

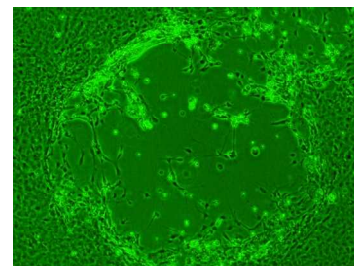
【背景】

キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症^{1*}（以下、キンギョヘルペスウイルス病）は平成4年に愛知県ではじめて確認されて以来、日本のキンギョ養殖場において多大な被害をもたらしています。以前、本疾病の病原ウイルスは Goldfish haematopoietic necrosis virus (GFHNV) と呼ばれていましたが、ウイルス分類に関する国際委員会（国際ウイルス命名委員会）において、2009年コイ科魚類から2番目に分離されたヘルペスウイルスであることから Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) へと改名されました。本感染症による被害は日本だけでなく、キンギョでは米国、台湾、オーストラリア、ニュージーランド、英国から、コイ科魚類ギベリオブナ^{2*}ではハンガリー、チェコ及び中国から報告があります。このように、世界中のキンギョ養殖業及び天然水域のギベリオブナや養殖ギベリオブナに多大な被害をもたらしている病気にも関わらず、魚類株化細胞^{3*}を用いて、本ウイルスを安定的に継続して培養（継続的培養^{4*}）することが出来ず、大量のウイルス培養液を得ることができなかつたため、培養ウイルスを用いた感染実験やウイルス病予防に有効なワクチンの開発は全くなされていませんでした。このため、キンギョ養殖業者およびキンギョの生産県の水産試験場等から、その防除法の開発について強い要望がありました。それに対応すべく、(独)水産総合研究センター増養殖研究所では、キンギョヘルペスウイルス病の対策の研究を進めてきました。

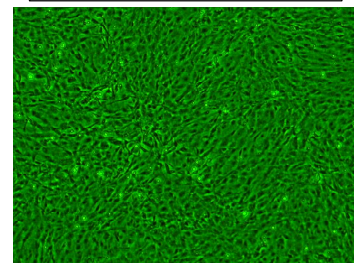
【成果の内容】

キンギョの鱗由来の魚類株化細胞を用いて、細胞がフラスコ底面に定着する前の細胞培養液中に浮遊している時にウイルス液を添加するか、ウイルス液と感染細胞とを混合し、2~3倍に希釈した後、新しい培養フラスコに移すことにより、CyHV-2の継続培養に成功しました（図1）。また培養ウイルスを用いたキンギョ（増養殖研究所玉城庁舎にて生産した健全なリュウキン及びエドニシキ）への人為的感染実験に成功しました（図2）。

さらに、CyHV-2の培養ウイルス液にホルマリンを0.1%濃度で添加し作製した不活化ワクチン^{5*}をキンギョ（エドニシキ）へ腹腔内に注射し、その9日後に再度その不活化ワクチンを注射しました。その13日後にウイルスが含まれる水に魚を入れて感染させました。その際同様に、ワクチン無処理区及びウイルス未感染細胞培養液接種（細胞培養液接種）区にもウイルスを感染させました。その後、21日間死亡を観察した結果、無処理区及び細胞培養液接種区は100%の魚が死亡したのに対しワクチン接種区は57%の魚が生存しました（図3）。これらの死亡率を比較した結果、ワクチン接種区とワクチン無処理区の間には有意差があり、さらにワクチンの有効率^{6*}は57%でした。また、ワクチン処理区については、他の試験区に比べ死亡の始まる時期も遅いことが観察されました。このように本ワクチンの有効性が証明され、養殖場におけるキンギョヘルペスウイルス病の被害軽減に有効であることが分かりました。本ワクチンを用いることにより、ランチュウやエドニシキ等の高級キンギョにキンギョヘルペス病に対する抗病性を付与することができ、それらの安定的な生産・販売が可能になります。



キンギョヘルペスウイルス感染細胞
(中央付近にウイルスに感染し細胞
がはがれた様子が見られる。)



