

KHV 感染コイの高水温環境における生残と 抗 KHV 抗体の産生過程

根本 孝・中谷仁崇

Observation of survival and KHV antibody production of common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to KHV under the condition of water temperature transferred to higher degree

Takashi NEMOTO and Yoshitaka NAKATANI

Abstract

KHV disease by CyHV-3 causes a fatal disease in common carp. In 2003 this viral disease has caused severe financial losses to carp culture households in Lake Kasumigaura. The virus induces a lethal disease especially from May to July and from September to October in Lake Kasumigaura. In this study we demonstrate that large amount of common carp juveniles, it contains 174 kg, 7,340 individuals (BW 23.7 g), exposed to the virus at 23 °C for 6 days and then transferred to higher temperature in 32 °C for 5 days in the same tank and after an interval of 3 days in 23 °C, transferred to in 32 °C for 5 days again. Next we again transferred carps in 23 °C in 3 days and 32 °C in 5 days. In all this procedure, its survival rate showed 90.8 % in number. Within 72 hours after transferred to 32 °C at the first term, a high level of anti-KHV antibody in serum was detected among some carps. Then carps became resistant to a challenged infection. In this study we suggest these treated juveniles reduced its mortality from around 80 % to 20 % in net-cage culture in Lake Kasumigaura.

Key Words: **CyHV-3, KHV, naturally resistant, common carp, temperature**

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トンにおよび、すべての養殖コイは持続的養殖生産確保法にもとづき約2,500トンが焼却、埋却処分された (高島, 2004)。その後、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収容するとKHV病を発症しへい死することが確認された (荒井ら, 2008)。また、野生コイの感染動向調査から、霞ヶ浦にはKHVが定着していることが示された (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)。しかしこれらは実験室レベルでの知見であるため、霞ヶ浦での商業規模としてのコイ養殖への技術適用の可能性を明らかにする必要がある。そこで、KHVに人為感染させた大量のコイ稚魚を用いた大型水槽における昇温処理を試み、その処理過程における生残とKHV耐性の指標となる抗KHV抗体の産生の動向を観察した。

方 法

供試魚のコイ稚魚は、民間養殖業者が霞ヶ浦の野生コイから自然産卵により採卵し、陸上池において地下水で養成したものをを用いた。昇温処理に用いた数量は174 kg、推定尾数 7,340尾である。コイ稚魚の平均体重は23.7 gであった。コイ稚魚へのKHVへの人為感染は、KHV病発症コイの鰓を磨砕して調整した磨砕液を2,500倍希釈にした

水槽水で、稚魚の全量を一括して23°C、3時間浸漬することにより行った (Niwa et al., 2007; 野内・荒井, 2008)。この2,500倍希釈磨砕液の感染価は、 $10^{4.3}$ TCID₅₀/mlである。浸漬後の稚魚は、コンクリート製水槽5つにほぼ均等に分けて収容した。水槽の容積は2.88 m³である。水槽への注水は地下水を10 l/minのかけ流しとした。毎日の給餌量は魚体重の2%相当量の配合飼料を与えた。収容中は適宜溶存酸素量を測定し、必要に応じ酸素ポンプによる酸素ガスの給気を行った。水温の設定は、平常時は23°Cとし、高温時は32°Cとした。

昇温は、魚群への十分なKHVな感染が認められた時点で開始した。水温変化は23°Cから昇温して水温32°Cを5日間継続した後、インターバルとして23°Cに3日間戻した。これを1セットとして、合計3セット行った (Niwa et al., 2007; 福田, 私信)。昇温期間中は、随時水温、溶存酸素量を測定するほか、へい死魚は速やかに除去した。昇温処理中におけるコイ血清中の抗KHV抗体の産生の有無をELISAにより分析した (Adkinson et al., 2005)。血清の採取は、人為感染終了時、昇温開始後1日目、同じく3日目、2回目の昇温開始直前および2回目の昇温終了時に行った。なお、採血したコイは再び水槽に戻した。コイ血清中からの抗KHV抗体の測定は、試料の血清の吸光度 (OD値, (Optical Density)) の測定によった。OD値は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 (三輪, 2010)。昇温処理の終了した稚魚の一部は、磨砕液希釈水に浸漬してKHVへの再感染を行い、水温23°Cで一定としたガラス水槽中に収容し、昇温処理の効果を把握するためKHV耐性の有無を観察した。

