

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 7 月 13 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K18747

研究課題名(和文)RNAウイルス感染時の宿主免疫応答を利用したエビ類の疾病診断法の確立

研究課題名(英文)Establishment of a disease diagnostic method for shrimp using host immune response during RNA virus infection

研究代表者

稲田 真理 (INADA, Mari)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・研究員

研究者番号：50723558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IMNV注射後3日目において5個体の血リンパをサンプリングし、RT-PCRにてIMNVの検出を行ったところ陽性となり、ウイルス感染試験が成立したことが確認された。

WSSV感染区のクルマエビの頭胸部および腹部において、WSSVのエンベロープ構成タンパク質の一つであるVP28をターゲットとし、ISHによるWSSVのVP28遺伝子の検出を試みたところ、胃の上皮細胞やリンパ様器官などで検出された。免疫関連遺伝子については、活性酸素合成系の遺伝子、サイトカイン関連遺伝子ではインターロイキン17受容体2、免疫応答や炎症の制御に関わるp38などの遺伝子の発現が増加傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：エビ類の免疫機構の一端が明らかになる。比較免疫学の観点から、病原体感染時のエビ類(宿主側)の免疫応答を調べることで、哺乳類などの脊椎動物との免疫機構の相違が明らかとなり、免疫系進化の理解につながる。ウイルス学の観点から、宿主侵入時の病原体の遺伝子発現を明らかにすることは、ウイルスの増殖機構・病原性発現機構の理解につながる。

社会的意義：現在有効性の評価が難しいエビ類のワクチンや免疫賦活剤の効果判定が可能となり、有効性の高いエビ類の水産用医薬品開発に貢献できる。本研究で開発した遺伝子マーカーはウイルス病の指標となるだけでなく、クルマエビの健康診断ツールとして使用できる。

研究成果の概要(英文)：On the third day after IMNV injection, blood lymph of five individuals was sampled for IMNV detection by RT-PCR, which was positive, confirming that the virus infection test was established.

In the cephalothorax and abdomen of WSSV-infected shrimp, VP28, one of the envelope component proteins of WSSV, was targeted, and detection of VP28 gene of WSSV by ISH was attempted, and WSSV DNA was detected in epithelial cells and lymph-like organs in the stomach. As for immune-related genes, there was an increasing trend in the expression of genes involved in reactive oxygen species synthesis, interleukin 17 receptor 2 in cytokine-related genes, and p38, which is involved in the regulation of immune response and inflammation.

研究分野：魚病

キーワード：クルマエビ WSSV IMNV

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エビ類の養殖が東南アジアをはじめ世界各地で盛んに行われているが、ピブリオ病やホワイトスポットウイルス(WSSV : white spot syndrome virus) 病などの感染症による被害が世界的に生じており、疾病対策が求められている。しかし、抗ウイルス作用を持つ抗体や水産用医薬品として認められたクルマエビ用の薬剤は我が国に無く、世界的にもエビ類に対する有効な疾病防除対策が無いのが現状である。したがって、エビ類の大量死が発生した際、可能な限り速やかに死因を特定し、まん延防止対策を講じることが被害軽減に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

エビ類の免疫系の一端を解明してウイルス病の新規診断法を確立し、エビ養殖においてこれまで実用化できていないウイルス病防除対策のブレークスルーを目的とする。

エビ類では不死化細胞株が樹立されておらず、魚類で用いられている細胞株を用いたウイルス病診断法はエビ類には適用できない。本研究では、ウイルス感染時におけるクルマエビの免疫応答の特徴と各感染症の進行過程における病態を明らかにし、ウイルス感染の指標となるエビ類の遺伝子マーカーの同定を行う。宿主の免疫応答を利用してエビ類のウイルス病の迅速診断法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 病原体感染エビの作製

本研究で用いる病原体を得るため、インドネシアのジェバラにある Main Center for Brackishwater Aquaculture (MCBA) において、病原体感染エビの作製を行った。MCBA に保管されている伝染性筋壊死症ウイルス (IMNV) を解凍し、現地で購入した平均体長 5 cm のバナメイエビ 11 個体に注射した。

(2) in situ ハイブリダイゼーション (ISH) および遺伝子発現解析

(1) で作製した IMNV 感染エビを -80 で凍結し、諸手続きを経て輸入し、当研究所において実験に用いた。クルマエビにおける WSSV (DNA ウイルスモデル) と IMNV (RNA ウイルスモデル) ウイルス感染時のウイルスの局在性と宿主の遺伝子発現パターンを調べるため、水温 25 において WSSV と IMNV をクルマエビに注射し、in situ ハイブリダイゼーション (ISH) および鰓、リンパ様器官、血リンパにおける遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 病原体感染エビの作製

IMNV 注射後 3 日目において 5 個体の血リンパをサンプリングし、RT-PCR にて IMNV の検出を行ったところ、5 個体中 4 個体のサンプルが陽性となり、IMNV を用いたウイルス感染試験が成立したことが確認された (図 1)。以上はインドネシア MCBA における実験である。

