

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07565

研究課題名(和文)動物プランクトンは魚類ウイルス性疾患の感染源になるのか

研究課題名(英文)Possibility of zooplankton as an infectious source for fish viral disease

研究代表者

伊東 尚史 (Ito, Takafumi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・グループ長

研究者番号：70372050

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：モデル動物プランクトンとしてミジンコを用い、動物プランクトンがウイルス性疾患の感染源になるのか調べた。VHSV、CyHV-2及びCyHV-3を対象に研究を行った。VHSVではミジンコ体内からVHSVがEPC細胞を用いて分離されたものの、CyHV-2及びCyHV-3では分離されなかった。各ウイルス液に1日間浸漬したミジンコをVHSVではニジマスに、CyHV-2ではキンギョに、CyHV-3ではコイに摂餌させたが、いずれも疾患は起こらなかった。その要因は各ウイルスが消化過程で不活化されるためと推察された。これらより、動物プランクトンが魚類ウイルス性疾患の感染源になる可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to assess whether infectious piscine pathogenic viruses such as viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV), Cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2) and Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) can remain viable in crustacean zooplankton and can be transferred to and remain viable in a fish host. Since water fleas are cultivable under laboratory condition, water flea (*Moina macrocopa*) was adopted as a model crustacean zooplankton. This study demonstrated that VHSV can be taken up from the environmental water by water fleas and can remain viable within water fleas for several days. CyHV-2 and CyHV-3 do however not isolate from the water fleas. No mortality was observed in rainbow trout, goldfish and carp which were fed the water fleas contaminated with piscine pathogenic viruses during 14 days. Thus, it is unlikely that this crustacean act as a mechanical vector of VHSV, CyHV-2 and CyHV-3 to rainbow trout, goldfish and carp, respectively.

研究分野：魚病学

キーワード：魚病 ミジンコ VHSV CyHV-2 CyHV-3 ウイルス動態

## 1. 研究開始当初の背景

養殖・天然を問わず、魚類に対して様々なウイルス性疾病が存在し、これまでそれら病原ウイルスの特性や疾病予防及び軽減法など数多くの研究がなされている。これらウイルス病の伝播形態についても、感染魚や感染魚が生息する環境水を介する水平感染や感染親魚からの垂直感染が疾病蔓延の原因であると報告されている。しかし、魚類が仔稚魚期に摂餌する動物プランクトンがウイルス疾病の感染源となるかについては報告がない。最近、Faisal & Winters (2011)は北米五大湖の甲殻類の一種から魚類病原ウイルスのひとつで五大湖の天然魚の大量死の原因となったウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV)を分離している。Faisal & Winters (2011)は甲殻類(*Diporeia* spp)の外側をエタノールで消毒した後、魚類株化細胞を用いてVHSVを分離しており、ウイルスは甲殻類の体内で感染性を保持していたと考えられる。VHSVは五大湖のほぼ全域から採取された *Diporeia* spp から分離されており、この結果からVHSVは本甲殻類の体内に長期間存在していることと推察される。また、VHSVに感染した小型魚類(Fathead Minnow)を摂餌した大型魚類(Tiger Muskellunge)がVHSVに感染することも知られている(Getchell et al. 2013)。

これら最近の報告を考えあわせると、動物プランクトンが魚類病原ウイルスに感染または体内に取り込まれ、その動物プランクトンが魚類ウイルス性疾病のベクターとなり、それを摂餌した魚類が発病する新たな感染ルートが存在する可能性が出てきた。

## 2. 研究の目的

そこで、本研究では動物プランクトンが魚類

ウイルス性疾病の感染源になるかどうかを明らかにするため、ウイルスフリーで純培養できるミジンコを用いて、ミジンコに対するVHSV、CyHV-2及びCyHV-3の人為的感染実験を行い、魚類病原ウイルスがミジンコに感染するかどうか明らかにすること、またウイルスで汚染したミジンコをVHSVではニジマス、CyHV-2ではキンギョ、CyHV-3ではコイにそれぞれ摂餌させ、経口感染が成立するかどうか明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 各ウイルス液に浸漬したミジンコからのウイルス分離

