

コイ春ウイルス血症

SVC : Spring Viremia of Carp

1. 疫学

(1) 病名と病原体

- ① 病名：コイ春ウイルス血症
英名：Spring Viremia of Carp (SVC)
- ② 病原体：ラブドウイルス科に属する SVC ウイルス。
Rhabdovirus carpio と命名されている。

(2) 地理的分布

イタリア、オーストリア、オランダ、チェコ、ドイツ、ハンガリー、フランス、ブルガリア、ポーランド、ボスニアヘルツェゴビナ、クロアチア、ルーマニア、セルビアモンテネグロ、スロバキア、スペイン、英国、旧ソ連邦、アメリカ合衆国

(3) 宿主域

- ① 自然発病魚：コイ (*Cyprinus carpio*)、ハクレン (*Hypophthalmichthys molitorix*)、ソウギョ (*Ctenopharyngodon idella*)、コクレン (*Aristichthys nobilis*)、フナ (*Carassius carassius*)、キンギョ (*C. auratus*)、ヨーロッパナマス (*Silurus glanis*)、テンチ (*Tinca tinca*)
- ② 実験感染魚：コイ、グッピー (*Lebistes (=Poecilia) reticulata*)、ソウギョ、パイク (*Esox lucius*)

(4) 発生の特徴

本疾病はその病名が示すように、一般に春先の水温上昇期によくみられる。水温が7℃を越えると発生し、10~15℃で最も被害が大きい。17℃を越えると外観症状が明瞭でなくなることもあるが、死亡はみられる。23℃を越えると死亡はみられなくなるが、ウイルスは魚体内で生存している。このような感染耐過魚がウイルスキャリアーとなり、外観症状を示すことなくウイルスを排出する。結果としてこれらが次なる感染源となり、本ウイルスに感受性を有する魚種に伝播する。本疾病は発生初期および終期またはコイ以外の魚種では外観症状が明瞭でない場合があるので注意を要する。

(5) 外観症状

罹病魚には、腹部膨満 (写真 1)、鰓および体表の点状出血 (写真 2)、眼球突出 (写真 2)、粘液便、体色暗化、鰓の褪色などがみられる。

(6) 剖検所見

罹病魚には内臓器 (肝臓、腎臓、腸管、心臓) および腹膜や腹部脂肪組織の点状出血 (写真 3)、鰓の点状出血 (写真 3)、脾腫、体側筋の点状出血 (写真 4)、腹水 (透明または出血性) の貯留、浮腫などが主にみられる。

(7) 消毒

- ① 網などの採捕用具、輸送用のコンテナやバケツ、長靴その他魚および飼育水と接触する可能性のあるものの消毒には、250ppm のヨード剤の 15~30 分間の浸漬処理が有効である。
- ② 特に汚れがひどいものは 1% 水酸化ナトリウムが有効 (pH11 以上で使用) である。

(8) 防除法

- ① 化学療法は無効である。
- ② 発病群の移動、感染耐過群の親魚としての飼育は疾病蔓延のおそれがあるので行わない。
- ③ 発病池の消毒を行う。
- ④ 細菌等の 2 次感染を薬剤で抑止することは有効である。



写真1 SVCに罹病したコイの外観症状。体色の暗化、眼球突出、腹水貯留による腹部の膨満がみられる。



写真2 SVCに罹病したコイの外観症状。腹部膨満、眼球突出、体表の点状出血が見られる。



写真3 SVCに罹病したコイ。浮腫、鰓の褪色、脾腫、内臓・鰾および脂肪組織の点状出血がみられる。



写真4 SVCに罹病したコイ。体側筋に点状出血が観察される。

2. 診断手順

(1) 試料採取法

① 被検魚の収集

- (a) 少なくとも10尾の瀕死魚または当該疾病の外観症状を示す生存魚を採取する。
- (b) 被検魚の収集から採材までにはできるだけ速やかに行うことが望ましく、できれば発生現場で臓器試料を摘出する。
- (c) やむを得ず被検魚を検査機関まで輸送する場合は、生きたままビニール袋などに入れて酸素パッキングし、水温変動に注意して搬送するか、検査対象魚を発生現場で即殺後、個体ごとに別々に無菌の密閉可能な容器に収容して検査機関まで搬送する。
- (d) 被検魚として死魚しか入手できない場合は、なるべく新鮮なものを採取し、個体ごとにビニール袋などで密閉包装し、氷冷または冷蔵状態で搬送する。搬送の際、被検魚が凍結することのないように注意する。
- (e) 臓器試料または被検魚には採取場所および日時を明記したラベルを添付する。

