

第13回コイヘルペスウイルス病に関する技術検討会
議事次第

日時：平成21年4月22日14：00～17：00
場所：農林水産省水産庁漁政部第2会議室

1. 開会

2. 議事

- (1) 現状報告について
- (2) 試験・研究について
- (3) まん延防止措置について
- (4) その他

第 13 回コイヘルペスウイルス病に関する技術検討会委員名簿

	No.	氏 名	現 職
座長	1	青木 宙	東京海洋大学大学院海洋科学研究科教授
副座長	2	佐野 元彦	独立行政法人水産総合研究センター 養殖研究所 病害防除部長
	3	鈴木 和良	千葉県内水面水産研究所長
	4	高濱 芳明	茨城県内水面水産試験場長
	5	田中 深貴男	埼玉県農林部生産振興課副課長
	6	畑井 喜司雄	日本獣医生命科学大学教授
副座長	7	兵藤 則行	新潟県内水面水産試験場病理環境課長
	8	福田 穎穂	東京海洋大学海洋科学部海洋生物資源学科教授
	9	細江 昭	長野県水産試験場長

参考委員

No.	氏 名	現 職
1	佐藤 稔	全国養鯉振興協議会専務理事
2	橋本 啓芳	全国内水面漁業協同組合連合会専務理事
3	吉田 俊一	全日本錦鯉振興会副理事長

KHV病感染コイの発見状況総括表(平成20年12月末現在)

単位: 件

	養殖場等							天然水域等					その他	合計	(参考) 発見都道府 県数
発生時期	養殖場 (経営体数)	蓄養場	釣り堀	公園	個人池	小計	河川	湖沼	ため池	水路	小計				
15年合計	12	(69)	12	26	2	13	65	25	2	1	1	29	2	96	22
16年合計	38	(34)	10	17	60	436	561	230	16	32	71	349	0	910	39
17年合計	30	(30)	2	1	13	186	232	57	3	11	7	78	0	310	41
18年合計	30	(25)	5	1	8	95	139	32	3	1	7	43	0	182	38
H19.1	3	(3)	1	0	1	1	6	0	0	0	0	0	0	6	4
2	1	(1)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
3	1	(1)	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2	2
4	1	(1)	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
5	1	(1)	0	0	1	2	4	0	0	1	0	1	0	5	4
6	6	(4)	1	0	4	18	29	3	0	1	1	5	0	34	15
7	6	(4)	1	1	2	18	28	3	0	0	2	5	0	33	19
8	0	(0)	0	0	0	18	18	1	0	1	2	4	0	22	10
9	0	(0)	0	0	3	10	13	1	0	0	0	1	0	14	9
10	0	(0)	0	0	3	6	9	2	0	0	0	2	0	11	8
11	1	(1)	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	2	2
12	0	(0)	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	2	2
合計	20	(15)	3	1	14	76	114	11	0	3	5	19	0	133	30
H20.1	0	(0)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
2	0	(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	(0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	(0)	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1
5	3	(3)	0	0	0	3	6	0	0	0	0	0	0	6	3
6	4	(4)	0	0	1	6	11	4	1	3	1	9	0	20	12
7	3	(3)	0	0	1	12	16	7	2	1	1	11	0	27	13
8	1	(1)	0	0	0	13	14	1	0	0	0	1	0	15	6
9	0	(0)	0	0	1	12	13	1	1	0	0	2	0	15	6
10	1	(1)	0	0	2	3	6	1	0	1	1	3	0	9	7
11	1	(1)	0	0	1	0	2	1	0	0	0	1	0	3	3
12	2	(2)	0	0	0	2	4	0	0	0	0	0	0	4	2
合計	15	(14)	0	0	6	52	73	16	4	5	3	28	0	101	29
合計	145	(187)	32	46	103	858	1184	371	28	53	94	546	2	1732	47

注1. 公園には、便宜上、学校・浄水場等公共施設の池を含めた。

注2. 個人池には、便宜上、法人・寺等の池を含めた。

注3. ため池には、便宜上、堀・池等と呼ばれているものを含めた。

注4. 水路には、便宜上、〇〇用水等と呼ばれているものを含めた。

注5. 溝、芝生に放置されていたものをその他とした。

注6. 経営体数については、延べ数ではないため、月毎の合算と合計が一致しない場合がある。

(参考1)KHV感染コイ発見養殖経営体数の推移

年(平成)		H15年	H16年	H17年	H18年	H19年	H20年	累計
感染コイ発見コイ養殖経営体数		69	34	30	25	15	14	187
感染コイ発見コイ養殖経営体比率		4.8%	2.4%	2.1%	1.8%	1.1%	1.0%	13.1%

注1. 感染コイ発見コイ養殖経営体数は、上記の表の養殖場 145件に係るもの

注2. 感染コイ発見コイ養殖経営体比率は、2003年(第11次)漁業センサス(平成15年11月1日現在)のコイ養殖を営んだ経営体数(1,426)に対する比率。

(参考2)KHV感染コイ発見1・2級河川水系数の推移

年(平成)		H15年	H16年	H17年	H18年	H19年	H20年	累計
感染コイ発見1・2級河川水系数		12	72	45	33	12	7	151
感染コイ発見1・2級河川水系比率		0.4%	2.5%	1.6%	1.2%	0.4%	0.2%	5.3%

