

## 環境水からの KHV 検出法に関する研究

兒玉 昂幸<sup>a</sup>・伊藤 輝昭  
(内水面研究所)

KHV が発生した河川や養鯉場での Sph 法及び TK 法による KHV 検査の簡便化を図るため、環境水からの KHV 検出法に使用可能な DNA ポリメラーゼについて検討した。既報で作成した鉄凝集法による河川水からの DNA 抽出液を用いた検討では、候補とした 5 種の DNA ポリメラーゼのうち、TAKARA の Tks Gflex DNA Polymerase と EX Premier Polymerase で、全サンプルでの DNA の増幅が確認された。また、DNA 増幅の阻害が見られた河川水からの DNA 抽出液に、KHV 罹患魚鰓から抽出した KHVDNA を 100 倍希釈で添加したサンプルを用いた試験では、Tks Gflex DNA Polymerase、EX Premier Polymerase とともに、全サンプルでの KHVDNA の増幅が確認された。以上のことから、Tks Gflex DNA Polymerase、EX Premier Polymerase のいずれかを使用することで、環境水からの Sph 法及び TK 法による KHV 検査が可能であると考えられた。

キーワード：コイ、KHV 病、Sph 法、TK 法、PCR

コイヘルペスウイルス病 (KHV 病) は 2000 年にアメリカとイスラエルで新しいウイルス病として報告されて以降、ヨーロッパやアジアなど、各国で発生が報告され、日本では 2003 年に霞ヶ浦で発生し、その後、全国に広がり、養殖及び天然水域の鯉へ多大な被害を及ぼした。

本県でも 2003 年に KHV 病が食用鯉養殖場で初認<sup>1)</sup>された後、県内に広がり、主に筑後川と遠賀川流域を中心に発生域が広がった。そのため、本県では KHV 病のまん延防止ため、内水面漁場管理委員会指示により、KHV 病既発生河川からのコイの移動や KHV 病の陰性が確認されているコイ以外の放流が禁止されている。また、養殖コイの流通に伴う県内外への KHV 病まん延防止のため、県内の養鯉業者に対し、春と秋の 2 回、KHV 病の定期検査も実施している。これらの取り組みの結果、本県では 2012 年度以降、河川や養鯉場での KHV 病による被害は発生していない<sup>2-12)</sup>。

KHV 病は持続的養殖生産確保法施行規則により特定疾病に指定されており、特定疾病については水産防疫要綱において病性鑑定指針に基づき検査をするように定められている<sup>13)</sup>。病性鑑定指針では、検査部位を鰓、腎臓及び脾臓とし、初動診断法として PCR 検査の Sph 法と LAMP 法が、最終診断法として PCR 検査の TK 法が記載されており<sup>14)</sup>、一般的には PCR 検査が行われ、本県での KHV 病の検査においても PCR 検査を実施している。

KHV 病発生水域での検査における問題点としては検査魚のサンプリングが挙げられる。河川や水路では、疾病

による斃死魚が腐敗しており、河川を泳いでいる弱った個体を採捕する必要があるが、水深等の理由から採捕困難なケースがある。また、養鯉場では、採卵用の親ニシキゴイや価値の高いニシキゴイなど、生かした状態でのサンプリングが必要な場合があるが、これらの個体を捕獲する際の水飛沫等により他水域に KHV 病が水平感染する恐れやサンプリングに伴う衰弱・斃死の危険性等がある。

マダイ養殖やウナギ養殖では、鉄凝集法にて環境水からウイルスを凝集し、検査を行う手法が開発されている<sup>15-17)</sup>。KHV 病の検査においてもこの手法が適用できればサンプリングの問題点が解決できると考えられるが、環境水に含まれるフミン酸等の PCR 阻害物質により、正しく検査が行えない可能性がある<sup>18)</sup>。

