

## 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25日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21580230

研究課題名（和文） 地球温暖化によって北上する熱帯産ウシエビがもたらす疾病の診断と予防

研究課題名（英文） Virus detection and prevention of diseases brought by black tiger prawn migrating toward north with global warming

研究代表者

伊丹 利明（ITAMI TOSHIAKI）

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00363573

研究成果の概要（和文）：

地球温暖化によって熱帯産のウシエビの生息範囲が北上し、日向灘では、ウシエビとクルマエビの生息海域が重複している。そこで、本研究ではウシエビの病原ウイルスの定量・高感度検出法の確立ならびに先端的防除対策を確立する。

(1) 定量 LAMP 法を用いた高感度ウイルス検出法を用いて病原ウイルスについて検出を試みた結果、ウシエビからは病原ウイルスは検出されなかった。

(2) いずれの海域においてもウシエビはウイルスを保有していなかった。

(3) Caspase 遺伝子をノックダウンした場合、エビはウイルス感染に対して抵抗性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Expanding the global warming, black tiger prawn, *Penaeus monodon*, has been migrating toward the north. In Hyuganada sea area, native species of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicas*, and up-coming tiger prawn are occupying the same habitat. In order to detect the virus that might have been brought by black tiger prawn, a sensitive detection method has been established. Cutting-edge technologies for preventing diseases have been attempted.

1. Pathogenic viruses have not been detected in the black tiger prawn found in Hyuganada sea area using real-time LAMP method.

2. Any virus-positive black tiger prawn was not found along the Miyazaki coast line.

3. Shrimp showed the resistance against WSSV infection when caspase gene was knocked down.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

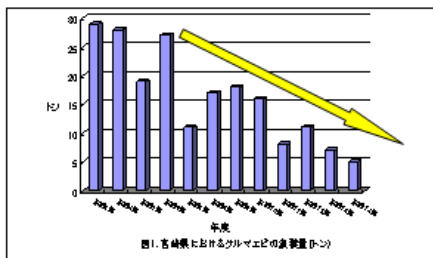
科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：魚病、クルマエビ、ウシエビ、ウイルス、検出、RNAi

1. 研究開始当初の背景

近年地球温暖化が顕著になり、海水温が

100年あたり0.78℃上昇したとされている。しかし、九州南部など局所的に観測すると2~3℃上昇したとも言われ、サンゴの生育阻害でも明らかのように、このような水温上昇は海洋生物にとって影響は大きい。とくに、



温暖な宮崎県沿岸海域は2~3℃の水温上昇でも熱帯産の魚介類が産卵・孵化が可能となり、新たな生息域となる。宮崎県の日向灘では、温帯域に本来生息するクルマエビの漁獲量が急激に減少している。

日本においては、平成8年にクルマエビ急性ウイルス血症 (Penaeid Acute Viremia, PAV) が外国から侵入して、クルマエビの養殖生産に大きな被害をだした。同時に、天然クルマエビにも PAV 原因ウイルス (Penaeid Rod-shaped DNA Virus, PRDV) が検出され始め、養殖エビから天然エビにもウイルス感染が広まっていることが明らかとなった。しかし、我々は、宮崎県沖 (日向灘) に生息する天然クルマエビの PRDV 保有率が極めて少ないこと (瀬戸内海産のもの約 1/10) を明らかにした。このように健全なクルマエビ資源であるにも係わらず、図 1 に示すように日向灘の天然クルマエビの漁獲量の減少は顕著である。

クルマエビ資源の減少と同時に、熱帯産のウシエビが漁獲されるようになった事、さらに、ウシエビの稚エビ (孵化後約 1ヶ月) が宮崎県の大淀川および加江田川河口で昨年発見された事から、この海域でのウシエビの再生産が確認された。温帯域に生息するクルマエビの減少と熱帯に生息するウシエビの増加を考え合わせると、これらの現象は地球

温暖化による水温上昇に起因すると考えられる。

## 2. 研究の目的

近年、宮崎県沿岸では熱帯産のウシエビ (写真) が多く出現し始めた。これは温暖化の影響による海水温の



宮崎県で採捕されたウシエビ。

上昇によるものと考えられる。宮崎県の河口付近でウシエビの稚エビが昨年採捕されたことから、宮崎県沿岸でのウシエビの産卵・孵化と定着化が進んでいる事が明らかとなった。

