

マダイイリドウイルス病のゼブラフィッシュ *Danio rerio* 感染モデルについて

今城雅之・大嶋俊一郎

(高知大学教育研究部自然科学系農学部門)

A Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Red Sea Bream Iridovirus Disease

Masayuki Imajoh and Syun-ichirou Oshima

Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University

Abstract: Red sea bream iridovirus (RSIV) is a piscine, icosahedral, double-stranded DNA virus and belongs to the genus *Megalocytivirus* within the family *Iridoviridae*. Red sea bream iridovirus disease caused by RSIV has been confirmed in over 30 cultured marine fish species in Japan. Here, we report the successful infection of adult zebrafish with RSIV, indicating that zebrafish can be used as a useful model for developing RSIV vaccines. Zebrafish intraperitoneally injected or immersed with RSIV began to die at 3 or 6 days post-infection. At the same time, more than 10^5 ORF407R and ORF380R transcript copies per 10^8 β -actin transcript copies were estimated in the sampled individuals by quantitative real-time RT-PCR analysis, suggesting that the expression levels of the two genes may be associated with mortality. All zebrafish were dead within 11 days after intraperitoneal injection with RSIV. The cumulative mortality of zebrafish after immersion with RSIV was 91.5%. Moribund fish swam lethargically near the surface of the water. Dead fish showed exophthalmos, severe anemia of the gill and hemorrhage of the internal organs. Basophilic enlarged cells were observed histologically in the spleen of the dead fish, although whether the spleen was enlarged was unclear. By transmission electron microscopy, RSIV virions were detected in the intestine, the liver, the heart and the gill of the dead fish. Microarray and gene ontology analyses revealed that 151 genes were up-regulated, which included apoptosis-related genes in molecular function and cellular component, and 138 genes were down-regulated, which included immune response-related genes in biological process, in both zebrafish at 5 and 10 days after immersion with RSIV when compared to control fish immersed with PBS. These findings provide a further understanding of pathogenic mechanisms in RSIV disease.

キーワード : マダイイリドウイルス, ゼブラフィッシュ, 脾臓, 異型肥大細胞, マイクロアレイ.

Keyword: Red sea bream iridovirus, Zebrafish, Spleen, Enlarged cell, Microarray.

はじめに

マダイイリドウイルス (Red sea bream iridovirus, RSIV) はイリドウイルス科のメガロシチウイルス属に属する直鎖状2本鎖DNAウイルスである (Ito ほか¹⁾)。RSIVを原因とするマダイイリドウイルス病は1990年の8月から9月の四国における養殖マダイの大量斃死によって初めて確認され、翌年には西日本各地のマダイ養殖場で大規模な発生が見られるようになり、稚魚のみならず成魚にも発症したことから産業的に大きな問題となった (井上ほか²⁾)。本病の発生はこれまでに、スズキ目28種、カレイ目2種、フグ目1種の海産養殖魚で確認されており、特に、マダイ、ブリ、カンパチ、ヒラマサ、シマアジ、イシダイ、イシガキダイ、スズキ、イサキ、クロマグロ、ヒラメ、トラフグの12魚種で感受性が高いとされている (川上ほか³⁾)。このような多様な魚種で夏季の高水温期を中心に毎年発生を繰り返していることから、マダイイリドウイルス病は本邦で発生したウイルス病としては最大規模の被害を与えている。

RSIVは致死性の高い急性感染症を引き起こし、罹病魚の外観的な特徴として、体色黒化もしくは褪色、体表や鰭に出血性のスレ、軽度の眼球突出が挙げられ、剖検では、鰓の貧血、臓器の点状出血、脾臓の肥大が見られる。病理組織学的には、脾臓、腎臓、心臓、鰓において、細胞質が塩基性色素で均一あるいは顆粒状に染まる異型肥大細胞と呼ばれる大型細胞が多数観察され、この異型肥大細胞と脾臓の肥大はマダイイリドウイルス病最大の特徴とされる (井上ほか²⁾)。

