

国内で検出されたCarp edema virus のニシキゴイ、マゴイおよびキンギョに対する感染性と病原性

松本あかね¹, 本田幸太郎², 高橋洋², 近藤昌和², 安本信哉^{2†}

Infectivity and pathogenicity of carp edema virus isolated in Japan to koi carp, common carp and goldfish

Akane Matsumoto¹, Kotaro Honda², Hiroshi Takahashi², Masakazu Kondo² and Shinya Yasumoto^{2†}

Abstract : Viral edema of carp (VEC) caused by the carp edema virus (CEV) causes economic losses for Japanese koi farms. In this study, we investigated the infectivity and pathogenicity of a domestic CEV isolate (genogroup IIa) in koi carp, common carp and goldfish. The challenge test consisted of 9 groups (n = 15): 3 groups each of koi carp, common carp, and goldfish, at 15, 20 and 25°C. These groups were challenged with CEV (3.0×10^3 copies/ μ L) in duplicate. All koi carp died in the 15 and 20°C groups, but all survived in the 25°C group. The surviving koi carp in 25°C groups showed high PCR positive rates of 66.7 and 73.3%, with VEC histopathological changes observed. For the common carp, 1 and 2 fish died in the 20°C groups, but no deaths or VEC symptoms were observed in the 15 and 25°C groups. In all common carp groups, PCR-positive fish were observed along with histopathological changes. For all goldfish groups, no deaths or VEC symptoms were observed. As with the common carp, PCR-positive fish were found in all goldfish groups, yet no VEC histopathological changes were detected. These results demonstrate infectivity of this CEV strain in koi carp, common carp, and goldfish, but low pathogenicity in common carp and goldfish.

Key words : carp, *Cyprinus carpio*, goldfish, carp edema virus, viral edema of carp

緒言

コイ *Cyprinus carpio* には食用のコイ (マゴイ) とニシキゴイが存在し、いずれも生物学的には同一とされる¹⁾。一般的には体色が黒い個体をマゴイ、色彩鮮やかな個体をニシキゴイと呼ぶ。コイは食用としての需要が高く、世界中で養殖されている魚種である²⁾。ニシキゴイは新潟県中越地方で食用に飼育されたコイから突然変異によって生まれたわが国発祥の観賞魚であり、赤や白といった鮮やかな体色を持つ。現在では、品種改良が進み多くの品種が作出され、品評会等で高い評価を受けた魚は高額で取引されるようになった。ニシキゴイは海外においても高い人気を得ており、

国内生産の8割以上が輸出されている。ニシキゴイを活魚として輸出するには、多くの国でコイヘルペスウイルスの無病証明が必要となるが、近年では、一部の国でコイ浮腫症ウイルス (Carp edema virus: CEV) もその対象となっている³⁾。

CEVによる感染症は、国内では主にニシキゴイで発症する病気であり、ウイルス性コイ浮腫症 (viral edema of carp: VEC) と呼ばれる。本症は初夏 (6~7月) に稚魚が眼球陥没、躯幹の浮腫み、鰓弁の棍棒化などの症状を呈し、水温25°C以下では当歳魚や2歳魚 (まれに成魚) が眠ったように横臥し、いずれも大量死を引き起こす^{4,6)}。CEVは1974年に国内のニシキゴイで初報告されて以降⁷⁾、ニシキゴイ産

2022年11月30日受付, 2023年1月27日受理

¹ 国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産大学校水産学研究所 学生 (Graduate student, Graduate School of Fisheries Science, National Fisheries University)

² 生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

[†] 別刷り請求先 (corresponding author): yasumotos@fish-u.ac.jp

業の発展にともない、世界各国で発生が報告されるようになった。近年では、本症がニシキゴイ以外のコイでも被害が報告されており⁸⁻¹⁴、2017年には国際獣疫事務局 (OIE)が指定する新興感染症リストに含まれた¹⁵。しかしながら、国内では食用ゴイでの被害が少ないため、国内に蔓延するウイルス株はそれらへの病原性および感染性が低いことが考えられた。また、CEVはコアタンパク質p4aをコードするDNA配列の断片により6~10%の遺伝的多様性が認められ、遺伝子グループI, IIa, IIb, IIIaおよびIIIbの5つに分けられる。なかでもI型はコイ, IIa型はニシキゴイ, IIb型はコイとニシキゴイ両方から主に分離または被害が報告されているが^{16, 17}、実際の感染性や病原性を調べた報告は少ない¹⁸。

