

2020年9月に開催された OIE 水生委員会のレポートへの日本のコメント

(Annex15)コイヘルペスウイルス病(新様式の適用)

(第1章 範囲)(~~削除~~)

コイヘルペスウイルス病とは、*Alloherpesviridae* 科のコイヘルペスウイルス属の病原体であるコイヘルペスウイルス-3 (CyHV-3) の~~全ての遺伝子型~~への感染を意味する(Haramoto et al., 2007; Waltzek et al., 2009)。

理由:

「全ての遺伝子型への感染」という記述は、Engelsma et al.(2013)で言及されているバリエーションを含むと解釈される可能性があり、不要な混乱を避けるため削除を行う。

(第3.6項 サンプルのプールについて)(~~挿入~~/削除)

診断感度に対するプールの影響は評価されていないため、大型魚は個別に処理を行い検査することが推奨される必要がある。プールを行う場合は、診断感度を考慮した上で、同一群内で複数個体を検査する時に限りプールできる。稚魚や 0.5g までのサンプルなどの小さな成長段階をプールすることで、ウイルスの分離や分子検出に必要最小限の材料を得ることができる。

理由:

プールの影響が評価されていないにもかかわらず、大型魚を個別に検査しなくてはならないと定めるのは極端である。KHV 病原体の性状を考慮すると、感染はすぐに個体から群に広がることが想定されるので、プールによる希釈で感度が低下することは考えがたい。よって、群単位でプールを行うことは可とすべきではないか。

(表 4.1 健康な動物を対象としたサーベイランスと臨床的に影響を受けた動物の調査における OIE が推奨する診断方法と検証レベル)(**挿入**)

診断方法	1. 健康な動物に対するサーベイランス				2. 臨床的に影響を受けた動物の推定診断				3. サーベイランスまたは推定診断による疑陽性の確定診断			
	仔魚	稚魚	成魚	LV	仔魚	稚魚	成魚	LV	仔魚	稚魚	成魚	LV
組織病理学的検査						++	++	1				
細胞または人工培地による培養						++	++	1				
リアルタイム PCR	++	++	++	1	++	++	++	1				
Conventional PCR	+++	+++	+++	1	++	+++	+++	1	++	++	++	1
ネステッド PCR	++	++	++	1	+++	+++	+++	1	++	++	++	1
アンプリコンシーケンシング									+++	+++	+++	1
In-situ ハイブリダイゼーション												
バイオアッセイ												
LAMP 法						+++	+++	1				
IFAT 法						+	+	1				
血清学的検査 (ELISA 法)			+++	1			+++	1				

コメント:

- ・ 1. 健康な動物に対するサーベイランスにおける Conventional PCR はこれまでのマニュアルで B 評価であったが、今回の改正で妥当ではないと評価した根拠を教えてください。また、少なくとも評価の根拠を示すまでは、従来通り++と評価すべきではないか。
- ・ ELISA 法について、これまでのマニュアルでは 1 成魚のサーベイランスと推定診断で B 評価であったが、今回の改正で妥当ではないと評価した理由を教えてください。また、少なくとも評価の根拠を示すまでは、従来通り++と評価すべきではないか。

(参考)

+++ = 示された目的において検証された推奨方法。

++ = 適切な方法であるが、さらなる検証が必要な場合がある。

+ = 状況によっては使用できるが、コスト、信頼性、検証の欠如、その他の要因により適用が厳しく制限される。

網掛け = この目的には適切ではない。

(第 4.3 項 ウイルス分離のための細胞または人工培地培養)

標的病原体に対する感受性が変化していないことを確認するために、細胞株を監視する必要がある。

臨床的に影響を受けた魚の KHV 感染の診断は、細胞培養でのウイルス分離によって行うことができる。ただし、ウイルスは限られた数の細胞株でしか分離されないため、取扱いが困難である場合がある。また、細胞培養の分離は、KHV DNA を検出するための公開されている PCR ベースの方法ほど感度が高くなく、KHV の信頼できる診断方法とは見なされていない(Haenen et al.、2004)。

使用する細胞株:KF-1、KFC または CCB

2.3.0 章(魚の病気に関する一般情報)のセクション A.2.2.2 に記載されている手順の使用

確認用の識別

CPE を確認的に同定するための最も信頼できる方法は、PCR と、それに続く PCR 産物の配列分析です。KHV の同定に推奨される PCR 法は、魚組織の直接検出に推奨される方法と同じです(以下のセクション 4.3.1.2.3)。最終的な確認のために、正しいサイズの PCR 産物は、配列分析によって KHV 由来であると特定する必要がある。

i)適切な DNA 抽出キットまたは試薬を使用して、細胞物質と上清物質の両方を含むウイルス培養物のサンプルから DNA を抽出する。

ii)抽出された DNA は、以下に説明する PCR プロトコルを使用して増幅する。次に、増幅された PCR 産物をゲルから切り出し、セクション 4.3.1.2.3 に記載されている通りに配列決定することができる。

コメント:

使用する細胞として KFC というものが挙げられているが、あまり馴染みのない細胞であるため、根拠となる文献を挙げるべきである。また、Chapter 2.3.0 の General Information B. 1.1 Fish cell line のリストにも加えるべきである。

(第 4.4.3 項 Conventional PCR) (~~挿入~~/削除)

