

農学部門長 殿

研究代表者 今城 雅之 印

助言・評価者 大嶋 俊一郎 印

平成26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 高知県の天然河川に生息するコイに潜伏感染したコイヘルペスウイルスの
回帰発症の検証

2. 研究成果（2ページ程度）

マゴイとニシキゴイ *Cyprinus carpio* L.で発生し問題となるコイヘルペスウイルス病は現在、持続的養殖生産確保法の特定疾病に指定されており、全国でそのまん延防止に努めなければならない。平成25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「高知県内の河川に生息する野生ゴイのコイヘルペスウイルス保有状況」では、コイヘルペスウイルス（CyHV-3）を保有するコイが高知市の鏡川、南国市の物部川および安芸市の和食川で生息していること、これまでに発生報告のなかった和食川のコイで CyHV-3 感染が初めて確認されたことなどが明らかになったことから、本プロジェクトでは引き続き、現在沈静化している高知県のコイヘルペスウイルス問題の現状を把握すべく、コイに感染した CyHV-3 の再活性化について焦点を当てることで、コイヘルペスウイルス病の回帰発症の可能性を検証することを目的とした。

コイのサンプリングは昨年を引き続いて高知市の中心部を流れる鏡川で実施し、60×60 cmの刺し網を用いて3月から10月までの調査期間で合計77検体（魚体長461.5±22.3 mm）を捕獲した。捕獲した検体は延髄破壊でその場で屠殺して持ち帰り、検体を解剖して鰓及び脳を摘出した。鰓は重量で約200 mgになるようにカットし、脳から嗅葉部を切り取り、フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿によってDNAを回収した。CyHV-3 DNAの検出・定量には、Gilad（2004）らのリアルタイムPCR法に従い、回収した200 ngのDNAを供した。CyHV-3 遺伝子型はKurita（2009）らに従いチミジンキナーゼ遺伝子領域の塩基配列を解析することで決定した。さらにCyHV-3 DNA陽性サンプルは、Uchiiら（2013）のnested-PCR法によるCyHV-3環状DNAの検出とUchiiら（2013）らのリアルタイムRT-PCR法によるORF32遺伝子の検出にそれぞれ供した。

サンプリング時の水温は、3月で15℃、4月で22℃、5月で22℃、6月で24℃、7月で27℃、8月で28.5℃、9月で25.5℃、10月で22℃となり、CyHV-3の至適増殖温度は15℃から25℃の

範囲であることから、3月から6月及び10月がウイルス増殖に適した時期であった。その一方で、リアルタイムPCR法の結果、3月、5月、6月、7月、8月及び10月の各検体の鰓または脳組織からCyHV-3が1（鰓）/7、1（脳）/10、1（脳）/12、1（鰓と脳）/8、2（ともに鰓と脳）/11及び1（脳）/9の割合でそれぞれ検出され、これらのウイルス量は1細胞あたり3月で2.6コピー、5月で2.4コピー、6月で1.7コピー、7月で1.7コピー（鰓）または1.4コピー（脳）、8月で2.0コピー（鰓）、1.6コピー（脳）、2.1コピー（脳）または3.0コピー（脳）及び10月で1.4コピー（脳）となり（図1参照）、大きな季節変動は見られなかった。これらの結果は昨年と同様の傾向であり、CyHV-3を保有する個体が鏡川に生息しているものの、至適増殖水温になってもウイルス増殖は誘発されないことを示した。さらに、5月と6月の脳組織の陽性サンプルからはnested-PCR法により環状DNAの検出とリアルタイムRT-PCR法により潜伏に関与するORF32遺伝子の発現が認められた。これらのことから、CyHV-3は再活性化せずにヘルペスウイルス特有の長期間にわたる潜伏感染を確立しており、現時点で発症する傾向にないことが明らかになった。日本の天然水域でコイヘルペスウイルス病の最大の被害例となった琵琶湖では、春から夏の産卵期にかけてウイルスが増殖して感染歴のないコイに今なお拡大していることが報告されている。今回の調査結果から、高知県の河川は琵琶湖の事例とは全く異なっており、感染拡大の状況にはないと考えられた。

