

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82708

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02282

研究課題名(和文)アワビ筋萎縮症をモデルとした貝類の宿主病原体相互作用の解明と防除技術の確立

研究課題名(英文)Elucidation of host-pathogen interactions in shellfish using abalone amyotrophia as a model and establishment of control techniques.

研究代表者

松山 知正 (Matsuyama, Tomomasa)

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)・グループ長

研究者番号：20372021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：病原体を特定し、ゲノム構造とウイルス粒子形態がafrican swine fever virus(ASFV)と類似することから、Abalone asfa-like virus(AbALV)に命名した。本ウイルスは4種のアワビに感染し死因となることが明らかとなった。水温上昇によりウイルスがほとんど消失するが、水温を下げると再びウイルスが増殖し、治療は困難であった。poly I:Cを予め接種することでウイルスの増殖を抑制できたが、感染を防ぐことはできなかった。株間の全ゲノムを比較したところ、全長にわたって多くの変異が検出され、本ウイルスは古くから我が国に存在したことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原ウイルスを特定し、国内の大型アワビ4種に感染することを明らかにした。体内のウイルス量は水温と連動して増減し、生残個体は長期に渡って感染源となることがわかった。これらの知見は、養殖現場における本病の対策に有用である。

本ウイルスは獣医分野で重要なASFVに近縁な初めての別種であり、アスファウイルス科の2種目のウイルスと考えられ、ウイルス学的に重要な位置を占める。株間の変異は、膜貫通領域を含む遺伝子に偏る傾向が見られた。貝類は脊椎動物のような特異免疫機構を持たないが、膜タンパクを標的とした未知の防御機構を持つのもかもしれない。

研究成果の概要(英文)：The pathogen was identified and named Abalone asfa-like virus (AbALV) because of the similarity of its genome structure and virus particle morphology to african swine fever virus (ASFV). The virus was found to infect and cause death in four species of abalone. Increased water temperature caused the virus to almost disappear, but it multiplied again when the water temperature was lowered, making treatment difficult. poly I:C pre-inoculation inhibited virus multiplication, but did not prevent infection. Comparison of the whole genome between viral strains revealed many SNPs across the entire genome length, suggesting that this virus has existed in Japan for a long time.

研究分野：魚病学

キーワード：アワビ ウイルス 筋萎縮症 Abalone asfa-like virus ASFV

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

貝類に感染するウイルスは世界的に 3 種しか特定されておらず、ウイルスに対する宿主応答もほとんど解明されていない。貝類のウイルスに対する生理応答が理解できれば、新たな疾病防除法の開発に重要な知見となる。筋萎縮症は 1970 年代後半にアワビの人工種苗に発生した感染症で、本研究の開始直前まで病原体は不明であった。我々は、申請時には病原体と思われるウイルスのゲノムの部分配列を取得し、アスファウイルスに近縁なウイルスを病原体として推定していた。本病は、クロアワビの稚貝に大量死を起こすが成貝は死亡せず、エゾアワビやメガイアワビは発病しないと報告されていた。また、水温の上昇に伴って自然治癒することが知られていた。病原ウイルスの特性や、宿主応答の解明が新たな対策を講じるために望まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、病原体のウイルス学的特徴を理解するとともに、各種アワビ類に対する病原性、アワビの宿主応答を解析し、本病に対する新たな防除対策を提案することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 病原ウイルスの分類に関する解析

病原ウイルスの全ゲノム配列を決定するために、感染試験で得られたウイルスゲノムコピー数が高いサンプルについて、NanoPore シーケンサーによるロングシーケンスと Illumina シーケンサーによるショートリードを取得し、ハイブリッドアセンブルを実施して全長配列の取得を試みた。取得した配列は、近縁関係にある African swine fever virus (ASFV) のゲノムと比較した。

ウイルスの粒子形態を観察するために、本ウイルスの major capsid protein (MCP) の組換えタンパクに対する抗血清を作成し、免疫染色を行ってウイルス抗原の組織分布を観察した。最も陽性反応が多く見られた鰓組織について、透過型電子顕微鏡による観察を行った。

#### (2) ウイルスサンプル間の比較ゲノム解析

2008 年から 2020 年の間に保存された 5 ロットの病貝について、感染している本ウイルスの全ゲノム配列を解読し比較した。

#### (3) 5 種のアワビ類に対する感染試験

クロアワビ、エゾアワビ、メガイアワビ、マダカアワビおよびトコブシの 1 歳未満の稚貝と 4 ~ 5 歳の成貝に対して、病貝の飼育排水を供給することで感染試験を行った。トコブシに対しては注射による感染試験も行った。死亡の経過を観察するとともに、体内のウイルス量を定量 PCR で、感染細胞の動態を MCP に対する抗血清を用いて病理組織学的に解析した。

