

天然キジハタからのベータノダウイルスの検出

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-06-25 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森, 広一郎, 西岡, 豊弘, 菅谷, 琢磨, 有元, 操 メールアドレス: 所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014651

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



Ⅲ 増養殖対象種の病害の予防および防除技術の開発

天然キジハタからのベータノダウイルスの検出

森 広一郎, 西岡豊弘, 菅谷琢磨, 有元 操
(上浦栽培漁業センター)

ウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis : VNN) は海産魚の種苗生産および育成過程で問題となっており, 1990年に我が国のイシダイ (Yoshikoshi and Inoue, 1990) で初めて発生が報告された。それ以来, 国内ではシマアジ, ヒラメ, ハタ類等, 海外では VNN に類似した疾病 (encephalomyelitis, encephalopathy あるいは encephalitis など) がバラマンディー, ターボット, ハリバット, スズキ, ハタ類等で報告されている。国内外を合わせると発生魚種は14科30種となり, 本病は広範囲の魚種で世界的に大きな問題となっている (室賀ら1998, Munday *et al.*, 2002)。この VNN 原因ウイルスは当初ノダウイルス科に分類されたが (Mori *et al.*, 1992), 現在ではベータノダウイルスに分類されている。

本病の感染経路については, シマアジの発生事例では, 孵化直後に本病が発生し, 親魚生殖腺から高率にウイルスが検出されることから, 親魚からの垂直感染が主要な感染経路であることが明らかにされており, ウイルス検査陰性の親魚だけを産卵に用いることにより VNN の発生率を著しく低下させることに成功している (Mushiaki *et al.*, 1994, Mori *et al.*, 1998)。しかしながら, ヒラメやハタ類などでは, 孵化直後に本病が発生することは希で, 稚魚期以降の中間育成過程で本病が発生する事例が多いなど (Fukuda *et al.*, 1996), 感染経路については不明な点が多く残されている。

キジハタにおいても1990年以降, 種苗生産過程の仔稚魚期に本病が発生し, 大きな問題となっている (Mori *et al.*, 1991)。キジハタの種苗生産では, 漁獲された天然未成魚を数年間養成した成魚を親魚として用いているが, 親魚になるとウイルスが検出されるなど, 親魚からの垂直感染を示唆する疫学情報は得られていない。本研究では, 入手する天然キジハタが種苗生産場の汚染源になる可能性について明らかにするため, 瀬戸内海をはじめとするいくつかの海域で漁獲された天然魚を入手し, ベータノダウイルスの保有状況を調査した。

材料と方法

検査サンプル

2002年9月22日から同11月6日の間に, 瀬戸内海東

部, 同中部 (AとBの2カ所), 同西部, 若狭湾および九州西岸の6海域で延べ縄あるいは刺網によって漁獲されたキジハタ鮮魚 (平均体重421g = 範囲120~1,252g) を合計65尾入手し, 4℃で保冷した状態で36時間以内に上浦栽培漁業センターに搬入した。搬入後速やかに解剖し, 眼球 (網膜組織), 脳, 延髄, 脊髄, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓および生殖腺を検査サンプルとして採取した。その際に, 入手魚に腹鰭切除または鼻腔隔皮の欠損が有るものを放流魚と判断した。採取したサンプルは, 検査に供するまで-80℃で凍結保存した。

PCRによるウイルス検出

採取したサンプルに9倍量のHBSS (Hank's balanced salt solution) を加え磨砕し, 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過後, 磨砕濾液の一部から市販の核酸抽出試薬 (ISOGEN, ニッポンジーン社製) を用いてRNAの抽出を行った。得られたRNAを適量のジエチルピロカーボネート処理した超純水 (DDW) に溶解し, これを核酸試料とし以下の検査に用いた。PCRは, Nishizawa *et al.* (1994) の報告した RT-PCR および森ら (2001) の報告した nested PCR に準じて行った。即ち, RT-PCR には T4 領域 (RNA2 から427bpを増幅) の増幅用プライマーとして F2 (5'-CGTGTTCAGTCATGTGTCGCT-3') と R3 (5'-CGA GTCAACACGGGTGAAGA-3') を, 逆転写酵素に Super Script II Reverse Transcriptase (Invitrogen) を, Taq DNA 合成酵素に Takara EX Taq (Takara) を用いた。そして, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700, アプライドバイオシステムズ) によって, 逆転写反応 (42℃, 30分間) を行った後, 熱変性 (95℃, 40秒間), アニーリング (55℃, 40秒間) および伸長 (72℃, 40秒間) の一連の PCR 反応を30サイクルで行った。nested PCR には T4 領域に4つのベータノダウイルスの遺伝子型のうち RG 型に特異的なプライマーである RG-nf (5'-ACCTGAGGAGACTACCGCT C-3') と RG-nr (5'-CAGCGAAACCAGCCTGCAGG-3') を用い, 前述の RT-PCR の増幅産物の一部を核酸試料とし, 上述の PCR 反応を30サイクルで繰り返した。RT-PCR および nested PCR による増幅産物の解析

