

博士(水産科学) 吉田夏子

学位論文題名

環境水中におけるコイヘルペスウイルス(KHV)の
生存性および抗 KHV 物質產生細菌を用いた
魚類飼育排水の浄化に関する研究

学位論文内容の要旨

コイヘルペスウイルス (koi herpesvirus: KHV) 病は、コイ *Cyprinus carpio* の稚魚から成魚にまで大量死をもたらすウイルス感染症である。日本では 2003 年に茨城県霞ヶ浦の養殖コイにおいて本病が初めて発生し、霞ヶ浦におけるコイ養殖は壊滅的な打撃を受けた。一般に、感染症による大きな被害が生じるのは孵化場、種苗生産施設あるいは養殖場であることが多いが、KHV 病は養殖魚のみならず天然魚にも猛威をふるい、甚大な被害をもたらした。KHV 病は現在わが国において持続的養殖生産確保法の特定疾病に指定され、国内防疫を目的とした蔓延防止措置が取られている。しかしながらこれは KHV 病発生後もしくは発生が疑われた場合においてのみ、KHV を含む可能性のある飼育水の流出を規制するに過ぎず、病気の発生に備え、自然環境への KHV の流出を防ぐ取り組みは未だ検討されていない。KHV 病が養殖環境のみならず自然環境まで拡大していった背景として、養殖場からの排水を通してウイルスがコイ生息環境中に流出したことが疑われ、魚類飼育排水中のウイルスを不活化することは本病の拡大を防ぐ上で重要な手段になり得るものと考える。一般に淡水中の病原体の感染性を失わせる方法として紫外線やオゾンによる殺菌法が知られているが、いずれもコストの面から飼育排水への応用は困難とされ、新たな KHV 病の防除法の確立が重要な課題と言える。そこで本研究では、河川水および湖水中における KHV の生存性に着目し、新たな KHV の防除法について検討を行い、抗 KHV 物質產生細菌を用いた魚類飼育排水処理モデルを作製し、そのウイルス不活化能力について検討した。

第 1 章では、環境水中における KHV の生存性について培養細胞およびコイを用いて検討した。培養細胞を用いた検討の結果、KHV は未処理の環境水中において不安定で、1~3 日で不活化し、検出限界以下となったのに対し、濾過除菌処理および高圧滅菌処理を施した環境水中では KHV は

比較的安定であることが示された。またコイを用いた検討において、KHV 添加直後の環境水を用いて浸漬攻撃を行った区では KHV 病が発生したのに対し、KHV 添加後 3 日間保持した環境水を用いて浸漬攻撃を行った区では病気は発生せず、死亡は見られなかった。以上の結果から、KHV は環境水中において 1~3 日で感染性を失い、この現象には環境水中に存在している微生物が関与していることが示唆された。KHV が環境水中において 1~3 日で不活化する現象を捉えたことは KHV 病の防除対策を進める上で大きな前進であり、環境水中でのウイルスの挙動を考慮に入れた防除対策の構築が期待される。すなわち、KHV 病が発生した場合、その池からコイを全て取り除き 3 日以上放置した後に、KHV に感染履歴のないコイや、親魚選別および卵消毒により作出された KHV フリーの稚ゴイを新たに導入することで、その池を KHV フリーにすることが可能と考える。この手法は、有機物により影響を受けることはなく、また消毒薬の使用時に懸念される自然環境への負荷もなく、消毒薬の使用が困難な池などにおける防除対策として有効であると考える。

次いで第 2 章では第 1 章で用いた五稜郭公園の堀の水から抗 KHV 物質産生細菌の探索を行い、五稜郭公園の堀の水由来細菌 132 株から 2 株の抗 KHV 物質産生細菌を見出した。また、コイの腸内容物由来細菌 374 株中 19 株およびコイ飼育水由来細菌 207 株中 5 株においても抗 KHV 活性が見られた。これらの結果から、前章において示された、五稜郭公園の堀の水中で KHV が速やかに不活化された現象の裏付けが得られたものと考える。また、これらの抗 KHV 物質産生細菌が本研究の目的とする魚類飼育排水中のウイルスの不活化に有効活用できるのではないかと考えた。

