

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03046

研究課題名(和文)なぜ伝染性造血器壊死症ウイルスは強毒化するのか？ - ウイルス強毒化要因の解明

研究課題名(英文) Why has infectious hematopoietic necrosis virus been changing into more virulent? Identification of the factors causing the virus change

研究代表者

佐野 元彦 (SANO, Motohiko)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：00372053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年の伝染性造血器壊死症(IHN)ウイルス強毒化の要因を解明することを目的とした。死亡稚魚由来ウイルス株は、その由来系統のニジマス稚魚に強い毒力を示す傾向があり、インターフェロン感受性が低かった。一方、産卵親魚体腔液由来株は多くが弱毒であった。ウイルスの持続感染は、死亡率の低い感染群で発生しやすく、その発生抑制には血中抗体が関与していることが示唆された。産卵親魚は、免疫が低下する産卵直前に再感染することが判明した。従って、毒力の低いウイルス株に感染・耐過した稚魚が養殖育成期間にわたって持続感染を起こすことによって魚体内でウイルスの多様性が生じ、この中から強毒ウイルスが出現するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ニジマス海面養殖は、企業参入が相次ぎ、大きな期待が寄せられているが、依然として伝染性造血器壊死症(IHN)がニジマス養殖に大きな被害を与え続けている。以前は小さな稚魚だけの被害であったが、近年では100g以上の魚も死亡するようになり、ウイルスの強毒化が大きな脅威であり、ニジマス養殖振興にはこの抑制が喫緊の課題である。本研究の結果、今まで想像されていた親魚でのウイルスの変異・強毒化ではなく、死亡の少なかった稚魚群の育成期間にわたる持続感染によってウイルス変異が起きると推察された。これ以上の強毒化阻止には、稚魚期のウイルス接触を防止するとともに、ワクチン等の予防手段の開発が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to elucidate the factors behind the recent increase of virulence of infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus. Virus isolates from dead rainbow trout fry tended to show strong virulence to the fry strain from which they were isolated, and the virus might be less sensitive to interferon of the fish strain. Many isolates from ovarian fluid of spawning fish were low virulent. Persistent virus infection was more likely to occur in infected fish with a low mortality rate and blood antibodies against the virus can be involved in suppressing the persistent infection. Adult fish were found to be re-infected with the virus just before spawning when their immunity was suppressed. These results suggest that persistent infection occurs in the juvenile fish surviving in a primary infection with low virulent virus, resulting in appearance of virus diversity in the fish during the growing up period and consequently emerging of highly virulent viruses.

研究分野：水族病理学

キーワード：ニジマス養殖 ウイルス病 伝染性造血器壊死症 強毒化 強毒化要因 持続感染 再活性化 親魚ウイルス保有

1. 研究開始当初の背景

近年、ニジマス海面養殖に企業参入が相次いでおり、大きな期待が寄せられている。このように期待が高まる中、依然として伝染性造血器壊死症 (IHN) がサケマス養殖に大きな被害を与え続け、被害額で約半数を占め、常に第 1 位となっている。日本に IHN ウイルスが持ち込まれた初期の 70 年代では 1-2g 程度のごく小さな稚魚の被害が主であったものが、徐々に大きな個体の死亡が増加し、近年では 100g 以上の魚も感染・死亡するようになっている。この IHN ウイルスの強毒化は大きな脅威であり、ニジマス海面養殖の促進においても、この IHN ウイルス強毒化を抑えることが喫緊の課題である。

このウイルス強毒化を食い止める対策の構築のためには、「なぜ IHN ウイルスは近年強毒化傾向にあるのか？」を理解する必要がある。特に、強毒化を制御するために重要なのは、毒力の強いウイルスがどのように選択されるか？その環境要因は何なのか？を明らかにすることである。

種苗生産業者は、一度ウイルスに感染させた後、生残し免疫を得た耐過魚を養殖業者へ販売するようになっている。このように生産された多くの感染耐過魚はウイルスキャリアーとなり、このウイルスキャリアー魚の移動により、感染ウイルスが拡散していると考えられる。このような状況の中、このウイルスキャリアー魚を親魚として長期に育成して性成熟を迎えると、免疫能が低下し、魚体内でウイルスが再活性化して環境中に排泄されると推察される。この親魚に持続的に感染する過程で、大型の成魚中でも増殖できるウイルスが選択される可能性があり、このことが IHN ウイルスの強毒化を促進していると想像できる。このことが明らかとなれば、親魚におけるウイルス制御を行うことにより IHN ウイルスの強毒化を食い止める体制の構築を行うことが可能となる。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、近年、より大型の個体に感染・死亡をもたらすように強毒化してきている IHN ウイルスについて、なぜ強毒化してきているのか、その要因を解明することを目的とし、

