

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2011

課題番号：20710013

研究課題名（和文） 水域生態系において懸濁物質がウイルス感染に与える影響

研究課題名（英文） Effect of suspended matter and its sediment on viral infection in aquatic ecosystems.

研究代表者 本庄 三恵 (HONJO MIE)

京都大学 生態学研究センター・ 研究員

研究者番号：30450208

研究成果の概要（和文）：

水域生態系において懸濁物質がウイルスの感染に与える影響を、ウイルスの吸着・遊離過程に着目し、野外調査および室内実験を用いて評価を行った。その結果、懸濁物質の中でも鉱物粒子のウイルスの吸着能が高く、これらの堆積物がウイルスのリザーバーとなっていることを明らかにした。さらに、環境水中および堆積物中からウイルスを定量的に検出する手法を確立した。

研究成果の概要（英文）：

In order to contribute to a better understanding of viral dynamics in aquatic ecosystems, this study examined effect of suspended matter and its sediment on viral infection in aquatic environments. We revealed that mineral particles could attach to virus and its sediments could be reservoir of virus in aquatic environments. Novel quantification methods of virus from environmental water and sediment were also established.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境動態解析

キーワード：ウイルス、コイヘルペスウイルス、懸濁物質、吸着、検出法、水域生態系、琵琶湖、堆積物

## 1. 研究開始当初の背景

ウイルスは自然環境水中で  $10^5$ – $10^9$ /mL も存在し、ウイルス感染は水域生物の重要な死亡要因となっている。その結果、生態系の生物群集組成や物質循環を駆動する重要な要因であることが明らかとなってきた (Suttle 2007 in Nature Reviews)。さらに、近年コイヘルペスウイルス (KHV) 病などの新興感染症が、野生個体の大量死を引き起こすという

現象も報告されており、水域生態系でのウイルス感染症拡大のメカニズムや動態を明らかにすることが急務となっている。

KHV 感染症は 2003 年から 2004 年にかけて霞ヶ浦や琵琶湖をはじめとする自然水域に広がり、それぞれ 1000 t、10 万匹以上のコイの死亡が確認された。当初の大量死からは状況が改善してはいるものの現在でも毎年 KHV の発生が確認されている。また、KHV 感

感染症によるコイの死亡は冬に終息するにもかかわらず次の年の春に再び発生することから、ウイルスは一定期間水域生態系で生残していることが考えられる。KHV の水中での生残時間はわずか数日であるという報告 (Ilouze et al. 2006)がある一方で、我々の予備的調査では環境水中に KHV が存在することが示唆されていたことから、KHV は堆積物や懸濁物質など水以外の場所で生残し続け、ある環境下で水中に供給されている可能性が考えられる。ウイルス粒子の表面が負の電荷を帯びているという事実は、環境中において正の電荷を持つ懸濁物質がウイルスを吸着させているという考えを支持するものである。さらに pH の変化は、ウイルス粒子の電荷に変化を与え吸着物質からの遊離を促すことが知られ、このような水質変化は KHV 病をはじめとするウイルス感染症が起りやすい環境を作っている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、懸濁物質（ここでは堆積物を含む）がウイルスの動態に与える影響を評価するために、KHV およびλファージをモデルウイルスとして用い、以下の点を明らかにすることを目的とした。

- (1) 懸濁物質からのウイルス検出法の確立
- (2) 環境水中における懸濁物質のウイルスの分布
- (3) 懸濁物質がウイルスの生残性(消失過程)に与える影響
- (4) pH の変化が懸濁物質からのウイルス遊離と感染に与える影響

## 3. 研究の方法

環境中のウイルスのほとんどが未知の種類であり、その動態はほとんど分かっていない。そのため、塩基配列が既知の KHV を用いて、環境水および堆積物中からのウイルス DNA の定量的な検出手法の確立を行った。

