

コイヘルペスウイルス病発症魚等の各部位を用いた感染試験－Ⅱ

野内 孝則*・荒井 将人*

Examination for Contracted Fish that Survive Infection of Koi Herpesvirus

(KHV) - 2

Takanori YANAI, Masahito ARAI

key words : Carp, Koi herpesvirus, KHV, survive infection, contracted fish,

はじめに

霞ヶ浦北浦では、2003年10月にコイヘルペスウイルス（以下「KHV」という。）病が発生した（高島ら，2004）。KHVは、網いけすで養殖されていたコイばかりでなく、天然のコイからも確認され（高島ら，2004）、北浦では、KHV病によると考えられる天然コイの死亡も確認された（きたうら広域漁協，私信）。KHV病は、「持続的養殖生産確保法」に基づく「特定疾病」に指定されていることから、KHV病のまん延を防止するため、KHV病発生後に霞ヶ浦北浦の網いけすで生残していたコイは、2004年3月30日までに全て焼却または埋却処分が行われ、その処分数量は2,467トンにも及んだ（高島ら，2004）。しかし、霞ヶ浦北浦の天然水域では、その後もコイの生息が確認されており、これら天然コイの検査ではKHV陽性個体が確認されている（荒井ら，2006）。さらに、2004年以降は、霞ヶ浦北浦における天然コイの大量へい死は確認されていない（荒井ら，2006）。このことから、霞ヶ浦北浦に生息する天然域のコイはKHVに感染し耐過したと考えられる（荒井ら，2008）。しかし、KHVに感染し耐過したコイは、ウイルスの保有魚（キャリア）と考えられている（飯田，2005；福田，2005）。従って、KHV病が「持続的養殖生産確保法」に基づく「特定疾病」である限り、KHVを体内に保有しているコイは、移動ばかりでなく食用としての利用にも制限が加えられることとなる（農林水産省，2003）。

このため、KHVに感染した群の生残個体（KHV感染耐過魚）を用いて、その各部位によるKHV感染試験を行った（野内ら，2008）。今回は、KHV病耐性魚作出のため処理した昇温処理魚、KHV病を発症した群の生残魚、KHV病発症魚の各部位についてKHVの感染性を検討し、若干の知見を得たので報告する。

方 法

I 昇温処理魚の各部位を用いた感染試験

－KHV昇温処理魚の各部位からKHV未感染魚に対する感染性の検討－

(1) 供試魚

a. 飼育試験魚

東京海洋大学・吉田ステーション由来のコイ（2006年産、KHV未感染魚）、サイズ：約7g

b. 感染源作出魚

KHV病発症魚の鰓抽出液*を地下水で2500倍に希釈した液（以下「鰓抽出液希釈水」という。）に上記aのコイを2006年8月22日に3時間浸漬後23℃で飼育した。昇温処理は、コイがKHV病を発症後の同年8月29日から9月8日まで（10日間）水温を32℃とし、その後は水温を23℃で一定とした。昇温処理60日後の11月7日に生残していたコイ5尾の各部位を感染源として用いた（表1）。

表1 試験Ⅰ 昇温処理魚(感染源作出魚)の検査結果

No	区 分	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	PCR検査結果	
					鰓	脳(嗅球)
1	昇温処理魚	127.8	98.7	24.0	陰性(-)	陰性(-)
2	"	150.4	117.9	40.8	陰性(-)	陰性(-)
3	"	128.2	100.9	25.0	陽性(+)	陰性(-)
4	"	141.3	107.7	35.4	陰性(-)	陰性(-)
5	"	141.8	109.1	34.2	陰性(-)	陰性(-)

*鰓抽出液浸漬7日後から32℃で10日間処理し、処理後60日経過魚

*鰓抽出液：KHV発症魚の鰓弁を取り出し乳鉢でケイ砂を入れて磨砕し、細胞培養液（MEM-2）により10倍量としてから遠心分離（3000回転，10分間）後の上澄液を-80℃で保管した液（野内ら，2008）。

c. KHV病発症魚の鰓によるKHV病感受性確認試験

霞ヶ浦産コイから採卵し、地下水で飼育していたコ

*：現在，財団法人 茨城県栽培漁業協会

イ (2005年産) を2006年10月27日に鰓抽出液希釈水に3時間浸漬後23°Cで飼育し、11日後の11月7日にKHV病を発症したコイ9尾(表2)の鰓(各個体0.3g, 計2.7g)を用いた。

d. 鰓抽出液のKHV病感受性確認試験

2006年11月7日に上記cのコイから作成した鰓抽出液希釈水を用いて、上記aのコイを3時間浸漬し、その後23°Cで飼育した。

(2) 飼育条件

①飼育水槽

容積600Lのガラス水槽に地下水500Lを入れ、止水とした。

②水温

温度調節器により、23°Cとした。

③収容数

各試験区には、(1) aのコイを10尾とした。

④給餌、換水等

試験期間中は、無給餌、無換水とした。

(3) 試験区

1区：対照

(1) aのコイ、10尾を飼育した。

2区：フィレー(スキンレス：鱗、皮膚、鰭、骨を除いた筋肉)を収容

(1) bのコイ、No.1~5(表1)からフィレー5gを用いた。

3区：筋肉(鱗、皮膚、鰭、骨付き筋肉)を収容

(1) bのコイ、No.1~5(表1)から筋肉5gを用いた。

4区：鰓を収容

(1) bのコイ、No.1~5(表1)から鰓2.7gを用い

た。

5区：内臓(肝臓、脾臓、腎臓)を収容

(1) bのコイ、No.1~5(表1)から内臓5gを用いた。

6区：KHV病発症魚の鰓を収容

(1) cのコイ、No.1~5(表2)から鰓2.7gを用いた。

7区：鰓抽出液浸漬コイ

(1) dのコイを飼育した。

(4) ウイルスの検出

ウイルスの検出は、PCR検査により行った。PCR検査のプライマーセット及びPCR反応プログラムは、Yuasa *et al.* (2005)に従った。

(5) 試験期間

2006年11月7日から2007年1月9日まで64日間行った。なお、2~6区の各部位の収容は、最初の3日間行った。

II 鰓抽出液浸漬30日後の生残魚の各部位を用いた感染試験

—KHV病発症群の生残魚の各部位からKHV未感染魚に対する感染性の検討—

(1) 供試魚

a. 飼育試験魚

東京海洋大学・吉田ステーション由来のコイ(2006年産、KHV未感染魚)、サイズ：約15g

b. 感染源作出魚

2007年5月23日に鰓抽出液希釈水を用いて上記aのコイを3時間浸漬し、その後23°Cで飼育した。浸漬30日後に生残していた3尾(生残率：2.2%)を感染源として用いた(表3)。

表2 試験-I KHV発症魚(感受性確認)の検査結果

No	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR検査結果 鰓
1	202.4	166.1	103.6	体表：スレ	陽性(+)
2	232.6	186.9	173.0	体表：スレ、腹部発赤	陽性(+)
3	220.2	176.7	130.7	体表：スレ	陽性(+)
4	225.7	181.0	187.2	体表：スレ、眼球陥没、鰓ぐされ、腹部発赤	陽性(+)
5	206.6	165.3	124.1	体表：スレ	陽性(+)
6	247.2	205.6	189.5	体表：スレ	陽性(+)
7	236.2	193.5	178.4		陽性(+)
8	230.7	184.7	180.4		陽性(+)
9	212.7	167.6	157.5		陽性(+)

* 供試魚・鰓各個体0.3g(計：2.7g)垂下。

表3 試験-II 感染源(KHV感染30日後の生残魚)の検査結果
(2007年6月22日)

No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	PCR検査結果			
				鰓	鱗	筋肉	脳(嗅球)
1	120.7	94.1	21.2	陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陽性(+)
2	120.2	93.4	18.2	陽性(+)	陽性(+)	陽性(+)	陽性(+)
3	103.2	80.0	10.3	陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陽性(+)

- (2) 飼育条件
I (2)と同じ。
- (3) 試験区
1区：対照
(1) aのコイ, 10尾飼育した。
2区：フィレー（スキンレス：鱗, 皮膚, 鰭, 骨を除いた筋肉）を収容
(1) bのコイ, No. 1~3 (表3) からフィレー5gを用いた。
3区：筋肉（鱗, 皮膚, 鰭, 骨付き筋肉）を収容
(1) bのコイ, No. 1~3 (表3) から筋肉 5gを用いた。
4区：内臓（鰓, 脳を含む全ての臓器）を収容
(1) bのコイ, No. 1~3 (表3) から内臓 5gを用いた。
- (4) ウイルスの検出
I (4)と同じ。
- (5) 試験期間
2007年6月22日から同年8月10日まで50日間行った。なお、各部位の浸漬は最初の5日間行った。試験開始31日後に収容魚の半数（5尾）を取り上げ、KHVのPCR検査を行った。残りはそのKHV感受性確認のため、鰓抽出液希釈水に3時間浸漬後23℃で飼育した。

