

霞ヶ浦における野生コイのコイヘルペスウイルスへの感染動向

中谷仁崇・荒井将人・根本 孝

Survey of wild common carps, *Cyprinus carpio*, infected with KHV in Lake Kasumigaura

Yoshitaka NAKATANI, Masahito ARAI, Takashi NEMOTO

Abstract

KHV-Disease caused by cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) occurred to the net cage cultivated carp, common carp, in Lake Kasumigaura and Lake Kitaura in 2003. Since then all of these cultivated carp still alived in the net-cage was incinerated under the Law of Ensure Sustainable Aquaculture Protection until March 2004. At the same time KHV was detected from the wild common carps in Lake Kasumigaura and Lake Kitaura. However the dynamics of the virus in Lake Kasumigaura are unclear after that.

We collected wild carp samples of Lake Kasumigaura from 2008 to 2010 and attempted to detect CyHV-3 DNA in a tissue of the gills and the olfactory lobe in brains by polymerase chain reaction, PCR, assay and to detect serum anti-KHV antibody with an enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, too. The survey determined that 21 individuals (13.1%) out of 160 individuals in 2008, 60 individuals (35.3%) out of 170 individuals in 2009 and 14 individuals (8.2%) out of 171 individuals in 2010 were positive by PCR assay. And high proportion of fish, as follows 109 individuals (72.7%) out of 150 individuals in 2008, 108 individuals (65.5%) out of 165 individuals in 2009 and 132 individuals (77.2%) out of 171 individuals in 2010, maintained high levels of serum anti-KHV antibody. Furthermore young carp (> 200 mm of body length) maintained high level of anti-KHV antibody, too.

Our results suggested that large proportion of wild common carp in lakes where KHV-Disease had occurred such as in Lake Kasumigaura will not succumb to high mortality.

Key Words : KHV, wild carp, common carp, anti-KHV antibody, Kasumigaura

はじめに

2003年10月、霞ヶ浦、北浦においてKHV病が養殖コイに発生した (Sano, 2004)。この発生は日本におけるKHV病の最初の確認となったほか、天然水域での発生の最初の確認ともなった (高島ら, 2004)。コイヘルペスウイルス (KHV) 病は1998年に初めて確認された疾病であり、感染性が高く養殖場で発生した場合の致死率も高い疾病である (Hedrick, 2000)。霞ヶ浦、北浦ではこのときの養殖用網いけす内のコイへい死量は推定で1,190トンにおよんだ。また、網いけす内で生残していたコイは持続的養殖生産確保法にもとづく特定疾病のまん延防止措置によりその全量となる約2,500トンが焼却、埋却処分された (高島, 2004)。一方、霞ヶ浦、北浦には古くから野生コイも生息しており、KHV病発生前の1993年から2002年まで10年間における野生コイの漁獲量は平均346トンとなっていた (茨城県, 2004)。野生コイのKHV感染状況については、荒井ら (2006) が、霞ヶ浦、北浦において2004年2月から

2005年3月までの間、野生コイのKHV感染状況をPCR検査により調査し、サンプルの11.9%のコイからKHVゲノムを検出したと報告している。しかし、野生コイはKHV病発生以降もその繁殖が確認されており、また野生コイの大量へい死も確認されていない。

このような状況の霞ヶ浦、北浦においては、2005年以降の野生コイのKHVの動向は詳しくは明らかになっていない。そこで継続的に野生コイを採捕し、天然水域におけるKHVの動態を解明することとした。

方 法

2008年から2010年まで、毎年5月、6月、7月、9月、10月、11月に野生コイ (活魚) を小型定置網 (張網) により採集した。毎月の採取尾数は30尾を目標とした。張網の設置位置は霞ヶ浦湖尻部左岸付近にあたる行方市富田地先とした。このほか採集尾数の不足に対応できるように補完的な調査点として霞ヶ浦湖奥部左岸付近にあたる行