次に、KHV の自然環境中での分布を明らかにするため、これらの手法を用いて河川、琵琶湖およびその内湖の水、懸濁物質（主にプランクトン、鉱物粒子）および堆積物から KHV の検出を行い、これらの質とウイルスの数との関係の解析を行った。

さらに、ウイルスの吸着と遊離に与える要因を明らかにするため、環境水中のウイルス量との pH や懸濁物質濃度などの水質との関係解析を行った。これらの結果から、有機物量との関係が示唆されたため、異なる質の湖底堆積物に KHV を添加する室内実験によって、有機物が KHV の遊離に与える影響を評価した。また、野外調査から懸濁状態の鉱物粒子がウイルスの吸着能が高いことが明らかになったため、粒子サイズがウイルスの吸着能に与える影響を室内実験において評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 堆積物および環境水からのウイルスの定量・検出手法の開発

環境中に存在するウイルス量は、感染個体の組織内に比べ非常に微量であるため、検出にはウイルスの濃縮が不可欠である。一方、濃縮過程での回収率はサンプルごとに大きく異なる。これまで、環境水や活性汚泥、土壌中からのウイルスの検出手法は数多く開発されてきたが、回収率を考慮し、定量的に検出する手法は確立されていなかった。本研究では、定量 PCR を用いて既知量のλファージを添加し回収率を推定することで環境水および堆積物から定量的にウイルス DNA を検出する手法を確立することに成功した（論文①、⑤）。これらの定量法は、他のウイルスにも適用可能と考えられ、すでに環境水からは別の魚病ウイルス（コイヘルペスウイルス 1、コイヘルペスウイルス 2）の検出にも成功している。また、ビーズビーターなどを使用せず非破壊的な濃縮法を用いているため、感染力を保持したウイルスの検出にも応用できる可能性があり、今後環境中でのウイルスの動態や生態解析に役立つことが期待できる。

### (2) 環境水中における懸濁物質および堆積物のウイルスの分布

2008 年 11 月に琵琶湖内湖の伊庭内湖において、プランクトンネット NXX17 で主に動物プランクトンと植物プランクトンを含む懸濁物質を採取し、KHV の検出・定量を行った。その結果、8 サンプル中 7 サンプルから KHV が検出され、プランクトンに KHV が吸着あるいは含有されていることが示唆された。検出された KHV 量は Rotifera (ワムシ類) の数と正の相関がみられた（論文③）。

さらに、琵琶湖の堆積物中から KHV の検出を試みた結果、検出定量に成功した。堆積物中の KHV 濃度は最大  $3.3 \times 10^5$ /kg であり、これは体積当たりの水中 KHV 濃度(virus/L)の 1222 倍であった。このことから、堆積物が KHV のリザーバーとなっていることが示唆された（論文①）。

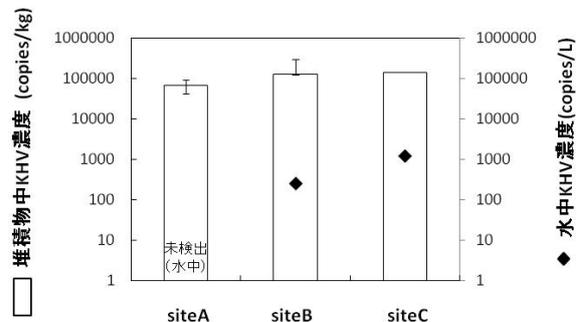


図1 堆積物中と水中 KHV 濃度の比較 (Honjo et al. 2012 改変)

琵琶湖および伊庭内湖において 2009 年 4 月から 2010 年 6 月に水中および堆積物中の KHV の検出・定量を行った。その結果、主に砂利を含む堆積物からの検出率は全体的に低い傾向が見られた。一方、泥を多く含む堆積物は年間を通して高頻度で検出される場所と全く検出されない場所に区別された。このことから KHV の分布は堆積物中の鉱物粒子のサイズだけでなく、堆積物に含まれる物質や他の環境要因にも影響されることが示唆された。

