

NIBS LETTER 2012 JULY
No. 575

日生研おより

2012年(平成24年)7月号 第58巻第4号(通巻575号)

挨拶・巻頭言

表現するということ

.....草薙公一(2)

獣医病理学研修会

第51回 No.1036 ガチョウの腹腔内腫瘍

.....日生研(3)

第51回 No.1042 イヌの包皮口腫瘍

.....岩手大学(4)

第51回 No.1045 イヌの卵巣部腫瘍

.....摂南大学(5)

レビュー

海産魚のウイルス性神経壊死症の

ワクチン開発.....黒田 丹・中井敏博(6)

お知らせ

研修者・見学者受け入れ状況.....(16)



NIBS

一般財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.gr.jp/>



表現するということ

草薙 公一

自分の考えを表現することは思っているほど易しいことではない。ましてやそのまま正確に相手に伝えるとなれば、それはほぼ不可能に近いことであろう。しかしながら人は社会生活を営む上でこの「表現する」「伝える」という作業を避けて通れないことも現実であり、その考えと表現のギャップに悩み、時に心傷つく場合もある。昨今、地理的距離は移動や通信手段の進歩による時間短縮に伴い急速に縮められている。それに比例するかのように人々の交流は、深さはさておきその密度を確実に増している。今までならば会うことは無かったであろう相手とも出会っていると思われる。会えば当然自分を表現することになり、その頻度も確実に増えることになる。そして理解される機会が増えるとともに誤解される機会も増えていくことに繋がる。海外相手となれば誤解の機会が更に多くなることは十分に予想されることである。これが今、そしてこれから進んでいく世界になるの

であろう。表現すると言う意味合いでプレゼンテーションという言葉をよく耳にするようになった。その形は様々であろうが自分の考えを相手に如何に伝え、納得してもらおうかと言うことである。近頃言われ出した言葉のように思えたが、実はかなり以前から繰り返し使われていたようである。ただ、その必要性を実感しないまま今まで過ごしてきたのは私だけであろうか。その事を気にも留めず此処まで過ごしてこられた事に感謝する一方、改めて新聞等の記事で扱われる事を考えると、日本社会もまだ対応していなかったかと妙な安心感も覚えてしまう。しかし、現実には異文化の混合になっている。着々と国際化の波も各方面で浸透してきている。世界は益々狭くなっていく。地球上の時間的距離が短くなっていき、瞬時に世界中の情報が地球上を駆けめぐり。そしてその反応を即座に異文化圏、日本国内を問わず示さなければならない状況が生まれている。当然の事として自分たちが置かれている地域と異なる地域の人たちと交流が持たれ、お互いに理解し合う必要が出てきている。自分の考えを如何に正確に表現し、そして理解してもらおうか。その方法を真剣に考えていく段階に入っている事は確かである。私たちは、今考えている以上に表現する力を身につけなければならない世界に生きている。この状況がプレゼンテーションの重要性を再認識させていることは確かである。「あうんの呼吸」の世界が小さくなって行く。

先日、新聞で「プレゼンテーション」に触れた記事を目にした。プレゼンを学ぶこと、教育に取り込むことについて賛否両論が述べられていた。既に学校ではプレゼンテーションの取り込みが始まっている。これには文部科学省の学習指導要領が背景にある。全教科で「言語活動の充実」を掲げており国も本腰でその必要性を考えているようである。教育の中での広がり、小中学校と高校とでその目的は多少異なるようである。コミュニケーションの手段とグローバル化への対応、どう捉えるかの違いはあるが相手を意識した上で自分の考えを表現し、そしてその反応を受け取るという点では同根であるようだ。今までは一方通行の「発表」であったことが聞き手を意識するようになる。そこから生まれるコミュニケーションを育てることが大切なのだと理解した。苦手を理由に表現しないことは止めにして、まずは相手を考えながら発信することが大切であり、それを続けることで周囲との関係が育っていく。次にどのような方法で表現すれば正しく意志が伝わるか、熱意が伝わるか。ここで初めてテクニックを考えるようになるのでありテクニックに拘る余り本質を忘れてはいけない。新聞記事を読みながら「なるほど」と感心した。ほとんど受け売り状態になってしまったが納得すればこれも私の意見になるのであろう。

