

## コイヘルペスウイルス病未発症魚における臓器別ウイルス量の衰弱魚との比較

山野井英夫・植木 範行\*

Comparison of the Koi Herpesvirus Levels in Several Organs between Symptomless and Diseased Fishes

Hideo YAMANOI and Noriyuki Ueki

キーワード：コイヘルペスウイルス病, KHV

岡山県西部に位置する高梁川の支流小田川で、2003年10月末から野生コイ *Cyprinus carpio* に大量死が発生し、翌11月、その原因がコイヘルペスウイルス（以下KHV）病であることが確認された<sup>1)</sup>。その後、毎月数尾の野生コイを小田川で捕獲し、鰓の一部を材料としてKHV遺伝子を対象としたPCR検査を実施していたところ、鰓や体表など外観に病変が一切なく、また活力等においても正常と思われたコイの鰓からKHV遺伝子が検出された。鰓ぐされなどの外観症状がなく、衰弱魚ではない自然の魚から、同遺伝子が検出されたまれな例と思われたので、後に捕獲された病魚とともに臓器別のPCR検査に供してウイルスの体内分布を調べ、また簡便法によりウイルス密度の臓器別比較をおこなったので以下に報告する。

## 材料と方法

前述のとおり'03年11月の初発の後、翌'04年1月から小田川で毎月数尾のコイをサンプリングし、鰓の一部を供してKHV遺伝子を対象としたPCR検査を実施していたところ、'04年4月（河川水温約20℃）に捕獲した外観的に正常なコイ3尾のうち1尾から陽性反応が得られた<sup>1,2)</sup>。PCR検査結果が陽性であることが確認された時点では既に冷凍保存してあった魚体を、冷蔵庫中で解凍し、開腹、開頭した後、99.5%エタノールに全身を漬けた。室温に約1週間おいて固定した後、鰓や鰭、視葉や嗅葉など脳の各部位、動脈球や心室、心房、肝臓や腸管、腎臓、筋肉など22の臓器の一部を摘出し、QIAGEN DNeasy Tissue Kit（QIAGEN K.K., 東京）を用いて抽出したそれらの核酸抽出物を材料とした。

GILAD *et al.* (2002) のPCR反応液<sup>3)</sup>で抽出液を10倍階段希釈し、どの希釈段階まで陽性反応が認められるかでウイルス量の比較を簡便的に行った<sup>4)</sup>。

なお、4月末、同川で少数のコイの死亡がみられたとの聞き取り情報があったが、検体は得られなかった。

6月、同川（河川水温約25℃）でコイの斃死が再び発生し、このとき採捕した衰弱コイ2尾とともに鰓ぐされ症状が観察され、さらに鰓の一部を供したPCR検査によって両者ともKHV遺伝子が検出された。これら2尾を先の魚と同様にエタノール固定し臓器を摘出して、同様の検討に供し比較材料とした。

## 結果と考察

モニタリング調査はその後も継続しているが<sup>2)</sup>、'04年7月までの検査結果を表1に、供試したコイ3尾の全長等と、それらを捕獲した際の水温を表2に示した。なお、これらモニタリング調査については別報に詳しい<sup>2)</sup>。

未発症魚における臓器別ウイルス量の検討結果を、発症魚の結果とあわせて図1に示した。対数表示の目盛り軸となっており、ゼロは原液、1が10倍希釈液、2が100倍希釈液をそれぞれ示し、棒の長さによって、その希釈段階まで明瞭な陽性反応が得られたことを表している。

未発症魚では、鰓で10の6乗希釈まで、尾鰭、腸管で10の5乗希釈までバンドが出現した一方で、網膜、嗅葉、視葉、小脳、迷走神経葉、延髄、心房、肝臓、腎臓、筋肉、浮き袋ではバンドが一切見られなかった。

2尾の発症魚での結果は、臓器により多少のばらつきがあったものの、供した臓器のすべてで陽性結果が得ら

\*現所属：岡山海区漁業調整委員会事務局

れ、ウイルスが体内に広く分布、拡散していることがうかがえた。特に、鱭、鰓、動脈球、腎臓で高い点は、両発症魚に共通している。

なお、臓器によって核酸抽出の効率に差があることが推定されるので、この結果からウイルス量の比較を厳密

に行うことには無理がある。しかしながら、本病の検査に供する臓器の選択等にあたって一応の参考にはなる結果と考えられた。また、現在、本病では多くの場合に鰓を材料としているが、今回の結果からすれば、そのことに特に問題はないと考えられた。

水産庁の報道発表によれば、KHV病は'05年6月9日までに国内44都道府県で発生しており、公式に陽性が確認された検体数だけでも極めて多数にのぼっているが、その全ては、死亡魚、あるいは大量死の際に捕獲された魚などであって、過去にKHV病が確認されたとはいえ、その時点で異常な死亡のない天然河川で捕獲され、外観や活力などからも健康と思われたコイが陽性となった例は、この1尾の他にほぼないと推測された。