Engelsma et al. (2013)は、新鮮な組織サンプル中の KHV DNA の検出に最も感度が高いと従来から考えられている公開されたシングルラウンド PCR 法では、臨床的に影響を受けた魚の一部の KHV 遺伝子型を検出できないと報告した。したがって、Engelsma et al. (2013)によって記載されたアッセイは、KHV バリエントを検出する場合に**使用できる強く推奨される。ただし、この KHV バリエントの病原性については未確認である。**~~サイクル数を 50 に延長するか、ネストされた 2 回目の増幅を使用することにより、このアッセイは無症状のキャリアのウイルスを検出するのにも適している可能性がある。~~この方法と他の一般的に使用される PCR プロトコルを表 4.4.3 に示す。

理由:

- a) Engelsma et al. (2013)で検出された遺伝子配列を有する変異体 1-3 は細胞で分離されおらず、魚への感染性も証明されていないため、伝播可能な病原性ウイルスであるかどうか明確になっていない。これらの変異体を細胞で分離し、病原性も含めた性状分析を行い、これらが病原性ウイルスであることが証明されてから、病原体に含まれるものと解釈すべき。従って、Engelsma et al. (2013)の nested PCR は変異体 1-3 を検出可能な方法として紹介するにとどめ、この変異体の病原性について未確認であることを言及すべきである。今後、Engelsma et al. (2013)の nested PCR を推奨するためには、本法と既存の方法との検査制度を比較検証する必要がある。
- b) キャリアの検出には PCR のサイクル数を 50 に増加させることが適している場合があるとしているが、Engelsma et al. (2013)にはそのような記述がない。サイクル数の評価に根拠がない場合は、誤解を招くので削除すべきである。なお、一般的に非特異バンドの出現を招く可能性が高く、市販の酵素の中には 50 回のサーマルサイクルで失活してしまうものもあると考えられるため、方法として好ましくない。サーマルサイクリングは 40 回を超えないのが一般的ではないか。妥当性を検証してから記載してほしい。

(第 5 章 明らかに健康である動物の無病を証明する為のサーベイランスに対し推奨される診断方法)(~~挿入~~/削除)

KHV フリーであることを宣言するために、感受性種の健康な集団に対する調査として、現在推奨されている十分に検証された方法はない。

リアルタイム PCR アッセイでは、KHV のすべての遺伝子型を検出できない可能性があるという証拠が増えてきている。

~~したがって、~~Engelsma らによって記述されたネステッド PCR アッセイ (2013) は、すべての既知の KHV 遺伝子型を検出するものであり、現在、明らかに健康な集団の無病を証明するためのサーベイランスに推奨~~されている~~される可能性がある。る。

理由:

「リアルタイム PCR アッセイでは、KHV のすべての遺伝子型を検出できない可能性があるという証拠が増えてきている」という根拠を示す論文を追記すべきである。

Engelsma et al. (2013) が記述しているネステッド PCR を新たに推奨するには、KHV バリエントの病原性を確実とした上で、検出感度と反応特異性について既法と比較検証する必要があると考える。そのため、無病証明のため「推奨されている」のではなく「推奨される場合がある」といった記述にすべきであると考え。

(Annex16)一般情報

(第 1.3 章 臨床状態に応じた仕様)

殆どのウイルスの臨床感染の診断においては、サンプリングする適切な臓器には、前腎/中腎、脾臓、心臓又は脳のいずれかが含まれる。魚全体または内臓全体を揚げるために使用することができる。コイヘルペスウイルスの場合は鰓と腸をサンプリングする必要がある、流行性潰瘍性症候群の場合は皮膚又は筋肉を、*Gyrodactylus salaris* の場合は魚全体又は鰭を検査する必要がある。臨床的に感染した 10 尾の病魚サンプルは、各疫学ユニットの病原体検査に十分足りるだろう。

ウイルスの無症候性感染の検出若しくはターゲッドサーベイランスについては、水生マニュアルの各疾病章及び OIE 水生コードの第 1.4 章を参照すること。

コメント:

Annex15 コイヘルペスウイルス病の第 3.2 章(臓器または組織の選択)には、サンプリングの推奨部位は鰓、腎臓、脾臓であると記述されており、整合性がとれていない。

(6. 加盟国への情報周知)

(6.3 ウイルス性コイ浮腫症 (CEV)について)

委員会は、CEV の感染がすでに複数国内で発生しており、数年前から検出されているという一部の国からのアドバイスを含め、受け取ったコメントを検討した。委員会は、CEV の状況を引き続き監視することに同意し、水生コード第 1.1.4 条に従って、新興疾病として CEV の感染を報告するよう各国に要請した。

コメント:

CEV を新興疾病として判断するに至った議論の内容と、判断の元になった論文等の根拠を提供して欲しい。

なお、現在までアジアでの発生報告 (NACA 集計) において、CEV の報告を求め始めた 2017 年から 2019 年に至るまで、3 カ国から 8 件の報告しかない。また、近年においては CEV による死亡率は低い。このことから、CEV は b) 新たに認識された、または疑われる病原体である可能性はあるものの、少なくともアジアにおいて a) 新たな地理的地域への広がりがあると判断するための客観的なデータが不足している。一部の国からは CEV が重大な影響を及ぼすとの意見があるが、現時点では、日本は水生動物または公衆衛生に重大な影響を及ぼす疾病であるか判断するための十分な情報が不足していると認識している。

このことを踏まえた上で、科学論文での記述だけでなく、NACA や WAHIS への報告状況及び各国における発生状況や被害状況を十分に把握した上で、CEV が新興疾病並びにリスト疾病に該当するかを議論してほしい。

(参考) OIE の新興疾病の定義 OIE glossary より

リストに掲載されている疾病以外で、以下の結果として水生動物または公衆衛生に重大な影響を及ぼす疾病を意味する。

a) 既知の病原体の変化、または新たな地理的地域や種への広がり。

b) 新たに認識された、または疑われる病原体。