毒力の異なる分離株の特性解明、毒力の異なる分離株の持続感染性、養殖親魚のウイルス保有および疾病発生状況を検討する

3. 研究の方法

毒力の異なる分離株の特性解明

病魚や親魚由来の毒力や持続感染性の異なるウイルス分離株 *in vitro* や *in vivo* での性状等のウイルス特性を明らかにする。

毒力の異なる分離株の持続感染性

ニジマスに対する毒力と持続感染性を感染実験により明らかにする。また、それらの魚体内ウイルス動態と宿主の免疫応答の解析により、毒力と持続感染性の関連性を明らかにする。

養殖親魚のウイルス保有および疾病発生状況

親魚から効率良くウイルスを分離する方法を開発し、県水産試験場の協力を得て、親魚のウイルス保有調査を行い、IHN 発生状況と親魚保有ウイルスとの関連性を調べる。

4. 研究成果

毒力の異なる分離株の特性解明

養殖現場でニジマス稚魚の感染耐過魚の生産が行われるとき、2~3 割程度の死亡があるとの聞き取りから、3 割程度の死亡は生産の許容範囲であると判断し、本研究では 5g 以上の稚魚を用い、累積死亡率が 70%以上のウイルス株を強毒株、30%以下を弱毒株、その間の死亡率を中程度の毒力株とした。

2013 年ニジマス死亡魚由来の IHN ウイルス分離株の 4 株 (YN1311、NT1301、SO1304、TV1308) を選定し、ニジマス大型稚魚 (平均魚体重 13.5g) での感染実験で死亡率を調べ、それぞれ 70%、10%、20%、0% となり (図 1)、YN1311 は強毒、それ以外は弱毒と判定した。4 株のゲノム G 遺伝子の配列では同じ“長野遺伝子型”系統に分類された。4 株の EPC 細胞での増殖性や増殖温度では毒力と相関しなかったが、ニジマスの腎臓由来白血球での増殖性では強毒の YN1311 が 10^5 TCID₅₀/mL に達したのに比べ、弱毒の 3 株では 10^2 TCID₅₀/mL にとどまり、強毒株で増殖量が高かった。インターフェロンで誘導される Mx1 遺伝子の発現量について、ウイルス接種後のニジマス腎臓で調べると、感染 3 日後に、死亡が発生しなかった SO1304 ではほとんど上昇しなかったが、死亡が発生した 3 株では大きく上昇した (図 2)。YN1311 感染魚でも他のウイルスと同様に発現上昇していたにもかかわらず、多数の死亡が発生することから、強毒株はインターフェロンの感受性が低いものと考えられた。

長野県水産試験場と静岡県水産・海洋技術研究所富士養鱒場の協力を得て、2019 年の産卵親魚体腔液由来の 8 株 (長野 4 株・静岡 4 株) について、IHN の選抜育種をしていない熊谷系稚魚 (平均魚体重 7.3g) と選抜育種が進んだ富士養鱒場系稚魚 (平均魚体重 7.0g) を用いた感染

実験で死亡率を調べた。熊谷系に対して1株は中程度の毒力、7株は弱毒であった(表1)。しかし、この中程度株も富士養鱒場系には致死性を示さなかった。親魚体腔液由来のウイルス株は概して毒力が低いと考えられた。一方、2019年の死亡稚魚由来9株(長野5株・静岡4株)は、熊谷系に対してすべて弱毒であったが、富士養鱒場系に対しては、1株が強毒、3株が中程度の毒力、5株が弱毒であった(表1)。強毒1株と中程度の毒力3株の2株は静岡由来であったことから、死亡させた由来ニジマス系統に対して強い毒力を示す傾向にあると考えられた。これらのウイルス株うち毒力の異なる11株を用い、分離したニジマス腎臓白血球での増殖性を調べたが、同じような数や組成の白血球を得ることが難しく、ウイルスの培養が安定しなかった。そのため、RTG-2細胞および新たに作出した熊谷系と長野系ニジマスの鱚由来細胞を用いて、Poly I:Cでインターフェロン(IFN)誘導した時と誘導しないときのウイルス増殖性を調べたが、全体でみれば毒力との相関性は認められなかった。熊谷系ニジマス鱚由来細胞ではPoly I:Cの処理によりCPEの出現がなくなったり、大きく遅れるなどの阻害作用が見られたことから、熊谷系ニジマスでインターフェロン産生が高く、そのため、多くの分離株に対して死亡率が低かったのではないかと推測され、今後、調査する必要があると思われる。

