

# Carp edema virus人為感染時の飼育水および鰓における ウイルスコピー数の推移

安本信哉<sup>1†</sup>, 石橋成豊<sup>2</sup>, 近藤昌和<sup>1</sup>

## Temporal changes in viral genome copy numbers in rearing water and gills during experimental infection with carp edema virus

Shinya Yasumoto<sup>1†</sup>, Naritoyo Ishibashi<sup>2</sup> and Masakazu Kondo<sup>1</sup>

**Abstract:** Viral edema of carp (VEC) is a viral disease affecting carp *Cyprinus carpio*, caused by the carp edema virus (CEV). However, the dynamics of the virus and the levels of viral shedding in diseased and carrier fish remain to be elucidated. In this study, experimental infections with two CEV strains were performed, after which samples were collected chronologically from the rearing water and gills in order to measure viral genome copy numbers (vgcn). The vgcn in the rearing water remained below the detection limit up to 1 day post infection (dpi). However, the presence of the virus was first detected at 3 dpi, reaching a peak at 7 dpi before declining rapidly. As with the rearing water, the vgcn in the gills also began to increase from 3 dpi, peaking at 7 dpi before gradually declining thereafter. Therefore, when koi carp are experimentally infected with CEV, viral replication in the gill tissue begins around 3 dpi, and the rearing water becomes cloudy presumably due to excessive mucus secretion. Around 7 dpi, the viral level in the gill tissue and viral shedding reach their peak, with symptoms such as sunken eyes and recumbency observed. Subsequently, the viral level declines gradually, and the fish dies several days later.

**Key words:** koi carp, *Cyprinus carpio*, carp edema virus, viral edema of carp

### 緒 言

ウイルス性コイ浮腫症 (Viral edema of carp, VEC) は Carp edema virus (CEV) によって引き起こされるコイのウイルス病である<sup>1)</sup>。本病は主にニシキゴイ *Cyprinus carpio* で問題となっており、6~7月の梅雨時期に当歳魚で発生する場合はVEC、秋の低水温期に2歳以上や成魚で発生する場合はウイルス性眠り病 (Viral sleeping disease, VSD) と呼ばれる<sup>2)</sup>。VECの主な外観症状としては、駆幹部の浮腫や鰓弁の棍棒化、粘液の過剰分泌、体表や尾鰭のうっ血、

眼球の陥没などがある。VSD病魚は基本的にVECと同じ症状を示すが、それに加え眠ったように池の底や水面で横たわる。この状態に陥ると、物音などの刺激によって一時的に起き上がり遊泳するが、しばらくすると再び横臥し、最終的に死亡する<sup>3,4)</sup>。これらCEVによる感染症は25℃以下で発生し、死亡率は80~100%に達することもある<sup>5)</sup>。

VECおよびVSDの治療は、0.5%塩水浴と昇温 (28℃以上) が効果的であることが知られており、ニシキゴイ業者の間で一般的に行われてきた<sup>6-8)</sup>。予防に関しても、一部の養鰻場では多年魚 (CEVキャリア) と同居させることにより、

2025年12月16日受付; 2026年1月23日受理; 2026年3月27日発行 (Received 16 December 2025; Accepted 23 January 2026; Published 27 March 2026)

<sup>1</sup>水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

<sup>2</sup>水産大学校生物生産学科学生 (Student of Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

<sup>†</sup>責任著者 (corresponding author): yasumotos@fish-u.ac.jp

人為的にCEVに感染させ、免疫処理を行っている(私信)。しかし、感染後の塩水浴や昇温のタイミングは経験に依存しているため、免疫処理により死亡したり免疫を獲得できなかったりすることが問題となっている。これは、キャリア魚や感染魚におけるウイルス動態やその排出量が明らかとなっていないことが原因とされる。このことから、VECの防疫対策を行う上で、飼育水中や魚体内のウイルス動態を明らかにする必要があると考えた。

