

## 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24年5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780168

研究課題名（和文） ゲノムワイド解析技術に基づくサケ科魚類癌ウイルスのワクチン開発

研究課題名（英文） Development of vaccine against *Oncorhynchus masou* virus (OMV) disease based on whole genome analysis of OMV

研究代表者

笠井 久会 (KASAI HISAE)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授

研究者番号：50399995

研究成果の概要（和文）：OMV (*Oncorhynchus masou* virus; SalHV2) はサケ科魚類に感染して肝炎と基底細胞癌を引き起こすウイルスである。ニジマスに対し高い病原性を有する株を選抜し、これに病原性・腫瘍原性の異なる2株を加えてOMVの全ゲノム配列決定とゲノム解析を行った結果、病原性、腫瘍原性への関与が推察される遺伝子が見出された。さらに選抜された株を元に作成したワクチンのワクチン有効率は、実用的ワクチンの基準値であるRPS値は60%を超え、74%に達した。

研究成果の概要（英文）：*Oncorhynchus masou* virus (OMV) disease is a hepatic, oncogenic and skin ulcerative condition of national and international socio-economic importance. The OMV genome sequences of three strains including the high virulent strain against rainbow trout revealed about 160 kbp genome composed of a unique long sequence, and a unique short fragment flanked by inverted repeats. ORFs involved in pathogenicity or oncogenicity were found in OMV genome. Furthermore an effective vaccine was developed in which relative percent survival (RPS) reached 74%.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合 計       |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2011年度 | 800,000   | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総 計    | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚病，増養殖

## 1. 研究開始当初の背景

OMV はヘルペスウイルス目のウイルスで魚類で初めて発見された腫瘍原性を有するウイルスである。分類学的には、*Alloherpesvirus* 科 *salmoherpesvirus* 属に属し、分布は国内のみに留まることから、ウイルスが世界流行しないよう国内で制圧すべき状況にある。

OMV は宿主のサクラマスを始めヒメマス、サケ、ギンザケ、ニジマスに病原性を示し、特にヒメマス、サケ、サクラマスには強い病原性を示す。腫瘍原性も実験的に確かめられている。サクラマスから OMV が分離された当初、OMV のサクラマス、シロサケ、ギンザケおよびニジマスに対する病原性は仔魚期のみで

あった。一方、1988年にギンザケから分離された OMV はギンザケに対し、稚魚のみならず、より大型の魚に対しても病原性を有していることが報告され、1999年に分離されたニジマス由来 OMV は、ニジマスに対し強毒であるが、腫瘍原性は認められていない。このように分離株によって病原性に大きな違いが見られるものの、これら分離株は血清学的に均一であり区別されない。病原性の違いや腫瘍原性を明らかにするには、ゲノムワイド解析技術を用いた株間の詳細な比較が不可欠であるが、いまだ行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、サケ科魚類に感染して肝炎と基底細胞癌を引き起こす OMV (*Oncorhynchus masou virus*; SalHV2) の全ゲノム配列を解析し、宿主の発癌誘起機構の解明と OMV 感染防御に有効なワクチンを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 代表株の選抜およびウイルスゲノム DNA の RFLP 解析：1978 年から現在まで、各地で各魚種から分離されている 200 を超える株から代表株を選抜し、ニジマスに対する病原性、ニジマス由来 RTG-2 細胞での CPE および増殖性を比較した。次いで、サクラマス由来 00-7812 株、ギンザケ由来 COTV-8801 株およびニジマス由来 RtNa-0010 株よりゲノム DNA を抽出し、RFLP 解析に供した。

(2) ウイルスゲノムの全塩基配列の決定および遺伝子領域の解析：00-7812 株、COTV-8801 株および RtNa-0010 株を次世代シーケンス解析に供し、得られたコンティグをマルチプル PCR により整列化した。コンティグ間の未知領域およびゲノム末端までの未知領域をクローニングした後、塩基配列を決定した。次いで、ゲノム塩基配列から ORF を抽出し、アノテーションを行った。

(3) ワクチンの開発：ニジマスに対する病原性が最も高かった RtNa-0010 株を RTG-2 細胞で培養後、4℃で 80,000×*g*、120 分間超遠心し、感染力価にして 10<sup>9</sup> TCID<sub>50</sub>/mL の濃縮液を作製しホルマリンで不活化した。平均体重 30 g 前後のニジマスに、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup> および 10<sup>8</sup> TCID<sub>50</sub>/0.1 mL/尾となるよう腹腔内接種し、14 日後に攻撃試験 (10<sup>0.9~2.9</sup> TCID<sub>50</sub>/尾) を行い 36~80 日間観察し、ワクチンの有効率 (Relative percent survival; RPS) を求めた。