ミジンコ (*Moina macrocopa*) の培養には3cm程度に切った稲わらと市販されているカニ殻等を主成分とするミジンコ繁殖促進飼料とを混合しオートクレーブしたものを使い、ウイルスフリーで培養した。本実験に使用したミジンコは1個の耐久卵から培養を行い、さらにクローニングした後実験に供した。VHSVでは供試ウイルス株としてDK-3592B株(遺伝子型Ia)を使用し $10^3$ 、 $10^5$ 及び $10^7$ TCID<sub>50</sub>/mLのウイルス液に浸漬し、浸漬開始後3、24、48、72及び144時間に、EPC細胞(Fijan et al. 1983)を用いてVHSVがミジンコの体内から分離されるかどうか調べた。ウイルスが分離された場合には感染細胞よりRNAを抽出し、VHSV特異プライマーを用いたRT-PCRにより分離ウイルスがVHSVかどうか同定を行った。また、ミジンコを $10^8$ TCID<sub>50</sub>/mLのVHSV液に浸漬し、浸漬開始後24、48及び72時間にミジンコ体内のVHSVのウイルス力価を測定した。なお、ミジンコからのウイルス分離及びミジンコ中のウイルス力価を測定する際には、ミジンコの外部に

付着しているウイルスのコンタミを防ぐため、  
先ず MEM 培地で洗浄した後、次いで体表を

Table 1. VHSV ウイルスに浸漬されたミジンコのウイルス分離結果

Immersion duration (h)	Virus concentration (TCID <sub>50</sub> ml <sup>-1</sup> )	Detection of VHSV in samples	
		Immersion medium	<i>M. macrocopa</i> with ethanol *
3	10 <sup>7</sup>	+	+
	10 <sup>6</sup>	+	-
	10 <sup>5</sup>	+	-
	0 (negative control)	-	-
24	10 <sup>7</sup>	+	+
	10 <sup>6</sup>	+	+
	10 <sup>5</sup>	+	-
	0 (negative control)	-	-
48	10 <sup>7</sup>	+	+
	10 <sup>6</sup>	+	+
	10 <sup>5</sup>	-	-
	0 (negative control)	-	-
72	10 <sup>7</sup>	+	+
	10 <sup>6</sup>	+	+
	10 <sup>5</sup>	-	-
	0 (negative control)	-	-
144	10 <sup>7</sup>	+	+
	10 <sup>6</sup>	-	-
	10 <sup>5</sup>	-	-
	0 (negative control)	-	-

エタノールで消毒し、さらに MEM 培地で再度洗浄した後実施した。

Cyprinid herpesvirus-2 (CyHV-2)では供試ウイルス株として SaT-1 株を用い 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL のウイルス液に浸漬し、浸漬開始後 24、48 及び 72 時間に、GFF 細胞 (Li & Fukuda 2003, Ito et al. 2013) を用いて CyHV-2 がミジンコの体内から分離されるかどうか調べた。Cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3)では供試ウイルス株として KHV0301 株を用い 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL のウイルス液に浸漬し、浸漬開始後 24、48 及び 72 時間に、CCB 細胞 (Neukirch et al. 1999) を用いて CyHV-3 がミジンコの体内から分離されるかどうか調べた。

(2) 各ウイルス液に浸漬したミジンコの経口投与実験

10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 程度の VHSV を保持しているミジンコを 1 日に 40 個体、平均体重 0.4g のニジマスに 2 週間摂餌させ、さらに市販飼料を与え 2 週間飼育し VHSV の発症の有無を観察した。陽性対照区として DK-3592B 浸漬区及

びミジンコの浸漬液に供試魚を浸漬させる区を設けた。また、陰性対照区としてウイルス液に浸漬していないミジンコを摂餌させる区を設けた。CyHV-2 及び CyHV-3 では 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL のウイルス液に 1 日間浸漬したミジンコを CyHV-2 ではキンギョに、CyHV-3 ではコイに毎日 2 週間摂餌させ、さらに 2 週間死亡を観察し、キンギョではキンギョヘルペスウイルス病が、コイではコイヘルペスウイルス病が発症するかどうか調べた。ミジンコの体表に付着しているウイルスからの感染を防ぐため、試験 (1) と同様に各供試魚へ給与されたミジンコは体表を MEM 培地で洗浄した後エタノールで消毒し、さらに MEM 培地で再度洗浄したものを与えた。