結 果

1) 温度操作

表1に水槽別のKHV感染魚の収容量を示した。平均体重23.7gの稚魚を、1水槽につき平均34.9kg、1,460尾で収容した。このとき各水槽は438尾/m³から622尾/m³の密度であった。昇温を開始するにあたり条件となる、収容魚がKHVへ十分感染したか否かの判断は、2つの観点で行った。それは、外観症状の観察と毎日のへい死魚数の変化である。外観症状では、KHV病の症状として特徴的である、遊泳緩慢や遊泳異常としての跳びはねの有無、体表粘液分泌の過多、表皮の荒れや損傷が、群の相当の割合にみられるかの点で判断した (日本水産資源保護協会, 2008; OIE, 2009)。また、へい死魚数の観点では、池毎に計数したその日のへい死魚総数が、前日のへい死魚総数の2倍以上となった時点をもって、昇温を開始する日として判断した。今回の昇温では、この2つの観点のうちへい死魚数による判断を優先して行った。昇温開始日が決定することにより、その後の温度変化の予定が決定することとなる。今回の実験では、5つの水槽における昇温開始日は同一となった。

表1. KHV感染魚の昇温処理用水槽への収容状況

水槽番号	I	II	III	IV	V
収容量 (kg)	30.7	39.9	30.0	42.6	31.1
収容数 (尾)	1,290	1,680	1,260	1,790	1,310
密度 (kg/m ³)	10.7	13.9	10.4	14.8	10.8
密度 (尾/m ³)	448	583	438	622	455

表2. 区画別昇温処理過程中のへい死尾数の推移

日数	水温	(尾)				
		I	II	III	IV	V
1	23	3	0	0	0	0
2	23	2	1	2	0	0
3	23	2	1	0	1	1
4	23	-	-	-	-	-
5	23	11	4	10	2	2
6	23	48	18	81	17	5
7	32	235	85	216	107	101
8	32	46	24	24	30	39
9	32	1	3	3	9	6
10	32	0	2	2	1	0
11	23	-	-	-	-	-
12	23	0	1	0	0	2
13	23	0	0	0	0	0
14	32	0	0	0	0	0
15	32	71	1	0	0	4
16	32	0	0	0	0	0
17	32	1	2	1	0	0
18	23	0	0	0	0	0
19	23	-	-	-	-	-
20	23	0	1	0	0	1
21	32	1	0	0	0	0
22	32	0	0	0	0	0
23	32	0	0	0	0	0
24	32	0	0	0	0	0
25	23	-	-	-	-	-
26	23	0	0	0	0	0
27	23	0	0	0	0	0
28	23	0	0	0	0	0
29	23	0	1	0	0	0
30	23	0	0	0	0	0

表2に感染後のへい死尾数の推移を示した。水槽収容後1日目、2日目のへい死はハンドリングによる影響が主な要因であるとみられた。感染後5日目から6日目にかけてへい死尾数が増加しはじめた。この場合、感染後6日目の朝に確認されたへい死尾数がすでに前日のへい死尾数の2倍を超過したため、その日に昇温を開始した。表2中の水温は設定値を示すが、感染後7日目が32°Cとなるのは6日目に昇温を開始しているものの、昇温開始24時間後の時点の日をもって32°C1日目としたためである。また、水槽Iにおいて15日目に発生したへい死は、飼育中の酸素供給における支障が生じた酸欠によるものであ

る。なお、各水槽における毎日の測定における水温の実測値と設定水温との水温較差は小さく、期間中を通した毎日の水温較差は、平均較差±標準偏差で $-0.06 \pm 0.26^{\circ}\text{C}$ で推移し、水温条件は予定どおり設定できた。表 2 から明らかかなように、最初の昇温の時点では急激にへい死尾数が増加したが、翌日以降急激にへい死尾数は減少した。この間の各水槽におけるへい死尾数は 7 日目から 9 日目にかけて指数関数的に減少した。それ以降はいずれの水温においてもへい死はほとんどみられなかった。この結果、KHV の病勢によるへい死は 9 日目には終息したものとイえた。30 日経過後に稚魚をすべて取り上げて計数した結果、その時点での生存率は水槽毎でみると 67.6% から 91.4% となった。また、水槽 I において酸欠によるへい死分を除いた場合、昇温処理全体としての生存率は 90.8% となった。取り上げ時点での平均体重は 25.1g となっていた。