② 外観症状および剖検所見の記載

- (a) 0.5%MS222 (Tricaine : 3-aminobenzoic acid ethyl ester methanesulfonate) などの麻酔剤で麻酔するか、または大型魚では撲殺する。
- (b) 外観症状を記載する (1-(5) 外観症状の項参照)。
- (c) 魚体表面を70%アルコール綿またはアルコール噴霧器で消毒し、滅菌したハサミやピンセット

トなどで解剖する（被検魚の採取から 48 時間以内に行う）。

(d) 内臓の異常を調べ、剖検所見を記載の上、検査に必要な部位を採取する（1-(6) 剖検所見の項参照）。

③ウイルス検査のための臓器試料の採材

(a) 魚体サイズによる採材部位

仔魚および卵黄嚢を有する魚

魚全体を試料とする。体表を消毒後、卵黄嚢がある場合は除去する。

全長 4~6cm の魚

腎臓を含む内臓全体および脳を試料とする。

全長 6cm 以上の魚

腎臓、脾臓および脳を試料とする。

(b) 臓器試料の採取

臓器試料は被検魚から滅菌したハサミ、ピンセットなどで採取する。

病魚から試料を採取し、前腎、脾臓および脳を混合して各最大 5 尾分を 1 検体としてプールする。採材量は 1 検体分で約 1.0g 以内とする。

臓器試料は計量の後、予め輸送液* 19mL を入れた滅菌した 15mL チューブに入れる。

* 1 輸送液：抗生物質添加イーグル最少必須培地（MEM）。抗生物質はゲンタマイシン 1000 $\mu\text{g/mL}$ またはペニシリン 800IU/mL とジヒドロストレプトマイシン 800 $\mu\text{g/mL}$ の併用が適当。合成抗真菌剤のマイコスタチンまたはファンギゾン 400IU/mL を加えてもよい。輸送時間が 12 時間を越えるようなら、ウイルスを安定化するために血清か卵白を 5~10% 加えてもよい。

(c) 試料の輸送

臓器試料の入った容器は互いに接触しないように個々にビニール袋で包装し、検査機関まで 0~4℃ に保ちながら搬送する。その際に試料が凍結しないよう注意する。

臓器試料のウイルス検査は、採取後できるだけ速やかに行う。やむを得ず遅くなる場合でも 48 時間以内に行う。

魚体ごと検査機関まで搬送した場合は、到着後直ちに (b) からの作業を行う。

(d) 検査試料の処理

検査試料および器具などは病原体による汚染・伝播を防止するために以下の処置を施す必要がある。被検魚、臓器試料の残りは焼却処分、輸送用コンテナおよび水は次亜塩素酸ソーダなどで消毒する。解剖器具、微生物培養用器具は再使用や廃棄の前にオートクレーブによって滅菌する。

(2) ウイルス検査のためのサンプル調製

① 臓器試料のホモジナイズ

(a) 操作は氷冷下（0~4℃）で行うことが望ましい。

(b) 臓器試料が予め抗生物質処理されていない場合は、試料を抗生物質を添加した培地に再懸濁し、15℃、2~4 時間、または 4℃で一晩放置する。

(c) 試料容器を傾けて抗生物質添加培地を捨てる。

(d) プールされた臓器を乳鉢または電気ミキサーでホモジナイズして、ペースト状にし、これを輸送液に懸濁して最終的には 1:10 のホモジネート液とする。

(e) 試料の採取から 48 時間以内に細胞に接種できない場合は、臓器試料はそのまま -80℃ に凍結保存し、後日ウイルス検査を行う。

② 接種試料の調製

- (a) 希釈ホモジネート液を冷却遠心機で 4℃、2,000g、15 分間遠心分離し、上清を回収する。
- (b) 上清は注射器等を用いてウイルス分離用培地で 10 倍に希釈し、0.45 μm フィルターでろ過もしくは抗生物質処理を行い、接種試料とする（採取組織の 1/100 濃度となる）。

(3) ウイルス検査

① 培養細胞への接種

- (a) 予め EPC 細胞^{*2}を 24 ウェル細胞培養プレート（ファルコン、ヌンク、コースター社製のいずれでも可）に 20℃で培養しておく（希釈したホモジネート液を接種する細胞は、分散後 24 時間程度経過したものをを用いる）。

