

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 4 月 14 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ～ 2012
 課題番号： 22580374
 研究課題名 (和文) 水域汚染物質の電荷的引力による魚介類病原微生物の新規感染機構に関する研究
 研究課題名 (英文) Studies on new infection route of pathogens to fish and shellfish via electrostatic interactions of positively charged heavy metal ions with negatively charged cells of the microorganisms
 研究代表者
 一色 正 (ISSHIKI TADASHI)
 三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授
 研究者番号： 30378319

研究成果の概要 (和文)：本研究では、 Cd^{2+} 、 Zn^{2+} および Pb^{2+} などの 2 価の重金属イオンを介して負に帯電したマリンビルナウイルス (MABV) と動植物プランクトンとが付着し、それを貝や魚が摂餌して取り込むことによって、餌料生物を介した MABV の伝播と魚貝類への感染が起こり得ることが明らかとなった。したがって、重金属による海洋汚染は、魚貝類におけるウイルス感染を助長する重要な要因になるであろう。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we experimentally revealed the development of an infection route via food organisms that fish or shellfish is infected with marine birnavirus (MABV) by feeding ion coagulations of negatively charged virus particles and plankton cells by bivalent cations such as Cd^{2+} , Zn^{2+} or Pb^{2+} . Therefore, environmental pollution due to heavy metals will play an important role in development of the MABV infection cycle and fish disease outbreaks in aquaculture environments.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：魚病学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：水域汚染物質・電荷的引力・微生物・付着・感染

1. 研究開始当初の背景

我が国の水産増養殖の現場において魚病の問題が表面化してから既に半世紀以上が過ぎたが、依然として病気の発生は増養殖業の発展を妨げる阻害要因となっており、魚病による経済損失は年間 100~200 億円と推定されている。一方、1996 年以降、貝柱の赤変化を伴う養殖アコヤガイの大量斃死が西日本各地で発生し問題となったことがある。本大量斃死の主たる原因は未だ明らかにされ

ていないが、その原因の一つとしてマリンビルナウイルス (MABV) と呼ばれるウイルスの関与が報告された。MABV は広い宿主範囲をもつ dsRNA で、様々な水棲生物から検出される興味深いウイルスである。現在では少なくともアコヤガイを含む 14 種の貝類、10 種の魚類及び天然海水中に常在しており、宿主が健全な状態では病原性を示さないが、宿主の健康状態が悪化すると突如として本来の病原性を発揮し、宿主を発病させる日和見

ウイルスとしての性質を備えている。他方、沿岸海域では長年の養殖に伴う有機物の堆積や海底からの栄養塩の溶出、及び陸域からの生活・産業排水の流入に伴う環境汚染はまだ続いているのが現状である。化学汚染物質の多くは土壌粒子に吸着して長期的に沿岸海洋中に残存することから、海洋生物、特に、底棲生物（貝類や底棲性魚類）には直接的・間接的な影響を及ぼすことが懸念される。したがって、環境汚染は MABV 等日和見ウイルスによる感染症の発生リスクを高める重要な要因である可能性があるが、それらを明らかにした例はない。ウイルス感染症はそのウイルス自体の病原性が弱くても、細菌感染症や寄生虫感染症等の他の魚病の先行因子となるため、環境汚染は魚病全体の発生リスクを高める要因にも成り得るものと考えられる。沿岸海域は人間活動に密接な繋がりを持ち、陸域と海域の物質交換が活発に行われる境界域であるため、そこでの環境汚染の影響を評価する研究は将来の地球環境を予測し、保全する上で重要である。

2. 研究の目的

本研究では水域汚染と魚病発生との因果関係を解明する手掛かりを得るため、金属元素の電荷的引力に基づく微生物の付着機構が関与した感染機構が成立するのかどうかを検証する。すなわち、魚病を引き起こす病原ウイルスと魚介類の餌となるプランクトンの表面はいずれも負に帯電しているため、汚染水域中に 2 価の陽イオンとして多量に溶存している金属元素の介在によって両者の微生物同士が付着し、その付着物が魚介類に摂餌される機構により、汚染水域では魚介類へのウイルス感染が促進されているのではないかという新規の仮説を立てた。本研究では、この仮説が成立することを試験管内及び生体内における実験を行って総合的に実証する。

