

コイヘルペスウイルス病

KHVD : Koi herpesvirus disease

1. 疫 学

(1) 病名と病原体

① 病 名：コイヘルペスウイルス病

英 名：Koi herpesvirus disease

② 病原体：Koi herpesvirus (KHV)

ヘルペスウイルス科に属する (写真 1)。本ウイルスは、コイのウイルス性乳頭腫症ウイルス Cyprinid herpesvirus (CHV) やキンギョ造血器壊死症ウイルス Goldfish hematopoietic necrosis virus (GFHNV) とは、異なるウイルスである。

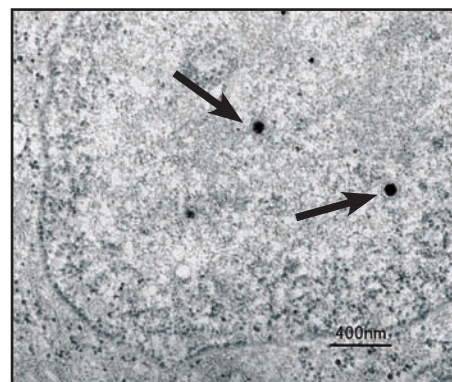


写真1 KHV-1細胞で増殖するKHVの電子顕微鏡像。核内にヌクレオキャプシド(矢印)が観察される。(三輪理博士提供)

(2) 発地域

イスラエル、ヨーロッパ諸国 (英国、ドイツ、オランダ、ベルギー)、アメリカ合衆国、インドネシア、タイ、フィリピン、日本および台湾においてマゴイおよびニシキゴイで報告されている。

(3) 宿主域

① マゴイ (*Cyprinus carpio carpio*) およびニシキゴイ (*Cyprinus carpio koi*)

② これまでの感染実験では、キンギョおよびソウギョでは発病しないことが知られている。

(4) 発症の特徴

マゴイ、ニシキゴイで感受性に差はなく、幼魚から成魚まで発生する。20~25℃程度の水温で発生し、致死性が高く、累積死亡率が100%に達することもある。発生は水温の影響を受け、感染実験によれば、13℃以下あるいは28℃以上の水温では、死亡が見られないことが報告されている。河川の上流の養魚場で発生した後、下流の養魚場でも大発生を起こした事例が知られ、本病の伝染性は強いことが推察される。また、感染耐過魚からウイルスが排出される可能性が指摘される。

(5) 症 状

病魚は、行動が緩慢となり、しばしば平衡感覚の失調をきたし、摂餌不良となる。外観的には体表に発赤が見られることもあるが (写真 2)、本病の特徴は鰓の変化であり、鰓の褪色、びらん、巣状壊死、二次鰓弁の癒合が顕著で、*Ichthyobodo* や *Trichodina* などの原虫や *Flavobacterium columnare* などの細菌の二次感染がしばしば見られる (写真 3、4)。その他には、胸鰭基部のうっ血および出血、体表の部分的褪色、粘液の分泌異常あるいは眼球の落ち込みなどが観察される。特徴的な剖検所見は乏しく、内臓の癒着が見られる程度である。

(6) 病理学的所見

① 病変は、主に鰓、表皮、腎臓、脾臓、肝臓および消化管で見られる。特に鰓上皮での変化が顕著で、鰓上皮細胞の増生および肥大、二次鰓弁の癒合が共通して観察され、壊死が散在あるいは巣状に見られる。また、鰓上皮細胞に腫大し、核膜過染を呈する核あるいは弱好酸性の核内封入体が観察される (写真 5)。

② その他の組織では、著しい変化は少ないが、壊死が散在あるいは巣状に観察されるほか、鰓上皮と同様な腫大し、核膜過染を呈する核あるいは弱好酸性の核内封入体が観察される。

- ③ 原虫や細菌の二次的な感染によって引き起こされる病理変化も含まれるため、上記の病変だけをもって本病を診断することは危険である。

(7) 消毒

オートクレーブによる滅菌、アルコールや塩素消毒など一般的なウイルスの消毒法に準ずる。

(8) 防除法

一般的なウイルスの防除法に準ずる。



写真2 感染死亡したニシキゴイ。(R. P. Hedrick 博士・A. Eldar 博士提供: American Fisheries Society, 2000)