そこで、本研究ではCEVをニシキゴイに人為感染させ、経日的に飼育水および鰓におけるウイルスコピー数の推移を調べた。

## 材料と方法

### 供試ウイルスおよび供試魚

CEVは、新潟県(2011年)および山口県内(2022年)の養鰹場で得られたニシキゴイ病魚(品種は紅白;当歳魚)の鰓から分離されたNFU11N1株とNFU22Y1株を用いた。なお、これらの株は3つの遺伝子グループ(I, IIaおよびIIb)のうち、IIaに分類されることを確認している<sup>9)</sup>。供試魚(ニシキゴイ, 紅白)は、2024年に水産大学校(山口県下関市)で生産・飼育された当歳魚120尾(平均体重 $65.3 \pm 15.2$  g, 平均尾叉長 $14.9 \pm 2.3$  cm)を使用した。なお、供試魚は試験開始1週間前に容量50 Lの水槽に20尾ずつ搬入し、水温20℃で馴致飼育した。

### 人為感染試験

人為感染試験には飼育水採材区、鰓採材区および対照区(未感染区)の3試験区(それぞれ  $n = 20$ )を設け、ウイルス株を換えて2回行った。飼育水採材区および鰓採材区ではVEC病魚由来鰓摩砕液を加えた1 Lの飼育水(20℃;ウイルス濃度  $1.0 \times 10^3$  copies/ $\mu$ L)に、供試魚20尾を1時間浸漬した<sup>10)</sup>。対照区では、健全魚由来鰓摩砕液を用い、同様に浸漬した。浸漬後、魚体表面に付着した未感染ウイルスを取り除くために、10 Lの曝気させた水道水で3回洗浄(1分間)したのち、容量50 Lの水槽に収容して14日間経過観察を行った。試験期間中は無給餌とし、換水も行わなかった。飼育水採材区および対照区では感染直後(水槽搬入直後)、感染後1, 3, 5, 7, 10および14日目に3 mLずつ採水し、1.5 mLチューブに分注して-80℃で保存した。鰓採材区においても同様に感染直後、感染後1, 3, 5, 7 および 10日目に生残魚2尾ずつから鰓を摘出して-80℃で保存した。感染後14日目については、NFU11N1株を感染させた試験区では

すべて死亡し、NFU22Y1株の試験区では1尾のみしか生残していなかった。そのため、NFU22Y1株を感染させた試験区の生残魚1尾のみを採材した。なお、すべての試験区において試験期間中に死亡した魚および生残魚についても同様に鰓を摘出して保存した。

### CEVの定量

飼育水(100  $\mu$ L) および鰓(10 mg)のDNA抽出にはDNAzol<sup>®</sup>(Molecular Research Center)を用い、メーカーのプロトコルに従って行った。さらに、Oyamatsu et al<sup>11)</sup>によって設計されたプライマーF1/R1によって得られるCEVのDNA断片を組み込んだプラスミドを精製し、定量PCRを行った。PCR反応液の調製にはGo taq<sup>®</sup> Enviro Master Mix (2 $\times$ ) (Promega)を用いた。1検体あたりGo taq<sup>®</sup> Enviro Master Mix 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ Mの各プライマー(最終濃度0.9  $\mu$ M), probe 0.6  $\mu$ L(最終濃度0.3  $\mu$ M)を加え、鋳型DNA 4  $\mu$ Lを含むスクリーナーゼフリー水で最終容量20  $\mu$ Lとした(PCR反応液)。反応条件は95℃で10分間の初期変性、続いて95℃で30秒間、60℃で30秒間の40サイクルとし、全てのサンプルで反復を2とした。PCR反応の結果から $10^0 \sim 10^7$  copies/ $\mu$ Lの標準曲線を作成してウイルスコピー数を測定した。なお、鰓採材区より得られた鰓のコピー数については2試料の平均値で示し、感染後7日目と死亡魚間におけるウイルスコピー数の比較にはt検定( $P < 0.05$ )を用いた。