* 2 EPC 細胞：*Epithelioma papulosum cyprini*

- (b) 予めすべてのウェルの培養液を除去し、24 ウェル細胞培養プレートの陰性コントロール用ウェルに 1mL、1000 倍希釈用ウェルに 0.9mL の細胞培養液を加える（図 1）。
- (c) 1000 倍希釈用ウェルには接種試料を 0.1mL 加え、100 倍希釈用ウェルには 1mL の接種試料を加える。

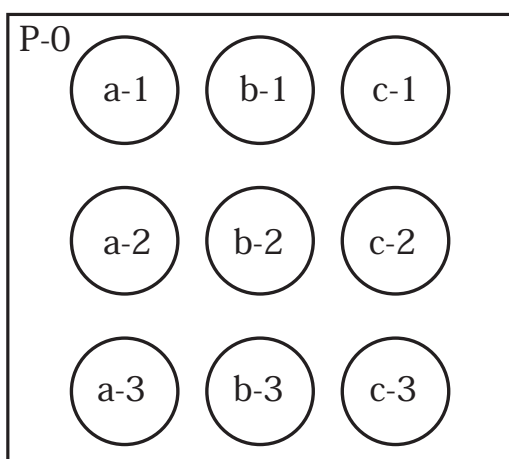


図 1 培養細胞への接種
15 尾サンプルの場合 (1 ウェルあたり 5 尾分)
a-1 ~ a-3 : 陰性対照 (細胞培養液のみ 1mL)
b-1 ~ b-3 : 100 倍希釈液 (試料 1mL)
c-1 ~ c-3 : 1000 倍希釈液 (試料 0.1mL + 細胞培養液 0.9mL)

② 培養および観察

- (a) 試料を接種した培養細胞は 20℃で 7 日間培養し、毎日顕微鏡観察（位相差倒立顕微鏡、対物レンズ倍率× 40 または× 20）することにより、陰性対照と試料接種培養細胞における細胞の形態変化を観察する。
- (b) 試料接種した培養細胞に細胞変性効果 (CPE)^{*3}が現れたら、(3) ウイルスの同定の手順に従ってウイルスの同定に着手する。

* 3 細胞変性効果 (CPE : Cytopathic effect) : EPC 細胞における SVCV の CPE は、細胞の球形化を伴う変性像が観察され、次第に培養容器から剥離する。個々の細胞では、核の染色質が粒状化し、核膜の肥厚または崩壊が認められる。

- (c) 7 日後においても CPE が発現しなければ、さらに新たな培養細胞に試料を継代して培養を行わなければならない。

③ 継代培養

- (a) 新たに 24 ウェル細胞培養プレートに EPC 細胞を用意する。
- (b) 予めすべてのウェルの培養液を除去し、陰性コントロール用に 1mL、10 倍希釈用および 100 倍希釈用にそれぞれ 0.9mL 細胞培養液を入れておく（図 2）。
- (c) 初代の培養プレートの 100 倍希釈ウェルおよび 1000 倍希釈ウェルからそれぞれ 50 μL 取り、2 代目のプレートの 10 倍希釈用ウェルに入れる（その際滅菌したブラック付きピペット

- チップで、ウェルの底を掻き取り培養細胞とともに培養液を採取する)。
- (d) 100 倍希釈用ウェルには 10 倍希釈用ウェルから 100 μ L 取り、接種する (その際 10 倍希釈用ウェルは静かに撹拌してから行う)。
- (e) 参考のため初代の培養用プレートは -20 $^{\circ}$ C に保存する。
- (f) 継代したプレートを 20 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し、毎日 CPE の出現の有無を観察する。CPE が観察されるか、疑わしいものは (4) ウイルスの同定に進む。
- (g) CPE が認められなければ陰性と判定する。

