

## 神奈川県におけるコイヘルペスウイルス (KHV) の検出

原 日出夫・井塚 隆・相川 英明・臼井 一茂

Detection of Koi Herpesvirus (KHV) in Carp *Cyprinus carpio* in Kanagawa Prefecture, Japan.Hideo HARA\*, Takashi IZUKA\*, Hideaki AIKAWA\*  
and Kazushige USUI\*\*

## はじめに

コイヘルペスウイルス (KHV) 病は1998年にイスラエルと米国で発生し, Hedrick *et al.*<sup>1)</sup>によりコイ *Cyprinus carpio* に大量斃死を引き起こす疾病として報告された。しかし, 最近になって1996年に英国で発生していたことが報告された<sup>2)</sup>。その後急速に世界中に拡大し, ヨーロッパ, 北米, アジアおよびアフリカでKHV病が確認されている<sup>3)</sup>。日本では, 2003年11月に初めて発生が確認された<sup>4)</sup>。その後国内各地に急速に拡がり, 2005年10月までに全国の都道府県で発生が確認されている<sup>5)</sup>。神奈川県では2003年12月に釣り堀のコイからKHVが初めて確認されたが, このとき釣り堀および排水先の河川においてコイの大量斃死は発生していない<sup>6)</sup>。しかし, 2004年4月以降, 県内の河川や公園の池等でKHV病によるコイの大量斃死が頻発した<sup>6)</sup>。市街地におけるコイの大量斃死は, 回収や処分, さらに腐敗による悪臭や景観の悪化などの問題を引き起こし, 内水面漁業および養殖業関係者のみならず, 社会的に大きな注目を集めた。一方, KHV病は新しい病気であることから, それに関する知見は十分とは言えない状況にある。今後KHV病対策を検討するうえで, 疫学的知見を収集整理する必要がある。そこで, 2004年4月から2005年6月までの間にコイの斃死等により神奈川県水産技術センター内水面試験場に持ち込まれたコイのKHVの検出状況および大量斃死を伴う場合には斃死尾数についてもまとめたので併せて報告する。

## 材料および方法

## 供試魚

2004年4月から2005年6月までの間に, 河川等で斃死発生時に原因解明のためにサンプリングされた瀕死または斃死したコイおよび2004年5月に斃死の発生していない水域でウイルス検査のためにサンプリングされたコイを用いた。サンプリング時期, 場所および体長を記録した。なお, 切り出した鰓のみや頭部のみのサンプルが6検体あり, これらの体長は計測していない。斃死したコイの尾数については, 関係機関に対し斃死魚の回収尾数を聞き取り集計した。河川の回収尾数については水系単位で集計した。

## PCR検査

各供試魚から約10mgの鰓を切り出した後, Puregene DNA Purification Kit (Gentra Systems社製)により抽出したDNA分画を鋳型 (0.5 μL) として, 特定疾病診断マニュアル<sup>7)</sup>に従ってKHVに特異な2種類のプライマーセットによって2つの手法によるPCRを行った。まず, 1つ目のプライマーセットは Sph I-5 F (5' -GACACCACATCTGCAAGGAG-3') および Sph I-5 R (5' -GACACATGTTACAATGGTGGC-3') を, 2つ目のプライマーセットは KHV 9/5 F (5' -GACGACGCCGAGACCTTGTG-3') および KHV 9/5 R (5' -CACAAGTTCAGTCTGTTCCTCAAC-3') を使用した。PCR反応液の全量を20 μLとし, 反応系は, Takara Ex Taq Hot Start Version (Takara baio社製) を使用した。反応条件について, KHV Sph I-5 F, R では, 変性を94°C 1分間, アニールリングを55°C 2分間, 伸長反応を72°C 3分間とし, 増幅サイクル数は30サイクルとして行った。KHV 9/5 F, R では, 変性を94°C 1分間, アニールリングを68°C 1分間, 伸長反応を72°C, 30秒間とし, 増幅サイクル数は39サイクルとして行った。それぞれの反応産物7 μLと電気泳動用ローディングバッファー (ニッポンジーン社製) 3 μLを混合後, アガロースゲルに接種し, 陽性対照サンプル (KHV DNA), 陰性対照サンプル (d DW) および分子量マーカー (TOYOBO製) とともに15分間電気泳動した。このゲルを0.5 μg/mLの臭化エチジウム水溶液で30分間染色後, トランスイルミネーター (コスモバイオ株製) によるDNA断片 (KHV Sph I-5のプライマーセットは分子量290bpおよびKHV 9/5のプライマーセットは分子量484bp) の存在の有無を確認した。なお, 陽性対照として用いたKHV DNAは, 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いただいた。