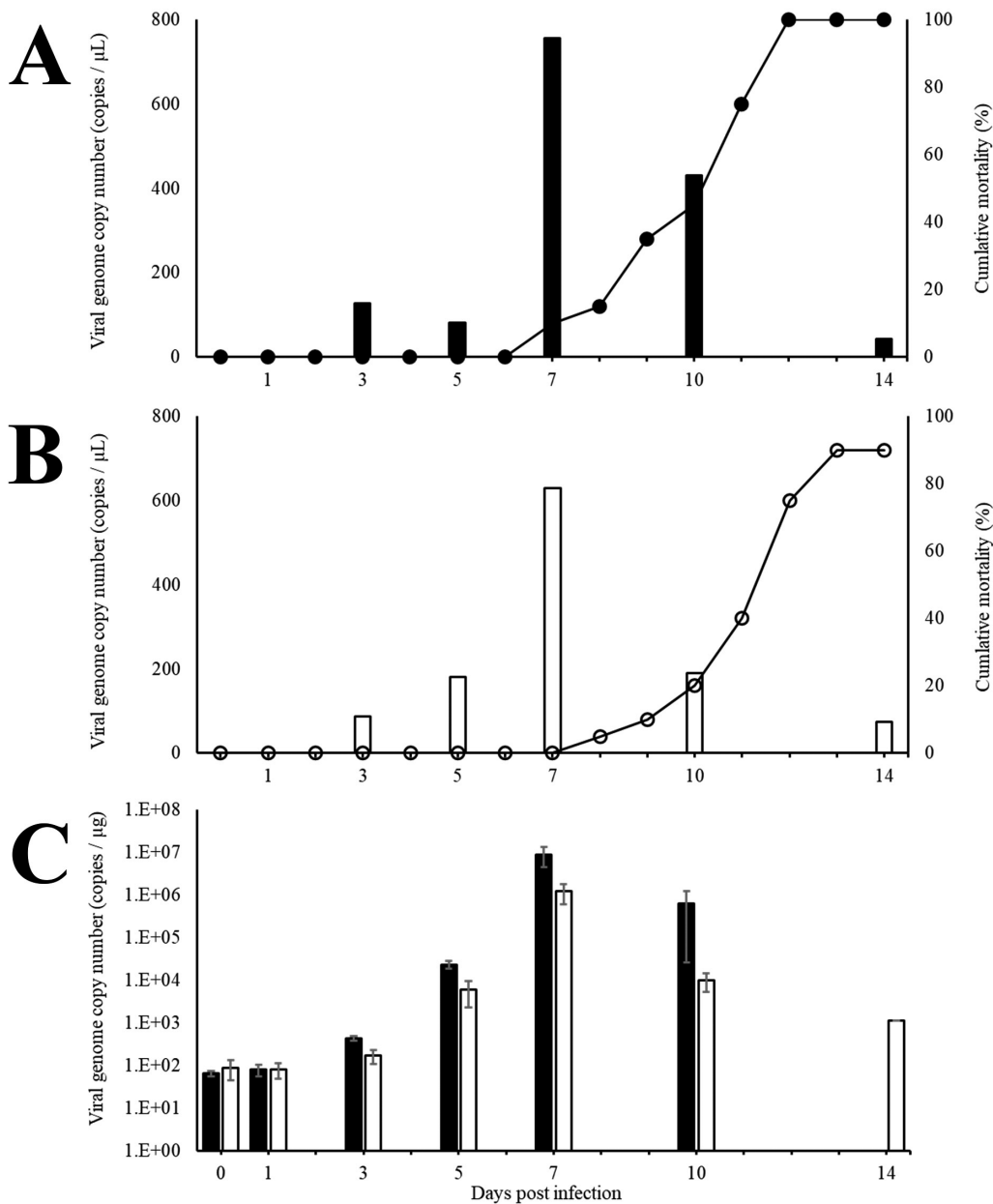
## 結 果

飼育水採材区における累積死亡率と飼育水中に含まれるウイルスコピー数の推移をFig. 1AおよびBに示した。いずれのウイルス株においても感染後2日目から飼育水が白濁し始め、次第に遊泳不活発となり、感染後6~7日目(死亡がみられる数日前)から水底で横臥する様子が観察され、感染後10~12日目に多くの死亡魚がみられた。最終的な累積死亡率はNFU11N1株で100%, NFU22Y1株で90%となった。死亡魚は、躯幹部の浮腫や眼球陥没といったVECの症状を示す個体が確認され(Fig. 2)、鰓のウイルスコピー数は $2.3 \times 10^2 \sim 5.9 \times 10^6$  copies/ $\mu$ gであった。NFU22Y1株感染における生残魚は軽度な浮腫症状はみられたものの、その他特筆すべき著変はみられず、鰓のウイルスコピー数はそれぞれ $9.6 \times 10^2$  および $5.9 \times 10^3$  copies/ $\mu$ gであった。飼育水中のウイルスコピー数は、いずれも感染直後および感染後1日目は検出限界以下であったが、感染後3, 5, 7, 10および14日目のNFU11N1株ではそ