III KHV病発症魚の各部位を用いた感染試験—1
—KHV病発症魚の各部位からKHV未感染魚に対する感染性の検討—

- (1) 供試魚
a. 飼育試験魚
東京海洋大学・吉田ステーション由来のコイ（2006年産, KHV未感染魚）, サイズ：約15g
b. 感染源作出魚
鰓抽出液希釈水に霞ヶ浦産コイから採卵し、地下水で育成したコイ（2005年産）を2007年8月31日に3時間浸漬後23℃で飼育し、6日後に生残していた5尾の各部位を用いた（表4）。
- (2) 飼育条件
I (2)と同じ。
- (3) 試験区
1区：対照
(1) aのコイ, 10尾飼育した。
2区：フィレー（スキンレス：鱗, 皮膚, 鰭, 骨を除いた筋肉）を収容

- た筋肉）を収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) からフィレー各1g, 計5gを用いた。
3区：筋肉（鱗, 皮膚, 鰭, 骨付き筋肉）を収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) から筋肉各1g, 計5gを用いた。
4区：内臓（脳, 消化管, 腎臓）を採取後直ちに（0時間）収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) から内臓各1g, 計5gを取り出して直ちに用いた。
5区：内臓（肝臓, 脾臓, 腎臓）を採取12時間後に収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) から内臓各1g, 計5gを取り出して氷蔵保管（+1℃）し、12時間後に用いた。
6区：鰓を採取後直ちに（0時間）収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) から鰓各1g, 計5gを取り出して直ちに用いた。
7区：鰓を採取3時間後に収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) から鰓各1g, 計5gを取り出して氷蔵保管（+1℃）し、3時間後に用いた。
8区：鰓を採取6時間後に収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) から鰓各1g, 計5gを取り出して氷蔵保管（+1℃）し、6時間後に用いた。
9区：鰓を採取12時間後に収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) から鰓各1g, 計5gを取り出して氷蔵保管（+1℃）し、12時間後に用いた。
10区：鰓を採取24時間後に収容
(1) bのコイ, No. 1~5 (表4) から鰓各1g, 計5gを取り出して氷蔵保管（+1℃）し、24時間後に用いた。
- (4) ウイルスの検出
I (4)と同じ。
- (5) 試験期間
2007年9月6日から同年11月4日まで60日間行った。なお、各部位の収容は最初の5日間行った。試験開始33日後に収容魚のうち5尾を取り上げ、KHVのPCR検査を行った。残りはそのKHV感受性確認のため、鰓抽出液希釈水に3時間浸漬後、23℃で飼育した。

表4 試験—III 感染源(発症魚)の検査結果(2007年9月6日)

No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR検査結果				
					鰓	鰭	筋肉	消化管	脳(嗅球)
1	213.7	166.0	110.7	体表:スレ, 鰓ぐされ	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陽性(+)	陰性(-)
2	355.0	281.1	613.3	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)
3	310.0	251.3	389.6	体表:スレ, 尾鰭:欠損	陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)
4	365.0	285.0	613.2	体表:スレ, 鰓ぐされ	陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)
5	305.4	242.5	401.0	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)

IV KHV 病発症魚の各部位を用いた感染試験－2

－KHV 病発症魚の各部位及び血液からの KHV 未感染魚に対する感染性の検討－

(1) 供試魚

a. 飼育試験魚

東京海洋大学・吉田ステーション由来のコイ（2006年産，KHV 未感染魚），サイズ：約 15 g

b. 感染源作出魚

鰓抽出液希釈水に霞ヶ浦産コイから採卵し，地下水で飼育したコイ（2005年産）を 2007年 11月 3日に 3時間浸漬後 23℃で飼育し，9日後に生残していた 5尾の各部位を用いた（表 5）。

(2) 飼育条件

I (2)と同じ。

(3) 試験区

1 区：対照

(1) a のコイ，10 尾飼育した。

2 区：フィレー（スキンレス：鱗，皮膚，鰭，骨を除いた筋肉）を収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）からフィレー各 1 g，計 5 g を用いた。

3 区：筋肉（鱗，皮膚，鰭，骨付き筋肉）を収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）から筋肉各 1 g，計 5 g を用いた。

4 区：内臓（脳，消化管，腎臓）を採取後直ちに（0 時間）収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）から内臓各 1 g，計 5 g を取り出して直ちに用いた。

5 区：内臓（肝臓，脾臓，腎臓）を採取 12 時間後に収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）から内臓各 1 g，計 5 g を取り出して氷蔵保管（+1℃）し，12 時間後に用いた。

6 区：鰓を採取後直ちに（0 時間）収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）から鰓各 1 g，計 5

g を取り出して直ちに用いた。

7 区：鰓を採取 3 時間後に収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）から鰓各 1 g，計 5 g を取り出して氷蔵保管（+1℃）し，3 時間後に用いた。

8 区：鰓を採取 6 時間後に収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）から鰓各 1 g，計 5 g を取り出して氷蔵保管（+1℃）し，6 時間後に用いた。

9 区：鰓を採取 12 時間後に収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）から鰓各 1 g，計 5 g を取り出して氷蔵保管（+1℃）し，12 時間後に用いた。

10 区：鰓を採取 24 時間後に収容

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）から鰓各 1 g，計 5 g を取り出して氷蔵保管（+1℃）し，24 時間後に用いた。

11 区：血液を添加

(1) b のコイ，No. 1～5（表 5）尾柄部から各 1 ml 採血し，計 5ml を用いた。

(4) ウイルスの検出

I (4)と同じ。

(5) 試験期間

2007年 11月 12日から同年 12月 4日まで 23 日間行った。なお，各部位の浸漬は，最初の 5 日間行った。

表 5 試験－IV KHV 病発症魚による感染試験，感染源の検査結果（2007年 11月 12日）

No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症状	PCR検査結果					
					鰓	鰭	筋肉	消化管	脳(嗅球)	血液
1	270.0	215.0	265.0		陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陽性(+)	陰性(-)
2	375.0	295.0	680.7		陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)	陽性(+)
3	290.0	230.0	288.1		陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)
4	262.0	205.0	219.8		陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)	陰性(-)
5	330.0	265.0	491.5		陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)	陽性(+)	陰性(-)

V KHV 病発症魚の各部位を用いた感染試験-3

—KHV 病発症魚の鰓、卵巣及び血液からの KHV 未感染魚に対する感染性の検討—

(1) 供試魚

a. 飼育試験魚

東京海洋大学・吉田ステーション由来のコイ (2006 年産, KHV 未感染魚), サイズ: 約 50 g

b. 感染源作出魚

鰓抽出液希釈水に霞ヶ浦産コイから採卵し, 地下水で飼育したコイ (2005 年産) を 2008 年 4 月 11 日に 3 時間浸漬後 23℃で飼育し, 10 日後に生残していた 5 尾の各部位を用いた (表 6)。

表6 試験-V 感染源(KHV病発症魚)の検査結果

No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	PCR検査結果		
				鰓	卵巣	血液
1	370.0	307.0	728.0	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)
2	376.0	307.0	722.0	陽性(+)	陽性(+)	陰性(-)
3	411.0	338.0	869.0	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)
4	356.0	289.0	673.0	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)
5	306.0	253.0	383.0	陽性(+)	陰性(-)	陰性(-)

(2) 飼育条件

I (2)に準じて行った。

(3) 試験区

1 区: 対照

(1) a のコイ, 10 尾飼育した。

2 区: 鰓を収容

(1) b のコイ, No. 1~5 (表 6) から鰓各 1 g, 計 5 g を用いた。

3 区: 卵巣を収容

(1) b のコイ, No. 1~5 (表 6) から卵巣各 1 g, 計 5 g を用いた。

4 区: 血液を添加

(1) b のコイ, No. 1~5 (表 6) 尾柄部から各 1 ml 採血し, 計 5ml を用いた。

(4) ウイルスの検出

I (4)と同じ。

(5) 試験期間

2008 年 4 月 21 日から同年 6 月 9 日まで 50 日間行った。なお, 各部位の収容は最初の 3 日間行った。試験開始 30 日後に収容魚のうち 5 尾を取り上げ, KHV の PCR 検査を行った。残りはその KHV 感受性確認のため, 鰓抽出液希釈水に 3 時間浸漬後, 23℃で飼育した。

