

学 位 論 文 題 名

ウイルス性神経壊死症における
ウイルス混合感染の重要性とその対策

学位論文内容の要旨

我が国の水産増養殖業では、多くの魚種を対象とした生産技術が確立されてきたが、それに伴い様々な病気が発生し大きな問題となっている。特にウイルス病では実用的な治療法がなく、種苗生産施設などの隔離施設においては、親魚選別、卵消毒、飼育水の殺菌等の防除対策に重点が置かれてきた。一方、天然環境からの隔離が困難である養殖場においては、防除対策に加え予防免疫等の積極的な対策が不可欠であり、魚類ウイルス病に対する様々なワクチンが開発されてきた。しかしながら、開発された魚類ウイルスワクチンの多くは、実験的には十分な防御効果が認められるものの、養殖現場において安定的な防御効果が認められず、市販には至らない現状にある。本研究では、養殖現場におけるワクチン効果の不安定性がウイルス混合感染に起因すると考えた。即ち、養殖現場で混合感染症が発生した場合、一方の病原ウイルスに対するワクチンを投与したとしても、他方のウイルスによる死亡を抑えることは不可能であり、これが現場におけるワクチン効果の不安定性に繋がると考えた。そこで、マハタ *Epinephelus septemfasciatus* のウイルス神経壊死症 (viral nervous necrosis, VNN) をモデルとし、第 1 章では、VNN の原因ウイルスである魚類ノダウイルスの増殖性が、混合感染しているレトロウイルスにより亢進されることを *in vitro* で明らかにし、次いで第 2 章では、長崎県下で発生したマハタの VNN はノダウイルス以外の病原ウイルスが存在する混合感染であることを明らかにした。さらに第 3 章では、ウイルス混合感染にも対応可能な新しい免疫法である Poly (I:C) 免疫法の効果および用法・用量についてマハタ VNN をモデルに検証し、総合考察においてウイルス混合感染の重要性と対策について提言した。

VNN の原因ウイルスである魚類ノダウイルスは、ノダウイルス科ベーターノダウイルス属に属するエンベロープを持たない小型球形の RNA ウイルスで

ある。本ウイルスの培養には、ストライプト・スネークヘッド *Ophicephalus striatus* 由来の SSN-1 細胞が多用される。SSN-1 細胞がレトロウイルス (snakehead retrovirus, SnRV) に持続感染していることが明らかにされているが、SnRV の存在がノダウイルスの増殖にどのように影響しているのかについては明らかにされていない。そこで第 1 章では、まず、ブルーギル *Lepomis macrochirus* 由来 BF-2 細胞を用い、SnRV 持続感染細胞 (PI-BF-2 細胞) を作出し、BF-2 および PI-BF-2 細胞のノダウイルス産生量を比較することでノダウイルスの増殖性に対する SnRV の影響について検討した。その結果、PI-BF-2 細胞におけるノダウイルスの産生量は、BF-2 細胞に比べ 50-100 倍以上高くなったことから、SnRV がノダウイルスの増殖性を大幅に亢進することが明らかになった。また、魚類ノダウイルスは RNA ウイルスであるため、通常 DNA 型のウイルスゲノムは存在しない。しかし、ノダウイルスを接種した PI-BF-2 細胞においてノダウイルスの DNA 型ゲノムが検出された。本 DNA 型ゲノムは、混合感染している SnRV 由来の逆転写酵素により産生されたと考えられた。

