



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	ニホンウナギに感染しているJapanese Eel Endothelial Cells-infecting Virusの探索に関する研究(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	岡崎, 祥子
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第458号
Issue Date	2016-03-14
Type	博士論文
Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/54531">http://hdl.handle.net/20.500.12099/54531</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本(国)籍)	岡崎祥子(福岡県)		
主指導教員氏名	東京農工大学 教授 水谷哲也		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第458号		
学位授与年月日	平成28年3月14日		
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	東京農工大学		
学位論文題目	ニホンウナギに感染している Japanese Eel Endothelial Cells-infecting Virus の探索に関する研究		
審査委員	主査	東京農工大学	教授 白井淳資
	副査	帯広畜産大学	教授 小川晴子
	副査	岩手大学	教授 古市達哉
	副査	東京農工大学	教授 水谷哲也
	副査	岐阜大学	教授 杉山誠
	副査	岐阜大学	教授 森川茂

### 学位論文の内容の要旨

ニホンウナギは、古来日本人に親しまれている重要な魚種である。しかし、近年漁獲量が激減し、絶滅危惧種に指定された。ニホンウナギの感染症を正しく理解・診断し、効果的に予防やコントロールを行っていくことは安定的な食料生産を確保する上で必要不可欠である。ニホンウナギのウイルス性血管内皮壊死症は JEECV を原因とするウイルス感染症で、ニホンウナギに致死性を示す。本ウイルスはポリオーマウイルスの T 抗原に相同性がある LTLG 領域を持つが、LTLG 領域以外の ORF についてその機能はいまだ不明である。また、JEECV の感染実態についても不明である。ニホンウナギは熱帯域に位置する産卵場と温帯域に位置する成育場の間で数千 km の回遊を行う遡河性の回遊魚であることから、生活史に沿った調査が非常に困難であり、JEECV の疫学解明には大きな妨げとなっていた。

ウイルス性血管内皮壊死症は 1980 年代以降日本全国の養殖場で発生しており、経済損失があるにもかかわらず養殖場の JEECV 分離株に関する報告は少ない。さらに自然界に生息するニホンウナギに感染する JEECV の情報が皆無であった。本研究では JEECV の分子疫学調査に資する目的で、養殖場の病魚から分離された JEECV の分離株の全塩基配列を決定するとともに、病原性に関与すると推測される LTLG 領域の塩基配列決定に資する nested PCR 法の開発を行い、それをニホンウナギの生活史に沿った分子疫学調査に適用することで、以下の成果を得た。

第 1 章では、養殖場のニホンウナギ由来の JEECV 分離株 2 株の全塩基配列を明らかにした。その結果、標準株と分離株ではいくつかの ORF で差異が認められたものの、LTLG 領域に差異は認められなかった。今回開発した LTLG 領域の塩基配列決定用 nested PCR 法は 3'→5'エクソヌクレアーゼ活性を持つ DNA ポリメラーゼを用いており、LTLG 領域の塩基配列

決定に適していると考えられた。本法の JEECV の分子生物学的診断法としての感度は既報のリアルタイム PCR 法より 10 倍低いが、既報の PCR-A, PCR-B および PCR-C とは同等であったことから、実際のニホンウナギの検体にも有効な感度であると考えられた。

第 2 章では、日本各地のニホンウナギ成魚を対象にした JEECV の各遺伝子検査法による JEECV の検出率を比較した結果、PCR-B が最も高く、次いでリアルタイム PCR 法が高いという結果を示した。日本各地のニホンウナギ成魚を対象にした分子疫学調査により成魚の 0 ~13.6% に JEECV が感染していることが示された。さらに、LTLG 領域の塩基配列は標準株や養殖場の分離株とは異なり、遺伝的多型性があることが明らかになった。

第 3 章では、産卵場の親魚を対象にした分子疫学調査により、ニホンウナギ親魚の 20.0% に JEECV が感染していることを示した。さらに、LTLG 領域の塩基配列は標準株や養殖場の分離株とは異なり、自然界の成魚に感染する JEECV と同様に遺伝的多型性を示した。

