

学位論文題名

A Novel Immunization Method for Protection  
of Rainbow Trout from  
Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV)

(新しい免疫手法による伝染性造血器壊死症ウイルスの防除に関する研究)

学位論文内容の要旨

伝染性造血器壊死症 (infectious hematopoietic necrosis: IHN) は、ラブドウイルス科ノビラブドウイルス属の IHN ウイルス (IHNV) によるウイルス感染症で、世界各地の孵化場や養殖場で深刻な被害をもたらしている。IHN は、元々北米西海岸の風土病であったが、IHNV 汚染卵の移動により世界各地に広がった。日本でも、1971 年に北海道の孵化場でアラスカから輸入したベニサケに初めて IHN が発生し、その後 IHNV 汚染卵の移動と共に日本各地に広がった。IHN 対策として、卵消毒、飼育施設の消毒、飼育用水の殺菌、隔離飼育などの防除対策が実施され、孵化場および養魚池における IHN による被害は大幅に軽減された。しかし、1980 年代になり、養殖場で飼育中の比較的大型のニジマスで IHN による被害が発生するようになり、産業上新たな問題となった。IHN は本来稚魚期の病気であり、3g 以上の幼魚から成魚においては IHN の発生が殆ど認められなかったことから、日本のニジマス養殖環境において IHNV の病原性に大きな遺伝的変異が生じたのではないかと推察されている。そこで本研究では、第 1 章において、静岡県および長野県で 2006 年に IHN 罹病および健常ニジマスから分離された新たな IHNV 株を用い、IHNV の遺伝的変異とニジマスに対する病原性の関係について検討し、さらに第 2 章では、養殖場における IHN 対策として、非病原性の伝染性膵臓壊死症ウイルス (infectious pancreatic necrosis virus, IPNV) あるいは合成二本差 RNA である Poly(I:C) を用いた新たな免疫法を検討した。

IHNV のゲノムは、約 11,000 塩基の非分節マイナス鎖の RNA で、nucleocapsid protein (N), glycoprotein (G), matrix protein (M), phosphoprotein (P), non-virion protein (NV) および

large protein (L, polymerase) の6つの遺伝子がコードされる。この内、G 遺伝子は、IHNV の感染因子をコードしていることから、IHNV の遺伝子解析に古くから用いられている。そこで、第1章では、2000年代に分離された静岡県下のニジマス由来 IHNV 3株、長野県下のニジマス株2株および愛知県下のニジマス株2株のG 遺伝子の塩基配列を解析し、1970年から1980年代にかけて分離された日本株および世界各地での分離株を含む計49株を用い、IHNV の分子系統学的解析を行った。その結果、1970年代に分離された IHNV 株は、何れも genogroup U に属する米国株と高い類似性を示したが、1990年以降の分離株は遺伝的に大きく変異していることが明らかになり、さらに1990年以降のウイルス株には、分子進化的に独立した2系群 (JRt Shizuoka 系および JRt Nagano 系) が存在することが明らかになった。興味深いことに日本株における IHNV G 遺伝子の多様度は7%であり、北米株間で認められた多様度 (3.6%) を大幅に上回っていたことから、1970年代に米国より日本に持ち込まれた IHNV は、日本のニジマス養殖環境に適応した後、急速な進化を遂げたことが裏付けられた。そこで、JRt Shizuoka 系および JRt Nagano 系の代表株を用い、各々のニジマスに対する病原性を比較した。その結果、JRt Shizuoka 系 IHNV 株の病原性が JRt Nagano 系株に比べ高いことが明らかになった。一方、Mochizuki (2008) は、1970年代にシロサケ病魚より分離された IHNV 株 (ChAb76) がニジマスに対し殆ど病原性を示さないことを示している。従って、ニジマス養殖環境下で急速に進化した IHNV 日本株は、ニジマスに対する病原性の点でも変化していると考えられた。

