

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20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380112

研究課題名（和文） 養殖現場を視野に入れた魚類ウイルスRNAワクチンの実用化

研究課題名（英文） Practical use of RNA vaccine at aquaculture field.

研究代表者

吉水 守 (YOSHIMIZU MAMORU)

北海道大学・大学院水産科学研究院・特任教授

研究者番号：40122915

研究成果の概要（和文）：

本研究で実用化を目指した「ds-RNA 型」ワクチンは、申請者らが開発してきた「mRNA 型」ワクチンを発展させたものであり、ds-RNA 接種により産生されるインターフェロンを利用した簡便かつ実用的な魚類ウイルスに対する免疫方法である。Poly(I:C)をニジマス、マハタ、ヒラメに投与し、魚を一過性の抗ウイルス状態とし、それぞれ伝染性造血器壊死症、ウイルス性神経壊死症、ウイルス性出血性敗血症原因ウイルスで攻撃して生存率を対照と比較した。3例共にワクチン効果が確認でき、この間に養殖環境中に存在する病原ウイルスに暴露させることでウイルスに対する特異免疫を誘導することもできた。さらに実用化に向け、魚毒性の心配がない用法・容量を定めることができた。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we developed a novel fish-immunization with a synthetic double-stranded RNA [Poly(I:C)] and live pathogenic viruses. The fishes immunized with live pathogenic virus, followed by administration of Poly(I:C), became a transient, non-specific antiviral state, and those fish survive the initial immunization with live virus, thereby mounting a specific protective immune response against the injected pathogenic virus. Strong protective immune response was observed in rainbow trout, Japanese flounder and sevenband grouper by Poly(I:C)-immunization with IHNV, VHSV and NNV, respectively. It is conceivable that Poly(I:C)-immunization will eventually be applicable to a wide range of fish species as well as other viruses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

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，ウイルス，ワクチン，ds-RNA，Poly(I:C)

1. 研究開始当初の背景

わが国をはじめ多くの国で魚介類の増養殖が盛んに行われているが「魚病」被害が産業上大きな問題になっている。環境汚染や食の安全の問題が大きく取りあげられ、魚病対策においてもホルマリン等有害物質の使用禁止や抗生物質の使用を減らす等の必要があり、より積極的な防疫対策としてワクチンの開発が切望されている。特にウイルス病では効果的な治療法がないために、ワクチン開発が緊急の課題であるが、魚類のウイルス病に対するワクチンとしては、イリドウイルス病のワクチンが唯一市販されているに過ぎない。

申請者らは、これまでに様々なウイルス病のワクチン開発に取り組んできた。その一つに「レトロウイルスを用いた RNA ワクチンに代わる新たな RNA ワクチン」がある。本ワクチンは、魚類病原ウイルスの感染防御抗原をコードする mRNA をレトロウイルス粒子にパッケージしたワクチンで、レトロウイルス粒子により細胞内に運ばれた mRNA がウイルス抗原を発現させ、免疫を誘導するものである。本 RNA ワクチンの開発過程で、申請者は興味深い現象に気がついた。感染防御抗原を発現しない RNA ワクチン区(対照区)の魚も、ウイルス攻撃に対しある程度の抵抗性を示すこと、さらに生残魚の血清から攻撃用ウイルス抗原に対する特異抗体が検出されることである。本現象は、RNA ワクチンを接種することで魚体内にインターフェロン(IFN)が誘導され、ワクチン魚がウイルス攻撃に対する非特異的な抵抗性を呈すばかりでなく、攻撃用ウイルスに対する特異免疫をも誘導していることが明らかになった。これまでの研究で、アクアビルナウイルスやレオウイルス等の非病原ウイルスに感染した魚が、IFN の誘導により、異種病原ウイルス(IHNV, VHSV, ノダウイルス)に対し非特異的な抵抗性を示す