そこで本研究では、国内で得られたVEC病魚から分離されたCEVを用いてニシキゴイ、食用として養殖されているマゴイおよびコイの近縁種であるキンギョ *Carassius auratus* に対して感染実験を行い、感染性と病原性について調べた。

材料および方法

供試ウイルスおよび供試魚

CEV (NFU11N1) は、2011年に新潟県内の養鯉場で得られたニシキゴイ病魚 (紅白, 当歳) の鰓から分離されたものを供した。

ニシキゴイ (平均体重 52.5 g)、マゴイ (平均体重 39.2 g) およびキンギョ (平均体重 16.2 g) は、2019および2020年に水産大学校で生産し、飼育された当歳魚を供した。

病魚からのCEVの検出と塩基配列の決定

CEVに感染したニシキゴイの鰓から、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, ドイツ) を用いてDNAを抽出した。CEV -P4a遺伝子断片の増幅を目的とし、抽出したDNAを鋳型にして、プライマー対CEV for B/CEV for rev Lを用いてPCRを行い、さらにそのPCR産物を鋳型にして、プライマー対CEV ForB-int/CEV RevJ-intを用いてNested PCRを行った¹⁹。PCR反応液は、KAPA2G Robust Hotstart PCR kit (KAPA Biosystems, アメリカ合衆国)のプロトコールに従い調製した。反応条件は95℃ 5分間の初期変性のうち、95℃ 30秒間, 55℃ 30秒間, 72℃ 30秒間を45サイクル行い、さらに72℃ 7分間の最終伸長を行った。PCR増幅産物は1.5%アガロースゲルを用いて50 Vで1時間泳動し、エ

チジウムブロマイド溶液で染色したのち、紫外線を照射して確認した。PCR産物にExo-SAP-IT (Thermo Fisher Scientific, アメリカ合衆国) 0.7μLおよび超純水6.3μLを加えて、シェイキングインキュベーターで37℃ 40分間処理し、続いて80℃ 20分間静置して精製した。

塩基配列の決定は、BigDye Terminator V3.1サイクルシーケンスキット (Thermo Fisher Scientific, アメリカ合衆国) を用いて、キットのプロトコールに従って行った。得られた塩基配列データに基づき、NCBI BLASTnを用いて相同性検索を行った。

MEGAによる系統解析

本研究で得られた配列と、53の代表的なCEVのP4a遺伝子配列からマルチプルアライメントおよび系統樹の作成を行った^{9, 20}。MEGAソフトウェア (Version 10.1.8) を使用し、ClustalWを用いてマルチプルアライメントを行ったあと、Tamura - Neiモデルに従って最尤法による系統解析を実施した^{16, 21}。生成された系統樹の各分岐の信頼性は、ブートストラップ法 (1000回反復) を使って検定した²²。

ウイルスの定量

ウイルスの定量には、親松ら (1997) によって設計されたプライマー F2/R2によって得られるCEVのDNA断片を組み込んだプラスミドを精製し、定量PCRを行った²³。PCR反応液の調製にはKAPA SYBR[®] FAST qPCR Kit Master Mix (2×) Universal (KAPA Biosystems, アメリカ合衆国) を用いた。PCR反応液には1検体あたりKAPA SYBR[®] FAST qPCR Master Mix (2×) Universal 10μL, 10μMの各プライマー 0.4 μL, ROX High (50×) 4 μL, 鋳型DNA 5 μLが含まれスクリーナーゼフリー水で最終容量を20 μLとした。反応条件は95℃ 20秒間の酵素活性ののち、95℃ 3秒間, 60℃ 30秒間を1サイクルとする反応を40サイクル行い、全てのサンプルで反復を2とした。PCR反応の結果から 10^{2-9} copies/μLの標準曲線を作成してウイルスを定量した。