現在、マダイイリドウイルス病は産業的な被害の大きさから、ホルマリン不活化ワクチンが開発され実用化されている (Nakajima ほか⁴⁾)。我々は以前の研究で、2000年以降に国内で分離されるRSIVは発見当初に発生していたものと遺伝子型が異なり、中国、韓国、東南アジアなどで分離・報告されたものと同じ型であることから、国外から新たに侵入したRSIVが現在流行していること、さらに、遺伝的な多様化が起こっていることを明らかにした (Imajoh ほか⁵⁾)。このことから、今後、イリドワクチンに使用されているワクチン株が流行株と一致しないために、ワクチンの効果が低下していく問題が懸念され、それに代わる新しいワクチンの開発研究を進めていく必要がある。しかし、マダイなどの海産養殖魚を用いたワクチンの野外実験を行うには大規模な設備が必要となり、また、多大な労力を必要とする (Nakajima ほか⁶⁾)。この課題を解決すべく、我々はゼブラフィッシュをRSIV感染モデルとして扱うことに注目した。ゼブラフィッシュはコイ目、コイ科、ダニオ亜科に属する小型の熱帯魚であり、卵および卵胚が入手しやすいこと、繁殖および多数の個体の飼育が容易であること、胚形成全体の組織が明瞭であること、世代時間が短いことなど、実験モデルとして様々な利点を提供する。ゼブラフィッシュの感染モデルとしての活用はこれまでいくつかの魚病ウイルスや魚病細菌の研究 (LaPatra ほか⁷⁾, Sanders ほか⁸⁾, Phelan ほか⁹⁾, Neely ほか¹⁰⁾, Prouty ほか¹¹⁾, O'Toole ほか¹²⁾ など) で注目されているが、病原体によっては、感染が成立しない、病原性が低下する、病変の再現がないといったことから、ゼブラフィッシュが必ずしも病原体本来の病原性を示すとは限らない。そこで、本稿では、RSIV感染モデルとしてゼブラフィッシュの可能性について検証したので報告する。

材料と方法

供試ウイルスと供試魚

供試ウイルスには、2005年に高知県須崎市の養殖マダイの脾臓から分離されたU-6株を用いた。供試魚には、高知市内にある熱帯魚専門店より入手した成魚ゼブラフィッシュを用いた。

感染実験

感染は浸漬法と注射法により行った。浸漬法では、平均体長1.7cmのゼブラフィッシュ170尾を 4.7×10^4 TCID₅₀/mlの濃度に調整したウイルス液に2時間浸漬した。注射法では、平均体長2.9cmのゼブラフィッシュ132尾の腹腔内に 2.4×10^5 TCID₅₀量のウイルス液を注射した。陰性対照として、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いた。飼育条件は28°Cの水温下で1日につき3回の給餌を行い、感染期間を3週間とした。感染後、経時的に3尾ずつ回収して総RNA抽出に供した。また、感染実験期間中の死亡魚は直ちに水槽から取り上げ、ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE染色) と透過電子顕微鏡観察に供した。

Table 1. TaqMan primers and probes used in this study.

Target gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5' to 3' direction)
ORF591R	forward	GGCTCTTGGGCAACCGTAA
	reverse	CCGGAGGCCTCACCCTT
	probe	CTGCACATATTAAATCGCAGCCTCATGCC
ORF407R	forward	CATGGATAACGCCAAGATGTTTAA
	reverse	TCCAGTGACGCCCGTTCT
	probe	CACGAGGCCGTCATGGACCTGTTC
ORF380R	forward	CGCAACGTGCAAAGCAAT
	reverse	GCAGATTCACCTTGTGTGTTGACA
	probe	ACACCGCGCCAGTCCCGT
β -actin	forward	TGCTCCCCGAGCTGTCTT
	reverse	ACCAACCATGACACCCTGATG
	probe	TCCATCGTGGGTCGCCCA

HE 染色

死亡魚を 10%リン酸緩衝ホルマリン液に漬けて固定し、昇順エタノールによる脱水、キシレン透徹を行い、パラフィンに一晩浸潤させた後に包埋した。パラフィン包埋のサンプルはマイクロトームを用いて薄切切片を作製し、スライドガラスの上に電熱プレートで乾燥・定着させた。その後、キシレン透徹、降順エタノールによる水和を行い、マイヤーのヘマトキシリン液で 5 分間の核染色とマイヤーエオシン液で 5 分間の細胞質染色を行った。その後、流水で色出し、昇順エタノールによる脱水とキシレン透徹を行い、サンプルを封入後、オリンパス社の正立顕微鏡 BX51 を用いて観察を行った。

