

学 位 論 文 題 名

Molecular ecology of marine birnavirus in the Uwa Sea

(宇和海におけるマリンビルナウイルスの分子生態学)

学位論文内容の要旨

1994年から、西日本各地でアコヤガイの大量斃死が続いている。その原因究明の過程で養殖アコヤガイからマリンビルナウイルス(MABV)が分離された。実験感染では、アコヤガイから分離された本ウイルス(JPO-96株)はアコヤガイに対する病原性は低いことが報告されたが、台湾で分離されたビルナウイルスはハマグリに対して重金属や温度差などのストレス下で強い病原性を示すことが報告されている。このことから、西日本で起こったアコヤガイ大量斃死の場合も、貝に何らかのストレスが加わりアコヤガイの MABV に対する感受性が高くなった可能性がある。一方、MABVは症状のある魚介類のみならず、様々な健康な魚介類からも分離されており、宿主域が広く環境を介して伝染していることが考えられる。したがって、MABVの宿主内および環境中における動態を知ることは本ウイルスによる疾病を防御する観点から重要であるが、これまでに MABV の水圏環境における動態を系統立てて検討した報告はない。そこで本研究では、MABV の魚介類・環境における生態を解明する一環として、宇和海におけるアコヤガイとその飼育環境での MABV の生態を解明することを目的とした。

本論文の第1章では、MABVの研究の歴史を述べ、ついで第2章ではアコヤガイにおける MABV の動態を明らかにするために、アコヤガイ体内の MABV の通年消長と感染様式を調べた。愛媛県宇和島市遊子地区漁場の2地点(St.A, St.B)に試験用アコヤガイを移入し、1997年6月から1998年1月まで、毎月10個ずつサンプリングしウイルス検出を行なった。MABVの検出は肝臓から本ウイルスに特

異的な PCR で行った。さらに、PCR 産物の塩基配列を決定し、これまでに報告されている株と比較することで遺伝的変異を調べた。PCR が陽性だった個体については CHSE-214 細胞を用いてウイルス分離を試みた。PCR の結果、両地点で 9 月までは検出率が 30% 以下であったが 11 月以降は 90% 以上になった。ウイルス分離は 10 月以降のサンプル 13 個体で、 $10^{2.7} \sim 10^{5.1}$ TCID₅₀/g の感染力価が測定された。このことから、アコヤガイは春季の漁場移入時にはウイルス保有率は低いが、経時的に増加し、秋季以降はウイルス分離が可能なまでに増加したと考えられる。遺伝子解析の結果、96 年に分離された JPO-96 株に比べ 97 年の株(JPO-97)は一塩基で変異が認められたものの、アミノ酸レベルでは変化していなかった。また、アコヤガイにおける MABV の感染様式を特定するために、毎月、肝臓、口、心臓、外套膜の凍結切片およびセルディスクに付着させた血球細胞に対して抗 MABV-Y-6 株血清を用いた蛍光抗体法を行った。9 月と 1 月の肝臓と血球は電子顕微鏡観察に供した。その結果、夏季では血球から特異蛍光が観察され、冬季には肝臓実質細胞のみに特異蛍光が観察された。電子顕微鏡による観察では 1 月のサンプルでのみウイルス粒子が観察された。このことから、MABV は感染初期には血球細胞に感染し、遺伝子およびタンパク質は合成しているが感染性のある完成粒子は形成せず、持続感染していると考えられた。感染性粒子は秋季以降に肝臓内で形成されていることが明らかになった。

次に、第 3 章では、本ウイルスの感染経路を明らかにするために、1997 年 6 月から 1998 年 1 月まで St.A および St.B のアコヤガイ飼育水深である 2 m から採水し海水中から MABV 検出を試みた。海水 10 ml をフィルター濾過後、蒸留水に対して透析、エタノール沈殿にてウイルスを濃縮した。これを PCR、酵素抗体法 (ELISA) およびウイルス分離に用いた。また、PCR 産物についてはシーケンスを行った。その結果、St.A では 8 月から 1 月まで、St.B では 6 月から 1 月まで MABV 遺伝子が検出された。ELISA では St.A、St.B とともに 6 月サンプルからはウイルスタンパク質は微量しか検出されなかったが、1 月サンプルでは両地点ともにウイルス量として

10² TCID₅₀ に相当するウイルスタンパク質が検出された。ウイルス分離ではいずれの月でも陰性であった。また、PCR産物のシーケンスの結果、ほとんどの塩基配列が JPO-97 株と一致し、前述のアコヤガイでの経月消長と海水中での消長がほぼ同調していたことから、MABV はアコヤガイから放出されている可能性が考えられた。以上のことから、MABV は宇和海の海水中に普遍的に存在し、季節的に量的変動があることが明らかになった。