注1. 感染コイ発見1・2級河川水系数は、上記の表の河川367件、湖沼26件が属する水系のうち、1・2級河川水系の数

注2. 感染コイ発見1・2級河川水系比率は、平成13年4月現在の全国1・2級河川水系数2,831(国土交通省資料)に対する比率。

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業
「コイヘルペスウイルスのまん延防止技術の開発」

独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所

研究期間：2007 年度～2010 年度（4 年間）

中核機関・研究総括者：（独）水研センター養殖研究所 三輪 理

共同機関：（国）東京海洋大学・（国）北海道大学・茨城県水産試験場・新潟県水産試験場・
滋賀県水産試験場・岡山県水産試験場・（株）アーク・リソース

I. 試験研究の全体計画

1. 研究目的

本研究では、

1. KHV 感染耐過魚からのウイルス検出技術の確立
2. 養殖・加工施設からのまん延防止法の確立
3. 天然水域における KHV サーベイランス により

感染耐過魚のウイルス潜伏器官および天然水域における KHV の動態を解明し、感染耐過魚からのウイルス検出技術、垂直感染防止技術の開発、および養殖・加工施設からのまん延防止法の確立を目標とする。

その結果、

1. KHV 病によるペット、および野生ゴイ被害の低減とコイ養殖やニシキゴイ輸出産業の振興
2. 天然水域の野生ゴイにおけるウイルスの生息状況の把握とこれ以上のまん延の防止が期待される。

2. 研究内容

1. KHV 感染耐過魚からのウイルス検出技術の確立

KHV に感染、発症後治癒し、通常のエラやヒレ等から行う PCR ではウイルスが検出できなくなったコイにおいて、潜伏しているウイルスの検出技術の開発や血中抗体価を測定することにより感染歴を判定できる手法のキット化を行う。

（1）PCR による検査技術の開発

これまで KHV 発症魚からのウイルスの検出は、発症時に最もウイルス量の多いエラないしヒレを用いて行ってきたが、感染耐過魚ではこれらの器官からは検出困難となりウイルスは内部臓器に潜伏している可能性が高い。そこで感染耐過魚の種々の器官を調べ、どの器官から最も高率にウイルスが検出できるかを調べるとともに、潜伏状態にあるウイルスを再活性化して検出する技術を開発する。

（2）抗体検出法のキット化

これまでコイ血中の抗 KHV 抗体価を測定する ELISA を開発し、血中抗体価から感染履歴の推定が可能になったが、中核機関においては抗原に用いる KHV の大量精製が難しいため普及が困難な状態にある。そこで当初は中核機関で精製した KHV を用いて ELISA の条件検討を行いつつ、最終的には ELISA の固相化用の抗原や、抗コイ IgM マウスモノクローナル抗体等を大量に作成し、試薬をまとめてキット化する。

2. 養殖・加工施設からのまん延防止法の確立

養殖・加工施設等において感染耐過魚からの垂直感染あるいはそれらの加工品を通じたまん延を防ぐための方策を確立し、さらにこれらの施設からの排水による疾病の蔓延を防ぐため排水中の KHV を効率的に処理するシステムの開発を行う。

(1) 卵の安全で簡便な消毒方法の確立

これまでの研究によりコイの卵やふ化仔魚は KHV に対する感受性がないことが判明している。従って採卵時の消毒さえしっかり行えば垂直感染が阻止できると考えられる。そこで卵の安全で簡便な消毒法の基準を確立する。

(2) 排水の効率的な処理方法の開発

これまで市販の種々の消毒剤や物理的処理に対する KHV の感受性を明らかにしてきたが、日常、飼育施設の排水を消毒剤のみで処理するのはコストや手間の点で難しい。そこでこれら物理化学的処理法と常在細菌のウイルス不活化作用を組み合わせ、KHV を効率的に不活化できる排水処理システムを確立する。

(3) 加工処理方法の確立

平成 17 年の持続的養殖生産確保法改正により、まん延防止措置として、焼却・埋却処分以外の「病原体の感染力を失わせる方法」が追加された。これを踏まえ、加工品の感染性を検査し、製品に感染力が残存しないような加工処理基準を作成する。

3. 天然水域における KHV サーベイランス

これまで KHV 病が発生した天然水域においては、コイの移動禁止や放流禁止などの措置が執られているが、いったん大量死が発生した水域で 2 度目の大量死が生じたことは無く、それらの水域でウイルスの存在状況がどうなっているのか不明であるため、我が国の代表的な水系においてコイを採集し、KHV のサーベイランスを行う。中課題 1 の技術を応用して行うため 2 年目から 4 年目にかけて行う。結果は随時、消費・安全局主催の KHV 技術検討会に提出するとともに、最終的には天然水域でのまん延防止策をどのようにすべきか検討を行う。

(1) 霞ヶ浦におけるサーベイランス

霞ヶ浦では KHV により養殖ゴイの大量死が起きたことはよく知られているが、同湖に生息する天然ゴイには目立った死亡はない。そこで継続的に天然ゴイを採捕し、随時中課題 1 で得られた成果を取り入れつつ、PCR や抗体検査による KHV のサーベイランスを行う。

(2) 琵琶湖におけるサーベイランス

霞ヶ浦と同様に行う。

(3) 児島湖・宮川におけるサーベイランス

霞ヶ浦と同様に行う。

(4) サーベイランスの結果のとりまとめと解析

最終年度において、それまでの各水系のサーベイランスを通して得たデータを解析し、KHV がある水系に侵入後どのような経緯をたどるのか、何らかの共通したパターンを示すのか、あるいは各水系に独特な消長を示すのか等をまとめ、それに応じて、天然水域でのまん延防止策をどのようにすべきか検討を行う。