ことが報告されている。しかし、これら生残魚の異種病原ウイルスに対する特異免疫応答については、全く着目されてこなかった。

2. 研究の目的

申請者らは、自然免疫であるインターフェロン(IFN)を利用することで、簡便かつ実用的な魚類ウイルスに対する免疫方法が確立できると考えた。すわなち、IFN 誘導物質である合成二本鎖 RNA [Poly(I:C)] を接種することにより魚体内に IFN を誘導させ抗ウイルス状態とし、この間に養殖環境に存在する病原ウイルスに暴露することで、ウイルスによる魚の死亡を制御しながらもウイルス感染を成立させ、最終的には病原ウイルスに対する免疫を成立させようとするものである。

本免疫方法は、申請者らが開発してきた「mRNA 型ワクチン」の発想をさらに発展させた「二本鎖 RNA 型(ds-RNA)のワクチン」であり、遺伝子組み換え技術を必要としないこと、ウイルスの培養ならびに不活化を必要としないこと、接種後速やかに消失するという RNA ワクチン最大の利点を継承していること、多様な魚種とウイルスに応用可能であることから、養殖現場での実用化が十分可能な「RNA ワクチン」である。本免疫法のモデルとして、ニジマスと伝染性造血器壊死症ウイルス(IHNV)、ヒラメとウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV) およびマハタとウイルス性神経壊死症ウイルス(NNV)での検討を計画した。

3. 研究の方法

本研究では、上記ニジマスと IHNV、マハタと RG-NNV およびヒラメと VHSV をモデルとし、IFN 誘導物質として非病原性伝染性脾臓壊死症ウイルス(IPNV) および合成二本鎖 RNA [Poly(I:C)] を用い、自然免疫である IFN を応用した魚類ウイルスに対する新しい免疫法の確立を検討した。

初年度は、ニジマスに非病原性のIPNVを接種し、次いでIHNVで攻撃し、予めIPNVに感染したニジマスがIHNVの攻撃に対し抵抗性であるかどうかを検討した。次に、IHNV攻撃で生残したニジマスより採血し、得られた血清中に抗IHNV抗体が誘導されているかどうかを観察した。また、IHNV攻撃で生残したニジマスからIPNV およびIHNV が分離されるかどうかを検査した。さらに、上記IHNV 一次攻撃生残ニジマスをIHNVで再攻撃し、IHNV再攻撃時の発症・死亡率を観察した。IPNV の代わりにIFN誘導物質である Poly (I:C)を用いて同様の実験を行い、Poly(I:C)接種によりIFN が誘導されたニジマスがIHNV 攻撃に対し抵抗性であるかを試験し、Poly(I:C)接種ニジマスが抗ウイルス状態であるかどうかを観察した。

次年度は、マハタと RG-NNV をモデルにIFNを利用した免疫法が有効であるかどうかを検証した。すなわち、Poly(I:C)を接種したマハタが RG-NNV に対し抵抗性であること、また生残マハタ血清から抗 RGNNV 抗体が検出されること、さらには生残マハタが RGNNV による再攻撃に対し抵抗性であることを実験的に検証した。さらにIFN ならびに抗ウイルス状態誘導のためのPoly(I:C) 最小有効濃度について異なる濃度のPoly(I:C)をマハタに接種した後、各々を RG-NNV で攻撃し、各実験区の抗ウイルス状態 (RG-NNV に対する抵抗性)を比較した。IFN により誘導された抗ウイルス状態の持続期間をマハタにPoly(I:C)を接種後、0, 2, 4, 7, 14 日後にRG-NNVで攻撃し、その累積死亡率を比較することで、IFN により誘導された抗ウイルス状態の持続期間を明らかにした。本実験により、Poly(I:C)接種後のウイルス攻撃のタイミングを検討した。

21-22 年度に、IFN による抗ウイルス状態誘導のためのPoly(I:C)の用法・用量を明らかにし得たので、本免疫方法が、その他のウイ

ルス病へも応用可能か検証した。試験はヒラメとVHSV, マダイとマダイイリドウイルス (RSIV)で実施した。これらのウイルス病について検討することで、現在我が国で問題になっているウイルス病のほとんどが網羅できると考えた。