方市玉造地先の茨城県内水面水産試験場棧橋も設定した(図1)。採集したコイは全長, 体長, 体重を測定後, 採血と KHV ゲノム検出のための組織の摘出を行った。

KHV ゲノム検出は PCR 分析により行った。PCR のための試料は各個体の鰓弁のほか, 脳組織(嗅葉)を採取して 100%エタノールに保存し, 後の分析に供した。なお, Yuasa et al. (2007) は自然耐過したコイからの KHV ゲノムの検出として嗅葉を用いることの有効性を明らかにしている。PCR のプライマーセットおよび反応プログラムは Yuasa et al. (2005) によった。PCR 分析の結果は, 電気泳動において 290 bp にバンドが現れたものを陽性とした。

また, 野生コイが KHV に感染後免疫を獲得して感染耐過魚として生存しているのかどうかを判断するため, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)によりコイの抗 KHV 抗体の有無を分析した(Adkinson et al., 2005)。血清の採取は以下により行った。試料の尾柄部の尾動脈および尾静脈から魚体サイズに合わせたシリンジで血液を 1ml 採血し, マイクロチューブに入れた。マイクロチューブの血液は室温で数時間静置し, 血球成分の沈降を進行させた後, 冷蔵庫で一晩保管し血球成分の凝固を進めた。次に凝固がすすんだマイクロチューブを 2,000 G で 10 分間遠心分離して血餅と血清を分離した。上清の血清をマイクロピペットで 100 μ l 程度採取して別のマイクロチューブに分注した。血清の入ったマイクロチューブは -80°C で冷凍保存して後の分析に供した。コイ血清中からの抗 KHV 抗体の測定は, 三輪(2010)に基づいて行った。抗 KHV 抗体の保有の有無は, 試料の血清の吸光度(OD 値, (Optical Density))を測定した後, 標準血清の吸光度と比較して, 試料の血清吸光度の相対値が 0.4 より大きいものを高い抗 KHV 抗体価をもつ個体とした。

結 果

行方市富田地先で, 2008 年 5, 6, 7, 9, 10 月は各月 30 尾および 11 月に 10 尾の合計 160 尾を採集した。2008 年は行方市玉造地先では採集しなかった。2009 年は行方市富田地先で, 5, 6 月は各月 32 尾, 7 月 28 尾, 9 月 16 尾, 10 月 15 尾の合計 123 尾を採集した。また行方市玉造地先で 7 月 5 尾, 9 月 9 尾, 10 月 8 尾, 11 月 30 尾の合計 52 尾を採集した。この結果, 2009 年は合計 175 尾を採集した。2010 年は行方市富田地先で, 5, 6, 7 月は各 30 尾, 9 月 27 尾, 10 月 30 尾, 11 月 24 尾の合計 171 尾を採集した。2010 年は行方市玉造地先では採集しなかった。

2008 年に採取した野生コイの魚体サイズは, 標準体長 \pm 標準偏差および体重 \pm 標準偏差として, 369 ± 77 (mm) および $1,129 \pm 741$ (g)であった。同じく 2009 年に採取した野生コイの魚体サイズは, 369 ± 77 (mm) および $1,129 \pm 741$ (g)であった。また同じく 2010 年に採取した野生コイの魚体サイズは, 37.2 ± 7.6 (cm) および $1,079 \pm 666$ (g)

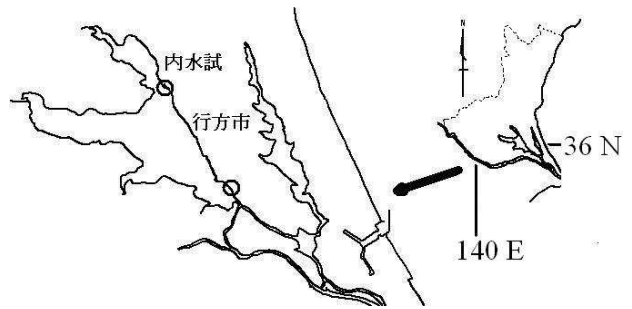


図1. 調査地点位置図 (○: 小型定置網)