II. 20 年度の計画・成果概要

1. 中課題名「KHV 感染耐過魚からのウイルス検出技術の確立」

(1) 小課題名「PCR による検査技術の開発」

計画

感染実験ゴイを長期間定期的にサンプルして脳、体表（鱗+鰭）、心臓、腹腔内臓器（肝、腎、脾、腸等）を含む各臓器の組織切片を作成する。診断用 PCR を利用してジゴキシゲニンで標識したウイルスゲノムに対する DNA プローブを作成し、in situ hybridization を行って感染細胞の場所を組織学的に検出する。さらに 19 年度の感染実験に用いたものとは異なるウイルス株およびマゴイ系群を用いて、耐過魚を作成し、各臓器から感染 3 および 6 ヶ月後に、PCR を用いてウイルスの検出を試み、検出効率を検討する。また昇温治療により作出した耐過魚からも同様にウイルスの検出を試み、検出効率を検討する。

成果概要

病理組織学的検査により、感染後数日間はまったく脳には病変はみられず、感染 7 日目に初めて KHV 感染細胞は脳内にまれに見られはじめた。12 日目には他の組織に遅れて脳内に顕著に感染細胞が観察され、in situ hybridization によってそれらの細胞で KHV 遺伝子を確認した。その後、グリア細胞の増生とともに感染細胞は減少したが、1 年以上を経ても脳に病変が残存していた。以上の結果は病理学的にも KHV 感染が最終的には脳に達することを示しており、脳を検査することの妥当性を裏付けた。

KHV は大きく欧州型とアジア型に分けられるが、欧州型 KHV 株（米国由来）感染耐過魚を作成し、各臓器に含まれる KHV ゲノム量を測定した結果、やはり脳で最も多く、脳の検査で問題ないことを示した。さらに、KHV 感染 9 日目から昇温治療した場合には、治癒後に脳内から KHV ゲノムが検出されたが、感染 3 日目から昇温治療した場合はその後脳内から KHV ゲノムは検出されなかった。この結果は、脳において感染 1 週間以降にならないと感染細胞が観察されないという病理組織学的観察結果とよく一致する。すなわち KHV 病は感染が脳に移行しないうちに治癒すれば脳内にウイルスが残存しない場合もありうることを示された。

（2）小課題名「抗体検出法のキット化」

計画

組み替え KHV タンパク質を固相化した ELISA の性能を精製 KHV の場合と比較検定し、固相化用の抗原を選定する。さらに抗原、2 種類の精製抗コイ IgM マウス MoAb を用い、現行法よりも短い時間で結果が得られ、常に標準血清や陽性血清の値が安定である ELISA の条件を確立する。

固相化用抗原、2 種類の精製抗コイ IgM マウス MoAb を用い、抗原固相化プレートの選択のため、固相化濃度、反応時間、反応温度を検討する。また、これまでの ELISA（現行法）ではサンプル添加後、結果が出るまでに 4~5 時間を費やしていたことから、より短時間で結果が得られるキットを作成するために、サンプルや各抗体の濃度、反応時間の検討を行う。さらに標準血清や陽性血清の値が常に安定であり、また現行法と同等の値を示す条件を確立する。条件確立後はキットを試作し保存安定性試験に入る。使用期限 6 ヶ月を目標とする。

成果概要

前年度作製した大量培養法による固相化用抗原および抗コイ IgM 抗体を用いて、固相化濃度・時間・反応温度を変えて実験を繰り返し、至適条件の検討を行った。決定した条件によりこれまでの実験レベルと同等の結果が得られることを確認した（図 1）。また、測定者間の誤差軽減と、アッセイ時間の短縮を目的としてあらかじめ固相化して乾燥させたプレートの検討をしたところ、現行法と同等の結果が得られ時間短縮にもなるという結果が得られた。これらの試薬等は中核機関に送付し、そこでも性能を確認した。

一方、前年度作製した組み替え KHV タンパク質を固相化抗原とした ELISA の性能試験も行なった。しかし、精製 KHV を ELISA 抗原とした場合に比べ、組み替え KHV タンパク質では十分な値を得ることが出来なかった。したがって現時点ではコイ血清中から抗 KHV 抗体を

検出するには精製 KHV の方がキット用の ELISA 抗原として適当と考えられる。

上記条件の下、試作キットを作製し、保存安定性試験を開始した。製造後一定期間経過したキット操作による ELISA 測定値の変動に基づき、再現性の妥当性を検証している。現在 5 ヶ月間、ELISA 測定値に目立った変動は見られない。これは試験継続中である。

また、更なるアッセイ時間の短縮を目指し、抗体濃度・反応時間・反応条件などの検討を行い、系の工夫を行なった。その結果、2 パターンの方法において、同等の結果が得られ、その可能性が示唆された。このアッセイ手順による ELISA の安定した再現性、至適条件については現在検証中である。

なお、今年度開発したプロトタイプキットは中課題 3 に提供され、実際に野生魚の抗体測定に用いられ、性能が検証されている。

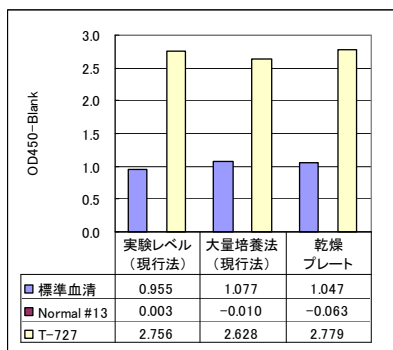


図 1. キットプロトタイプによる ELISA の結果

1) 実験レベルの材料による ELISA (左)

2) 今回決定した至適条件下での現行法による ELISA (中)

3) 固相化済み乾燥プレート使用による ELISA (右)

2) および 3) はいずれも本事業で作製した精製 KHV と精製抗体を用いており、標準血清、未感染魚血清 (Normal#13) ,および 陽性血清 (T-727) は両方の方法で同等の値を示した。

