

ヒラメとマツカワにおける神経壊死症ウイルスのDNA型の検出

中央水産試験場

研究の目的

神経壊死症ウイルス（魚類ノダウイルス）のいわゆるウイルス保有検査は、これまでRT-PCRによるウイルスゲノム（遺伝子）RNAの検出により行われてきた。しかし、研究の課程でこれまで存在が知られていなかったゲノムRNAのDNA型の分布状況を調べ、ウイルス保有検査の見直しを図る。

研究の成果

- ① 神経壊死症ウイルス（魚類ノダウイルス）のゲノムは2本のRNAからなり、RNA 2およびRNA 1とよばれているが、それぞれの後半部分の421塩基および669塩基をPCRまたはRT-PCRで増幅した（図1）。
- ② ヒラメでは特にRNA 2のDNA型が高い割合で検出された（図2）。
- ③ マツカワでも、同様にRNA 2のDNA型が高い割合で検出され、さらにRNA 1のDNA型も検出された。
- ④ 検出されたDNA型の塩基配列を決定し、神経壊死症ウイルスゲノムRNAの塩基配列と比較したところ、ほぼ一致した（図3）。
- ⑤ 以上の結果から、ヒラメとマツカワに高い割合でみられる神経壊死症ウイルスDNA型のはたらき、すなわちウイルス感染粒子との関連やウイルス保有状態との関連等について今後明らかにする必要がある。また、感染粒子の検出方法の開発などによる診断法の開発を早急に進める必要がある。

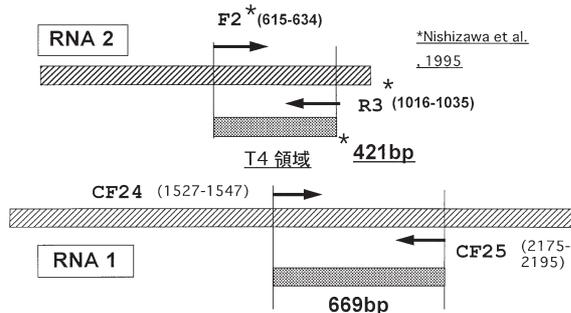


図1 神経壊死症ウイルス（魚類ノダウイルス）ゲノムRNA1とRNA2のPCRおよびRT-PCRによる増幅部位

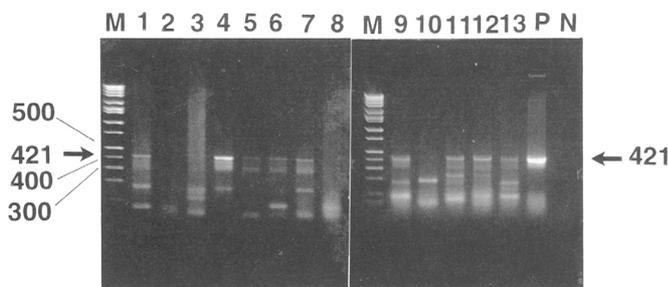


図2 ヒラメにおける神経壊死症ウイルス（魚類ノダウイルス）ゲノムRNA2のDNA型の検出
試料番号1、4、6、7、9、11、12、13は421塩基の増幅産物が得られ陽性である。M、分子量マーカー；P、陽性対照；N、陰性対照

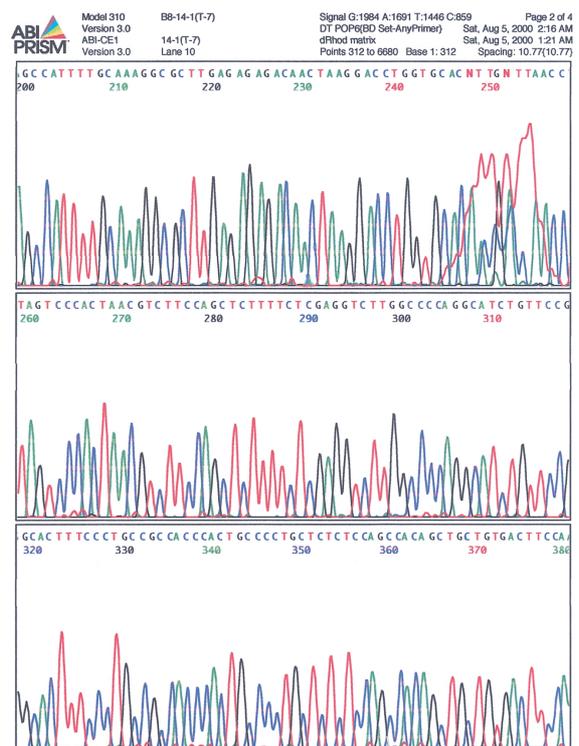


図3 マツカワにおける神経壊死症ウイルス（魚類ノダウイルス）RNA1DNA型の塩基配列の決定
PCRによる増幅産物をクローニング後DNAシーケンサーにより塩基配列を決定した。