結 果

I 昇温処理魚の各部位を用いた感染試験

—KHV 昇温処理魚の各部位から KHV 未感染魚に対する感染性の検討—

(1) 感染試験作出魚

感染源作出魚の KHV の PCR 検査結果を表 1 に示した。試験に用いた 5 尾のうち 1 尾は鰓の PCR 検査で陽性となり KHV 保有が確認されたが, その他の 4 尾の鰓, 及び, 脳 (嗅球) による PCR 検査は陰性であった。

収容魚の KHV 感受性確認試験 (発症魚の鰓収容区) の PCR 検査結果を表 2 に示した。鰓を用いた PCR 検査では, 9 個体全てが KHV 陽性を示した。

(2) KHV 感受性確認試験

6 区 (KHV 病発症魚を用いた鰓の収容区) では, 試験開始後 7 日目から 13 日目までに収容魚 10 尾が全て死亡した。死亡魚は, KHV の特徴的な症状 (体表: スレ, 眼球: 陥没, 鰓弁: 膨潤等) を示しており, 鰓を用いた PCR 検査では, 全ての個体が KHV 陽性であった (表 7)。また, 7 区 (鰓抽出液を用いた浸漬試験) でも試験開始後 8 日目から 20 日目まで供試魚 10 尾全てが死亡し, PCR 検査で KHV 陽性であった (表 8)。

表7 試験-I 6区(KHV病発症魚鰓収容)の試験結果

No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR検査結果	備考
					鰓	斃死月日
1	64.9	50.5	4.2	スレ, 水生菌付着(全身)	陽性(+)	2006/11/14
2	62.9	49.9	3.6	スレ, 鰓弁:膨潤, 眼球:突出	陽性(+)	〃
3	63.4	50.6	3.2	スレ, 水生菌付着	陽性(+)	〃
4	59.0	45.7	3.2		陽性(+)	2006/11/16
5	60.9	46.7	2.6	スレ, 水生菌付着(頭部), 眼球:陥没	陽性(+)	2006/11/18
6	73.9	56.1	3.9	スレ	陽性(+)	2006/11/19
7	60.4	47.0	3.0	スレ	陽性(+)	〃
8	79.7	65.8	6.5	スレ, 鱗:剥離	陽性(+)	2006/11/20
9	65.8	51.3	3.0	スレ, やせ	陽性(+)	〃
10	75.3	59.5	5.5	スレ	陽性(+)	〃

表8 試験-I 7区(鰓抽出液浸漬)の試験結果

No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR検査結果 鰓	備考 死亡月日
1	82.9	69.7	8.8	スレ, 鰭:欠損, 眼球:やや突出	陽性(+)	2006/11/15
2	55.9	42.5	1.7	スレ, やせ	陽性(+)	2006/11/19
3	69.6	54.1	4.4	スレ	陽性(+)	"
4	60.2	48.9	3.1	スレ, 肛門:発赤	陽性(+)	2006/11/20
5	60.5	48.0	2.8	スレ, 肛門:発赤	陽性(+)	"
6	58.0	45.1	2.5	スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	"
7	74.4	55.2	5.2	スレ	陽性(+)	2006/11/21
8	71.0	55.3	5.0	スレ	陽性(+)	"
9	62.2	46.9	2.6	スレ	陽性(+)	2006/11/24
10	65.6	50.9	3.6		陽性(+)	2006/11/27

(3) 昇温処理魚の各部位による感染試験

1~4区では, 試験開始後30日目までKHV病の発症, 死亡は確認されなかった。このため, 30日後に各試験区の収容魚を5尾ずつ取り上げてPCR検査を行った。PCR検査は, 鰓及び脳(嗅球)を用いたが, 全てKHV陰性であった(表9)。試験は, 収容63日後まで行い, 終了時に鰓及び脳(嗅球)からPCR検査を行ったが, 全てKHV陰性であった。なお, 鰓収容区で試験開始57日後に死亡した個体についてPCR検査を行ったが, KHVは陰性であった(表10)。

表9 試験-I 試験開始30日後の検査結果(2006年12月7日)

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症状	PCR検査結果	
						鰓	脳(嗅葉)
1区 対照	1	68.6	54.5	4.2	なし	陰性(-)	陰性(-)
	2	67.9	53.6	4.1	なし	陰性(-)	陰性(-)
	3	60.7	46.5	2.7	なし	陰性(-)	陰性(-)
	4	62.3	47.6	2.7	なし	陰性(-)	陰性(-)
	5	57.0	43.5	2.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
2区 ファイルー 5g収容	1	70.0	52.8	4.6	なし	陰性(-)	陰性(-)
	2	71.5	55.6	4.3	なし	陰性(-)	陰性(-)
	3	63.8	50.0	3.8	なし	陰性(-)	陰性(-)
	4	65.9	52.8	3.2	なし	陰性(-)	陰性(-)
	5	65.9	49.8	3.0	なし	陰性(-)	陰性(-)
3区 筋肉 5g収容	1	69.8	56.3	4.1	なし	陰性(-)	陰性(-)
	2	65.9	51.7	3.7	なし	陰性(-)	陰性(-)
	3	57.7	45.2	2.6	なし	陰性(-)	陰性(-)
	4	62.4	49.0	2.9	なし	陰性(-)	陰性(-)
	5	54.1	40.6	1.7	なし	陰性(-)	陰性(-)
4区 内臓 5g収容	1	69.8	54.5	4.5	粘液過多	陰性(-)	陰性(-)
	2	67.3	49.8	3.3	なし	陰性(-)	陰性(-)
	3	67.3	52.4	3.7	なし	陰性(-)	陰性(-)
	4	60.5	47.9	3.2	粘液過多	陰性(-)	陰性(-)
	5	66.8	50.8	3.6	なし	陰性(-)	陰性(-)
5区 鰓 2.7g収容	1	72.4	56.5	4.6	なし	陰性(-)	陰性(-)
	2	69.9	53.0	3.6	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	66.5	50.3	3.4	なし	陰性(-)	陰性(-)
	4	60.4	46.5	2.8	なし	陰性(-)	陰性(-)
	5	59.1	45.0	2.3	やせ	陰性(-)	陰性(-)

表10 終了時(63日後)検査結果(2007年1月9日)

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症状	PCR検査結果	
						鰓	脳(嗅葉)
1区 対照	1	69.0	53.2	3.5	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	70.5	54.4	3.8	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	67.9	52.0	3.5	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	68.7	54.6	3.5	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	68.5	53.2	3.4	やせ	陰性(-)	陰性(-)
2区 ファイルー 5g収容	1	77.3	59.3	5.1	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	71.4	55.7	3.9	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	68.9	55.3	3.8	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	68.7	53.4	3.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	72.4	56.6	4.1	やせ	陰性(-)	陰性(-)
3区 筋肉 5g収容	1	43.5	33.0	0.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	60.4	48.0	2.6	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	60.4	47.1	2.4	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	57.8	45.5	2.1	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	62.6	50.0	2.2	やせ	陰性(-)	陰性(-)
4区 内臓 5g収容	1	73.4	56.5	3.9	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	65.4	51.1	3.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	60.8	46.4	2.0	やせ, 鰓弁:やや膨潤	陰性(-)	陰性(-)
	4	67.0	52.3	2.9	やせ, 鰓弁:やや膨潤	陰性(-)	陰性(-)
	5	67.3	52.0	3.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
5区 鰓 2.7g収容	1	64.5	50.2	2.3	やせ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)	陰性(-)
	2	67.6	52.0	3.6	やせ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)	陰性(-)
	3	70.7	55.2	3.4	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	62.1	46.8	2.0	やせ, 鰓弁:やや膨潤	陰性(-)	陰性(-)
	5*	70.3	60.2	3.8	眼球:突出, やせ	陰性(-)	陰性(-)

*2007年1月3日, 死亡。

II 鰓抽出液浸漬 30 日後の生残魚の各部位を用いた感染試験

—KHV 病発症群の生残魚の各部位から KHV 未感染魚に対する感染性の検討—

(1) 感染源作出魚

試験に供した 3 尾のコイの PCR 検査結果を表 3 に示した。検査は、鰓、鰭、筋肉、脳（嗅球）を用いて行った。2 尾の筋肉の検査結果で KHV 陰性であった以外は、全て KHV 陽性となり、試験に用いた 3 尾全てが KHV の保有が確認された。