それぞれ  $1.2 \times 10^2$ ,  $8.1 \times 10^1$ ,  $7.5 \times 10^2$ ,  $4.3 \times 10^2$  および  $4.3 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L となり, NFU22Y1 株ではそれぞれ  $8.8 \times 10^1$ ,  $1.8 \times 10^2$ ,  $6.3 \times 10^2$ ,  $1.9 \times 10^2$  および  $7.4 \times 10^1$  copies/ $\mu$ L と推移した。なお, 対照区では試験期間中に異常を示す魚や死亡魚はみられず, いずれの試料からも CEV は検出されなかった。

鰓採材区ではいずれの試験区においても 9 日目から死亡魚がみられ, NFU11N1 株ではすべて死亡し, NFU22Y1 株で 1 尾生残した (14 日目として鰓を採材)。死亡魚の鰓のウイルスコピー数はそれぞれ  $9.8 \times 10^1 \sim 5.9 \times 10^6$  (平均

$2.3 \times 10^6$ ) copies/ $\mu$ g であった。経日的に採材した鰓組織中のウイルスコピー数は NFU11N1 株を用いた試験で感染直後から  $6.4 \times 10^1$ ,  $9.6 \times 10^1$ ,  $4.2 \times 10^2$ ,  $2.3 \times 10^4$ ,  $8.8 \times 10^6$  および  $6.2 \times 10^5$  copies/ $\mu$ g, NFU22Y1 を用いた試験では  $8.7 \times 10^1$ ,  $8.0 \times 10^1$ ,  $1.6 \times 10^2$ ,  $5.8 \times 10^3$ ,  $5.2 \times 10^6$ ,  $9.7 \times 10^4$ ,  $1.1 \times 10^3$  (1 個体のみ) copies/ $\mu$ g であった (Fig. 1C)。感染後 7 日目のウイルスコピー数 ( $8.8 \times 10^6$  および  $5.2 \times 10^6$  copies/ $\mu$ g) は死亡魚のそれよりも有意に高かった ( $P = 0.015$ )。



**Fig. 1.** Results of experimental infection to koi carp. A and B, Cumulative mortality (● and ○) post experimental infection with CEV (A, NFU11N1; B, NFU22Y1) and changes in viral genome copy numbers in rearing water (■ and □). C, Changes in viral genome copy numbers in gills (■, gills infected with NFU11N1; □, gills infected with NFU22Y1).



**Fig. 2.** The infected fish at 7 days post infection. The fish show sunken eyes and edema of the body. Bar = 5 cm.

## 考 察

本研究では2株のCEVを用いて人為感染を行ったのち、経日的に飼育水および鰓を採材してウイルスコピー数を測定し、その推移を調べた。人為感染の結果、飼育水採材区ではいずれのウイルス株を用いた試験区においても累積死亡率は90%以上となり、死亡魚はVECの典型的な症状を示した。また、飼育水採材区および鰓採材区のすべての魚でウイルスコピー数は $9.8 \times 10$  copies/ $\mu\text{g}$ 以上を示したことから、すべてCEVに感染していることが確認された。また、ウイルス株による傾向の違いはみられなかった。飼育水のウイルスコピー数は、いずれも感染後1日目までは検出限界以下であったものの、3日目以降から検出され始め、7日目にピークとなり、換水を行っていないにもかかわらず、その後急激に低下することが明らかとなった。2本鎖DNAウイルスのDNAはその他のウイルスに比べて安定しており、本研究の条件でCEVのDNAが数日中に分解されることは考えにくい<sup>12,13)</sup>。そのため、ウイルスコピー数が低下した原因については、排出されたウイルスが再度魚に感染したことに加え、水槽壁面や底面に形成されたバイオフィーム、あるいは有機物や懸濁物にウイルスが吸着・付着し、沈降や表面に保持されることで、水中から検出されにくくなったと考えられる。死亡は感染後7~8日目から始まり、同10~12日目に多くみられたことから、死亡する数日前に多くウイルスを排出することが明らかとなった。鰓のウイルスコピー数においても飼育水と同様に、感染後3日目から増え始め、7日目でピークとなり、その後緩やかに減少した。CEVは主に鰓で増殖することから<sup>4)</sup>、鰓で増殖したウイルスが水中へと拡散したと推察される。感染後7日目のウイルスコピー数は死亡魚のウイルスコピー数よりも有意に高かったことから、鰓のウイルス量は死亡前にピークとなることが示唆された。つまりCEVをニシ