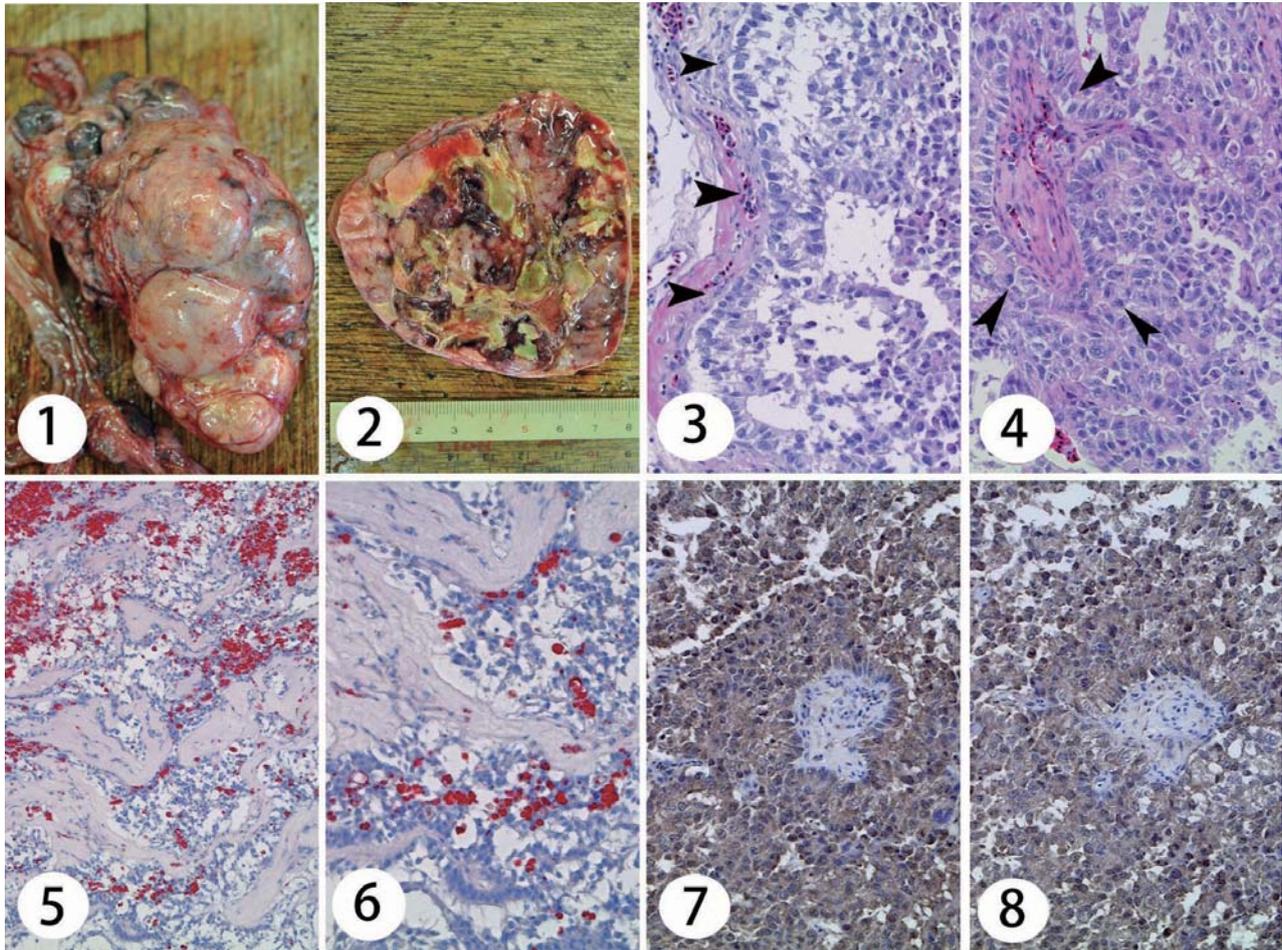
プレゼンは元はといえば営業分野から発したもののことである。如何に自分を表現し、アピールしていくかであり、そのテクニックを進化させてきたのであろう。それが多岐に應用され、今や教育現場にも登場し、日々のコミュニケーションは勿論、グローバル化対応にも必須な要素となっている。ならばプレゼンに力を持たせるにはどうしたらよいのか。まずは言わんとする事の内容を十分理解していること、そして脚色なく正直であること、更に相手が反応を返せるようにすることが大切だと思う。その上で自分の考えを、納得して受け取ってもらえる表現方法を探していく。そこに努力を重ねて行きたいものである。そうした努力の中から、滑らかではあるが表情の無い画一的な表現とは異なる、人柄の出た独自の表現が生まれてくるのだと思う。

さて、私たちは、今まである程度共通の環境、同質化された文化の中で表現をしてきた。一つ一つが具体的でなくとも意図を十分汲み取る、一言でその背景を察するような世界に身をおいてきた。いわゆる「あうん」の世界であろうか。グローバルコミュニケーションとはかなりの距離感を感じるがそこそこに心地良い世界でもある。願わくはこの「あうん」の世界も理解できる感性を持ち続けられる将来であってほしいと思うのは少々欲張りなのであろうか。

(副理事長)