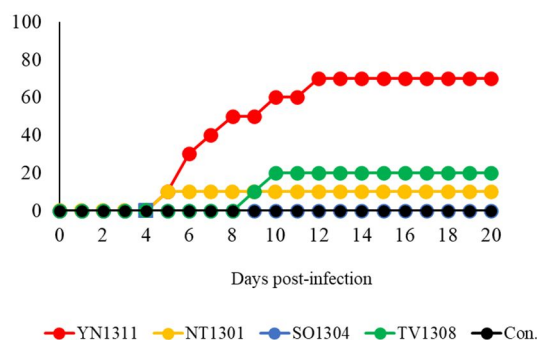


図1. ニジマス大型魚稚魚における累積死亡率の推移

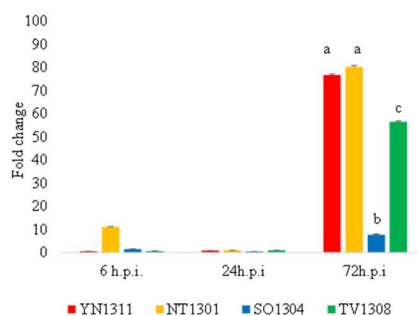


図2. 感染魚腎臓中のMx1遺伝子の発現量EF-1αで標準化し、非感染対照群の平均値を1とした時の相対値を算出。異なる記号間で有意差(p<0.05)。

表1. 体腔液と稚魚由来株のニジマス稚魚に対する

分離株番号	分離場所	由来材料	ニジマス稚魚死亡率(%)	
			熊谷系	富士養鱒場系
NF8	長野	体腔液	15	0
N9F	長野	体腔液	5	15
N18F	長野	体腔液	0	0
N52F	長野	体腔液	45	0
S27M	静岡	精液	30	5
S50M	静岡	精液	20	5
S37F	静岡	体腔液	0	5
S70F	静岡	体腔液	15	0
N5.26-2	長野	死亡稚魚	10	30
N5.26-5	長野	死亡稚魚	5	50
N5.30-5	長野	死亡稚魚	15	5
N6.4-5	長野	死亡稚魚	10	25
N6.21-3	長野	死亡稚魚	0	5
SB2-14	静岡	死亡稚魚	0	60
10202-s2	静岡	死亡稚魚	0	85
10202-s3	静岡	死亡稚魚	0	55
10091-s1	静岡	死亡稚魚	0	30
YN1311	参照株		70	5
SO1304	参照株		30	0

毒力の異なる分離株の持続感染性

で用いた4株(YN1311、NT1301、SO1304、TV1308)とニジマス大型稚魚による感染実験では、接種7日後に強毒株で高い魚体内ウイルス量を示したが、他のウイルス株では低い値であった。YN1311で接種25日後、NT1301で12日後、SO1304で25日後、TV1308で15日後には通常のウイルス分離によっては検出できなくなった。累積死亡率は、それぞれ80%、20%、10%、10%であった。これ以降、経時的に5尾ずつを取り上げ、免疫抑制剤であるデキサメタゾンとシクロスポリンの混合溶液を5回投与したのち、ウイルス分離を行ったところ、強毒のYN1311では接種30日後でウイルスが検出されなかったが、NT1301で37日後、SO1304で44日後、TV1308で30日後にウイルスが分離された(表2)。免疫抑制剤の投与により持続感

以上の結果から、産卵親魚は、免疫が低下する産卵直前にウイルスに再感染することが判明し、親魚におけるウイルスの持続感染は短期間と考えられるため、当初想定していた親魚におけるウイルス変異は強毒化に大きく関与していないと考えられた。一方、IHN ウイルスの持続感染は、血中抗体などの十分な免疫を誘導する死亡率の高い感染稚魚群では発生しにくく、死亡率の低い感染稚魚群で発生しやすいことが明らかとなった。毒力の低いウイルス株に感染・耐過した稚魚が 1 年程度の養殖育成期間にわたって持続感染を起こすことによって魚体内でウイルスの多様性が生じ、この中からこの感染したニジマス系統に対する強毒ウイルスが出現するものと考えられた。この宿主系統の毒力の特異性はインターフェロンなどの宿主防御系を潜り抜けることができるウイルス特性によるものと推察された。養殖業者は、池出し後の稚魚をウイルスに暴露することにより 2~3 割以下の死亡率の軽い感染を経験させることで、稚魚に免疫を付与することを行っており、この感染耐過魚の作出がウイルスの多様性の増加および強毒化を促進していると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坪井豪亮・野中 碧・平部 俊（海洋大）・竹内智洋・小川 滋・重倉基希・中村永介 松山 創・間野伸宏・加藤豪司・佐野元彦
2. 発表標題 IHV感染耐過稚魚におけるウイルスの持続・潜伏感染
3. 学会等名 令和4年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aoi Nonaka, Gosuke Tsuboi, Suguru Hirabe, Wei Chang, Tomohiro Takeuchi, Kouta Takehana, Shigeru Ogawa, Eisuke Nakamura, Hajime Matsuyama, Shiro Itoi, Goshi Kato, Motohiko Sano
2. 発表標題 Molecular epidemiological analysis revealing dynamics of infectious hematopoietic necrosis virus in facility
3. 学会等名 20th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野中 碧・坪井豪亮・平部 俊・魏 暢・竹内智洋・竹花孝太・小川 滋・中村永介・松山 創・糸井史朗・加藤豪司・佐野元彦
2. 発表標題 伝染性造血器壊死症発生事例の分子疫学的分析の試み
3. 学会等名 令和3年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2021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
---------	---------