

Carp edema virusを用いたニシキゴイに対する 人為感染の比較検討

安本信哉[†], 松本あかね, 石橋成豊, 高橋洋, 近藤昌和

Comparative study of experimental infection against koi carp using Carp edema virus.

Shinya Yasumoto[†], Akane Matsumoto, Naritoyo Ishibashi, Hiroshi Takahashi
and Masakazu Kondo

Abstract: Viral edema of carp is caused by Carp edema virus and is a major carp disease listed on the WOAHP list of emerging infectious diseases. However, an effective experimental infection method that can control virus copy number has not been established. In this study, we compared three experimental infection methods: immersion infection using gill suspensions from diseased fish (immersion method), infection by rearing water from diseased fish (rearing water method) and co-infection method. Cumulative mortality in the immersion groups ranged from 40 to 60%, while that in the rearing water infected and co-infected groups ranged from 80 to 100%. The rearing water method can be used to control the viral DNA copy number and to perform experimental infections when frozen storage is possible. Thus, we performed the same experimental infection using frozen rearing water and found no disease or mortality, indicating that stable experimental infection using the rearing water method is difficult. The immersion method has a lower mortality rate than the other two methods, and it requires a large amount of gill tissue because of the low number of virus DNA copies that can be obtained from the gill tissue. However, it is possible to control the number of virus DNA copies and to preserve the gill tissue suspension by freezing. Therefore, the immersion method was considered the most suitable for stable experimental infection under the same conditions.

Key words: koi carp, *Cyprinus carpio*, experimental infection, carp edema virus, viral edema of carp

緒 言

ウイルス性コイ浮腫症 (viral edema of carp: VEC) は1974年に我が国の錦鯉養殖場で最初に報告された感染症である¹⁾。原因はポックスウイルス科 (Poxviridae) に属するCarp edema virus (CEV) と呼ばれる2本鎖DNAウイルスであり、近年ではニシキゴイ産業の発展にともない、世界各国で報告されている^{2,8)}。さらに、2017年には国際獣疫事務局 (WOAH) の新興感染症リストに含まれ、益々注目されるようになった⁹⁾。しかしながら、有効な人為感染法がないほか、ウイルス増殖に適した培養細胞も未だ確

立されていないため、本病の診断や人為感染等の試験研究において大きな障壁となっている。CEVに関する研究報告で採用されている人為感染法の多くは、感染魚と未感染魚を同一水槽内で飼育することによって感染させる同居感染法が採用されているが¹⁰⁻¹²⁾、この方法では攻撃ウイルス濃度をコントロールできない。同一条件で安定的に人為感染を行うためには、ウイルス濃度を一定に保たなければならないが、そのためには病魚臓器摩砕液を作成して人為感染試験を行う必要がある。しかし、VEC病魚鰓摩砕液に含まれるウイルスDNAコピー数 (およそ $10^5 \sim 10^6$ copies/ μ L) は高い死亡率を得るには少なく、同じウイルス量で

2023年11月29日受付, 2024年1月24日受理

水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

[†] 責任著者 (corresponding author): yasumotos@fish-u.ac.jp

あっても使用する病魚の鰓組織によって結果が異なる場合がある(私信)。そこで、本研究では病魚鰓組織摩砕液を用いた浸漬感染法、病魚飼育水による感染法および同居感染法の3方法について比較検討した。

材料および方法

供試ウイルスおよび供試魚

CEV (NFU11N1 (Genotype II)) は、2011年に新潟県内の養鰓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¹³⁾。

ニシキゴイ(紅白, 平均体重 6.8 ± 2.2 g, 平均全長 88.2 ± 9.2 mm)は、2020年から2022年に水産大学校で生産し、飼育された当歳魚を供した。

CEVの検出と定量

CEVのDNA抽出は、鰓および腎臓からDNAzolにより使用マニュアル通りに行った。また、CEVの検出は、Matrasら(2017)のnested PCR法により行った³⁾。PCR反応液は、KAPA2G Robust Hotstart Start PCR kit (KAPA Biosystems, アメリカ合衆国)のプロトコルに従い調製した。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。

ウイルスの定量は、上記と同様にDNA抽出を行い、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、リアルタイムPCRを行った¹⁴⁾。PCR反応液は、KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2×) Universal (KAPA Biosystems, アメリカ合衆国)のプロトコルに従い調製した。反応条件は95℃ 10分間ののち、95℃ 30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 $100 \sim 7$ copies/ μ Lの標準曲線を作成してウイルスを定量した。

