

昇温処理したコイヘルペスウイルス感染魚の KHV感染水域での長期飼育観察

根本 孝・中谷仁崇・荒井将人・野内孝則

Long term observation of naturally resistant to KHV in cultured carp, *Cyprinus carpio*, in Lake Kasumigaura

Takashi NEMOTO, Yoshitaka NAKATANI, Masahito ARAI, Takanori YANAI

Abstract

KHV-disease among cultured common carp, *Cyprinus carpio*, has occurred in Lake Kasumigaura in October 2003. This viral disease has caused severe financial losses to carp culture households in Lake Kasumigaura. PCR assay also showed the long term presence of KHV DNA in wild carp population in Lake Kasumigaura. In this study, in order to eradicate KHV disease from carp culture we were involved in the treatment of KHV infected juvenile rearing at permissive temperature 23 °C which the virus induces a lethal disease and subsequently transferred to them at non-permissive temperature 32 °C. Then we reared the juveniles in net-cages in Lake Kasumigaura for 2 years and 10 months long at maximum with a large scale so as to commercial scale culture. In this rearing, the net-cage which has a volume of 8 m³ contains 500 individuals of the juvenile (BW 47 g in average). After 2 years and 10 months, its survival rate showed 81.4 %, besides the survival rate of non-treated juvenile of transferring temperature showed only 22.2 % within 7 months. PCR assay showed the 96.2 % among 26 individuals of dead fish of non-treated juvenile were positive. These results suggested that cultured carps that were transferred to the non-permissive temperature 32 °C with KHV infected become resistant to KHV presence in Lake Kasumigaura.

Key Words: **KHV, naturally resistant, *Cyprinus carpio*, Lake Kasumigaura, cultured carp**

はじめに

KHV病が我が国で最初に確認されたのは、2003年10月に霞ヶ浦および北浦の網いけすで大量へい死した養殖コイからである (Sano et al., 2004; 高島ら, 2004)。霞ヶ浦および北浦では持続的養殖生産確保法に基づくKHV病のまん延防止措置により、網いけす内の生残魚の全量が焼却処分され、その数量は霞ヶ浦および北浦の合計で約2,500 tにのぼった (高島ら, 2004)。このような状況下で養殖用種苗として導入した他の水域由来のKHV未感染コイ稚魚を霞ヶ浦の網いけすに收容するとKHV病を発症しへい死することが確認されている (荒井ら, 2008)。また、霞ヶ浦の野生コイから毎年KHVゲノムが検出されており、KHV病の既発生水域にはKHVが定着していることが示されている (荒井ら, 2006; 中谷ら, 2011)。一方、KHV感染魚を高水温環境下に一定期間おくことによりその後感染魚はKHVへの耐性を示すことが知られている (Ronen et al., 2003), 福田 (私信)。これをうけて、高水

温への昇温処理を行った群を霞ヶ浦で網いけすに收容しKHVの増殖適期を含む6ヶ月間飼育したところ、その生存率は約90%であり、既発生水域中でもこの間十分なKHV病耐性を示すことが明らかとなっている (Niwa et al., 2008)。本研究では、霞ヶ浦における商業規模におけるコイの網いけす飼育期間が、霞ヶ浦へのコイ稚魚の收容後、取り上げ出荷までの期間がおおよそ2年であることに着目し、2年以上の期間の飼育における生存性を明らかにすることを目的として、昇温処理魚のKHV感染水域中における生存性について、さらに7ヶ月から最長で34ヶ月間にわたり観察した。

方 法

昇温処理魚の作出は以下のとおり行った。KHVに人為感染させたコイ稚魚を、水温を23℃に保った水槽で無給餌で一定期間飼育し、魚群の外観症状などからKHVへの十分な感染が確認された後に水温を32℃に上昇させ、

32°Cで5日間飼育した。その後水温を23°Cに降下して、23°Cで3日間飼育した。これを1セットとしてこの昇温操作を3回行った(Niwa et al., 2008; 福田 (私信))。

昇温処理を行う供試魚は、同一親魚群から2006年から2008年まで毎年5月に採卵し、陸上池で養成したコイである。昇温処理は当歳魚を用いた。昇温処理後霞ヶ浦の網いけすに収容するまでの間は、陸上池においてかけ流しによる地下水での隔離飼育とした。網いけすへの収容は、昇温処理後の翌春、概ね3月から5月までの期間に行った。一部の区画では、昇温処理後直ちに当歳魚を収容した。網いけすは茨城県内水面水産試験場実験用棧橋に設置した網いけす(2m×2m×2m)であり、各区画にそれぞれ500尾づつ(62.5 ind./m³)収容した。同時に、同腹の稚魚で昇温処理を行っていない魚と他の水域から導入した親魚の異なるKHV未感染魚も個別の網いけすに収容した。

