

コイヘルペスウイルス (KHV) 病感染耐過魚からのウイルス高感度検出の試み

小林 健一郎*1・的 山 央人・兵藤 則行・張 旭*2,3・隅田 泰生*2,3

Trial of high sensitive detection of Koi herpesvirus (KHV) from persistently or latently infected koi carp

Kenichiro KOBAYASHI, Hisato MATOYAMA, Noriyuki HYODO, Xu ZHANG and Yasuo SUDA

キーワード：KHV, 高感度検出, 感染耐過魚, ニシキゴイ

コイヘルペスウイルス (以下 KHV) 病はコイの増養殖に大きな被害を与えている。この疾病は国内では2003年に初めて発生し¹⁾、以後全国各地に伝播し被害が拡大した。

KHV 病のまん延を防止するため、KHV 検査が行われている。診断には、初動診断として PCR²⁾ および LAMP³⁾ が実施されており、確定診断は、Yuasa *et al.*の方法²⁾ および Gilad *et al.*の方法⁴⁾ に報告されている2つのプライマーを用いた PCR により行われている。さらに、他の特異遺伝子配列を標的とした PCR⁵⁾ も開発されている。

現行の PCR では、KHV に感染・発症し治療した魚 (以下感染耐過魚) の鰓から、長期間に渡りウイルスを検出することは難しい。一方、ウイルスゲノムは、ウイルス暴露後長期間にわたり、脳に残存することが明らかにされている⁶⁾。しかしながら、脳を検査に供することは破壊検査となり、高価なニシキゴイから採取することは現実的には難しい。したがって、KHV 感染耐過魚の鰓から、より高感度に検出可能な技術を開発することが求められている。

これまでの研究から、ウイルスの糖鎖結合性を利用して、糖鎖固定化金ナノ粒子 (以下 SGNP) によるウイルスの捕捉・濃縮後、定量 PCR (以下ウイルス濃縮 Q-PCR) を行うことで、従来の方法より高感度に極く低濃度のウイルスを検出で

きる技術が開発されている⁷⁾。そこで本研究では KHV 感染耐過魚を作出し、新たに開発されたウイルス濃縮技術を応用することにより、感染耐過魚から KHV を検出する技術の有効性を検討した。

また、現在ニシキゴイ養殖場の KHV サーベイランスは、検査用 KHV フリー魚と3週間同居飼育を行い、同居飼育後の魚を検査することにより行われている。しかし、これまで感染耐過魚との同居期間について調べた例は少ないため、適切な同居期間について検討した。

さらに、KHV サーベイランスにおける基礎的知見を得るため、同居飼育を行わず感染耐過魚そのものを検査する方法 (以下直接法) と、3週間同居飼育した後同居魚を検査する方法 (以下同居法) の比較検証を試みた。

材 料 と 方 法

1. ウイルス濃縮 Q-PCR の有効性

供試魚及び接種源

供試魚には、新潟県内水面水産試験場にて作出し、800L の FRP 水槽にて23°Cで馴致したニシキゴイ70尾 (平均180.0g) を使用した。

KHV 感染接種源は NR1A0308 株 (独立行政法人 水産総合研究センター養殖研究所より分与)

*1 新潟県農林水産部水産課

*2 鹿児島大学大学院理工学研究科

*3 (株) スティックスバイオテック

をニシキゴイに接種後、9日目に死亡した死亡魚の鰓をホモジナイズし、MEM（イーグル最小必須培地、日水製薬）で1,000倍希釈した液を用いた。

KHV 感染耐過魚の作出

ウイルス攻撃は、上述の接種源を1尾当たり100 μ L ずつ腹腔内に接種することにより行った。

昇温は魚群への十分な KHV 感染が認められた時点で開始した。すなわち、攻撃後23 $^{\circ}$ Cにて飼育し、10尾を無作為に取り上げ LAMP により5尾以上が陽性になること、および1尾以上の死亡を確認した時点とした。この時点を境に、23 $^{\circ}$ C から昇温して32 $^{\circ}$ C を5日間継続した後、インターバルとして23 $^{\circ}$ C に3日間戻した。これを1セットとして、連続してもう1セット行った。なお、攻撃後18日目から35日目までの昇温処理期間を除き、飼育期間中の水温は19.0～24.6 $^{\circ}$ Cで推移した。