ウシエビには、本種特有の病原ウイルスがある。日本では特定疾病とされているイエローヘッド病原ウイルス (YHV) と伝染性皮下造血管壊死症原因ウイルス (IHHNV) が報告されている。日向灘では、ウシエビとクルマエビの生息海域が重複していることから、クルマエビもこのようなウイルスを保有する可能性が考えられる。とくに、YHV はクルマエビに強い病原性を示し、死亡率は90%以上と PRDV と匹敵する被害が予想される。さらに、IHHNV については、南九州産のクルマエビがハワイの検疫所において IHHNV 陽性を示した例がある。また、ウシエビの成長阻害要因となっている事も明らかにされている。このように、ウシエビの生息範囲の北上によって、健全なクルマエビ集団が、新興感染症に罹患する危機的状況にある。

そこで、本研究ではこれら新興病原ウイルスの定量・高感度検出法の確立ならびに養殖クルマエビへの伝播の防止のための RNAi を用いた先端的防除対策を確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) エビ病原ウイルス定量 LAMP 法の確立

供試 DNA は PRDV 罹病エビの心臓から DNazol Reagent を用いて抽出する。抽出した DNA を Loopamp DNA 増幅キット（栄研）と Loopamp リアルタイム測定装置（現有）を用いて、定量 LAMP 法を確立する。標的 DNA を組み込んだプラスミドの 10 倍階段希釈系列を用いて、スレッシュホールドタイムに要する反応時間から、検量線を作成して、直線性を確認した。検出限界を測定して、検出感度を確認した。さらに、健康エビ由来 DNA やエビに感染性を持つ他のウイルスや *Vibrio* などの細菌との非特異的な交差反応のないことを確認し、特異性の評価を行った。反応条件（温度、時間、適正フィルター）の検討を行い、反応を至適化し、定量 LAMP 法を確立した。YHV および IHNV についても、同様に定量 LAMP 法を確立する。ただし、陽性対照としての鋳型 cDNA あるいは DNA としては、Kasornchandra 博士（タイ国浅海病害防除研究所 所長）の協力を得て、収集・保存しているものを用いた。

#### (2) 各臓器におけるウイルス量の差異

定量 LAMP 法を用いて、天然ウシエビにおける各ウイルスの臓器内分布の差異を調べた。これにより、ウイルス保有量を決定するための定量 LAMP 法に用いる最も適切な臓器を決定した。対象となる臓器は、①心臓（循環器系）、②リンパ様器官（異物排除機構）、③鰓（海水と接触する呼吸器官）、④卵巣（稚エビへのウイルス伝播の原因）⑤胃（消化器で感染門戸）および⑥腸（糞便中にウイルスが含まれる）である。

#### (3) 各海域および干潟域のウシエビにおけるウイルスの保有量の差異

サンプリングしたウシエビから上記 (2)

で決定された標的器官を採材し、必要に応じて  $-80^{\circ}\text{C}$  のディープフリーザーで保存する。

DNA と RNA の抽出および定量 LAMP 法は前項と同様に行い、各海域および干潟から採取された天然ウシエビが保有するウイルス量を定量し、稚エビと成エビにおけるウイルス量を比較した。

#### (4) 培養細胞による PRDV の検出

LAMP 法によって検出された PRDV、YHV および IHNV の病原性を確認するために、すでに研究代表者らが明らかにしたクルマエビ卵巣の初代培養を用いた。本培養では均一で多量の細胞が培養できることから、天然エビ由来の大量のウイルス検査サンプルの調査には最適である。まず、定量 LAMP 法によってウイルス陽性を示した個体の残存サンプルをホモジナイズして、上澄みを初代培養細胞に感染させた。培養上澄みを LAMP 法による検出を試みた。さらに、上澄みをクルマエビに注射して、症状が再現されるかどうかを生物検定し、病原性の有無を確認した。

#### (5) RNAi によるウイルスの感染防除法の確立

研究代表者らは、PRDV に対する予防対策としてクルマエビのカスパーゼ遺伝子に対する dsRNA を作製し、クルマエビに投与した。また、STAT 遺伝子や Augonate 遺伝子をノックダウンした。

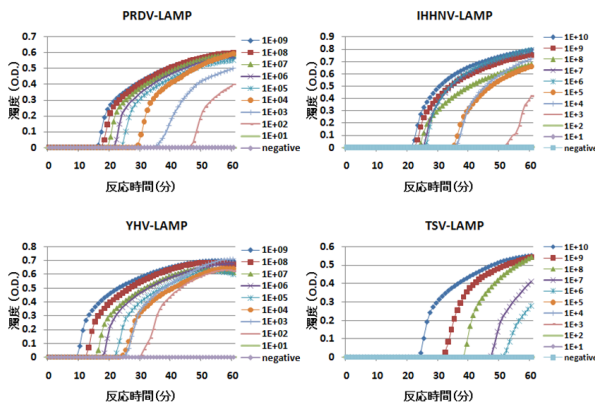
### 4. 研究成果

LAMP 法による反応温度条件の検討の結果、WSDV、IHNV、YHV および TSV はいずれも  $63^{\circ}\text{C}$  による反応で最も迅速な遺伝子増幅が認められた。