表1. PCR 分析における部位別陽性検出数

Yr	2008				2009				2009				
	Month	n	Gill	both	Brain	n	Gill	both	Brain	n	Gill	both	Brain
May	30	1	0	2	30	3	1	2	30	0	0	0	1
Jun	30	0	0	1	30	0	5	5	30	2	0	0	1
Jul	30	6	1	2	32	8	6	3	30	1	0	0	4
Sep	30	1	1	1	25	4	2	6	27	0	0	0	0
Oct	30	1	2	2	23	1	1	2	30	0	0	0	3
Nov	10	0	0	0	30	6	0	5	24	1	0	0	1

n: サンプル数, Gill: 鰓のみで陽性, Brain: 脳のみで陽性, both: 同一個体の鰓脳で陽性

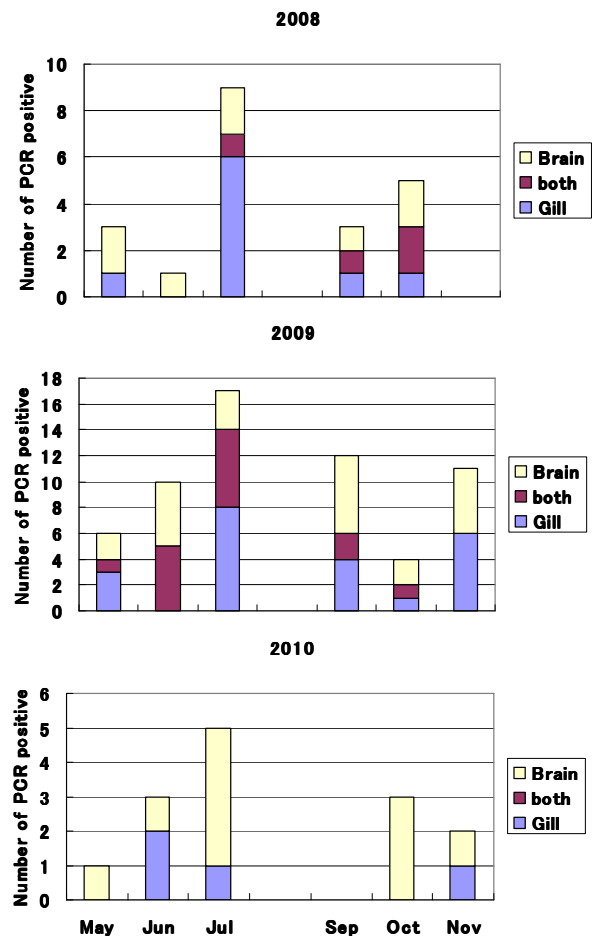


図3. PCR 陽性個体検出数の月別推移. Gill: 鰓のみで陽性, Brain: 脳のみで陽性, both: 同一個体の鰓脳で陽性.

であった。図 2 にこれらの体長組成の月別推移を示した。

2008 年から 2010 年に PCR 分析を行った鰓組織及び脳（嗅葉）組織の結果を検査部位別に示した（表 1）。あわせて、部位別の検出個体数の月別推移を示した（図 3）。その結果、年間を通算した PCR 陽性個体の出現率は、2008 年は 13.1%，順に 2009 年 35.3%，2010 年 8.2% となった。なお、PCR 分析では鰓組織だけでなく脳の嗅葉部位も分析することにより、検出率は鰓部位のみの分析よりも、年により変動したものの、61.5% から 2.5 倍増大した。月別の PCR 陽性個体の出現数はいずれの年も 7 月に最も多くなるが、2009 年と 2010 年は 11 月にも PCR 陽性個体の出現がみられた。

図 4 に霞ヶ浦の水温の推移を示した。これは茨城県内水面水産試験場がその実験用棧橋において午前 9 時に測定している水深 1m 層の実測値である。Gilad et al. (2003), Ronen et al. (2003) によるコイヘルペスウイルスの増殖が比較的容易な水温とされる、水温 15℃ 以上 28℃ 以下の測定回数を実測値からみると、2008 年は年間 241 観測日中 111 回、2009 年は 234 観測日中 131 回、2010 年は 230 観測日中 81 回の観測となった。この結果、2008 年から 2010 年までの PCR 陽性個体出現率の大小と適水温観測回数の多寡には正の相関が認められた。