人為感染試験1

人為感染1では病魚鰓摩砕液を用いた浸漬感染(浸漬区)、病魚飼育水を用いた感染(飼育水感染区)および病魚との同居感染(同居感染区)をそれぞれ2水槽ずつ行った。

浸漬法や病魚作製に用いた病魚鰓摩砕液は、-80℃で保存されたVEC病魚鰓組織をその10倍量の無血清イーグル

MEM(日水製薬株式会社, 日本)中で摩砕して作製し、使用するまで再び80℃で保存した。

浸漬感染は、供試魚10尾を入れた500 mLのビーカーに(水温20℃)、病魚鰓摩砕液を加えて1時間浸漬して感染させた(最終ウイルス濃度 1.0×10^3 copies/ μ L)。その後、水量2.5 Lのプラスチック水槽に収容した。

病魚飼育水(2.9 copies/ μ L)を用いた感染では、上述の浸漬法と同様に感染させたのちにすべての魚を取り上げ(感染7日目)、その水槽に未感染魚10尾をあらたに加えて感染させた。取り上げた魚は病魚($n = 5$)として、未感染魚10尾を飼育した水槽に加えて同居感染に用いた。対照区として未感染魚鰓摩砕液を用いた浸漬対照区、未感染魚飼育水を用いた飼育水対照区および未感染魚($n = 5$)と同居させた同居対照区を設けた(それぞれ $n = 10$)。感染後、水温20℃で14日間経過観察を行い、その間に死亡した魚は解剖して鰓と腎臓を摘出し、上述のnested PCRに供するまで-80℃で保存した。試験終了時に生残した魚も同様に行った。

人為感染試験2

人為感染2では冷凍保存した病魚飼育水を用いて同様に感染試験を行った(2試験区)。病魚飼育水は人為感染1の浸漬区と同様に作出し(最終ウイルス濃度3.6 copies/ μ L)、500 mL容の採水ボトルに分注し-80℃で1ヶ月間保存したのち、流水で解凍して使用した。なお、未感染魚の飼育水を同様に冷凍したものを使用した対照区も設けた。

統計処理

累積死亡率の比較にはFisherの正確確率検定を用いた。

結果および考察

人為感染試験1の結果をTable 1に示した。浸漬区では感染後4日目から遊泳緩慢となり、6日目から死亡魚がみられ、累積死亡率はそれぞれ40および60%となった。一方で、飼育水感染区では感染後1日目から遊泳緩慢な個体がみられ、3日目から死亡魚が観察され、5または6日目にはともに全滅した。同居感染区でも同居後3日目から遊泳緩慢となり、4日目から死亡魚が確認され、累積死亡率はそれぞれ80%および100%となった。いずれの方法においても浸漬法よりも有意に高かった($p < 0.05$)。死亡魚は、体表や鰭の出血、軀幹部の浮腫および眼球陥没などのVECに特徴

的な外見所見を呈しており、鰓または腎臓あるいはその両方でCEV陽性であった。生残魚については外見的症状はみられなかったものの、ほとんどがCEV陽性であった(1尾のみ陰性)。なお、すべての対照区で死亡魚およびCEV陽性個体はみられなかった。よって、いずれの方法においても感染は成立しているものの、飼育水を用いた感染方法および同居感染法では効率的に病魚が得られることが示された。同居感染法については死亡魚がみられた時期などについても既報と同様であった¹⁰⁻¹²⁾。特に飼育水を用いた感染方法では、ウイルス量は非常に低いコピー数であったにもかかわらず、飼育開始後すぐに症状が現れ、速やかに死亡した。つまり、感染力を持ったウイルスであればごくわずかな量で感染が成立し発病することが示された。一方で浸漬法ではウイルスコピー数が 1.0×10^3 copies/ μ Lもあったにもかかわらず、死亡率は40~60%にとどまった。ウイルスコピー数はウイルスDNAに基づいて算出されたものであり、感染力を持ったウイルスの数とは異なることから、病魚鰓組織中のウイルスは感染力を持たないウイルスを含むことが示唆された。ポックスウイルスは、宿主細胞内に存在するウイルスのうち、エンベロープを有するものは感染力があるとされるが¹²⁾、細胞内のCEVは、エンベロープを持たないか、エンベロープを有しても感染力を持たないのかもしれない。