透過電子顕微鏡観察

死亡魚を 2.5%グルタルアルデヒド液に漬けて前固定し、その後、1.0%オスミウム酸固定液により後固定を行った。二重固定したサンプルは昇順エタノールによる脱水を行い、酸化プロピレンで浸透し、エポキシ樹脂に包埋した。包埋サンプルはウルトラマイクロトームにより超薄切切片を作製し、フォルムバームの支持膜を張ったグリッド上に吸着させた。染色は硝酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を行った。5 分間のウラン染色後、50%エタノールと蒸留水で洗浄し、1 分間の鉛染色を行い、蒸留水で再び洗浄した。洗浄後、乾燥させたサンプルは日立製作所の透過型電子顕微鏡 H-7100 を用いて観察を行った。

リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (リアルタイム RT-PCR 法)

RSIV は前初期遺伝子として 9 種類、初期遺伝子として 40 種類、後期遺伝子として 38 種類の合計 87 種類のウイルス蛋白をコードしている (Lua ほか¹³⁾)。リアルタイム RT-PCR の標的領域として、前初期遺伝子から未知機能蛋白質をコードする ORF591R、初期遺伝子から ATPase をコードする ORF407R、後期遺伝子から主要外被蛋白質をコードする ORF380R の 3 遺伝子を選択し、 β アクチンを内部標準遺伝子とした。プライマーおよびプローブの設計は Primer Express version 2.0 ソフトウェアを用いて行い、それらの配列情報を Table 1 に示した。回収した感染魚から QIAGEN 社の RNeasy Lipid Tissue Mini kit によりマニュアルに従って総 RNA を抽出し、1 μ g の総 RNA 溶液を用いて Invitrogen 社の Super Script II Reverse Transcriptase により逆転写反応を行った。PCR 反応は 1 μ l の cDNA 溶液、Applied Biosystems 社の TaqMan Gene Expression Master Mix, 7300 リアルタイム PCR システムを用いて 3 本立てで行った。得られたデータはアボガドロ定数と TA クローニングベクターを用いた方法 (Fujioka ほか¹⁴⁾) に従ってコピー数に換算し、 β アクチンのコピー数で標準化した。

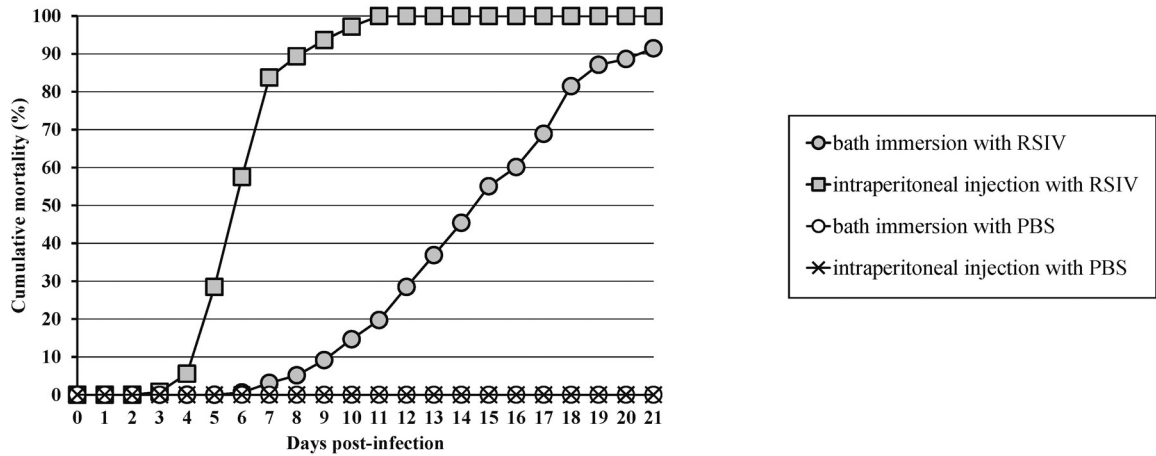


Fig. 1. Cumulative mortality of zebrafish after immersion and intraperitoneal injection with RSIV strain U-6.