網いけすでは1日2回の自動給餌により養成した。給餌量は常法によった。網いけすでの飼育期間中は、毎日へい死の有無を記録したほか、定期的に網いけすを取り上げて生残魚の全数を計数、計量を行った。生存率は、収容尾数に対する月毎の残存数の割合として求めた。なお、残存数は毎月の浮上したへい死魚数を除いたものとしたが、全数計数時に誤差が生じた場合は月別へい死数を補正した。確認されたへい死魚の腐敗の進行が軽度であると判断される場合、適宜、へい死魚の鰓部位からのKHVゲノムの検出をPCR法(Yuasa et al., 2005)により行った。また一部の生残魚についても鰓部位からのKHVゲノムの検出を行った。

結 果

表1に昇温処理魚の作出と網いけすへの収容の経過を示した。区画Iから区画Vの収容時の魚体重は32.0gから65.8gの範囲にあり、五つの区画の平均で47.0gであった。また区画VIの平均体重は780gであった。表中の区画Iから区画Vは2006年から2008年まで毎年、同一の霞ヶ浦産親魚群から採卵したF1である。うちIからIIIは昇温処理を行った後に、IVとVは昇温処理を行わずに霞ヶ浦で飼育を開始した。なお、採卵に用いた霞ヶ浦産親魚は2003年にKHV病が霞ヶ浦の網いけすで発生した際の生存魚である(荒井ら, 2008)。区画VIは、静岡県榛原郡吉田町にある東京海洋大学水圏科学フィールド教育研究センター吉田ステーションで継代飼育されている魚を由来とするKHVに感染していないコイである。このコイは、吉田ステーションから茨城県内水面水産試験場に分譲された後、網いけすに収容するまでの間、同試験場内において、

表1. 網いけす収容区画別のコイ稚魚の由来

区画	ふ化年	昇温処理の有無	網いけす収容開始年月	収容期間(月)	親魚の系統
I	2006	有り	2007年5月	34	霞ヶ浦産
II	2007	有り	2008年5月	22	
III	2008	有り	2009年3月	21	
IV	2006	なし	2007年5月	7	
V	2007	なし	2008年5月	8	
VI	2005	なし	2008年5月	3	東京海洋大学継代魚

表2. 区画別生存数の推移

経過月数	I	II	III	IV	V	VI
0	500	500	500	500	500	20
1						20
2						13
3						0
7	447	433		111		
8					197	
9			409			
13		433				
15						
19	438					
21			385			
22		422				
26	420					
34	407					
へい死合計	93	78	115	389	303	20
最終生存率%	81.4	84.4	77.0	22.2	39.4	0.0
月間死亡率%	0.55	0.71	1.10	11.1	7.58	33.3

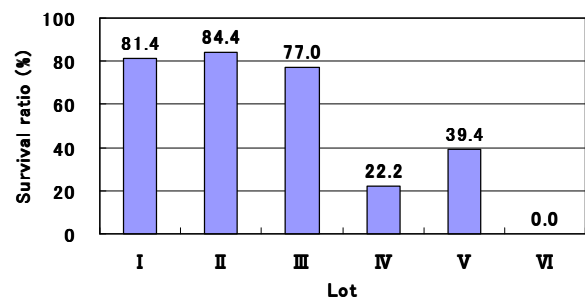


図1. 網いけす飼育終了時の生存率。

屋内に隔離した環境下で、地下水により飼育されていた。

表2に霞ヶ浦での飼育中の生存数の推移を示した。これは区画毎に一定の月数を経過する毎に、網いけすから全数を取り上げて生存数を計数した結果である。その結果、最長の飼育期間となった区画Iでは、網いけすへ収容後34ヶ月時点での収容尾数に対する生存率は81.4%であった。また、区画II、区画IIIの生存率は84.4%と77.0%であった。一方、同一親魚由来であって昇温処理を行っていない区画IVとV区画Iでは、経過月数が7月間と8月間で生存率は22.2%と39.4%にとどまった。さらに区画VIでは3ヶ月経過時点で全数がへい死した(図1)。