2. 中課題名「養殖・加工施設からのまん延防止法の確立」

(1) 小課題名「卵の安全で簡便な消毒方法の確立」

計画

19 年度より多数の感染耐過親魚を作出し、卵、精液、受精卵および卵巣腔液について垂直感染の有無を調べる。加えて、感染耐過親魚から得た受精卵、またはウイルス液に浸漬した受精卵を、平成 19 年度とは異なる条件で消毒処理を行い、受精卵および仔魚のウイルス保有状況を調査する。また、消毒の効果をより明らかにするために、KHV の検出率に加え、卵に付随する一般生菌数の評価を併せて行う。

また、より実用的な消毒基準を確立するため、卵付着基質として使用する実験用のアクリル板に加え、実際に生産者が使用している「きんらん」を用いた際の消毒効果を評価する。さらに、平成 19 年度より親魚のペア数を増やし、ふ化率および奇形率を調べ消毒の卵発生への影響を評価する。

成果概要

作出した感染耐過親魚より得られた精液および未受精卵から KHV は検出されなかった。

人為的に KHV に暴露した卵と精液から得た受精卵を、アクリル板に付着させ、時間と濃度を変えてヨード剤で消毒処理を行った。培養法と PCR で KHV の検出を試みたところ、受精 1 時間後に消毒した場合のみ、未消毒区、50ppm15 分消毒区および 50ppm30 分消毒区から PCR でのみ KHV が検出された。一方、他の消毒条件においては検出されなかった (表 1)。また、卵付着基質として実際に用いられるきんらんを用いた場合も同様の結果となった。

上述の KHV が検出された区の卵をホモジネートしウイルスフリーゴイに接種することにより、病原性の有無を検討した。また、接種 3 週間後にサンプリングし KHV 検査を行った。その結果、病原性は認められず、KHV は検出されなかった。

これらの受精卵から得た仔魚は、受精卵で KHV が検出された区を含めて KHV は検出されなかった。さらに、KHV 検出率による評価に加え、卵の一般生菌数の増減から消毒率を算出

し評価したところ、50ppm30分消毒した場合に90%以上の消毒効果が認められた。

卵に対するヨード剤消毒の影響は、受精14時間後の卵において、200ppm・15分間および30分間の消毒区の発眼率およびふ化率は、未消毒区と比較して有意に低かった（ $p<0.05$ ）。一方、同じ時期の卵をそれ以下の濃度および時間で消毒した区と未消毒区の発眼率・ふ化率では有意な差は認められなかった（ $p>0.05$ ）。

また、受精62時間後の卵では、いずれの濃度および時間で消毒を行っても未消毒区と比較して有意な差はなかった。奇形率については、いずれの消毒条件においても消毒区と未消毒区の値に有意な差は認められなかった。これまでの結果をもとに養殖業者等に対して推奨する卵の消毒方法を以下のように決定した。本法により感染耐過親魚からでもKHVフリーの稚魚を得ることが可能である。

表1 人為攻撃した受精卵の消毒後におけるウイルス検査結果

Lot番号	Lot1		Lot2		Lot3	
消毒時期	受精1時間後		受精14時間後		受精62時間後	
ppm-min	検出法					
	PCR法	培養法	PCR法	培養法	PCR法	培養法
50-15	+	-	-	-	-	-
50-30	+	-	-	-	-	-
200-15	-	-	-	-	-	-
200-30	-	-	-	-	-	-
対照区	+	-	-	-	-	-

推奨される卵の消毒手順

ア 消毒用水槽に清浄な水を入れ、有効ヨウ素濃度50ppmになるように、水産用イソジン液10%を加える（水1トン当たり5リットル）。

イ 卵を上記の消毒液に漬けゆっくり動かし、卵と消毒液が十分に接するようにする。

ウ 15分間消毒したら、消毒液から取り出し、ウイルスのいない池に収容する。

注意事項

ア 消毒は日陰で行うこと。（イソジンは直射日光で効力が落ちる）

イ 消毒液は原則として1回ごとに替える。

ウ 消毒液を捨てるときは、ハイポで色が消えるまで中和してから捨てる。

エ 稚魚、成魚には著しい毒性があるので、十分注意する。

オ 消毒に用いる水は清浄な水とし、キンラン等を清浄な水で洗う。

（汚れがあると消毒剤の効力が落ちるため）

カ 消毒後の卵を元のコイや消毒前の卵が入っていた池に戻さない。

キ 外観的に症状が見られずエラないしヒレを用いたPCRでKHVが検出されない親魚を用いること。

ク 消毒については発眼期もしくは受精14時間前後に行うこと。

（2）小課題名「排水の効率的な処理方法の確立」

計画

活性汚泥方式浄化槽の処理能力について、経時的に試料を採取し、排水処理施設としての有効性を検討する。さらに、脂質分解活性についても検討を行う。平成19年度に得られた活性汚泥中のタンパク質分解活性の強い細菌の抗KHV活性を測定する。また活性汚泥中の細菌をコイ飼育・加工場からの排水処理施設に導入するための基材について検討する。細菌による生物学的処理に加え、物理的処理として飼育排水を紫外線殺菌装置に通したときの殺菌率を測定する。