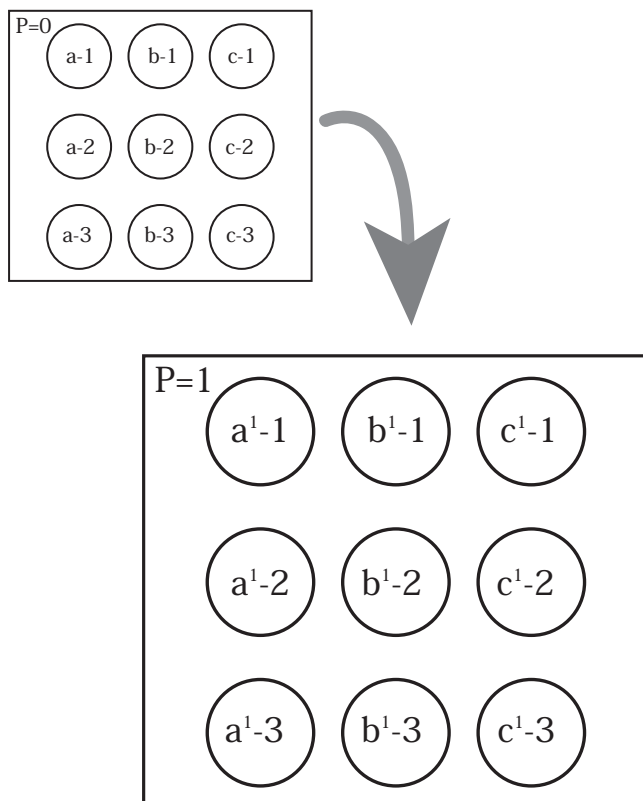


図2 継代培養

a¹-1 ~ a¹-3 : 陰性対照 (細胞培養液のみ 1mL)

b¹-1 ~ b¹-3 : 50 μ L (P0 の 100 倍希釈液) + 50 μ L (P-0 の 1000 倍希釈液) + 細胞培養液 0.9mL

c¹-1 ~ c¹-3 : b¹ 列の各ウェルから 100 μ L + 細胞培養液 0.9mL

(4) 間接蛍光抗体法によるウイルスの同定

- (a) 3-(3) ウイルス検査で CPE が発現または疑わしいものについて本法を行う。
- (b) 予め滅菌した丸型カバーガラスを 24 ウェル細胞培養プレートに入れ、EPC 細胞を接種し、20 $^{\circ}$ C で培養しておく。
- (c) EPC 細胞が増殖していることを確認したうえで各ウェルの培養液を除去し、陰性コントロール用に 1mL、検査用ウェルの 10 倍希釈用および 100 倍希釈用にそれぞれ 0.9mL 細胞培養液を入れておく。
- (d) 初代目または 2 代目の培養プレート (継代培養したもの) の 100 倍希釈ウェルおよび 1000 倍希釈ウェルからそれぞれ 50 μ L 取り、新たなプレートの 10 倍希釈用ウェルに入れる (その際、滅菌したブラック付きピペットチップでウェルの底を掻き取り培養液を採取する)。
- (e) 100 倍希釈用ウェルには 10 倍希釈用ウェルから 100 μ L 取り、接種する (その際 10 倍希釈用ウェルを静かに撹拌してから行う)。
- (f) 参考のため古い培養用プレートは -20 $^{\circ}$ C に保存する。
- (g) 新たなプレートを 20 $^{\circ}$ C で培養し、7 日間毎日 CPE の発現の有無を観察する。
- (h) 試料を接種したウェルおよび陰性対照のウェルの細胞培養液を除去する。

- (i) 0.01M リン酸緩衝塩類溶液 (PBS、pH7.2) で 1 回洗浄する。
 - (j) 洗浄液を除去したのち、冷アセトン-エタノール固定液 (30% アセトン、70% エタノール、-20℃ 保存) で 3 回洗浄する。
 - (k) 冷アセトン-エタノール固定液を各ウェル当たり 0.5mL 入れ、15 分間固定する。
 - (l) 固定後カバーガラスをウェルから取り出し、30 分間室温で風乾する (直ちに次の操作に移らない場合は、風乾したカバーガラスは -20℃ に保存する)。
 - (m) SVCV に対する特異抗体 (1 次抗体: 抗 SVCV ウサギ血清、配布品) を Tween80 を 0.05% 含む PBS (PBS-Tween) で希釈する。
 - (n) 試験するカバーガラスを再度新たなプレートに入れ、PBS-Tween で 4 回洗浄し、固定乾燥したカバーガラスを湿らせる。
 - (o) 余分な水分を除去後、固定試料を湿潤箱内で 1 次抗体 ($250 \mu\text{L}/2\text{cm}^2 \cdot \text{ウェル}$) と 37℃ で 1 時間反応させる。この際カバーガラスが乾燥しないよう注意する。
 - (p) PBS-Tween で 4 回洗浄する。
 - (q) FITC 抗ウサギ Ig 山羊血清 (2 次抗体: 市販品) を PBS-Tween で希釈する。
 - (r) 余分な水分を除去後、2 次抗体と湿潤箱内で 37℃ で 1 時間反応させる。この際カバーガラスが乾燥しないよう注意する。
 - (s) ウェルからカバーガラスを取り出し、無蛍光スライドガラスにグリセリン塩類溶液 (pH8.5) を滴下し、細胞面を傷つけないよう注意して細胞面を下にして封入する。
 - (t) 蛍光顕微鏡で観察し、予め陽性および陰性対照の反応を確認した上で、緑色蛍光が観察されれば陽性と判定する。
- * 本法で使用した廃液は、2% 次亜塩素酸ナトリウムにより消毒する。