ウイルス濃縮 Q-PCR の有効性評価

攻撃後39、65、122および158日目にサンプリングを行い、鰓の一部をウイルス濃縮 Q-PCR に供した。

ウイルス濃縮 Q-PCR は、Proteinase Kを用いて55 $^{\circ}$ Cにて3時間酵素消化後、SGNP を添加し、室温にて30分間時々攪拌しながら、ウイルスをSGNP に吸着させることにより濃縮を行った。その後、100 $^{\circ}$ Cにて10分間加熱し Proteinase Kを失活させ、10,000g にて2分間遠心し、さらにボイルした後、上清2 μ L をリアルタイム PCR に供した。

リアルタイム PCR の試薬は、SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc) を使用した。プライマーは、Gilad *et al.*⁸⁾ に従ったものを使用した。反応条件は、ステップ1では、95 $^{\circ}$ C 10秒間、ステップ2は95 $^{\circ}$ C 5秒間の後、60 $^{\circ}$ C 30秒間1サイクルとし、このサイクルを40回繰り返した。データ解析は、付属のソフトを用いて増幅曲線（以下 Ct）と融解温度（以下 Tm）で評価し、陽性を判定した。

比較対照として、Puregene DNA Purification Kit (Gentra Systems, USA) を用いて核酸抽出を行い、

Gilad *et al.*⁴⁾ に従って PCR を行った。

なお、両者の検出率の比較は、Fisher の直接確率検定により行った。また、供試魚に用いたニシキゴイは、ウイルス濃縮 Q-PCR および PCR で KHV 陰性であることを確認している。

2. 同居期間の検討

試験1で作出した攻撃後39日目の感染耐過魚24尾と新潟県内水面水産試験場にて作出した KHV フリーのニシキゴイ20尾（平均139.7 g）を同居飼育した。同居魚から各5尾ずつ48時間、1週間、2週間および3週間ごとにサンプリングを行い、攻撃後の経過日数ごとおよび同居日数ごとの検出率を調べた。同様にして、攻撃後65日目、122日目および158日目についても検討した。

結果

1. ウイルス濃縮 Q-PCR の有効性

攻撃後の経過日数ごとに、ウイルス濃縮 Q-PCR と PCR の検出率を表1に示した。攻撃後39日目の感染耐過魚から、ウイルス濃縮 Q-PCR では87%（39尾中34尾）、PCR では46%（39尾中18尾）から検出された。攻撃後65日目の感染耐過魚からは、いずれの方法においても80%（5尾中4尾）から検出された。また、攻撃後122日目の感染耐過魚からは、ウイルス濃縮 Q-PCR では30%（27尾中8尾）、PCR では7%（27尾中2尾）から検出された。しかし、攻撃後158日目の感染耐過魚からは、いずれの方法においても検出されなかった。

攻撃後39日目では、ウイルス濃縮 Q-PCR の検出率は87%と PCR の46%に比べ有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。さらに、攻撃後122日目では、ウイルス濃縮 Q-PCR の検出率は30%と PCR の7%に比べ高い値は示したものの、有意性は認められなかった（ $p > 0.05$ ）。攻撃後65および158日目の感染耐過魚からの検出率については、供試尾数が5尾と少ないことから、統計学的な評価はできなかった。

表1 攻撃後の経過日数ごとの KHV 検出状況

攻撃後の経過日数	39日後	65日後	122日後	158日後
濃縮 Q-PCR 検出率	87%	80%	30%	0%
PCR 検出率	46%	80%	7%	0%

2. 同居期間の検討

KHV フリー魚を攻撃後39日目の感染耐過魚と同居させた場合、ウイルス濃縮 Q-PCR では、48時間の同居で検出率は20%であったが、1週間同居すると同居した魚の100%から検出された。一方、PCR での検出率は48時間の同居では0%であったが、1週間同居すると同居した魚の60%から検出された(表2)。