伝染性造血器壊死症ウイルスによるアポトーシス

水産孵化場

研究の目的

伝染性造血器壊死症（IHN）はサケ・マス類に高い死亡率をもたらす危険な感染症である。この感染症の防疫対策を研究する一環として、原因ウイルスの病原性について調べた。

研究の成果

- ① IHNウイルスに感染したサクラマスではリンパ球の細胞死が顕著に確認された。また、これはアポトーシスとよばれる細胞自身の自発的働きにより起こる細胞死だった。
- ② アポトーシスを起こす細胞のみを染色し（TUNEL法）識別した結果、ウイルス非感染魚のリンパ球は3%がアポトーシスを起こしていたのに対し、IHNウイルス感染後5日目の死亡魚と生残魚ではそれぞれ100%、21%のリンパ球がアポトーシスを起こしていることがわかった。また、これらのリンパ球はアポトーシスの特徴とされる遺伝子（ゲノムDNA）の断片化が起きていた。
- ③ IHNウイルスに感染したRTG-2細胞（ウイルス検査に用いる培養細胞）もTUNEL法により染色され、リンパ球と同様にアポトーシスを起こしていることがわかった。
- ④ アポトーシスは不要な細胞を処理するための、生体の恒常性維持に重要な現象（細胞死）とされている。しかし、IHNウイルスの感染により、魚体内のリンパ球がアポトーシスにより異常に減少することは魚の抗病性全体を引き下げることにもつながると考えられる。

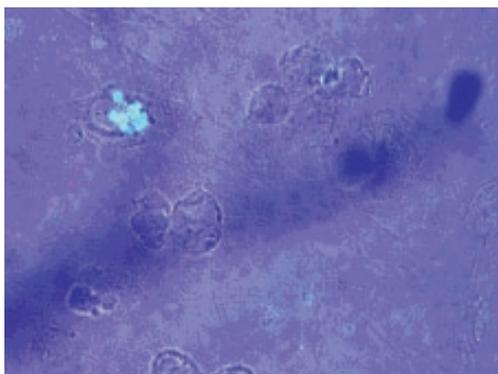


図1 IHNウイルス感染RTG-2細胞のアポトーシス
緑色の蛍光を発している細胞はアポトーシスを起こしている。

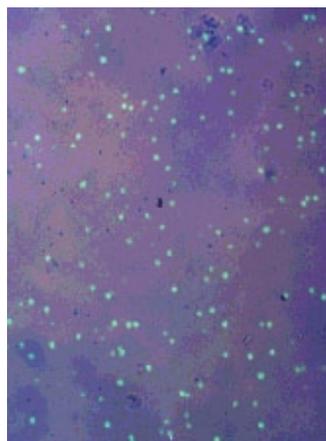


図2 IHNによる死亡魚のリンパ球
ほぼ全てのリンパ球が緑色の蛍光を発しており、顕著にアポトーシスが起きていることがわかる。

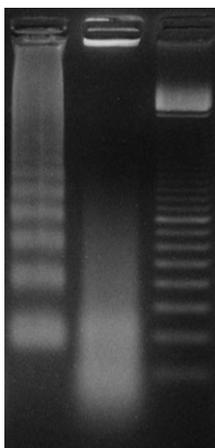


図4 リンパ球のDNAの電気泳動
左からウイルス感染魚、非感染魚、サイズマーカー。
ウイルス感染魚のDNAはしま模様の泳動像を示し、1本であるはずのDNAが高度に断片化していることがわかる。

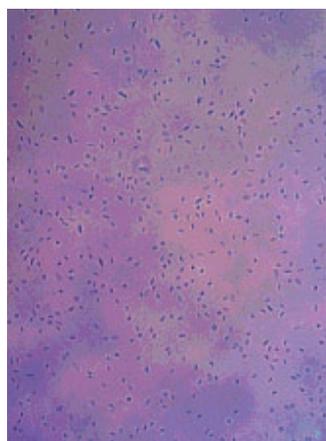


図3 非感染魚のリンパ球
緑色のリンパ球はほとんど確認できない。