2) 抗 KHV 抗体価測定

昇温処理中の抗 KHV 抗体の産生の有無をみるため、コイの血清を、実験開始からの経過日数で 1 日目、7 日目、9 日目、13 日目、17 日目の 5 日にわたり、毎回、水槽 I から無作為に取り出した 3 尾から採取し、血清中の抗 KHV 抗体価を測定した。1 検体の吸光度は 3 連で測定しその平均値を標準血清における吸光度と比較した。図 1 に吸光度の測定結果を示した。その結果、9 日目の 3 検体中 1 個体から抗 KHV 抗体価をもつと判断できる OD 値 0.4 を超える個体が検出された。各測定日毎の検体数は 3 尾にとどまったが、13 日目に 3 個体中 1 個体、17 日目に同 2 個体が高い OD 値を示した。

3) KHV 再感染実験

昇温処理による KHV への耐性の有無をみるため、KHV 感染後から 30 日経過後の生残魚から無作為に 30 尾を抽出し、同様の方法で人為感染による KHV への再感染を行った。比較対象として、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稚魚 (平均体重 52.5g) 10 尾に対しても同様に KHV へ感染させた。両群は KHV 感染後、水温 23°C として地下水のかけ流しにした 60ℓ ガラス水槽に個別に収容し、経過観察した。その結果、対照魚区では、感染後 8 日目に 3 尾がへい死し、9 日目に 7 尾がへい死して全滅した。一方、昇温処理魚区では 9 日目までに 30 尾中 4 尾がへい死したものの、そのへい死状況は、再感染後 3 日目と 7 日目から 9 日目にそれぞれ 1 尾ずつへい死するという散発的なものであった。その後は、観察を終了した 88 日目まで新たなへい死はみられなかった。なお、対照魚区のへい死魚については、その鰓組織を PCR 分析により KHV ゲノムの検出を行ったところ (Yuasa et al., 2005), 3 尾中 3 尾で KHV ゲノムが検出された。

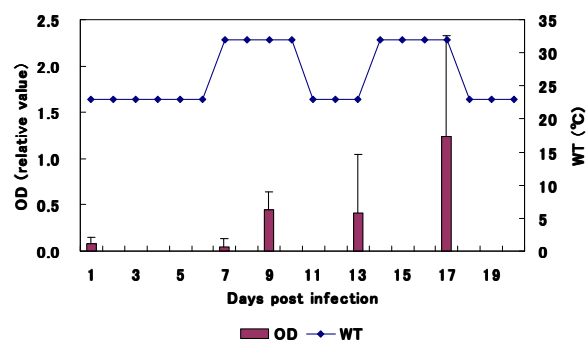


図 1. KHV 感染後の抗 KHV 抗体の産生の推移。

考 察

コイに KHV への耐性を持たせる方法として、Gilad et al. (2003), Ronen et al. (2003) が、KHV の増殖活性水温帯が 15°C から 25°C の間であるとし、また、 28°C 以上での高水温環境下での飼育により死亡率が低下することと、その血清中に高い抗 KHV 抗体が検出されることを明らかにしている。今回の昇温処理はその手法を応用して実験規模を拡大して行うことでの有効性を確認するために行った。

今回の結果から、 100kg 単位のコイ稚魚群に対しても同様の処理効果が得られることが明らかとなった。昇温処理魚は、再感染においても高い生存率を示したことから、温度上昇をきっかけとする抗 KHV 抗体の産生がみられたためである。また、昇温処理魚が感染水域における商業規模での長期間の飼育においても高い生存率を示していることから (根本ら, 2011), 商業規模での一連の処理による魚類飼育も可能であることが示された。

しかし、昇温処理中の歩留まりも良好であったものの、水槽飼育中のコイの生息環境は悪いものとなった。それは KHV 病の病徴である体表粘液等による水質の悪化や高密度の収容と高水温下での飽和溶存酸素量の低下に伴う酸欠の発生がみられたことによる。今回、酸欠によるへい死の発生を軽減するため、頻繁な酸素ポンプによる酸素給気を行った。昇温処理中における歩留まりの向上には、水質環境の維持とともに、いかに KHV の病勢を抑制するかにあるといえよう。