CEV人為感染試験

ニシキゴイ、マゴイおよびキンギョ (それぞれ水温15℃区, 20℃区および25℃区)の3魚種を用いて9つの試験区を設置し、2回の人為感染試験を行った。供試魚は容量50 Lの水槽に15尾ずつ収容した。ウイルスは、下記に示した方法でCEVに感染させた病魚 (紅白, 当歳) から採取した

鰓組織とその10倍量の無血清イーグルMEM (日水製薬株式会社, 日本)中で摩砕し, 1 Lの飼育水に加えた (最終ウイルス濃度 3.0×10^3 copies/ μ L)。さらに, その飼育水に供試魚をそれぞれ15尾ずつ1時間浸漬し (3.0×10^3 copies/ μ L), CEVに感染させた。感染後, 再び水槽に戻して14日間経過観察を行い, 瀕死または死亡に至った魚は解剖して鰓と腎臓を摘出した。摘出した組織は以下のPCRに供するまで-80°Cで保存した。試験終了時に生残した魚も同様に行った。なお, 生残した個体の一部については病理組織学的検討を行った。

人為感染魚からのCEVの検出

ウイルスの検出は鰓および腎臓から行った。各組織からDNAzol[®] (Molecular Research Center, アメリカ合衆国)を用いてメーカーのプロトコールに従ってDNAを抽出し, 4°Cで保存した。抽出DNAは親松ら (1997)の方法に従ってNested PCRに供した²⁴⁾。

病理組織学的観察

生残魚の鰓および内臓諸器官を10%ホルマリン液で固定し, エタノール系列で脱水後, キシレンで透徹してパラフィン包埋した。定法に従って厚さ4 μ mのパラフィン切片を作製し, hematoxylin eosin染色 (HE)を施して光学顕微鏡で観察した。

結 果

CEVの検出と塩基配列決定および分子系統解析

BLASTn検索の結果, 本研究で使用したCEV (NFU11N1)はポーランドのニシキゴイで検出されたCEV (accession number KX254004)と99%の相同性があった (Fig. 1)。

CEV - P4a遺伝子配列に基づいた系統解析の結果, 系統樹は3つの遺伝子グループを示し (I, IIaおよびIIb), 本研究で用いたCEV (NFU11N1)はIIaに含まれた (Fig. 2)。

CEV人為感染試験

人為感染の累積死亡率の推移をFig. 3に示した。

一回目ではニシキゴイ15および20°C区において, 遊泳が不活発となり, 軀幹部の浮腫, 眼球陥没, 底で横臥するなどのVECの典型症状が観察された (Fig. 4)。15°C区では感染から6~12日目にかけて, 20°C区では感染から3~6日目までに全て死亡した。一方で, ニシキゴイ25°C区ではすべて生残し, VECの症状を呈する個体はみられなかった。マゴイでは, 20°C区で1尾のみが感染8日目から遊泳不活発となり, 13日目に死亡した。15°Cおよび25°C区ではすべて生残し, VECの症状もみられなかった。キンギョでは, いずれの試験区でVECの症状を呈する個体は観察されず, すべて生残した。

二回目でも同様に, ニシキゴイ15°C区では感染から8~11日目に, 20°C区では4日目までにすべての個体がVECの症状を伴って死亡した。ニシキゴイの25°C区ではすべて生残し, 外見的な異常はみられなかった。マゴイの20°C区では14日目に2尾死亡したが, 外見的なVECの症状はみられなかった。その他のマゴイおよびキンギョの試験区では

Table 1 PCR positive rate in artificial infection with CEV

Exp ^{*1}	Experimental group	Positive rate (%) ^{*2}	
1	Koi carp	15°C	100
		20°C	100
		25°C	66.7
	Common carp	15°C	53.3
		20°C	80.0
		25°C	33.3
Goldfish	15°C	33.3	
	20°C	53.3	
	25°C	26.7	
2	Koi carp	15°C	100
		20°C	100
		25°C	73.3
	Common carp	15°C	73.3
		20°C	80.0
		25°C	40.0
Goldfish	15°C	73.3	
	20°C	73.3	
	25°C	33.3	

^{*1} Artificial infection were performed in duplicate (Experiment 1 and 2).