そこで、環境水からの KHV 病の PCR 検査に使用可能な DNA ポリメラーゼについて検討した。

### 方 法

#### 1. DNA ポリメラーゼ候補の探索

TAKARA の Ex Taq HS (以降、Ex Taq)、Tks Gflex DNA Polymerase (以降、Gflex)、EX Premier DNA Polymerase (以降、EX Premier)、KAPA の HiFi Hot Start PCR Kit (以降、HiFi)、2G Robust Hot Start PCR Kit (以降、2G Robust) の 5 種の DNA ポリメラーゼを候補とし、検討を行った。

<sup>a</sup>現所属：水産海洋技術センター

上記 DNA ポリメラーゼを用いて、既報<sup>19)</sup>において作成した、ウイルス DNA を鉄凝集法にて環境水より抽出済みのサンプル 45 検体 (KHV 陰性確認済み) から、ウイルス凝集確認用として添加している RSIV を対象に Kurita *et al* のプライマー<sup>20)</sup>にて PCR 検査を実施し、DNA の増幅が見られた本数から DNA ポリメラーゼ候補を選定した。

反応液の組成や増幅条件は Kurita *et al* の報告<sup>20)</sup>を基本としつつ、メーカー推奨の条件で設定し、表 1 のとおりとした。

## 2. DNA ポリメラーゼ候補での KHV 検出試験

1. において、DNA 阻害が見られた抽出液 8 本に対し、KHV 病罹患魚の鰓から抽出した DNA を 100 倍希釈となるように添加した。選定した DNA ポリメラーゼ候補を用い、上記サンプルにおいて sph 法にて PCR 検査を実施し、DNA が増幅されるかを確認した。

反応液の組成や増幅条件は、水産防疫要綱における病性鑑定指針記載の手法と同様とした。すなわち、表 1 におけるプライマーを KHV Sph I -5 F (50 μM) 0.12 μl, KHV Sph I -5 R (50 μM) 0.12 μl とし、増幅条件は、94℃・30 秒を 1 サイクル、94℃・30 秒、63℃・30 秒、72℃・30 秒を 40 サイクル、72℃・7 分を 1 サイクルで行った。

## 結 果

### 1. DNA ポリメラーゼ候補の探索

各 DNA ポリメラーゼ候補における RSIV の増幅結果について、参考例として図 1 に電気泳動図の一部を、表 2 に増幅の全結果を示す。

Ex Taq では 45 検体中 37 検体、HiFi では 45 検体中 30 検体、2G Robust では 45 検体中 37 検体で 570bp の DNA 片の増幅が確認され、Gflex, Ex Premier では全検体で DNA 片の増幅が確認された。

Ex Taq, HiFi, 2G Robust で DNA 増幅の阻害が見られたサンプルのうち、3 種とも増幅できなかったサンプルは 4 検体であり、Ex Taq, HiFi で増幅できなかったサンプルは 1 検体、HiFi, 2G Robust で増幅できなかったサンプルは 4 検体、Ex Taq, 2G Robust で増幅できなかったサンプルは 2 検体であった。その他、HiFi のみが増幅できなかったサンプルは 2 検体であった。

### 2. DNA ポリメラーゼ候補での KHV 検出試験

表 1 に示すように、1. において DNA 増幅の阻害が見られたサンプルのうち、Ex Taq, HiFi, 2G Robust の 3 種の DNA ポリメラーゼともに阻害が見られた 4 検体、

HiFi, 2G Robust で阻害が見られた 4 検体の計 8 検体に KHV 病罹患魚の鰓から抽出した DNA を 100 倍希釈となるように添加し、Gflex, Ex Premier で KHV 病の PCR 検査を行った。

結果を図 2 に示す。

Gflex, Ex Premier とともに、全サンプルで 290bp の DNA 片の増幅が確認された。

## 考 察

Gflex, Ex Premier とともに、1, 2 の試験における全検体から DNA を増幅できたことから、いずれかを使うことで、環境水を用いての KHV 病の PCR 検査が可能であると考えられた。