マイクロアレイ解析

浸漬感染5日後および10日後に抽出した3尾分の総RNAを合わせ、タカラバイオ社のRNA Transcript SureLABEL Core kitを用いてRNA増幅とアンチセンスRNAの合成を行い、Filgen社のZebrafish 14k Occhipに42°Cで20時間のハイブリダイズを行った。その後、0.1% SDSを含む2×SSCで4分間、0.1% SDSを含む0.1×SSCで4分間、0.1×SSCで1分間の順で計3回の洗浄を行い、GenePix 4000Bによりスキヤニングして、Array-Pro Analyzer version 4.5により各スポットを定量化した。得られたデータは陰性対照に対して2倍以上と1/2以下の増減変動を示した遺伝子群を抽出し、遺伝子オントロジーによる3つの機能分類に従い、P値が0.05以下の優位性を示した遺伝子数を円グラフで表した。

結果と考察

感染実験の結果を上記のFig. 1に示した。注射感染区では、感染3日後から死亡個体が見られるようになり、感染11日後で累積死亡率

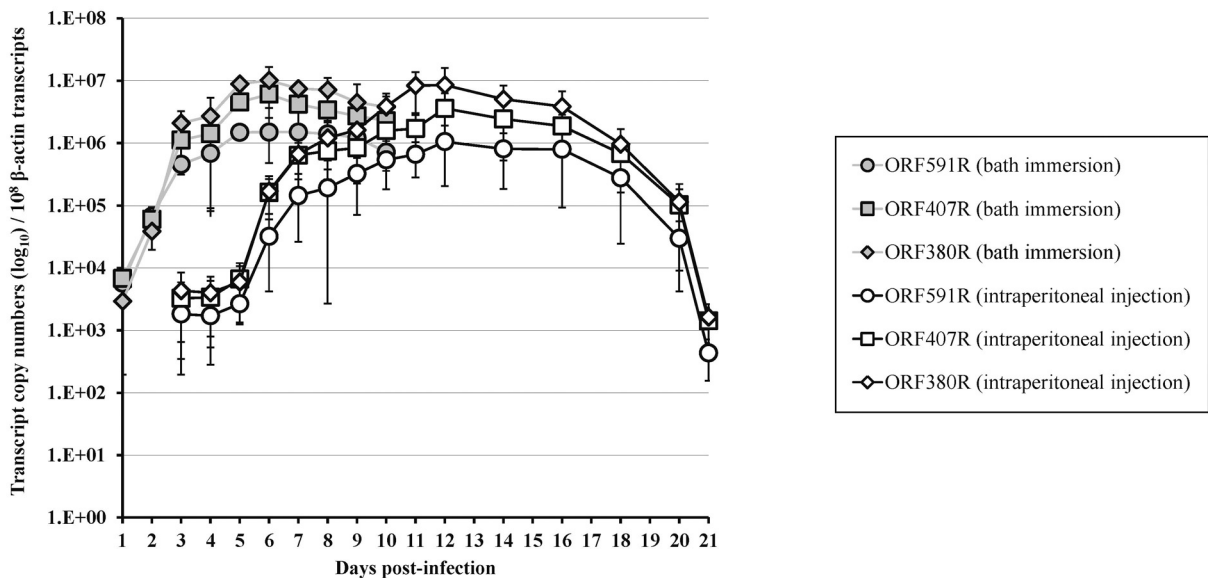


Fig. 2. Temporal expression of ORF591R, ORF407R and ORF380R genes quantified by qRT-PCR assay in zebrafish after immersion and intraperitoneal injection with RSIV strain U-6. The transcript copy numbers were normalized to the β-actin expression. Error bars represent standard deviation of three replicates.