(5) RT-PCR 検査 (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法)

- ① RNA の抽出 (市販の RNA 抽出キットを使用、以下 TRIzol[®] (インビトロジェン株式会社) の使用例)
 - (a) 培養細胞の細胞変性効果 (CPE) が完全に出現した組織培養液を遠沈管に回収し、4℃ で 3,000rpm・5 分間、遠心分離する。
 - (b) 遠心上清 250 μL に TRIzol 750 μL を加えて十分攪拌し、室温で 5 分間放置する。
 - (c) これにクロロフォルム 200 μL を加え 15 秒間激しく攪拌した後、室温で 5 分間放置し、4℃ で 12,000g・10 分間、遠心分離する。
 - (d) 透明上清 (水相) を別のチューブに移し、500 μL の 2-プロパノールを入れて軽く混合し、10 分間放置後 4℃ で 12,000g・10 分間、遠心分離する。
 - (e) 上清を吸い取り除去した後、75% エタノール 1,000 μL を入れて軽く攪拌し、4℃ で 7,500g・5 分間、遠心後、上清を除去して乾燥させる。
 - (f) 乾燥後 dDW (DNase・RNase free) 100 μL を加えてよく溶かす。

* RNA は分解されやすいので、溶解後は速やかに水冷する。保存する場合は、-80℃ で行う。

** ウイルスに汚染した器具等は滅菌缶に入れオートクレーブ処理する。
- ② RT-PCR (市販の RT-PCR キットを使用)
 - (a) インビトロジェン社の RT-PCR キット SuperScript[™] One-Step RT-PCR with Platinum[®] Taq および以下に示す合成したプライマー F1 および R2 を使用する。

診断用プライマーの配列

| プライマー名 | 配 列 |
|---------|---|
| SVCV F1 | 5' -TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR* R*TC-3' |
| SVCV R2 | 5' -AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATH* ACN* CAY*-3' |

ストック液は 10pmol/μL に調製

* R: A または G、H: A または C または T、N: A または C または G または T、Y: C または T

- (b) 以下に示した組成でチューブに 46 μL ずつ RT-PCR 反応液を調製し、①の RNA 抽出液 4 μL を反応液に添加する。

RT-PCR 反応液の調製

| 試 薬 | (1 検体分) |
|-----------------------------------|---------|
| 2 × Reaction Mix (キット) | 25 μL |
| dDW (滅菌超純水) | 10 μL |
| SVCV F1 primer (10pmol/μL) | 5 μL |
| SVCV R2 primer (10pmol/μL) | 5 μL |
| RT Platinum® <i>Taq</i> Mix (キット) | 1 μL |
| 合 計 | 46 μL |

- (c) 逆転写反応として 50°C で 30 分間反応後、94°C で 2 分間の処理を行い、次いで PCR 反応として 94°C で 30 秒、55°C で 30 秒、72°C で 60 秒を 35 サイクル、最後に 72°C で 7 分間後、4°C で保存する。
- (d) 1.0% のアガロースゲルによる電気泳動で 714bp のサイズの RT-PCR 増幅産物が確認されたものを陽性と判定する。
- ③ 2nd (Semi-Nested) PCR 検査
- (a) RT-PCR で陽性バンドが得られなかった時にのみ実施する。
- (b) 2nd-PCR に使用するプライマーの配列は以下の通りである。

2nd-PCR 用プライマーの配列

| プライマー名 | 配 列 |
|---------|---|
| SVCV F1 | 5' -TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR* R*TC-3' |
| SVCV R4 | 5' -CTG GGG TTT CCN* CCT CAA AGY* TGY*-3' |