## 結 果

## KHVのPCR検査結果

KHVのPCR検査の結果を表1に示した。2004年4月から2005年6月までの間, 県下の河川等12水系20河川, 公園の池等20箇所, 釣り堀3箇所および養殖場2箇所のコイ154尾の検査を行ったところ, KHVが検出された尾数は, KHV Sph I-5プライマーセットで41尾, KHV 9/5プライマー

2006. 2. 1 受理 神水セ業績No. 05-11

脚注\* 内水面試験場 \*\* 環境農政部水産課

注1) 農林水産省(2005): コイヘルペスウイルス病に関するPCR検査結果.  
([http://www.maff.go.jp/koi/pcr\\_kensa.html](http://www.maff.go.jp/koi/pcr_kensa.html))

表 1 KHVのPCR 検査結果

検査年月	サンプリング場所			検査結果			
	河川等	公園の池等 <sup>*3</sup>	釣堀 養殖場	KHV Sph 1-5 プライマーセット		KHV 9/5 プライマーセット	
				陽性数 / 検体数	陽性数 / 検体数	陽性数 / 検体数	陽性数 / 検体数
2004年4月		公園の池等A		0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
			養殖場A	0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
2004年5月	鶴見川			6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6
	引地川水系蓼川			2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
	境川			2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
	多摩川			2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
	相模川 <sup>*1</sup>			0 / 10	0 / 10	0 / 10	0 / 10
	相模川水系中津川 <sup>*1</sup>			0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
	相模川水系荻野川			0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
	相模川水系小出川			0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
	千歳川 <sup>*1</sup>			0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
	酒匂川 <sup>*1</sup>			0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	芦ノ湖 <sup>*1</sup>			0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
	早川 <sup>*1</sup>			0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
		菊名池公園の菊名池		0 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
		山崎公園の池		2 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
		もえぎ野公園の池		2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
		綾南公園の池		2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
		公園の池等B		0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
		公園の池等C		0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
		公園の池等D		0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
		公園の池等E		0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
		公園の池等F		0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
		公園の池等G		0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
		公園の池等H		0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
			釣堀A	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
			養殖場B	7 / 15	8 / 15	8 / 15	8 / 15
2004年6月	金目川水系座禅川			1 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1
	帷子川			3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3
	大岡川			2 / 3	2 / 3	2 / 3	2 / 3
	滝の川			2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
	相模川水系干無川			2 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
	相模川水系恩曾川			0 / 5	0 / 5	0 / 5	0 / 5
	酒匂川水系小八幡川			0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
		横浜市児童遊園地の池		4 / 4	4 / 4	4 / 4	4 / 4
		引地川公園の泉の森の池		1 / 2	2 / 2	2 / 2	2 / 2
		公園の池等I		0 / 4	0 / 4	0 / 4	0 / 4
		公園の池等J		0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
		公園の池等K		0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
		公園の池等L		0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
			釣堀B	0 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1
			釣堀C	1 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1
2004年8月			養殖場B	0 / 13	0 / 13	0 / 13	0 / 13
2004年9月	相模湖			0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
		公園の池等M		0 / 1	0 / 1	0 / 1	0 / 1
			養殖場B	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
2005年2月		公園の池等N		0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
2005年4月	境川水系白旗川			0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
2005年5月	帷子川			0 / 1	1 / 1	1 / 1	1 / 1
	境川水系宇田川			0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
		綾南公園の池		0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
2005年6月	大岡川			0 / 2	0 / 2	0 / 2	0 / 2
合 計	12水系20河川 <sup>*2</sup>	20箇所	3箇所 2箇所	41 / 154	48 / 154	48 / 154	48 / 154

\*1 斃死が発生していない水域から異常の認められないコイを検査

\*2 芦ノ湖は早川水系に、相模湖は相模川水系に含める

\*3 検体が全て陰性であった公園の池等は仮称で記載

セットで48尾であった。月別に見ると2004年5月に29尾、6月に18尾からKHVが検出された。その後、2005年4月までKHVは検出されず、2005年5月に1尾のみ検出された。なお、2004年5月に斃死の発生していない河川や湖においてサンプリングされたコイからKHVは検出されなかった。しかし、このうち相模川水系においてPCR検査を実施した翌月に斃死したコイからKHVが検出された。

**KHV陽性水域と斃死尾数**

KHV陽性水域と斃死尾数を表2に示した。KHV陽性水域は河川等9水系、公園の池等6箇所、釣り堀2箇所および養殖場1箇所であった。2004年の総斃死尾数は23,578尾で、多摩川水系(8,987尾)および鶴見川水系(8,261尾)で約7割を占めた。公園の池における斃死尾数は3~30尾であった。釣り堀や養殖場の魚は直ちに処分されたため、KHV病の発生から終息までの総斃死尾数は不明である。2005年は、6月までの総斃死尾数は帷子川水系の7尾のみであり、当該水系は2年連続でKHVが検出された。