## 4. 研究成果

(1) 代表株の選抜およびウイルスゲノム DNA の RFLP 解析：2000 年にニジマスより分離

した株の感染力価は他の株より 100 倍以上高く、魚体重 1 g、11 g および 114 g のニジマスを用いた人為感染試験では魚体サイズに関わらず 70~88% と高い死亡率をもたらした。

ウイルスゲノムを *Bam*HI で処理した場合、00-7812 株と他の 2 株は明らかに異なるパターンを示し、類似した切断パターンを示す COTV-8801 株と RtNa-0010 株にも相違が認められた。(図 2) これにより OMV の型別が可能となり、さらにこれら 3 株と他の分離株を比較すると、分離年および病原性の違いに応じて区別された。以上より、OMV は血清学的に同一であるが、株間にウイルスゲノムの塩基配列の変異が認められ、その変異に伴う病原性の変化が生じている可能性が示された。

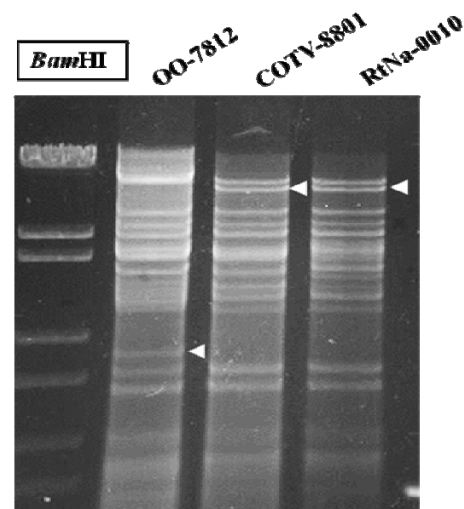


図 2. ウイルスゲノム DNA の制限酵素切断パターン。

(2) ウイルスゲノムの全塩基配列の決定および遺伝子領域の解析：OMV ゲノムは、00-7812 株、RtNa-0010 株ともに約 160 kbp、GC%は 46%前後であった。ゲノム中には、およそ 3 kbp のリピート領域が含まれていた。OMV ゲノムは、ロングユニーク領域および両端に逆位反復配列が位置したショートユニーク領域から構成され、この構造は *salmonid herpesvirus 1* (SaHV-1) と一致した。(図 2) サケ科魚類以外の魚類ヘルペスウイルスではロングユニーク領域とその両端に位置する同方向配列のリピート領域から構成されることから、この構造はサケ科魚類のヘルペスに特徴的な構造であるが、同様の構造はヒトの水痘帯状疱疹の原因ウイルスである *Varicella zoster virus* (VZV) にもみられる。また、OMV のロングユニーク領域内には 180 bp 程度の配列が 10 回繰り返したリピート領域が含まれ、これはカエルのヘルペスウ

イルス Ranid herpesvirus 2 やヒトの伝染性単核症の原因ウイルスである Epstein-Barr virus (EBV) にもみられることから、OMV は様々な宿主のヘルペスウイルスの構造的特徴を併せ持っていることが明らかになった。ユニーク領域からは約 100 個、リピート領域からは 1 個の protein coding ORF が予測された。魚類および両生類のヘルペスウイルス内で保存されている 12 の遺伝子は、OMV ゲノム中にも存在し、高い類似性を示した。抽出された ORF の多くが機能不明であるが、ナマズのヘルペスウイルス *Ictalurid herpesvirus* (IcHV1) およびチョウザメのヘルペスウイルス *Acipenserid herpesvirus 2* (AciHV2) と類似性を示すものが多かった。