(3) ニジマス消化物及び幽門垂抽出液中における VHSV の力価の変動

ニジマス消化内容物の VHSV への影響を調べるため、10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL の VHSV 溶液を MEM、市販飼料、ニジマスの胃内容物及びニジマス幽門垂の抽出液に懸濁させ、懸濁後 0、1、2、4 及び 6 時間後にウイルス力価を EPC 細胞を用いて測定した。各ウイルス力価の測定はトリプリケイトで実施し、試験結果は Student's t-test で有意差検定を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 各ウイルス液に浸漬したミジンコからのウイルス分離

VHSV 液に浸漬したミジンコからウイルス分離した結果、10<sup>7</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 浸漬区では浸漬開始 3 時間~6 日後、10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 浸漬区では浸漬開始 1 日~2 日後のミジンコからウイルスが EPC 細胞を用いて分離された (Table 1)。さらに RT-PCR 法により分離ウイルスは

VHSV であることを確認した。なお  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL 浸漬区及び陰性対象として用いたミジンコ用培養液に浸漬したミジンコからはいずれもウイルスは検出されなかった。また、 $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL の VHSV に暴露されたミジンコ体内のウイルス力価の変動を調べた結果、ウイルスに暴露されたミジンコはおよそ  $10^3 \sim 10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL の VHSV を 3 日間は保持していることが示された (Table 2)。これらのことから、環境水中の VHSV は感染性を有した状態でミジンコの体内に保たれることが推察された。

Table 2. VHSV ウイルスに浸漬されたミジンコ体内のウイルス力価

Immersion duration (h)	Sample	Virus titer (TCID <sub>50</sub> ml <sup>-1</sup> or sample <sup>-1</sup> )
24	Immersion medium	$10^{3.3} \sim 10^{7.8}$
	<i>M. macrocopa</i>	$10^{1.5} \sim 10^{4.7}$
48	Immersion medium	$10^{7.8} \sim 10^{7.9}$
	<i>M. macrocopa</i>	$10^{1.3} \sim 10^{5.1}$
72	Immersion medium	$10^{7.5} \sim 10^{7.7}$
	<i>M. macrocopa</i>	$10^{1.8} \sim 10^{4.7}$

CyHV-2 及び CyHV-3 液に浸漬したミジンコをウイルス分離した結果、試験した最も高いウイルス濃度である  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL 区でも浸漬した 1~3 日間を通し、いずれのウイルスも分離されなかった。したがって、CyHV-2 及び CyHV-3 は  $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL 程度ではミジンコ体内に残存しない可能性が推察された。一方でこれらのウイルスの分離に用いている魚類株化細胞の感度の低さが本結果を導いた要因である可能性も危惧された。

## (2) 各ウイルス液に浸漬したミジンコの経口投与実験

VHSV を保持しているミジンコをニジマスに 2 週間摂餌させ、さらに 2 週間飼育し VHSV の発症の有無を観察したが、VHSV は発症しなかった。また、全ての生残魚の腎臓からウイルスは分離されず、RT-PCR も陰性であった。なお、陽性対照区である DK-3592B 浸漬区及び

ミジンコの浸漬液に供試魚を浸漬させる区の累積死亡率はそれぞれ 90% 及び 20% であった (Table 3)。

Table 3. 経口感染細胞における累積死亡率と死亡魚及び生残魚からの VHSV 検出結果

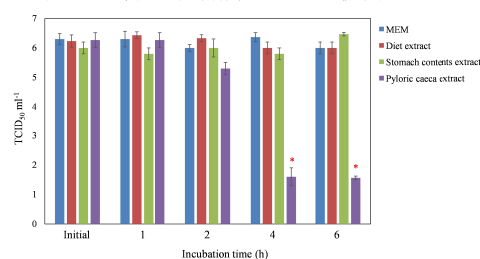
Group	Cumulative mortality (%)	Dead fish (positive/total)		Surviving fish (positive/total)	
		Cell culture	RT-PCR	Cell culture	RT-PCR
Fed VHSV-contaminated <i>Moina macrocopa</i>	-1 0 0 Mean	0 0 0 0	- - - -	0/30 0/30 0/30 0/30	0/30 0/30 0/30 0/30
Washing medium after disinfection with ethanol	-1 -2 0 Mean	0 0 0 0	- - - -	0/30 0/30 0/30 0/30	0/30 0/30 0/30 0/30
Immersion medium	-1 -2 0 Mean	13 27 20 20	4/4 8/8 8/8 8/8	4/4 8/8 8/8 8/8	2/26 1/22 0/22 0/22
DK-3592B (positive control)	93	28/28	28/28	0/2	0/2
Fed non-treated <i>M. macrocopa</i>	0	-	-	0/30	0/30