表2 KHV陽性水域と斃死尾数

年	KHV陽性水域				斃死尾数(尾)
	河川等	公園の池等	釣り堀	養殖場	
2004年	多摩川水系				8,987
	鶴見川水系				8,261
	境川水系				2,888
	引地川水系				1,280
	相模川水系				929
	帷子川水系				546
	大岡川水系				477
	金目川水系				97
	滝の川水系				25
		菊名池公園の菊名池			30
		山崎公園の池			19
		引地川公園の泉の森の池			17
		綾南公園の池			12
		横浜市児童遊園地の池			7
		もえぎ野公園の池			3
				釣り堀B	—
			釣り堀C	—	
			養殖場B	—	
計	9水系	6箇所	2箇所	1箇所	23,578
2005年	帷子川水系				7

— : データなし

**KHV陽性コイの体長組成**

KHVが検出され体長も記録されているコイは46尾であり、体長は55~820mm(平均体長425mm±185)であった。これらのコイの体長を100mm毎の階級に区分した尾数を図1に示した。KHVは全ての階級から各2~13尾検出された。体長400~499mmの階級13尾、500~599mmの階級25尾、600mm~の階級7尾、100~199mmの階級および300~399mmの階級5尾、~99mmの階級3尾、200~299mmの階級2尾であった。

**KHV検出尾数の推移**

KHV検出尾数の推移を図2に示した。検出尾数が最も多かったのは2004年5月で29尾、次いで同6月に18尾、その後未検出の月が続き、2005年5月に1尾検出された。

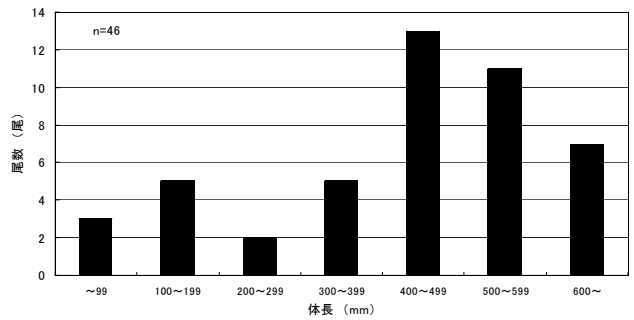


図1 KHV陽性コイ *Cyprinus capio* の体長組成

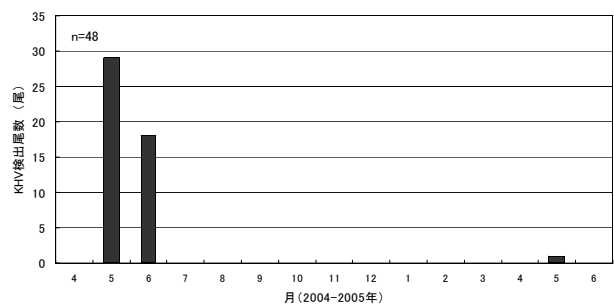


図2 KHV検出尾数の推移

**考 察**

2004年5月から6月を中心に、河川において発生したコイの大量斃死の原因は、PCR検査によりKHVと診断された。2004年の国内のKHV病による被害尾数は、滋賀県の琵琶湖が最も多く8万4千尾であるが<sup>注2)</sup>、多摩川水系および鶴見川水系はこれに次ぐ数であり、本県の河川におけるKHV病の被害は甚大であったと言える。

本研究では2種類のプライマーセットを用いたが、KHV Sph I-5プライマーセットで検出されず、KHV 9/5プライマーセットで検出されたサンプルが7尾存在したことから、KHV 9/5プライマーセットに比べ、KHV Sph I-5プライマーセットによるPCR法の検出感度は若干低い可能性が考えられた。このことについて、最近KHV Sph I-5プライマーセットの改良が報告されており<sup>8)</sup>、今後の活用が期待される。

KHV陽性コイの体長組成を検討したところ、体長100mm未満から600mm以上の全階級のコイからKHVが検出され、KHVは幅広いサイズに感染すると思われた。なお、体長400mm以上の陽性コイの尾数が多い傾向にあることについて、河川等で斃死が発生した際に大きい魚が人の目に付き易く回収され易いことおよび本県の河川では小さいコイが採捕されることはほとんどなく(私信)、小さいコイは回収され難かったものと思われた。

注2) 農林水産省(2005):第8回コイヘルペスウイルス病に関する技術検討会 資料1.  
([http://www.maff.go.jp/www/press/cont2/20050309press\\_5e.pdf](http://www.maff.go.jp/www/press/cont2/20050309press_5e.pdf))