第4章では、異なる水深で飼育しているアコヤガイと海水中から MABV を検出した。宇和海でアコヤガイは通常水深 2 m で養殖されているが、真珠核の挿入手術の前に“抑制”をかけるために 15 m から 16 m に深吊りを行なう。そこで、2 m および 15 m でアコヤガイを飼育し、貝中および海水中の MABV の消長を調べた。サンプリングは、6、7、9 および 11 月に行なった。結果として、PCR による MABV 検出率は、2 m も 15 m も変化はなく、貝の移入以降に徐々に高くなり、第2章のデータと一致した。このことから飼育水深を変えてもアコヤガイの MABV 保有率に影響はないことが明らかになった。ウイルスの分離率も 2 m と 15 m に差はなかった。また、塩基配列解析の結果、1997 年度の分離株と 100% 一致した。各深度の海水からの MABV ゲノム検出では、15 m では、6 月から 11 月を通して検出され、PCR 産物量はほぼ一定であった。一方、2 m では 6 月および 7 月には検出されなかったが、9 月および 11 月には検出され、PCR 産物量は 15 m より多かった。以上のことから、MABV のアコヤガイ体内での消長は飼育水深に依存しないが、海水中におけるウイルス量は水深によって異なることが明らかになった。

第5章では、MABV の媒介生物を明らかにするために、魚介類のエサとなるプランクトンを介した水平感染を考え、動物・植物プランクトンから本ウイルスの検出を行なった。プランクトンのサンプリングは宇和海内海村の水深 2 m および 40 m から行い、顕微鏡下で動物プランクトンと植物プランクトンにソーティングした。分別したプランクトンからそれぞれ核酸を抽出し、PCR に供し MABV 保有の有無を調べた。その結果、9 月の水深 2 m および 11 月の水深 40 m から得た動物プラン

クトンからウイルスゲノムが検出された。一方、植物プランクトンからは、ウイルスゲノムは検出されなかった。また、PCR 陽性サンプルからウイルス分離を試みたが、分離されなかった。これらのことから、動物プランクトンにおいては MABV の感染ウイルス量あるいは蓄積量は少ないものの、動物プランクトンが宇和海生態系での MABV 感染環の一部となり、MABV のレゼルボアとして機能している可能性が考えられた。

本研究を通して、宇和海のアコヤガイにおける MABV の感染生態が明らかになった。アコヤガイ中では、MABV は年間を通じて感染しているが、夏季にはウイルスゲノムおよびウイルスタンパク質を生産しているものの完成粒子を形成せず、血球細胞に持続感染している。しかし、秋季以降には肝臓の実質細胞で完成粒子を形成することが明らかになった。また、アコヤガイ、海水およびプランクトンから検出されたウイルスゲノムは、これまで他の魚介類から分離された MABV 株とほとんど違いが見られなかった。このことから、MABV はどのような生物から分離されたものでも、遺伝学的に類似していることが明らかになった。海水からの MABV 検出結果がアコヤガイからの検出結果と同調したことから、今回検出したウイルスの一部はアコヤガイから放出されていることが考えられた。また、MABV のアコヤガイ体内における経月消長は、飼育される水深で違いはないが、海水中におけるウイルス量は深度によって違いがあることが明らかになった。さらに、MABV が動物プランクトンから検出されたことから、本ウイルスの新しい感染経路として動物プランクトンを介した食物連鎖による経路の存在が示唆された。

本研究の結果およびこれまでの報告を総合すると、宇和海における MABV の感染環は養殖ブリやマダイをはじめとする魚類、アコヤガイ、動物プランクトンおよび海水を介して形成されていることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 水 守

副 査 教 授 田 島 研 一

副 査 教 授 鈴 木 聡

(愛媛大学沿岸環境科学研究センター)

副 査 助 教 授 西 澤 豊 彦

学 位 論 文 題 名

Molecular ecology of marine birnavirus in the Uwa Sea

(宇和海におけるマリンビルナウイルスの分子生態学)