しかし、本県では、2012 年度以降、県内で KHV 病が発生していないため、KHV 病が発生した河川や養鯉場の環境水から実際に検出可能か検証できていない。このため、今後は KHV 病発生時に現場での検証を行っていくことが必要と考えられた。

なお、Gflex は DNA ポリメラーゼや dNTP Mix 等の試薬を必要に応じて都度混ぜるタイプの、Ex Premier は Ready mix タイプの商品である。また、2024 年 10 月時点の単価は、それぞれ、Gflex が約 180 円/回、Ex Premier が約 165 円/回のため、環境水からの PCR 検査においては、労力・コストの両面を考慮すると、Ex Premier が優れていると考えられた。

## 謝 辞

鉄凝集法についてご指導・ご鞭撻いただいた国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所の河東康彦氏に厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 高橋実, 恵崎撰, 中本崇, 吉岡武志, 福澄賢二, 佐藤博之. 魚類防疫体制推進整備事業. 平成 15 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H15\\_279-303.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H15_279-303.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 2) コイヘルペスウイルス病対策チーム. コイヘルペスウイルス病対策事業. 平成 24 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upLoad/H24\\_347-375.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upLoad/H24_347-375.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧

- 3) コイヘルペスウイルス病対策チーム. コイヘルペスウイルス病対策事業. 平成 25 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H25\\_385-413.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H25_385-413.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 4) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 平成 26 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H26\\_413-436.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H26_413-436.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 5) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 平成 27 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H27\\_373-400.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H27_373-400.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 6) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 平成 28 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H28\\_348-376.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H28_348-376.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 7) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 平成 29 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H29\\_341-367.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H29_341-367.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 8) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 平成 30 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H30\\_327-355.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/H30_327-355.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 9) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 令和元年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/R1\\_320-348.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/R1_320-348.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 10) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 令和 2 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/R2\\_308-341.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/R2_308-341.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 11) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 令和 3 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. [https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/R3\\_301-331.pdf](https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/R3_301-331.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 12) コイヘルペスウイルス病対策チーム. 内水面環境保全活動事業 (2) 魚病まん延防止対策 (コイヘルペスウイルス病). 令和 4 年度福岡県水産海洋技術センター事業報告. <https://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/jigyuu/upload/8ae00aeb7fca31d54f4bdadd6c7396a13dc06bbb.pdf>, 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 13) 農林水産省. I 水産防疫対策の基本的な考え方 2 水産防疫対策の推進方向及び関係者の果たすべき役割. 水産防疫対策要綱. [https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan\\_yobo/attach/pdf/index-26.pdf](https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/attach/pdf/index-26.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 14) 農林水産省. II 病性鑑定指針 1 魚類 (8) コイヘルペスウイルス病 (KHVD). 水産防疫対策要綱. [https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan\\_yobo/attach/pdf/index-26.pdf](https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/attach/pdf/index-26.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 15) Kawato Y, Ito T, Kamaishi T, Fujiwara A, Ototake M, Nakai T, Nakajima K. Development of red sea bream iridovirus concentration method in seawater by iron flocculation. *Aquaculture* 2016 ; 450 : 308-312.
- 16) Kawato Y, Mekata T, Inada M, Ito T. Application of Environmental DNA for Monitoring Red Sea Bream Iridovirus at a Fish Farm. *Microbiology Spectrum* 2021 ; 9(2). <https://journals.asm.org/doi/10.1128/spectrum.00796-21>, 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 17) 国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門病理部, 静岡県水産・海洋技術研究所. 1. ウイルス性血管内皮壊死症の診断方法 1.3 飼育水中のウイルス DNA の検出. ウナギのウイルス性血管内皮壊死症診断・防除マニュアル. [https://www.fra.go.jp/gijutsu/project/files/diagnostic\\_prevention\\_of\\_viral\\_endothelial\\_cell\\_necrosis.pdf](https://www.fra.go.jp/gijutsu/project/files/diagnostic_prevention_of_viral_endothelial_cell_necrosis.pdf), 2024 年 10 月 31 日閲覧
- 18) 一般社団法人環境 DNA 学会. 5. DNA の分析 5-1-2. リアルタイム PCR 実験. 環境 DNA 調査・実験マニュアル. <https://ednasociety.org/wp-content/uploads/>

