

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 14 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580235

研究課題名（和文）養殖ウナギの血管内皮壊死症の原因ウイルス（JEAdV）の核酸解析

研究課題名（英文）Nucleic acid analysis of causative virus (JEAdV) of the viral endothelial cells necrosis of eel (VECNE) in cultured eel

研究代表者

小野 信一（ONO SHIN-ICHI）

東海大学・海洋学部・教授

研究者番号：20152530

研究成果の概要（和文）：養殖ウナギに発生するウイルス性血管内皮壊死症の原因ウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。ウイルスゲノムは環状 DNA 構造でその塩基数は 15,131bp であった。このゲノムのオープンリーディングフレームを他のウイルスと比較すると、相同性はポリオーマウイルスの large T-antigen 領域しか認められないことから、新しいウイルス科に属することを示した。このゲノムの異なる領域から作成した 3 種類の PCR プライマーはいずれも本ウイルスを特異的に検出した。また、ホルマリン不活化ワクチンによる予防効果が認められた。

研究成果の概要（英文）：Viral DNA fragments of the virus causing viral endothelial cell necrosis of eel were obtained using rapid determination system for viral nucleic acid sequences (RDV), and 15,131bp circular full genome sequences were determined using a next-generation sequencing system, overlapping PCR, and Southern blot analysis. One open reading frame (ORF) was homologous to the large T-antigen of polyomavirus; other ORFs have no homology with any nucleic or amino acid sequences of polyomavirus. Therefore, as this DNA virus might comprise a novel virus family, we provisionally named it Japanese eel endothelial cells-infecting virus (JEECV). The conventional PCR is performed using three different primers. These primer set only amplified in the virus infected eels. The relative percent survival (RPS) of the formalin inactivated vaccine by the inoculation in the peritoneal cavity in the eels showed 66.6% after vaccination for 56 days.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：ウナギ、ウイルス性血管内皮壊死症、JEECV、JEAdV、魚病ウイルス、ポリオーマウイルス

1. 研究開始当初の背景

養殖ウナギに発生する疾病の中で、大きな被害を与えている疾病はウイルス感染症と

考えられている鯉弁に特徴的な症状を示す疾病である。この疾病にはウイルス性血管内皮壊死症や板状・点状出血症と呼ばれている

ものが含まれる。この疾病の中で、ウイルス性血管内皮壊死症については、当初鰓弁の中心静脈洞に顕著なうっ血を特徴とすることから、鰓うっ血症と呼ばれた。しかし、自然感染魚の電顕観察や人為感染実験により鰓、肝臓、腎臓、脾臓などの血管内皮細胞の壊死が顕著であり病変部にはウイルス粒子が認められることから、本症はウイルス性血管内皮壊死症とされた（江草ら、1989、永井・小野、1989、井上ら1994、小野・永井1997）。原因ウイルスについては、電顕観察から直径約75nmで正二十面体のウイルスであると考えられていたが、本ウイルスに感受性のある培養細胞がないためその詳細は不明であった。小野ら（2007）はニホンウナギ (*Anguilla japonica*) の背大動脈や心臓動脈球の血管から長期間培養可能な内皮細胞を作出した。この細胞 (JEEC) を用いてウイルス性血管内皮壊死症の自然感染魚から、電顕により観察されたウイルスと同様のウイルスを分離した。本ウイルスの形態学的特徴および理化学的性状から、DNAウイルスのアデノウイルス群に属することを示した。さらに、感染実験により分離したウイルスの病原性も確認したことから本症の原因ウイルスを特定し、本ウイルスを Japanese eel Adenovirus (JEAdV) とすることを提唱した。さらに、JEAdV の全塩基配列の解明などの核酸解析に関する研究が進めば、その詳細な分類学的位置や本症の早期診断のための PCR プライマーの設計やワクチン開発も可能となり、本症の被害の減少にもつながると考えられる。

2. 研究の目的

我が国の養殖ウナギに大きな被害を与えているウイルス性血管内皮壊死症である。本症の原因ウイルス (JEAdV) はウナギ血管内皮由来の株化細胞 (JEEC) を用いて分離培養され、形態学的特徴や理化学的性状からアデノウイルス群に属することが示されている（小野ら、2007）。しかし、JEE細胞内で増殖するウイルス量が少ないためウイルス精製やゲノム DNA のクローニングに至っていない。