CyHV-2 及び CyHV-3 についても同様にウイルス液に 1 日間浸漬したミジンコを CyHV-2 ではキンギョに、CyHV-3 では 2 週間摂餌させ、さらに 2 週間死亡を観察したが、いずれのウイルスと魚種の組み合わせでもウイルスに暴露したミジンコを与えた魚で病気は起こらず、生残魚からもウイルスは検出されなかった。なお、CyHV-2 浸漬区及び CyHV-2-ミジンコ浸漬液区の累積死亡率はそれぞれ 83% 及び 43% であり、CyHV-3 浸漬区及び CyHV-3-ミジンコ浸漬液区の累積死亡率はそれぞれ 100% 及び 62% であった。

## (3) ニジマス消化物及び幽門垂抽出液中における VHSV の力価の変動

MEM、市販飼料及びニジマス胃内容物の抽出液中では VHSV のウイルス力価は実験期間の 6 時間に大きな変動は観察されなかった。しかし、ニジマス幽門垂の抽出液中では 15 分 4 時間後には  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/mL 以上減少し、この低下は他の試験区と比較し有意であった。

図 1 ニジマス消化物及び幽門垂抽出液中における VHSV の力価の変動



\* : 同じ保持時間における他の試験区に比べ有意差あり (p < 0.05)

## <引用文献>

- Faisal M, Winters AD (2011) Detection of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) from *Diporeia* spp. (Pontoporeiidae, Amphipoda) in the Laurentian Great Lakes, USA. *Parasit Vectors* 4:2
- Fijan N, Sulimanovic D, Bearotti M, Musinie D, Zwillenberg LD, Chilmonczyk S, Vantherot JF, deKinkilin P (1983) Some properties of the *Epithelioma papulosum cyprinii* (EPC) cell line from carp *Cyprinus carpio*. *Ann Virol* 134:207-22
- Getchell RG, Cornwell ER, Groocock GH, Wong PT, Coffee LL, Wooster GA, Bowser PR (2013) Experimental transmission of VHSV genotype IVb by predation. *J Aquat Anim Health* 25:221-229
- Li X, Fukuda H (2003) *In vitro* culture of goldfish cell sensitive to goldfish herpesvirus. *J Shanghai Fish Univ* 12:12-18
- Ito T, Kurita J, Ozaki A, Sano M, Fukuda H, Ototake M (2013) Growth of Cyprinid herpesvirus 2 (CyHV-2) in cell culture and experimental infection of goldfish *Carassius auratus*. *Dis Aquat Org* 105:193-202
- Neukirch M, Böttcher K, Bunnajirakul S (1999) Isolation of a virus from Koi with altered gills. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 19:221-224

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 1 件)

Takafumi Ito, Niels Jørgen Olesen, Viral haemorrhagic septicaemia virus remains viable for several days but at low levels in the water flea *Moina macrocopa* ( VHS ウイルスはミジンコ *Moina macrocopa* 中で数日間

生存しているが低レベルである。)

*Diseases of Aquatic Organisms*, 127, 11-18  
(2017) 査読有

DOI: <https://doi.org/10.3354/dao03185>

[ 学会発表 ] (計 2 件)

Takafumi Ito, Niels Jørgen Olesen, Viability of infectious viral hemorrhagic septicemia virus in water flea *Moina macrocopa* ( ミジンコ *Moina macrocopa* における感染性 VHS ウイルスの生存性 ) 第 10 回下等脊椎動物のウイルスに関する国際シンポジウム、2017 年 6 月 6 日、ブタペスト (ハンガリー)

Takafumi Ito, Niels Jørgen Olesen, Viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) remains viable within water flea *Moina macrocopa* over several days but at low levels ( VHS ウイルスはミジンコ *Moina macrocopa* 中で数日間生存しているが低レベルである。 ) 第 18 回ヨーロッパ魚病学会、2017 年 9 月 6 日、ベルファスト (英国)

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊東尚史 ( Takafumi Ito )  
国立研究開発法人水産研究・教育機構  
増養殖研究所 魚病研究センター  
グループ長  
研究者番号 : 7 0 3 7 2 0 5 0