は、トリスホウ酸/EDTA 緩衝液 (0.46M Tris, 0.46M ホウ酸, 0.01M EDTA) で調製した2.0% NuSieve 3:1 Agarose (FMC)で電気泳動を行い、増幅産物の有無およびその分子量を確認した。

培養細胞によるウイルス分離

前述のPCRでウイルス遺伝子が検出されたサンプルについて、培養細胞 (E-11 = Iwamoto *et al.*, 2000) によるウイルス分離を実施した。その際、前述の核酸抽出に使用した磨砕濾液を検査サンプルとし、96ウェルのマイクロプレートを用い25℃で10日間培養し、TCID (tissue culture infectious dose) 法によりウイルスの感染価を測定した。

分離ウイルス株の病原性試験

培養細胞で分離された瀬戸内海産天然魚由来の1株 (RGEhi02株)、日本海産天然魚由来の1株 (RGFuk02株) の合計2株について、キジハタに対する病原性試験を行った。分離ウイルスをE-11細胞で培養 (25℃で7~10日間) し、TCID法によりウイルスの感染価を測定後、HBSSで107.0TCID₅₀/mℓに調製し、キジハタ (平均体重1.9g = 範囲1.3~3.0g) 1尾当り50μℓを背部筋肉に接種した。対照として、HBSS 50μℓを背部筋肉に接種する区を設けるとともに、1999年に玉野栽培漁業センターの病魚から分離された病原株 (RGoka99株) についても同様に接種する区を設けた。各接種区とも20尾を供し、接種後100ℓ水槽に収容後、水温25~26℃で2週間飼育し、死亡率を調査した。死亡魚については、RT-PCRでウイルス検査を行った。

結 果

PCRによるウイルス検出

検査したキジハタのうち瀬戸内海西部、若狭湾および東シナ海で漁獲されたサンプルから、RT-PCRおよびnested PCRによりベータノダウイルスの遺伝子が検出された (表1)。nested PCRでは、RG型株専用のプライマーで増幅産物が認められたことから、今回検出されたウイルスの遺伝子型はすべてRG型であると判断された。nested PCRによる検出率は、瀬戸内海西部、若狭湾および東シナ海でそれぞれ60.0%、46.6%および25.0%で、調査海域全体では24.6%であった。また、nested-PCRによる組織別のウイルス検出率は、眼球、脳、延髄および脊髄で20.0~24.6%と高く、これに比べ、心臓、肝臓、脾臓、腎臓あるいは生殖腺からの検出率は3.1~4.6%と低かった。なお、瀬戸内海中部A海域で漁獲されたキジハタは、8尾中4尾で腹鰭の切除が認められ放流魚と判断されたが、いずれの個体からもウイルス遺伝子は検出されなかった。

培養細胞によるウイルス分離

PCRでウイルス遺伝子が確認された一部のサンプル (眼球、脳および延髄) についてE-11細胞によりウイルス感染価を測定したところ、眼球で $3.5 \times 10^{3.3} \sim 3.5 \times 10^{7.9}$ TCID₅₀/g、脳で $4.3 \times 10^{2.6} \sim 4.3 \times 10^{6.5}$ TCID₅₀/g、延髄では、 $9.0 \times 10^{2.9} \sim 9.0 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀/gであった。

表1 キジハタ天然魚からのベータノダウイルス検出結果

漁獲場所	尾数	平均体重 g (範囲 g)	検出率 %			
			RT-PCR	nested PCR	E-11細胞による分離 ^{*1}	
瀬戸内海西部	9.24	10	505 (333~938)	30.0	60.0	66.7
瀬戸内海中部 A	9.22	8 ^{*2}	447 (167~1,252)	0	0	ND
瀬戸内海中部 B	9.27	10	353 (170~643)	0	0	ND
瀬戸内海東部	10.8	10	350 (120~1,027)	0	0	ND
若狭湾	10.5	15	210 (148~301)	13.3	46.6	57.1
東シナ海	10.25 11.6	12	717 (510~976)	16.6	25.0	0
全体	9.22~11.6	65	421 (120~1,252)	10.8	24.6	50.0

*1: nested PCRでウイルスが検出されたサンプルについて分離を行った。

*2: 8尾のうち4尾が放流魚と判断された。

分離ウイルス株の病原性試験

瀬戸内海産キジハタ天然魚由来の1株 (RGEhi02株) と日本海産天然魚由来の1株 (RGFuk02株) の合計2株について、キジハタに対する病原性試験を行ったところ、各試験区の累積死亡率はHBSSを接種した対照区で0%であったのに対し、RGEhi02株攻撃区で40.0%、RGFuk02株攻撃区および病魚分離株のRGOka99株攻撃区で20.0%となり、今回分離された天然魚由来株においても病魚分離株と同程度あるいはそれ以上の累積死亡率を示した(図1, 表2)。なお、死亡魚についてはRT-PCRで検査を行った結果、すべての死亡魚からベータノダウイルスが検出された。

