁: 膨潤, 肝臓: 退色	陰性(-)

表5 試験 - 2, 終了時検査(2006.6.30)

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症状	PCR検査結果 鰓
1 対照区	1	101.2	78.3	11.8	やせ	陰性(-)
	2	91.4	71.7	7.8	やせ	陰性(-)
	3	106.0	81.4	13.3	やせ	陰性(-)
	4	83.8	63.6	5.2	やせ	陰性(-)
	5	96.9	75.3	10.3	やせ	陰性(-)
2 生残魚 筋肉区 (鱗なし)	1	96.0	73.5	9.2	やせ	陰性(-)
	2	91.5	69.3	7.2	やせ	陰性(-)
	3	95.4	72.2	8.3	やせ	陰性(-)
	4	85.1	65.4	5.1	やせ	陰性(-)
	5	82.1	61.7	5.2	やせ	陰性(-)
3 生残魚鱗, 骨付き肉区	1	94.0	72.9	8.5	やせ	陰性(-)
	2	93.5	72.3	8.5	やせ	陰性(-)
	3	82.9	64.4	6.0	やせ	陰性(-)
	4	80.3	61.1	4.8	やせ	陰性(-)
	5	86.9	66.2	6.3	やせ	陰性(-)
4 生残魚鰓区	1	95.6	74.4	10.8	やせ	陰性(-)
	2	98.9	74.8	9.7	やせ	陰性(-)
	3	77.7	58.0	4.3	やせ	陰性(-)
	4	89.5	69.3	7.2	やせ	陰性(-)
	5	88.9	66.3	6.2	やせ	陰性(-)
5 発症魚鰓区	1	93.5	71.7	9.5	やせ, 鰓弁: 膨潤	陰性(-)
	2	84.9	63.0	5.0	やせ	陰性(-)
	3	93.3	72.0	8.9	やせ	陰性(-)
	4	84.0	64.3	5.3	やせ	陰性(-)
	5	90.0	67.9	6.9	やせ	陰性(-)

表6 KHV 感受性等確認試験

No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR検査結果 鰓	備考 死亡月日
1	145.1	116.0	48.0	スレ, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	8月31日
2	155.4	126.6	55.4	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	9月1日
3	149.8	117.9	50.6	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色 (鰓ぐされ)	陽性 (+)	
4	144.0	116.5	44.4	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	
5	129.6	105.0	31.4	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	
6	128.9	102.3	31.7	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	
7	164.1	133.2	70.0	スレ, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	9月2日
8	171.0	138.0	66.1	スレ, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	
9	153.3	125.0	54.4	スレ, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	
10	156.6	126.9	61.1	スレ, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	
11	165.9	137.2	66.1	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	
12	134.4	107.5	38.7	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	
13	151.5	124.5	44.8	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	
14	152.7	124.3	53.8	スレ, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	
15	131.6	105.8	35.2	スレ, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	
16	124.4	101.2	29.4	スレ, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	
17	106.7	91.8	19.4	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	
18	153.4	124.9	53.4	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	9月3日
19	156.9	127.3	54.7	スレ, 鰓弁: 膨潤, 退色	陽性 (+)	
20	162.2	131.5	59.9	水生菌付着, 鰓弁: 膨潤	陽性 (+)	

* 2006年8月24日試験開始

考 察

感染耐過魚の筋肉, 鰓・内臓を添加した水槽に収容した群では, KHV の発症が確認されず, PCR 検査も陰性であった。また, 感染耐過魚と健康魚を同居させても KHV を発症せず, PCR 検査でも陰性であった。このことから, KHV 耐過魚の筋肉, 内臓等については KHV の感染源となる可能性が極めて低いと考えられた。

さらに, KHV 発症魚の鰓を 16000 倍に希釈した水中での飼育試験では, 供試魚の KHV の発症, 死亡は 51 日後まで確認されなかった。これらのことよって, ウイルスの密度が低い場合には, KHV の感染に至らない可能性が高いものと推察される。

一方, KHV 発症魚の鰓抽出液による浸漬試験では, KHV の感染が確認されたことから, KHV 病原因ウイルスは死亡した組織内に留まるために水中に移出する機会が減り, 感染力が低下するのではないかと考えられる。

KHV 感染の可能性については, KHV の実験感染後 1~14 日経過したマゴイと同居させた健康ニシキゴイは感染するものの, 感染後 21 日以降のマゴイと同居した健康ニシキゴイは KHV に感染していない (養殖研, 2006)。また, PCR 法により実験感染 40 日後まで感染耐過マゴイからは KHV が検出されたが, 60 日以降は検出されなくなる (養殖研, 2006) との報告がある。今回の試験で, KHV 発症後 2 ヶ月経過した群の生残魚を KHV 未感染魚と 23 で 30 日同居させた試験区では, 未感染魚の発症, へ

い死も認められておらず, さらに, 供試魚の PCR 検査でも KHV 陰性となっている。しかし, 感染耐過魚と KHV 未感染魚の同居飼育試験では, 1 年半以上を経過した未感染魚で PCR 陽性となった事例 (荒井ら, 2008) もあり, 感染耐過魚の感染条件についてさらに検討する必要がある。

要 約

KHV に感染した群の生残魚 (感染耐過魚) を用いて, KHV 感染源の可能性について検討した。その結果, 次のことが明らかになった。

- (1) 感染耐過魚のファイラー (鱗, 鰭, 骨等除去), 筋肉 (鱗, 鰭, 骨付), 内臓 (肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓), 鰓, 感染耐過魚と未感染魚の同居試験を行った結果, 何れの試験区でも KHV の発症は認められず, PCR 検査でも陰性となった。
- (2) 1 と同様の試験区及び発症魚の鰓を投入した試験区でも KHV の発症は, 確認されなかった。
- (3) KHV 発症魚の鰓から取り出した抽出液に未感染魚を浸漬させた結果, KHV を発症し死亡した。
- (4) KHV 病の原因ウイルスは, 組織内に留まることによって, 感染力が低下することが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、試験魚の提供及び結果に御助言頂いた東京海洋大学教授福田穎穂博士に深く感謝の意を表します。

引用文献

高島葉二，渡邊直樹，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．茨城県内水面水産試験場調査研究報告，39，1-8．
荒井将人，野内孝則，高島葉二（2008）：天然魚にコイヘルペスウイルス病が発生した水域における網いけす養殖コイへの感染．茨城内水試研報，41，39-45．
飯田貴次（2005）：特集 海外からの病気の侵入，コイヘルペスウイルス病．日本水産学会，71(4)，632-635．
福田穎穂（2005）：コイヘルペスウイルス病研究最前線，KHV との共存のみち．魚病研究．40(4)．204．
（独）水産総合研究センター 養殖研究所（2006），第9回コイヘルペスウイルス病に関する技術検討会資料．