次に、2008 年から 2010 年までの血中の抗 KHV 抗体価の測定による月別にみた抗 KHV 抗体保有個体の出現結果を表 2 に示した。また、図 5 に高い抗体価（相対値で 0.4 以上）を示した個体の出現率の月別推移を示した。その結果、年間を通算した高抗体価保有個体の出現率は、2008 年は 72.7%，2009 年 65.5%，2010 年 77.2% となった。月別にみた場合の高抗体価を有する個体の出現率は、いずれの年も 6 月または 7 月が最も高く 9 月以降は低く推移する傾向がみられた。しかし 2009 年と 2010 年は 11 月に、その年の最高値に次ぐ値を示していた。

次に、体長と抗 KHV 抗体価の関係（図 6, 7）を示した。OD 相対値で 0.4 以上の高い抗体価を示した個体のうち、最小個体は体長 139mm，次いで 198mm であった。これら個体の採捕時期が 9 月、10 月であることと、図 2 の体長組成の推移からこれらは当歳魚であると判断した。また、体長 200mm を超える個体群の抗体価の平均値はすべての体長区分において 0.4 より大きい値を示した。

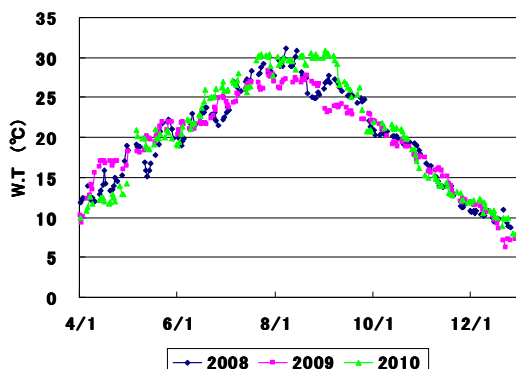


図 4. 霞ヶ浦の水温の推移(水深 1.0 m 層, 毎 9:00 測定値)

表 2. 抗 KHV 抗体保有個体の検出結果

Yr	2008			2009			2010		
	Month	n	OD>0.4 %	n	OD>0.4 %	n	OD>0.4 %		
May	30	19	63.3	30	14	46.7	30	19	63.3
Jun	30	26	86.7	30	25	83.3	30	30	100.0
Jul	30	29	96.7	27	17	63.0	30	30	100.0
Sep	30	18	60.0	25	18	72.0	27	13	48.1
Oct	30	17	56.7	23	11	47.8	30	21	70.0
Nov	-	-	-	30	23	76.7	24	19	79.2

n: サンプル数, OD>0.4: OD (相対値) が 0.4 を超えた個体数

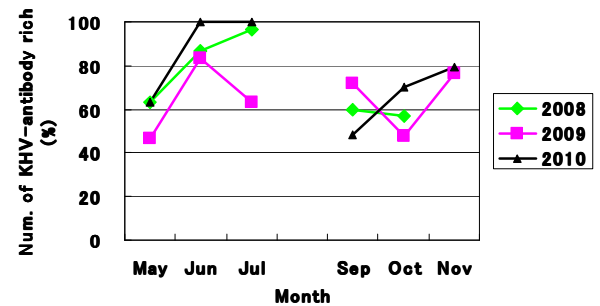


図 5. 抗 KHV 抗体保有個体の出現率の推移.

