

トラフグの口白症病原体関連タンパク質を標的にした 本症の血清学的診断法に関する研究

学位論文内容の要旨

トラフグの口白症は、養殖トラフグの疾病の中でも重要な疾病で、いったん発生するとその生簀の魚群が全滅することもある。本症は、口吻部に潰瘍患部が形成され、病魚が他の個体に噛み付く攻撃的な行動が特徴的な症状であり、罹病魚脳磨砕濾液を健常魚に接種することにより再現されることから、濾過性病原体による感染症であることが明らかになっている。本病原体の大きさは 50 nm 以下で、有機溶剤および酸に感受性を有し、37℃では安定であるが 50℃で失活し、浮遊密度が 1.096 g/cm³、紫外線、タンパク質分解酵素およびプロピオラクトンに感受性であることが明らかにされているが、本病の診断法および防除対策は未だ確立されていない現状にある。従来、本症の診断法は目視に頼らざるをえなかったが、本研究では、本症感染耐過魚血清が脳内に存在するある種のタンパク質（kuchijirosho associated proteins, KAPs）を認識することを明らかにし、さらに抗 KAPs 抗体の有無に基づいた本症の診断法の開発を行った。

第 1 章では、長崎県下のトラフグ養殖業者に対して面談による聞き取り調査を実施した結果、本症の発生時期は、高水温期であること、魚齢に関係なく発症することが再確認された。次いで、トラフグ養殖業者が本症と診断したトラフグ 132 個体の外観症状を確認した上で、典型的な症状を呈した個体の脳の磨砕ろ液を用いた再現試験を実施し、その症状を確認した結果、現在トラフグ養殖業者が口白症と診断する基準は、従来から知られている外観症状を基としていることが確認された。さらに、本症を発症した事例の調査で、本症の感染耐過魚群で翌年再発した事例が複数あったことから、本症に対してトラフグは免疫を獲得しないと考えられた。餌料に人工餌料を与えても本症が発症した事例があったことから、餌料生物が感染源となることが否定された。外部寄生虫の駆除剤として使用されていたホルマリン

が完全に使用されなくなった翌年に本症の被害が急増したことから、外部寄生虫が本症の流行をうながしていることが推察された。そして、これらの結果から、トラフグ養殖場での本症の感染経路については、本症の感染耐過魚が感染源となり、外部寄生虫が関与して水平感染を助長していると考えられた。

第2章では、本症の自然発症トラフグの脳の磨砕ろ液を健常魚5尾に接種し、感染・発症した個体の脳から病原体保存液を作成した。なお、この病原体保存液の病原性は $10^{4.7}$ LD₅₀/mL であった。次いで、本症の自然発症トラフグの脳磨砕ろ液を接種して発症したトラフグの脳、腎臓、脾臓中の本症の病原体量を測定した結果、各々 $10^{5.4}$, $10^{5.2}$ および $10^{5.1}$ LD₅₀/g となり、脳組織の病原体量は腎臓あるいは脾臓組織より多く存在することが明らかになった。さらに、トラフグ養殖場またはその周辺でよく見られるトラフグ以外の魚種が感染源となる可能性を検討するために、クサフグ、ヒガンフグ、ハコフグ、イシダイ、マダイおよびメジナの本症感受性について検討した。その結果、クサフグ、ヒガンフグ、ハコフグの3魚種のみならずブリも発症・死亡した。ブリでは12gの小型魚から530gの大型魚まで本症に感受性を持ち、本症を発症したブリの脳の磨砕ろ液を接種したブリも発症し死亡した。これらのことから、本症はブリ養殖場で水平感染し、ブリが感染耐過魚となる可能性のあることが示唆された。

第3章では、本症の診断法の確立を目的に、本症感染耐過トラフグの血清を用い、本症トラフグ組織より本症病原体あるいは関連タンパク質の検出を試みた結果、本症感染耐過トラフグの血清を用いた免疫染色において、分子量100～120kで、健常魚の血清を用いた免疫染色では検出されないタンパク質（口白症関連タンパク質, kuchijirosho associated proteins, KAPs）が供試した全ての個体の脳組織から検出された。また、本症病原体は脳のみならず腎臓あるいは脾臓にも存在するが、KAPsは脳組織のみから検出された。