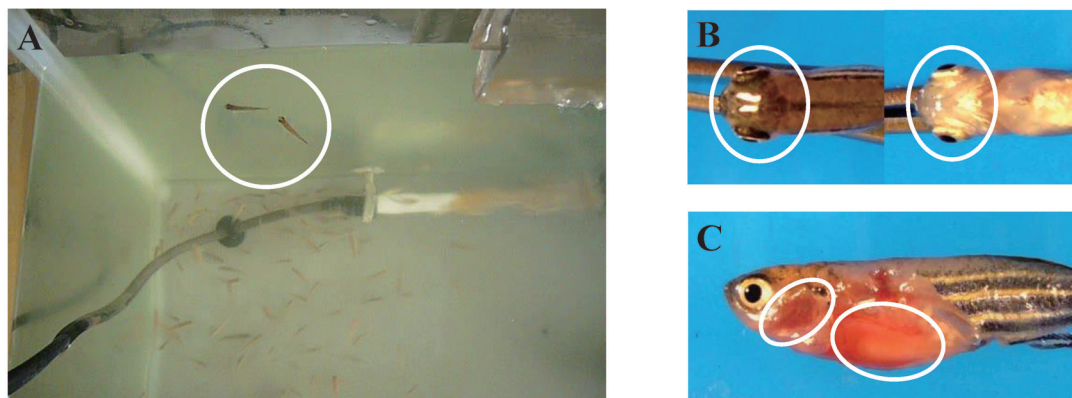


Fig. 3. Clinical signs of dead zebrafish infected with RSIV strain U-6. Moribund fish swam lethargically near the surface of the water (A). Dead fish showed exophthalmos (B), severe gill anemia and hemorrhage of internal organs (C).

は100%に達した。一方、浸漬感染区では、感染6日後から21日後まで死亡が続き、最終的な累積死亡率は91.5%となり、注射感染区の方が早い段階で死亡個体が増加する傾向にあった。陰性対照区では、死亡個体は全く観察されなかった。

リアルタイムPCRの結果、注射感染区では感染1日後、浸漬感染区では感染3日後から、ORF591R、ORF407R、ORF380Rを含む3つの遺伝子の転写産物が検出されるようになり、これらの発現量は、前者では感染6日後、後者では感染12日後にそれぞれピーク値に達した (Fig. 2)。また、前者の方が経時的に早い段階で発現量が増加し、ウイルス増殖が速い傾向を示した。死亡が始まった注射感染区の感染3日後と浸漬感染区の感染6日後では、ORF407RとORF380Rの転写産物量は 10^5 コピー以上まで増加しており、これらの量と死亡には相関性があると考えられた。また、ORF591R、ORF407R、ORF380Rはそれぞれ複製段階により異なった発現パターンを示すことから (Luaほか¹³)、各々の発現量の時間的変動には差異があることを予測していたが、感染期間を通して類似した変動が見られた。これは脾臓などの指向性の高い臓器と筋肉などの低い部位を分けずに解析したためと思われる。

RSIVに感染した死亡直前の個体は水面近くを力なく遊泳していた (Fig. 3A)。死亡個体の外観的な症状として眼球突出を示すものが多く (Fig. 3B)、剖検では、鰓の褪色と内臓諸器官の褪色・出血が認められた (Fig. 3C)。これらの特徴はマダイで報告されている症状 (井上ほか²) と同じであったが、感染巣の中心とされる脾臓の肥大 (Itoほか¹) については、サイズが小さすぎたために、外観的な変化を判断できなかった。しかし、病理組織学的観察の結果、マダイイリドウイルス病特有の異型肥大細胞が脾臓で見られ、加えて、腎臓や肝臓でも同様に観察された (Fig. 4)。透過電子顕微鏡観察の結果、腸管、肝臓、心臓、鰓において、六角形を呈する直径約200nmのウイルス様粒子が多数観察された (Fig. 5)。脾臓と腎臓はサイズが小さすぎて電顕像を見つけないことができず、ウイルス粒子の有無を確認できなかった。以上の結果から、RSIVはゼブラフィッシュに高い致死性を持ち、マダイと多くの共通した病変を引き起こすことが明らかとなった。RSIVの至適増殖温度は25°C以上の高水温であり (NakajimaとSorimachi¹⁵)、東南アジア諸国では、RSIVと同属のウイ