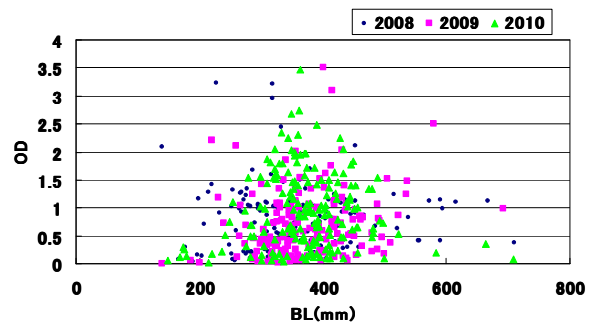


図 6. 体長と抗 KHV 抗体価の関係.

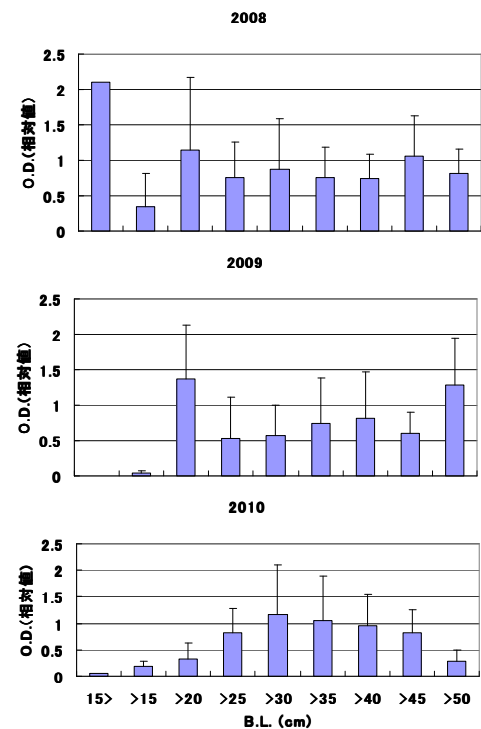


図 7. 体長別抗 KHV 抗体価の平均値 (bar: SD).