ガチョウの腹腔内腫瘍

日生研 第51回獣医病理学研修会 No.1036



動物：シナガチョウ，雄，年齢不明。

臨床事項：ガチョウ血球を採取する目的で飼育されている数羽のガチョウのうちの1羽が平成22年8月に突然死亡した。このガチョウは平成19年9月に動物園から譲渡され飼育されていたものであり，死亡の前に特に異常な症状は見られていなかった。死因特定のため，病理解剖を実施した。

剖検所見：両側の趾蹠に数個の結節形成を伴う趾瘤症が見られ，他には異常は無かった。開腹したところ，腹腔内に大小の腫瘍が多発しており，最大のものは直径約15 cmの大型腫瘍であった（図1）。同腫瘍は，白色から黒色の大小結節からなり，断面は充実性で膿瘍が散在した（図2）。さらに腹膜及び腸間膜にも，直径約1 cm～1.5 cmの黒色の小～中型腫瘍が散発していた。

組織所見：腫瘍細胞は柵状増殖を特徴とし，腫瘍辺縁部（図3）や腫瘍内部の間質結合織に隣接（図4）して顕著に観察された。柵状配列した腫瘍細胞が隣接する間質結合織から離れ，一見管腔状に配列しているような増殖像も散見された。腫瘍細胞の柵状配列はセルトリ細胞腫に特徴的な増殖像によく類似し，オイルレッドOで染色される腫瘍細胞が観察されたこと（図5；弱拈，図6；強拈），免疫染色でS-100（図7）とNSE（図8）に陽性反応が観察されたことなどから，セルトリ細胞腫と診断

された。なお，免疫染色ではサイトケラチンに陰性であり，ピメンチンについては染色に用いた抗体にガチョウに対する種交差性がなく，判定は出来なかった。

診断：ガチョウの悪性セルトリ細胞腫（Malignant Sertoli cell tumor in a goose）

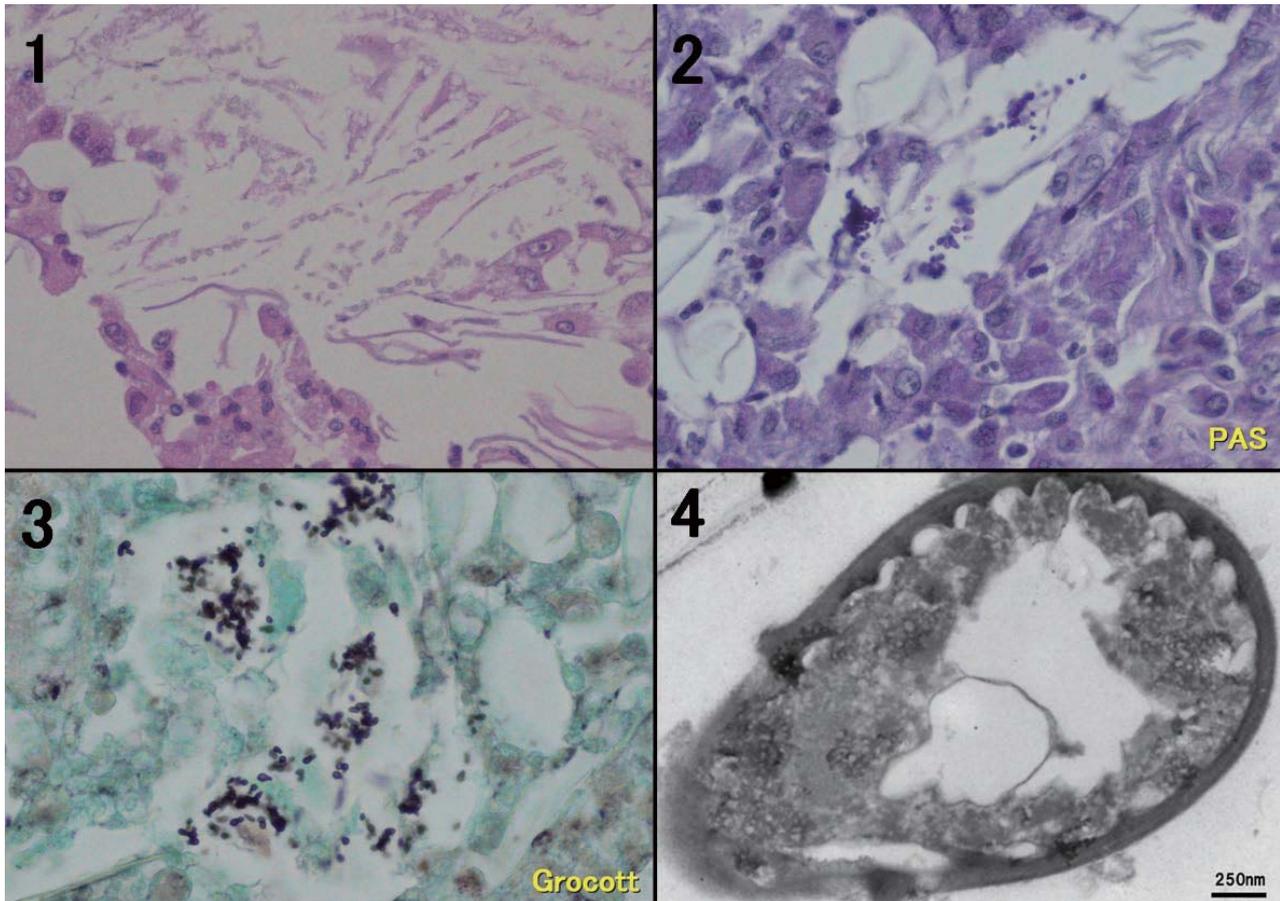
考察：腹腔内に播種していたこと，腫瘍細胞の異型度の強さ，分裂像も多く壊死性変化が目立つことなどから，悪性腫瘍と診断した。腫瘍の原発は精巣と考えられ，成書では鳥類での精巣腫瘍の分類は哺乳類での分類と大きな違いはないと記載されている。鳥類のセルトリ細胞腫は日本ウズラとセキセイインコで報告があるが，ニワトリでは発生は少ないとされており，ガチョウでの報告は調べた限り見つけられなかった。（上塚浩司）