成果概要

まず、活性汚泥式の浄化能力を明らかにするため、根室管内さけ・ます増殖協会標津川孵化場（川北）にて試料を採取し、前年度確立した方法をもとに分離した細菌のタンパク分解活性を測定した。孵化場の排水処理施設では、瀑気を止め固形物を沈殿させた上澄みを 1 槽から順に 5 槽まで移行させる方式であり、最も有機物量の多い 1 槽においてはタンパク分解活性の高い細菌が多く存在することが示された。脂質分解活性についても検討したが、検出限界以下であった。第 1 槽の細菌叢は、*Achromobacter* 属ならびに *Pseudomonas* 属細菌が優勢であった。分離した菌株の抗 KHV 活性を検討したところ、現在のところ少なくとも 3 株が陽性であり、槽内の総滞留時間も 1~2 ヶ月と長いことから、KHV が含まれる飼育排水の処理も可能と考えられた。さらに、カラム式の飼育排水処理施設の原理的モデル（閉鎖環境）を実験室レベルで設計および作製し（図 1）、数種の基材を試した。うちヒトデ骨片を樹脂で固めたペレットによって、抗 KHV 活性を有する細菌の定着をみたところ、少なくとも 3 日間は定着することが明らかとなった。これまでの研究より、通常の河川水や池水中の細菌の中には KHV を不活化するものが常在していると考えられる。したがって、実際の施設では設置後数日から数週間で常在細菌が繁殖し、それらが優勢になれば実質上問題ないと思われ、分離した細菌はそれまでの間、維持されれば十分であると考ええる。

最後に、物理的処理としてさけます孵化場尻別事業所の飼育排水を紫外線殺菌装置に通したところ、一般生菌数に対して 96.1 %の殺菌率が得られた。KHV は $4.0 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線処理で不活化することから、活性汚泥式の処理に組み合わせる物理的処理は紫外線殺菌装置が適していることが示された

3. 中課題名「天然水域における KHV サーベイランス」

（1）小課題名「霞ヶ浦におけるサーベイランス」

計画

霞ヶ浦の行方市地先において、定置網等により 5 月、6 月、7 月、9 月、10 月、11 月に野生のコイを各月 30 尾を目標にサンプリングする。コイは採血して血清を採取し、解剖して鰓組織および脳の嗅葉を取り出す。血清は ELISA により血中の抗 KHV 抗体価を測定する。また、鰓および脳の嗅葉から PCR により KHV の検出を試みる。さらに野生ゴイの斃死サンプルが入手できた場合は鰓の PCR により KHV の検査を行う。

成果概要

平成 20 年 5、6、7、9、10、11 月に行方市富田地先の小型定置網（張網）によりサンプリングを実施し、5、6、7、9、10 月は各月 30 尾、11 月は 10 尾（計 160 尾）を採集した。また、湖内において野生ゴイの斃死魚は確認されなかった。

鰓組織及び脳（嗅葉）の PCR 検査については、計 160 尾を PCR 検査し、21 尾（13.1%）が陽性であった。陽性個体の月別検出尾数は 7 月が最も多く（30 尾中 9 尾）、次いで 10 月（30 尾中 5 尾）、5 月及び 9 月（ともに 30 尾中 3 尾）であった。本年、霞ヶ浦の天然魚において KHV 病による斃死は認められなかったものの、PCR 検査により継続的にウイルスが検出されたことから、平成 15 年の KHV 病発生後 4 年以上を経過しても湖内にウイルスが存在することが確認された。水温が上昇した 7 月は鰓からの検出が多く、これは水温の上昇に伴い低レベルながら感染個体が増加したためと考えられた。天然水域では時期により様々な感染状態のコイが生息していると考えられるため、ウイルス保有状況の調査には鰓と脳の両方を検査試料とすることが有効と推察された。

ELISA による抗体検査について、5~7 月、9~10 月の期間に採集した計 150 尾の血清について抗体価を測定したところ、多くの個体が高い抗体価を示した。このことから、湖内に

多くの感染履歴を持つ個体が生息していることが確認された（図1）。

抗体価は5月から増加し、7月に最も高く、9月以降減少する傾向が伺えた。7月には鰓を試料としたPCR検査の陽性検出割合も高かったことから、抗体陽性個体の増加とPCR陽性個体の増加との関連が示唆された。体長24cm以下のコイは調査期間中に13尾採集され、採集月は7月に1尾、9月7尾、10月5尾であった。調査魚の月別体長組成の推移から、当歳魚は生まれた年の秋までには1才以上魚と同様に感染するものと推察された。

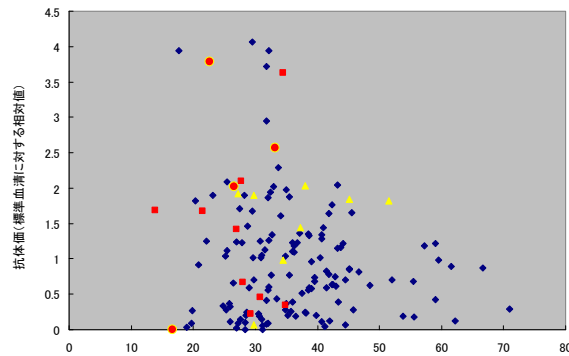


図1：平成20年度霞ヶ浦で採捕された野生ゴイの体長と抗体価の散布図。赤は鰓がPCR陽性、黄色は脳が陽性、赤に黄色の縁取りがあるものは両方とも陽性だった個体を示す。比較的小型の個体で鰓が陽性のものが多く新規の感染が生じていることがうかがえる。

（2）小課題名「琵琶湖におけるサーベイランス」

計画

琵琶湖の沿岸域においてはエリ(小型定置網)により隔月(2ヶ月に一度)の頻度でコイを各月25尾(計150尾)を目標にサンプリングするとともに、5～6月にはヨシ帯においてタモ網等を用いて仔稚魚のサンプリングを試みる。体長域においては、沖曳き網(小型底引き網)により冬季(1～3月)にコイを50尾を目標にサンプリングする。コイは採血して血清を採取し、解剖して鰓組織および脳の嗅葉を取り出す。血清はELISAにより血中の抗KHV抗体価を測定する。また、鰓および脳の嗅葉からPCRによりKHVの検出を試みる。仔稚魚は魚体全体を用いて検出を行う。さらに琵琶湖で斃死したコイのサンプルが入手できた場合は鰓のPCRによりKHVの検出を行う。