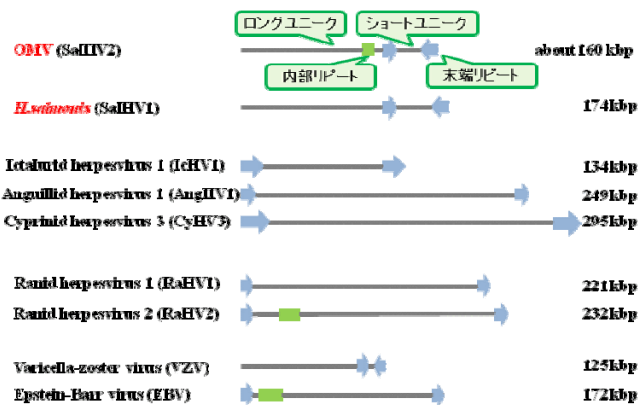


図 3. OMV および他のヘルペスウイルスのゲノム構造。

ORF-a はモチーフ検索の結果、Apoptosis regulator proteins の機能が付された。Apoptosis regulator proteins は細胞のアポトーシスを抑制する機能を有する。これは、他の魚類ヘルペスウイルスの推定遺伝子領域の機能にはみられない OMV に特徴的なものであった。哺乳類のヘルペスウイルスではウイルスゲノム中の癌遺伝子が細胞のアポトーシスの誘導を抑制し、細胞の癌化を促進することから、OMV の腫瘍原性にこの遺伝子が関与している可能性が示された。

00-7812 株および RtNa-0010 株から予測された protein coding ORF の大きさを比較すると、全 ORF のうち約 20 個の ORF 長が異なっていた。これら株間で長さの異なる ORF について COTV-8801 株のゲノム塩基配列から対応する ORF を抽出し、3 株でのマルチプルアライメントを行なった。RtNa-0010 株と COTV-8801 株のアミノ酸配列はほぼ一致し、00-7812 株のみ明らかに異なる ORF が多くみられた。つまり、本実験に供した OMV 3 株が 00-7812 株とその他の 2 株に区別され、この区分は成魚に対する病原性の有無と一致す

る。このことから、これら 00-7812 株とその他 2 株が区別される推定遺伝子領域が病原性に関わる可能性が示された。それらの推定遺伝子領域の多くはその機能が不明である。これらの遺伝子の機能を解析することが、病原性の相違を生じさせるメカニズムの解明につながると考えられる。

一方、ORF-b はホモロジー検索の結果、IcHV の ORF59 との類似性が示された。IcHV の ORF59 はエンベロープの主要タンパクをコードしていることから、OMV においても同様の機能が予想される。ウイルスのエンベロープタンパクは抗原性に大きな影響を与える。OMV 3 株の ORF36 のアミノ酸配列を比較すると、RtNa-0010 株と COTV-8801 株は完全に一致するが、00-7812 株では 1 残基の置換があった。さらに ORF-c は、膜タンパクの機能が付されたことから、ウイルスのエンベロープの構成に関与している可能性が示された。この ORF について OMV 3 株間のアミノ酸配列を比較すると、部分的に 00-7812 株のみが異なる配列を有していた。これら膜タンパクをコードする遺伝子の変異が抗原性を変化させ、病原性にも影響を与える可能性が考えられる。

以上、OMV の全ゲノムシーケンスにより、多くの構造的特徴および推定遺伝子領域に関する知見が得られた。特に、OMV の病原性および腫瘍原性に関わる候補遺伝子を予測することができた。今後、由来の異なる株のゲノム情報を得ることで、株間の比較を通じた病原性および腫瘍原性のメカニズム解明が期待される。

(3) ワクチンの開発：ワクチネーションの期間中ワクチン接種魚に特に異常は観察されなかった。不活化ウイルス抗原量が  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/尾の場合、累積死亡率は有意に低く、また、RPS も 85.7 と、ワクチンとして有効な結果が得られた。不活化ウイルス抗原量が  $10^7$  および  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/尾のときの RPS はそれぞれ 57.1 および 42.9 であった。不活化ウイルス抗原量を  $10^{6.7}$  TCID<sub>50</sub>/尾とし、 $10^{0.9}$  および  $10^{2.9}$  TCID<sub>50</sub>/尾の 2 濃度で攻撃試験を行ったところ、2 回の試験の RPS の平均値はそれぞれ 74.6 および 51.4% であった。(図 3) 以上より、ニジマスのヘルペスウイルス病に対するホルマリン不活化ワクチンの抗原量は  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/尾程度が適切であり、これにはウイルス培養原液を使用することから、実用化に向けては培養時のウイルス感染力価の向上が課題となることが示された。さらにゲノム解析により抽出された感染防御抗原の候補となる ORF は、サブユニットワクチンの候補となり、加えて抗体検出 ELISA 用の抗原としての利用も可能と考える。