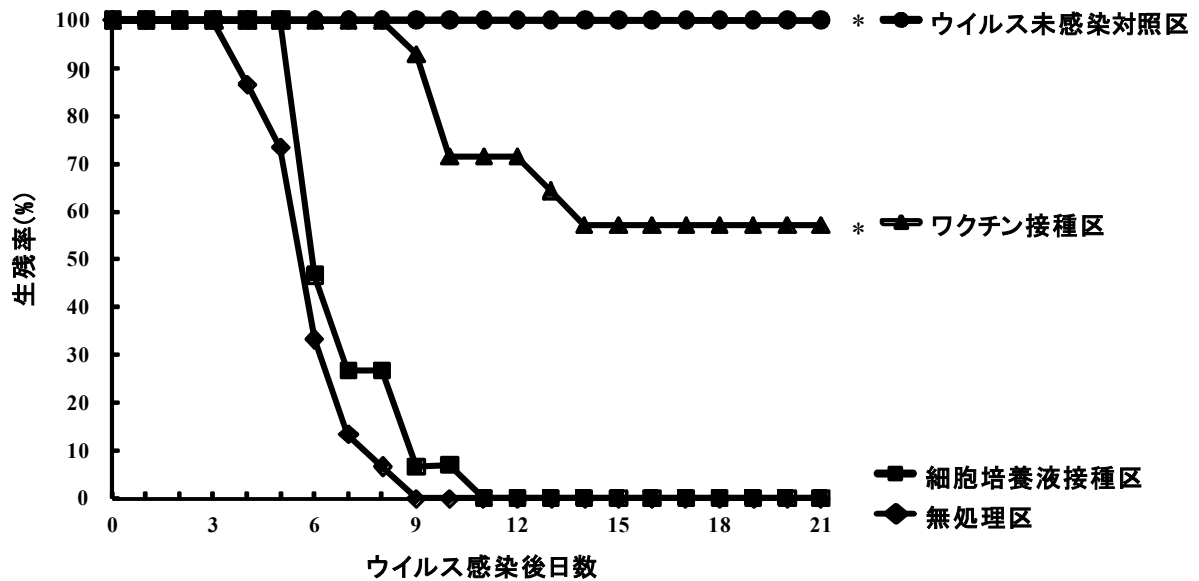
ウイルス未感染細胞（細胞のはがれた
部分は無い。)

図1 キンギョヘルペスウイルスに感染した細胞
(上) と感染していない細胞 (下)



キンギョヘルペスウイルス感染し
死亡したキンギョ
(外見症状はほとんど観察されず、
生きているように見える。)

図2 キンギョヘルペスウイルスに感染したキンギョ



* 細胞培養液接種区及び無処理区に対し、統計的に有意差有り ($P < 0.01$)

図3 ワクチン効果実験の結果

【今後の課題・展望】

今後は、ワクチン効果の向上および有効期間の検討等、このワクチンの実用化を視野に開発研究を進めてまいります。また、本疾病による被害は米国、台湾、オーストラリア及び英国等でも発生していることから、将来的には世界中への普及も可能です。

なお、本ウイルスの培養法とワクチンの製造法については、「コイ科ヘルペスウイルス-2 (Cyprinid herpesvirus-2: CyHV-2) 感染症用ワクチンおよびその製造方法、ならびに CyHV-2 ウイルス製造方法」として特許出願中 (特願 2013-103124) です。

また、これらの成果は 2013 年 9 月発行の水生生物の疾病に関する国際誌(Diseases of Aquatic Organisms) 及び 2013 年 11 月発行のヨーロッパ魚病学会誌(Bulletin of the European Association of Fish Pathologists)に掲載されました。

【発表論文】

タイトル : Growth of cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in cell culture and experimental infection of goldfish *Carassius auratus* (細胞培養による cyprinid herpesvirus 2 の増殖とキンギョへの実験感染)

著者 : Takafumi Ito · Jun Kurita · Akiyuki Ozaki · Motohiko Sano · Hideo Fukuda · Mitsuru Ototake