2024/08/%E7%92%B0%E5%A2%83DNA%E8%AA%BF%E6%9F%B  
B%E3%83%BB%E5%AE%9F%E9%A8%93%E3%83%9E%E3%83%8B  
%E3%83%A5%E3%82%A2%E3%83%AB\_ver3\_0.pdf, 2024年  
10月31日閲覧

://www.sea-net.pref.fukuoka.jp/info/kenkyu/up  
Load/K34-2.pdf, 2024年10月31日閲覧

- 19) 兒玉昂幸, 松本昌大, 伊藤輝昭, 中本崇. KHV 病既発  
生河川におけるコイ放流再開の可能性について. 福  
岡県水産海洋技術センター研究報告第34号. <https>

- 20) Kurita J, Nakajima K, Hirono I, Aoki T. Polyme  
rase chain reaction (PCR) amplification of DN  
A of red sea bream iridovirus (RSIV). Fish Pat  
hol ; 33 : 17-23.

表1 RSIVのPCR検査における各DNAポリメラーゼ候補の反応液組成及び増幅条件

TaKaRa Ex Taq Hot Start Version				KAPA HiFi HotStart PCR Kit					
試薬名	添加量 (μL)	温度	時間	サイクル数	試薬名	添加量 (μL)	温度	時間	サイクル数
		94°C	2分	1サイクル			95°C	3分	1サイクル
10×バッファー	2	94°C	30秒	1サイクル	5×KAPA HiFi Fidelity Buffer	4	98°C	20秒	1サイクル
dNTP Mixture (2.5mM)	1.6	58°C	30秒	40サイクル	dNTP Mixture (10mM)	0.6	60°C	15秒	35サイクル
1-Fプライマー (100μM)	0.2	72°C	40秒		1-Fプライマー (100μM)	0.06	72°C	15秒	
1-Rプライマー (100μM)	0.2	72°C	2分	1サイクル	1-Rプライマー (100μM)	0.06	72°C	1分	1サイクル
TaKaRa ExTaq HS	0.1				KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase	0.4			
DW	14.9				DW	13.88			
テンプレート	1				テンプレート	1			
合計	20				合計	20			

KAPA 2G Robust HotStart PCR Kit				Tks Gflex DNA Polymerase					
試薬名	添加量 (μL)	温度	時間	サイクル数	試薬名	添加量 (μL)	温度	時間	サイクル数
		95°C	3分	1サイクル			94°C	2分	1サイクル
5×KAPA 2G Buffer B	4	95°C	15秒	1サイクル	2×Gflex PCR Buffer	10	94°C	30秒	1サイクル
dNTP Mixture (10mM)	0.4	58°C	15秒	40サイクル	1-Fプライマー (100μM)	0.06	58°C	15秒	40サイクル
1-Fプライマー (100μM)	0.1	72°C	15秒		1-Rプライマー (100μM)	0.06	68°C	40秒	
1-Rプライマー (100μM)	0.1	72°C	1分	1サイクル	Tks Gflex DNA Polymerase HS	0.4	68°C	2分	1サイクル
KAPA 2G Robust HotStart DNA Polymerase	0.08				DW	8.48			
DW	14.32				テンプレート	1			
テンプレート	1				合計	20			
合計	20								

TAKARA Ex Premier DNA Polymerase				
試薬名	添加量 (μL)	温度	時間	サイクル数
		94°C	2分	1サイクル
2×Polymerase Mixture	10	94°C	30秒	1サイクル
1-Fプライマー (100μM)	0.06	58°C	15秒	40サイクル
1-Rプライマー (100μM)	0.06	68°C	40秒	
DW	8.88	68°C	2分	1サイクル
テンプレート	1			
合計	20			