#### (4) 治療に関する試験

飼育水温による治療の効果を検証した。病貝を 5, 10, 15, 20, 25 で飼育し 1 週間および 2 週間後の体内のウイルス量を測定した。また、病貝を自然水温 (14~26 ) で飼育しウイルス量の変動を調査した。また、ASFV においてウイルスの増殖抑制作用が知られているリファンピシンを用いた治療を試みた。さらに、ウイルス感染を模倣し抗ウイルス状態を誘導すると報告されている二本鎖 RNA として、poly:IC や MCP 遺伝子および緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子をもとに作成した二本鎖 RNA を病貝に接種し、経時的に体内のウイルス量を測定し治療効果を検証した。

#### (5) 病貝と健常貝の比較メタボローム解析およびトランスクリプトーム解析

病貝と健常貝それぞれ 6 個体の筋肉を採取し、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。また、健常貝、病貝、poly:IC 接種によりウイルス量が減少した群についてトランスクリプトーム解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) 病原ウイルスの分類に関する解析

病原ウイルスは全長 281kbp の直鎖 DNA をゲノムにもち、予測された遺伝子数は 309 個であった。ゲノムの中央領域には ASFV の遺伝子に相関性が高い遺伝子が 55 個配置され、両端には ASFV と同様に相関な遺伝子がタンデムに配置されていた。ゲノム両端に繰り返し配列を持つ特徴は、ASFV と類似する。中央領域のゲノム構造は、一部に逆位があるものの、シンテニーは ASFV と類似していた (図 1)。電子顕微鏡観察では、粒径約 200nm の形態的に ASFV と類似したウイルス粒子が感染細胞の細胞質に観察された。感染細胞の核は、ASFV の報告と同様に、退縮していた。これらのことから、筋萎縮症の病原体は ASFV に近縁なウイルスと考えられ、Abalone asfa-like virus (AbALV) と命名した。

ASFV は豚に大量死をもたらすため獣医学では最も重要な病原体の一つだが、近縁種は見つからず 1 科 1 種のウイルスとされている。本研究で特定命名された AbALV はアスファウイルス科

の2種類のウイルスに分類されると考えられ(図2)、学術的に重要な位置を占める。

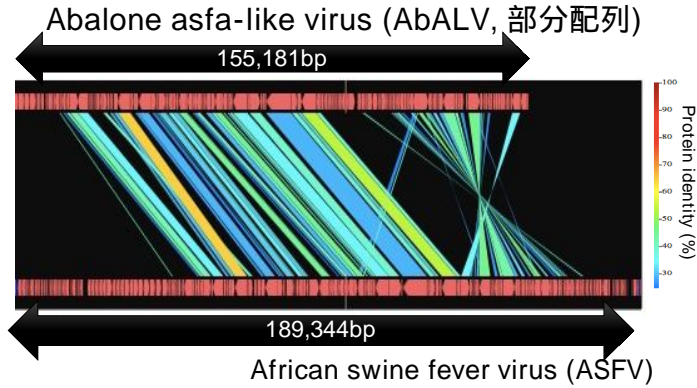


図1. AbALVとASFVのシンテニー解析  
赤色は予測された遺伝子の位置と向きを、中央のオレンジ~青の線は相同遺伝子を連結している。GenomeMatcher(Ohtsubo et al., 2008)で描画。

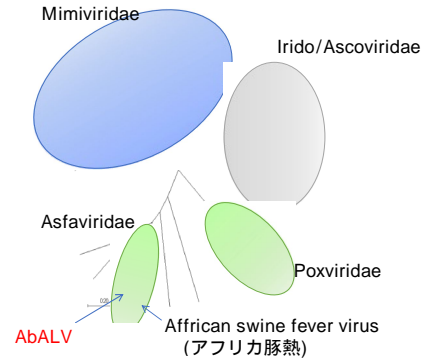


図2. DNA polymerase遺伝子系統樹

(2) ウイルスサンプル間の比較

ゲノム解析

ゲノム全長にわたって多数の一塩基多型(SNP)が存在し(5サンプル間の合計SNP数は5214)、連続した10塩基を超える欠損も数箇所認められた。また、同一サンプル内でも多数のSNPが検出された。つまり、同一個体にゲノム配列の異なる複数株が混在して感染していると考えられる。ゲノムの多型性の高さ、アワビの種苗生産が行われて数年後に本病が発生した経緯から、本ウイルスは古くから日本周辺に分布していた可能性が考えられる。SNPは膜貫通領域を持つタンパク質をコードする遺伝子に偏る傾向が見られた。