そこで、本研究では、(1) プラスミッドベクターによる DNA クローニングを必要としない rapid determination system for viral nucleic acid sequences (RDV法) や次世代シーケンサーなどを用いて JEAdV のゲノムの全塩基配列を決定し、本ウイルスの分類学的位置を明らかにする。(2) PCR による本症の早期診断法を確立するための PCR プライマーを設計する。(3) 本症の予防対策として、ホルマリン不活化ワクチンによる有効性の検討などを主な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞へのウイルス感染

JEE細胞の培養は、EGM-2 を添加した Humedia-EB2 で 25°C、5% CO₂ 培養器で培養した。この細胞に 0.01TCID₅₀/細胞 MOI のウイルスを感染させた。

(2) RDV法によるウイルスゲノムの分析
ウイルス感染細胞の培養上清から細胞残渣を除いた後、ウイルスを含む上清 100μL から QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。この DNA を増幅した後、RDV法により得られたウイルス DNA 断片から differential display RT-PCR によるゲノムウォーキングによって部分的にウイルスゲノムの塩基配列を決定した。

(3) 次世代シーケンサーによるウイルスゲノムの全塩基配列の分析

ウイルス DNA は 4 日間培養したウイルス培養液 30mL の上清を超遠心した後 QIAamp DNA mini kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。このウイルス DNA をランダムに増幅して、Genome Sequencer FLX system (Roche and 454 Life Science) を用いてウイルスゲノムの全塩基配列を解析した。

(4) アミノ酸配列のアライメント

本ウイルスの核酸配列の解析には BLASTx を用いた。本ウイルスのポリオーマウイルス large T-antigen-like 領域とポリオーマウイルス群とのアライメントは MEGA4 software を使用した。

(5) JEE細胞での本ウイルス増殖の解析
JEE細胞に 0.01MOI のウイルスを感染させた後、24 時間から 187 時間までのウイルス増殖の経過は TaqMan プロブを用いた Real time PCR により解析した。プライマーとプロブはポリオーマウイルス large T-antigen-like 領域の一部から作成した。

(6) サザンブロット解析

凍結融解した感染細胞と非感染細胞を遠心した後それぞれの上清 200μL から DNA を抽出した。その DNA は制限酵素 *Bgl*III で 4 時間処理した後、0.8% アガロースゲルで電気泳動した。プロブは精製した PCR 産物を用いた。このプロブを ³²P でラベルした後 42°C、15 時間ハイブリダイズした。

なお、PCR プライマーは以下に示す。

2682F

(5'-GACGCTTATGACGCTCCACTGGATGCGCAT-3')

6011R

(5'-CTCTGCCATCTDAAGCCTCTTGCGCGTACC-3')

(7) 本ウイルスの検出のための PCR プライマーの検討

感染細胞、非感染細胞および正常魚、自然感染魚、実験感染魚、計 67 尾のウナギの鰓、肝臓、腎臓、脾臓から DNA を抽出した。こ

の DNA を鋳型として本ウイルスのポリオーマウイルス large T-antigen-like 領域から 2 か所を含む 4 か所から作成したプライマー (Primer A: 270bp、Primer B: 240bp、Primer C: 340bp、Primer O24: 240bp、数字は増幅されるサイズ) と AmpliTag Gold (ABI)を用いてアニーリング温度 65°C、60°C、55°C、サイクル数 70 回の PCR を行った。

また、養殖ウナギの JEECV の保有状況を調べるために 5 月~12 月までの月 2 回静岡県浜松市内の 2 つの養殖場のウナギ計 82 尾をサンプリングして JEECV の検出を行った。

(8) ホルマリン不活化ワクチンの有効性の検討

ウイルス液 ($10^{5.75}$ TCID₅₀/mL) にホルマリンを最終濃度 0.3%になるように加え、4 摂氏、10 日間静置してウイルスの不活化ワクチンとした。平均体重 46.0g のウナギ 200 尾を供試魚とした。実験区としてワクチン接種区、ワクチン再接種区および対照区の 3 区を設けた。ワクチン接種区のウナギには 1 尾当たりホルマリン不活化ワクチン 0.5mL を腹腔内接種した。ワクチン再接種区では 1 回目のワクチン接種から 28 日目に再度ワクチンを接種した。ワクチン接種後 28 日目と 56 日目に 3 実験区の 50 尾のウナギに対して $10^{5.0}$ TCID₅₀ のウイルスによる攻撃試験を行いワクチンの有効性を調べた。