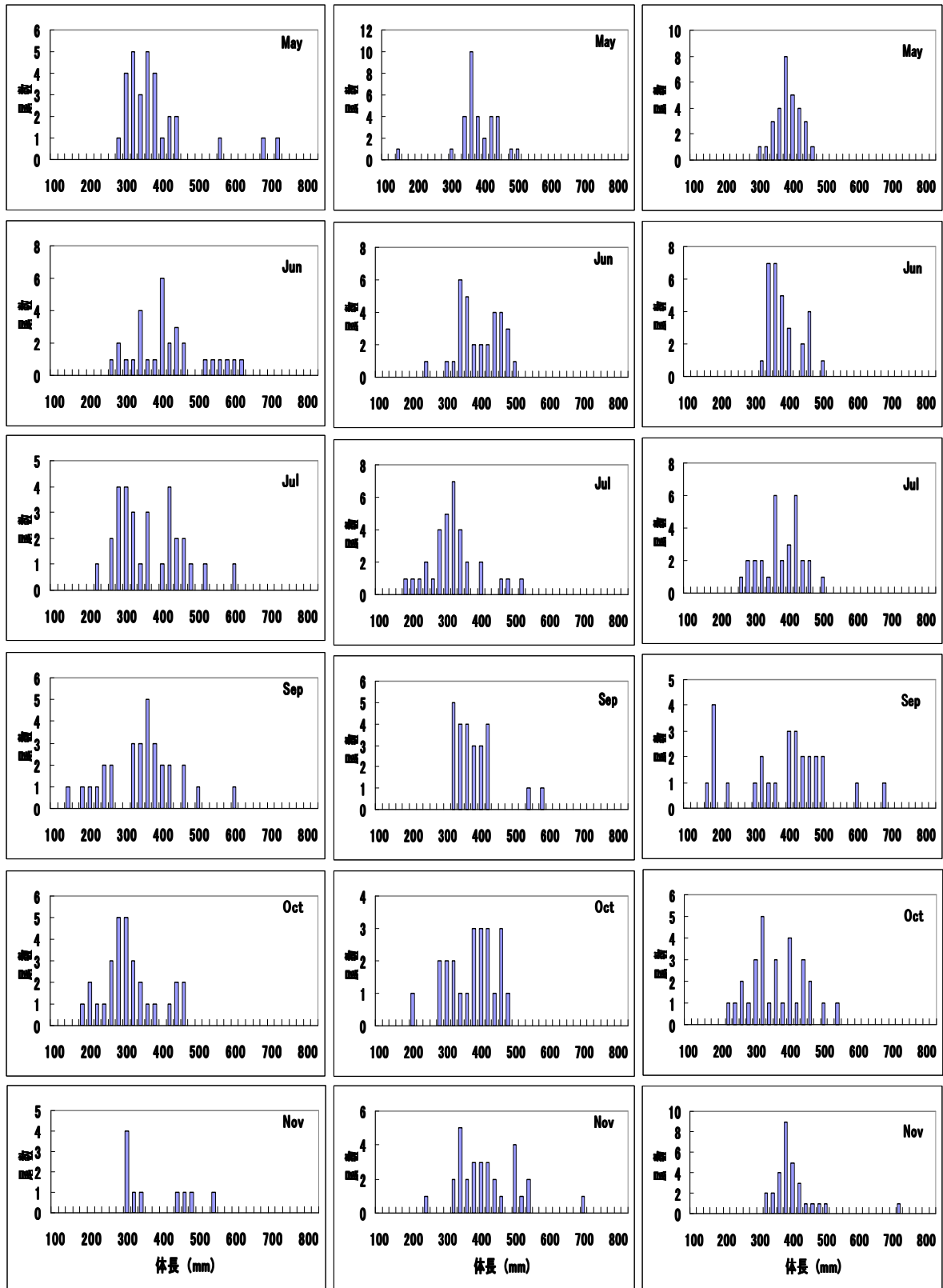


図 2. 採集した野生コイの体長組成の推移 (左: 2008 年, 中央: 2009 年, 右: 2010 年)

また、図 8 に PCR 検査の結果別に体長と抗 KHV 抗体価の関係を示した。2008 年、2009 年の結果では、鰓部位のみ PCR 陽性の個体群と脳部位のみ PCR 陽性となった個体群ではそれらの体長が大小の群に別れる傾向がみられたものの、2010 年の結果からは別れる傾向は明瞭にはみられなかった。

考 察

2008 年から 2010 年における野生コイの鰓組織と脳組織から KHV のゲノムの検出が毎年継続的に検出されたことは、2003 年の KHV 病が発生した後も、霞ヶ浦にはコイヘルペスウイルスが存在していることを示している。Gilad et al. (2003), Ronen et al. (2003) はコイヘルペスウイルスの増殖は 15°C から 25°C の間であるとし、28°C 以上での死亡率の低下と 13°C 以下で死亡がみられないとしている。霞ヶ浦の水温がこれらの適温時期にはいる時期、なかでも 6 月、7 月にその検出率がほかの時期よりも高くなっていることは、霞ヶ浦においてもコイヘルペスウイルスの増殖活性が高くなったことを示唆している。Gilad et al. (2003) は低水温からこの温度帯への水温上昇は KHV 感染魚の死亡率を高めることを実験的に示しているが、霞ヶ浦においても 6 月 7 月の時期は春から夏にかけての水温上昇期にあっており、この時期に KHV の増殖が活発化し、持続感染が起きていることを示している。しかし天然水域では大規模なへい死は確認されていなかった。今回の調査から、年間を通じた PCR 陽性個体の出現率の大小が霞ヶ浦の適水温帯の日数の長短と関連がみられたことは興味深い。まさに KHV の増殖活性温度帯の影響を示しているといえよう。

なお今回、PCR 検査の部位は鰓組織に加えて脳部位組織でも行うことにより PCR 陽性個体の出現率が向上することが示されたことから、コイヘルペスウイルスの保有状況の調査には従来の鰓の他にも脳を検査試料とすることは有効であるとする知見が確かめられた (Yuasa et al., 2007, 日本水産資源保護協会, 2008)。