次いで第 2 章では、長崎県下で発生したマハタの VNN において、ノダウイルス以外のウイルスとの混合感染が起こっていることで、ノダウイルスワクチンで十分な防御効果が認められないことを実証した。まず、VNN 罹病魚の脳磨碎濾液または同脳磨碎濾液を中性界面活性剤である Triton X-100 で処理し、エンベロープを持つウイルスを除去した脳磨碎濾液から調製したホルマリン不活化ワクチンを投与したマハタを、病魚脳磨碎濾液で攻撃したところ、病魚脳磨碎液不活化ワクチン投与区での生残率は 96 %であったのに対し、Triton X-100 処理脳磨碎濾液不活化ワクチン投与区の生残率は 57 %となり、両区で大きな差異が認められた。次いで、病魚脳磨碎濾液のマハタに対する半数致死量 (LD_{50}) を求めたところ、同液の LD_{50} はノダウイルス量に換算して $10^{1.5}$ TCID₅₀ / fish であった。これに対し、同脳磨碎濾液より分離した培養ノダウイルスの LD_{50} は $10^{3.4}$ TCID₅₀ / fish であった。即ち、病魚脳磨碎濾液のマハタに対する LD_{50} は、培養ノダウイルスの約 1/100 であることが示された。以上の結果から、病魚脳磨碎濾液にノダウイルス以外の病原ウイルスが存在することが示され、長崎県下の VNN マハタはウイルス混合感染症であることが明らかになった。エンベロープを持たないノダウイルスの病原性は、Triton X-100 で処理しても低下しないが、病魚脳磨碎濾液を Triton X-100 で処理するとその病原性は半減した。さらに、Triton X-100 処理病魚脳磨碎濾液に SnRV を添加してもその病原性が戻らなかったことから、病魚脳磨碎濾液中に存在するノダウイルス以外の病原ウイルスは、エンベロープを持つウイルスであるが、SnRV とは異なる

ウイルスであると考えられた。

第2章では、ウイルス混合感染において、病魚脳磨砕濾液をホルマリンで不活化したワクチンを投与することで十分な防御効果が誘導可能であることを示したが、病魚脳磨砕濾液を安定的かつ大量に生産することは困難である。そこで第3章では、ウイルス混合感染症を視野に入れた新しい免疫方法として、インターフェロン (IFN) 誘導物質である Poly (I:C) を用いた免疫法の有効性および用法・用量について検討した。まず、Poly (I:C) を投与したマハタをノダウイルスで攻撃したところ、一尾の死亡も認められず、Poly (I:C) の投与により、マハタが抗ウイルス状態になることが確認された。また、これらの生残魚からノダウイルスに対する特異抗体が検出されたこと、さらに生残魚をノダウイルスで再攻撃しても死亡が認められなかったことから、Poly (I:C) に続きノダウイルスを接種することで、ノダウイルスに対する特異免疫が誘導されることが明らかになった。次いで、Poly (I:C) の用法・用量について検討したところ、Poly (I:C) を 50 μg / fish 以上投与し、投与直後から4日以内にウイルスを接種することで、ウイルスに対する免疫が誘導可能であることが明らかになった。本 Poly (I:C) 免疫法は、魚類体内で IFN を誘導することで魚類を抗ウイルス状態 (非特異的) とし、この間に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を誘導する方法である。即ち、未同定のウイルスあるいは分離・培養が困難なウイルスに対しても応用が可能である。従って、第2章で述べたウイルス混合感染症に対しても Poly (I:C) 免疫法が十分有効であると考えられた。

以上、本研究では、ノダウイルスワクチンが効かなかった原因がウイルス混合感染症であることを明らかにしたが、これはマハタ VNN に限定されるものではない。養殖現場で期待されたワクチン効果が認められない場合、一病気に一病原体という概念に囚われることなく、ウイルス混合感染症を疑い、対策を立てる必要があると考える。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守
副 査 教 授 都 木 靖 彰
副 査 准教授 西 澤 豊 彦

学 位 論 文 題 名

ウイルス性神経壊死症における ウイルス混合感染の重要性とその対策

我が国の水産増養殖業では多くの魚種を対象とした生産技術が確立されてきたが、それに伴い様々な病気が発生し問題となっている。特にウイルス病では実用的な治療法がなく、種苗生産施設など隔離施設においては、防除対策に重点が置かれている。一方、天然環境からの隔離が困難である養殖場においては、予防免疫等の防疫対策が不可欠であり、魚類ウイルス病に対する様々なワクチンが開発されてきた。しかし、開発されたワクチンの一部は、実験的には十分な防御効果が認められるものの、養殖現場において安定的な防御効果が認められないものもある。本研究では、養殖現場におけるワクチン効果の不安定性がウイルス混合感染に起因すると考えた。マハタ *Epinephelus septemfasciatus* のウイルス神経壊死症 (viral nervous necrosis, VNN) をモデルとし、第 1 章では、VNN の原因ウイルスである魚類ノダウイルスの増殖性が混合感染しているレトロウイルスにより亢進されることを *in vitro* で明らかにし、次いで第 2 章では、長崎県下で発生したマハタの VNN はノダウイルス以外の病原ウイルスが存在する混合感染症であることを明らかにした。さらに第 3 章では、ウイルス混合感染症にも対応可能な Poly (I:C) を用いた免疫法の効果および用法・用量について魚類ノダウイルスをモデルに検証し、総合考察においてウイルス混合感染の重要性と対策について提言した。