そこで第 3 章では、抗 KHV 物質産生細菌を有効活用したカラム式の魚類飼育排水処理モデルを実験室レベルで作製し、そのウイルス不活化能力について検討した。抗ウイルス物質産生細菌を固定化するためのろ材として、現在水産廃棄物として問題となっているヒトデの骨片を有効活用したろ材に着目した。ヒトデの骨片は多孔質の構造をとることが知られており、細菌付着性のろ材として応用出来ると考えた。ヒトデ骨片ろ材の細菌付着性について検討した結果、 10^9 CFU/g 程度の細菌が付着し、市販のろ材と同程度の能力を有していることが明らかになった。またヒトデ骨片ろ材は、モデルを 8 日間連続的に運転した後も 10^8 CFU/g 程度の抗 KHV 物質産生細菌を保持していた。

次いで、抗 KHV 物質産生細菌を用いた試験区モデルと、細菌を用いていない対照区モデルを作製し、これらのモデルのウイルス不活化能力について 2 つの条件下で検討した。設定条件 2 の対照区では KHV 病による死亡が発生し、累積死亡率は 80% に及んだのに対し、試験区では死亡を抑制することができ、KHV がカラム中の抗 KHV 物質産生細菌によって不活化されることが示された。しかしながら、設定条件 1 の試験区では対照区と比較し、供試魚の死亡率の低下が見られたものの

死亡を完全に防ぐことはできず、このような条件下では KHV が十分に不活化されない可能性が考えられた。そのため、本モデルの運転条件の詳細については検討を重ねる必要があるが、本研究において見出された抗 KHV 物質產生細菌ならびに本研究において作製した魚類飼育排水処理モデルは、ウイルスの不活化に有効であると考える。現在、ニシキゴイの養殖場では水質浄化を目的としたろ過装置が設置されており、本モデルをスケールアップし実際に養殖場に導入する際には、既設のろ過装置を応用できるのではないかと考える。本研究では無菌条件下でモデルを運転し、単一の抗 KHV 物質產生細菌によるウイルス不活化効果を検討しているため、養殖場のろ過装置に抗 KHV 物質產生細菌を導入した際の、他の細菌との競合やその時のウイルス不活化能力などについて検討する必要があると考える。

以上、本研究では環境水中における KHV の生存性を明らかにし、抗 KHV 物質產生細菌を用いた魚類飼育排水処理モデルを作製してその有用性を示した。本研究で確立した、抗 KHV 物質產生細菌を応用した魚類飼育排水処理モデルには、運転条件の詳細設定やスケールアップ後の検討など解消しなければならない課題も残されているが、効果的な魚類飼育排水中のウイルス不活化法が限られる中、抗 KHV 物質產生細菌は新たなウイルス病の防除対策として有効な手段となり得るものと考える。今後、コイのように天然水域にも広く生息する魚種の増養殖において、魚類飼育排水中のウイルスの不活化の重要性が広く認識され、本研究において確立した手法が既知の魚類感染症の防除・防疫対策と共に KHV 病の防除につながることを確信する。

