

農学部門長 殿

研究代表者 今城 雅之
助言・評価者 大嶋 俊一郎

平成 27 年度農学部門個人・グループ研究プロジェクト
研究成果報告書

標記について、下記のとおり報告いたします。

記

1. プロジェクト名称

野生コイに感染したコイヘルペスウイルス再活性化の環境リスク因子の特定

2. 研究成果（2 ページ程度）

コイヘルペスウイルス病はマゴイとニシキゴイ (*Cyprinus carpio* L.) に発生する新興ウイルス感染症であり、コイヘルペスウイルス (CyHV-3) を原因とする。現在、わが国において本疾病は持続的養殖生産確保法の特定疾病に指定されており、特に天然水域に生息する野生コイで問題となっていることから、全国でそのまん延防止に努めなければならない。申請者は、平成 25 年度と 26 年度の自然科学系 (農学部門) 個人・グループ研究プロジェクトで採択された 2 年間のプロジェクトにおいて、高知県下の 3 河川 (鏡川、物部川、および和食川) に生息する一部のコイはコイヘルペスウイルスに感染していたものの、潜伏感染を確立しており、再発して感染拡大する傾向にないことを明らかにした (1)。しかし、その一方で、同じ四国内の愛媛県西条市にある馬淵川では、一昨年に続き昨年もコイヘルペスウイルス病による被害を受けたコイが見つかったことから、何らかの環境変化が引き金となって、潜伏状態から復帰感染を引き起こして発症する場合があるという新たな考えが出てきた。そこで、本研究では、愛媛大学との共同研究で、愛媛県下の河川に生息するコイを対象に CyHV-3 の感染実態を調査し、同時に河川水の環境分析を行うことで、ウイルス再活性化の引き金となる環境因子を明らかにすることを目的とした。

コイのサンプリングは計画当初、愛媛県西条市の馬淵川、界谷川、および御船川を対象にしていたが、コイの捕獲が困難であったため、松山市の小野川 (緯度 33°49'06.2"N、経度 132°45'41.0"E) に変更した。現場で河川水の水温、pH、電気伝導度 (EC) を測定し、コイを釣りで捕獲した。その場で検体の延髄を破壊して屠殺し研究室に持ち帰った。その後、検体の体長と体重を測り、慎重に解剖して鰓と脳を摘出した。鰓は重量で約 200 mg になるように細分化し、脳から嗅葉部を切り取り、プロテイナーゼ K で消化した。その後、DNA 抽出の定法であるフェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿により DNA を回収し、その純度と量を測定した。100 ng の抽出 DNA 溶液を Gilad ら (2) の定量 PCR 法に供して、CyHV-3 DNA を検出・定量した。ウイルス遺伝子型は Kurita ら (3) に従いチ

ミジンキナーゼ (TK) 遺伝子領域の塩基配列を解析することで判別した。さらに、定量 PCR 陽性サンプルは Uchii ら (4) の nested-PCR 法に供し、ウイルスゲノム環状化の有無を明らかにした。

今回得られた結果を Table 1 にまとめた。小野川の EC 値はサンプリング期間の間 20 mS/m 以上となり、全国の河川の平均値と比較して相対的に高く、汚濁した河川水を示す数値であった。サンプリング時の水温は 6 月 29 日で 26.5°C、7 月 29 日で 27.4°C、9 月 9 日で 23.0°C、11 月 30 日で 16.0°C、12 月 22 日で 13.2°C となり、CyHV-3 の至適増殖温度は 15°C から 25°C の範囲であることから、9 月上旬から 11 月下旬がウイルス増殖に適した時期であったと考えられた。定量 PCR 法の結果、9 月 9 日の 1 検体の脳サンプルのみで陽性となった。TK 遺伝子のシーケンス解析の結果、その遺伝子型は、これまで日本で報告されている J/A1 型と判別された。韓国と中国では、数年前に欧州・米国由来とされるヨーロッパ型 CyHV-3 がへい死コイから初めて分離され、従来にない型の侵入が問題となっているが、今回の小野川のコイではヨーロッパ型は確認されなかった。また、9 月 9 日の脳サンプルにおけるウイルス量は 4.3 ± 1.0 コピー/ 10^6 cells と我々の以前の報告と同様 (1) に低い値となり、環状ゲノムは検出されなかったものの、脳のみから検出されたことを合わせて考慮すると、小野川のコイに対して CyHV-3 はヘルペスウイルス特有の潜伏感染を長期間確立して、至適水温になっても増殖する傾向にないと考えられた。このことから、今回再活性化した CyHV-3 を見つけることができず、その環境要因を特定するには至らなかった。しかし、コイヘルペスウイルス病発生がまだ確認されていない小野川で CyHV-3 が検出されたのは今回初めてであり、報告事例のない河川で本疾病が発生する可能性は十分にある。また、ヨーロッパ型の国内侵入は新たな懸念材料でもあることから、今後、農薬や TOC など有機物の指標も水質検査に加え、愛媛県内で対象の河川を広げて CyHV-3 調査を継続していく計画がある (平成 28 年度科学研究費助成事業基盤研究 (B) にて申請中)。