参考文献：

1. Barnes, H. J., Fletcher, O. J. and Abdul-Aziz, T. 2008. Reproductive System. pp.348-351. In: Avian Histopathology, 3rd ed. (Fletcher, O. J. ed.), American Association of Avian Pathologists, Florida.
2. Reece, R. L. 2008. Other Tumors of Unknown Etiology. pp.593-616. In: Diseases of Poultry, 12th Ed. (Saif, Y. M. ed.), Blackwell, Iowa.
3. Gorham, S. L. and Ottinger, M. A. 1986. Sertoli cell tumors in Japanese quail. *Avian Dis.* 30: 337-339.

イヌの包皮口腫瘍

岩手大学 第 51 回獣医病理学研修会 No.1042



動物：イヌ，アメリカンコッカースパニエル，雄，7歳。
臨床事項：2010年9月頃に包皮口部の腫瘍に気づき，ホームドクターへ来院した。同月21日に包皮口部が外科的に切除され，当該部位がホルマリン固定材料として当研究室へ送付された。血液生化学的検査や単純X線検査では著変は認められなかった。

肉眼所見：包皮口の左側先端に1.7×1.1cm大，右側に1.6×1.2cm大の腫瘍がそれぞれ認められた。切り出し時の断面は，両側ともに白色から黄白色充実性であった。

組織所見：腫瘍のほとんどの領域は，ケラチン物質を伴った多数の類上皮細胞と好中球の浸潤からなる化膿性肉芽腫性病変により構成されていた。一部の領域では，リンパ球・形質細胞浸潤を伴う類上皮細胞結節による充実性病変がみられた。病変部では，円形から楕円形，ボーリングピン様の酵母様真菌の集塊が散在性に認められた(図1)。それら酵母様真菌はPASおよびグロコット染色に陽性を示し(図2, 3)，グラム染色やチールネルゼン染色にはいずれも染色されなかった。電子顕微鏡

検査では，酵母様真菌の内壁は規則性のあるらせん状の突起状構造を呈し，楕円形の一方にくびれを有して開口部と考えられる構造を示しており，それらはマラセチア属菌の超微形態の特徴と一致していた(図4)。

診断：マラセチア属菌がみられた化膿性肉芽腫性陰茎包皮炎 pyogranulomatous phalloposthitis with *Malassezia* sp.