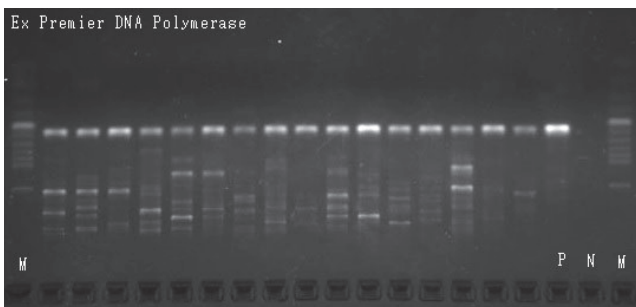


図1 サンプルNO.17~32における電気泳動図 (左 : Ex Premier DNA Polymerase, 右 : 2G Robust Hot Start PCR Kit)  
M:100bp DNA Ladder P:Positive Control N:Negative Control

表2 既報で作成したサンプルにおけるRSIVのPCR検査結果

サンプルNO.	DNAポリメラーゼ						KHV検出試験での 使用の有無
	Ex Taq HS	2G Robust Hot Start PCR Kit	HiFi Hot Start PCR Kit	Tks Gflex DNA Polymerase	Ex Premier DNA Polymerase		
1	○	○	○	○	○		
2	○	○	○	○	○		
3	○	○	○	○	○		
4	○	○	○	○	○		
5	○	○	×	○	○		
6	○	○	○	○	○		
7	○	○	○	○	○		
8	○	○	○	○	○		
9	○	○	○	○	○		
10	○	○	○	○	○		
11	○	○	○	○	○		
12	○	○	○	○	○		
13	×	×	○	○	○		
14	×	×	○	○	○		
15	○	○	○	○	○		
16	×	○	×	○	○		
17	×	×	×	○	○	使用	
18	○	×	×	○	○	使用	
19	○	×	×	○	○	使用	
20	○	○	×	○	○		
21	○	×	×	○	○	使用	
22	○	○	×	○	○		
23	○	×	×	○	○	使用	
24	○	○	○	○	○		
25	×	×	×	○	○	使用	
26	○	○	×	○	○		
27	○	○	○	○	○		
28	×	×	×	○	○	使用	
29	×	○	○	○	○		
30	○	○	×	○	○		
31	○	○	○	○	○		
32	×	×	×	○	○	使用	

※ ○：陽性 ×：陰性

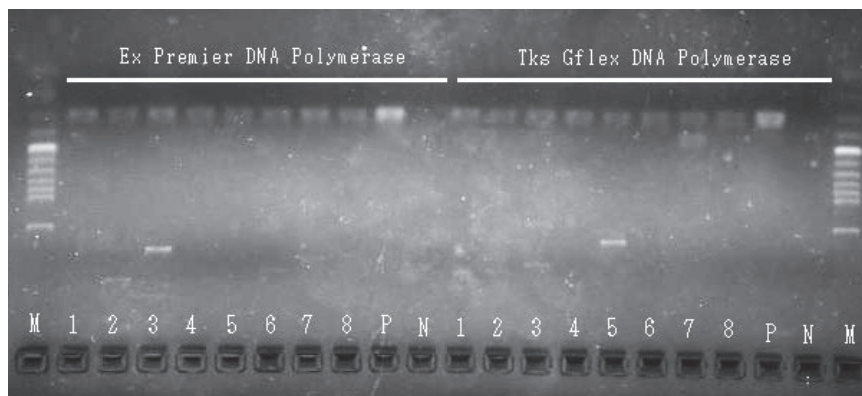


図2 添加したKHVに対するPCR結果

M:100bp DNA Ladder P:Positive Control N:Negative Control 1~8: サンプルNO