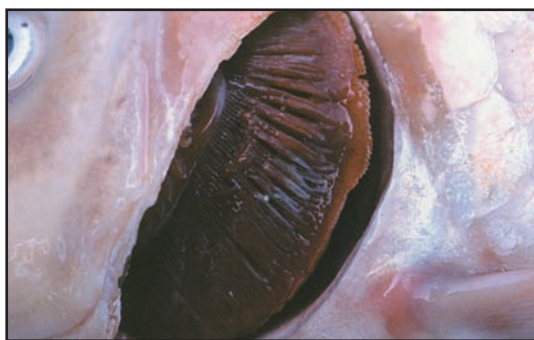


写真3 感染死亡したニシキゴイの鰓。二次鰓弁の癒合やびらんが見られる。(R. P. Hedrick 博士・A. Eldar 博士提供: American Fisheries Society, 2000)



写真4 感染死亡したマゴイの鰓。*Flavobacterium columnare* の混合感染が見られる。鰓上皮細胞の壊死が顕著で「鰓ぐされ」状態を呈する。(田中深貴男氏提供)

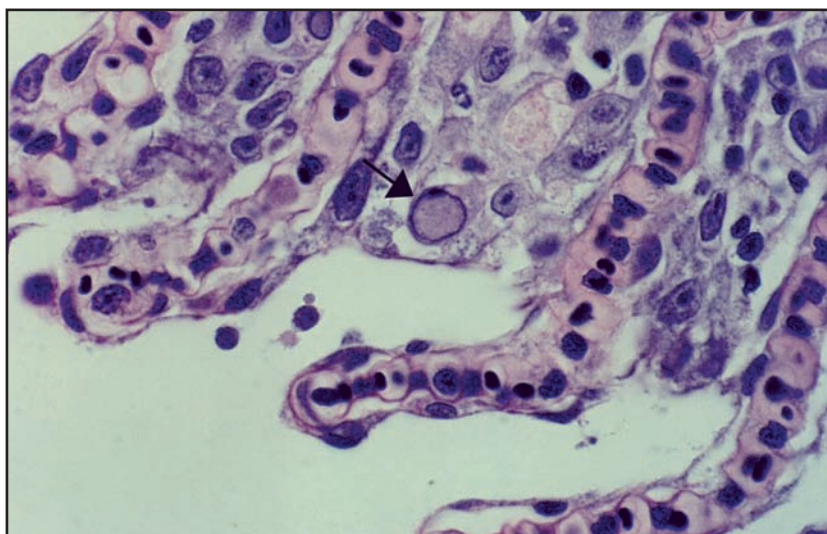


写真5 感染死亡魚の鰓の病理組織像。鰓上皮細胞の著しい増生、核の肥大とクロマチンの核膜への移動(矢印)が観察される。(R.P. Hedrick 博士提供: American Fisheries Society, 2000)

2. 診断手順

(1) 試料採取法

① 被検魚の収集

- (a) 被検魚の収集から採材まではできるだけ速やかに行うことが望ましく、できれば発生現場で臓器試料を摘出する。摘出した臓器試料は、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に収容し、検査機関へ直ちに氷冷または冷蔵状態で運搬する。ウイルスが不活化するため、臓器試料の凍結は好ましくないが、やむを得ず送付まで保存する場合は、試料を -80℃ に凍結保存後、凍結した状態で輸送する。
- (b) 被検魚を検査機関まで輸送する場合は、検査対象魚を発生現場で即殺後、個体ごとに無菌の密閉可能な容器に収容し、氷冷または冷蔵状態で 48 時間以内に輸送する。運搬の際、被検魚が凍結することのないように注意する。
- (c) 被検魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮な個体を採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装して氷冷または冷蔵状態で搬送する。この場合も、運搬の際、被検魚が凍結することのないように注意する。
- (d) 臓器試料または被検魚には、採取場所、日時、個体あるいは試料番号、魚体長および体重などの情報を明記したラベルを添付する。

② 外観症状および剖検所見の記載

- (a) 外観症状を記載する。特に鰓の所見に注意する。鰓に寄生する原虫、細菌などを顕微鏡により観察し、記録する。
- (b) 解剖後、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採材する。

③ ウイルス検査のための臓器試料の採材

(a) 臓器採材が困難な稚仔魚

できる限り筋肉部位を取り除き、魚全体を試料とする。

(b) 臓器採材が可能な魚

鰓、腎臓および脾臓を試料とする。

(2) PCR 法 (KHV Sph I-5F,R による PCR 法)