3. 研究の方法

(1) 試験管内実験

2 価の重金属イオンを介する電荷的引力によって負に帯電した MABV と植物プランクトン（キートセロスネオグラシール *Chaetoeros neogracile*, 以下、キートセロス）が付着し、その付着物を動物プランクトン（S 型シオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* sp. complex, 以下、ワムシ）が摂餌して取り込むことにより、これら餌料生物を介して MABV が伝播されるのかどうかを実験的に検討した。実験では、キートセロスにおける重金属の付着は培養液中に重金属塩（ CdCl_2 , ZnCl_2 , PbCl_2 ）を添加して培養後、付着した重金属量を測定して検討した。キートセロスにおける MABV の付着は培養液中に MABV

と各重金属塩を添加した重金属区、MABV は添加するが重金属塩は添加しない陽性対照区および MABV も重金属塩も添加しない陰性対照区を設定した。キートセロスを培養後、付着したウイルス量を測定するとともに、走査型電顕で観察して検討した。ワムシにおける MABV の取込みは、前述と同様の方法で実験区を設定して培養したキートセロスをワムシに摂餌させたのち、取込まれたウイルス量を測定して検討した。

(2) 生体内実験

人為的に MABV に汚染させたキートセロスあるいはワムシをアコヤガイ *Pinctada fucata* およびヒラメ *Paralichthys olivaceus* 仔魚に摂餌させる伝播実験を行い、MABV が伝播した動植物プランクトンを貝や魚が摂餌することで、MABV が貝や魚へ伝播するのかどうかを実験的に検討した。アコヤガイへの伝播実験では、キートセロスの培養液に添加する物質の違いに基づいて 6 つの実験区を設定し、それぞれをウイルス+Zn 区、ウイルス+Cd 区、ウイルス+超純水区、MEM（ウイルスの培養液）+Zn 区、MEM+Cd 区および MEM+超純水区と称した。各実験区のアコヤガイに所定の培養液で培養したキートセロスを毎日 2 回、10 日間給餌した。その後、アコヤガイの内臓から MABV の分離を試みた。この実験は計 2 回行った。ヒラメ仔魚への伝播実験では、ウイルスの伝播源として、MABV を人為的に汚染させたキートセロス、ワムシおよびキートセロスとワムシの両者のそれぞれを使用するキートセロス汚染実験、ワムシ汚染実験、およびキートセロス+ワムシ汚染実験の 3 つを行った。キートセロス汚染実験およびワムシ汚染実験では、MABV 汚染プランクトンの培養液に添加する物質の違いに基づいて 4 つの実験区を設定し、それぞれをウイルス+Zn 区、ウイルス+超純水区、MEM+Zn 区および MEM+超純水区と称した。キートセロス+ワムシ汚染実験ではウイルス+Zn 区のみを設定した。所定の培養液で培養したキートセロスを与えて所定の培養液で培養したワムシを作製し、これを該当する実験区のヒラメ仔魚に毎日 2 回、10 日間給餌した。その後、ヒラメ仔魚を対象に RT-PCR および Nested-PCR 検査を行い、ヒラメ仔魚に取り込まれた MABV の遺伝子の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) 試験管内実験

キートセロスにおける重金属付着量の測定結果を表 1 に示す。全ての実験区で測定対象とした Cd, Zn および Pb が検出された。検出量は最大で Cd が CdCl_2 10 mM 区において 10513.42 ± 204.39 ppm, Zn が ZnCl_2 10 mM 区において 23719.35 ± 1049.44 ppm およ

びPbがPbCl₂ 10 mM区において119799.51 ± 3114.91 ppmであった。一方、重金属塩を添加しなかった対照区の試料では測定に使用したろ紙に由来する微量(5.13 ± 0.03 ppm)のZnが検出されたが、CdとPbは検出されなかった。この結果から、キートセロスにおけるCd、ZnおよびPbの付着が確認され、その付着量は添加した重金属塩濃度に依存する傾向が見られた。