4. 研究成果

(1) RDV 法による部分的なウイルスゲノム DNA の塩基配列と次世代シーケンサーによる全塩基配列の解析

感染 4 日目の JEE 細胞の培養上清から RDV によって 29 の PCR 産物が得られた。これらをダイレクトシーケンス後、BLAST 検索すると 20 産物に相同配列が認められた。これらの塩基配列を基にしてプライマーを設計した。このうち図 1 に示した 3 つのプライマー (O24、O04A、O04C) がウイルス感染細胞のみを増幅した。プライマー O24 で増幅した PCR 産物のアミノ酸配列を比較するとポリオーマウイルスの Large T-antigen 領域の一部に相同性が認められた。RT-PCR でもプライマー O24 は細胞内で転写されることが確認された。

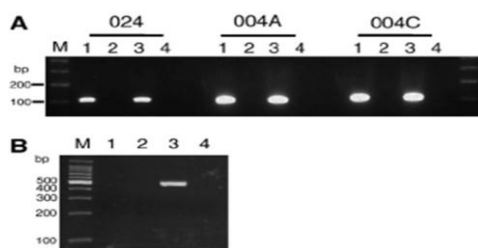


図 1. ウイルスゲノム断片の塩基配列の決定。A:RDV 法によって得られた 3 種類のウイル

ス DNA 断片。1 感染 JEE 細胞の培養上清 2 : 非感染細胞の培養上清 3 : 感染細胞 4 : 非感染細胞 B. RT-PCR による JEE 細胞でのウイルス DNA の転写。1,2:非感染細胞、3,4:感染細胞,2,4:superscript III 酵素処理なし、M:マーカー

これらの結果は RDV によって得られたこれらのシーケンスは目的のウイルスゲノムの部分的な配列であることを示した。

Differential display RT-PCR によるゲノムウォーキングで約 5kbp と 2kbp の 2 つの DNA 断片が得られた。次に、このウイルスゲノムの全塩基配列を得るために次世代シーケンサーを用いて得られた 17,000 のシーケンスからウイルスゲノムの全塩基数は 15,131bp で環状 DNA 構造を持っていることを明らかにした。また、少なくとも 2 本鎖あわせて 15 のオープンリーディングフレーム (ORF) が予測された。この ORF のうち Large T-antigen-like ORF 以外はポリオーマウイルスのどの遺伝子とも相同性は認められなかった (図 2)。

15 の ORF の中で、698 個のアミノ酸をコードしている ORF には、RDV 法によって決定した約 100 個のアミノ酸配列が含まれていた。この ORF は ATP 結合領域で鳥類のポリオーマウイルスの Large T-antigen 遺伝子に相同的であった。しかし、この ORF にはイントロンがないことなどポリオーマウイルスの一般的な T-antigen 遺伝子の構造とは異なっていた。これらことから、このウイルスは、当初その形態学的特徴や理化学的性状からアデノウイルス群に属すると考えていたが本研究成果から、新しいウイルス科に属することを示した。そこで、この DNA ウイルスを JEEV(JEEcells-infecting virus)と称することを提唱した。

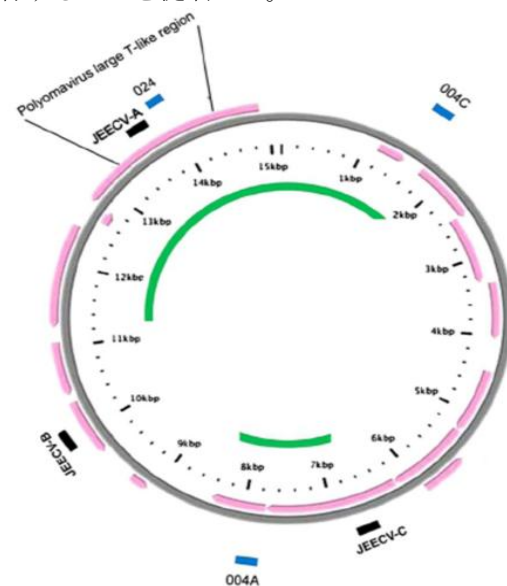


図2. JEECV ゲノムの構造。矢印：15 の予測 ORF、青、緑線：RDV およびゲノムウオーキングによって得られた DNA 断片、黒線：PCR プライマー

JEECV のゲノムが環状であることを次世代シーケンサーにより示した。次に、JEECV の無傷のゲノムサイズを実証するために、Rolling circle 解析や JEECV 感染細胞から抽出した DNA の増幅領域を重複させた LongPCR によって JEE 細胞内では環状のウイルスゲノムが存在することを示した。また、ウイルスゲノム配列には3つの反復配列が認められた。さらに、JEECV ゲノムサイズを確認するためにサザンブロット解析を行った。その結果、JEECV の環状 DNA の1か所を切断する制限酵素 *Bgl*III で切断した DNA のサイズは約 15kbp で次世代シーケンサーにより得られたサイズと一致した。