① 準備

- (a) 採取した病魚試料
- (b) PCR 法使用機器および試薬 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類など)
- (c) プライマー

KHV Sph I-5F : 5'-GAC ACC ACA TCT GCAAGGAG-3'

KHV Sph I-5R : 5'-GAC ACA TGT TAC AAT GGT GGC-3'

増幅産物サイズ : 290bp

② 手技

- (a) 採取した病魚試料を適当な PCR 用 DNA 抽出キットにより核酸抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。
- (b) 抽出した核酸および陽性対照 DNA をテンプレートとして、上記のプライマーを用いて PCR 反応を行う。反応は、94℃ で 1 分間、55℃ で 2 分間、72℃ で 3 分間を 30 サイクル、最後に 72℃ で 7 分間行う。

- (c) PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- (d) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 290bp のバンドの有無を観察する。

③ 判 定

目的のバンドが検出された個体を陽性、検出されなかった個体を陰性と判定する。

(3) PCR 法 (KHV9/5F,R による PCR 法)

① 準 備

- (a) 採取した病魚試料
- (b) PCR 法使用機器および試薬 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、エッペンドルフチューブ、酵素・試薬類、電気泳動装置および試薬類など)
- (c) プライマー
- KHV9/5F :5' -GAC GAC GCC GGA GAC CTT GTG-3'
- KHV9/5R :5' -CAC AAG TTC AGT CTG TTC CTC AAC-3'
- 増幅産物サイズ :484bp

② 手 技

- (a) 採取した病魚試料を適当な PCR 用 DNA 抽出キットにより核酸抽出する。抽出法などは、使用するキットのマニュアルに従う。
- (b) 抽出した核酸および陽性対照 DNA をテンプレートとして、上記のプライマーを用いて PCR 反応を行う。反応は、95℃で 5 分間、次いで 94℃で 1 分間、68℃で 1 分間、72℃で 30 秒間を 39 サイクル、最後に 72℃で 7 分間行う。
- (c) PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 1% 程度のアガロースゲルで電気泳動を行う。
- (d) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 484bp のバンドの有無を観察する。

③ 判 定

目的のバンドが検出された個体を陽性、検出されなかった個体を陰性と判定する。

(4) LAMP 法

① 準 備

- (a) 採取した病魚試料
- (b) LAMP 法使用機器および試薬
- ・ホモジナイザーペッスル
 - ・検体処理用およびマスターミックス調製用滅菌チューブ (0.5 mL または 1.5 mL)
 - ・ピペット (0.5~10 μ L, 10~100 μ L, 100~1,000 μ L)
 - ・フィルター付きチップ
 - ・反応チューブ冷却用アルミ製ラック
 - ・氷 (クラッシュアイス) およびアイスボックス
 - ・微量簡易遠心機
 - ・8 連マイクロチューブ用簡易遠心機
 - ・ボルテックスミキサー
 - ・Loopamp 反応チューブ
 - ・簡易抽出処理用 TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0)

- 市販の DNA 分離試薬 (DNeasy Tissue Kit ; Qiagen 社製など)
- Loopamp プライマーセット KHV
- Loopamp DNA 増幅試薬キット中の
2 × Reaction Mix. (RM)、
Bst DNA Polymerase (Bst DNA Polymerase)、
Distilled Water (DW)

《リアルタイム濁度検出の場合》

- Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C、RT-160C)

《蛍光目視検出の場合》

- 紫外線照射装置 (波長 240~260nm, 350~370nm)
- 広幅の眼鏡または防護面
- Loopamp 蛍光・目視検出試薬
- Loopamp リアルタイム濁度測定装置 (LA-320C、RT-160C)、またはインキュベーター (温度精度が ± 0.5℃ 以内 : ホットボンネット付)

* インキュベーター使用の場合は、別途、反応停止用ヒートブロックが必要。

(c) プライマー

KHV-FIP : 5'-CCC AAC CCA AGA AGC AGA AAC CCG TTG CCT GTA GCA TAG AAG A-3'
 KHV-BIP : 5'-CAC TCC TCC GAT GGA GTG AAA CTG CCC ATG TGC AAC TTT G-3'
 KHV-F3 : 5'-CTG TAT GCC CGA GAG TGC-3'
 KHV-B3 : 5'-AAC TCC ATC GCC GTC ATG-3'
 KHV-LF : 5'-CCC GCC GCC GCA-3'
 KHV-LB : 5'-TGG AAC TGT CTG ATG AGC GT-3'