各実験区のキートセロスに付着していた感染性ウイルス量の平均値 ± SDを図1に示す。ウイルスも重金属塩も添加していない陰性対照区における付着量は測定限界以下であったが、ウイルスを添加したその他の実験区においては感染性ウイルスの付着が確認された。各実験区の平均ウイルス付着量 ± SD (LogTCID₅₀/g)は、CdCl₂ 1 mM区および10 mM区ではそれぞれ4.69 ± 0.25 および5.94 ± 0.45, ZnCl₂ 1 mM区および10 mM区ではそれぞれ4.90 ± 0.39 および5.78 ± 0.45, ならびにPbCl₂ 1 mM区および10 mM区ではそれぞれ4.52 ± 0.84 および6.03 ± 0.38であった。実験区間のデータの統計解析結果を表2に示す。陽性および陰性対照区と各実験区とを比較した結果、重金属塩を添加した全ての実験区は陰性対照区のみならず、陽性対照区に対しても有意に高い値であった ($P < 0.01$)。重金属塩を添加した実験区間で比較した結果、添加した重金属塩の種類に関わりなく、10 mM区は1 mM区よりも有意に高い値であった ($P < 0.01$)。また、ZnCl₂ 1 mM区がPbCl₂ 1 mM区よりも有意に高い値であったこと ($P < 0.05$)を除けば、添加した重金属塩の種類に関わりなく、重金属塩の濃度が同じ実験区の間では有意な差異は認められなかった。混合培養した陰性対照区とCdCl₂ 20 mM区の培養液中のキートセロスを走査型電子顕微鏡で観察した結果、CdCl₂ 20 mM区のキートセロスの表面にはMABVとほぼ同じ大きさ(直径約60 nm)の球状粒子を含む多数の微粒子が付着していることが確認された(図2)。

表1. キートセロスにおける重金属付着量

実験区	重金属量(ppm)			
	Cd	Zn	Pb	
CdCl ₂	0.1 mM	6.51 ± 0.04	3.04 ± 0.07	<0.015
	1 mM	217.08 ± 2.80	3.33 ± 0.05	<0.015
	10 mM	10513.42 ± 204.39	4.38 ± 0.03	<0.015
ZnCl ₂	0.1 mM	<0.01	31.30 ± 0.93	<0.015
	1 mM	<0.01	1196.14 ± 89.96	<0.015
	10 mM	<0.01	23719.35 ± 1049.44	<0.015
PbCl ₂	0.1 mM	<0.01	3.78 ± 0.04	283.68 ± 11.57
	1 mM	<0.01	4.97 ± 0.02	4889.10 ± 135.65
	10 mM	<0.01	7.47 ± 0.23	119799.51 ± 3114.91
対照区	0 mM	<0.01	5.13 ± 0.03	<0.015

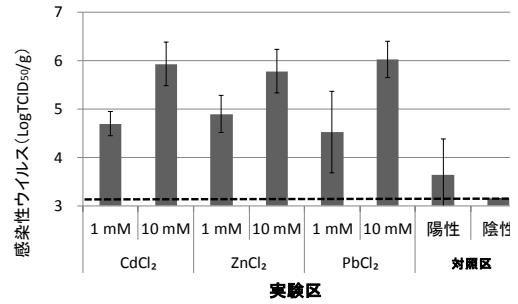


図1. 重金属下におけるMABVの付着実験において混合培養したキートセロスに付着したMABVの感染性ウイルス量。

図中の点線は検出限界値(3.15 LogTCID₅₀/g)を示す。

表2. 重金属下におけるMABVの付着実験において混合培養したキートセロスに付着したMABVの感染性ウイルス量の統計学的比較

実験区	実験区							
	CdCl ₂		ZnCl ₂		PbCl ₂		対照	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	陽性	陰性
CdCl ₂ 1 mM								
10 mM	**							
ZnCl ₂ 1 mM	**	**						
10 mM	**	**	**					
PbCl ₂ 1 mM	**	*	**	**				
10 mM	**	**	**	**	**	**		
対照 陽性	**	**	**	**	**	**		
陰性	**	**	**	**	**	**	**	**

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

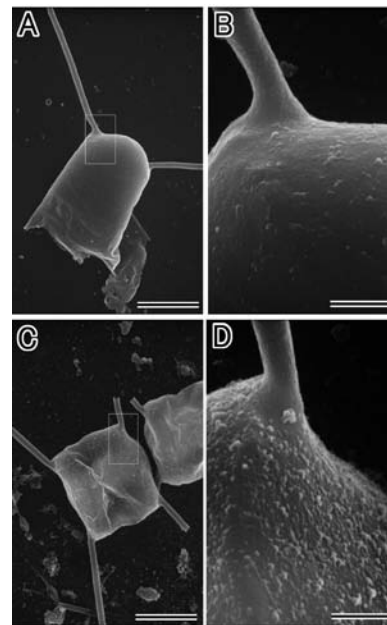


図2. 重金属下におけるMABVの付着実験において混合培養したキートセロスの走査型電子顕微鏡写真。(A) 陰性対照区。スケール=3 μm。(B) (A)の高倍率像。スケール=500 nm。(C) CdCl₂20 mM区。スケール=3 μm。(D) (C)の高倍率像。細胞表面における多数の微粒子の付着が認められる。スケール=500 nm。