KAPsは脳組織磨砕液超遠心分離分画の上清分画から検出されたが、SDS-PAGEによる染色性から推察されるKAPsの脳組織内存在量は1-10 mg/g tissue以下と、発症魚の患部組織中に存在する感染体の量としては極めて少ないこと、また、個体間でKAPsの分子量に差異が認められること、さらに、KAPsの分子量が一般的なウイルスの構造タンパク質としては

大きすぎることから、KAPs は口白症病原体ではなく、口白症関連タンパク質であると考えられた。

興味深いことに、KAPs は感染耐過魚の血清を用いた免疫染色で健常魚の脳組織からも検出され、さらに健常魚と発症魚の脳組織中における KAPs 量に大きな差異は認められなかった。これらのことから、KAPs は魚体内で新たに合成されたタンパク質ではなく、脳組織内に元々存在するタンパク質の抗原性が口白症病原体の何らかの作用により部分的に変化することによって、元来存在するタンパク質が KAPs として新たに抗原認識されるようになったものではないかと考えられる。

第 4 章では、KAPs に対する抗体の有無により口白症診断あるいは感染履歴の把握を試みるため、口白症感染耐過魚、健常魚ならびに発症歴不明トラフグの脳組織およびそれぞれの血清を用い、KAPs の検出試みた結果、供試した感染耐過魚の血清全てが KAPs を認識し、逆に供試健常魚の血清は何れも KAPs とは反応しなかった。従って、KAPs をプロットしたタンザクスリットを準備し、トラフグから採血を行い、血清を分離して KAPs との反応性を見ることで、トラフグを生かしたまま養殖現場で本症の診断が可能になると考えられる。但し、本症に感染したトラフグの脳内に何時 KAPs が誘導されるか、その時期についてはまだ明らかになっていないため更なる検討が必要である。

口白症に対する積極的な防除対策の一つとして、本研究ではホルマリン不活化ワクチン開発の可能性についても検討したが、ホルマリン処理病原体による防御効果は認められなかった。

最後に、感染耐過魚の血清は脳組織内の KAPs を認識していたが、本症病原体が含まれる超遠心分離沈殿分画中のタンパク質を全く認識していなかった。このことから、本症病原体がウイルス粒子程度の密度を有するものの、その抗原性は極めて低いという重要な知見が得られた。本症病原体の抗原性が低いとすれば、罹病魚血中に病原体に対する抗体が誘導されづらいことは容易に推察でき、トラフグ養殖漁場で本症が再発する事例が複数あることや、ホルマリン処理した病原体の予防効果が全く認められなかったことが十分に理解できる。口白症病原体のこれら新しい性状を既知の性状と考え合わせると、口白症病原体は濾過

性病原体ではあるが、既存の魚類ウイルスとは大きく性質の異なるものであり、今後の研究展開において、濾過性病原体として知られるプリオンあるいはウイロイド等の特徴まで視野に入れた比較・検討も必要と考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守

副 査 教 授 田 島 研 一

副 査 所 長 井 上 潔 (西海区水研所長)

副 査 助教授 西 澤 豊 彦

学 位 論 文 題 名

トラフグの口白症病原体関連タンパク質を標的にした

本症の血清学的診断法に関する研究

トラフグの口白症は、口吻部に潰瘍患部が形成され、病魚が他の個体に噛み付く攻撃的な行動が特徴的な症状であり、濾過性病原体による感染症であることが明らかになっている。本病原体の大きさは 50 nm 以下で、有機溶剤、酸、紫外線、タンパク質分解酵素およびプロピオラクトンに感受性を有し、37℃では安定であるが 50℃で失活し、浮遊密度が 1.096 g/cm³ であることはわかっているものの、本症の診断法および防除対策は未だ確立されていない。本研究では、本症の診断法として、本症感染耐過魚が保有する KAPs に対する抗体を用いたウエスタンブロット法による本症の血清学的診断法の開発をおこなった。