(2) 浸漬 31 日後の供試魚の検査結果

検査は各区 10 尾中 5 尾で行った。PCR 検査は、鰓及び脳（嗅球）から行い、1~4 区で KHV 陰性が確認された。また、試験開始 28 日後の 2 区（フィレー区）の死亡した 1 尾の PCR 検査では KHV 陰性であった（表 11）。なお、試験開始 31 日後までに死亡したのは、この 1 尾のみであった。

(3) 供試魚の感受性確認試験

KHV の保有が確認された、KHV 感染 30 日後のコイの各部位を KHV 未感染コイの飼育水中に収容しても KHV の感染が確認されなかったことから、収容魚の KHV の感受性を確認することとし、鰓抽出液を地下水で 2500 倍に希釈した液に試験開始 31 日後のコイを 3 時間浸漬し、飼育した。

その結果、浸漬 1 日後から 14 日後にかけて死亡が確認され、死亡魚の PCR 検査を行ったところ、浸漬 2 日後までの死亡魚 3 尾は、KHV 陰性であったが、9 日後から 14 日後にかけての死亡魚は KHV 陽性であった（表 12）。

さらに、鰓抽出希釈液浸漬 18 日後に生残していた供試魚を取り上げ、PCR 検査を行ったところ、7 尾中 3 尾は KHV 陽性であった（表 13）。なお、各区とも死亡魚及び一部の生残魚から PCR 検査で KHV 陽性が確認された。

このことから、供試魚は、KHV に感受性を有することが示された。

表 11 試験—II 2007年7月23日(浸漬31日後)の検査結果

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	PCR検査結果	
					鰓	脳(嗅球)
対照区	1	106.2	82.4	14.3	陰性(-)	陰性(-)
	2	98.6	74.4	11	陰性(-)	陰性(-)
	3	103.6	82	12.9	陰性(-)	陰性(-)
	4	91	69.9	8.1	陰性(-)	陰性(-)
	5	97.7	74.1	10	陰性(-)	陰性(-)
フィレー区	1	111.3	84.7	18.6	陰性(-)	陰性(-)
	2	86.4	67.7	6.8	陰性(-)	陰性(-)
	3	99.7	76	12.7	陰性(-)	陰性(-)
	4	95	72.4	9.2	陰性(-)	陰性(-)
	5	110.4	82.7	14.5	陰性(-)	陰性(-)
	* 6	100.2	77.7	7.5	陰性(-)	陰性(-)
魚肉鱗骨付区	1	95.3	73.7	11.4	陰性(-)	陰性(-)
	2	100.2	75.4	11.2	陰性(-)	陰性(-)
	3	99.1	77.6	12.1	陰性(-)	陰性(-)
	4	100.9	76.1	11.7	陰性(-)	陰性(-)
	5	95.4	72.5	10	陰性(-)	陰性(-)
内臓区 (鰓, 内臓, 脳)	1	83.5	65.4	6.4	陰性(-)	陰性(-)
	2	107.4	82.5	15.1	陰性(-)	陰性(-)
	3	101.7	78.2	11	陰性(-)	陰性(-)
	4	99.8	78.3	11.4	陰性(-)	陰性(-)
	5	95	72.6	10.3	陰性(-)	陰性(-)

*2007年7月20日 死亡

表 12 試験—II 鰓抽出液浸漬(2007年7月23日)後、斃死魚の検査結果

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR結果(鰓)	斃死月日
対照区	1	94.0	74.2	7.3	眼球:陥没, やせ, 体表:スレ, 鰓弁上部:白化	陽性(+)	2007/8/1
	1	99.2	81.8	7.9	眼球:陥没, 体表:スレ	陽性(+)	2007/8/4
	2	105.6	81.0	10.3	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/8/4
フィレー区	1	96.5	78.7	11.0	眼球:陥没, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/7/24
	1	125.2	102.1	24.0	体表:スレ, 鰓弁:白化	陽性(+)	2007/8/1
魚肉鱗骨付区	1	98.0	77.4	9.5	鰓ぐされ, やせ	陰性(-)	2007/7/24
	2	102.8	79.3	12.1	眼球:やや陥没, 体表:スレ, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/7/24
内臓区 (鰓, 内臓, 脳)	1	88.7	71.0	6.1	眼球:陥没, やせ, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/7/25
	1	91.4	71.6	7.1	眼球:陥没, 頭部:陥没, やせ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/8/2
	2	97.7	75.3	8.2	やせ	陽性(+)	2007/8/2
	3	104.6	79.5	10.9	体表:スレ	陽性(+)	2007/8/4
	1	94.0	74.5	8.0	眼球:陥没, 体表:スレ, やせ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/8/6

表 13 試験—II 鰓抽出液浸漬(2007年7月23日)後の検査結果(8月10日生残魚)

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR結果(鰓)
対照区	1	98.6	76.3	8.8	やせ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)
	2	112.9	86.3	12.7	やせ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)
フィレー区	1	85.4	64.8	6.6	やせ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)
	2	97.1	72.5	8.5	やせ	陰性(-)
魚肉鱗骨付区	1	87.5	68.5	6.4	やせ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)
	2	109.6	85.0	11.1	やせ	陽性(+)
	3	94.5	72.5	6.4	やせ, 鰓弁:白化	陽性(+)

III KHV 病発症魚の各部位を用いた感染試験－1

－KHV 病発症魚の各部位から KHV 未感染魚に対する感染性の検討－

(1) 感染源の検査結果

感染源作出魚である KHV 病発症魚の PCR 検査結果を表 4 に示した。感染源を作出した KHV 病発症魚の鰓の PCR 検査では、全ての個体で KHV 陽性を示した。しかし、筋肉及び脳（嗅球）の検査では、KHV 陰性であった。

(2) 試験開始 33 日後の検査結果

KHV 病発症魚の各部位を収容して 33 日後までは、全ての試験区で死亡は確認されなかった。このため、各区に収容した 10 尾中 5 尾を取り上げ、鰓と脳（嗅球）か

らの PCR 検査を行った。この結果、全ての試験区で KHV 陰性であった（表 14）。

(3) KHV 感受性の確認

試験開始 33 日後の各区の収容魚 5 尾を鰓抽出液を地下水で 2500 倍に希釈した液に 3 時間浸漬し、KHV の感受性について確認した。浸漬 8 日後から 26 日後に全ての供試魚が死亡した。死亡魚の死亡日と PCR 検査結果を表 15 に示した。この結果、各区から PCR 検査で KHV 陽性の個体が確認された。死亡魚からは、体表のスレと鰓弁や眼球陥没等の KHV 病の症状が確認されたが、PCR 検査では KHV 陰性となった個体もあった。

表 14 試験－III 試験開始33日後の検査結果(2007年10月9日)

試験区名	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症状	PCR検査結果	
						鰓	脳(嗅球)
1区 対照	1	123.0	91.4	21.1	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	120.2	90.5	22.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	112.4	85.7	16.4	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	123.7	93.6	21.1	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	120.5	93.7	20.8	やせ	陰性(-)	陰性(-)
2区 ファイルー	1	110.6	85.2	14.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	122.2	94.2	20.2	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	113.1	84.7	16.6	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	112.3	84.9	15.8	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	117.2	88.5	17.9	やせ	陰性(-)	陰性(-)
3区 筋肉	1	109.3	80.7	14.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	105.9	77.4	14.9	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	119.6	89.1	18.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	111.7	84.6	15.8	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	111.3	84.8	15.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
4区 内臓0時間	1	109.0	83.7	14.3	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	109.7	84.0	15.2	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	113.6	84.1	19.3	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	112.3	83.4	17.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	127.4	94.8	22.5	やせ	陰性(-)	陰性(-)
5区 内臓12時間	1	124.0	95.3	22.5	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	125.8	97.1	21.3	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	120.0	91.0	18.5	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	115.3	88.9	15.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	105.4	81.8	14.2	やせ	陰性(-)	陰性(-)
6区 鰓 0時間	1	119.2	93.1	19.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	113.4	86.6	18.6	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	110.3	84.9	16.2	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	111.3	86.9	15.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	107.5	84.0	15.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
7区 鰓 3時間	1	119.6	91.8	21.4	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	118.4	92.3	19.8	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	106.9	82.3	13.9	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	112.6	84.9	16.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	115.9	87.3	17.4	やせ	陰性(-)	陰性(-)
8区 鰓 6時間	1	114.7	85.8	17.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	120.5	92.5	18.6	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	113.2	87.4	15.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	116.0	88.5	15.3	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	109.5	86.6	12.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
9区 鰓12時間	1	111.3	82.7	15.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	116.4	88.9	16.3	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	112.8	85.7	15.3	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	115.5	88.2	15.8	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	107.2	81.0	14.6	やせ	陰性(-)	陰性(-)
10区 鰓24時間	1	120.8	93.2	21.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	2	113.2	85.0	18.7	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	3	119.3	91.1	19.0	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	4	110.3	83.6	13.5	やせ	陰性(-)	陰性(-)
	5	105.6	79.5	13.9	やせ	陰性(-)	陰性(-)