^{*2} PCR positive fish had PCR positive gill and/or kidney.

```

KX254004 : 2  gttatcaatggaatttggattgtgtttttgtagtccaagagttttcttctcatcgt 61
||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
NFU11N    : 1  gttatcaatggaatttggattgtgtttttgtagtccaagagttttcttctcatcgt 59

```

Fig. 1 Comparison of a part of the nucleotide sequence encoding the CEV p4a core protein. KX254004: DDBJ under accession number.

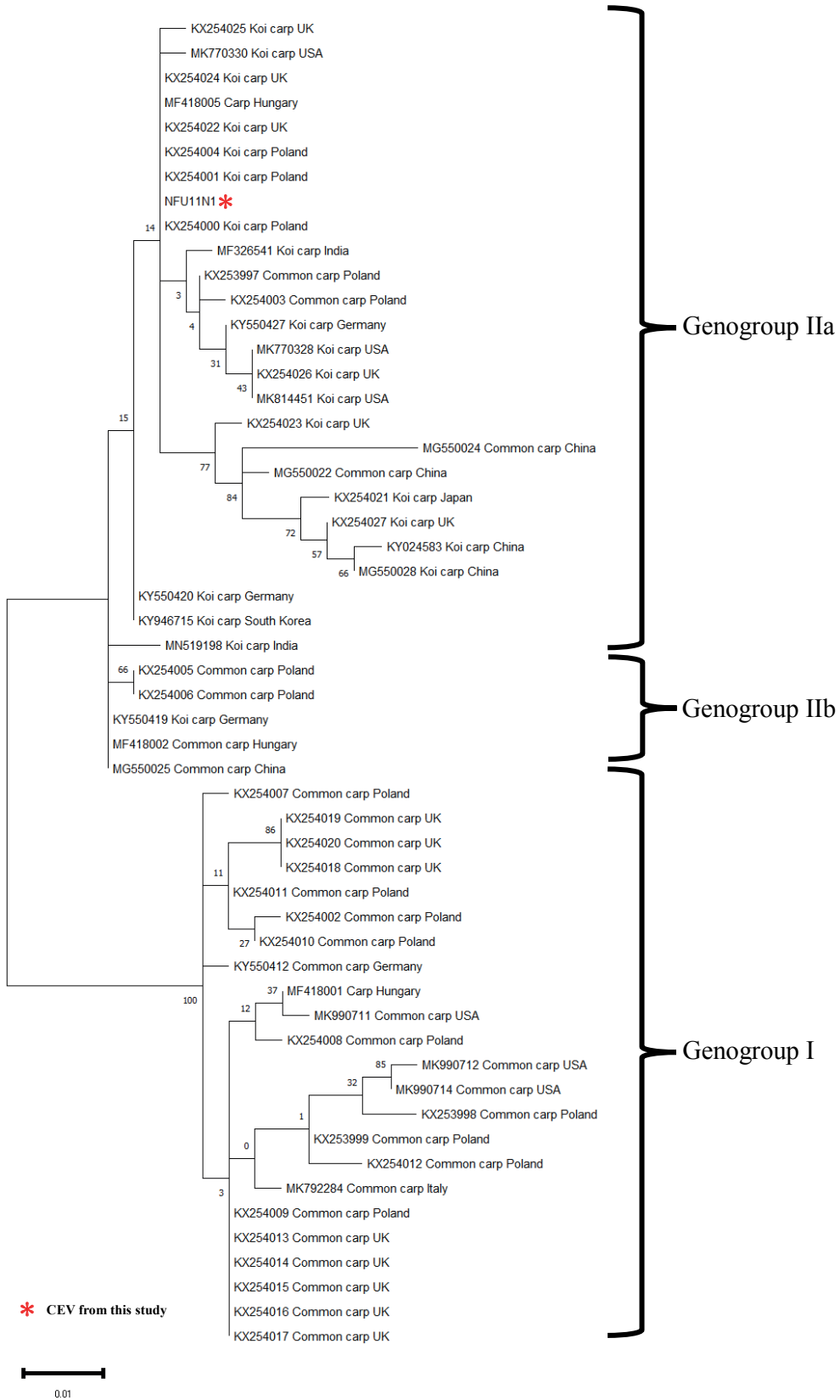
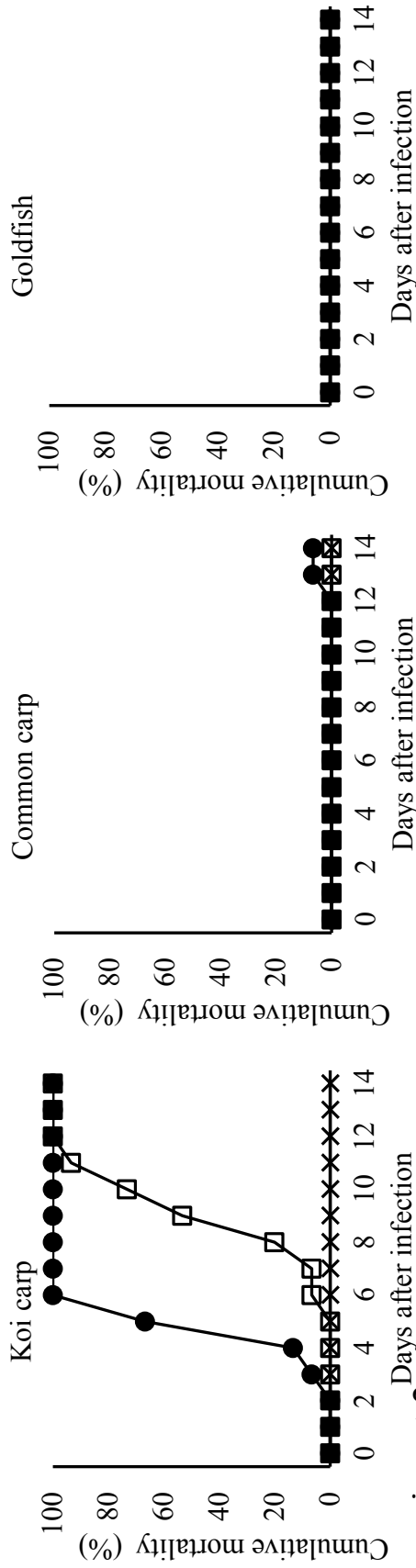