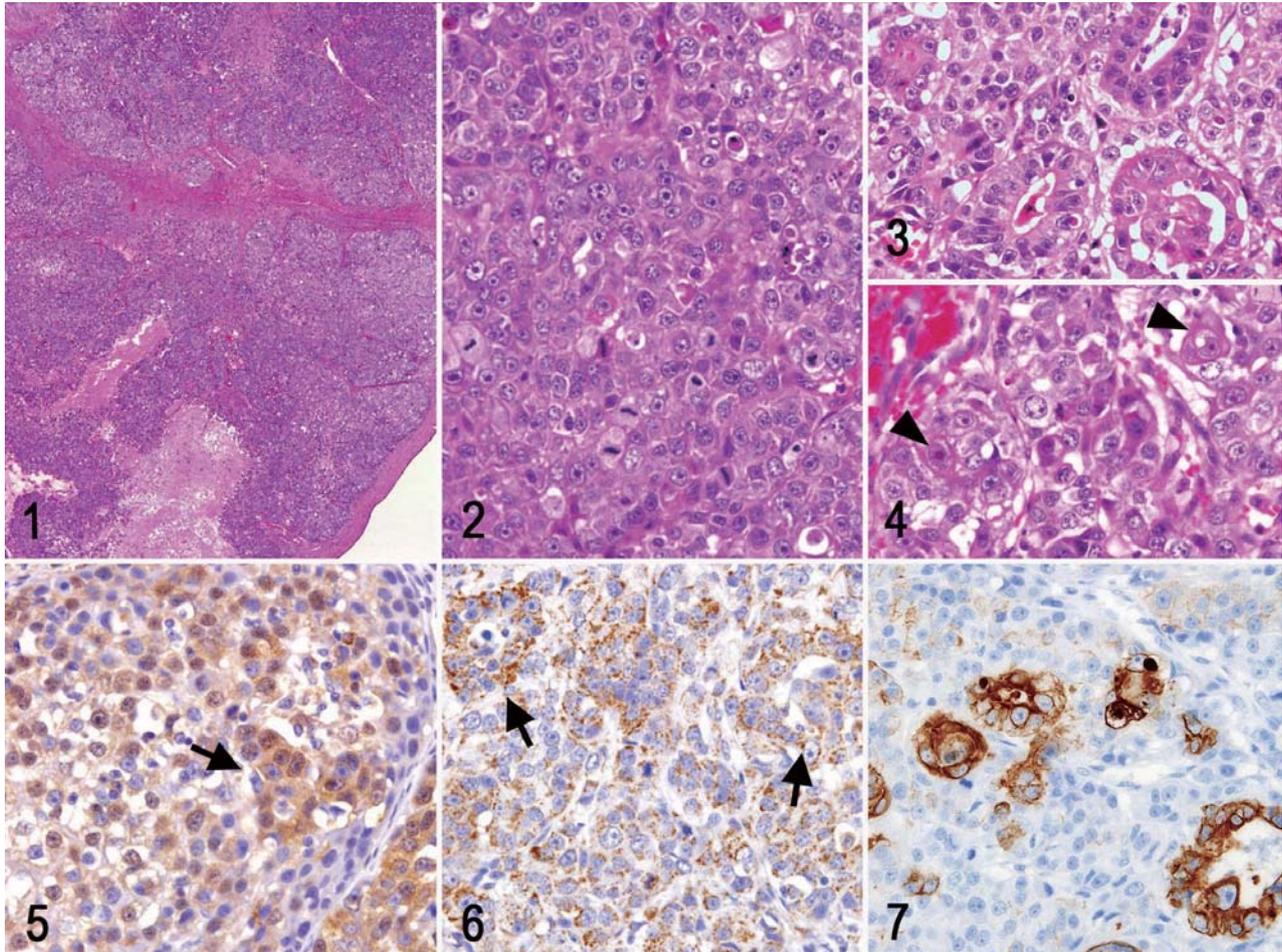
考察：従来，犬では主に *Malassezia pachydermatis* による外耳炎や皮膚炎などが知られているが，近年，ヒトでは *M. pachydermatis* や *M. sympodialis* による肉芽腫性皮膚炎が報告されている。本症例では，皮脂の分泌が豊富な包皮において脂活性を有するマラセチア属菌が過剰に増殖したものと考えられ，化膿性肉芽腫性病変の原因としてその関与が疑われた。(佐々木淳)

参考文献：

1. Harsha BD, et al. 2011. *Arch. Pathol. lab. Med.* **135**: 1085-1087.
2. Yi-Ming Fan, et al. 2006. *Arch. Dermatol.* **142**: 1181-1184.

イヌの卵巣部腫瘍

摂南大学 第 51 回獣医病理学研修会 No.1045



動物：イヌ，パピヨン，雌，9歳10ヶ月齢。

臨床事項：右第3と左第4乳腺腫瘍の摘出手術に際した身体検査で，左卵巣部に腫瘍が確認されたため，乳腺腫瘍とともに子宮卵巣が摘出された。乳腺腫瘍と，左卵巣部腫瘍から左子宮角の一部が，ホルマリン固定後当方へ送付された。

肉眼所見：ホルマリン固定後の左卵巣腫瘍は5.2×4.5×3.2 cm大で，表面は乳白色，平滑～結節状，弾性軟であった。断面は白色～淡黄色で，壊死巣がしばしば観察された。