KHVの検出時期は5月から6月に集中しているが、この理由の一つに産卵期<sup>9)</sup>と重なったことが考えられた。Bekesi・Csontos<sup>10)</sup>はコイの春ウイルス血症 (Spring viremia of carp (SVC))に感染した産卵親魚の卵巣腔液から本症の原因ウイルスを分離していることから、KHVに感染したコイにおいても卵巣腔液からKHVが排出された可能性があることおよび産卵活動によってコイ同士の接触する機会が増加したことがKHVのまん延を助長したものと思われた。他方、Gilad et al.<sup>11)</sup>はKHVの感染実験において、水温が18, 23および28°Cで85%以上の死亡率を示し、特に23°Cで最も高い死亡率を示す一方、13°C以下では死亡がみられず、さらにKF-1細胞におけるKHVの増殖は15~25°Cで認められたと報告しており、今後、県内の発生状況と水温との関係についても検討する必要がある。

Ronen et al.<sup>12)</sup>は、KHVに感染後生残したコイはKHVに対する抵抗性を獲得すると報告している。2005年5月にKHVが再検出されたのは帷子川のみであり、また、そのときの斃死尾数は僅かであったことから、ほとんどの生残魚はKHVに対する抵抗性を獲得した可能性が高いと思われた。

本報では、神奈川県におけるコイの大量斃死およびその原因のコイヘルペスウイルスの検出状況についてまとめた。KHV病は全国的に発生している一方、県内には未発生の水域も多数存在しており、今後もKHVの動向を把握する必要がある。また、防除技術の早期開発および実態に応じた対策の検討が必要である。

### 摘 要

2004年4月から2005年6月までの間、県下の河川等からサンプリングしたコイ154尾についてKHVのPCR検査を実施したところ、48尾からKHVが検出された。

KHVが検出された水域は9水系9河川、公園の池6箇所、釣り堀2箇所および養殖場1箇所であった。

2004年にKHVが検出された水域では斃死尾数が合計で23,000尾を超え、特に鶴見川や多摩川で8,000尾を超えた。

KHVは幅広い体長(体長55~820mm)のコイから検出され、検出時期は2004年5月、同6月および2005年5月であった。2005年にKHVが再検出されたのは帷子川のみであり、また、そのときの斃死尾数は僅かであったことから、ほとんどの生残魚はKHVに対する抵抗性を獲得した可能性が高いと思われた。

### 謝 辞

本研究を行うにあたり、相模川漁業協同組合連合会、酒匂川漁業協同組合、早川河川漁業協同組合、湯河原観光漁業協同組合および芦之湖漁業協同組合にはサンプル

の提供をいただいた。また、国土交通省京浜河川管理事務所、KHV病の発生した水域の各市町および各県政地域総合センターには斃死情報およびサンプルの提供をいただいた。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

### 引用文献

- 1) 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.
- 2) Dixon, P. F., O. L. M. Haenen, N. Beevers, K. Denham, C. Joiner, C. B. Longshaw, R. M. LeDeuff, R. Paley, D. M. Stone, S. StHilaire, K. Way (2004): Status of koi herpesvirus disease in Europe, and research on the virus in the United Kingdom. Abstract in "KHV infection: Present status and future prospects for prevention", 5-7.
- 3) 飯田貴次 (2005): コイヘルペスウイルス病, 日本水産学会誌, 71(4), 632-635.
- 4) Sano, M., T. Ito, J. Kurita, T. Yanai, N. Watanabe, S. Miwa and T. Iida (2004): First Detection of Koi Herpesvirus in Cultured Common Carp *Cyprinus carpio* in Japan. *Fish Pathol.*, 39(3), 165-167.
- 5) 原日出夫 (2004): コイヘルペスマン延防止対策, 平成15年度神奈川県水産総合研究所業務概要, 54.
- 6) 原日出夫 (2005): コイヘルペスマン延防止対策, 平成16年度神奈川県水産総合研究所業務概要, 52.
- 7) (社)日本水産資源保護協会 (2000): 特定疾病診断マニュアル, 1-25-1-27.
- 8) Yuasa, K., M. Sano, J. Kurita, T. Ito and T. Iida. (2005): Improvement of a PCR Method with the Sph I-5 Primer Set for the Detection of Koi Herpesvirus (KHV). *Fish Pathol.*, 40(1), 37-39.
- 9) 細谷和海 (1996): 「日本の淡水魚(川那部浩哉・水野信彦 編・監修)」, ㈱山と溪谷社, 東京, 338.
- 10) Bekesi, L. and L. Csontos (1985): Isolation of spring viremia of carp virus from asymptomatic broodstock carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Dis.*, 8, 471-472.
- 11) Gilad, O., S. Yun, M. A. Adskin, 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.
- 12) Ronen, A., A. Perelberg, J. Abramowitz, M. Hutoran, S. Tinman, I. Bejerano, M. Steinitz and M. Kotler (2003): Efficient vaccine against the virus causing a lethal disease in cultured *Cyprinus carpio*. *Vaccine*, **21**, 4677-4684.