検出感度の向上に貢献すると考えられるループライマーを種々検討したが、結局昨年度作成したプライマーセット（表 2）が最も安定的にかつ高感度でウイルスを検出す

ることが確認された。

図 2 に、各病原ウイルスのプラスミド溶液の希釈系列を用いた LAMP 法による遺伝子増幅



を示した。WSDV は  $10^2 \sim 10^9$  の標的遺伝子が検出され、 $10^5 \sim 10^9$  の間で決定係数 ( $R^2$ ) = 0.99 の信頼性の高い検量線が作成された。IHNV は  $10^2 \sim 10^{10}$  の遺伝子が検出され、 $10^6 \sim 10^{10}$  の間で  $R^2=0.98$  の信頼性の高い検量線が作成された。YHV は  $10^2 \sim 10^9$  の遺伝子が検出され、 $10^2 \sim 10^9$  の間で  $R^2=0.99$  の信頼性の高い検量線が作成された。TSV は  $10^6 \sim 10^{10}$  の遺伝子が検出され、 $10^6 \sim 10^{10}$  の間で  $R^2=0.99$  の信頼性の高い検量線が作成された。

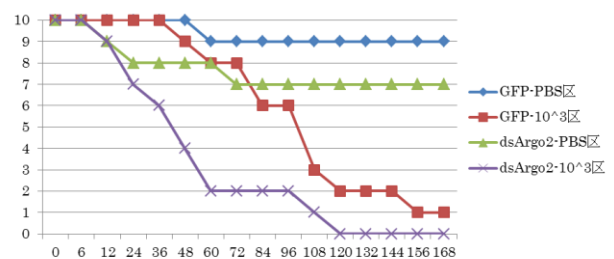
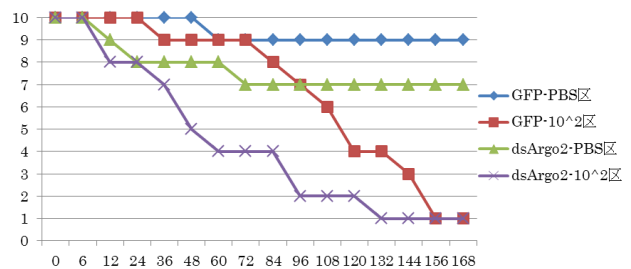
WSDV および YHV の LAMP 法による検出では、 $10^9$  コピーの遺伝子を 20 分以内に増幅することが認められた。さらに、WSDV、IHNV および YHV の LAMP 法による検出では、 $10^2$  コピー程度の微量な遺伝子も 60 分以内に検出可能であることが認められた。

一ツ瀬川河口や五ヶ瀬川河口から採取されたウシエビ稚エビから DNA あるいは RNA を抽出して、本法を用いて上記 4 種類のウイルスの有無について検査を行ったところ、いずれの固体からも病原ウイルスは検出されなかった。このことから、一ツ瀬川河口産のウシエビには病原ウイルスが存在しないことが明らかとなった。

本研究では、リアルタイム LAMP 法による、

WSDV、IHNV、YHV および TSV の高感度定量迅速診断法を確立した。LAMP 法による検出は一定温度で 60 分以内に標的遺伝子の迅速な検出が可能で、 $10^2$  程度の非常に微量な核酸も検出可能であった。このように、LAMP 法によるエビ類病原ウイルスの検出は、ウイルスの早期発見に繋がる有効な診断法である。

次に、ワクチン開発の基礎的知見を得るため、クルマエビの Argonaute2 遺伝子をノックダウンしたのちに、PRDV による人為感染実験を行った。その結果、図 3、4 に示すように、Argonaute2 遺伝子をノックダウンした区では、PRDV の感染が早期化し、より重篤化することが明らかとなった。このことから、エ



ビ類におけるウイルス感染では、Dice2-Argonaute2 系が感染予防に大きな役割を担っていることが明らかとなった。したがって、このウイルス感染防御系を強化するかあるいはあらかじめウイルス DNA の一部をエビに取り込ませることによって、Dice2-Argonaute2 系の RNAi が発動してウイ

ルス感染防除が可能となると考えられる。これは、新たなワクチン開発の基盤的知見として重要である。

#### 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)

[雑誌論文] (計 15 件 査読有)