最終年度は、本免疫法の実用化に向け、Poly (I:C)の水産用医薬品としての許認可を目指すために、Poly(I:C)の毒性・残留性および用法・用量について検討した。なお、本法で免疫が成立したことを裏付けるためには、ウイルスに対する特異抗体の正確な検出法が不可欠である。本研究では、これまでに申請者らが開発した魚類抗体検出ELISA 法を用い、従来不可能とされてきたマダイイリドウイルス病ウイルスに対する特異抗体の検出を試みた。

4. 研究成果

本研究は、インターフェロン(IFN)を利用し、簡便かつ実用的な魚類ウイルスに対する免疫方法[Poly(I:C)]免疫法の確立と実用化を目指すものであり、初年度はニジマスとIHNV をモデルに以下の成果を得た。1) ニジマスに非病原性のIPNVを接種し、次いでIHNVで攻撃を実施し、予めIPNVに感染したニジマスがIHNVの攻撃に対し抵抗性であることを示した。2) IHNV 攻撃で生残したニジマスの血清中に、抗IHNV抗体が誘導されていることを確認した。3) 上記IHNV 1次攻撃生残ニジマスをIHNVで再攻撃し、IHNVによる再攻撃に対し抵抗性であることを確認した。以上の結果より、IPNVに続きIHNVで攻撃したニジマスがIHNVに対する免疫を獲得することが明らかになった。次いで、4) IPNVの代わりにIFN誘導物質であるPoly(I:C)を用いて同様の実験を行った。すなわち、Poly(I:C)を接種することによりIFNが誘導されたニジマスがIHNV攻撃に対し抵抗性であることを実験的に確認することで、Poly(I:C)接種ニ

ジマスが抗ウイルス状態であることを確認した。5) IHNV 攻撃生残魚の血清中に抗 IHNV 抗体が誘導されていることを確認し、さらに IHNV による再攻撃試験により、IHNV 一次攻撃生残魚が IHNV に対し抵抗性であることを確認した。6) 本法では、抗ウイルス状態の魚の免疫に生ウイルスを用いるが、本法で免疫した魚を解体しウイルス検査を実施したところ、ウイルスは分離されず免疫魚がウイルスキャリアーとならないことを確認した。以上の実験により、IPNV あるいは Poly(I:C) を接種することでニジマスが抗ウイルス状態になること、さらに抗ウイルス状態にある魚を IHNV で攻撃することにより、ニジマスを殺すことなく IHNV に対する免疫を獲得させることが可能であることを明らかにした。

次年度は IFN 誘導物質である合成二本鎖 RNA [Poly(I:C)] を投与することで、魚を一過性の抗ウイルス状態とし、この間に病原性ウイルスに暴露させることでウイルスに対する特異免疫を誘導するかどうか検討した。低水温期の養殖ヒラメに甚大な被害をもたらす VHS に対し、Poly(I:C) 免疫法の有効性ならびに Poly(I:C) の用法・用量について検討した。供試魚として、長崎県で種苗生産したヒラメ (31.7g) を、また免疫および攻撃用病原ウイルスとして VHSV obama25 株を用いた。Poly(I:C) 免疫法の有効性確認試験では、供試魚に Poly(I:C) (200 μ g/fish) を筋肉内接種し、2 日目に VHSV ($10^{4.3}$ TCID₅₀/fish) を接種した。その後 4 週間目に VHSV で攻撃した死亡率の推移を観察した。また、Poly(I:C) 投与 2 日前から 14 日後にかけて VHSV 攻撃し、各区の死亡率の推移を比較することで、抗ウイルス状態の持続期間について検討した。最小有効投与量試験では、12.5 μ g/fish から 200 μ g/fish について検討した。Poly(I:C) 投与後 VHSV を接種した魚

では死亡は認められず (RPS:100%)、また本生残魚は VHSV による再攻撃に対し高い抵抗性 (RPS:100%) を示した。なお、生残魚の血清から VHSV に対する特異抗体が検出された。従って、ヒラメに Poly(I:C) を投与した後に VHSV を接種することで、VHSV に対する特異免疫が誘導できることが示された。Poly(I:C) 投与によるヒラメの抗ウイルス状態は、投与翌日から 7 日目まで持続することが明らかになった。また、ヒラメにおける Poly(I:C) 免疫法では、12.5 μ g/fish 以上の Poly(I:C) を投与すれば十分であった。