各実験区でワムシに取り込まれたウイルス量の平均値±SDを図3に示す。ウイルスも重金属塩も添加していない陰性対照区においては、いずれもワムシに取り込まれたウイルス量は測定限界以下であった。一方、ウイルスと重金属塩を共に添加したいずれの実験区においては、ワムシにおけるウイルスの取り込みが確認された。各実験区の平均ウイルス取込み量±SD (LogTCID₅₀/g)はCdCl₂ 1 mM区および10 mM区ではそれぞれ3.32±0.20および3.62±0.16, ZnCl₂ 1 mM区および10 mM区ではそれぞれ3.19±0.08および3.55±0.31, ならびにPbCl₂ 1 mM区および10 mM区ではそれぞれ3.30±0.18および3.51±0.27であった。実験区間のデータの統計解析結果を表3に示す。陽性および陰性対照区と各実験区とを比較した結果、ZnCl₂ 10 mM区のみが両対照区に対して有意に高い値であった ($P<0.05$)。重金属塩を添加した実験区間で比較した結果、CdCl₂ 10 mM区とZnCl₂ 10 mM区のみがZnCl₂ 1 mM区よりも有意に高い値であった ($P<0.05$)。

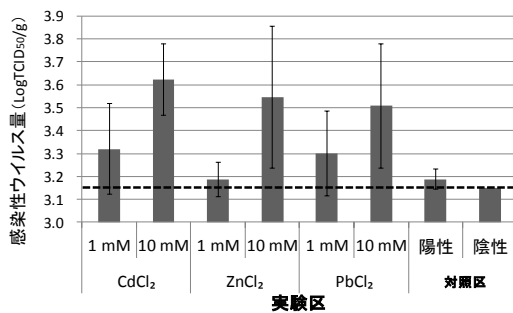


図3. 動物プランクトンにおけるウイルス取込み実験において採取したワムシに取り込まれていたMABVの感染性ウイルス量。

図中の点線は検出限界値 (3.15 LogTCID₅₀/g)を示す。

表3. 動物プランクトンにおけるウイルス取込み実験において採取したワムシに取り込まれていたMABVの感染性ウイルス量の統計学的比較

実験区	実験区							
	CdCl ₂		ZnCl ₂		PbCl ₂		対照	
	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	1 mM	10 mM	陽性	陰性
CdCl ₂ 1 mM								
CdCl ₂ 10 mM								
ZnCl ₂ 1 mM		*						
ZnCl ₂ 10 mM			*					
PbCl ₂ 1 mM								
PbCl ₂ 10 mM								
対照 陽性				*				
対照 陰性				*				

*: $P<0.05$.

以上の試験管内実験の結果から、Cd²⁺, Zn²⁺およびPb²⁺などの2価の重金属イオンを介して負に帯電したMABVとキートセロスとが付着し、それを動物プランクトンが摂餌して取り込むことによって、餌料生物を介したMABVの伝播が起こり得るものと推察される。

(2) 生体内実験

アコヤガイへの伝播実験における実験区別のMABVの分離率を表4に示す。計2回の感染実験において検討した実験区のうち、MABVを添加せずに培養したキートセロスを給餌した3つの実験区; MEM+Cd, MEM+ZnおよびMEM+超純水区のアコヤガイでは、いずれの個体からもMABVは分離されなかった。一方、MABVを添加するが、重金属塩は添加せずに培養したキートセロスを給餌した実験区; ウイルス+超純水区では、第1回目実験においてのみ、15個体中2個体(13%)の低い分離率でMABVが分離された。これらに対して、MABVとCdCl₂を添加して培養したキートセロスを給餌した実験区; ウイルス+Cd区では、2回の実験のいずれでもMABVが分離され、それぞれ15個体中5個体(33%)および15個体中6個体(40%)の高い分離率を示した。また、MABVとZnCl₂を添加して培養したキートセロスを給餌した実験区; ウイルス+Zn区でも15個体中3個体(20%)の分離率を示した。

表4. アコヤガイに対する伝播実験における実験区別のウイルス検出率

実験名	実験区	分離個体数/検査個体数	検出率(%)
第一回目実験	ウイルス+Cd	5/15	33
	ウイルス+Zn	ND	ND
	ウイルス+超純水	2/15	13
	MEM+Cd	0/15	0
	MEM+Zn	ND	ND
	MEM+超純水	0/15	0
第二回目実験	ウイルス+Cd	6/15	40
	ウイルス+Zn	3/15	20
	ウイルス+超純水	0/15	0
	MEM+Cd	0/15	0
	MEM+Zn	0/15	0
	MEM+超純水	0/14	0