成果概要

①琵琶湖で斃死したコイの鰓のPCRによるKHVの検出

初夏に琵琶湖南湖において斃死ゴイが8個体収集され、うち5個体からKHVゲノムが検出されたことから、小規模ながらKHV病が発生したことが示唆された。

②琵琶湖で漁獲または採捕した野生ゴイのサンプリング状況

5月から11月にかけて琵琶湖北湖において標準体長11.9～70.5cmのコイを272個体サンプリングした。また、仔稚魚を採捕するため5/16～6/24にかけてタモ網による採捕を4回試み、コイと思われる仔稚魚39尾を捕獲した。捕獲した個体がコイであることを確認するために、鈴木らの手法(日水誌, 71(1), 10-15 (2005))を用いてRAPD分析を行った結果、17個体がコイ(標準体長31.5mm以下)であることを確認した。

③琵琶湖で漁獲または採捕した野生ゴイにおけるKHVのPCR検査

鰓及び脳(嗅葉)を検査部位としてKHVのPCR検査を行った結果、6～7月に漁獲されたコイで鰓3個体、脳7個体からKHVゲノムが検出された。なお、鰓と脳の両方から検出されたのは標準体長34.9cmの1個体のみであった。

また、コイ仔稚魚に対して、脳と鰓を含む頭部を検査部位としてKHVのPCR検査を行った結果、何れの個体からもKHVゲノムは検出されなかった。

④ELISAによる抗KHV抗体保有検査

抗 KHV 抗体価を血清の ELISA により測定した結果、概ね標準体長 30cm 以下の個体には高い抗体価を示す個体は認められなかったが、30cm より大きな個体には抗体価が高い個体が認められ、40cm より大きな個体ではほとんどの個体が高い抗体価を示した(図 1)。

また、7～12 月の検査数がやや少ない(特に 9 月)が、抗体価は漁獲月によって変動し、琵琶湖で KHV 病の発生水温帯(20～25℃)となる初夏と秋のやや後に高くなる可能性が示唆された。

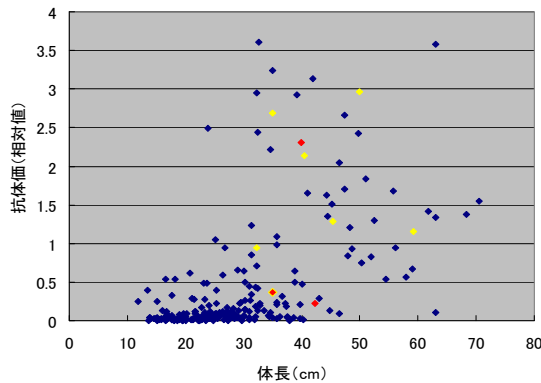


図 3. 琵琶湖のコイの体長と抗体価の関係。小型の個体の抗体価は低く、体長 30-40cm 程度を境に高い抗体価を持つものが急増する。赤は鰓が PCR 陽性の個体、黄色は脳が陽性の個体、赤に黄色の縁取りは両方が陽性の個体を示す。

(3) 小課題名「児島湖におけるサーベイランス」

計画

児島湖において、KHV の発生しやすい水温帯となる時期(6 月頃)、夏季の高水温時期(8 月頃)、秋季の水温低下時期(11 月頃)、冬季の低水温時期(3 月頃)に野生のコイを各 30 尾を目標にサンプリングする。コイは 1 尾ずつ採血して血清を採取し、解剖して鰓組織および脳の嗅葉を取り出す。血清は ELISA により血中の抗 KHV 抗体価を測定する。また、鰓および脳の嗅葉から PCR により KHV の検出を試みる。さらに野生ゴイの斃死サンプルが入手できた場合は鰓の PCR により KHV の検査を行う。なお、当初宮川でもサンプリングを行う予定であったが、大量死後コイの個体数が激減しサンプリングが極めて困難であることが判明したため、児島湖のみを対象としてサーベイランスを行う。

成果概要

児島湖において 6 月 11 日にサンプリングした野生ゴイ 30 尾中、9 尾から KHV ゲノムが検出された。脳から検出された個体は 6 尾で平均体重 4509g、鰓から検出された個体は 3 尾で平均体重 4471g であり、鰓と脳(嗅葉)の両方から KHV が検出された個体はなかった。サンプリング日の現場における水温は、25.6℃であった。9 月 2 日に採捕された野生ゴイ 41 尾は比較的小型個体が多く、また KHV が検出された個体はなかった。サンプリング日の現場における水温は、28.4℃であった。また、11 月 5 日に採捕された野生ゴイ 49 尾中、17 尾から KHV ゲノムが検出された。脳から検出された個体は 2 尾で平均体重 323g、鰓から検出された個体は 16 尾で平均体重 619g であり、鰓と脳(嗅葉)の両方から KHV が検出された個体は 1 尾(体重 256g)であった。サンプリング日の現場における水温は、19.1℃であった。

なお、今年度はこれまでに児島湖において、コイの目立った斃死は確認されていない。

また、6 月 11 日及び 9 月 2 日のサンプリング分について血中の抗 KHV 抗体価を測定し、体長と抗体価の散布図を図 1 に示した。体長が大きくなるにしたがい、抗体価も高くなる傾向を示した。抗体価が高いにもかかわらず、脳(嗅葉)から KHV が検出されない個体が多かった。