ELISA による抗体検査の結果、年間を通算して検査個体中 65.5% から 77.2% が 0.4 以上の高い抗体価を示したうえ、2010 年 6、7 月のサンプルでは全ての個体が高い抗体価を示した。このことは、霞ヶ浦の相当割合の野生コイがコイヘルペスウイルスに感染し耐過した個体であることが裏付けられたといえる。

高い抗体価を示した個体の出現率の月別推移をみると、前年の 11 月が比較的高く、翌年の 5 月以降もほぼ同等の水準で推移していると考えられる。これは、12 月から 4 月までの冬季の低水温期における抗体価の変動は不明であるものの、KHV の増殖好適水温期には多くのコイが高い抗体価を保持していることを示している。コイの産卵期が 4 月、5 月頃であることを考慮すれば (鈴木, 1978)、前年の後半から翌年の前半のサンプルは新規加入群のない同一の年齢組成の群である。これは、実質的に霞ヶ浦の相

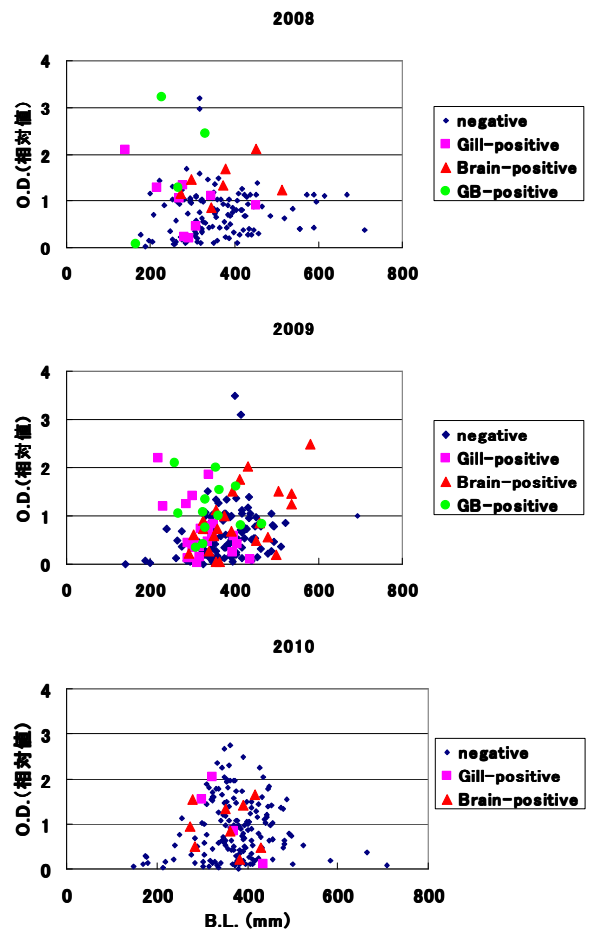


図 8. PCR 分析の結果別体長と抗 KHV 抗体価の関係。

当割合の野生コイはほぼ周年にわたり高い抗体価を保有した状態であるとみなすことができよう。さらに、高抗体価を持つ個体の体長組成から、調査月の後半には当歳魚と推定される個体も高い抗体価を示したことから、当歳魚もその年の秋までにはコイヘルペスウイルスに感染し耐過しうるものといえた。このことから、現在霞ヶ浦に存在するコイヘルペスウイルス株では、霞ヶ浦の野生コイ集団に KHV 病による大量へい死は発生しないものと推察される。このことは、KHV 病の既発生天然水域では KHV は存在し続ける一方、野生コイは感染耐過して生息していることから、KHV に新たな変異などがなければ、それら野生コイ集団では KHV による大量へい死は発生しないことを示唆している。

要 約

- (1) 2008 年から 2010 年まで、毎年 8 月を除く 5 月から 11 月までの間、霞ヶ浦の野生コイを定置網により採集し、PCR により KHV のゲノムの検出と ELISA により血清中の抗 KHV 抗体の測定を試みた。
- (2) 鰓及び脳 (嗅葉) を用いて PCR 分析を行った結果、2008 年に採集したコイ 160 尾の 13.1%、2009 年に採