表15 試験－III 鰓抽出液浸漬(KHV病感染確認)による死亡魚の検査結果

試験区名	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR結果(鰓)	死亡月日
1区 対照	1	104.0	84.0	13.3	体表:スレ	陽性(+)	2007/10/21
	1	110.3	84.3	15.6	体表:スレ, 眼球:やや陥没, 鰓弁:退色	陽性(+)	2007/10/23
	2	—	87.9	13.4	体表:スレ, 眼球:やや陥没, 鰓ぐされ	陽性(+)	2007/10/23
	1	105.1	81.5	11.7	体表:スレ, 眼球:陥没	陽性(+)	2007/10/24
	2	111.6	85.6	14.3	体表:スレ, 眼球:陥没	陽性(+)	2007/10/24
2区 ファイルー	1	111.9	84.2	14.8	体表:スレ, 眼球:やや陥没	陰性(-)	2007/10/14
	1	112.2	87.7	14.2	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/17
	1	117.8	88.9	19.4	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)	2007/10/19
	2	112.4	87.1	16.0	体表:スレ, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/10/19
	3	111.3	84.8	16.3	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/10/19
3区 筋肉	1	110.9	88.5	15.8	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)	2007/10/16
	2	112.0	84.1	16.2	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/16
	1	122.9	93.2	20.7	体表:スレ, 眼球:やや陥没, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/18
	1	112.9	85.8	19.7	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)	2007/10/19
	1	115.7	90.4	18.0	体表:スレ	陽性(+)	2007/10/20
4区 内臓 0時間	1	119.1	92.6	20.6	体表:スレ, 眼球:やや陥没	陽性(+)	2007/10/19
	1	124.6	97.9	21.8	体表:スレ	陽性(+)	2007/10/20
	2	137.6	106.3	28.7	体表:スレ, 眼球:陥没	陽性(+)	2007/10/20
	3	116.4	91.2	18.3	体表:スレ	陽性(+)	2007/10/20
	1	123.3	94.6	19.8	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/22
5区 内臓12時間	1	103.4	79.2	13.1	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/20
	1	121.9	93.0	17.2	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/10/26
	2	119.8	91.6	19.6	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/10/26
	3	121.3	94.3	20.7	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/10/26
	1	114.4	86.4	15.1	体表:スレ, 眼球:陥没	陽性(+)	2007/10/27
6区 鰓 0時間	1	118.6	93.0	18.6	鰓弁:膨潤	陰性(-)	2007/10/10
	1	111.8	85.9	12.2	体表:スレ, やせ, 眼球:やや陥没	陽性(+)	2007/11/3
	2	115.0	87.5	16.4	体表:スレ, やせ, 眼球:やや陥没	陽性(+)	2007/11/3
	1	122.9	92.9	14.3	体表:スレ, やせ, 眼球:やや陥没, 鰓ぐされ	陰性(-)	2007/11/4
	2	104.8	80.1	12.8	体表:スレ, やせ, 眼球:やや陥没	陰性(-)	2007/11/4
7区 鰓 3時間	1	117.0	91.7	18.3	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/16
	2	118.5	95.1	18.3	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/16
	3	108.9	83.7	14.1	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/16
	4	114.7	89.6	16.9	体表:スレ, 眼球:陥没, 鰓ぐされ	陽性(+)	2007/10/16
	1	120.7	95.1	19.1	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陰性(-)	2007/10/17
8区 鰓 6時間	1	109.4	84.9	10.8	やせ, 眼球:やや陥没, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/19
	2	109.0	85.4	16.2	体表:スレ, 眼球:やや陥没, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/19
	3	116.0	91.0	16.9	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/19
	1	117.9	90.3	18.3	体表:スレ, 眼球:やや陥没	陰性(-)	2007/10/21
	1	120.0	93.6	18.0	体表:スレ, 眼球:やや陥没, 鰓ぐされ	陽性(+)	2007/10/23
9区 鰓12時間	1	111.6	86.9	14.0	体表:スレ, 鰓ぐされ	陽性(+)	2007/10/17
	1	111.1	83.4	14.5	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/18
	2	117.1	90.3	18.3	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/18
	3	125.7	98.0	21.2	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/18
	4	117.5	89.9	17.4	体表:スレ, 鰓弁:膨潤	陽性(+)	2007/10/18
10区 鰓24時間	1	116.5	88.5	19.9	体表:スレ, 眼球:陥没	陽性(+)	2007/10/18
	1	111.6	85.9	16.3	体表:スレ, 眼球:陥没	陽性(+)	2007/10/20
	1	108.1	80.7	13.8	体表:スレ	陰性(-)	2007/10/21
	1	123.4	92.6	22.1	体表:スレ, 眼球:陥没	陽性(+)	2007/10/27
	1	118.1	90.0	21.1	体表:スレ, 眼球:陥没	陽性(+)	2007/10/29

IV KHV 病発症魚の各部位を用いた感染試験－2

－KHV 病発症魚の各部位及び血液からのKHV未感染魚に対する感染性の検討－

(1) 感染源の検査結果

感染源として用いたKHV病発症魚のPCR検査結果を表15に示した。検査した5尾中1尾は、検査部位全てでKHV陰性であった。残り4尾のコイは、鰓、鱗からは全てKHV陽性であったが、脳(嗅球)のKHV陽性は2尾、

血液のKHV陽性は1尾であり、筋肉と消化管ではKHV陰性であった。

(2) 試験結果

各部位を飼育水槽に垂下し、飼育を行ったが、6区(鰓0時間区)では、試験開始の翌日に全て死亡した。なお、7、8、9区(鰓3・6・12時間区)と3区(筋肉収容区:鱗、骨、鱗等含む)では、試験開始3日後までに全て死亡した。2007年11月13日の死亡魚の検査結果を表16

に示した。3区及び6～9区の死亡原因は、PCR検査でKHV陰性であったこと、供試魚は3日後までに死亡しておりKHV病による死亡では早すぎること、死亡魚の観察からKHV特有の症状が認められなかった。

このため、死亡魚の検鏡したところ、鰓弁、鰭、体表に長桿菌が多数確認され、体表等に菌のフローラが確認

された。これらのことから、試験魚の死亡原因は、カラムナリス症によるといえる。また、試験終了時のPCR検査結果を表17に示した。試験終了時には各区のともKHV陰性であった。なお、10区（鰓24時間区）の供試魚は全て生残しており、PCR検査でもKHV陰性であった。

表16 試験Ⅳ KHV病発症魚、鰓収容区の死亡魚の検査結果

試験区名	No.	全長	体長	体重	症 状	PCR結果(鰓)	死亡日
6区 鰓0時間	1	123.0	97.5	27.2	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	2	116.1	92.2	21.2	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	3	133.6	106.9	32.8	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	4	108.1	84.0	18.4	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	5	94.6	74.6	12.9	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	6	84.7	65.8	9.8	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	7	92.5	71.5	11.2	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	8	89.7	70.5	9.7	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	9	116.0	93.1	22.3	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	10	90.9	72.5	12.0	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
7区 鰓3時間	1	93.5	73.6	11.6	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	2	88.4	68.7	10.4	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	3	82.9	65.0	9.2	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13
	4	93.0	73.6	12.6	鰓ぐされ、鰓弁：膨潤、体表：白点有り	陰性(-)	2007/11/13

表17 試験Ⅳ KHV病発症魚における感染試験、検査結果(2007年12月7日)