② 手 技

(a) 検体の調製

《市販の DNA 分離試薬 (DNeasy Tissue Kit ; Qiagen 社製など) を用いる場合》

- 抽出方法などは、使用するキットのマニュアルに従う。
- DNA 抽出サンプルは、95℃ で 5 分間加熱処理し、氷上で保存する。

《LAMP 法簡易抽出試薬を用いる場合》

- 検体前処理用滅菌チューブに採取した魚病試料 5~10mg を入れ、TE buffer 100 μL を加えてホモジナイザーペッスルを用いて組織を均一化する。
- Ex F 100 μL を加えキャップを閉めてボルテックスミキサーで混和する (1 秒間 × 3 回)。
- 微量簡易遠心機で数秒間遠心 (以下、スピンドウン) し、95℃ で 5 分間加熱処理する。
- 1M Tris-HCl : pH 7.0 10 μL を加えてボルテックスミキサーで混和する。
- 混和後、室温で 2,000g 以上で 30 秒間遠心し、氷上に移し、上清をサンプル溶液とする。

* 簡易抽出法を用いた場合は、市販の DNA 分離試薬を用いた場合に比べて感度が 1 オーダー程度低下する可能性がある。

(b) マスターミックスの調製

- -20℃ で保存していた各試薬を室温で解凍し、解凍後は直ちに氷上で保存する。
- 別途用意したマスターミックス調製用滅菌チューブに Loopamp DNA 増幅試薬キットの 2 × Reaction Mix. (RM), Bst DNA Polymerase, Distilled Water (DW) と、Loopamp プライマーセット KHV の Primer Mix. KHV (PM KHV) を下表の割合で分注する。

- ピペッティングまたはキャップを閉めた上で軽く数回叩くこと（以下、タッピング）により良く混合した後、スピンドアウンする。

* 調製したマスターミックスはすぐに使用すること。

試 薬	用 量 (例)	
	1 test 分	10 tests 分
2 × Reaction Mix.(RM)	12.5 μ L	125 μ L
Primer Mix. KHV(PM KHV)	2.5 μ L	25 μ L
Bst DNA Polymerase	1.0 μ L	10 μ L
Distilled Water(DW)	4.0 μ L	40 μ L
合 計	20.0 μ L	200 μ L

《蛍光検出試薬による検出》

- 上記マスターミックスの Distilled Water (DW) 4 μ L のうち、1.0 μ L を Loopamp 蛍光・目視検出試薬とし、Distilled Water (DW) を 3.0 μ L 加えて合計 20.0 μ L とする。

(c) サンプルの混合

- 氷上に置いた Loopamp 反応チューブにマスターミックス 20 μ L を分注する。
- サンプルの DNA、並びに陰性コントロールとして Distilled Water (DW) を、陽性コントロールとして Positive Control KHV (PC KHV) を 5 μ L 添加し、全量 25 μ L とする。
- ピペッティングまたはキャップを閉めた上でのタッピングにより良く混合した後、8 連マイクロチューブ用簡易遠心機でスピンドアウンする。

* 混合の際には気泡が立たないように注意する。

* 反応チューブにサンプル溶液が添加されていることを目視で確認すること。

(d) 増幅反応および検出

- Loopamp リアルタイム濁度測定装置、またはインキュベーター（温度精度が $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 以内：ホットボンネット付）を 65°C に設定し、表示温度が設定温度に達していることを確認する。
- 分注済みの反応チューブをセットし、 65°C で 60 分間インキュベートする。
- 増幅反応後にヒートブロックを用いて酵素失活操作（ 80°C 、5 分間または 95°C 、2 分間）を行って反応を停止させる。

* リアルタイム濁度測定装置の場合、酵素失活は自動処理される。インキュベーターを用いる場合は、別途必ず酵素失活操作を行うこと。

《Loopamp リアルタイム濁度装置による検出》

- 装置の表示画面上で陽性コントロールと陰性コントロールの濁度の上昇の有無を確認する。陽性コントロール(Positive Control KHV(PC KHV))で濁度が上昇し、陰性コントロール (Distilled Water ; DW) で濁度が上昇していなければ、増幅反応は正常に進行している（図 1）。それ以外の場合には、増幅反応が適切に進行していない可能性があるため、試薬調製からの再検査を実施する必要がある。
- 次に、各検体の判定を行う。増幅反応時間内（60 分間）に濁度の上昇が認められた場合を「陽性」、濁度の上昇がみられない場合を「陰性」とする。