(3) 懸濁物質がウイルスの生残性(消失過程)に与える影響

ウイルスの生残性を評価するため、KHV の感染力を定量的に測定する方法としてプラークアッセイおよび TCID<sub>50</sub> による検出方法の確立を試みた。コイの培養細胞(CCB 株)を用いて、培地の最適化、および環境水、懸濁物質や堆積物に含まれるバクテリアやカビなどの夾雑物の除去条件の最適化の結果、環境水およびコイ飼育水中の KHV の感染力価測定に成功した。本研究では、堆積物や懸濁物質中の感染性 KHV の定量法確立には至らず、生残性に与える影響の評価は今後の課題として残った。とくに、堆積物や懸濁物質中のバクテリアやカビなどの除去が達成されること、さらに感受性の高い細胞を用いた培養系の確立が今後の課題であることが明らかになった。

(4) 吸着および遊離に与える要因

①吸着に関して

田んぼの代掻きにより発生した鉱物粒子を多く含む濁水に、KHV および入フェージを添加し、水および懸濁物質のウイルス量を測定し、ウイルスの吸着の有無を確認した。その結果、いずれのウイルスも懸濁物質から約 10<sup>6</sup>/g のウイルスが検出されたが、これは水中添加量の 1.3-8.5%であった。このことから、ウイルスは濁水中の鉱物粒子に吸着し、その堆積物に高濃度に濃縮される一方、水中濃度の変化にはあまり寄与しないことが示唆され、懸濁物質が水環境中でウイルスのリザーバーとして動態に影響を与えていることを室内実験からも確かめられたと言える。また、代掻きなど人間活動がウイルスの動態に影響を与えている可能性を示唆する新たな知見である。

次に、懸濁物質が沈殿した結果としての堆積物に着目し、琵琶湖から採取した質の異なる堆積物に KHV を吸着させる室内実験を行った。その結果、砂利に比べ泥がウイルスをよく吸着させることが明らかとなり、野外調査と一致する結果を得た。

②遊離に関して

琵琶湖の野外調査データをもとに水中 KHV 量と水質の関係を解析した結果、KHV 量は濁度とクロロフィル量、バクテリア数と正の相

関があることが分かった。一方、pH との関係は見られなかった(論文⑥)。そこで、遊離に与える要因として有機物量に着目し、琵琶湖堆積物に吸着させた KHV が beef extract の有無で遊離する量を室内実験にて確かめた。その結果 beef extract の存在下で泥から水中へ遊離するウイルス量が約 100 倍になることが明らかになり、水中の有機物濃度がウイルスの遊離に影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Honjo M. N., Minamoto T., Kawabata Z. (2012) Reservoirs of Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) DNA in sediments of natural lakes and ponds. *Veterinary Microbiology*、査読有、155: 183-190  
DOI:10.1016/j.vetmic.2011.09.005.
- ② Minamoto, T., Honjo, M. N., Yamanaka, H., Uchii, K., Kawabata, Z. (2012) Nationwide Cyprinid herpesvirus 3 contamination in natural rivers of Japan. *Research in Veterinary Science*、査読有、93: 508-514  
DOI:10.1016/j.rvsc.2011.06.004
- ③ Minamoto, T., Honjo, M. N., Yamanaka, H., Tanaka, N., Itayama, T., Kawabata, Z. (2011) Detection of cyprinid herpesvirus-3 DNA in lake plankton. *Research in Veterinary Science*、査読有、90: 530-532  
DOI:10.1016/j.rvsc.2010.07.006.
- ④ Uchii, K., Telschow, A., Minamoto, T., Yamanaka, H., Honjo, M. N., Matsui, K., Kawabata, Z. (2011) Transmission dynamics of an emerging infectious disease in wildlife through host reproductive cycles. *The ISME Journal*、査読有、5: 244-251  
DOI:10.1038/ismej.2010.123.
- ⑤ Honjo, M. N., Minamoto, T., Matsui, K., Uchii, K., Yamanaka, H., Suzuki, A. A., Kohmatsu, Y., Iida, T., & Kawabata, Z. (2010) Quantification of cyprinid herpesvirus-3 (CyHV-3) in environmental water using an external standard virus. *Applied and Environmental Microbiology*、査読有、76: 161-168  
DOI:10.1128/AEM.02011-09.
- ⑥ Minamoto, T., Honjo, M. N., Kawabata, Z. (2009) Seasonal Distribution of Cyprinid Herpesvirus 3 in Lake Biwa, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*、査読有、75: 6900-6904  
DOI:10.1128/AEM.01411-09.
- ⑦ Minamoto, T., Honjo, M. N., Uchii, K., Yamanaka, H., Suzuki, A. A., Kohmatsu,