区画Iから区画VIまで、それぞれの経過月数が異なるため、経過月数で除して月平均死亡率を求めると、区画Iから区画IIIは、0.55%から1.10%の範囲にあり、区画IV、V、VIは順に11.1%、7.58%、33.3%となった。このことから、昇温処理の有無により生存率に違いがみられた。しかしながら、区画毎の月平均死亡率も経過月数が長いほど低くなる傾向がみられることから、経過期間の影響を小さくするため、全ての区画で共通して全数の計数時期が近い、経過月数7月から9月の時点での生存数をもって月平均死亡率を求めた。その結果、区画IからIIIは1.51%から2.02%の範囲となったことから、いずれにおいても昇温処理の有無により、網いけす中の飼育における生存率に差が認めら

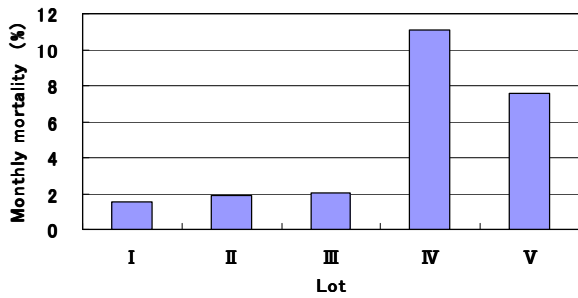


図 2. 網いけす飼育期間が7ヶ月から9ヶ月時点での月平均死亡率.

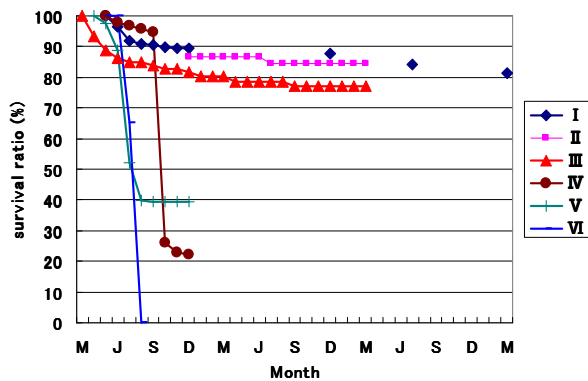


図 3. 網いけす中の生存率の月別推移

れた (図 2)。

図 3 に、表 2 の結果と毎日のへい死魚の有無の結果をあわせた月別の生存率の推移を示した。図の表記では、各区画の網いけす飼育開始年は異なっているが、いずれも同一年に飼育を開始したものとして示している。その結果、区画 I から III は、その生存率は緩やかな漸減傾向を示し、約 2 年を経過しても高い生存率を示していた。一方、区画 IV から VI は、いずれも網いけすに収容後半年以内に生存率がかなり低下した。このことから、昇温処理の有無により長期間の飼育における生存率に大きな違いが表れてきていることがわかる。

図 4 に月別のへい死の発生割合を示した。これは区画毎にどの月にへい死が生じるかを明らかにするため、毎日の観察から確認したへい死尾数に対する月別の分散割合として示している。その結果、全体的にみれば 6 月から 8 月の間にへい死が集中していることがわかる。しかし、区画 III は 4 月にへい死が集中しており、区画 IV は 10 月にへい死が集中していた。また、区画 II は 7 月にのみへい死魚が確認された。なお、区画 III は他の区画と異なり、3 月に網いけすへの収容を開始し、翌月に多くのへい死が生じた。区画 III に収容した 2009 年 3 月 24 日の午前 9 時の霞ヶ浦の表面水温は 11.5°C であった。

表 3 に KHV ゲノム検出を目的とした PCR 分析の結果を示した。区分としては昇温処理魚群と昇温未処理群および東京海洋大学由来コイとし、それぞれへい死魚と活魚に

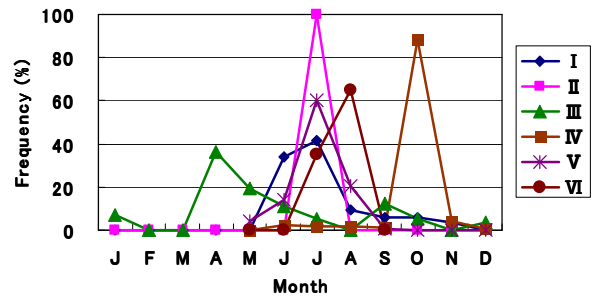


図 4. 区画別網いけすにおけるへい死発生の月別割合.