試験区名	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	症 状	PCR結果(鰓)
1区 対 照	1	115.6	88.3	17.8		陰性(-)
	2	108.8	81.9	16.0		陰性(-)
	3	106.0	78.5	14.1		陰性(-)
	4	99.8	74.5	13.2		陰性(-)
	5	86.7	64.7	7.6		陰性(-)
	6	100.7	76.9	11.4		陰性(-)
	7	109.9	84.5	16.2		陰性(-)
	8	118.7	90.4	18.0		陰性(-)
	9	121.2	91.7	20.5		陰性(-)
	10	89.4	67.8	8.4		陰性(-)
2区 フイレー	1	106.6	78.8	14.7		陰性(-)
	2	103.0	78.2	12.0		陰性(-)
	3	102.5	77.5	13.5		陰性(-)
	4	110.0	84.3	14.9		陰性(-)
	5	135.3	105.6	28.5		陰性(-)
	6	96.5	73.4	10.6		陰性(-)
	7	120.1	92.1	20.3		陰性(-)
	8	91.8	70.5	9.0		陰性(-)
	9	112.7	86.3	16.2		陰性(-)
	10	105.6	79.2	13.6		陰性(-)
4区 内臓0時間	1	122.3	93.1	20.4		陰性(-)
	2	94.2	72.0	10.7		陰性(-)
	3	125.8	96.2	21.5		陰性(-)
	4	115.9	88.7	17.7		陰性(-)
	5	95.2	70.8	10.0		陰性(-)
	6	96.0	73.1	9.6		陰性(-)
	7	104.6	81.5	14.0		陰性(-)
	8	96.8	74.1	11.3		陰性(-)
	9	115.4	87.7	19.3		陰性(-)
5区 内臓12時間	1	86.7	65.3	7.9		陰性(-)
	2	129.8	97.3	23.7		陰性(-)
	3	99.7	75.6	11.3		陰性(-)
	4	98.1	74.2	11.9		陰性(-)
	5	109.5	82.9	17.2		陰性(-)
	6	112.5	86.3	16.1		陰性(-)
	7	110.3	84.1	17.0		陰性(-)
	8	104.3	80.6	14.9		陰性(-)
	9	96.6	73.3	11.0		陰性(-)
10区 鰓24時間	1	104.8	78.6	13.8		陰性(-)
	2	103.5	77.6	16.4		陰性(-)
	3	119.5	91.0	21.8		陰性(-)
	4	108.5	82.2	14.8		陰性(-)
	5	120.3	91.3	21.7		陰性(-)
	6	97.5	75.0	9.9		陰性(-)
	7	87.9	66.4	8.0		陰性(-)
	8	102.2	78.9	13.3		陰性(-)
	9	103.3	77.7	13.0		陰性(-)
	10	88.2	67.0	8.0		陰性(-)
11区 血液	1	115.8	85.4	18.3		陰性(-)
	2	126.8	94.6	24.8		陰性(-)
	3	104.4	80.2	12.6		陰性(-)
	4	115.8	88.4	19.0		陰性(-)
	5	105.2	81.0	15.2		陰性(-)
	6	99.0	74.9	27.9		陰性(-)
	7	112.1	84.4	17.2		陰性(-)
	8	125.2	95.7	22.6		陰性(-)
	9	107.7	84.0	15.9		陰性(-)
	10	121.3	93.8	20.9		陰性(-)

V KHV 病発症魚の各部位を用いた感染試験—3

—KHV 病発症魚の鰓、卵巣及び血液からの KHV 未感染魚に対する感染性の検討—

(1) 感染源の検査結果

感染源として用いた KHV 病発症魚 5 尾の鰓からの PCR 検査では、全ての個体が KHV 陽性を示したが、卵巣は 1 尾、血液は 5 尾全てで KHV 陰性であった (表 6)。

(2) 試験中の斃死魚の検査結果

2 区 (鰓収容区) では、11~18 日後までに供試魚全てが死亡した。死亡魚の鰓で行った PCR 検査は、全て KHV 陽性であった (表 18)。

表18 試験—V KHV発症魚・鰓収容区の死亡状況

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	PCR結果(鰓)	死亡日	
2区	1	99.0	81.8	14.2	陽性(+)	2008/5/2	
	鰓	2	106.5	82.9	16.8	陽性(+)	2008/5/7
		3	106.9	84.7	15.7	陽性(+)	2008/5/7
		4	92.0	73.0	9.8	陽性(+)	2008/5/7
		5	89.6	72.3	8.4	陽性(+)	2008/5/8
		6	80.0	62.2	8.2	陽性(+)	2008/5/8
		7	77.6	62.2	6.2	陽性(+)	2008/5/8
		8	92.8	72.1	10.9	陽性(+)	2008/5/9
		9	84.6	65.7	7.7	陽性(+)	2008/5/9
		10	71.0	55.0	5.2	陽性(+)	2008/5/9

(3) 試験開始 30 日後の結果

試験開始から 30 日後に 1, 3, 4 区の各区 5 尾を取り上げ、PCR 検査を行った。その結果、全て KHV 陰性であった (表 19)。

表19 試験—V KHV病発症魚の感染試験開始30日後の検査結果(2008.5.21)

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	PCR検査結果		備考	
					鰓	脳(嗅球)		
1区	対照	1	110.2	86.5	15.0	陰性(-)	陰性(-)	30日後取り上げ
		2	105.1	84.4	15.7	陰性(-)	陰性(-)	"
		3	104.9	84.6	12.1	陰性(-)	陰性(-)	"
		4	92.9	73.8	9.5	陰性(-)	陰性(-)	"
		5	88.4	67.8	8.8	陰性(-)	陰性(-)	"
3区	卵巣	1	102.3	79.6	14.7	陰性(-)	陰性(-)	30日後取り上げ
		2	92.1	71.5	9.7	陰性(-)	陰性(-)	"
		3	81.3	65.4	7.3	陰性(-)	陰性(-)	"
		4	73.7	59.6	5.6	陰性(-)	陰性(-)	"
		5	71.9	56.1	4.9	陰性(-)	陰性(-)	"
4区	血液	1	95.8	76.4	10.9	陰性(-)	陰性(-)	30日後取り上げ
		2	85.4	66.9	7.5	陰性(-)	陰性(-)	"
		3	95.3	74.8	9.8	陰性(-)	陰性(-)	"
		4	79.4	64.8	7.0	陰性(-)	陰性(-)	"
		5	80.9	62.5	7.9	陰性(-)	陰性(-)	"

(4) 感受性確認試験

試験開始 30 日後に生残しており、PCR 検査で用いた供試魚以外の 5 尾を鰓抽出液に浸漬し、飼育した結果、浸漬後 9 日目から 19 日目までに全て死亡した。死亡魚の鰓で行った PCR 検査では、全ての死亡魚が KHV 陽性となった (表 20)。

表20 試験—V 鰓抽出液浸漬(感受性確認)後の死亡魚の検査結果

試験区	No.	TL(mm)	SL(mm)	BW(g)	PCR結果(鰓)	死亡日	
1区	1	92.8	73.4	10.2	陽性(+)	2008/5/30	
	対照	2	90.7	74.5	9.5	陽性(+)	2008/6/2
		3	76.6	59.5	5.7	陽性(+)	2008/6/4
		4	87.4	68.1	7.7	陽性(+)	2008/6/5
		5	101.6	80.9	10.9	陽性(+)	2008/6/6
3区	1	103.0	82.4	14.0	陽性(+)	2008/6/1	
	卵巣	2	76.3	59.5	5.5	陽性(+)	2008/6/5
		3	90.4	70.4	8.9	陽性(+)	2008/6/6
		4	113.0	88.0	13.1	陽性(+)	2008/6/8
		5	82.6	61.8	5.5	陽性(+)	2008/6/9
4区	1	88.0	66.7	9.5	陽性(+)	2008/6/1	
	血液	2	89.7	71.1	9.0	陽性(+)	2008/6/1
		3	77.9	62.5	5.3	陽性(+)	2008/6/1
		4	94.8	73.4	10.8	陽性(+)	2008/6/2
		5	95.6	75.7	9.8	陽性(+)	2008/6/2

考 察

KHV に感染させた後、昇温処理を行ったコイの筋肉、鰓、鰓、内臓を収容した水槽の KHV 未感染魚からは KHV 病の発症が確認されず、PCR 検査も KHV 陰性であった。さらに、試験開始 30 日後の収容魚を KHV 鰓抽出液に浸漬すると、KHV 病を発症し PCR 検査でも KHV 陽性となることが確認された。また、KHV 鰓抽出液に浸漬し、KHV 病を発症した群の浸漬後 30 日の生残魚の筋肉、鰓、脳、内臓を収容した水槽の KHV 未感染魚は、KHV 病を発症せず、PCR 検査でも KHV 陰性であったが、その収容魚に鰓抽出液から作成した希釈液に浸漬すると、KHV 病の発症と PCR 陽性が確認された。

野内ら (2008) は、KHV に感染した群の感染後 189 日目の生残魚を用いて同様の試験を行い、各部位からの感染性の検討を行っているが、鰓、筋肉、鰓、鱗、内臓 (腎臓、肝臓、脾臓) からの KHV 未感染魚への感染は確認されていない。今回の結果と前報から、KHV 病を発症した群の生残魚 (感染耐過魚・昇温処理魚) の各部位は、KHV の感染源となる可能性は極めて低いものと考えられた。さらに、KHV 病感染耐過魚と KHV 未感染魚の同居試験でも KHV 病の発症は確認されていない (野内ら, 2008) ことから、KHV 病の感染耐過魚が KHV を感染させる可能性は極めて低いものと考えられた。しかし、KHV 病の発症が不十分で、KHV の増殖水温 (13~26℃) 以下で経過したコイは、その後、KHV の増殖水温となると、KHV 病を発症し、同居魚に KHV を感染させることが確認されている (荒井ら, 2008)。

このため、KHV 病を発症したコイの各部位を収容した水槽に KHV 未感染魚を入れ、KHV 病の発生状況を確認した。この結果、KHV 病発症魚の鰓を収容した試験区 (試験—I, III, IV, V) では、4 試験中 2 試験 (試験—I, V) では、KHV 病の発症と PCR 検査での KHV 陽性が確認された。しかし、2 試験 (試験—III, IV) では、KHV 病は発症せず、PCR 検査でも KHV 陰性であった。なお、KHV 発症魚の筋肉、鰓、内臓 (消化管、卵巣等)、脳、血液からは、KHV 病の発症は確認されず、PCR 検査でも KHV 陰性となった。このことから、KHV 病発症魚の鰓は、KHV の感染源となる可能性は

あるものの、その他の部位（卵巣、血液を含む）は、KHVの感染源となる可能性は極めて低いものと考えられた。さらに、KHVの鰓を+1℃で氷蔵保管し、鰓を取り出した直後（0時間）、氷蔵保管3時間後、6時間後、12時間後、24時間後でのKHV感染試験をそれぞれ2回行ったが、何れもKHV病による死亡はなかった。なお、試験IVでは氷蔵保管12時間後までの試験魚は、鰓と皮膚に付着していた細菌（カラムナリス）の影響で、カラムナリス症を発症し全て死亡した。このことからKHV病発症魚の鰓による感染時間の特定には至らなかった。また、コイを調理する際の血液によるKHVの感染が疑われた（木實谷、私信）ことから、KHV発症魚の血液を1000倍に希釈した地下水中にKHV未感染魚を用いて2回試験したもののKHV病の発症も死亡も確認されなかった（試験IV、V）。なお、コイの卵巣は、甘煮等に加工した際に好まれることから、KHV病発症魚の卵巣についてもKHV感染の可能性について試験を行ったが、KHV病の発症、死亡は確認されなかった（試験V）。

さらに、前報（野内ら、2008）でもKHV発症魚の鰓を16,000倍に希釈した水中での飼育試験では、供試魚のKHVの発症、死亡は51日後まで確認されなかった。これらることによって、KHVウイルスの密度が低い場合には、KHVの感染に至らない可能性が高いものと推察される。

一方、KHV病発症魚の鰓抽出液を用いた浸漬試験では、全ての試験においてKHVの感染が確認された。このことから、KHV病の原因ウイルスが死亡した組織内に留まると、水中に移出する機会が減り、感染力が低下すると考えられた。これらの結果から、KHV病の感染耐過魚の各部位がKHV病の感染源となる可能性は、極めて小さいものと考えられた。また、KHV病の発症魚であっても鰓を取り除けば、KHV未感染魚への感染する可能性は、極めて小さいものと考えられた。さらに、筋肉、内臓（卵巣、消化管を含む）、血液が付着していてもKHV病の感染源となる可能性は、極めて小さいものと考えられた。

要 約

KHVに感染した群の昇温処理魚、KHV感染30日後の生残魚及びKHV病発症魚の各部位を用いてKHV感染の可能性について検討した。その結果、次のことが明らかになった。

(1) KHV発症魚に昇温処理を行った魚のフィレー（鱗、鰭、骨等除去）、筋肉（鱗、鰭、骨付）、内臓（肝臓、脾臓、腎臓）、鰓を収容した水槽でKHV未感染魚を飼育した結果、何れの試験区でもKHVの発症は認められず、PCR検査でも陰性となった。

(2) KHV病発症魚の鰓抽出液に浸漬した、30日後の生残魚（135尾中132尾斃死）のフィレー（鱗、鰭、骨等除去）、筋肉（鱗、鰭、骨付）、内臓（鰓、脳を含む内臓全て）を収容した水槽でKHV未感染魚を飼育した結果、全ての区でKHVを発症せず、PCR検査でも陰性であった。

(3) KHV病発症魚のフィレー（鱗、鰭、骨等除去）、筋肉

（鱗、鰭、骨等付）、内臓（肝臓、脾臓、腎臓、消化管、脳）、鰓を添加した水槽でKHV未感染魚を飼育した結果、鰓収容区でのみKHVを発症した。

(4) KHV病発症魚の血液を添加した水槽でKHV未感染魚を飼育した結果、KHV病を発症せず、PCR検査でも陰性であった。

(5) KHV病発症魚の卵巣を収容した水槽でKHV未感染魚を飼育した結果、KHV病を発症せず、PCR検査でも陰性であった。

(6) KHV病発症魚の鰓を収容した試験を4回の試験を行い、そのうち2回でしかKHV感染が確認されなかった。また、切り出した組織の時間経過に伴う感染の有無を特定するために、KHV発症魚から取り出した鰓を0, 3, 6, 12, 24時間後に収容した試験を行ったが、明確な結果は得られなかった。

(7) KHV病発症魚の各部位（血液を含む）を用いた試験では、鰓を用いた場合のみKHVの感染が確認された。このため、KHV病の発症魚であっても鰓を取り除くことによりKHVの感染の可能性は極めて小さくなるものと考えられた。

参考文献

- 荒井将人, 野内孝則, 高島葉二 (2006) : 霞ヶ浦・北浦における天然コイのヘルペスウイルス病の感染状況, 茨城県内水面水産試験場研究報告, 40, 37-43
- 荒井将人, 渡邊直樹, 野内孝則, 高島葉二 (2008) : コイヘルペスウイルス病発生群中で生残したコイの特性, 茨城県内水面水産試験場研究報告, 41, 33-38
- 荒井将人, 野内孝則, 高島葉二 (2008) : 天然魚にコイヘルペスウイルス病が発生した水域における網いけす養殖コイへの感染, 茨城県内水面水産試験場研究報告, 41, 39-46
- 福田穎穂 (2005) : コイヘルペスウイルス病研究最前線, KHVとの共存のみち, 魚病研究, 40(4), 204.
- 飯田貴次 (2005) : 特集 海外からの病気の侵入, コイヘルペスウイルス病, 日本水産学会, 71(4), 632-635.
- 農林水産省 (2003) : コイヘルペスウイルス (KHV) 病感染魚の飼料原料への活用に係る指導・確認における留意事項について, 2003年11月25日付け農林水産省消費安全局衛生管理課長通知
- 高島葉二, 渡邊直樹, 野内孝則, 中村丈夫 (2004) : 霞ヶ浦・北浦におけるコイヘルペスウイルス病の発生, 茨城県内水面水産試験場調査研究報告, 39, 1-8
- 野内孝則, 荒井将人 (2008) : コイヘルペスウイルス病耐過魚の切り身を用いた感染試験-I, 茨城県内水面水産試験場研究報告, 41, 55-60
- Yuasa, K., M. Sano, J. Kurita, T. Ito and T. Iida (2005) : Improvement of a PCR Method with the Sph 1-5 Primer Set for the Detection of Koi Herpesvirus (KHV). Fish Pathol., 40, 37-39

付表 コイヘルペスウイルス病感染魚等の各部位による感染試験結果の概要

KHV感染33日後の生残魚(感染耐過魚)による試験(期間:32日)*

試験区	収容数	終了時検査
① 対照	10	陰性(-)
② 筋肉(鱗, 骨等除去)	10	陰性(-)
③ 筋肉(鱗, 骨等含む)	10	陰性(-)
④ 内臓(鰓, 腎臓等)	10	陰性(-)
⑤ 同居	10	陰性(-)

KHV感染189日後の生残魚とKHV発症魚の鰓による試験(期間:52日)*

試験区	収容数	30日後検査	終了時検査
① 対照	10	陰性(-)	陰性(-)
② 筋肉(鱗, 骨等除去)	10	陰性(-)	陰性(-)
③ 筋肉(鱗, 骨等含む)	10	陰性(-)	陰性(-)
④ 鰓(感染生残魚)	10	陰性(-)	陰性(-)
⑤ 鰓(KHV発症魚)	10	陰性(-)	陰性(-)

供試魚のKHV感受性についての確認試験(期間:11日)*

試験区	収容数	PCR検査
① エラ抽出液浸漬	20	陽性(+)

昇温処理魚(KHV感染後76日)による試験(期間:64日)

試験区	収容数	30日後検査	終了時検査
① 対照	10	陰性(-)	陰性(-)
② 筋肉(鱗, 骨等除去)	10	陰性(-)	陰性(-)
③ 筋肉(鱗, 骨等含む)	10	陰性(-)	陰性(-)
④ 内臓(肝臓, 腎臓, 脾臓)	10	陰性(-)	陰性(-)
⑤ 鰓(昇温処理魚)	10	陰性(-)	陰性(-)
⑥ 鰓(KHV発症魚)	10	陽性(+)	陽性(+)
⑦ 鰓抽出液(2500倍)	10	陽性(+)	陽性(+)

KHV感染30日後の生残魚による試験(期間:50日)

試験区	収容数	31日後検査	感受性確認
① 対照	10	-	陽性(+)
② 筋肉(鱗, 骨等除去)	10	-	陽性(+)
③ 筋肉(鱗, 骨等含む)	10	-	陽性(+)
④ 内臓(鰓, 脳, 消化管)	10	-	陽性(+)

KHV発症魚(KHV感染8日後)による試験(期間:60日)

試験区	収容数	33日後検査	感受性確認
① 対照	10	陰性(-)	陽性(+)
② 筋肉(鱗, 骨等除去)	10	陰性(-)	陽性(+)
③ 筋肉(鱗, 骨等含む)	10	陰性(-)	陽性(+)
④ 内臓(0時間後)	10	陰性(-)	陽性(+)
⑤ 内臓(12時間後)	10	陰性(-)	陽性(+)
⑥ 鰓(0時間後)	10	陰性(-)	陽性(+)
⑦ 鰓(3時間後)	10	陰性(-)	陽性(+)
⑧ 鰓(6時間後)	10	陰性(-)	陽性(+)
⑨ 鰓(12時間後)	10	陰性(-)	陽性(+)
⑩ 鰓(24時間後)	10	陰性(-)	陽性(+)

KHV発症魚(KHV感染9日後)による試験(期間:23日)

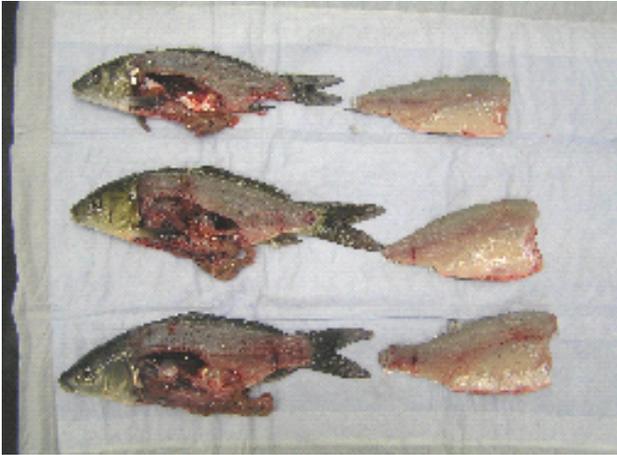
試験区	収容数	終了時検査	備考
① 対照	10	陰性(-)	
② 筋肉(鱗, 骨等除去)	10	陰性(-)	
③ 筋肉(鱗, 骨等含む)	10		(3日:全死)
④ 内臓(0時間後)	10	陰性(-)	
⑤ 内臓(12時間後)	10	陰性(-)	
⑥ 鰓(0時間後)	10	陰性(-)	(1日:全死)
⑦ 鰓(3時間後)	10	陰性(-)	(3日:全死)
⑧ 鰓(6時間後)	10		(3日:全死)
⑨ 鰓(12時間後)	10		(3日:全死)
⑩ 鰓(24時間後)	10	陰性(-)	
⑪ 血液	10	陰性(-)	

KHV発症魚(KHV感染10日後)による試験(期間:50日)

試験区	収容数	33日後検査	感受性確認
① 対照	10	陰性(-)	
② 鰓	10	陽性(+)	(18日:全死)
③ 卵巣	10	陰性(-)	
④ 血液	10	陰性(-)	

*:コイヘルペスウイルス病耐過魚の切り身を用いた感染試験-I(野内ら, 2008)

コイヘルペスウイルス病感染魚等の各部位による感染試験の概要－1



感染源作出魚



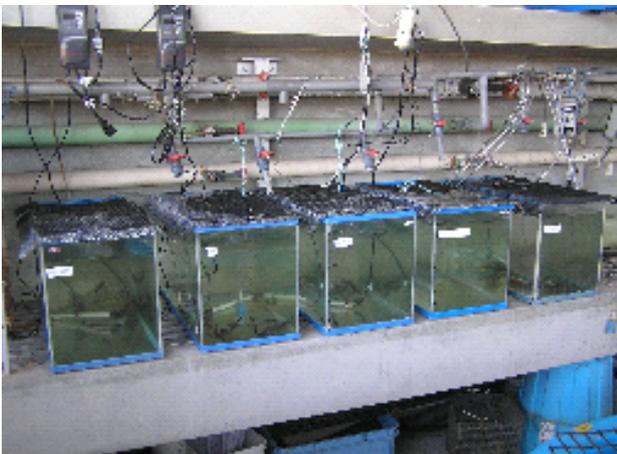
筋肉収容区(フィレー)



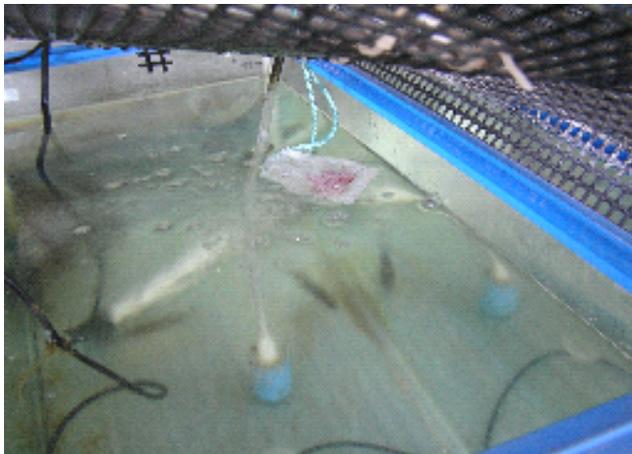
筋肉収容区(鱗・鱗・骨付き肉)



内臓収容区(心臓, 鰓, 肝臓, 脾臓, 腎臓)



試験状況

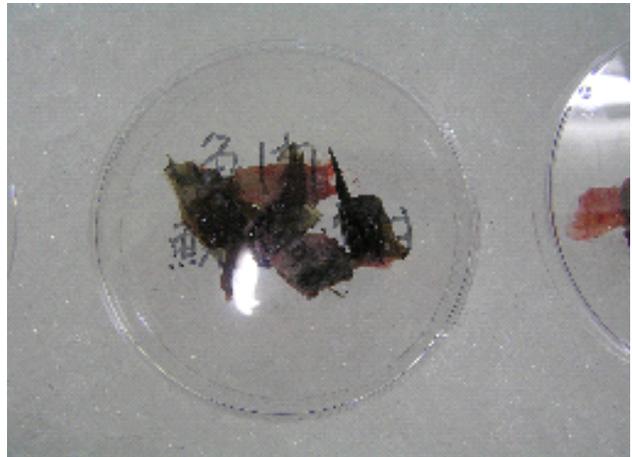


試験試料をネットに入れ垂下

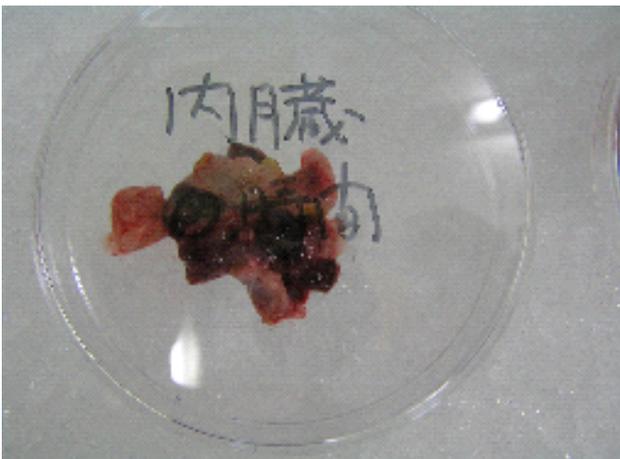
コイヘルペスウイルス病感染魚等の各部位による感染試験の概要－2



フィレ－(筋肉のみ)区



魚肉(鱗・鱗・骨付)区



内臓区(腎臓, 肝臓, 消化管等)



鰓区



採血の様子



血液区