キゴイに人為感染させると、感染後2~3日目には鰓組織内のウイルス増殖がはじまり、粘液過剰分泌による飼育水の白濁がみられる。次いで感染後7日目前後には組織内のウイルス量と排出量が最大となり、眼球陥没や横臥などの症状がみられる。そこから鰓組織内のウイルス量は緩やかに低下するとともに、排出量も低下し、数日後に死亡すると考えられる。このように死亡する前に魚体内のウイルス量がピークとなる傾向は、伝染性造血器壊死症やマダイイリドウイルス病などでも報告されており<sup>14,15)</sup>、魚類の病原ウイルスでは一般的な性質なのかもしれない。

CEVの人為感染を安定的に行うためには、ウイルス量の高い病魚鰓組織が必要であり<sup>9)</sup>、これまで死亡魚から鰓を採材していた。本研究により、死亡する前(水底で横臥したとき)の魚から採材した方が効率的であることが期待される。ただし、感染後7日目に検出されたウイルスの感染力の有無を確認する必要がある。また、本研究で採用した人為感染方法においては、水底で横臥しはじめる感染後6~7日目に鰓組織内のウイルスコピー数が最大となることから、この時点で昇温・塩水浴治療を行うことで、免疫の獲得が可能であると期待される。今後は、この時点での治療による生存率や実際の免疫効果について、検討していく必要がある。

## 引用文献

- 1) Abdelsalam EEE, Piačková V: Carp edema virus: Host selection and interaction, and potential factors affecting its introduction to the common carp population, distribution, and survival. *Aquaculture*, **563**, 739009 (2023)
- 2) 山田和雄: ウイルス性コイ浮腫症 ウイルス性眠り病. 畑井喜司雄, 小川和夫(編) 新魚病図鑑. 緑書房, 東京, 96-97 (2006) [Yamada K: Viral Edema of Carp and Viral Sleeping Disease. In: Hatai K, Ogawa K (eds) New Atlas of Fish Diseases. Midori-Shobo, Tokyo, 96-97 (2006) (in Japanese)]
- 3) Way K, Haenen O, Stone D, Adamek M, Bergmann SM, Bigarré L, Diserens N, El-Matbouli M, Gjessing MC, Jung-Schroers V, Leguay E, Matras M, Olesen NJ, Panzarin V, Piačková V, Toffan A, Vendramin N, Vesel T, Waltzek T: Emergence of carp edema virus (CEV) and its significance to European common carp and koi *Cyprinus carpio*. *Diseases of Aquatic Organisms*, **126**, 155-166 (2017)