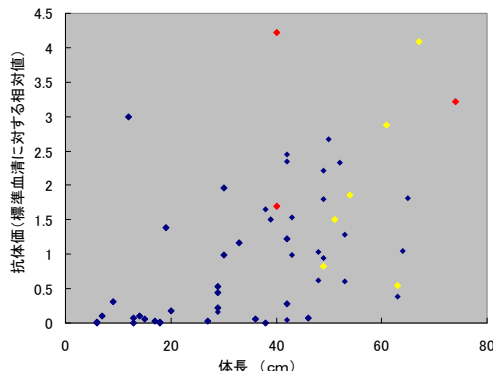


図 1. 児島湖の野生ゴイ体長と抗体価の散布図。赤は鰓の PCR+ 個体；黄色は脳の PCR+ 個体

Ⅲ. 21 年度計画

1. KHV 感染耐過魚からのウイルス検出技術の確立

(1) PCR による検査技術の開発

KHV 培養上清希釈液に健康コイを浸漬する方法で人為感染魚を作出する。生存した感染コイを半年間、23℃の流水で飼育して感染耐過魚を作出し、その耐過魚から脳の嗅葉を無菌的に摘出して実験材料とする。嗅葉の一部を用いて、ウイルスゲノムが十分に残存するが感染性が無いことを PCR 法やバイオアッセイ法により確認する。残りの嗅葉について無菌的に細かく切り刻んで細胞片とし、培養器内の CCB 細胞に接種し、1～2 週間培養する方法で残存ウイルスの再活性化を試みる。再活性化の有無は、培養上清を健康コイに接種して感染性を確認する方法で判定する。

また、感染耐過魚にデキサメタゾン等の免疫抑制剤を投与し、投与前および投与数日後に鰓・体表等から PCR 法を用いてウイルス検出を試み、免疫抑制剤を投与することにより、感染耐過魚の鰓・体表等からウイルスが検出可能になるか否かを検討する。

(2) 抗体検出法のキット化

確定した条件でのキット化に向け、引き続き保存安定性試験を進める。製造後、一定期間経過したキット操作による測定値の変動に基づき、再現性の検証を行う。現段階では測定値に目立った変動は見られないため、引き続き試験を行い、使用期限 6 ヶ月以上を目標に、使用期限を定める。5 時間程度となった測定時間を更に 4 時間程度にすることを目標に、前年度時間短縮の可能性が示唆された測定系について、抗原の固相化濃度、各抗体の組み合わせ条件・濃度、反応時間等の検討を行い、安定した再現性、至適条件について検証、その測定系によるキット化の可否を判断する。また、キット販売に向け、容器・容量を含めた総合テスト、試作キットを用いた直線性・プレート内間差等の性能試験を行う。また、Lot.試験を重ね、ELISA キットとしての安定した供給条件の整備・最適化を目指す。同時に規格・内容・使用書の作成など販売に向けた準備も進めていく。

2. 養殖・加工施設からのまん延防止法の確立

(1) 卵の安全で簡便な消毒方法の確立 (20 年度終了)

(2) 排水の効率的な処理方法の開発

活性汚泥方式浄化槽の処理能力について、モデル浄化槽を作りそこから経時的に試料を採取し、排水処理施設としての有効性を検討する。抗 KHV 活性を有する細菌を定着させたる材に、KHV 添加人工排水を通し、処理前後の感染性の有無を確認する。処理水温、

処理日数などの諸条件を検討し、現場レベルで実現可能な処理条件を設定する。ウイルスの不活化について科学的な裏付けを得るため、抗 KHV 活性物質の粗精製を行い、物質の大まかな性状を確認する。

(3) 加工処理方法の開発 (19 年度終了)

3. 天然水域における KHV サーベイランス

(1) 霞ヶ浦におけるサーベイランス

霞ヶ浦の行方市地先において、5 月、6 月、7 月、9 月、10 月、11 月に、定置網等により野生のコイを、各月 30 尾を目標にサンプリングする。採集したコイについては、採血して血清を採取するほか、解剖して鰓組織および脳の嗅葉を取り出す。血清は ELISA により血中の抗 KHV 抗体価を測定する。また、鰓および脳の嗅葉は PCR による KHV の検出を試みる。さらに、野生ゴイのへい死サンプルが入手できた場合、へい死魚の鰓について PCR による KHV の検出を行う。

(2) 琵琶湖におけるサーベイランス

琵琶湖の沿岸域においては、エリ(小型定置網)および刺網を中心とした漁法で 5~12 月にかけて継続的にコイを 200 尾(できる限り各月均等に)を目標にサンプリングする。沖合域においては、沖曳き網(小型底引き網)により冬季(2~3 月)にコイを 30 尾を目標にサンプリングする。コイは採血して血清を採取し、解剖して鰓組織および脳の嗅葉を取り出す。血清は ELISA により血中の抗 KHV 抗体価を測定する。また、鰓および脳の嗅葉から PCR により KHV の検出を試みる。さらに琵琶湖で斃死したコイのサンプルが入手できた場合は鰓の PCR により KHV の検査を行う。

(3) 児島湖におけるサーベイランス

児島湖において、KHV の発生しやすい水温帯となる時期(6 月頃)、夏季の高水温時期(8 月頃)、秋季の水温低下時期(11 月頃)、冬季の低水温時期(2 月頃)に野生のコイを各 30 尾を目標にサンプリングする。コイは 1 尾ずつ採血して血清を採取し、解剖して鰓組織および脳の嗅葉を取り出す。血清は ELISA により血中の抗 KHV 抗体価を測定する。また、鰓および脳の嗅葉から PCR により KHV の検出を試みる。さらに野生ゴイの斃死サンプルが入手できた場合は鰓の PCR により KHV の検査を行う。