ところで、先に示した防除対策により、孵化場などの隔離施設での IHN 発生を制御することが可能になったが、養魚池において同様の防除対策を実施することは極めて困難である。そこで、より積極的な防除対策として IHNV ワクチンの開発が切望され、これまでにホルマリン不活化ワクチン、弱毒ワクチン、ウイルス粒子成分ワクチン、DNA ワクチンなど様々なワクチンの開発が試みられているが、安定した防御効果が得られないことや遺伝子組換え体使用の問題から、日本において市販には至っていない。これらの原因が、日本のニジマス養殖環境での IHNV の急速な遺伝的変化および病原性の変化に起因する可能性が極めて高い。そこで第2章では、これら IHNV の急速な変化に対応可能な新しい免疫方法「Poly(I:C) 免疫法」について検討した。

これまでの研究において、非病原性の IPNV に予め感染したニジマスは、魚体内にイ

インターフェロン (IFN) が誘導されることで抗ウイルス状態になり、IHNV 等の病原ウイルスに対し強い抵抗性を示すことが明らかになっている。本研究においても、予め IPNV に感染したニジマスに IHNV で攻撃したところ、その生残率は 68.8%で、対照区の生残率 (0%) に比べ明らかに高いことを確認した。また、IPNV-IHNV 区の生残魚を IHNV で再攻撃したところ 92%の生残率で、その生残率は陽性対照区 (IPNV-Mock 区) の生残率 (4%) を大幅に上回った。さらに、IPNV-IHNV 区の生残魚血清から、IHNV に対する特異抗体が検出されたことから、IPNV 感染魚が IHNV に対し抵抗性を示すだけでなく、IHNV 攻撃後に IHNV に対する特異免疫が成立していることが明らかになった。すなわち、非病原性 IPNV 接種に続き IHNV を接種することで、ニジマスを殺すことなく IHNV に対する免疫を誘導することが可能であることが示された。しかしながら、非病原性であるとはいえ IPNV を養殖現場で用いることは望ましくない。そこで、IFN 誘導物質である合成二本鎖 RNA である Poly(I:C)が、IPNV の代替えとして利用可能かどうかについて検討した。まず、Poly(I:C) を接種したニジマスに IHNV で攻撃したところ、生残率は 95.7%であった (陽性対照区の生残率は 10%)。さらに、Poly(I:C)-IHNV 区の生残魚を IHNV で攻撃したところ全ての魚が生残し (陰性対照区の生残率: 0%)、Poly(I:C)-IHNV 区の生残魚から IHNV に対する特異抗体が検出された。すなわち、IPNV の代替えとして Poly(I:C)を用いた場合においても、魚体内で INF が誘導され非特異的な抗ウイルス状態となり、この間に IHNV 等の病原ウイルスを接種することで、接種したウイルスに対する特異免疫が誘導できることが示された。本研究で確立した Poly(I:C) 免疫法は、以下の点で既存のワクチンとは異なる。1) Poly(I:C) は他の RNA 同様不安定であることから、DNA ワクチンと異なり接種魚体内に残存しない。従って、Poly(I:C) 接種魚の食品としての安全性が担保される。2) ウイルス不活化操作が不要であることから、分離培養の困難であるウイルス、あるいは未同定のウイルスに対しても応用可能である。3) 遺伝子組換え操作が不要であることから、ワクチン開発の時間とコストが大幅に軽減され、さらに遺伝子組換え食品に否定的な消費者にも受け入れられる可能性が高い。以上の点から、本研究で開発した Poly(I:C) 免疫法は、今後様々な魚種の様々なウイルス病に応用されることが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守  
副 査 教 授 澤 辺 智 雄  
副 査 准教授 西 澤 豊 彦

学 位 論 文 題 名

## A Novel Immunization Method for Protection of Rainbow Trout from Infectious Hematopoietic Necrosis Virus (IHNV)

(新しい免疫手法による伝染性造血器壊死症ウイルスの防除に関する研究)

伝染性造血器壊死症 (IHN) は、ラブドウイルス科ノビラブドウイルス属の IHN ウィルス (IHNV) によるウイルス感染症である。本病は、元々北米西海岸の風土病であったが、IHNV 汚染卵の移動により世界各地に広がった。日本でも、1971 年に発生し各地に広がった。防除対策により、孵化場内の池出し前の IHN による被害は軽減されたが、1980 年代に比較的大型の養殖ニジマスで IHN による被害が発生するようになった。IHN は、本来稚魚期の病気であり、幼魚から成魚での発生は殆ど認められなかったことから、日本のニジマス養殖環境において IHNV の病原性に変異が生じたと推察されている。そこで本研究では、第 1 章において、2006 年に静岡県および長野県のニジマスから分離された IHNV 株を用い、IHNV の遺伝的変異とニジマスに対する病原性の関係について検討し、さらに第 2 章では、養殖場における IHN 対策として、非病原性の伝染性脾臓壊死症ウイルス (IPNV) あるいは合成二本鎖 RNA である Poly(I:C) を用いた新たな免疫法について検討した。

