

伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) の迅速検出法 の開発と生態学的研究への応用

学位論文内容の要旨

サケ科魚類において極めて致死性の高いウイルス疾病の一つに伝染性造血器壊死症 (IHN)がある。この原因ウイルス (IHNV) を採卵用親魚が保有している場合、成熟に伴い卵巣腔液や精液中にウイルスが出現し、生殖産物としての卵や精子の表面を汚染することにより、孵化後の抵抗力を持たない稚仔魚への感染が起こる。そのため本疾病防疫対策上、親魚が IHNV の感染を受けているか否かの調査および飼育用水の管理が重要な課題となっている。また、IHN は抵抗力の弱い稚仔魚期の疾病であるため病気の進行・伝播が早く多大な被害をもたらすことから、迅速かつ正確な検出・診断が望まれている。さらに IHNV の自然界での挙動に関しては未だ不明であるため、完全な防疫対策を立てることが困難な状況にある。そこで本研究では IHNV の分離培養法と遺伝子を標的とした検出法に着目し、迅速かつ正確な検出、診断法の確立と IHN の抜本的な防疫対策に必要である本ウイルスの魚体を離れてからの生存性について検討した。

第1章では、分離培養法の検討として IHNV の分離に最適な細胞の選抜を試みた。IHNV に高い感受性を有する細胞として Fernandez(1993) の報告をもとに、サケ科魚類由来細胞の CHSE-214、KO-6、RTE、RTG-2、RTH、RTT、SEH、STE、RTE-2細胞の 9種類とサケ科以外の魚類由来細胞の FHM、EPC、EPG 細胞の 3種類、計 12種類を選んだ。次にこれまでの親魚の検査結果から親魚の保有しているウイルス量が低いことから、M.O.I. を 0.001 として IHNV を接種し、各細胞における IHNV の増殖量を比較した。その結果、ウイルスの増殖が早く、かつ増殖量の多いサケ科魚類

由来の RTG-2 および RTE-2 細胞、サケ科魚類以外の魚類由来の EPC、EPG、FHM 細胞 の計 5 種類を選抜した。さらに実際のウイルス検査を考慮し、事前の調査で IHNV 陽性となったサケマス 卵巣腔液を供試して選抜した 5 種類の細胞での検出状況を比較した。その結果 RTE-2 と RTG-2 細胞が毒性の発現が少なく、かつウイルス検出率が高く サケマス 類の IHNV 検査に適していることが明らかになった。

第 2 章では、遺伝子検出法の一つとして Reverse Transcription(RT)-Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による IHNV の検出を検討した。設計したプライマーは、IHNV N-gene のオープンリーディングフレームの 212 ~ 231、669 ~ 688 番目に位置し、これらのプライマーにより増幅される PCR 産物は 510bp であった。RT-PCR の反応条件は、逆転写反応 23 °C 20 分、50 °C 30 分、99 °C 10 分の反応を行い cDNA を合成し、上流プライマー、Taq Polymerase を加えて、94 °C 2 分処理した後、94 °C 30 秒、45 °C 30 秒、72 °C 1 分の反応サイクルを 40 サイクル行い、最後に 72 °C 10 分間処理して cDNA を増幅させた。今回決定した条件下での検出限界は、ウイルス感染価が $10^{1.8}$ TCID₅₀/ml であり、増幅産物が IHNV に特異的であることをサザンハイブリダイゼーションにより確認した。また最近問題となっている混合感染への対応として IPNV と IHNV の同時検出法を検討し、血清学的診断法の代用として利用できることを明らかにした。

次に本法を実際のウイルス検査に応用するために、直接生体試料から RT-PCR で IHNV 遺伝子の検出を試みたが、培養法に比べ検出感度が低かった。これは RNA の抽出あるいは RT-PCR を阻害する物質が存在したためと考えられた。前述のように IHNV 感染培養細胞からの RT-PCR による検出感度が高いことからまず培養細胞に生体試料を接種して培養させることにより、ウイルス核酸量を増幅させるとともに、RNA の抽出阻害として働く物質が希釈されるものと想定し、細胞培養と RT-PCR 組合せた方法を検討した。その結果、検出感度が上昇し、現段階では最も早く、簡便、確実に診断できる方法と結論づけられた。

第 3 章では、細菌の生菌数測定法の一つである最確数(MPN)法と第 2 章で検討した IHNV の RT-PCR を組合せて飼育水中の IHNV 定量法について検討した。まず MPN 法をウイルスの定量に用いることが可能かどうかを検討した。TCID₅₀ 法と MPN3 本

法による感染価の比較を行ったところ、両方法でのウイルス感染価は同じであった。そこで試料の10倍希釈液列を培養細胞に接種してウイルスを増殖させ、PCRによる検査結果から MPN を求める方法(PCR-MPN-細胞培養法)と希釈液列毎にフィルター上にウイルスを捕捉して、フィルターからウイルス RNA を抽出し、PCRによる検査結果から MPN を求める方法(PCR-MPN-フィルター法)により環境水中のウイルスの定量検出について検討した。PCR-MPN-細胞培養法では接種ウイルス量とほぼ一致する値となったが、PCR-MPN-フィルター法では、1/10しか検出できなかった。この理由として、フィルターの捕捉率、フィルターからのRNA抽出率や阻害物質の存在などが考えられる。