Table 1. 小野川のコイにおける CyHV-3 の検出結果 (定量 PCR による陽性数、遺伝子型、環状ゲノムの有無)、および河川水の水質評価 (水温、pH、電気伝導度)

Date	Body length (mean \pm SD)	Body weight (mean \pm SD)	qPCR-positive no./ total no. examined		Genotype	Circular DNA	Copies per 10^6 cells (mean \pm SD)	Water temp.	pH	EC (mS/m)
			Gills	Brain						
5.18	N.D.	3.0 \pm 0.6 kg	0/4	0/4	—	—	—	N.D.	N.D.	N.D.
6.29	51.4 \pm 3.3 cm	3.6 \pm 0.6 kg	0/4	0/4	—	—	—	26.5	8.4	24.0
7.29	45.8 \pm 2.7 cm	2.7 \pm 0.4 kg	0/4	0/4	—	—	—	27.4	8.4	23.0
9.9	45.0 \pm 3.4 cm	2.7 \pm 0.6 kg	0/4	1/4	J/A1	None	4.3 \pm 1.0	23.0	7.8	22.0
11.30	46.7 \pm 4.2 cm	2.6 \pm 0.5 kg	0/4	0/4	—	—	—	16.0	7.9	29.0
12.22	52.6 \pm 4.3 cm	3.6 \pm 0.8 kg	0/5	0/5	—	—	—	13.2	7.6	24.0

引用文献

1. Fujioka H., Yamasaki K., Furusawa K., Tamura K., Oguro K., Kurihara S., Seki S., Oshima S., Imajoh M. (2015) Prevalence and characteristics of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) inhabiting three rivers in Kochi Prefecture, Japan. *Vet. Microbiol.*, 175, 362–368.
2. Gilad O., Yun S., Zagmutt-Vergara F.J., Leutenegger C.M., Bercovier H., Hedrick R.P. (2004) Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio* koi as assessed by

real-time TaqMan PCR. *Dis. Aquat. Organ.*, 60, 179–187.

3. Kurita J., Yuasa K., Ito T., Sano M., Hedrick R.P., Engelsma M.Y., Haenen O.L.M., Sunarto A., Kholidin E.B., Chou H., Tung M., de la Peña L., Lio-Po G., Tu C., Way K., Iida T. (2009) Molecular epidemiology of koi herpesvirus. *Fish Pathol.*, 44, 59–66.
4. Uchii K., Minamoto T., Honjo M.N., Kawabata Z. (2013) Seasonal reactivation enables Cyprinid herpesvirus 3 to persist in a wild host population. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 87, 536–542.

3. 研究助言・評価者のコメント（300字程度）

研究代表者は、昨年度までは高知県内の主な3河川に生息するコイを対象動物とし、CyHV-3の分布状況と発症状況を調査した結果、潜伏感染は確認されたが発症例はないことを明らかにしている。

本年度はコイヘルペスウイルス病による被害が確認された愛媛県下の河川に生息するコイを対象にCyHV-3の感染実態を調査し、潜伏ウイルスの再活性化の引き金となる環境因子を明らかにする試みを行っている。このような地道な研究結果の蓄積は、今後、本ウイルスの感染制御を行う上で重要なデータとなることが十分に期待できる。

今回の研究では、本ウイルス感染症の発症に関連すると思われる環境因子を特定することはできなかったようであるが、上述されているとおり今後も現在の測定項目に加え、別の環境因子についても続けて調査し、本ウイルスの再活性化に関連すると思われる環境因子の特定を期待したい。

4. 研究成果公開実績

学術雑誌掲載—論文名・掲載誌・巻・号・発行年・ページ数（投稿中・投稿準備中も含む）
学会口頭発表—題目・学会名・発表年月（発表予定も含む）

四国4県の河川に生息する野生コイのコイヘルペスウイルスの検出状況について（高知大学学術研究報告に投稿準備中）