CyHV-3のチミジンキナーゼ遺伝子の塩基配列の解析の結果、今回検出されたCyHV-3は全て、これまでに日本で報告されているアジアI型に分類された。日本を含むアジア各国ではアジア型のみ CyHV-3が報告されてきたが、ここ数年前から韓国と中国で発生したコイヘルペスウイルス病のコイから欧州と米国を中心に発生しているヨーロッパ型のCyHV-3が分離されるようになり、新たなCyHV-3侵入の問題が懸念されている。今回鏡川ではヨーロッパ型のCyHV-3は確認されなかったが、ヨーロッパ型のウイルス侵入は新たなコイヘルペスウイルス問題を引き起こす懸念材料であり、今後も継続して監視していく必要がある。

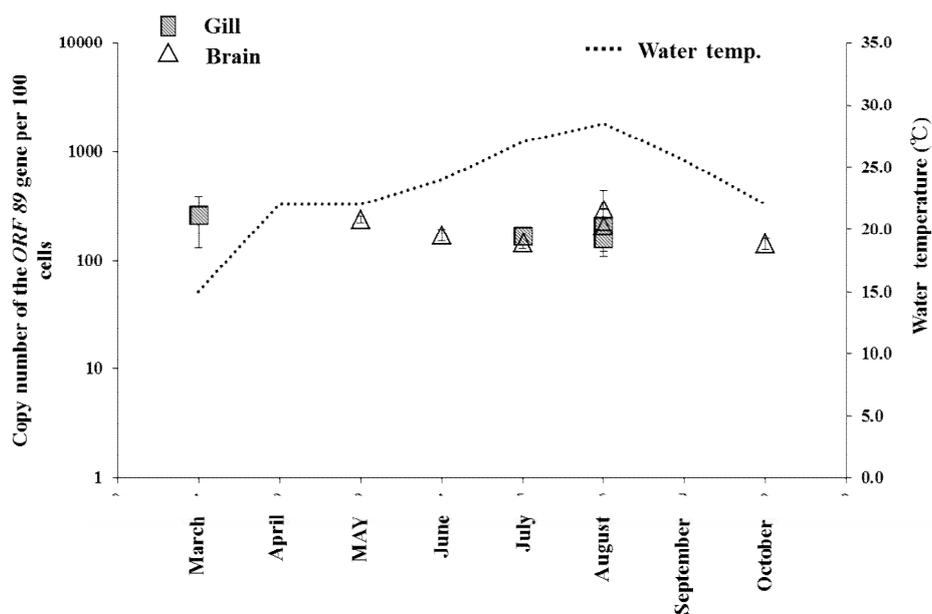


図1 3月から10月の各月におけるコイの鰓及び脳でのウイルスゲノム量の変動と水温変化

3. 研究助言・評価者のコメント（300字程度）

本研究では、2003年から国内で問題になっているコイヘルペスウイルス病の原因ウイルスである CyHV-3 について、高知県内の河川に生息するコイを対象動物として、その分布状況を継続的に地道に把握し、本病の再興感染が発生する可能性を潜伏感染やウイルス型などの観点から調べており、今後、本病に対する有効な対策を講じる上で意義深い研究成果が多数得られている。

本研究により得られた知見は、本病はもとより、今後、他の外来の各種病原体が国内に侵入して来た際に、有効且つ普遍的な対策を講じる上で非常に参考になることが期待されるので、今後も対象とするフィールド領域を拡大して、このままこの調査研究を継続して実施してもらいたい。

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）

学術雑誌掲載

Prevalence and characteristics of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) inhabiting three rivers in Kochi Prefecture, Japan. *Veterinary Microbiology*, 175, 2-4, 2015, 362-368.

学会口頭発表

温度変化による *in vitro* でのコイヘルペスウイルス複製への影響 日本水産学会 中国・四国支部大会 2014年11月29日