組織所見：腫瘍内は結合組織によって複数の小葉に分画され，各小葉ではN/C比の高い類円形細胞が充実状に増殖しており，しばしば壊死巣が形成されていた(図1)。腫瘍辺縁ではわずかに本来の間質腺が認められた。多くの腫瘍細胞は胚細胞様で，好酸性～淡明の細胞質と，1～2個の明瞭な核小体を入れた大型類円形核を有しており，核分裂像は多かった(図2)。ときに，上皮様の腺管構造(図3)や角化を示す細胞(図4)が混在していた。免疫染色では，胚細胞様細胞，上皮様細胞(矢印)とともに，octamer 4，CD30に陽性(図5；octamer 4，図6；CD30)，alpha-fetoproteinに弱陽性であった。Cytokeratin AE1/AE3，CAM 5.2では上皮様細

胞が強陽性，胚細胞様細胞は部分的に弱陽性を示した(図7；AE1/AE3)。Vimentinでは胚細胞様細胞が部分的に陽性，上皮様細胞は陰性を呈した。

診断：犬の卵巣における混合型胚細胞腫瘍(胎児性癌を伴う未分化胚細胞腫)

考察：ヒトや動物では純粋な胎児性癌の発生はまれで，ヒトでは胎児性癌の多くは混合型の成分として認められ，動物の報告でも混合型が多い。本例は組織学的及び免疫組織化学的に，腫瘍の大部分の成分は未分化胚細胞腫で，上皮様の部分は胎児性癌の成分と考えられた。よって純粋な胎児性癌とはせず，上記診断とした。

(阿野直子)

参考文献：

1. Ulbright, T. M. 2005. Germ cell tumors of the gonads : a selective review emphasizing problems in differential diagnosis, newly appreciated, and controversial issues. *Mod. Pathol.* **18 Suppl 2** : S61-79.
2. Yokouchi, Y., Imaoka, M., Sayama, A. and Sanbuissho, A. 2011. Mixed germ cell tumor with embryonal carcinoma, choriocarcinoma, and epithelioid trophoblastic tumor in the ovary of a cynomolgus monkey. *Toxicol. Pathol.* **39** : 553-558.

海産魚のウイルス性神経壊死症のワクチン開発

黒田 丹 (日本生物科学研究所研究開発部) ・ 中井敏博 (広島大学大学院生物圏科学研究科)

ウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis: VNN) が海産魚の増養殖における大きな障害となつてから 20 年が経過した。発生当初, 本病は種苗生産場での問題として登場し, その後比較的早い時期に, 仔魚や稚魚におけるウイルスの主要感染源は親魚であることが明らかにされた。この親魚からの垂直感染の遮断にウイルス・フリー親魚の養成と受精卵の消毒, さらに飼育水の殺菌といった一連の方策が有効であることが実証され, 種苗生産場での本病の予防措置がとられることになった [19, 23, 32]。

しかしその後次第に, 東アジアや東南アジア各国のハタ類 (*Epinephelus* 属), 地中海諸国のヨーロッパスズキ *Dicentrarchus labrax*, また北欧では大西洋オヒョウ *Hippoglossus hippoglossus* や大西洋タラ *Gadus morhua* などの魚種においては種苗期のみならず養成期にも VNN による大量死が頻発するようになり, 養殖産業での被害が甚大となった [22, 27]。海産魚の養殖では稚魚から成魚まで通常は海面の生簀で飼育される。養殖海域を含む沿岸域の野生魚から VNN 原因ウイルスが高頻度に検出されることから [27], 生簀での養成魚のウイルス感染源はこの不顕性感染している野生魚であると推測された。このような野生魚から放出されるウイルスの水平感染を防ぐ手だてとしては予防免疫が順当な選択肢となる。これまで日本において認可されている魚類ワクチンは, 細菌病では単剤として 6 種類あるが, ウイルス病ではマダイ *Pagrus major* やブリ属魚類などのイリドウイルス病に対する不活化ワクチンが唯一のものである (農林水産省消費安全局 http://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/index.html)。

このような状況下で, 2012 年 1 月に「マハタ VNN に対する不活化ワクチン」の製造販売承認が日生研株式会社により取得された。本稿は, VNN およびその原因ウイルスに関する知見を織り込みつつ, 農水省の委託プロジェクト研究 (平成 18 ~ 20 年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業

「高級魚アラの安定養殖生産のための VNN ワクチンの開発」) として独立行政法人水産総合研究センターが中核機関となって実施された本ワクチンの開発研究の内容を中心に紹介するものである。なお, 本誌「日生研たより」の読者諸氏に対しては本来なら研究結果を主体とした記述とすべきであるが, 後続する他の魚類ワクチン開発の指針となることを期して, 開発プロセスに力点をおいて述べることにする。

1. ウイルス性神経壊死症 (VNN)