表 3. PCR 分析結果

区分	I, II, III		IV, V		VI
	へい死	活魚	へい死	活魚	へい死
検査尾数	12	100	26	95	9
PCR陽性数	1	2	25	16	4
KHV陽性検出率 (%)	8.3	2.0	96.2	16.8	44.4

分割して示した。活魚からの鰓組織の採取は全量取り上げ時に無作為抽出して行った。へい死魚からの採取は、へい死魚の状態をみて適宜採取の可否を判断した。通常、網いけすでのへい死魚は、浮上している状態で発見されるが、それは多くの場合へい死後網いけすの底へ沈んだものが、腐敗の進行にともなう腹腔内へのガスの充満に伴い浮上してくるため、浮上魚は組織の腐敗が進行しているものが多いためである。この結果、昇温未処理魚での PCR 陽性の割合は、昇温処理魚での割合よりも高かった。特にへい死魚の PCR 陽性の割合は、昇温未処理魚の方が昇温処理魚よりも有意に高かった。また、昇温処理魚の死因は KHV との関連の判断はつかなかったが、昇温未処理魚の死因は KHV 感染によるものといえた。

考 察

2003 年に霞ヶ浦で KHV 病が発生した後、網いけすの養殖コイ魚は焼却処分され、霞ヶ浦でのコイ養殖は操業の休止を余儀なくされたところである。しかし、霞ヶ浦におけるコイ養殖の生産量は日本最大の規模をもって行われていたこともあり、養殖業者は早期の養殖の再開を望んでいた。しかし、荒井ら(2008)は、陸上で生産したコイ稚魚を霞ヶ浦に移動すると KHV 病を発症して死亡することを明らかにしているように、通常、稚魚の生産では、操業の再開が期待できないことを意味した。一方、霞ヶ浦の野生コイは当然に回収は不可能であったうえ、2003 年以降も生息が確認されていた。このことは KHV 感染耐過魚も生息しうることを意味しているが、事実、荒井ら(2006)や中谷ら(2011)により、KHV が霞ヶ浦に相当の長期にわたり存在することが明らかとなったことは、養殖の再開には少なくとも、KHV 感染水域中であっても KHV の耐病性を有する稚魚を導入することが条件となったといえた(根本、

2010)。

KHV に対する免疫法として、KHV が増殖しない水温帯である 30℃以上にコイを移すことで KHV への耐性を獲得することは Ronen et al. (2003)、福田 (私信) によってすでに示されていたが、実験室規模であったため、大規模な商業レベルでの霞ヶ浦での網いけす養殖に活用できるかは不明であった。従来、霞ヶ浦では、網いけす(5m×5m×2.5m=62.5m³)1 面につき、商品サイズのコイの場合 2,000 kg 程度(32 kg/m³)収容しているほか、網いけすへ最初に収容する稚魚でも 1 面あたり 10,000 尾程度(160 尾/m³、体重 50 g の場合 8.0 kg/m³)収容していたため、1 区画あたりの魚群量は大きい (野内 私信)。

Niwa et al. (2008)は、昇温処理魚の感染水域における大規模飼育として、平均体重 37.2g の稚魚、合計 138.5kg を 59.5 尾/m³ の密度で行ったが、今回の昇温処理魚の収容でも平均体重 47.0g の稚魚、合計 23.5kg を 62.5 尾/m³ の密度で開始しており、両者の密度はほぼ同じといえた。長期飼育の結果、約 2 年を経過した区画 I から III の飼育終了時点での均体重は 1,773g から 2,060g となり、十分に商品サイズまでの成長を示していた。また、昇温未処理魚の区画 IV、V においても、飼育終了時点でそれぞれ平均体重は 897g と 957g となり、順調な成長を示したといえた。しかし、昇温処理の有無により生存率に大きな差がみられたことから、今回の収容密度は従来の収容密度と比較して 1/2 以下であるものの、商業規模でのコイ養殖において、生存率向上させる上では昇温処理の効果は大きいといえた。一方、由来を異にする区画 VI は、収容時の平均体重が 780g であり、他の区画との収容時サイズの差も大きく、単純に生存率を比較することに注意を要するが、明らかに KHV 耐性が弱い結果となった。また、区画 VI は昇温処理の有無では区画 IV、V と同じであるが、生存率に違いが生じており、このことは、稚魚の系統による KHV 耐性の違いも示唆される結果となったことは興味深い。福田(私信)も、区画 VI のコイは KHV への感受性が極めて高い系統であるとしている。このことは KHV 耐性を有する系統の選抜による KHV 耐性コイの生産の可能性を示している。