攻撃後65日目の場合、ウイルス濃縮 Q-PCR では、1週間以内の同居では検出率0%であったが、

2週間同居すると20%となり、3週間の同居では100%から検出された。一方、PCR では、2週間同居しても検出率は0%であったが、3週間同居すると同居した魚の80%から検出された。

攻撃後122日目では、ウイルス濃縮 Q-PCR、PCR ともに、すべての同居期間で検出されなかった。

次に、得られた結果から、直接法と同居法の検出率を攻撃後の経過日数ごとに比較した(表3)。

その結果、攻撃後39日目における直接法による検出率は、ウイルス濃縮 Q-PCR では87%、PCR では46%であった。同時期の同居法による検出率は、ウイルス濃縮 Q-PCR では100%、PCR では40%であった。

また、攻撃後122日目における直接法による検出率は、ウイルス濃縮 Q-PCR では30%、PCR では7%であった。一方、同時期の同居法による検出率は、いずれの方法を用いても0%であった。

表2 感染耐過魚と同居した KHV フリー魚からの KHV 検出状況(n=5)

検査法	濃縮 Q-PCR				PCR			
	同居期間				同居期間			
	48時間	1週間	2週間	3週間	48時間	1週間	2週間	3週間
攻撃後の経過日数								
39日後	20%	100%	NT	100%	0%	60%	NT	40%
65日後	0%	0%	20%	100%	0%	0%	0%	80%
122日後	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

表3 直接法と同居法の検出状況

検査法	直接法 (n=24)		同居法 (n=5)	
	濃縮 Q-PCR	PCR	濃縮 Q-PCR	PCR
攻撃後の経過日数				
39日後	87%	46%	100%	40%
122日後	30%	7%	0%	0%

考 察

持続的養殖生産確保法に基づく KHV 病のまん延防止措置により、感染ゴイの消毒処分が行われており、ひとたび KHV 病が発生すれば、養鯉業

者にとって甚大な経済的損失を被ることとなる。

現在、KHV 診断に用いられている PCR は、KHV 感染耐過魚の鰓から、長期間に渡りウイルスを検出することは難しく、より高感度にウイルスを検出可能な検査法の開発が求められている。これまでに、ウイルスの糖鎖結合性を利用して、新たに開発されたウイルス濃縮 Q-PCR は、ヒトヘルペスウイルス (HSV-1,2,3,5) について、通常の PCR に比べ約1,000倍検出感度が高いことが明らかにされている⁷⁾。

本試験では、ウイルス濃縮 Q-PCR を KHV 検出に応用し、PCR に対する検出感度を比較検証した。その結果、感染耐過魚からの検出率は、攻撃後いずれの時期においても、ウイルス濃縮

Q-PCR の検出率が PCR と同じかそれ以上であることから、ウイルス濃縮 Q-PCR は PCR に比べ有効であると考えられた。

また、検出率は攻撃後時間の経過とともに漸減していくものと考えられた。Yuasa *et al.*は、感染マゴイと非感染ニシキゴイとの24時間同居感染実験の結果から、感染したマゴイから感染性ウイルスが排出される期間は、23°Cでは攻撃後1～14日であることを明らかにしている⁹⁾。

本試験は、感染耐過魚の作出方法が Yuasa *et al.*とは異なるが、攻撃後65日目においても同居を少なくとも3週間行えば、同居魚からいずれの方法でもウイルスが検出された。したがって、作出した感染耐過魚からは、攻撃後65日目においても同居魚に感染させるのに十分な量のウイルスが排出されていることが分かった。

一方、攻撃後122日目では、3週間同居した魚においても KHV は検出されなかった。これらの結果から、同居した魚から検出可能な同居期間は、攻撃後時間の経過とともに長くなり、ついには同居魚から検出できなくなるものと考えられた。

しかしながら、攻撃後122日目においても感染耐過魚では、ウイルス濃縮 Q-PCR では30%から、PCR では7%から検出されている。このことは、同時期の感染耐過魚は同居魚から KHV が検出されないレベルで、持続あるいは潜伏感染していることを示唆している。