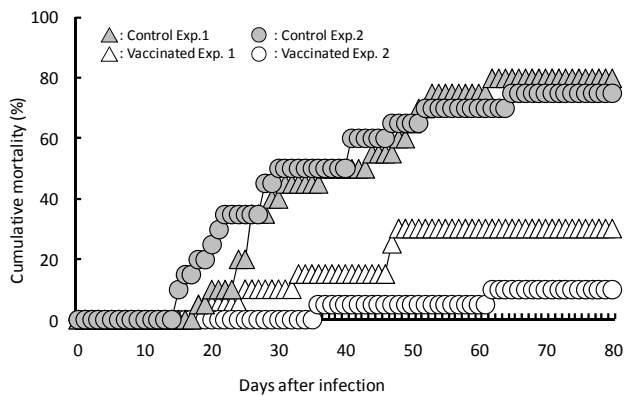


図3. 試験ワクチン接種群および  
対照群における累積死亡率。  
(攻撃試験条件:  $10^{0.9}$  TCID<sub>50</sub>/尾)

## 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3件)

①Yoshida, N., R. Sasaki, H. Kasai and M. Yoshimizu, Inactivation of koi-herpesvirus (KHV) in water using bacteria isolated from carp intestines and carp habitats, *Journal of Fish Diseases*, **35**, in press, 2012, 査読有。

②Kasai, H., K. Kawana, M. Labaiden, K. Namba, and M. Yoshimizu, Elimination of *Escherichia coli* from oysters using electrolyzed seawater. *Aquaculture*, **319**(3-4), 315-318, 2011, 査読有。  
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.07.025

③吉田夏子, 石田一晃, 笠井久会\*, 吉水守ヒトデ成型骨片への魚類飼育排水処理施設由来細菌の付着性. 日本水産学会誌, 77(1) 94-96, 2011, 査読有。  
DOI: 10.2331/suisan.77.94

〔学会発表〕(計11件)

①森 真希・笠井久会・吉水 守, サケ科魚ヘルペスウイルス Oncorhynchus masou virus (OMV) の全ゲノム解析, 平成24年度日本魚病学会春季大会, 平成24年3月17-18日, 東京海洋大学。

②Yoshimizu, M. and H. Kasai, Control strategy for viral diseases of salmonid fish and flounders at hatchery or seed production facility, and net pen or tank in Japan. 3rd International Symposium on Cage Aquaculture in Asia, , November 16-19, 2011, Malaysia.

③Yoshida, N., H. Kasai and M. Yoshimizu, Survivability of koi herpesvirus (KHV) and a new approach for disinfection of KHV in

fish breeding effluent water using anti-KHV bacteria. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 11-16, 2011, Hokkaido, Japan.

④笠井久会・降幡 充・吉水 守, サケ科魚類のヘルペスウイルス (OMV) 不活化ワクチンに必要な抗原量. 平成23年度日本魚病学会春季大会, 平成23年3月26-27日, 東京大学。

⑤吉田夏子・笠井久会・吉水 守, 抗KHV物質産生細菌による魚類飼育排水中のKHVの不活化. 平成23年度日本魚病学会春季大会, 平成23年3月26-27日, 東京大学。

⑥吉田夏子・清水智子・笠井久会・吉水 守, KHVの環境水中における生存性および抗KHV活性を有する細菌の探索. 平成23年度日本魚病学会春季大会, 平成23年3月26-27日, 東京大学。

⑦吉水 守・笠井久会・小原昌和, 洗卵による病原細菌・ウイルスの除去効果および卵内への侵入防止効果. 第4回サケ学研究会, 平成22年12月18日, 北海道大学。

⑧小原昌和・小川 滋・笠井久会・吉水 守, 等調液洗卵法による病原細菌およびウイルスの除去と卵内感染防除効果. 平成22年度日本魚病学会大会, 平成22年9月21-22日, 三重大学。

⑨小原昌和・笠井久会・吉水 守, 魚類病原細菌および一般細菌の人工感染試験による卵内感染機序の検討. 平成22年度日本魚病学会大会, 平成22年9月21-22日, 三重大学。

⑩森 真希・笠井久会・吉水 守, 細胞の増殖およびCPE形成時の形態変化. 平成22年度日本魚病学会大会, 平成22年9月21-22日, 三重大学。

⑪Kohara, M., S. Ogawa, H. Kasai and M. Yoshimizu, Occurrence of Intra-Ovum Infection and Effect of Egg-washing with Isotonic Solution on Elimination of Bacteria and Viruses before Fertilization in Salmon Aquaculture. 6th International Symposium on Aquatic Animal Health, September 5-9, 2010, U.S.A..

〔図書〕(計1件)

①Yoshimizu, M. and H. Kasai, CABI International, Fish Diseases and Disorders, Vol. 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections (2nd edition), Chapter 7: Oncogenic viruses, 2011, pp. 276-301.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠井 久会 (KASAI HISAE)

北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授  
研究者番号: 50399995