＊ 検体によって濁度上昇開始時間や濁度上昇値が陽性コントロール(Positive Control KHV (PC KHV)) と異なる場合がある。

《紫外線照射蛍光による検出》

- ・ 判定は、紫外線照射装置（波長 240~260nm, 350~370nm）を用いて反応チューブ底面より紫外線を照射して反応チューブの側面より観察し、陽性コントロール（Positive Control KHV (PC KHV)）と同様に緑色の蛍光を発すれば陽性、陰性コントロール（Distilled Water ; DW）と同様に蛍光を発しなければ陰性と判定する。
- ・ 観察は、目を眼鏡等で保護した状態で行う。
- ・ 記録する場合は、電気泳動撮影用カメラ等を用いる。

- ＊ 検体によって、陽性コントロールよりも強く蛍光を発することがあるが、蛍光の強さと検体のコピー数の間に相関はない。
- ＊ 地下水など重金属イオンを多量に含む飼育水で飼育された病魚試料を用いた場合、蛍光反応が阻害される可能性がある。
- ＊ 紫外線照射装置を用いた判定が明確でない場合は、①市販のブラックライトを反応チューブ底面にあてて、チューブ側面より観察する（写真 6-A）、②蛍光灯下で肉眼観察する（写真 6-B）、③電気泳動撮影用カメラで撮影し観察する（写真 6-C）などの方法を適宜用いる。

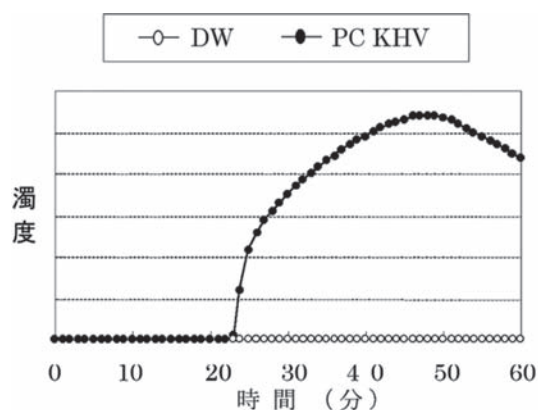


図1 Positive Control KHV (PC KHV) の増幅曲線パターン
(使用装置：Loopamp リアルタイム濁度測定装置)

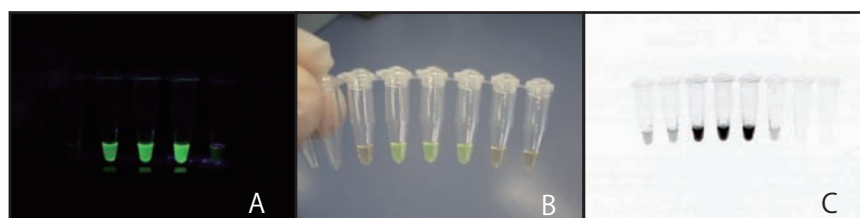


写真6 LAMP 法による観察例
A；ブラックライト検出、B；蛍光灯下目視、C；電気泳動用カメラ撮影

(5) 培養細胞によるウイルス検査

① 準備および手技

(a) 接種材料

採取した病魚試料を抗生物質を含む 10 倍量のイーグル最少必須培地 (MEM) でホモジナイズした後、4℃、2,000g、15 分間遠心分離し、上清を回収する。このホモジネート液を 15℃で 2~4 時間、または 4℃で一晩放置したものを接種試料とする。抗生物質としては、ゲンタマイシン 1,000 μg/mL、または、ペニシリン 800IU/mL とジヒドロストレプトマイシン 800 μg/mL の併用が適当。合成抗真菌剤のマイコスタチンまたはアンフォテリシン B(商品名ファンギゾン)400IU/mL を加えた方が良い。

(b) 細胞

KF-1 細胞：検査する前日に適当な培養器に分散・継代させる。

(c) 培 養

接種材料を細胞に接種し、20℃で3週間培養して重度の空胞化を特徴とする細胞変性効果 (CPE) の有無を観察する (写真 6)。接種材料は、最終的な判定まで -80℃に凍結保存する。

(d) 盲継代

CPE がみられなかった場合は、培養液の一部を新たに準備した KF-1 細胞に接種し、さらに 20℃で3週間培養し、観察する。

(e) 分離ウイルスの確認

CPE が見られた場合、分離されたウイルスが KHV であることを確認するため、「(2)、(3) PCR 法」に従い、培養液の抽出液を試料として PCR で検査する。