第 4 章では、日本近海に生息するニホンウナギ稚魚を対象にした疫学調査により、稚魚の 10.0% に JEECV が感染していることを示した。

本研究により、養殖場のニホンウナギ由来の JEECV 分離株では LTLG 領域以外の ORF に遺伝的多型性が認められることが明らかとなった。また、LTLG 領域の塩基配列決定用 nested PCR 法を開発することで、JEECV の病原性に重要と考えられる LTLG 領域の部分塩基配列を決定し比較することが可能となった。産卵場の親魚、日本近海の成魚および稚魚にそれぞれ JEECV が感染しており、LTLG 領域の塩基配列には遺伝的多型性が認められた。今後、自然界のニホンウナギに感染する JEECV の感染様式や病態の解明が進展することが期待される。本研究で得られた知見と開発した LTLG 領域の塩基配列決定用 nested PCR 法は、今後の JEECV の疫学調査や対策において有益な情報と技術になると考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

ニホンウナギのウイルス性血管内皮壊死症は 1980 年代以降日本全国の養殖場で発生しており、経済損失があるにもかかわらず養殖場の JEECV 分離株に関する報告は少ない。本研究では JEECV の分子疫学調査に資する目的で、養殖場の病魚から分離された JEECV の分離株の全塩基配列を決定するとともに、病原性に関与すると推測される LTLG 領域の塩基配列決定に資する nested PCR 法の開発を行い、ニホンウナギの生活史に沿った分子疫学調査に適用した。

本研究により、養殖場のニホンウナギ由来の JEECV 分離株 2 株の全塩基配列を明らかにし、標準株と分離株ではいくつかの ORF で差異が認められた。この配列を考慮して PCR を用いた検出系を確立した。日本各地のニホンウナギ成魚を対象にした分子疫学調査により成魚の 0 ~13.6% に JEECV が感染していることが示された。さらに、LTLG 領域の塩基配列は標準株や養殖場の分離株とは異なり、遺伝的多型性があることが明らかになった。産卵場の親魚を対象にした分子疫学調査により、ニホンウナギ親魚の 20.0% に JEECV が感染していることが示された。さらに、LTLG 領域の塩基配列は標準株や養殖場の分離株とは異なり、自然界の成魚に感染する JEECV と同様に遺伝的多型性を示した。さらに、日本近海に生息するニホンウナギ稚魚を対象にした疫学調査により、稚魚の 10.0% に JEECV が感染していることが初めて示された。

本研究により、養殖場のニホンウナギ由来の JEECV 分離株では LTLG 領域以外の ORF に遺伝的多型性が認められることが明らかとなった。産卵場の親魚、日本近海の成魚および稚魚にそれぞれ JEECV が感染しており、LTLG 領域の塩基配列には遺伝的多型性が認められた。今後、自然界のニホンウナギに感染する JEECV の感染様式や病態の解明が進展することが期待される。本研究で得られた知見と開発した LTLG 領域の塩基配列決定用 nested PCR 法は、今後の JEECV の疫学調査や対策において有益な情報と技術になると考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Detection of Japanese eel endothelial cells-infecting virus (JEECV) in the Japanese eel *Anguilla japonica* (Temminck & Schlegel), living in natural habitats  
著 者 名 : Okazaki, S., Manabe, H., Omatsu, T., Tsuchiaka, S., Yamamoto, T., Chow, S., Shibuno, T., Watanabe, K., Ono, S., Kuwada, H. and Mizutani, T.  
学術雑誌名 : Journal of Fish Diseases  
巻・号・頁・発行年 : 38(9):849-852, 2015
- 2) 題 目 : Detection of Japanese eel endothelial cells-infecting virus in *Anguilla japonica* elvers  
著 者 名 : Okazaki, S., Yasumoto, S., Koyama, S., Tsuchiaka, S., Naoi, Y., Omatsu, T., Ono, S. and Mizutani, T.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : In Press