同居感染法は事前に浸漬法で病魚を作製する必要があるが、長期的に維持することも難しく、攻撃ウイルス量も一定にすることができないことから、安定的に人為感染を行うことは困難である。一方で、飼育水を用いた感染方法では、飼育水が冷凍保存可能であれば安定して人為感染試験を行うことが可能である。そこで人為感染2では冷凍保存した飼育水を用いて実施した。

人為感染2では、死亡した個体も遊泳緩慢症状を呈する個体もみられず、生残魚もすべてCEV陰性であった。このことから、冷凍保存によりウイルスの病原性が低下したことが示唆された。よって、飼育水を用いた感染方法も安定的な人為感染を行うことは困難であると判断した。一般に

魚類の病原ウイルスは冷凍保存(-80°C)が可能である¹⁵⁾。しかし本研究によって、CEVは病魚鰓組織やその組織摩砕液であれば冷凍保存可能であるが、病魚の飼育水として冷凍保存できないことが明らかとなった。

浸漬法は他の2方法よりも死亡率は低く、鰓組織から得られるウイルスコピー数も少ないため、多量の鰓組織が必要となる。しかし、ウイルスコピー数のコントロールおよび鰓組織摩砕液の冷凍保存が可能である。よって、大量の試験魚が必要となるが、同条件で安定した人為感染を行うには浸漬法が最適であると思われる。しかし、いずれの方法も一長一短があるため、研究の目的により適切な人為感染方法を選ぶことが重要である。

文 献

- 1) 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)
- 2) Haenen O, Way K, Gorgoglione B, Ito T, Paley R, Bigarré L, Waltzek T: Novel viral infections threatening Cyprinid fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 36, 11-23 (2016)
- 3) 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.). *Journal of Fish Diseases*, 40, 319-325 (2017)
- 4) 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*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 126, 155-

Table 1. Cumulative mortalities from three methods of experimental infection

Infection method	Cumulative mortality (%)		
	Infected group		Control group
Immersion	40	60	0
Rearing water	100	100	0
Co-infection	100	80	0

- 166 (2017)
- 5) 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. *Journal of Fish Diseases*, **41**, 851-854 (2018)
- 6) Lovy J, Friend S E, Al-Hussinee L, Waltzek T B: First report of carp edema virus in the mortality of wild common carp *Cyprinus carpio* in North America. *Diseases of Aquatic Organisms*, **131**, 177-186 (2018)
- 7) Zrnčić S, Oraić D, Zupčić I G, Pavlinec Ž, Brnić D, Rogić Ž A, Sučec I, Steinhagen D, Adamek M: Koi herpesvirus and carp edema virus threaten common carp aquaculture in Croatia. *Journal of Fish Diseases*, **43**, 673-685 (2020)
- 8) Matějčíková K, Pojezdal L, Pokorová D, Reschová S, Piačková V, Palíková M, Tomáš Veselý, Papežiková I: Carp oedema virus disease outbreaks in Czech and Slovak aquaculture. *Journal of Fish Diseases*, **43**, 971-978 (2020)
- 9) 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)
- 10) Adamek M, Baska F, Vincze B, Steinhagen D: Carp edema virus from three genogroups is present in common carp in Hungary. *Journal of Fish Diseases*, **41**, 463-468 (2018)
- 11) Haenen O, Way K, Gorgoglione B, Ito T, Paley R, Bigarré L, Waltzek T: Novel viral infections threatening Cyprinid fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **36**, 11-23 (2016)
- 12) Pragyan D, Bajpai V, Suman K, Mohanty J, Kumar P S: A review of current understanding on carp edema virus (CEV): A threatful entity in disguise. *International Journal of Aquaculture and Fishery Sciences*, **7**, 87-93 (2019)
- 13) 松本あかね, 本田幸太郎, 高橋洋, 近藤昌和, 安本信哉: 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. 水大校研報, **71**, 73-80 (2023)*
- 14) 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)
- 15) 吉水守: 魚類ウイルス病とその防疫・防除に関する研究. 日本水産学会誌, **78**, 358-367 (2012)

* この論文は2022年に発行されたことになっているが [表紙 (p73) に記載], これは誤りであり, 正しくは2023年である。