今回のこの未発症魚は、自然河川で偶然捕獲されたものであり、本病の感染から発病、死亡、もしくは耐過に至る過程の、どの段階にあったのかは明らかではない。感染後のウイルスの体内における伝播や増殖を明らかにするためには、人為感染試験による試験が欠かせないが、我々には隔離施設がないため、そのような試験は実施で

表1 小田川におけるKHV病コイモニタリング結果

年 月 日	陽性尾数/検査尾数
2003年11月4日	1 / 1 (初発)
2004年1月21日	0 / 3
2月2日	0 / 3
3月15日	0 / 3
4月15日	1 / 3
4月22日	0 / 1
4月28日	0 / 4
5月10日	0 / 4
5月24日	0 / 5
6月7日	3 / 4
6月14日	1 / 1
6月22日	3 / 4
7月9日	0 / 1
7月22日	0 / 1

表2 比較に供した陽性コイ

採捕年月日	水温(℃)	全長(cm)	体重(kg)	備 考
2004年4月15日	20.1	44.0	1.14	肉眼的異常なし、活力良好
6月7日	25.5	37.0	0.70	軽度の鰓腐れ、衰弱(瀕死魚1)
6月22日	25.0	64.0	3.45	軽度の鰓腐れ、衰弱(瀕死魚2)

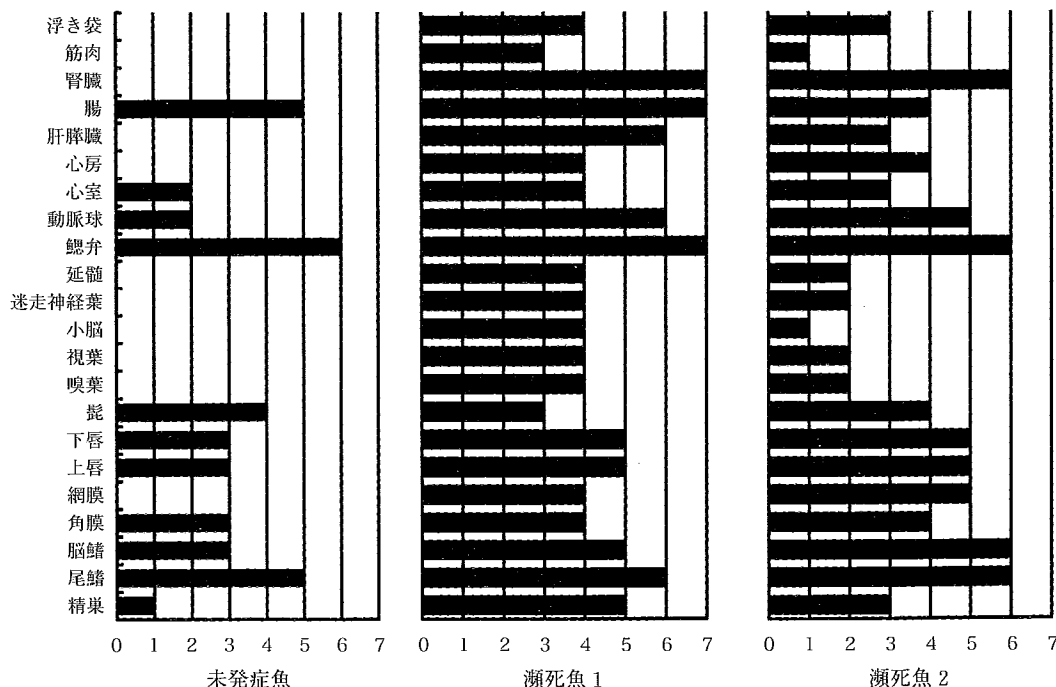


図1 臓器別PCR検査結果

きなかった。しかし、この未発症魚が仮に感染初期の段階であったとすると、本病の原因ウイルスは、鱗や鰓、腸で増殖した後、次の段階で心房、動脈球、腎臓で増殖し、コイを致死させる可能性が考えられた。

いずれにしても、検体数も少なく、不十分なものではあるが、本病では、ウイルス遺伝子の検出される部位が鰓や鱗、腸などに限定される時期があることは明らかであった。

#### 文 献

- 1) 水戸 鼓・村田 守・山野井英夫・植木範行, 2004:平成15年度コイヘルペスウイルス病モニタリング調査, 岡山水試報, 19, 68.
- 2) 水戸 鼓・村田 守・山野井英夫・植木範行, 2005:平成16年度コイヘルペスウイルス病モニタリング調査, 岡山水試報, 20, 105-106.
- 3) GILAD, O., S. YUN, K. B. ANDREE, M. A. ADKISON, A. ZLOTKIN, H. BERCOVIER, A. ELDAR, and R. P. HEDRICK, 2002: Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Dis. Aquat. Org.*, 48, 101-108.
- 4) 中山広樹, 1998: 本当に増えるPCR, 第2版, 秀潤社, pp201.