平成 21 年 4 月 22 日
茨 城 県

霞ヶ浦北浦におけるコイ養殖の再開について

1. 技術的課題に係る研究成果

(1) KHV耐性コイの網いけす飼育試験

飼育水の温度変化（昇温処理）を経た感染耐過魚を，霞ヶ浦北浦の網いけすで飼育試験を行った。

①試験条件

- ・温度変化の条件は，KHV感染魚群の飼育水温を5日間 32℃に昇温する操作を間欠的に3回行った。
- ・網いけす(5m×5m×深さ 2.5m)には1面あたり 5,000尾を収容した。

②飼育試験結果

- ・平成 19 年度（稚魚の由来：平成 18 年生まれの霞ヶ浦天然コイ由来稚魚）
平成 19 年 5 月から 12 月まで網いけすで飼育した結果，処理魚の平均生残率は 91.8%，未処理魚の平均生残率 25.3%となった。
- ・平成 20 年度（稚魚の由来：平成 19 年生まれの H15 年感染耐過魚由来稚魚）
平成 20 年 6 月から 12 月まで網いけすで飼育した結果，処理魚の平均生残率は 95.0%となった。

※これらの結果から，網いけす養殖の種苗として感染耐過魚を用いることで，高い生残率が期待できることが示された。

(2) 新たな加工処理方法の開発

KHV感染耐過魚（未昇温），昇温処理魚およびKHV発症魚を用いて未感染魚への感染性について試験を行った。

①試験条件

KHV耐過魚等の生の鰭・鱗つき魚肉，内臓，エラ，血液，フィレーを未感染魚の飼育水槽に収容した。

②試験結果

- ・発症魚のエラ区を除き，いずれの試験区でも未感染魚にKHV病の発症はみられなかった。
- ・KHV病発症魚のエラの収容区でのみPCR陽性となった（4回試験中1回）。
- ・なお，KHV発症魚のエラを磨砕した抽出液の浸漬試験ではKHV病発症が確認された。
- ・これらから，KHV病発症魚のエラはKHV感染源となりうるが，その他の部位がKHV感染源となる可能性は極めて低いものといえた。

※これらの結果から，KHV感染魚でも少なくともエラを除去して加工すれば，生鮮の状態でも実質的に感染性は無くなることが示された。

(3) 霞ヶ浦におけるコイヘルペスウイルス感染の動向

平成16年以降、霞ヶ浦北浦において天然コイのモニタリングを実施している。

①PCR検査（毎年）：陽性個体検出率：平均9.6%（4.3%～12.8%）

②抗体価測定：抗体保有個体検出率(OD値0.4以上)：H17 68.8%，H20 70.0%

※霞ヶ浦北浦では、養殖休止後5年間を経過した現在でも、KHVの存在が示されているが、養殖再開後についても、引き続き感染の動向をモニタリングしていく。

2. 霞ヶ浦北浦におけるコイ養殖再開について

(1) これまでの経緯

霞ヶ浦北浦のコイ養殖は、全国一の生産量を誇っていたが、平成15年10月のKHV病の発生により持続的養殖生産確保法に基づく移動禁止命令、処分命令が出され、平成16年3月までに当時飼育されていたコイの全量が処分された。

茨城県は、①新たな稚魚を湖内で飼育しても斃死するリスクが高いこと、②まん延させない出荷流通方法の検討が必要であることなどの理由から、養殖業者に対し、これらの課題が解決するまでの間、コイ養殖の自粛を要請した。

今般、前述のとおり①、②の技術的課題が解決されたことから、以下の条件付きでのコイ養殖自粛解除を行うこととしている。

なお、霞ヶ浦北浦の水質への負荷の軽減を図るため、養殖再開時には、網いけす養殖施設の規模を、平成15年当時の概ね半分にすることとしている。

(2) 霞ヶ浦北浦におけるコイ養殖時の条件

① 網いけす養殖を行う種苗について

KHV病に耐性を持つ種苗を用いることとし、網いけすへの収容尾数を管理することとする。

② 斃死魚の取扱いについて

まん延防止の観点から埋設、焼却による適正な処理を行うこと。

また、大量斃死があった場合には速やかに県へ連絡を行うこと。

③ 出荷形態について

切り身または鰓除去の鮮魚または加熱加工品とする

④ 上記③を担保する措置について

持続的養殖生産確保法に基づく移動禁止命令（③の形態に加工するための移動を除く）をかけることとする。

また、出荷記録を義務づけ、県の要請により出荷記録の提出に応じることとする。

(3) コイ養殖における生産管理工程表

生育段階	飼育場所等	管理手法
採卵～稚魚期① (5月～)	陸池①	消毒した池において井戸水を使用し、 KHV フリーでの飼育を行う。
稚魚期② (7～8月)	陸池②	飼育水を湖水とし、 KHV 耐性の獲得を行う。
稚魚期③ (8月～)	陸池②→網いけす	KHV 耐性を持った稚魚を網いけすに収容する。 ＜移動禁止命令の発出＞
稚魚期③～成魚	網いけす	＜移動禁止命令の下での飼育管理＞ ・収容尾数の管理。 ・飼育魚の健康状態の観察。
成魚 (翌年8月～)	網いけす→♂池	＜移動禁止命令の下での移動管理＞ ・取り上げ尾数の管理。 ・出荷魚の健康状態の確認。
＜まん延防止のための加工処理＞	♂池→加工場①	＜移動禁止命令の下での加工管理＞ ・加工場①は県内の流域内に限る。 ・加工場①において切り身または鰓除去の鮮魚への加工，加熱加工を行う。 ・魚体の処理で発生する残滓は，焼却，埋却またはこれらの処理が行われる処分場に出して行う。
＜ 出 荷 ＞	加工場①→加工場② 消費者	・感染性が保持されないため，県内外を問わず販売可能。 ・消費者向け販売品または加工業者への加工原魚として販売。 ・出荷記録表の記帳。