学位論文審査の要旨

主査 教授 吉水 守
副査 教授 都木 靖彰
副査 教授 澤辺智雄
副査 助教 笠井久会

学位論文題名

環境水中におけるコイヘルペスウイルス(KHV)の生存性および抗 KHV 物質產生細菌を用いた魚類飼育排水の浄化に関する研究

コイヘルペスウイルス (koi herpesvirus: KHV) 病は、コイ *Cyprinus carpio* の稚魚から成魚にまで大量死をもたらすウイルス感染症である。本病は 1998 年にアメリカ合衆国およびイスラエルで観賞用のニシキゴイに初めて発生し、以降、ヨーロッパや東南アジアを中心にまたたく間に世界中に伝播し、各地に甚大な産業被害をもたらした。日本では 2003 年に茨城県霞ヶ浦の養殖コイにおいて本病が初めて発生し、霞ヶ浦におけるコイ養殖は壊滅的な打撃を受けた。一般に、感染症により大きな被害が生じるのは孵化場、種苗生産施設あるいは養殖場であることが多いが、KHV 病は養殖魚のみならず天然魚にも猛威をふるい、甚大な被害をもたらした。この背景として、養殖場からの排水を通してウイルスがコイ生息環境中に流出したことが疑われており、魚類飼育排水中のウイルスを不活化することは本病の拡大を防ぐ上で重要な手段になり得るものと考えられる。しかし、現在のところ、KHV 病の発生が疑われた場合においてのみ、ウイルスが含まれている可能性のある飼育水を環境中に排出しないようにする指導が全国のコイ養殖場およびコイ飼育者に対して行われているに過ぎなく、病気が発生した際に備え、周辺水域への KHV の流出を防ぐような取り組みはなされていない。一般に淡水中の病原体の感染性を失わせる方法として、紫外線やオゾンによる殺菌法が知られているが、いずれもコストの面から飼育排水への応用は困難とされ、新たな KHV 病の防除法の確立が重要な課題と言える。

本研究では、河川水および湖水中における KHV の生存性に着目し、KHV の不活化に細菌が関与

していたことから、これら細菌の KHV 防除への応用について検討を行い、抗 KHV 物質產生細菌を用いた魚類飼育排水処理モデルを作製し、そのウイルス不活化能力について検討した。本研究の審査要旨は以下の通りである。

1. 培養細胞を評価系として用い、KHV が未処理の環境水中において不安定で、1~3 日で検出限界以下となるのに対し、濾過除菌処理および高圧滅菌処理した環境水中では比較的安定であることを示した。また、コイを評価系として用いた場合でも、KHV 添加直後の環境水に暴露したコイには KHV 病が発生するのに対し、KHV 添加後 3 日間保持した環境水に暴露したコイには病気は発生しないことを示した。以上から、KHV は環境水中において 1~3 日で感染性を失い、これに環境水中に存在している微生物、中でも細菌が大きく関与することを明らかにした。また、この結果を考慮に入れた防除対策として、汚染地域と非汚染地域のゾーニングを行い、上流からの浄化法を提言した。
2. 供試細菌の菌体外産生物質、即ち、培養ろ過液を対象としたスクリーニングを行い、自然環境水由来細菌 132 株から 2 株、コイの腸内容物由来細菌 374 株から 19 株およびコイ飼育水由来細菌 207 株から 5 株の抗 KHV 物質產生細菌を見出した。さらに、供試細菌について属レベルの同定を行い、抗 KHV 物質產生細菌は淡水魚の腸内および河川・湖沼の主要な細菌叢を構成することが知られている *Aeromonas* 属および *Pseudomonas* 属の細菌から多く見出され、魚類生息環境水中や腸内に広く存在する可能性があることを示した。
3. 抗 KHV 物質產生細菌を用いたカラム式の魚類飼育排水処理モデルを作製した。細菌を固定化するための細菌付着用ろ材として、現在水産廃棄物として問題となっているヒトデの骨片に着目し、ヒトデ骨片が市販の細菌付着用ろ材と同程度の性能を有し、モデル中においても細菌をよく保持することから、モデルへ応用できることを示した。さらに、抗 KHV 物質產生細菌を用いた試験区モデルと、細菌を用いていない対照区モデルを作製し、これらのモデルのウイルス不活化能力について検討を行い、コイを用いた評価系において試験区モデルに発症・死亡が認められなかったことから、カラム式の魚類飼育排水処理モデルにより KHV を不活化することができた。養鯉場の飼育水浄化装置や排水処理装置に、抗 KHV 物質產生細菌を導入した際の、他の細菌との競合やウイルス不活化能力などについて検討する必要があるものの、抗 KHV 物質產生細菌が飼育排水中の KHV の不活化に応用できることを示した。

以上、本研究の成果は、環境水中の KHV の生存性を明らかにし、効果的な手法が限られている魚類飼育排水中のウイルスの不活化に、抗ウイルス活性を有する細菌の利用が可能であることを示

したものであり、本法は環境に優しい水処理方法としてその応用が期待される。これらの成果は水産科学に寄与するところ大と考え、審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。