魚類ノダウイルスの培養には、ストライプト・スネークヘッド *Ophicephalus striatus* 由来の SSN-1 細胞が多用される。SSN-1 細胞はレトロウイルス (snakehead retrovirus, SnRV) に持続感染していることが明らかにされているが、SnRV の存在がノダウイルスの増殖にどのように影響しているのかは明らかにされていない。そこで第 1 章では、まず、ブルーギル *Lepomis macrochirus* 由来 BF-2 細胞を用い、SnRV 持続感染細胞 (PI-BF-2 細胞) を作出し、BF-2 および PI-BF-2 細胞のノダウイルス産生量を比較することでノダウイルスの増殖性に対する SnRV の影響について検討した。その結果、PI-BF-2 細胞におけるノダウイルスの産生量は、BF-2 細胞に比べおよそ 100 倍高くなったことから、SnRV がノダウイルスの増殖性を大幅に亢進することが明らかになった。

次いで第 2 章では、長崎県下で発生したマハタの VNN において、ノダウイルス以外のウ

イルスとの混合感染により、ノダウイルスワクチンで十分な防御効果が認められないことを実証した。まず、VNN 罹病魚の脳磨碎濾液または同脳磨碎濾液を中性界面活性剤である Triton X-100 で処理し、エンベロープを持つウイルスを除去した脳磨碎濾液から調製したホルマリン不活化ワクチンを投与したマハタを、病魚磨碎濾液で攻撃したところ、病魚脳磨碎液不活化ワクチン投与区での生残率は 96 %であったのに対し、Triton X-100 処理脳磨碎濾液不活化ワクチン投与区での生残率は 57 %となり、両区で大きな差異が認められた。次いで、病魚脳磨碎濾液のマハタに対する半数致死量 (LD_{50}) を求めたところ、同液の LD_{50} はノダウイルス量に換算して $10^{1.5}$ TCID₅₀/fish であったのに対し、培養ノダウイルスの LD_{50} は $10^{3.4}$ TCID₅₀/fish となり、病魚脳磨碎濾液のマハタに対する LD_{50} は、培養ノダウイルスの約 1/100 であることが示された。以上の結果から、病魚脳磨碎濾液にノダウイルス以外の病原ウイルスが存在することが示され、長崎県下の VNN マハタはウイルス混合感染症であることが明らかになった。

第 3 章では、ウイルス混合感染症を視野に入れた新しい免疫方法として、インターフェロン (IFN) 誘導物質である Poly (I:C) を用いた免疫法の有効性および用法・用量について検討した。まず、Poly (I:C) を投与したマハタをノダウイルスで攻撃したところ、死亡は認められず、Poly (I:C) の投与により、マハタが抗ウイルス状態になることが確認された。また、これらの生残魚からノダウイルスに対する特異抗体が検出されたこと、さらに生残魚をノダウイルスで再攻撃しても死亡が認められなかったことから、Poly (I:C) に続きノダウイルスを接種することで、ノダウイルスに対する特異免疫が誘導されることが明らかになった。次いで、Poly (I:C) の用法・用量について検討したところ、Poly (I:C) を 50 μ g / fish 以上投与し、投与直後から 4 日以内にウイルスを接種することで、ウイルスに対する免疫が誘導可能であることが明らかになった。

以上、本研究は、現場でノダウイルスワクチンの効果が不安定であった原因がウイルス混合感染症であることを明らかにし、その対策として Poly (I:C) 免疫法が応用可能であることを示したものである。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。