1. Mekata, T., Okugawa, S., Inada, M., Yoshimine, M., Nishi, J., Kono, T., Sakai, M., Sudhakaran, R., Itami, T., Class B scavenger receptor, Croquemort from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*: Molecular cloning and characterization: Molecular and Cellular Probes: 25(2-3), 94-100, 2011. (査読有)
2. Mekata, T., Sudhakaran, R., Okugawa, S., Inada, M., Kono, T., Sakai, M., Itami, T., A novel gene of tumor necrosis factor ligand superfamily from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Fish and Shellfish Immunology : 28 (2) 571 - 578, 2010. (査読有)
3. Inada, M., Mekata, T., Sudhakaran, R., Okugawa, S., Kono, T., El Asely, A.M., Linh, N., Yoshida, T., Sakai, M., Yui, T., Itami, T., Molecular cloning and characterization of the nitric oxide synthase gene from kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Fish and Shellfish Immunology : 28 (3) 701 - 710, 2010. (査読有)
4. Mekata, T., Sudhakaran, R., Okugawa, S., Kono, T., Sakai, M., Itami, T., Molecular cloning and transcriptional analysis of a newly identified anti-lipopolsaccharide factor gene in kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Letters in Applied Microbiology 50 (1), pp. 112-119, 2010. (査読有)
5. Mekata, T., Sudhakaran, R., Kono, T., U-taynapun, K., Supamattaya, K., Suzuki, Y., Sakai, M., Itami, T., Real-time transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of yellow head virus in shrimp. Journal of Virological Methods : 162 (1) 81 - 87, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 45 件)

1. K. Kihara, M. Yoshimine, M. Inada, J. Nishi, T. Yoshida, T. Kono, M. Sakai and T.

Itami. Identification and Expression Analysis of Toll interacting protein gene, MjTollip, in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus* 8th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Mangalore, India (November 23, 2011)

2. J Nishi, S Okugawa, M Inada, M Yoshimine, T Kono, T Mekata, T Yoshida, M Sakai, and T Itami. Identification and Characterization of Dicer2 Gene in Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. The 39th Scientific Symposium of UJNR Aquaculture Panel, Kagoshima, Japan. (October 26, 2010)
3. T Itami, T Mekata, R Sudhakaran, T Kono, T Yoshida, Y Suzuki, K Supamattaya M Inada, S Okugawa, J Nishi, M Yoshimine and M Sakai. Development and Evaluation of Real-time Loop-mediated Isothermal Amplifications Assay for Detection of Disease Viruses in Penaeid Shrimp. 6th International Symposium on Aquatic Animal Health, Tampa, USA, (September 7, 2010)
4. M Inada, S Okugawa, J Nishi, M Yoshimine, R Sudhakaran, T Kono, T Mekata, T Yoshida, M Sakai and T Itami Identification and Expression Analysis of Astakine Gene, MjAstaldne, in Kuruma Shrimp *Marsupenaeus japonicus* and change of hemocyte count on MjAstakine knockdown. Plant and Animal Genome XIX Conference, San Diego, USA, (January 19, 2011)
5. S Okugawa, R Sudhakaran, M Inada, T Mekata, J Nishi, M Yoshimine, T Yoshida, Y Suzuki, T Kono, M Sakai and T Itami. Characterization of Tumor Necrosis Factor Ligand Superfamily Gene in Kuruma Shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. 6th International Symposium on Aquatic Animal Health, Tampa, USA, (September 7, 2010)

[図書] (計 1 件)

1. 伊丹利明:第 3 章ウイルス病 §6 甲殻類などにおけるウイルス病、「改定・魚病学概論(小川和夫・室賀清邦 編)」49-52, 恒星社厚生閣(東京), 2012 年 3 月

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

1. 名称: 甲殻類急性ウイルス血症に対するワクチン  
発明者: 酒井正博, 伊丹利明, 河野智哉 国立大学法人宮崎大学  
権利者: 国立大学法人宮崎大学  
種類: 特許

番号：特願 2009-162802  
出願年月日：2009年7月9日  
国内外の別：国内

2. 名称：甲殻類急性ウイルス血症に対する  
ワクチン

発明者：酒井正博，伊丹利明，河野智哉 国立  
大学法人宮崎大学

権利者：国立大学法人宮崎大学

種類：特許

番号：PCT/JP2010/060503

出願年月日：2010年6月22日

国内外の別：国外

3. 名称：LAMP 法による急性ウイルス血症  
原因ウイルスの検出方法及び検出試薬キッ  
ト

発明者：伊丹利明，酒井正博，河野智哉 国立  
大学法人宮崎大学

権利者：国立大学法人宮崎大学

種類：特許

番号：特願 2011-50110

出願年月日：2011年3月8日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~fishery/staff/staff07/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊丹 利明 (ITAMI TOSHIAKI)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：00363573

### (2) 研究分担者

吉田 照豊 (YOSHIDA TERUTOYO)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：20240294