Fig 2 Maximum likelihood tree between 53 representative CEV sequences and the sequence obtained in this study (NFU11N1). The bootstrap value of the main branches is shown on the branches.

Experiment 1



Experiment 2

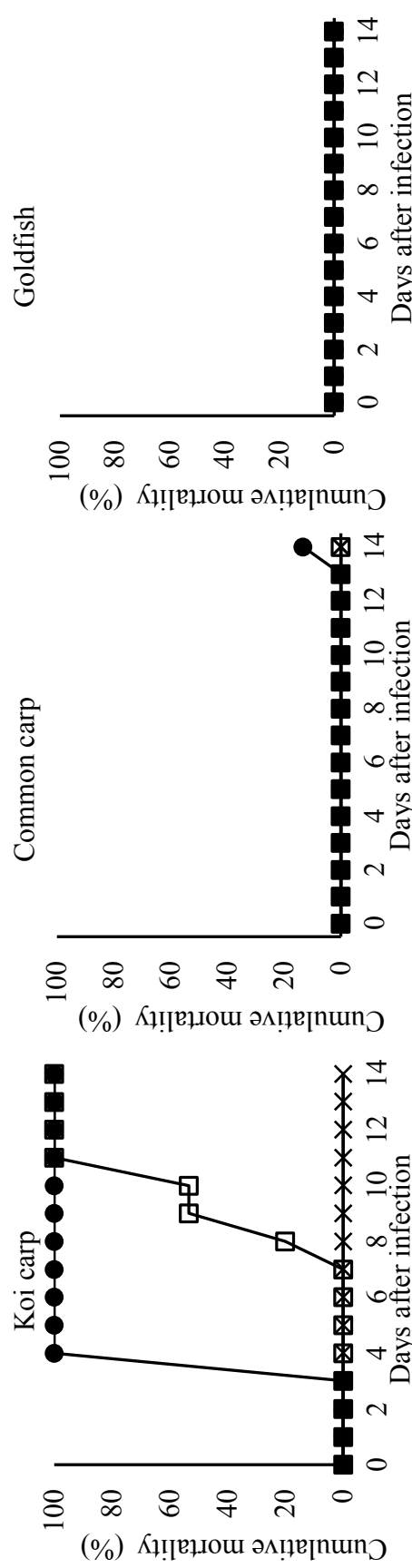


Fig. 3 Cumulative mortality in artificial infection with CEV. The challenge test consisted of 9 groups (n = 15), 3 groups each of koi carp, common carp, and goldfish, at 15 (□), 20 (●), and 25°C (×). These groups were challenged with CEV (3.0×10^7 copies/ μL) in duplicate (Experiment 1 and 2).