まず、長崎県下のトラフグ養殖業者に対して面談による聞き取り調査を実施した。現在トラフグ養殖業者が口白症と診断する基準は、従来から知られている外観症状を基としていることが確認された。本症を発症した事例の調査から、トラフグ養殖場での本症の感染経路については、本症の感染耐過魚が感染源となり、外部寄生虫が関与して水平感染を助長していると考えられた。

次いで、トラフグ以外の魚種が感染源となる可能性を検討するために、クサフグ、ヒガシフグ、ハコフグ、イシダイ、マダイおよびメジナの本症感受性について検討した結果、フグ類 3 魚種のみならずサイズに関係なくブリも発症・死亡した。

そこで、本症の診断法の確立を目的に、本症感染耐過トラフグの血清を用い、本症トラフグ組織より本症病原体あるいは関連タンパク質の検出を試みた結果、本症感染耐過トラフグの血清を用いた免疫染色において、分子量 100～120k で、健常魚の血清を用いた免疫染色では検出されないタンパク質（口白症関連タンパク質と仮称、以降 KAPs ; kuchijirosho associated proteins と略記する）が供試した全ての個体の脳組織からのみ検出された。

KAPs は脳組織磨砕液超遠心分離分画の上清分画から検出されたが、SDS-PAGE による染色性から推察される KAPs の脳組織内存在量は 1-10 mg/g tissue 以下であり、発症魚の患部組織中に存在する感染体の量としては極めて少ないこと、また、検体間で KAPs の分子量に差異が認められること、さらに、KAPs の分子量が一般的なウイルスの構造タンパク質としては大きすぎることから、KAPs は口白症病原体ではなく、口白症関連タンパク質であると考えられた。

KAPs は感染耐過魚の血清を用いた免疫染色で健常魚の脳組織からも検出され、さらに健常魚と発症魚の脳組織中における KAPs 量に大きな差異は認められなかった。これらのことから、KAPs は魚体内で新たに合成されたタンパク質ではなく、脳組織内に元々存在するタンパク質の抗原性が口白症病原体の何らかの作用により部分的に変化することによって、KAPs として新たに抗原認識されるようになったものではないかと考えられる。

そこで、KAPs に対する抗体の有無による口白症の診断あるいは感染履歴の把握を試みるため、口白症感染耐過魚、健常魚ならびに発症歴不明トラフグの脳組織およびそれぞれの血清を用い、KAPs の検出試みた結果、供試した感染耐過魚の血清全てが KAPs を認識しており、逆に供試健常魚の血清は何れも KAPs とは反応しなかった。従って、KAPs をブロットしたタンザクスリットを準備し、トラフグの血清を分離して KAPs との反応性を見ることで、トラフグを生かしたまま本症の診断が可能になると考えられる。但し、本症に感染したトラフグの脳内に何時 KAPs が誘導されるか、その時期についてはまだ明らかになっていないため更なる検討が必要である。

口白症に対する積極的な防除対策の一つとして、本研究ではホルマリン不活化ワクチン開発の可能性についても検討したが、ホルマリン処理病原体による防御効果は認められなかった。

最後に、口白症感染耐過魚の血清は脳組織内の KAPs を認識していたが、本症病原体が含まれる超遠心分離沈殿分画中のタンパク質は全く認識していなかったことから、本症病原体がウイルス粒子程度の密度を有するものの、その抗原性は極めて低いという知見が得られた。本症病原体の抗原性が低いとすれば、罹病魚血中に病原体に対する抗体が誘導されづらいことは容易に推察でき、トラフグ養殖漁場で本症が再発する事例が複数あること、およびホルマリン処理した病原体に感染防御効果が全く認められなかったことが理解できる。口白症病原体のこれら新しい性状を既知の性状と考え合わせると、口白症病原体は濾過性病原体ではあるが、既存の魚類ウイルスとは大きく性質の異なるものであり、今後の研究展開において、濾過性と知られる他の病原体を視野に入れた比較・検討も必要と考えられる。