感染耐過魚からの検出率を向上させるためには、同居した魚を検査するよりも感染耐過魚そのものを検査することが望ましい。あわせて、その際には、ウイルス濃縮 Q-PCR を用いることが有効であるものと考えられた。

一方、今後ウイルス濃縮 Q-PCR を普及させるためには課題がある。ウイルス濃縮 Q-PCR 結果は、付属ソフトを用いて Ct と Tm で評価し、特に Tm については、数値判定により陽性または陰性を判定する客観的な基準を確立した¹⁰⁾。しかし、実際に感染耐過魚を検査した場合、陽性または陰性と明確に判別し難いケースがみとめられた。本試験においては、このような結果がみとめられたケースはわずかではあるものの、その場合は陰性と区別するため、陽性と判定した。

今後、本検査法は、陽性または陰性がより明確に判別できるようさらに改良していく必要があるものと考えられた。

要 約

ウイルス濃縮 Q-PCR の有効性を評価したところ、感染耐過魚からの KHV 検出において、PCR に比べ検出率が高いことが明らかになった。また、攻撃後の日数が経過した場合、感染耐過魚からの検出率は、直接法が同居法に比べ高くなることが示された。

また、KHV サーベイランスにおける検査用 KHV フリー魚との同居期間は、現行の3週間が適切な期間であることが裏付けられた。

文 献

- 1) Sano M, Ito T, Kurita J, Yanai T, Watanabe N, Miwa S, Iida T. First detection of koi herpesvirus in cultured common carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.* 2004; **39**: 165-167.
- 2) Yuasa K, Sano M, Kurita J, Ito T, Iida T. Improvement of a PCR method with the Sph I-5 primer set for the detection of Koi herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.* 2005; **40**: 37-39.
- 3) Yoshino M, Watari H, Kojima T, Ikedo M. Sensitive and rapid detection of Koi herpesvirus by LAMP method. *Fish Pathol.* 2006; **41**(1): 19-27.
- 4) Gilad O, Yun S, Andree KB, Adkison MA, Zlotkin A, Bercovier H, Eldarand A, Hedrick RP. Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a poly-merase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. *Dis. Aquat. Org.* 2002; **48**: 101-108.
- 5) Bercovier H, Fishman Y, Nahary R, Sinai S, Zlotkin A, Eyngor M, Gilad O, Eldar A, Hedrick RP. Cloning of the koi herpesvirus (KHV) gene encoding thymidine kinase and its use for a highly sensitive PCR based diagnosis. *BMC Microbiol.* 2005; **5**: 13.
- 6) Yuasa K, Kawana M, Ito T, Sano M. A potential

risk of fish surviving koi herpesvirus (KHV) disease as a source of viral infection. In 5th International Symposium of The Japanese Society for Fish Pathology. The Japanese Society of Fish Pathology. Tokyo. 2008; 65.

7) Zhang X, Nakamura-Tsuruta S, Wakao M, Sobel M, Okuno T, Nose H, Suda Y. Analysis of sugar-chain binding property of human herpes viruses with sugar chip and concentration of viruses with sugar-chain immobilized gold nano-particle toward super high sensitive diagnosis. *J. Biochem.* In press.

8) Gilad O, Yun S, Zagmutt-Vergara FJ,

Letenegger, Belcovier H, Hedrick RP. Concentrations of a Koi herpesvirus (KHV) in tissues of experimentally infected *Cyprinus carpio koi* as assessed by real-time TaqMan PCR. *Dis Aquat Organ.* 2004; **60** (3): 179-87.

9) Yuasa K, Ito T, Sano M. Effect of water temperature on mortality and virus shedding in carp experimentally infected with koi herpesvirus. *Fish Pathol.* 2008; **43**(2): 19-27.

10) 張旭. 糖鎖を固定化した金ナノ粒子を用いたウイルスの高感度検査に関する研究. 博士論文, 鹿児島大学, 鹿児島. 2012.