(3) 5種のアワビに対する感染試験

年齢とは関係なく、AbALVはクロアワビ、エゾアワビ、メガイアワビ、マダカアワビに感染し増幅した。トコブシではウイルスは全く増殖せず、ウイルス液を注射した場合でも時間とともにウイルスは減少し、2週間以内に消失した。よって、本ウイルスはトコブシには感染性がない。1歳未満のアワビでは、クロアワビ、メガイアワビ、マダカアワビ(エゾアワビは未実施)において40~90%の高い累積死亡率が得られた。これまで、本病はクロアワビとマダカアワビの感染症であり、メガイアワビは感染しないと報告されていた。クロアワビとマダカアワビでは、本病の特徴である異常細胞塊が形成されるが、メガイアワビでは全く形成されなかった。また、同じく本病の特徴である貝殻の欠刻や真珠層への褐色色素沈着も、メガイアワビでは観察されなかった。主に外部形態変化や組織病変の無さからメガイアワビは非感受性と考えられてきたようだが、明らかにメガイアワビも本ウイルスに感受性を持ち、大量死の原因となることが示された(図3)。4~5歳のアワビにも本ウイルスは感染するが、死亡は殆ど発生しなかった。成長したアワビは死亡せずにウイルスを排出し続けることから、レゼルボアとして機能すると思われる。

免疫染色により病理組織学的に観察すると、AbALV抗原は初めに鰓下腺に観察され、その後鰓の上皮細胞で増加し(図3,4)、死亡率の上昇とともに筋肉中に観察されるようになった(図3)。

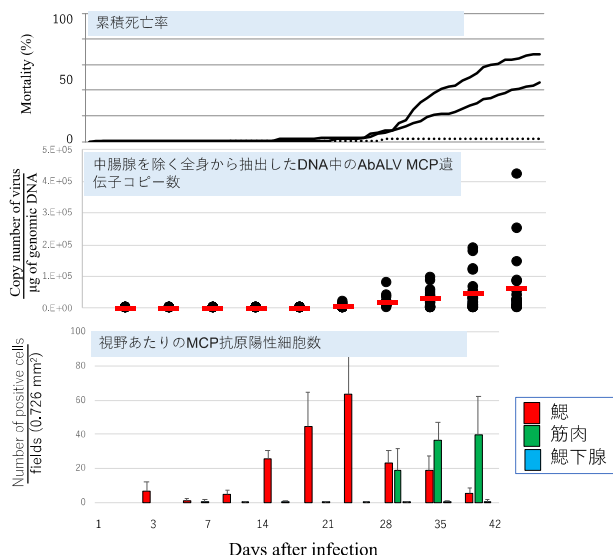


図3. メガイアワビに対する感染試験における死亡とAbALVの動態

クロアワビでは、死亡が発生する前後に神経組織に抗原が検出される個体もあった。ウイルスの感染組織が時間とともに変化する仕組みはわからない。死亡が発生する期間に鰓の陽性細胞が減少するのは、感染細胞の脱落によると考えら

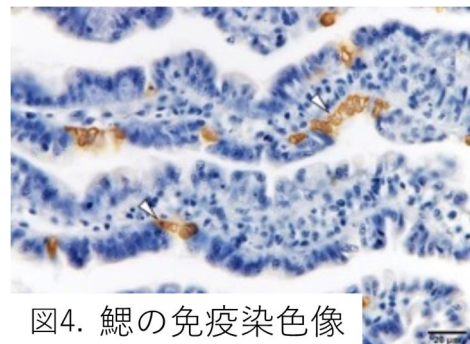


図4. 鰓の免疫染色像

れ、死亡の原因は鰓の障害によると思われる。

れた。クロアワビやマダカアワビに観察された異常細胞塊には、抗原が検出される場合と、全く検出されない場合があった。本病の特徴とされた異常細胞塊は、ウイルスによって直接的に形成されるのではないのかもしれない。