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Molecular epidemiology of avian bornavirus from pet birds in Japan  
著 者 名 : Sassa, Y., Horie, M., Fujino, K., Nishiura, N., Okazaki S., Furuya, T., Nagai, M., Omatsu, T., Kojima, A., Mizugami, M., Ueda, K., Iki, H., Ebisawa, K., Tomonaga, K. and Mizutani, T.  
学術雑誌名 : Virus Genes  
巻・号・頁・発行年 : 47(1):173-177, 2013
- 2) 題 目 : Detection of bovine group A rotavirus using rapid antigen detection kits, RT-PCR and next-generation DNA sequencing  
著 者 名 : Minami-Fukuda, F., Nagai, M., Takai, H., Murakami, T., Ozawa, T., Tsuchiaka, S., Okazaki, S., Katayama, Y., Oba, M., Nishiura, N., Sassa, Y., Omatsu, T., Furuya, T., Koyama, S., Shirai, J., Tsunemitsu, H., Fujii, Y., Katayama, K. and Mizutani, T.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 75(12):1651-1655, 2013
- 3) 題 目 : Identification of novel bovine group A rotavirus G15P[14] strain from epizootic diarrhea of adult cows by *de novo* sequencing using a next-generation sequencer  
著 者 名 : Masuda, T., Nagai, M., Yamasato, H., Tsuchiaka, S., Okazaki, S., Katayama, Y., Oba, M., Nishiura, N., Sassa, Y., Omatsu, T., Furuya, T., Koyama, S., Shirai, J., Taniguchi, K., Fujii, Y., Todaka, R., Katayama, K. and Mizutani, T.  
学術雑誌名 : Veterinary Microbiology  
巻・号・頁・発行年 : 171(1-2):66-73, 2014
- 4) 題 目 : Detection of enterovirus genome sequence from diarrheal feces of goat

著者名：Omatsu, T., Tsuchiaka, S., Hirata, T., Shiroma, Y., Okazaki, S.,  
Katayama, Y., Oba, M., Nishiura, N., Sassa, Y., Furuya, T., Nagai,  
M., Ochiai, H., Tamaki, S. and Mizutani, T.

学術雑誌名：Virus Genes

巻・号・頁・発行年：48(3):550-552, 2014

- 5) 題 目：Neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol affects ovarian gene  
expression and disrupts reproductive cycles in female rats

著者名：Nozawa, K., Nagaoka, K., Zhang, H., Usuda, K., Okazaki, S., Taya,  
K., Yoshida, M. and Watanabe, G.

学術雑誌名：Reproductive Toxicology

巻・号・頁・発行年：46:77-84, 2014

- 6) 題 目：Detection of a novel herpesvirus from bats in the Philippines

著者名：Sano, K., Okazaki, S., Taniguchi, S., Masangkay, S., J., Puentespina  
Jr., R., Eres, E., Cosico, E., Quibod, N., Kondo, T., Shimoda, H.,  
Hatta, Y., Mitomo, S., Oba, M., Katayama, Y., Sassa, Y., Furuya,  
T., Nagai, M., Une, Y., Maeda, K., Kyuwa, S., Yoshikawa, Y., Akashi,  
H., Omatsu, T. and Mizutani, T.

学術雑誌名：Virus Genes

巻・号・頁・発行年：51(1):136-139, 2015

- 7) 題 目：Identification and complete genome analysis of a novel bovine  
picornavirus in Japan

著者名：Nagai, M., Omatsu, T., Aoki, H., Kaku, Y., Belsham, G., J., Haga,  
K., Naoi, Y., Sano, K., Umetsu, M., Shiokawa, M., Tsuchiaka, S.,  
Furuya, T., Okazaki, S., Katayama, Y., Oba, M., Shirai, J.,  
Katayama, K. and Mizutani, T.

学術雑誌名：Virus Research

巻・号・頁・発行年：210(2):205-212, 2015