- 4) Pragyana D, Bajpai V, Suman K, Mohanty J, Sahoo PK: A review of current understanding on carp edema virus (CEV): A threatful entity in disguise. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies*, **7**, 87-93 (2019)
- 5) Oyamatsu T, Hata N, Yamada K, Sano T, Fukuda H: An etiological study on mass mortality of cultured colorcarp juveniles showing edema. *Fish Pathology*, **32**, 81-88 (1997)
- 6) Miyazaki T, Isshiki T, Katsuyuki H: Histopathological and electron microscopy studies on sleepy disease of koi *Cyprinus carpio koi* in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms*, **65**, 197-207 (2005)
- 7) Seno R, Hata N, Oyamatsu T, Fukuda H: Curative effect of 0.5% salt water treatment on carp, infected with carp edema virus (CEV) results mainly from reviving the physiological condition of the host. *Aquaculture Science*, **51**, 123-124 (2003)
- 8) Zhang X, Ni Y, Ye J, Xu H, Hou Y, Luo W, Shen W: Carp edema virus, an emerging threat to the carp (*Cyprinus carpio*) industry in China. *Aquaculture*, **474**, 34-39 (2017)
- 9) 松本あかね, 本田幸太郎, 高橋 洋, 近藤昌和, 安本信哉: 国内で検出されたCarp edema virus のニシキゴイ, マゴイおよびキンギョに対する感染性と病原性. 水産大学校研究報告, **71**, 73-80 (2023) [Matsumoto A, Honda K, Takahashi H, Kondo M, Yasumoto S: Infectivity and pathogenicity of carp edema virus isolated in Japan to koi carp, common carp and goldfish. *Journal of National Fisheries University*, **71**, 73-80 (2023) (in Japanese with English abstract)]
- 10) 安本信哉, 松本あかね, 石橋成豊, 高橋 洋, 近藤昌和: Carp edema virus を用いたニシキゴイに対する人為感染の比較検討. 水産大学校研究報告, **72**, 131-134 (2024) [Yasumoto S, Matsumoto A, Ishibashi N, Takahashi H, Kondo M: Comparative study of experimental infection against koi carp using Carp edema virus. *Journal of National Fisheries University*, **72**, 131-134 (2023) (in Japanese with English abstract)]
- 11) 親松 剛, 的山央人, 山本健也, 福田穎穂: PCR法によるコイ浮腫症ウイルス検出の試み. 水産増殖, **45**, 247-251 (1997) [Oyamatsu T, Matoyama H, Yamamoto K, Fukuda H: A trial for the detection of carp edema virus by using polymerase chain reaction. *Suisanzoshoku*, **45**, 247-251 (1997) (in Japanese with English abstract)]
- 12) 片山浩之: 水環境とウイルス. ウイルス, **66**, 163-170 (2016) [Katayama H: Viruses in water environment. *Virus*, **66**, 163-170 (2016) (in Japanese with English abstract)]
- 13) Williams RC, Perry WB, Lambert-Slosarska K, Futcher B, Pellett C, Richardson-O'Neill I, Paterson S, Grimsley JMS, Wade MJ, Weightman AJ, Farkas K, Jones DL: Examining the stability of viral RNA and DNA in wastewater: Effects of storage time, temperature, and freeze-thaw cycles. *Water Research*, **259**, 121879 (2024)
- 14) 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 ironfloculation. *Aquaculture*, **450**, 308-312 (2016)
- 15) 西村定一, 石田芳朗, 山本章三, 福田穎穂, 岡本信明, 佐野徳夫: 伝染性造血器壊死症 (IHN): 人為感染させたニジマス稚魚の魚体内, 水中および糞中ウイルス量の変動. 魚病研究, **23**, 13-17 (1988) [Nishimura T, Ishida Y, Yamamoto S, Fukuda H, Okamoto N, Sano T: Infectious haematopoietic necrosis: Virus titer in the fish bodies, rearing water and feces of artificially infected rainbow trout fry. *Fish Pathology*, **23**, 13-17 (1988) (in Japanese with English abstract)]

## Carp edema virus人為感染時の飼育水および鰓における ウイルスコピー数の推移

安本信哉, 石橋成豊, 近藤昌和

**要旨:** ウイルス性コイ浮腫症 (Viral edema of carp) はCarp edema virus (CEV) によって引き起こされるコイのウイルス病である。しかし、感染魚やキャリア魚におけるウイルス動態やその排出量は不明である。そこで、本研究ではニシキゴイに対して2株のCEVを用いて人為感染を行い、経日的に飼育水および鰓におけるウイルスコピー数の推移を調べた。飼育水のウイルスコピー数は、いずれも感染後1日目までは検出限界以下であったものの、同3日目以降から検出され始め、同7日目にピークとなり、その後急激に低下した。鰓においても、感染後3日目から増え始め、7日目でピークとなり、その後緩やかに減少した。つまりCEVをニシキゴイに人為感染させると、感染後3日目前後で鰓組織内のウイルス増殖がはじまり、粘液過剰分泌による飼育水の白濁がみられたのち、同7日目前後には組織内のウイルス量と排出量が最大となり、眼球陥没や横臥などの症状がみられる。そこから鰓組織内のウイルス量は緩やかに低下しながらも、数日後に死亡すると考えられる。