(f) 検査試料の処理

検査試料および器具などは病原体による汚染・伝播を防止するために以下の処理を施す必要がある。被検魚、臓器試料の残りは焼却あるいはオートクレーブ処理する。輸送コンテナおよび水は次亜塩素酸ソーダなどで消毒する。解剖器具、生物培養用器具は再使用や廃棄の前にオートクレーブによって滅菌する。

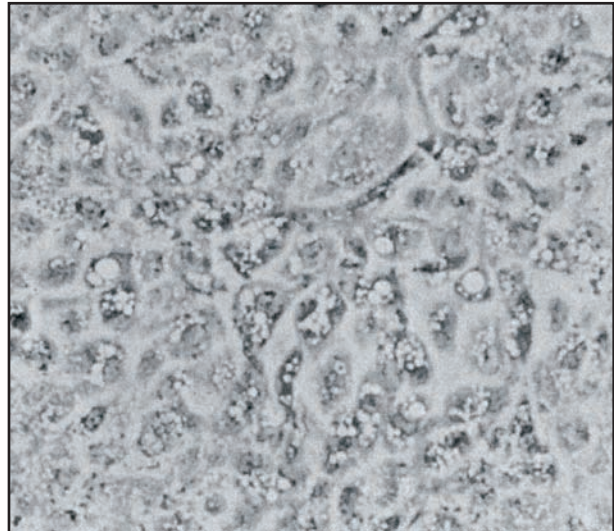


写真 6 KF-1 細胞における KHV の CPE。写真中央付近に見られる重度の空胞化が特徴。(栗田潤博士提供)

3. 参考文献

- Gilad, O., S. Yun, K. B. Andree, M. A. Adkinson, A. Zlotkin, H. Bercovier, A. Eldar and R. P. Hedrick (2002) : Initial characteristics of koi herpesvirus and development of a polymerase chain reaction assay to detect the virus in koi, *Cyprinus carpio koi*. Dis Aquat. Org., 48, 101-108.
- Gray, W. L., Mullis, S. E. LaPatra, J. M. Groff and A. Goodwin (2002) : Detection of koi herpesvirus DNA in tissues of infected fish. J. Fish Dis., 25, 171-178.
- Hedrick, R. P., O. Gilad, S. Yun, J. V. Spangenberg, G. D. Marty, R. W. Nordhausen, M. J. Kebus, H. Bercovier and A. Eldar (2000) : A herpesvirus associated with mass mortality of juvenile and adult koi, a strain of common carp. J. Aquat. Animal Health. 12, 44-57.
- Gilad, O., S. Yun, M. A. Adkinson, K. Way, N. H. Willits, H. Bercovier and R. P. Hedrick (2003) : Molecular comparison of isolates of an emerging fish pathogen, koi herpesvirus, and the effect of water temperature on mortality of experimentally infected koi. J. Gen Virol., 84, 2661-2668.
- Notomi, T., H. Okayama, H. Masubuchi, T. Yonekawa, K. Watanabe, N. Amino and T. Hase (2000) : Loop-mediated isothermal amplification of DNA, Nucl. Acids Res., 28, e63.
- Nagamine, K., K. Watanabe, K. Ohtsuka, T. Hase and T. Notomi (2001) : Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template, Clin. Chem., 47, 1742-1743.
- Mori, Y., K. Nagamine, N. Tomita and T. Notomi (2001) : Detection of Loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation, Biochem. Biophys. Res. Commun., 289, 150-154.
- 富田 憲弘 他 (2000) : 新規遺伝子増幅法 loop-mediated isothermal amplification (LAMP) 法の開発, 第 73 回日本生化学会大会発表抄録集

-
- 森 安義 他（2000）：ピロリン酸マグネシウムの沈殿生成を指標とした LAMP 法の簡易検出，第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集
- 富田 憲弘 他（2003）：ユビキタス遺伝子検査法の実現に向けた簡易検出 (1)LAMP 増幅産物の配列特異的可視化法，第 26 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集
- 吉野 学，渡 一，小島 禎，池戸正成（2006）：LAMP（Loop-Mediated Isothermal Amplification）法によるコイヘルペスウイルスの高感度迅速検出，魚病研究，第 41 巻第 1 号，19-27.