ND: 実施せず。

ヒラメ仔魚への伝播実験における実験区別のMABV遺伝子の検出率の結果を表5に示す。いずれの実験においても、MABV遺伝子はウイルス+Zn区あるいはウイルス+超純水区の魚から検出されたが、MEM+Zn区およびMEM+超純水区の魚からは検出されなかった。キートセロス汚染実験では、ウイルス+Zn区において、給餌4日後および6日後に採取した魚からウイルス遺伝子が検出され、実験終了時の累積検出率は20%となった。ウイルス+超純水区においては、給餌6日後、8日後および10日後に採取した魚から検出され、累積検出率は20%となった。ワムシ汚染実験では、ウイルス+Zn区のア区にお

いて、給餌 6 日後に採取した魚からウイルス遺伝子が検出され、A 区と B 区の平均累積検出率は 7%となった。また、給餌 6 日後に採取した 1 尾からは RT-PCR 法でもその標的部位の遺伝子が検出され、RT-PCR 法による A 区と B 区の平均累積検出率は 3%となった。ウイルス+超純水区の B 区では、給餌 9 日後にウイルス遺伝子が検出され、A 区と B 区の平均累積検出率は 3%となった。キートセロス+ワムシ汚染実験では、A 区において給餌 5 日後および 9 日後、ならびに B 区において給餌 6 日後、7 日後、8 日後および 9 日後にそれぞれウイルス遺伝子が検出され、A 区と B 区の平均累積検出率は 24%となった。

以上の生体内実験の結果から、MABV は餌料生物を介して貝や魚へ伝播すること、およびその伝播には重金属の電荷的引力が関わっていることが明らかとなった。したがって、2 価の重金属イオンを介して MABV を取り込んだ動植物プランクトンを貝や魚が摂餌して取り込むことによって、餌料生物を介した魚貝類への MABV の伝播が起こり得るものと推察される。

表5. ヒラメに対する伝播実験における実験区別のウイルス検出率

実験名	実験区	陽性尾数/検査尾数*	検出率(%)*
キートセロス汚染実験	ウイルス+Zn	3/15 (0/15)	20 (0)
	ウイルス+超純水	3/15 (0/15)	20 (0)
	MEM+Zn	0/15 (0/15)	0 (0)
	MEM+超純水	0/15 (0/15)	0 (0)
ワムシ汚染実験	ウイルス+Zn	A	2/15 (1/15)
		B	0/15 (0/15)
	ウイルス+超純水	A	0/15 (0/15)
		B	1/15 (0/15)
	MEM+Zn	A	0/15 (0/15)
		B	0/15 (0/15)
	MEM+超純水	A	0/15 (0/15)
		B	0/15 (0/15)
キートセロス+ワムシ汚染実験	ウイルス+Zn	A	2/15 (0/15)
		B	5/14 (0/14)

*:Nested-PCR (RT-PCR)

以上のように、本研究では、キートセロス、MABV および重金属塩を混合して培養すると各種重金属と MABV がキートセロスに付着すること、キートセロスに付着するウイルス量は重金属イオンの存在によって増加すること、MABV の付着したキートセロスを摂餌したワムシには微量の MABV が取込まれること、および MABV が取り込まれたキートセロスあるいはワムシを摂餌したアコヤガイおよびヒラメ仔魚から MABV が検出されることが実験的に確認された。これらの実験結果は、重金属元素の電荷的引力が関与した餌料生物を介する MABV の伝播が起こり得ることを強く示唆している。したがって、重金属による海洋汚染は、MABV の伝播を助長する要因となり得るものと考えられる。

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)

[学会発表] (計 1 件)

一色 正, 餌料生物を介する海洋型アクアピルナウイルスの伝播機構に関する研究. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会, 2011 年 10 月 1 日, 長崎.

[その他]

ホームページ等

<http://www.crc.mie-u.ac.jp/seeds/contents/detail.php?mid=20091221-104859&t=r&url=>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一色 正 (ISSHIKI TADASHI)

三重大学・大学院生物資源学研究所・准教授

研究者番号 : 30378319

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

吉松 隆夫 (YOSHIMATSU TAKAO)

三重大学・大学院生物資源学研究所・教授
研究者番号 : 10264102

(4) 研究協力者

那須 由希羽 (NASU YUKIHA)

三重大学・大学院生物資源学研究所・博士
前期課程学生