VECの症状を呈する魚や死亡した魚もなかった。

死亡魚および生残魚の鰓および腎臓のPCRを行ったところ、すべての試験区で鰓や腎臓で増幅産物 (181 bp) が確認された。鰓または腎臓のいずれか一方またはその両方で陽性となった個体を陽性個体とみなし、Table 1に示した。一回目の試験では、全て死亡したニシキゴイの15および20℃区の陽性率は、いずれも100%となり、生残したニシキゴイ25℃区では66.7%となった。マゴイの15℃区、20℃区、25℃区では、それぞれ53.3%、80.0%および33.3%となり、キンギョではそれぞれ33.3%、53.3%および26.7%となった。二回目の試験においては、全て死亡したニシキゴイの15℃区および20℃区の魚は全て陽性となり、生残した25℃区は73.3%となった。マゴイの15℃区、20℃区、25℃区ではそれぞれ73.3%、80.0%および40.0%となり、キンギョではそれぞれ73.3%、73.3%および33.3%となった。なお、死亡したニシキゴイおよびマゴイはすべて陽性であった。

病理組織学的検討



Fig. 4 Typical clinical signs of the infected koi carp: edematous body, enophthalmos (sunken eyes).

生残魚の病理組織観察を行ったところ、ニシキゴイ25℃区の一部の魚で、鰓弁の棍棒化および腎臓尿管上皮細胞の硝子滴変性がみられた (Fig. 5A)。マゴイにおいては、20℃区の一部の魚でニシキゴイと同様の病変がみられたものの、それ以外の試験区では病理組織学的な異常は観察されなかった。キンギョでは、鰓弁の棍棒化はみられなかったが、すべての試験区で鰓薄板上皮細胞の剥離が観察された (Fig. 5B)。腎臓では特筆すべき著変はみられなかった。

考 察

塩基配列決定および人為感染試験の結果、遺伝子グループIIaのウイルスと高い相同性があり、ニシキゴイでの感染が認められた。さらに、系統解析の結果から本CEVは遺伝子グループIIaであることが明らかとなった。同グループにはこれまで日本のニシキゴイで検出されたすべてのCEV株が含まれている。よって、供したCEV (NFU11N1) は日本でこれまで報告されていたものと同じ遺伝子グループのウイルスであると判断した。

2回の人為感染試験において、いずれもニシキゴイの15および20℃区ではすべて死亡したのに対して25℃区では全て生残したことから、本CEVはニシキゴイに対して15および20℃で高い病原性を有することが確認された。生残した25℃区のPCR陽性率は66.7および73.3%と高い値を示しており、VECの病理組織学的特徴である鰓の棍棒化および腎臓尿管上皮細胞の硝子滴変性がみられたことから、25℃の条件下においても感染は成立していると判断した。マゴイでは、20℃区でそれぞれ1および2尾の死亡 (いずれもPCR陽性) がみられたものの、その他の試験区では外見的にVECの症状を呈する個体はみられなかった。し

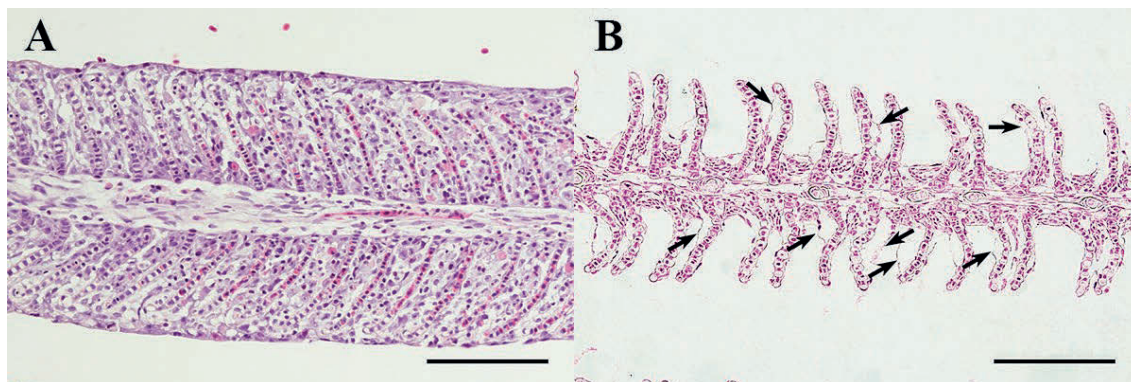


Fig. 5 Histopathological features of the Gill. A: Gill filament shows severe clubbing due to compensatory proliferation of interlamellar epithelial cells. B: Respiratory epithelial cells were detached from gill lamellae. HE. Bars: 50 μ m.

かしながら、15および20℃区のPCR陽性率は53.3~80.0%と高く、25℃区ではニシキゴイより低い傾向にあるものの33.3~40.0%の値を示した。また、CEVに特徴的な病理組織学的変化もみられたことから、本CEVのマゴイに対する病原性は低いものの、感染は成立することが示された。これまでIIa型のウイルスは主にニシキゴイで報告されてきたが^{16, 17)}、本研究の結果はそれを支持するものである。キンギョではすべての試験区で死亡またはVECの症状を呈する個体はみられなかった。PCR陽性個体はいずれの試験区でも確認され、陽性率はマゴイと同様に15および20℃区で高い傾向にあったことから、CEVはキンギョにも感染性を有することが確認された。コイ以外のコイ科魚類であるヨーロッパナ *Carassius carassius* やローチ *Rutilus rutilus* 等においても、人為感染によってCEVが感染することが報告されており¹⁸⁾、キンギョでも同様であることが明らかとなった。しかし、鰓や腎臓ではVECに特徴的な病理組織学的な変化はみられなかったものの、鰓薄板上皮細胞の剥離のみがみられた。VECの病理組織ではこのような病変は報告されておらず⁹⁾、キンギョ特有の病理組織学的特徴かもしれない。しかし、すべての試験区で死亡個体はみられず、VECに特徴的な病理組織学的特徴も示さなかったことから、本CEVのキンギョに対する病原性はマゴイよりも低いと判断した。

以上の結果から、本CEVはニシキゴイ、マゴイおよびキンギョへの感染性を有し、水温15および20℃下でニシキゴイに高い病原性を示すものの、マゴイおよびキンギョに対する病原性は低いことが明らかとなった。国内の分離されるCEVの遺伝子グループはすべてIIa型とされていることから²⁰⁾、国内に存在するCEVのマゴイおよびキンギョに対する病原性も同様に低いこと示唆された。

文 献

- 1) 間野泉一: 錦鯉A-Z 錦鯉の教科書. 新日本教育図書株式会社, 下関, 10 (2018)
- 2) FAO Yearbook. Fishery and Aquaculture Statistics 2019. https://www.fao.org/fishery/static/Yearbook/YB2019_USBcard/index.htm
- 3) 2022 © OIE - Aquatic Animal Health Code - 8/08/2022
- 4) 山田 和雄: ウイルス性コイ浮腫症. 畑井喜司雄, 小川和夫 (編), 新魚病図鑑. 株式会社 緑書房, 東京, 96 (2006)
- 5) Miyazaki T, Isshiki T, Katsuyuki H: Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio koi* in Japan. *Dis Aquat Org*, **65**, 197-207 (2005)
- 6) 山田 和雄: ウイルス性コイ眠り病. 畑井喜司雄, 小川和夫 (編), 新魚病図鑑. 株式会社 緑書房, 東京, 97 (2006)
- 7) 細谷 久信, 鈴木 三也: 梅雨時期に発生し、且つ大量斃死を伴うニシキゴイ稚魚の疾病に対する食塩水浴の効果. 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, **4**, 69-70 (1976)
- 8) Haenen O, Way K, Gorgoglione B, Ito T, Paley R, Bigarré L, Waltzek T: Novel viral infections threatening Cyprinid fish. *Bull Eur Ass Fish Pathol.*, **36** (1), 11-23 (2016)
- 9) Matras M, Borzym E, Stone D, Way K, Stachnik M, Maj-Paluch J, Palusinska M, Reichert M: Carp edema virus in Polish aquaculture - evidence of significant sequence divergence and a new lineage in common carp *Cyprinus carpio* (L.). *J Fish Dis*, **40**, 319-325 (2017)
- 10) Way K, Haenen O, Stone D, Adamek M, Bergmann S M, Bigarré L, Diserens N, El-Matbouli M, Gjessing M C, Jung-Schroers V, Leguay E, Matras M, Olesen N J, Panzarin V, Piačková V, Toffan A, Vendramin N, Veselý T, Waltzek T: Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. *Dis Aquat Org*, **126**, 155-166 (2017)
- 11) Radosavljevic V, Adamek M, Milicevic V, Maksimovic-Zoric J, Steinhagen D: Occurrence of two novel viral pathogens (CEV and CyHV-2) affecting Serbian cyprinid aquaculture and ichthyofauna. *J Fish Dis*, **41**, 851-854 (2018)
- 12) Lovy J, Friend SE, Al-Hussinee L, Waltzek TB: First report of carp edema virus in the mortality of wild common carp *Cyprinus carpio* in North America. *Dis Aquat Org*, **131**, 177-186 (2018)
- 13) Zrnčić S, Oraić D, Zupčić I G, Pavlinec Ž, Brnić D, Rogić ŽA, Sućec I, Steinhagen D, Adamek M: Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia. *J Fish Dis*, **43**, 673-685 (2020)
- 14) Matějčková K, Pojezdal L, Pokorová D, Reschová S,

- Piačková V, Palíková M, Veselý T, Papežíková I: Carp edema virus disease outbreaks in Czech and Slovak aquaculture. *J Fish Dis*, **43**, 971-978 (2020)
- 15) List of Diseases in the Asia-Pacific Quarterly Aquatic Animal Disease Report (Beginning), QAAD, Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, The OIE Regional Representation for Asia and The Pacific, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017/1, p41 (2017)
- 16) Soliman H, Lewisch E, El-Matbouli M: Identification of new genogroups in Austrian carp edema virus isolates. *Dis Aquat Org*, **136**, 193-197 (2019)
- 17) Radek M, Lubomir P, Veronika P, Martin F: Carp edema virus and immune response in carp (*Cyprinus carpio*): Current knowledge. *J Fish Dis*, **44**, 371-378 (2021)
- 18) Matras M, Stachnik M, Borzym E, Maj-Paluch J, Reichert M: Potential vector species of carp edema virus (CEV). *J Fish Dis*, **42**, 656-664 (2019)
- 19) Adamek M, Baska F, Vincze B, Steinhagen D: Carp edema virus from three genogroups is present in common carp in Hungary. *J Fish Dis*, **41**, 463-468 (2018)
- 20) Pikulkaew S, Phatwan K, Banlunara W, Intanson M, Bernard JK: First evidence of carp edema virus infection of koi *Cyprinus carpio* in Chiang Mai province, Thailand. *Viruses*, **12**, 1400 (2020), <https://doi.org/10.3390/v12121400>
- 21) Tamura K, Nei M: Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*, **10**, 512-526 (1993)
- 22) Felsenstein J: Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791 (1985)
- 23) Adamek M, Jung-Schroers V, Hellmann J, Teitge F, Bergmann SM, Runge M, Kleingeld DW, Way K, Stone DM, Steinhagen D: Concentration of carp edema virus (CEV) DNA in koi tissues affected by koi sleepy disease (KSD). *Dis Aquat Org*, **119**, 245-251 (2016)
- 24) 親松 剛, 的山 央人, 山本 健也, 福田 穎穂: PCR法によるコイ浮腫症ウイルス検出の試み. *水産増殖*, **45**, 247-251 (1997)
- 25) 稲田真理, 湯浅 啓, 黒部智史, 岸原達也, 的山央人, 永井崇裕, 板垣のぞみ, 堀口摩祐美, 北村志乃, 岩下誠: 日本におけるニシキゴイのウイルス性コイ浮腫症の保有率および遺伝子型に関する研究. 令和4年度日本魚病学会秋季大会プログラムおよび講演要旨, 17 (2022)