ストック液は 10pmol/μL に調製

* R: A または G、H: A または C または T、N: A または C または G または T、Y: C または T

- (c) 2nd-PCR 反応液は Takara EX *Taq* HS を用いて所定の PCR 反応液を調製する。

2nd-PCR 反応液の調製

| 試 薬 | (1 検体分) |
|----------------------------|----------|
| 10x EX <i>Taq</i> buffer | 5.0 μL |
| 2.5mM dNTP mixture | 4.0 μL |
| dDW (滅菌超純水) | 28.25 μL |
| SVCV F1 primer (10pmol/μL) | 5.0 μL |
| SVCV R4 primer (10pmol/μL) | 5.0 μL |
| Takara EX <i>Taq</i> HS | 0.25 μL |
| 合 計 | 47.5 μL |

- (d) PCR 反応液 47.5 μ L を分注し、サンプル (RT-PCR の増幅産物) 2.5 μ L を PCR チューブに加える。
- (e) サーマルサイクラーが 94°C に達したところでポーズして止め、チューブをセットして再スタートさせる。
- (f) PCR 反応として 94°C で 30 秒間、55°C で 30 秒間、72°C で 60 秒間を 30 サイクル、最後に 72°C で 7 分間後 4°C で保存する。
- (g) RT-PCR と同様の電気泳動により 606bp の増幅産物が得られたものを陽性と判定する。

3. 参考文献

- Ahne, W 1985a: *Argulus folioaceus* L. and *Philometra gometra* L. as mechanical vectors of spring viraemia of carp virus (SVC) . J. Fish Dis, 8, 241-212.
- Ahne, W. (1985b) : Viral infection cycle in pike (*Esox lucius*) L. Z. Angew. Ichthyol.,1,90-95.
- Faisal, M. and W. Ahne (1984): Spring viraemia of carp virus SVC: Comparison of immunoperoxidase, fluorescent antibody and cell culture isolation techniques for detection of antigen., J. Fish Dis. 7 ,57-64.
- Fijan, N., Z. Peterinec, D. Sulimanovic and L. O. Zwillenberg (1971): Isolation of the viral causative agent from the the acute form of infectious dropsy of carp. Vet. Arch. Zagreb,41 56,125-138.
- Fijan, N. (1972): Infectious dropsy in carp -a disease complex. "In Diseases of fish", Mawdesley-Thomas,ed.Symposia of the Zoological Society of London. Academic Press, London, 39-51.
- Fijan, N., D. Sulimanovic, M. Bearzotti, D. Muzinic, L. O. Zwillenberg, S. Chilmonczyk, J. F. Vautherot and P. De Kinkelin (1983): Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) cell line from carp (*Cyprinus carpio*). Ann.Virol. (Institut Pasteur), 134E, 207-220.
- Jorgensen P. E. V., N. J. Olesen, W. Ahne and N. Lorentzen (1989): SVC and PFR viruses. Serological examination of 22 isolates indicates close relationship between the two rhabdoviruses. In " Viruses of lower vertebrates" Ahne, W. and E. Kurstak, eds. Springer Verlag, Berlin Germany, 349-366.
- Stone D.M., W. Ahne. K. L. Denham, P. F. Dixon, C. T.- Y. Liu, A. M. Sheppard, G. R. Taylor, and K. Way (2002): Nucleotide sequence analysis of the glycoprotein gene of putative spring viraemia of carp viruses and pike fry rhabdovirus isolates reveals four distinct piscine vesiculovirus genogroups. Dis. Aquat. Org., 53, 203-210.
- Way, K. (1991): Rapid detection of SVC virus antigen in infected cell cultures and clinically diseased carp by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). J. Appl. Ichthyol., 7, 95-107.
- Wolf. K. (1988): Fish viruses and viral diseases.Cornell University Press, Ithaca, New York, USA, 476pp.
- Wunner, W. H. and D. Peters (1991): Family rhabdoviridae. In "Classification and Nomenclature of viruses" Francki R. I., C. M. Fauqule, D L. Knudson and F. Brown eds. Arch. Virol, (Suppl.2). Springer, New York,USA,and Vienna, Austria, 250-262.

注意: SVC に 関する写真は、いずれもヨーロッパ魚病学会のご厚意により、「ヨーロッパ魚病学会誌 ; Vol 15,No 4. 増補版 “What should I do?”」より転載したものであり、版權はヨーロッパ魚病学会にあります。