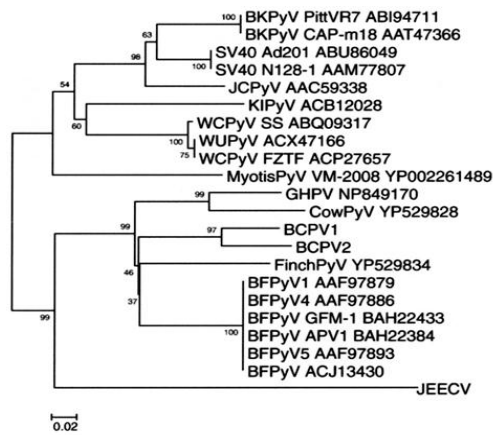


図4. JEECV の系統樹解析。JEECV のポリオーマウイルス Large T-antigen-like 領域とポリオーマウイルスの同領域の 1,000 回のブートストラップ反復による近隣接合法により得られた。横線は 0.02 のアミノ酸置換を示す。

(2) JEECV の JEE 細胞内での増殖経過
JEECV 感染後の 24~187 時間までの JEE 細胞内での JEECV の増殖を Large T-antigen 領域から設計したプライマーとプローブによる TaqMan real-time PCR で調べた。その結果、感染後 24 時間から 48 時間にかけて JEECV は著しい増加を示し、ウイルス DNA のコピー数は 144 時間で最大量の 1.2×10^7 に達した。

(3) 養殖ウナギからの JEECV の検出用 PCR プライマーの検討

今回設計した4種類のプライマーはいずれも感染細胞や実験感染魚や病魚からのみ JEECV を検出した。この中でポリオーマウイルス large T-antigen-like 領域から作成した Primer A と Primer C はアニーリング温

度が 55°C でも非特異な増幅は認められなかった。次に、これらのプライマーの検出感度を比較すると Primer A は 10 倍検出感度が高く、0.001pg の DNA でも検出可能であった。これらの結果から非特異な増幅がなく検出感度の高い Primer A が JEECV の検出には適していると考えられる。また、本症が発症している養殖場でまだ症状の認められていないウナギの組織別の検出率では、JEECV は鰓組織で高い検出率を示した。



図4. Primer A による JEE 細胞、正常魚および実験感染魚からの JEECV の検出。A-B: 非感染 JEE 細胞、C-D: 感染 JEE 細胞、E-F: 正常魚の鰓、G-H: 実験感染魚

静岡県浜松市内の2つの養殖場から採集した正常魚(未発症魚)での JEECV 保有率は、それぞれ平均 50.0%、35.0% となり両養殖場のウナギは高い割合で JEECV を保有していた。また、本症が発生した時期には2養殖場とも JEECV の検出率が高くなる傾向が認められた。

(3) JEECV のホルマリン不活化ワクチンの有効性の検討

ワクチン接種後28日目と56日目に JEECV の腹腔内接種による攻撃試験によりその有効性を調べた。その結果、ワクチン接種後28日目では死亡率は14%、一方対照区では66.0%に達し両実験区間の死亡率には有意差 ($P < 0.01$) が認められた。ワクチンの有効性を示す指標であるワクチンの有効率(RPS)は89.9%となった。ワクチン接種後56日目でもRPSは66.0%を示した。さらに、ワクチン接種後28日目にワクチンを再接種して56日経過した実験魚のRPSは72.2%を維持していた。ワクチン接種魚の血中抗体価は28日目には最大16であった。これらの結果から、本症の予防対策としてワクチン接種が有効であることが示唆された。

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 2件)

① Tetsuya Mizutani *, Yusuke Sayma , Akira Nakanishi, Shin-ichi Ono *, 他 9名 (2011) Novel virus isolated from samples showing endothelial cell necrosis in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Virology*, 412, 179-187. 査読有、* corresponding authors

② Mizutani, T., Sayama, Y. and Ono, S. (2011) Japanese eel endothelial cell-infecting virus LTLG gene for polyoma virus large T like protein, complete cds., DDBJ/EMBL/GeneBank database., Accesion No. AB543063, 査読無、

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 信一 (ONO SHIN-ICHI)

東海大学・海洋学部・教授

研究者番号：20152530

(2) 研究分担者

水谷 哲也 (MIZUTANI TETSUYA)

東京農工大学・農学部・教授

研究者番号：70281681