福田 (私信) によれば、昇温処理を行う場合に必要な条件となる、KHV の魚群への十分な感染の判断は、群の遊泳行動や外観症状の観察から判断可能であるとしており、背鰭をたたむ、体表の色調のむら、体表粘液過多等を例示している。その点、今回昇温処理の開始の基準として設定した、へい死魚の 2 倍の増加の有無という基準では、KHV の病勢が急激に強くなるため、昇温の効果が発現するまでにへい死尾数が増大してしまう可能性が大きい。Niwa et al. (2007) は感染確認時からの経過日数を定めた昇温処理による耐性獲得の効果を明らかにしている。この場合、

感染機会が明確な場合ほど、処理過程が自動的に決定できる点で効率的といえる。しかし、感染時の感染強度の違いによっても経過時間が異なることいえる。そのため、筆者らは生産現場での判断基準として、明確な基準としてへい死尾数の推移を提案したところである。昇温開始条件の検討は今後の研究を待ちたい。

今回の研究から、KHV 耐性の指標となる抗 KHV 抗体の産生がどのような温度変化により発現するか一定の知見が得られたといえる。今回、昇温開始後 24 時間後の時点では、抗 KHV 抗体の産生は確認できなかったが、72 時間後のサンプルからは抗 KHV 抗体が確認された。この結果とへい死尾数の推移から、病勢が沈静化したとみなせる 9 日目は同一日であったことから、血清サンプルは採取頻度や検体数は十分ではないものの、KHV 感染魚は高水温下におくことにより 72 時間以内に抗 KHV 抗体が産生され、KHV の強い病勢に耐性を示すといえた。今回の昇温過程では、水槽に設置したデータロガーの解析から、23°C から昇温を開始後およそ 100 分後に 32°C に到達していたことが判明したが、今後は、温度上昇速度と抗体産生の関連についても研究が待たれるところとなった。

要 約

- (1) 1,000 尾単位の大量の KHV 感染コイ稚魚を、KHV の増殖活性の適水温である 20°C 台と不適水温である 30 °C 以上の高水温に交互に変化させた環境下に収容するという、昇温処理による KHV 耐性の獲得の有無を検討した。
- (2) KHV に人為感染させた平均体重 23.7g のコイ稚魚合計 174 kg を、平均 34.9 kg ずつ 5 つの水槽に収容し、23 °C と 32 °C への交互の温度変化を複数回連続して与える昇温処理を 30 日間行い、その間の生残状況を観察した。
- (3) 昇温処理中、一定期間毎に無作為抽出したコイの血清中の抗 KHV 抗体量を測定した。また、昇温処理終了後、無作為抽出したコイを KHV に再感染させて水温 23 °C の環境下で 88 日間飼育した。
- (4) 昇温処理中の生存率は平均 90.8%であった。昇温処理魚 30 尾に KHV 再感染後、9 日目までに 30 尾中 4 尾がへい死したが、その後 88 日目まで新たなへい死はなかった。比較対照の KHV 未感染魚 10 尾に KHV を感染させたところ 9 日目までに全滅し、そのへい死魚 5 尾中 5 尾で PCR 分析により KHV ゲノムが検出された。
- (5) 人為感染後 9 日目の個体から抗 KHV 抗体の産生が確認された。その確認は 32°C へ昇温開始後 72 時間目あたり、その時点でへい死尾数の急激な減少がみられた。
- (6) KHV 感染魚は高水温下におくと 72 時間以内には抗 KHV 抗体を産生し、それにより KHV 耐性を獲得するとともに、その後の再感染によっても長期間耐性を

を示した。

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様々に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謹んで御礼申し上げます。また、貴重なコイ稚魚を多数提供下さいました、きたうら広域漁業協同組合の小森喜幸様に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.
- 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.
- 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.
- 根本 孝・中谷仁崇・荒井将人・野内孝則(2011): 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. 茨城内水試研報, 44, 13-17.
- 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.
- 野内孝則・荒井将人(2008): 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-I. 茨城内水試研報, 41, 55-60.
- 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 mortality 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.
- Niwa, S., M. Arai, T. Yanai, T. Hoshino (2008):

- Production of koi herpesvirus-tolerant carp, 5th World Fisheries Congress, Tokyo, Aquaculture, Abstract.
- OIE (2009): Koi herpesvirus disease. Manual of diagnostic tests for aquatic animals, 236-250.
- Ronen, A., A. Perelberg, J. Abramowitz, M. Hutoran, S. Tinman, I. Bejerano, M. Steinitz, M. KotlerRon (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.