#### (4) 治療に関する試験

病貝を異なる水温で飼育したところ、10 以下と 25 では 20 と比較してウイルス量が減少した。自然水温下での飼育では、ウイルス量は水温が 20 前後となった 5 月末に最大となり、23 を超えた 6 月末には急減した。日間死亡率はウイルスが多い期間に高かったが、ウイルスが減少した 7 月以降にも慢性的な死亡が続いた。水温が低下する秋にはウイルスが再増殖する個体が見られ、水温の上昇による完全な治癒には至らなかった。

リファンピシンには全くウイルスの増殖を抑制する効果が認められなかった。Poly:IC, MCP, GFP 遺伝子の二本鎖 RNA を接種した場合では、接種 2~4 週間後において有意にウイルス量が減少した。しかし、接種 8 週間後には減少したウイルス量は元の量に増幅していた。

以上のように、昇温や二本鎖 RNA 接種によりウイルス量は一旦減少するが、その効果は一時的であり、治療は困難であった。

#### (5) 病貝と健全貝の比較メタボローム解析とトランスクリプトーム解析

メタボローム解析における主成分分析と Heat map 解析では、感染群と健全群は明瞭に区別できた。病貝では特に、解糖系、TCA 代謝、尿酸回路が低下し、アミノ酸含量も全体的に低位であった。トランスクリプトーム解析については、現在もデータの集計を続けている。

#### (6) 防除対策の提案

本研究により、これまで本病を発症しないと考えられていたメガイアワビも感染し大量死することが明らかになった。メガイアワビはクロアワビで知られる典型的な外観や病理組織変化を示さないために、本病に感受性がないとされていた。メガイアワビも感染し、感染源にもなりうることを考慮して防疫措置をとる必要がある。成貝は感染しても死なないが、長期に渡ってウイルスを排出し続けることも明らかとなった。見た目が健康な成貝についても、感染源となりうることを考えて取り扱う必要がある。また、高水温等によりウイルスが減少しても、完全に排除されず、条件次第で再度ウイルスが増殖することも示された。感染を経験して生き残ったアワビは放流せずに、殺処分するべきと考えられる。以上の防疫に関わる知見は、本ウイルスの検出法とともに自治体の魚病および種苗生産関係者に対して周知した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 松山 知正, 桐生 郁也, 稲田 真理, 中易 千早	4. 巻 56
2. 論文標題 PCRによるAbalone asfa-like virusの検出に適した検体採取部位の検証	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 魚病研究	6. 最初と最後の頁 18-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3147/jsfp.56.18	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 -
1. 著者名 松山知正・高野倫一・西木一成・藤原篤史・桐生郁也・稲田真理・坂井貴光・寺島祥子・松浦雄太・磯和潔・中易千早	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel Asfarvirus-like virus identified as a potential cause of mass mortality of abalone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61492-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 松山知正・桐生郁也・稲田真理・高野倫一・松浦雄太・釜石隆	4. 巻 13
2. 論文標題 Susceptibility of Four Abalone Species, <i>Haliotis gigantea</i> , <i>Haliotis discus discus</i> , <i>Haliotis discus hannai</i> and <i>Haliotis diversicolor</i> , to Abalone asfa-like Virus.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 2315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v13112315	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 松山知正	4. 巻 56
2. 論文標題 貝類疾病の病原体特定に関する研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 魚病研究	6. 最初と最後の頁 169-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松山知正
2. 発表標題 貝類疾病の病原体特定に関する研究
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松山知正
2. 発表標題 アワビ類5種に対する筋萎縮症の感染試験
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松山知正
2. 発表標題 筋萎縮症病貝におけるアスファウイルスの組織分布
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山知正・桐生郁也・稲田真里・高野倫一・西木一生・藤原篤志
2. 発表標題 筋萎縮症病貝におけるアスファウイルスの組織分布
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松山知正
2. 発表標題 Searching for pathogenic viruses in shellfish using next-generation sequencing
3. 学会等名 Asian Fisheries Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>アワビ類の筋萎縮症の病原体と推定されるウイルスを特定し検査法を開発  <a href="https://www2.fra.go.jp/xq/seika/seika004/">https://www2.fra.go.jp/xq/seika/seika004/</a></p>
---

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
研究分担者	桐生 郁也  (Kiryu Ikunari)  (20443351)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(南勢)・主任研究員   (82708)	
研究分担者	藤原 篤志  (Fujiwara Atsushi)  (30443352)	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)・主幹研究員   (82708)	
研究分担者	高野 倫一  (Takano Tomokazu)  (40533998)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水研機構(南勢)・主任研究員   (82708)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	稲田 真理  (Inada Mari)  (50723558)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・研究員    (82708)	削除：2019年1月10日

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