次にニジマス稚魚人工感染実験における飼育排水中および人工感染魚が放出する IHNV 量を PCR-MPN-細胞培養法を用いて検討した。飼育排水から IHNV は検出できなかったが、人工感染による異常遊泳魚は24時間飼育で平均して31感染粒子/100mlを放出することが確認できた。これにより、飼育水中に IHNV が放出されていることが明らかとなった。この結果から推定すると、本実験での日間最大死亡数7尾から、止水状態で280 感染粒子/Lが排出されたことになる。しかし、感染実験は流水で行ったことから、常に水槽中に本法の検出限界である $10^{0.8}$ TCID₅₀/ml以上のウイルスが存在したとは限らず、飼育排水から IHNV を検出するのは困難であった。

第4章では、有機または無機の微細粒子に対する IHNV の吸着、吸着条件、吸着後のウイルスの感染性について検討した。まず、細菌、粘土鉱物、けいそう土などの微細粒子と IHNV との混合実験を行った結果特に、カオリン、酸性白土、ベントナイト、けいそう土などに非常によく吸着した。これら微細粒子に対する IHNV の吸着量は微細粒子量が多くなるにつれ増加し、pH、温度とは相関関係がみられなかった。また吸着した IHNV は感染性を保持し、その感染性は少なくとも9週間は持続した。次に微細粒子に吸着した IHNV を微細粒子から離脱させるために攪拌、超音波処理、100Vの電圧を負荷したが、いずれも離脱には至らなかった。しかし、魚類株化細胞と IHNV を吸着させた微細粒子を接触させると感染が成立し、さらに微細粒子吸着 IHNV によるニジマス稚魚への感染も成立した。このことは粒子に吸着したウイルスの感染性の保持がマウスへの感染実験により確認できたという Schaub & Sagik,(1975)の報告を支持するものであった。以上の結果は環境水中で IHNV はけいそう土、カオ

リン、酸性白土等の表面に吸着し、泥の中に潜んでいて感染のチャンスを待っている可能性が示唆され、微細粒子を介したIHNV感染が自然環境下での重要な感染経路の一つと考えられた。今後、魚体から放出されたウイルスの行方を詳細に探索し、環境水中でのIHNVの動態を明らかにしていく必要があると考える。

以上、本研究では魚類および環境水からのIHNVの迅速検出法確立のため、IHNVの分離培養に最適な細胞の選択とRT-PCRによるIHNVの検出法を検討し、細胞培養とRT-PCRを組合せることでIHNVの迅速な確定診断が行えることを明らかにした。また最確数法とRT-PCRを組合せることで水中からのIHNVの定量検出を可能とした。さらに環境水中でのIHNV感染環解明の手がかりとして、微細粒子へのIHNVの吸着と吸着後の感染性について検討し、IHNVが環境水中の泥に含まれる粘土鉱物などに吸着し、次の感染の機会を待っている可能性を示した。これらの結果はIHNVの防疫、防除対策を講じる上で重要な知見であると考えられる。今後、微細粒子に対するIHNVの吸着様式の解明と微細粒子に吸着したIHNVの魚体への具体的な感染様式の解明、飼育および環境水中でのIHNVの動態に関するさらなる研究が必要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 絵 面 良 男
副 査 教 授 猪 上 徳 雄
副 査 教 授 吉 水 守
副 査 助 教 授 田 島 研 一

学 位 論 文 題 名

伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) の迅速検出法 の開発と生態学的研究への応用

本論文は、アメリカ西海岸に端を発し、現在極東およびヨーロッパにまで広がった、極めて致死性の高いサケ科魚類の国際伝染病、伝染性造血器壊死症 (IHNV) ウイルスの分離培養法と遺伝子を標的とした検出法に着目し、迅速かつ正確な診断・検出法の確立と抜本的な防疫対策に不可欠な本ウイルスの魚体を離れてからの生存性について検討したものである。特に評価される成果は以下のとおりである。

1. IHNV の分離に適した細胞の選抜を試み、まず IHNV に高い感受性を有する細胞としてサケ科魚類由来の CHSE-214、KO-6、RTE、RTG-2、RTH、RTT、SEH、STE、RTE-2 細胞の 9 種類とサケ科以外の魚類由来の FHM、EPC、EPG 細胞の 3 種類、計 12 種類を選出した。次いで、これまでの採卵親魚の調査結果で、親魚の保有ウイルス量が少ない例も多いことから、感染の多重性(M.O.I.)を 0.001 として IHNV を接種し、各細胞における IHNV の増殖量を比較した。その結果、ウイルスの増殖が早く、かつ増殖量の多い細胞としてサケ科魚類由来の RTG-2 と RTE-2 細胞、サケ科以外の魚類由来の EPC、EPG、FHM 細胞の計 5 種類を選抜した。さらに実際のウイルス検査を考慮し、IHNV 陽性となったサクラマス卵巣腔液を供試して、選抜した 5 種類の細胞での検出状況を比較し、RTE-2 と RTG-2 細胞が毒性の発現が少なく、かつウイルス検出率が高いことを示し、両細胞がサケマス類の IHNV 検査に適していることを明らかにした。