- 集したコイ 170 尾の 35.3%, 2010 年に採集したコイ 171 尾の 8.2% で KHV ゲノムが検出されたことから, 霞ヶ浦には現在も KHV が存在し, かつ, KHV の持続感染が起きていることが示された。
- (3) ELISA により血清中の抗 KHV 抗体価を測定した結果, 2008 年に採集したコイ 150 尾の 72.7%, 2009 年のコイ 165 尾の 65.5%, 2010 年のコイ 171 尾の 77.2% で, 高い抗 KHV 抗体価を示した。
- (4) 高 KHV 抗体価の保有個体の月別出現率は, 例年 6 月または 7 月が最も高くなり, この間の出現率は最低でも 83.3% を示した。また, 当歳魚も高い抗体価を示した。
- (5) 霞ヶ浦の野生コイは抗 KHV 抗体の保有状況からみて, 当歳魚も含めて相当割合が KHV に感染耐過しているといえることから, 今後野生コイには KHV による大量へい死は起こらないものと推察された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり, 長期間にわたりサンプルの採集に多大なるご協力をいただきました麻生漁業協同組合代表理事組合長吉崎佐兵衛様に心より御礼申し上げます。また, 独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所三輪理博士, 湯浅啓博士には多大なる御助言ご指導を賜りましたほか, 三輪理博士には一部標本の抗体価測定にご協力頂きましたことを衷心より御礼申し上げます。なお, 本研究は平成 20, 21 年度新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業, 平成 22 年度レギュラトリーサイエンス新技術開発事業の資金等により行った。

文 献

- Adkinson, M. A., O. Gilad, R. P. Hedrick (2005) : An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to the koi herpesvirus (KHV) in the serum of koi *Cyprinus carpio*. *Fish pathology*, 40(2), 53-62.
- Gilad, O., S. Yun, M. A. Adkison, K. Way, N. H. Willits, H. Bercovier, R. P. Hedrick (2003) : Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on motality of experimentally infected koi. *Journal of General Virology*, 84, 2661-2668.
- Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. V. Spangenberg (2000) : A Herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. *Journal of Aquatic Animal Health*, 12, 44-57.
- Ronen, A., A. Perelberg, J. Abramowitz, M. Hutoran, S. Tinman, I. Bejerano, M. Steinitz, M. KotlerRonen et al. (2003) : Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*, 21, 4677-4684.
- Sano, M., T. Ito, J. Kurita, T. Yanai, N. Watanabe, S. Miwa, T. Iida (2004) : First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathology*, 39(3), 165-167.
- Yuasa, K., M. Sano, J. Kurita, T. Ito, T. Iida (2005) : Improvement of a PCR method with the Sph I-5 primer set for the detection of koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathology*, 40(1), 37-39.
- Yuasa, K., M. Kawana, T. Ito, M. Sano, T. Iida (2007) : Fate of koi herpesvirus (KHV) in surviving fish post infection. Is the brain the final habitat for the virus?, 13th international conference of the EAFP, 17-22 Sep 2007, Abstract, p.103.
- 荒井将人・野内孝則・高島葉二 (2006) : 霞ヶ浦・北浦における天然コイのコイヘルペスウイルス病の感染状況. 茨城内水試研報, 40, 37-43.
- 茨城県(2009) : 茨城の水産, 茨城, pp.107
- 三輪理(2010) : ELISA によるコイ血清中からの KHV 抗体測定法. 養殖研究所, <http://nira.fra.affrc.go.jp/KHV/ELISA.html>, 平成 23 年 2 月 1 日アクセス.
- 日本水産資源保護協会(2008) : 特定疾病診断マニュアル, 東京, pp.80
- 鈴木亮(1978) : 水族育種基礎データ 1)コイ, 水産育種, 3, 22-27.
- 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. 茨城内水試研報, 39, 1-8.

* 本研究の一部は平成 23 年度日本水産学会春季大会講演要旨集 (1105, p156)に掲載した。