本題に入る前に本項と次項で VNN とその原因ウイルスについて簡単に触れる。これについてはすでに多くの総説や解説書が出されているので詳細はそれらを参照されたい [22, 27]。VNN 罹病魚は神経障害からくる異常遊泳を特徴とし, 中枢神経組織や網膜に神経細胞の壊死と崩壊による空胞形成が認められる (図 1)。日本におけるインダイ *Oplegnathus fasciatus* の仔稚魚 [36] とオーストラリアにおけるアジアスズキ *Lates calcarifer* 仔魚 [9] での報告が VNN の初報告である。その後, ターボット *Scophthalmus maximus* (ノルウェー [5]), キジハタ *E. akaara* (日本 [21]), ヨーロッパスズキ (タヒチ [6]), シマアジ *Pseudocaranx dentex* (日本 [20]) といった魚種で

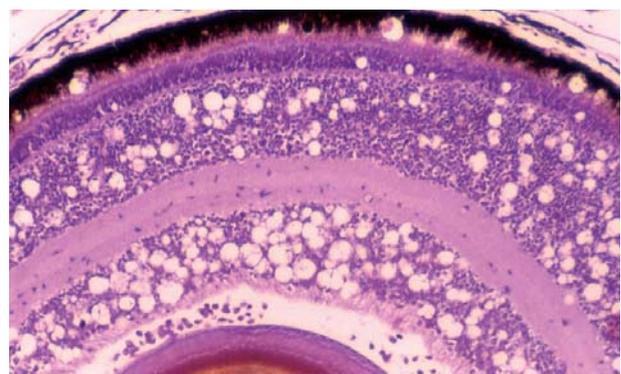


図 1 VNN 罹病魚 (キジハタ稚魚) の網膜にみられる空胞形成。

のいずれも仔魚期もしくは稚魚期での発生報告が続いた。また、これら種苗期での発生に加えて、ハタ類やスズキなどの限られた魚種では養成期間中でも VNN による大量死亡が報告されるようになった。養成期の魚では鰾の肥大が特徴的な症状である。

VNN は地理的には南米大陸を除く地域で発生しており、過去 20 年間に報告された罹病宿主は 8 目 24 科 44 魚種におよぶ [27]。これらの罹病魚には一部淡水魚も含まれており [4, 7]、海水域から淡水域への病気の浸潤も窺われる。このような罹病宿主範囲の広さはウイルスの宿主特異性の欠如を意味し、これは原因ウイルスに対する仔稚期に特有の高感受性によると考えられる。しかし一方で、原因ウイルスの遺伝子型と宿主域には密接な関係が認められ、魚体内でのウイルス増殖のためには神経細胞等の標的細胞種に何らかの質的相違があると推測される。なお、ブリ属魚種（ブリ *Seriola quinqueradiata*、カンパチ *S.dumerili*）やマダイといった日本での主要養殖魚、また世界的に重要な養殖魚であるサケ科魚類にはこれまで VNN の発生は認められていない。

2. 原因ウイルス

病気発生当初しばらくは原因ウイルスの分類学的位置は不明瞭であった。中枢神経組織の神経細胞中でのウイルス粒子の存在と病魚磨砕液を用いた感染試験による濾過性病原体の証明から、本病はウイルス病であることは疑いの余地はなかったが、既存の魚類株化細胞では原因ウイルスは分離・培養できなかった。病魚組織の観察から、原因体は直径約 25 ~ 30 nm のエンベロップをもたない球形ウイルスで、核酸の染色性から RNA ウイルスであることは推定されたもののそれ以外の性状は不明であった。しかし 1992 年に、死亡した大量のシマアジ仔魚から分画遠心により原因ウイルスが純化された結果、ウイルス核酸の基本性状が明らかにされた [20]。このウイルスは宿主魚であるシマアジの英名と病名に因んで striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) と名付けられた。

SJNNV はゲノムとして 2 分節プラスセンスの 1 本鎖 RNA (RNA1 と RNA2) をもち、RNA1 は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ遺伝子 (3.1 kb) で 100 kDa のタンパク質を、RNA2 は外被タンパク質遺伝子

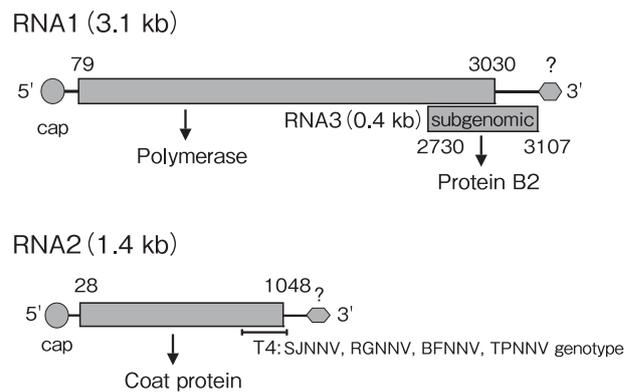


図2 ベータノダウイルス (SJNNV) のゲノム構造。

(1.4 kb) で 42 kDa のタンパク質をそれぞれコードする (図2)。それらの 5' 端にキャップ構造を有するが、3' 端にポリ A 構造を欠く [11]。また、感染細胞内ではこれらの遺伝子以外に RNA1 の 3' 端部から RNA3 (0.4 kb) が発現し、それにコードされている B2 タンパク質は RNA silencing を阻害する働きを持つ [14]。これらの形態およびゲノム構造はそれまで昆虫ウイルスとして知られてきたノダウイルス (ノダウイルス科) に一致し、VNN 原因ウイルスの分類学的位置が定まった [20]。