2. 遺伝子検出法の一つとして、Reverse Transcription (RT) - Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による IHNV の遺伝子検出のために、IHNV N-gene のオープンリーディングフレームの 212~231、669~688 番目に位置するプライマーを設計した。RT-PCR の反応条件は、逆転写反応 23 °C 20 分、50°C 30 分、99°C 10 分の反応を行い cDNA を合成し、上流プライマー、Taq Polymerase を加えて 94°C 2 分処理した後、94°C 30 秒、45°C 30 秒、72°C 1 分の反応サイクルを 40 サイクル行い、最後に 72°C 10 分間処理して cDNA を増幅さ

せた。この反応により増幅される PCR 産物が理論値どおり 510bp であり、IHNV の N-gene 由来であることをサザンハイブリダイゼーションにより確認した。今回決定した条件下での検出限界は、ウイルス感染価にして $10^{0.8}$ TCID₅₀/ml、ウイルス粒子数では 6.8 粒子であることを明らかにした。

3. 最近問題となっている混合感染への対応として、伝染性腭臓壊死症(IPN)ウイルスと IHNV を同時に検出できる PCR 法を確立し、血清学的診断法の代用として利用できることを明らかにした。

4. 実際のウイルス検査に応用するために、生体試料からの RT-PCR による IHNV 遺伝子の検出を試みたが、培養法に比べ検出感度が低かった。これは試料中に RNA の抽出あるいは RT-PCR を阻害する物質が存在するためと考え、培養細胞に生体試料を接種してウイルスを増殖させるとともに RNA 抽出阻害として働く物質を希釈するために細胞培養と RT-PCR 組合せた方法を確立した。これによりウイルス検出感度が上昇したことから、現段階で最も早く、簡便、確実に診断できる方法と結論づけた。

5. 細菌の生菌数測定法の一つである最確数(MPN)法と IHNV 遺伝子検出法の RT-PCR を組合せ、飼育水中の感染性 IHNV の定量の可能性を検討し、TCID₅₀ 法と MPN 3 本法による感染価が同じであることを確認した。そこで、試料を培養細胞に接種してウイルスを増殖させ、RT-PCR による検査結果から MPN を求める方法 (PCR-MPN-細胞培養法)と試料を濾過してフィルター上にウイルスを捕捉し、フィルターからウイルス RNA を抽出して PCR を行い、その結果から MPN を求める方法 (PCR-MPN-フィルター法)により、環境水中のウイルスの定量検出法を検討した。PCR-MPN-細胞培養法を用いると理論値とほぼ一致する感染ウイルス数を検出することが可能となった。しかし PCR-MPN-フィルター法では 1/10 量しか検出できず、その理由として、フィルターの捕捉率、フィルターからの RNA 抽出率、阻害物質の存在などを指摘した。

6. ニジマス稚魚による人工感染試験を行い、飼育排水中の IHNV および人工感染魚が放出する IHNV を PCR-MPN-細胞培養法を用いて検出を試みた。飼育排水からは IHNV を検出できなかったが、異常遊泳魚からは 24 時間あたり平均して 31 感染粒子/100ml の IHNV が検出飼育水中に放出されていることを明らかにし得た。

7. 有機または無機の微細粒子に対する IHNV の吸着、吸着条件、吸着後のウイルスの感染性について検討した。細菌、粘土鉱物、けいそう土などの微細粒子と IHNV との混合試験を行った結果、IHNV はカオリン、酸性白土、ベントナイト、けいそう土などに非常によく吸着することを明らかにした。これら微細粒子に対する IHNV の吸着量は微細粒子量に比例し、pH、温度とは相関関係がないことを明らかにした。また吸着した IHNV は感染性を保持し、その感染性が少なくとも 9 週間は持続すること、さらに微細粒子に吸着した IHNV を微細粒子から離脱させるために攪拌、超音波処理、100V の電圧を負荷したが、いずれも離脱させることはできなかった。しかし、IHNV を吸着させた微細粒子を魚類株化細胞に接触させると感染が成立し、さらに IHNV を吸着した微細粒子によるニジマス稚魚の人工感染試験も成立したことから、環境水中で IHNV は、けいそう土、カオリン、酸性白土等の表面に吸着して泥の中に長期間潜み、感染のチャンスを待つ

ている可能性を示唆した。

以上の研究成果は、魚類ウイルス学のみならず、魚類増養殖および栽培漁業の分野における魚病対策、特に魚類ウイルス病の防除、防疫対策において大きく貢献したものと高く評価され、審査員一同は、本研究の申請者が博士(水産学)の学位を授与される十分な資格を有すると判定した。