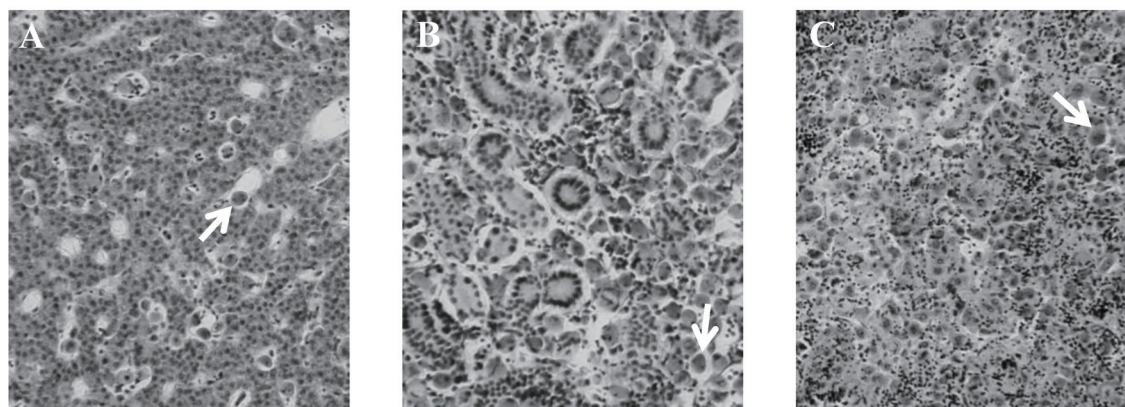


Fig. 4. Histological sections of the liver (A), the kidney (B) and the spleen (C) of dead zebrafish infected with RSIV strain U-6. Arrows indicate basophilic enlarged cell.

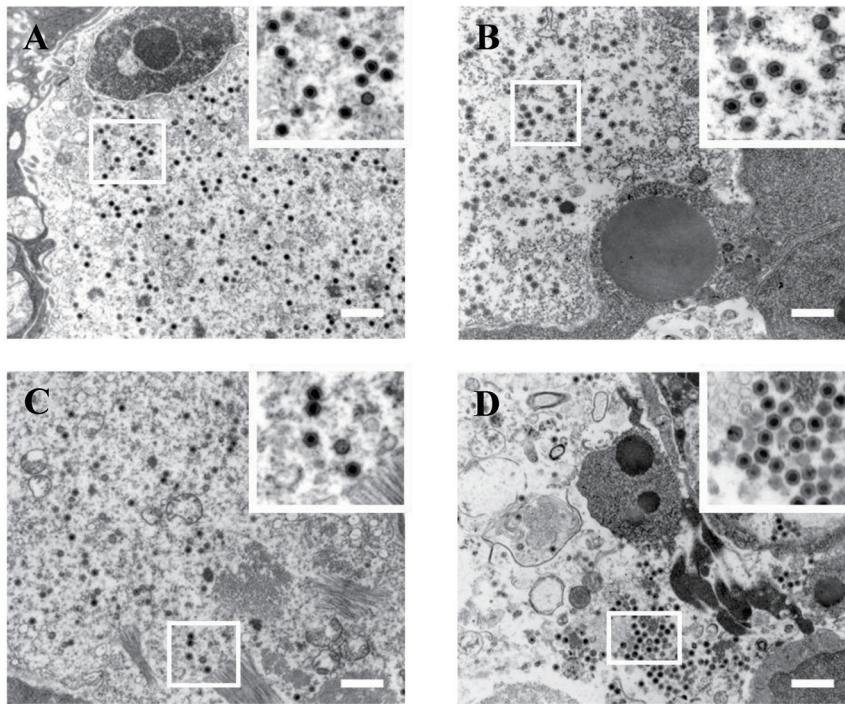


Fig.5. Transmission electron micrographs of the intestine (A), the liver (B), the heart (C) and the gill (D) of dead zebrafish infected with RSIV strain U-6. Scale bar = 1µm.