1994年から、西日本各地でアコヤガイの大量死が続いている。その原因究明の過程で養殖アコヤガイからマリンビルナウイルス(MABV)が分離された。実験感染では、アコヤガイから分離されたウイルスはアコヤガイに対する病原性が低いと報告されたが、重金属や温度差などのストレス下で強い病原性を示すことが明らかとなっている。このことから、西日本で起こったアコヤガイの大量死の場合も、宿主に何らかのストレスが加わり、アコヤガイのMABVに対する感受性が高くなった可能性がある。一方、MABVは症状のある魚介類のみならず、種々の健康な魚介類からも分離され、宿主域を広く持ち環境を介して感染している可能性がある。MABVの宿主内および環境中における動態を知ることは、本ウイルスによる疾病を防ぐ観点から重要であるが、これまでにMABVの水圏環境における動態を系統立てて検討した報告はない。本研究では、MABVの魚介類・環境における生態を解明する一環として、宇和海におけるアコヤガイとその飼育環境でのMABVの生態を解明することを目的とした。

本論文の第1章では、MABVの研究史を述べ、次いで、第2章ではアコヤガイにおけるMABVの動態を明らかにするために、アコヤガイ体内のMABVの周年消長と感染様式を検討した。愛媛県宇和島市遊子地区を試験地を選び、毎月アコヤガイから

のウイルス検出と分離を行なった。アコヤガイは春季の漁場移入時にはウイルス保有率は低かったが、経時的に増加し、秋季以降はウイルス分離が可能なまでに増加した。アコヤガイにおける MABV の感染様式を特定するために、肝臓、口、心臓、外套膜の凍結切片およびセルディスクに付着させた血球細胞について抗血清を用いた蛍光抗体法を行い、肝臓と血球は電顕観察に供した。夏季では血球に、冬季には肝臓実質細胞のみに特異蛍光が観察され、電顕観察では 1 月のサンプルでウイルス粒子が観察された。MABV は感染初期に血球細胞でウイルス遺伝子およびタンパク質の合成が認められるた、感染性のある完全粒子は認められず、持続感染状態にあり、感染性粒子は秋季以降に肝臓内で形成されることが明らかになった。

本ウイルスの感染経路を明らかにするために、第 3 章では、アコヤガイ飼育水深である 2 m から採水し海水中からの MABV 検出を試みた。秋から冬にかけて MABV 遺伝子が検出され、アコヤガイでの経月消長と海水中での消長がほぼ同調していたことから、MABV はアコヤガイから放出されている可能性が示唆され、MABV は宇和海の海水中に広く存在し、季節的な量的変動を示すことが明らかになった。

第 4 章では、2 m および 15 m と異なる水深でアコヤガイを飼育し、アコヤガイと同水深の海水からの MABV 検出を試みた。貝からの MABV 検出率は両水深とも変化なく、貝の移入以降に徐々に高くなり、第 2 章の結果と一致した。両深度の海水からの MABV 検出では、2mの方が 15mより検出頻度頻度が高く、PCR 産物量も多かったことから、MABV のアコヤガイ体内での消長は飼育水深に依存しないが、海水中におけるウイルス量は水深によって異なることが明らかとなった。

第 5 章では、MABV の媒介生物を明らかにするために、魚介類の餌料となるプランクトンを介した水平感染を考え、動物および植物プランクトンから本ウイルスの検出を行った。動物プランクトンからウイルスゲノムが検出されたが、植物プランクトンからは検出されなかった。PCR 陽性サンプルからのウイルス分離を試みたが、MABV は分離されず、MABV の感染ウイルス量あるいは蓄積量は少ないものの、動物プランクトンが宇和海生態系での MABV 感染環の一部となり、MABV のレゼルボアと

して機能している可能性が考えられた。

以上、本研究から宇和海のアコヤガイにおける MABV の感染生態が明らかになった。アコヤガイ中で MABV は年間を通じて感染しているが、夏季にはウイルスゲノムおよびウイルスタンパク質を生産しているが完成粒子を形成せず、血球細胞に持続感染し、秋季以降に肝臓の実質細胞で完成粒子を形成していた。また、アコヤガイ、海水およびプランクトンから検出されたウイルスゲノムは、これまで他の魚介類から分離された MABV 株とほとんど違いが見られなかったことから、MABV は各種魚介類から分離されたものも、遺伝学的に類似していることが明らかになった。さらに、海水からの MABV 検出がアコヤガイからの検出結果と同調していたことから、今回検出したウイルスの一部はアコヤガイから放出されていることが示唆された。また、MABV のアコヤガイ体内における経月消長は、飼育される水深で違いはないが、海水中におけるウイルス量は深度によって違いがあることが明らかになった。MABV が動物プランクトンから検出されたことから、本ウイルスの新しい感染経路として動物プランクトンを介した食物連鎖経路の存在が示唆された。

本研究の結果およびこれまでの報告から、宇和海における MABV の感染環は養殖ブリやマダイをはじめとする魚類、アコヤガイ、動物プランクトンおよび海水を介して形成されていることが示唆された。