(伊東尚史、(水産総合研究センター増養殖研究所)、栗田 潤 (水産総合研究センター)、尾崎照遵 (水産総合研究センター増養殖研究所)、佐野元彦 (水産総合研究センター中央水産研究所、現職・東京海洋大学)、福田穎穂 (東京海洋大学)、乙竹 充 (水産総合研究センター増養殖研究所、現職・水産総合研究センター中央水産研究所)

掲載雑誌 : 水生生物の疾病に関する国際誌 Diseases of Aquatic Organisms, 105 巻 3 号, p. 193-202

【論文概要】

キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症（キンギョヘルペスウイルス病）は平成4年に愛知県ではじめて確認されて以来、キンギョ養殖業に多大な被害をもたらしています。さらに、本感染症による被害は日本だけでなく、世界中で生じており、これまでにキンギョでは米国やオーストラリアおよび英国などから、ギベリオブナではハンガリー、チェコおよび中国から報告されています。このように、世界的に大きな関心が集まる病原ウイルスにも関わらず、これまでその原因ウイルスである Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2)の培養細胞による安定的な継続的培養ができませんでした。この研究では、キンギョ由来の株化細胞を用いて、CyHV-2の12代以上継続して培養できる方法を世界で初めて報告しました。また、その培養ウイルスのキンギョに対する病原性を腹腔内接種法や浸漬法による感染実験により確認しました。さらに、経時的に実験感染魚を調べた結果、腎臓が本疾病の診断に適していることが分かりました。

【発表論文】

タイトル：Vaccination against cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) infection in goldfish *Carassius auratus* (キンギョの cyprinid herpesvirus 2 感染症に対するワクチン)

著者： Takafumi Ito・Mitsuru Ototake

(伊東尚史、(水産総合研究センター増養殖研究所)、乙竹 充 (水産総合研究センター増養殖研究所、現職・水産総合研究センター中央水産研究所)

掲載雑誌：ヨーロッパ魚病学会誌 *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 33 巻 5 号, p. 158-164

【論文概要】

CyHV-2の培養ウイルス液にホルマリンを0.1%濃度で添加し作製した不活化ワクチンをキンギョ(エドニシキ)へ腹腔内に注射し、その9日後に再度その不活化ワクチンを注射しました。その13日後にウイルスが含まれる水に魚を入れて感染させました。その際同様に、ワクチン無処理区及びウイルス未感染細胞培養液接種(細胞培養液接種)区にもウイルスを感染させました。その後、21日間死亡を観察した結果、無処理区及び細胞培養液接種区は100%の魚が死亡したのに対しワクチン接種区は57%の魚が生存しました。これらの死亡率を比較した結果、ワクチン接種区とワクチン無処理区の間には有意差があり、さらにワクチンの有効率は57%でした。また、ワクチン処理区については、他の試験区に比べ死亡の始まる時期も遅いことが観察されました。このように本ワクチンの有効性が証明され、養殖場におけるキンギョヘルペスウイルス病の被害軽減に有効であることが分かりました。

【用語説明】

キンギョのヘルペスウイルス性造血器壊死症^{1*}：この病気に罹ったキンギョは遊泳が緩慢になる程度で、外観上ほとんど特徴がありません。この病気に罹ったキンギョの死亡率が80%以上になることも少なくありません。ウイルス病であることから抗生物質等の薬品は効果がありません。

ギベリオブナ^{2*}：ユーラシア大陸に生息するコイ科の淡水魚で、中国では養殖し食用に供する。英名 Prussian carp、学名 *Carassius gibelio*。

魚類株化細胞^{3*}：魚類の鰭、腎臓などの器官を基に樹立された、試験管内で無制限に分裂を繰り返すようになった細胞。

継続的培養^{4*}：魚類株化細胞を用いて半永久的にウイルスを培養すること。

不活化ワクチン^{5*}：ワクチンの1種、病原体をホルマリンなどの化学処理や加温処理などにより、免疫原性を保持し病原性をなくしたもの。

ワクチンの有効率^{6*}：RPS (Relative percentage survival の略) = $(1 - (\text{ワクチン処理区の死亡率} / \text{ワクチン未処理区の死亡率})) \times 100$ の式で求められる。一般的に、魚類に対するワクチンは有効率が60%あればワクチン効果があると考えられている。