ルスがアフリカンランプアイやドワーフグラミーなどゼブラフィッシュと同じ熱帯魚から分離されている (Sudthongkong ほか¹⁶⁾)。このことから、ゼブラフィッシュは本来 RSIV に高い感受性を示す魚種であることが考えられた。

RSIV とゼブラフィッシュとの相互作用について、マイクロアレイ法により遺伝子レベルで網羅的に解析した。解析の対象として、自然感染に近い状態の浸漬感染で、かつ3つのウイルス遺伝子の発現量が顕著に増加し始める前の感染5日後、および3つのウイルス遺伝子の発現量がピーク付近まで増加し累積死亡率が上昇し始めた感染10日後のゼブラフィッシュを用いた。その結果、発現量が2倍以上に変動した遺伝子数は感染5日後で1005個 (内、分子機能818個、細胞内構成要素5個、生物学的プロセス182個) であったのに対し、感染10日後では177個 (内、分子機能70個、細胞内構成要素51個、生物学的プロセス56個) まで減少した (Fig.6)。また、発現量が1/2倍以下に変動した遺伝子数は感染5日後で1979個 (内、分子機能700個、細胞内構成要素800個、生物学的プロセス479個) であったのに対し、感染10日後では183個 (内、分子機能108個、細胞内構成要素40個、生物学的プロセス35個) まで減少した。これらの

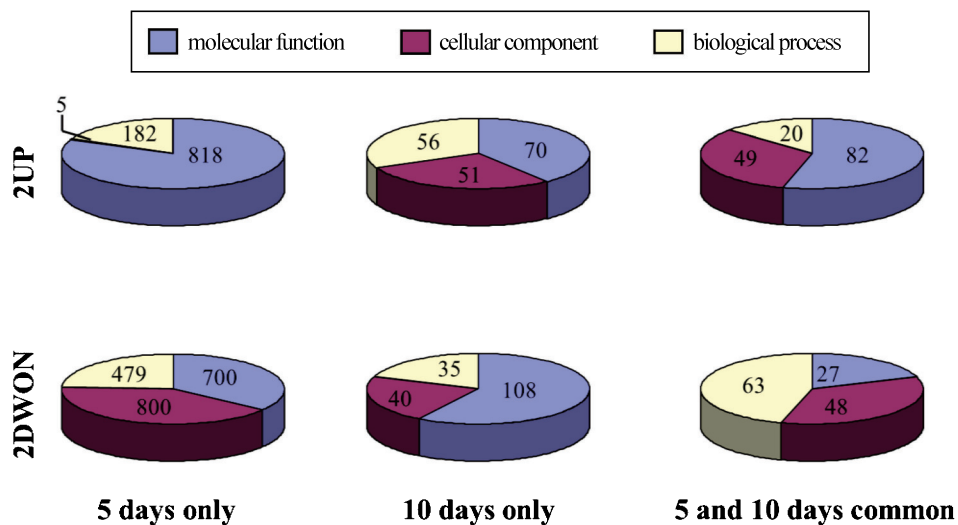


Fig. 6. Functional categorization of genes differentially expressed between zebrafish immersed with RSIV strain U-6 and PBS.

ことから、変動遺伝子数は感染 5 日後の方が感染 10 日後よりも圧倒的に多かった。その主な理由として、感染 10 日後で約 15%の累積死亡率を示していたことを考慮すると、ゼブラフィッシュの活性低下が原因であることが示唆された。感染 5 日後および 10 日後に共通した 2 倍以上の変動遺伝子数は 151 個 (内、分子機能 82 個、細胞内構成要素 49 個、生物学的プロセス 20 個) で、分子機能と細胞内構成要素の中にアポトーシスに関連した遺伝子が含まれていた。我々は以前の研究で、RSIV は細胞のアポトーシスによる細胞死を誘発して病原性を発揮することを *in vitro* で明らかにしており (Imajoh ほか¹⁷⁾)、ゼブラフィッシュで同様の病原性機序を確認することができた。感染 5 日後および 10 日後に共通した 1/2 以下の変動遺伝子数は 138 個 (内、分子機能 27 個、細胞内構成要素 48 個、生物学的プロセス 63 個) で、生物学的プロセスの中に、免疫反応に関連した遺伝子が含まれており、RSIV 感染により免疫力が低下していたことが示された。

本研究から、ゼブラフィッシュは RSIV 感染モデルに適していることが明らかとなった。今後は、ゼブラフィッシュをワクチン試験の評価モデルとして活用している研究 (Novoa ほか¹⁸⁾) を例に、国内で遺伝的に多様化した RSIV に対応できる新型ワクチンの開発研究に応用していく予定である。