第 1 章では、2006 年に静岡県、長野県下および愛知県下のニジマスから分離された計 7 株の G 遺伝子の塩基配列を解析し、1970 年から 1990 年代に分離された世界各地の分離株と共に分子系統学的解析に供した。その結果、1970 年代に分離された IHNV 株は、何れも genogroup U に属する米国株と高い類似性を示したが、1990 年以降の分離株は遺伝的に大きく変異していることが明らかになり、さらに 1990 年以降のウイルス株には、分子進化的に独立した 2 系群 (JRt Shizuoka 系および JRt Nagano 系) が存在することが明らかになった。また、日本株における IHNV G 遺伝子の多様度は 7% であり、北米株間で認められた多様度 (3.6%) を大幅に上回ることから、1970 年代に米国より日本に持ち込まれた IHNV は、日本のニジマス養殖環境に適応した後、急速な進化を遂げたことが裏付けられた。そこで、JRt Shizuoka 系および JRt Nagano 系の代表株を用い、各々のニジマスに対する病原性を比較したところ、JRt Shizuoka 系 IHNV 株の病原性が JRt Nagano 系株に比べ高

いことが明らかになった。一方、1970年代に分離された IHNV 株 (ChAb76) はニジマスに対し殆ど病原性を示さなかったことから、IHNV 日本株はニジマス養殖環境下での急速な進化に伴い、ニジマスに対する病原性も変化したと考えられた。

ところで、防除対策により隔離施設内の IHN 制御は可能になったが、養魚池での防除対策には限界があり、積極的な防疫対策としてワクチンの開発が不可欠である。第2章では、IHNV の急速な変化に対応可能な新しい免疫方法「Poly(I:C) 免疫法」について検討した。これまでに、非病原性の IPNV に感染したニジマスは、インターフェロン (IFN) が誘導され抗ウイルス状態になり、IHNV 等の病原ウイルスに対し抵抗性を示すことが知られている。本研究でも、予め IPNV に感染したニジマスに IHNV で攻撃したところ、その生残率が対照区に比べ明らかに高いことを確認した。また、IPNV-IHNV 区の生残魚を IHNV で再攻撃したところ生残率は 92%で、陽性対照区 (IPNV-Mock 区) の生残率 (4%) を大幅に上回った。さらに、IPNV-IHNV 区の生残魚血清から、IHNV に対する特異抗体が検出されたことから、IPNV 感染魚が IHNV に対し抵抗性を示すだけでなく、IHNV 攻撃後に IHNV に対する特異免疫が成立していることが明らかになった。すなわち、非病原性 IPNV 接種に続き IHNV を接種することで、ニジマスを殺すことなく IHNV に対する免疫を誘導できることが示された。次に、IPNV の代替えとして、IFN 誘導物質である合成二本鎖 RNA である Poly(I:C)の利用について検討した。Poly(I:C)を接種したニジマスを IHNV で攻撃したところ、生残率は 95.7%であった (陽性対照区の生残率は 10%)。Poly(I:C)-IHNV 区の生残魚を IHNV で攻撃したところ全てが生残し、さらに Poly(I:C)-IHNV 区の生残魚から IHNV に対する特異抗体が検出された。すなわち、IPNV の代替えとして Poly(I:C)を用いても、魚体内で INF が誘導され非特異的な抗ウイルス状態となり、この間に IHNV 等の病原ウイルスに感染すると、曝露されたウイルスに対する特異免疫が誘導できることが示された。本研究で開発した Poly(I:C) 免疫法は、今後様々な魚種の様々なウイルス病にも応用されることが期待される。

以上、本研究は、IHNV が今なお急速な進化を続けていることを、さらにその対策として新しいコンセプトの免疫法を考案し、その実用性を科学的に示したものである。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。