Y., Iida, T., Kawabata, Z. (2009) Detection of cyprinid herpesvirus 3 DNA in river water during, after an outbreak. *Veterinary Microbiology*, 査読有、135: 261-266 DOI:10.1016/j.vetmic.2008.09.081

〔学会発表〕(計 10 件)

- ① 本庄三恵・源利文・川端善一郎 環境水中のウイルス定量：水域生態系での感染症研究への適用。日本陸水学会第77回大会(名古屋)、2012.9.14.- 17
- ② Honjo, M. N., Minamoto, T., Yamanaka, H., Takahara, T., Kawabata, Z. Seasonal and spatial distribution of *Cyprinid herpesvirus 3* in water and sediment of a lagoon of lake Biwa, Japan. 2012 ASLO Aquatic Sciences Meeting, (in Otsu, Japan.), 2012. 7. 8-13
- ③ Honjo, M. N., Minamoto, T. and Kawabata, Z. Seasonal and spatial distribution of Cyprinid herpesvirus 1 and Cyprinid herpesvirus 2 in Lake Biwa, Japan. 日本生態学会第59回全国大会(大津)、2012.3.17-21
- ④ 源利文・本庄三恵・山中裕樹・内井喜美子・川端善一郎 「全国の自然河川におけるコイヘルペスウイルスの分布」 日本陸水学会第 75 回大会(弘前), 2010.9.17-20
- ⑤ 本庄三恵, 源利文, 川端善一郎 「堆積物におけるコイヘルペスウイルスの検出・定量」第 57 回日本生態学会(東京)、2010.3.15-20
- ⑥ 源利文、本庄三恵、内井喜美子、山中裕樹、鈴木新、神松幸弘、米倉竜次、大森浩二、板山朋聡、田中伸幸、浅野耕太、白江祐介、奥田昇、川端善一郎 「コイヘルペスウイルス感染症と人間の相互作用環(シンポジウム S12: 環境変化-感染症-人間のつながり)」日本生態学会第 57 回全国大会(東京)、2010.3.15-20
- ⑦ 田中伸幸、板山朋聡、源利文、本庄三恵、川端善一郎 「環境水中の低密度ウイルスに対する濃縮システムの開発」 第 44 回日本水環境学会年会(福岡)、2010.3.15-17
- ⑧ 源利文、本庄三恵、川端善一郎 「琵琶湖におけるコイヘルペスウイルスの動態解析」第 74 回日本陸水学会(大分)、2009.9.17
- ⑨ 本庄三恵、源利文、松井一彰、内井喜美子、山中裕樹、鈴木新、神松幸弘、飯田貴次、川端善一郎 「環境水中に存在するコイヘルペスウイルスの定量」第 73 回日本陸水学会(札幌)、2008.10.11
- ⑩ Tanaka, N., Itayama, T., Honjo, M., Minamoto, T., Kawabata, Z. 「Development of a Rapid Concentration System for Virus in Environmental water」 12th International

Conference on Integrated Diffuse Pollution Management (IWA DIPCON 2008) (in Khon Kaen, Thailand) 2008.8.27

〔その他〕

ホームページ等

<http://mhonjo.jimdo.com/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本庄 三恵 (HONJO MIE)  
京都大学・生態学研究センター・研究員  
研究者番号：30450208

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし