

KHV病耐性コイ作出技術開発 (1)

茨城県内水面水産試験場・筑波大学大学院生命環境科学研究科

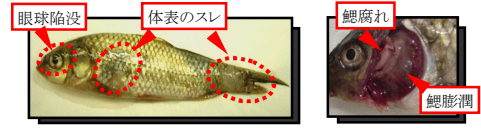
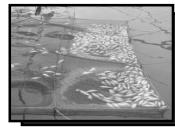
【要旨】

コイヘルペスウイルス (KHV) 病は、KHVを原因とし、マゴイおよびニシゴイ特異的に発症する致死性の高い魚病である。本研究では、人為的にウイルス感染を施したコイに対し、以下の2つの昇温処理条件を設け、生存率および抗KHV抗体価を比較検討することで、本病の病兆を示さず、かつ再度のウイルス感染にも耐性を示すKHV病耐性コイの新規作出技術開発に至った。

昇温処理条件として、①32℃で連続的に昇温する条件、②32℃に昇温、続いて23℃、再度32℃へ昇温する間歇昇温条件を設けた。KHV感染後に昇温を施さなかった対照区画が全滅したのに対し、条件①では58%、条件②では82%の生存率を示した。さらに、試験魚血清中の抗KHV抗体価をモニタリングした結果、抗体価の上昇にともない生存率の低下がみられなくなることから、本処理によるKHV病耐性は抗KHV抗体の産生によるものと考えられた。

昇温処理魚を本病発症至適水温(23℃)で12ヶ月間以上観察飼育したが、本病の病兆や斃死は確認されず、また本処理魚とKHVフリーコイを同居させても両魚で本病の病兆を示さなかった。さらに、昇温処理魚を感染水域である霞ヶ浦の網生養で飼育した結果、90%以上が生存することを確認できた。

以上のことから、本研究がコイ養殖へ貢献できるものと期待される。

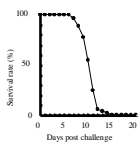


【材料と方法】

○供試魚

本試験には、東京海洋大学吉田ステーションで生産されたKHVフリーコイ(15 ± 5 g)を用いた。

KHV感染方法



KHV感染液は、本病を発症したコイから鰓を摘出し調製した。本感染液を使用し、浸漬感染を行った。昇温を施さなかった場合の生存率の推移を左図に示した。

試験条件(下図参照)

浸漬感染した試験魚に対し、昇温処理の効果を確かめるため連続的・間歇的に昇温処理を施した。昇温処理期間を除き、飼育水温は本病発症至適水温である23℃に維持した。

試験期間を通し、生存率および血清中の抗KHV抗体価をモニタリングした。また、試験期間を通してテンプレートDNA量を一定にすることで、PCR法によるウイルス量の推定を試みた。

昇温処理後の生残魚は、KHVに再感染させた他、ウイルスフリーコイとの同居試験に用いた。

○血清中の抗KHV抗体価測定

血清中の抗体価測定は、ELISA法により測定した。なお精製KHVおよび抗コイマウスモノクローナル抗体は、(独)水産総合研究センター養殖研究所から頂いた。

ウイルスDNA検出

ウイルス検出は、鰓から抽出したtotal DNAを試料とし、下表のプライマーを用いたPCR法で行った。なお図1の記号は、下図の増幅されたバンドのシグナル強度を4段階評価したものである。

KHV specific primers

Sph -5 F: 5'-GACACCCACATCTGCAAGGAG-3'
Sph -5 R: 5'-GACACATGTACAATGGTCGC-3'



【結果および考察】

昇温処理の効果

昇温処理を施さなかった対照区画では感染後15日目で全滅を確認した。昇温処理を施した区画の生存率を図1中の折れ線で、血清中の抗体価を棒グラフで示した。生存率を比較した結果、連続した昇温条件では58%、間歇昇温条件では82%となり、間歇昇温条件の方がより高い生存率を示した。また、抗体価と生存率に密接な関係が認められた。PCR法によるウイルス検出の結果、昇温を施した場合、感染後28日目からシグナルが弱まり、それ以降シグナルは検出されなくなった。

なお、本試験の生残魚を23℃で12ヶ月間以上飼育したが、KHV病の病兆や本病による斃死は認められなかった。

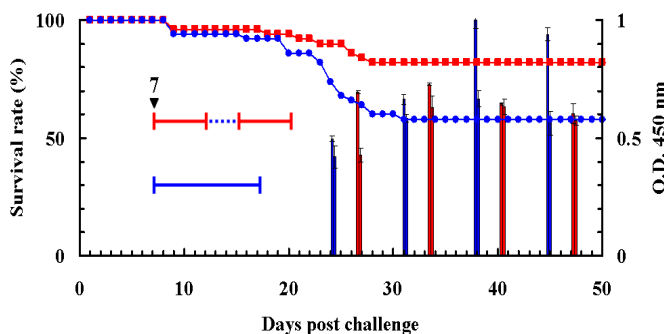


図1 生存率および抗KHV抗体価に与える昇温処理の効果

○昇温処理生残魚の特徴

- ・昇温処理生残魚20尾に対し、再度感染を試みたが、一切斃死は認められなかった。初感染から1年および2年が経過した生残魚に対し、再感染を施しても発症、斃死ともに認められなかった。
- ・昇温処理生残魚10尾とウイルスフリーコイ30尾とを同居させ、23℃で12ヶ月間飼育したが一切斃死は認められなかった。
- ・生残魚に免疫抑制剤 (dexamethasone) を投与したが、本病の病兆はみられなかった。

昇温処理によりKHV病に耐性を示すコイの作出が可能となった。

KHV感染水域におけるフィールド試験

昇温処理が養殖現場でも効果を発揮できるのか調べるため、大規模での試験を行った。前述の方法で浸漬感染を施し、間歇的な昇温処理を施した。この結果、生存率は84.2%となり、大規模でも処理効果が確かめられた。

さらに、作出した昇温処理魚と昇温処理を施さなかったコイを、それぞれ感染水域である霞ヶ浦の網生養に收容し、2007年6月から12月まで飼育した。表1のとおり、昇温処理を施さなかったコイを收容した区画では急激な生存率の低下がみられ、6ヶ月後の生存率は18.8%となった。これに対し、昇温処理区画では91.9%の生存率を示した。

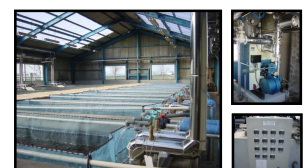


表1 フィールド試験結果

(A) Treated carp	Start	07/6/21	07/8/31	07/12/4	(B) Untreated carp	Start	07/6/21	07/8/31	07/12/4
Water temperature	23°C	30°C	10°C		Water temperature	23°C	30°C	10°C	
Fish (ind.)	3,726	3,473	3,424		Fish (ind.)	4,858	946	915	
Total weight (kg)	138.5	653.0	1087.5		Total weight (kg)	205.0	177.0	596.5	
Average weight (g)	37.2	188.0	636.1		Average weight (g)	42.2	187.1	651.9	
Survival rate	100%	93.2%	91.9%		Survival rate	100%	19.5%	18.8%	

【結論】

- ・間歇的な昇温処理により、KHV病に耐性を示すコイを効率的に作出できる新規技術を開発した。
- ・抗KHV抗体を産生することでウイルス耐性を示すと考えられる。
- ・本技術で作出されたKHV病耐性コイは、感染水域である天然水域においても顕著に高い生存率を維持した。

1 Original article: Shintaro Niwa, Masato Arai, Takanori Yanai, Takayuki Hoshino (2008): Production of koi herpesvirus-tolerant carp, 5th World Fisheries Congress, Aquaculture, 2a09

実施年度 平成18年度～平成20年度

文部科学省特別電源所在県科学技術振興事業費補助金ほか