区画 VI では比較的短期間に急激に生存率が低下し、その外観症状から KHV 病の病徴がみられていた。しかし、区画 VI のへい死魚の PCR 分析による KHV ゲノムの陽性反応は約 40%となり、高い検出率ではなかった。これは、すでに組織の腐敗がかなり進行していたことも影響しているといえた。この傾向は他の区画のへい死魚も同様といえたが、KHV 病の外観症状から概ね臨床診断は可能であった。事実、霞ヶ浦の水温変化は概ね 5 月から 11 月までは水温 15℃以上であり KHV の増殖好適水温帯が長期間形成されている環境にある。区画 III は他の区画と異なる時期に収容したこともあり、4 月に多くのへい死が発生したが、収容時の霞ヶ浦の水温が 11.5℃とやや低温であったことからため、それを契機とする細菌性白雲症など、細菌症や寄生虫症の発生が影響したものと考えられた。

要 約

- (1)昇温処理による KHV 耐性の効果が、KHV 病既発水域の天然水域での養殖においてもみられるかを明らかにするため、長期間にわたる飼育観察を行った。
- (2)霞ヶ浦由来の同一の親魚群から、2006 年から 2008 年まで毎年生産したコイ稚魚を用いて、当歳魚に KHV を人為感染させた後、昇温処理を行った。
- (3)昇温処理魚と同腹の昇温未処理魚等を 2007 年から 2009 年まで毎年 5 月頃から霞ヶ浦の網いけす中に収容して通常の給餌を行いながら、飼育観察を行った。
- (4)毎日の観察や一定期間毎に飼育魚の全数計数から、へい死による減耗の動向を追跡し、最長で 34 ヶ月間飼育した。また、へい死魚等について適宜 PCR 分析による KHV ゲノムの検出を試みた。
- (5)昇温処理を行った群の生存率は、網いけすへ収容後 34 ヶ月経過の区画では 81.4%、2 ヶ月経過の区では 84.4%、21 ヶ月経過の区では 77.0%であった一方、昇温未処理群は、7 ヶ月経過区、8 ヶ月経過区でそれぞれ 22.2%と 39.4%にとどまったほか、他の水域から導入した KHV 未感染魚は 3 ヶ月経過で全滅した。
- (6)PCR 分析の結果、いずれの区画においてもへい死魚、生存魚ともに KHV ゲノムが検出されたが、特にへい死魚からの検出率は昇温未処理魚のほうが昇温処理魚よりも有意に高かった。
- (7)昇温処理魚を霞ヶ浦において最長 34 ヶ月間の商業規模での網いけすの長期飼育を行ったところ高い生存率を示したことから、KHV 耐性の効果が持続していると示された。

謝 辞

本研究の実施にあたり、東京海洋大学教授福田穎徳博士には数多くの御助言ご指導を賜りましたほか、同大学で保有されている実験魚の提供もいただきましたことに対しまして心より御礼申し上げます。

文 献

- 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.
- 荒井将人・野内孝則・高島葉二(2008): 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. 茨城内水試研報, 41, 33-38.
- 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.
- 根本 孝(2010): コイヘルペスウイルス病克服へ向けた生産現場の挑戦. 農林水産技術研究ジャーナル, 33(7), 24-28.

- 中谷仁崇・荒井将人・根本 孝(2011): 霞ヶ浦における野生コイのコイヘルペスウイルス感染動向. 茨城内水試研報, 44, 1-6.
- 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.
- Niwa, S., M. Arai, T. Yanai, T. Hoshino (2008): Production of koi herpesvirus-tolerant carp. 5th World Fisheries Congress, Tokyo, Aquaculture, Abstract.
- Ronen A, A. Perelberg, J. Abramowitz, M. Hutoran, S. Tinman, I. Bejerano, M. Steinitz, M. KotlerRon 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.
- *本研究の一部は、平成 21 年度日本水産学会秋季大会で発表した。The Japanese Society of Fisheries Science, Autumn Meeting 2009, Abstracts, 345, p. 45

(2003): Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*, Vaccine, 21, 4677-4684.