3 年目は、マハタに NNV に対する免疫を獲得させるために必要な最小ウイルス量を筋肉内接種法と浸漬法により求めた。筋肉内接種区では、予め Poly(I:C) を 50 μ g/尾ずつ投与したマハタ種苗 (平均体重 53g) の背鰭下部背筋内に、 $10^{5.3} \sim 10^{0.3}$ TCID₅₀/mL となるよう 10 倍段階希釈した RG-NNV を 100 μ L/尾・12 尾/区ずつ接種した。一方、浸漬区では、Poly(I:C) を 50 μ g/尾ずつ投与したマハタ種苗 (平均魚体重 12g) を、RGNNV が $10^{6.3} \sim 10^{2.3}$ TCID₅₀/mL となるよう 10 倍段階希釈した紫外線照射海水に 60 尾ずつ 25.7°C で 30 分間浸漬した。筋肉内接種区は 3L 容円形水槽で個別収容し、浸漬試験区は 100L 円形水槽に各 60 尾収容した。免疫後 3 週間飼育したのち、各区の供試魚を RGNNV ($10^{4.3}$ TCID₅₀/尾、筋肉内接種) で攻撃し、死亡率の推移を 2 週間観察した。なお、実験終了時に各生残魚の血清を回収し、抗 RGNNV 抗体検出 ELISA に供した。マハタを用いた Poly(I:C)-免疫法において、RPS: 90%以上の効果を誘導するためには、筋肉内接種法で RGNNV を $10^{3.3}$ TCID₅₀/尾以上の投与する必要があるが、また浸漬法では $10^{4.3} \sim 10^{5.3}$ TCID₅₀/mL 以上の RGNNV 液へ浸漬する必要があることが示された。これらのウイルス量は、どれもマハタに対する半数致死量以上であ

った。なお、筋肉内接種区の供試魚では、分量の抗 RGNNV 抗体が検出されたが、浸漬区においては抗 RGNNV 抗体が検出されなかったにもかかわらず、RGNNV に対する十分な防御効果が認められた。

最終年度は、まず Poly(I:C)の魚に対する毒性および残存性をヒラメおよびサケを対象に検討した。平均体重 8.2 g のヒラメを 17°Cあるいは 13°Cで飼育し、800, 400, 200 および 100 μ g/尾となるよう Poly(I:C) を筋肉内接種し、その毒性について検討した。17°C飼育区では、800 μ g/尾接種区で1尾死亡したが、400 μ g/尾以下の接種区では死亡は認められなかった。しかし、200 μ g/尾接種区の 16.7~33.3%で接種部位の周辺の皮膚に赤変および潰瘍が認められた。一方、13°C飼育区では、100 μ g/尾接種区の 33.3%に、また 800 μ g/尾接種区では 83.3%に死亡あるいは潰瘍が認められた。1,000 μ g/尾接種のサケでも同様に低水温の方が障害は大きく現れた。次いで、Poly(I:C)投与魚のインターフェロン誘導の指標として、Mx 遺伝子の発現をインダイを対象に観察し、その発現を確認した。以上、Poly(I:C)は低温下で毒性を示すことが明らかとなったが、その濃度は昨年度までに検討してきた用法・用量の 10~20 倍濃度であり、実用上問題はないと考えられた。

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 20 件)

1. Oh, M.-J., H. J. Gye, T. Nishizawa, Assessment of the sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* with a live nervous necrosis virus (NNV) vaccine at natural seawater temperature. *Vaccine*, 査読有, Vol. 31,

2013, 2025-2027.

DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.02.049

2. Oh, M.-J., W-S. Kim, H-G. Seo, H-J. Gye, T. Nishizawa, Change in infectivity titre of nervous necrosis virus (NNV) in brain tissue of sevenband grouper, *Epinephalus fasciatus* Thunberg, with Poly(I:C) administration, *J. Fish Dis.*, 査読有, Vol. 36: 2013, 159-162. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2012.01451.x
3. Nishizawa, T., H-J. Gye, I. Takami, M.-J. Oh, Potentiality of a live vaccine with nervous necrosis virus (NNV) for sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus* at a low rearing temperature. *Vaccine*, 査読有, Vol. 30, 2012, 1056-1063.
DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.12.033
4. Oh, M.-J., I. Takami, T. Nishizawa, W-S. Kim, C-S. Kim, S-R. Kim, M-A. Park, Field tests of Poly(I:C) immunization with nervous necrosis virus (NNV) in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), *J. Fish Dis.*, 査読有, Vol. 35, 2012, 187-191.
DOI: 10.1111/j.1365-2761.2011.01334.x
5. Nishizawa, T., I. Takami, M. Yanga, M.-J. Oh, Live vaccine of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) for Japanese flounder at fish rearing temperature of 21 C instead of Poly(I:C) administration. *Vaccine*, 査読有, Vol. 29, 2011, 8397- 8404.
DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.08.032
6. Takami . I., S-R. Kwon, T. Nishizawa, M. Yoshimizu, Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by

- Poly(I:C) immunization. *Dis. Aquat. Org.*, 査読有, Vol. 89, 2010, 109-115.
DOI: 10.3354/dao02185
7. Nishizawa, T., I. Takami, Y. Kokawwa, M. Yoshimizu, Fish-immunization using a synthetic double-stranded RNA Poly(I:C), an interferon inducer, offers protection against RGNNV, a fish nodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, 査読有, Vol. 83, 2009, 115-122.
DOI: 10.3354/dao02001
 8. Mochizuki, M., H.J. Kim, H. Kasai, T. Nishizawa, M. Yoshimizu, Virulence change of infectious hematopoietic necrosis virus against rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral molecular evolution. *Fish Pathol.*, 査読有, Vol. 44, 2009, 159-165.
DOI: 10.3147/jsfp.44.159
 9. Kim, H-J, N. Oseko, T. Nishizawa, M. Yoshimizu, Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or Poly(I:C). *Dis. Aquat. Org.*, 査読有, Vol. 83, 2009, 105-113.
DOI: 10.3354/dao02000
- [学会発表] (計 23 件)
1. 吉水 守, 魚類ウイルス病とその防除・防疫に関する研究. 日本水産学会受賞講演, 東京海洋大学, 2013年3月26日-30日.
 2. Gye, H.J., I. Takami, M.-J. Oh, T. Nishizawa, Utilization of Poly(I:C)-immunization for viral nervous necrosis in sevenband grouper. In “5th Vaccine and ISV Annual global Congress”, Seattle Marriott waterfront Hotel, Seattle, USA, 2nd-4th October, 2011.
 3. Nishizawa, T., I. Takami, S.R. Kwon, M. Yoshimizu, M-J. Oh, Poly(I:C) immunization for fish virus diseases. In “The 8th International Symposium of Viruses of Lower Vertebrates”, Universidad de Santiago de Compostela, Spain, April 26-29, 2010.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
吉水 守 (YOSHIMIZU MAMORU)
北海道大学・大学院水産科学研究院・特任教授 (2011.3.31まで教授)
研究者番号: 40122915
 - (2) 研究分担者
筈井久会 (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
 - (3) 連携研究者
西澤豊彦 (NISHIZAWA TOYOHICO)
Nhonnam National University, Department of Aqualife Medicine, Professor (本研究開始時の研究代表者)
(北海道大学・大学院水産科学研究院・准教授)
(研究者番号: 10222184)
高見生雄 (TAKAMI IKUO)
長崎県水産試験場 対馬水産業普及指導センター 所長
研究者番号: 50506178
大迫典久 (OSEKO NORIHISA)
水産総合研究センター増養殖研究所 魚病診断・研修センター センター長
研究者番号: 30221823
Oh Myung-Joo (呉 明柱)
Nhonnam National University, Department of Aqualife Medicine, Professor