考 察

これまでに、本病の原因ウイルスであるベータノダウイルスは、カナダのwinter flounder (*Pleuronectes americanus*) の天然魚で検出例が報告されているが(Barker *et al.*, 2002)、我が国においてはベータノダウイルスが天然魚から検出された例はなく、本報のキジハタでの検出例が初めてである。winter flounderの

事例ではベータノダウイルスの検出率は0.23%と報告されているが、本報のキジハタでは24.6%と、それに比べると著しく高い値となった。今回分離されたベータノダウイルス株のキジハタに対する病原性は、病魚分離株と同程度の病原性を有していることが明らかになった。また今回調査したキジハタは、延縄などで漁獲された健常魚ではあったが、個体によっては $10^{7.3}$ TCID₅₀/gの高濃度のウイルスが組織から分離された。このような個体は、単にウイルスに感染した後に持続感染状態となり、体内に微量のウイルスを保有しているのではなく、少なくとも漁獲された時点では病的な状態に近い個体であると考えるのが妥当と思われる。これらの結果を考え合わせると、本ウイルスがキジハタ天然魚に少なからぬ影響を与えているということが示唆される。

キジハタの種苗生産には親魚候補群として天然魚が用いられているが、今回の調査でキジハタ天然魚が高率にウイルスを保有していることが確認され、種苗生産場では未成魚あるいは成魚の導入による水平感染および垂直感染が重要な感染経路となり得ることが強く示唆された。よって、今後親魚候補群の導入に当たって

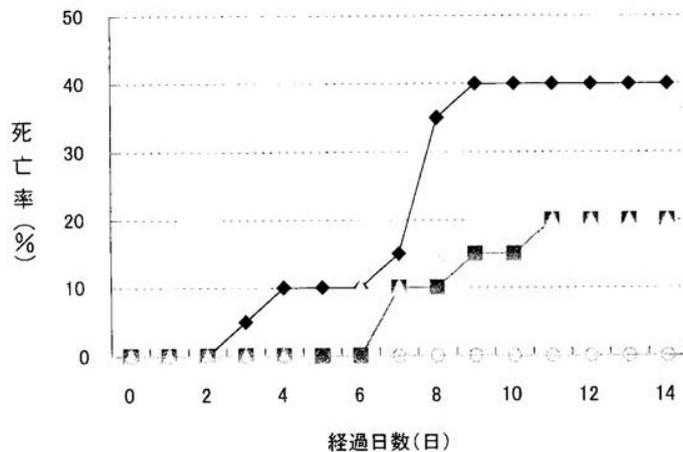


図1 天然キジハタから分離されたベータノダウイルスの病原性試験
キジハタ1尾当りに 5.0×10^5 TCID₅₀のウイルスを接種後、25~26℃で2週間飼育し死亡状況を観察した。

表2 天然キジハタから分離されたベータノダウイルスの病原性試験結果

試験区	接種株	累積死亡率%	死亡魚のPCR検査(検出率%)
天然キジハタ(瀬戸内海)由来株攻撃区	RGEhi02	40.0	100
天然キジハタ(日本海)由来株攻撃区	RGFuk02	20.0	100
養魚由来株攻撃区	RGOka99	20.0	100
対照区	-*	0	ND

*: 対照としてHBSSを接種した。

は検査を行うなど慎重に対処する必要があり，導入した後の親魚候補群からの防除対策を徹底する必要があると考えられる。

文 献

- Barker, D.E., A. Mackinnon, L. Boston, M.D.B. Burt, D.K. Cone, D.J. Speare, S. Griffiths, M. Cook, R. Ritchie and G. Olivier (2002) : First report of piscine nodavirus infecting wild winter flounder *Pleuronectes americanus* in Passamaquoddy Bay, New Brunswick, Canada. *Dis. Aquat. Org.*, 49, 99-105.
- Fukuda, Y., H.D. Nguyen, M. Furuhashi and T. Nakai (1996) : Mass mortality of cultured grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.*, 31, 165-170.
- Iwamoto, T., T. Nakai, K. Mori, M. Arimoto and I. Furusawa (2000) : Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.*, 43, 81-89.
- Mori, K., T. Nakai, M. Nagahara, K. Muroga, T. Mekuchi and T. Kanno (1991) : A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of red-spotted grouper. *Fish Pathol.*, 26, 209-210.
- Mori, K., K. Mushiake and M. Arimoto (1998) : Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, 33, 443-444.
- 森 広一郎・西岡豊弘・有元 操・中井敏博 (2001) : 魚類ノダウイルスの PCR 検出系の再検討. 平成13年度日本魚病学会春季大会
- Munday, B.L., J. Kwang and N. Moody (2002) : Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *J. Fish Dis.*, 25, 127-142.
- 室賀清邦・古澤徹・古澤巖 (1998) : 総説：シマアジのウイルス性神経壊死症. 水産増殖, 46, 473-480.
- Mushiake, K., T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994) : Control of VNN in striped jack : Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29, 177-182.
- Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga (1994) : Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, 18, 103-107.
- Takano, R., K. Mori, T. Nishizawa, M. Arimoto and K. Muroga (2001) : Isolation of viruses from wild Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, 36, 153-160.