謝辞

本研究は、平成 19 年度の高知大学学長裁量経費の助成を受けて行われたものである。ここに深く感謝の意を表します。

文献

1. Ito, T., Yoshiura, Y., Kamaishi, T., Yoshida, K., Nakajima, K., Prevalence of red sea bream iridovirus among organs of Japanese amberjack (*Seriola quinqueradiata*) exposed to cultured red sea bream iridovirus. *Journal of General Virology*, 94, 2094–2101. (2013)
2. 井上潔・山野恵祐・前野幸男・中島員洋・松岡学・和田有二・反町稔, 養殖マダイのイリドウイルス感染症. *魚病研究*, 27, 19–27. (1992)
3. 川上秀昌・中島員洋, 1996年から2000年にマダイイリドウイルス病が確認された海産養殖魚種. *魚病研究*, 37, 45–47. (2002)
4. Nakajima, K., Maeno, Y., Kurita, J., Inui, Y., Vaccination against red sea bream iridoviral disease in red sea bream. *Fish Pathology*, 32, 205–209. (1997)
5. Imajoh, M., Ikawa, T., Oshima, S., Characterization of a new fibroblast cell line from a tail fin of red sea bream, *Pagrus major*, and phylogenetic relationships of a recent RSIV isolate in Japan. *Virus Research*, 126, 45–52. (2007)
6. Nakajima, K., Maeno, Y., Honda, A., Yokoyama, K., Tooriyama, T., Manabe, S., Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in a field trial test. *Diseases of Aquatic Organisms*, 36, 73–75. (1999)
7. LaPatra, S. E., Barone, L., Jones, G. R., Zon, L. I., Effects of infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus infection on hematopoietic precursors of the zebrafish. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 26, 445–452. (2000)
8. Sanders, G. E., Batts, W. N., Winton, J. R., Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus. *Comparative Medicine*, 53, 514–521. (2003)
9. Phelan, P. E., Pressley, M. E., Witten, P. E., Mellon, M. T., Blake, S., Kim, C. H., Characterization of snakehead rhabdovirus infection in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Virology*, 79, 1842–1852. (2005)
10. Neely, M. N., Pfeifer, J. D., Caparon, M., Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis. *Infection and Immunity*, 70, 3904–3914. (2002)
11. Prouty, M. G., Correa, N. E., Barker, L. P., Jagadeeswaran, P., Klose, K. E., Zebrafish-*Mycobacterium marinum* model for mycobacterial pathogenesis. *FEMS Microbiology Letters*, 225, 177–182. (2003)
12. O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P. E., Wolf-Watz, H., Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*. *Microbial Pathogenesis*, 37, 41–46. (2004)
13. Lua, D. T., Yasuike, M., Hirono, I., Aoki, T., Transcription program of red sea bream iridovirus as revealed by DNA microarrays. *Journal of Virology*, 79, 15151–15164. (2005)
14. Fujioka, H., Yamasaki, K., Furusawa, K., Tamura, K., Oguro, K., Kurihara, S., Seki, S., Oshima, S., Imajoh, M., Prevalence and characteristics of

- Cyprinid herpesvirus 3 (CyHV-3) infection in common carp (*Cyprinus carpio* L.) inhabiting three rivers in Kochi Prefecture, Japan. *Veterinary Microbiology*, 175, 362–368. (2015)
15. Nakajima, K., Sorimachi, M., Biological and physico-chemical properties of the iridovirus isolated from cultured red sea bream *Pagrus major*. *Fish Pathology*, 29, 29–33. (1994)
 16. Sudthongkong, C., Miyata, M., Miyazaki, T., Iridovirus disease in two ornamental tropical freshwater fishes: African lampeye and dwarf gourami. *Diseases of Aquatic Organisms*, 48, 163–173. (2002)
 17. Imajoh, M., Sugiura, H., Oshima, S., Morphological changes contribute to apoptotic cell death and are affected by caspase-3 and caspase-6 inhibitors during red sea bream iridovirus permissive replication. *Virology*, 322, 220–230. (2004)
 18. Novoa, B., Romero, A., Mulero, V., Rodríguez, I., Fernández, I., Figueras, A., Zebrafish (*Danio rerio*) as a model for the study of vaccination against viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV). *Vaccine*, 24, 5806–5816. (2006)

平成27年 (2015) 10月9日受理

平成27年 (2015) 12月31日発行