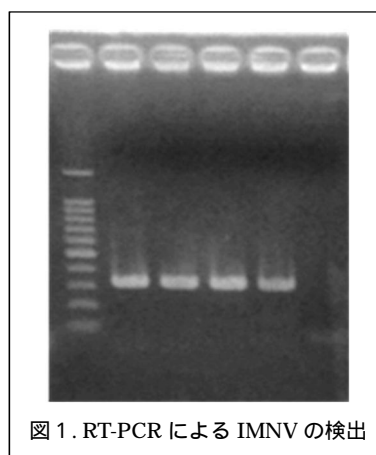


図 1. RT-PCR による IMNV の検出

(2) in situ ハイブリダイゼーション (ISH) および遺伝子発現解析

DNA ウイルスモデルである WSSV 感染区のカクルマエビの頭胸部および腹部において、WSSV のエンベロープ構成タンパク質の一つである VP28 をターゲットとし、ISH による WSSV の VP28 遺伝子の検出を試みたところ、胃の上皮細胞やリンパ様器官などで WSSV の DNA が検出された (図 2)。免疫関連遺伝子については、活性酸素合成系の遺伝子 (Nox や Duox)、造血、免疫、幹細胞維持などの生命を維持する上で欠かせない機能発現に関与する JAK/STAT シグナル伝達経路においては SOCS、RNA 干渉経路では Dicer2、Argo2、サイトカイン関連遺伝子では血管内皮細胞増殖因子 (VEGF1)、インターロイキン 17 受容体 2、免疫応答や炎症の制御に関わる p38 などの遺伝子の発現が増加傾向にあった (図 3)。

他方、RNA ウイルスモデルである IMNV 区に関しては、産休中にウイルスが失活し、ISH によるウイルスの組織局在性や免疫関連遺伝子の発現動態の一端を明らかにするには及ばなかった。

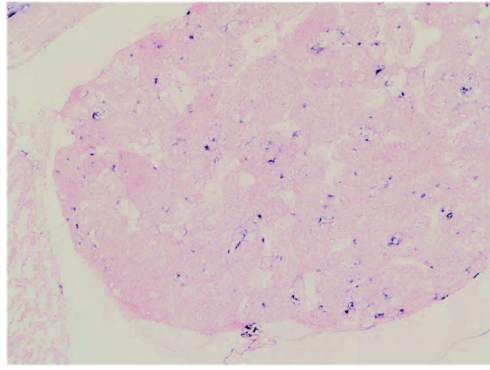


図 2. ISH による WSSV の VP28 遺伝子の検出

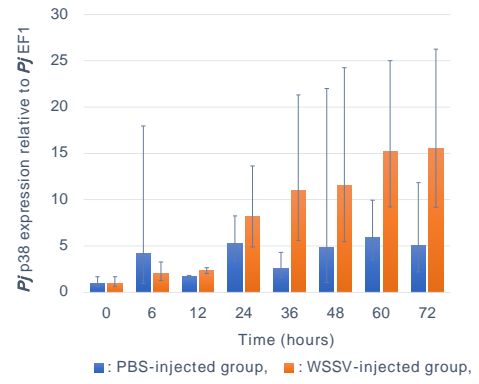


図 3. WSSV 感染時の p38 の遺伝子発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inada, M., Handayani, C.R., Kawato, Y., Mekata, T., Yuasa, K., Miwa, S.	4. 巻 51(4)
2. 論文標題 Modification of PCR program for detection of infectious myonecrosis virus	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 210-212
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3147/jsfp.51.210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inada, M., Mekata, T., Itami, T.	4. 巻 52(3)
2. 論文標題 White Spot Disease: WSD (= Penaeid Acute Viremia: PAV)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 115-120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3147/jsfp.52.115	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 稲田 真理 , 酒井 正博, 伊丹 利明
2. 発表標題 クルマエビのIL-17およびIL-17受容体の免疫応答と組織局在性に関する研究
3. 学会等名 日本比較免疫学会第29回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mari Inada, Christina Retna Handayani, Yasuhiko Kawato, Tohru Mekata, Kei Yuasa and Satoshi Miwa
2. 発表標題 Improvement of PCR Program for the Detection of Infectious Myonecrosis Virus (IMNV)
3. 学会等名 第10回アジア魚病学会国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲田 真理 , 酒井 正博, 伊丹 利明
2. 発表標題 クルマエビ(Marsupenaeus japonicus)のIL-17およびIL-17受容体の組織局在性に関する研究
3. 学会等名 平成29年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲田真理・河東康彦・米加田 徹・湯浅 啓・三輪 理・Christina Retna Handayani
2. 発表標題 クルマエビ (Marsupenaeus japonicus) に対する伝染性筋壊死症ウイルス (IMNV) の病原性に関する研究
3. 学会等名 平成28年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 稲田真理・松山知正・前田知己・末武弘章・引間順一・酒井正博・伊丹利明
2. 発表標題 クルマエビ (Marsupenaeus japonicus) のIL-6ホモログの免疫応答と組織局在性に関する研究
3. 学会等名 平成29年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲田真理・引間順一・酒井正博・伊丹利明
2. 発表標題 クルマエビ (Marsupenaeus japonicus) のIL-16前駆体に関する研究
3. 学会等名 平成29年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
インドネシア	MainCenter for Brackishwater Aquaculture		