魚類から発見されたノダウイルスは RNA2 の塩基配列において昆虫ノダウイルスとは明確に区別された [25]。現在は、昆虫ノダウイルスはアルファノダウイルス属に、魚類ノダウイルスはベータノダウイルス属に分類されている [31]。ちなみに、ノダウイルスの名は、野田村 (千葉県野田市) で蚊から分離されたウイルスが Nodamura virus (Nov) と名付けられたことに因る。その 35 年後に奇しくも日本で魚類から SJNNV が単離・同定された。Nov と SJNNV はそれぞれの属の基準種となっている。さらに蛇足をつけると、アルファノダウイルスのうち Nov だけが脊椎動物に対して病原性が認められる [3]。

ベータノダウイルス属は、RNA2 の T4 領域と名付けられた変異の大きい約 380 塩基の配列の相同性に基づき 4 つの主要遺伝子型に分けられる [25]。すなわち、SJNNV 型、RGNNV (redspotted grouper nervous necrosis virus) 型、BFNNV (barfin flounder nervous necrosis virus) 型および TPNNV (tiger puffer nervous necrosis virus) 型である (塩基配列の相同性は互いに約 70%)。これらの遺伝子型はそれらの宿主特異性と密接に関係していて、SJNNV

型と TPNNV 型はそれぞれシマアジの仔魚，トラフグの仔稚魚からのみ分離されるという宿主域が狭いのに対し，RGNNV 型は世界各地でハタ類やスズキなど多種類の温水魚の，また BFNNV 型はターボットや大西洋オヒョウなど多種類の冷水魚の VNN 原因ウイルスとして報告されている [24]。しかし，フランスで 15°C で飼育されていたヨーロッパスズキから BFNNV 型が分離された例が示唆するように [29]，遺伝子型の宿主特異性は温水魚または冷水魚と括るのは厳密ではなく発生時の飼育水温に依存していると考えるのが適切かもしれない。なお，スペインでササウシノシタ科の一種 (*Solea senegalensis*) から SJNNV 型が分離されており (水温 30°C) [26]，SJNNV 型もまた宿主範囲はさらに広がると予想される。

飼育水温に依存すると考えられる各遺伝子型の宿主特性は細胞内でのウイルスの増殖温度特性と一致し，温水魚由来の RGNNV 型は 25 ~ 30°C に，冷水魚由来の BFNNV 型は 15 ~ 20°C にそれぞれ至適増殖温度を有する [12, 13]。また抗血清による交差中和反応試験により，これらの 4 遺伝子型は 3 つの血清型，すなわち SJNNV 型が血清型 A，TPNNV 型が血清型 B，そして RGNNV 型と BFNNV 型は同じ血清型 C に分類されている [18]。本病のワクチン開発においてこれらの遺伝子型と血清型解析は重要な知見となった。

3. マハタ VNN のワクチン開発

1) マハタ養殖と VNN の被害

マハタ *E. septemfasciatus* はスズキ目ハタ科マハタ属に属する大型のハタ科魚類で，成魚は 1 m 以上になる。漁獲量が少なく幻の高級魚と呼ばれるマハタは，アジア諸国においても高い需要があることから，国際的競争力を有する次世代養殖魚種として着

目されている。マハタ種苗は，従来，天然種苗に依存してきたためその安定供給に問題があったが，近年，(独)水産総合研究センターや県の水産研究機関で人工種苗の大量生産技術が開発されたことにより，人工種苗によるマハタ養殖の道が切り開かれた (図 3)。現在，国内において年間で推定 50 万尾以上の種苗生産が可能と考えられる。

マハタが順調に成長する水温は 16 ~ 27°C であり，マダイやブリ養殖が可能な西日本の暖水海域であれば，マハタの養殖が可能である。本種の種苗生産は，水温 20°C 前後の 5 ~ 6 月に採卵と人工授精が行われ，約 3 か月間陸上水槽で殺菌海水を用いて仔稚魚を飼育した後，8 ~ 9 月に魚体重約 10 ~ 20 g のサイズで海面生け簀での中間育成に移る。養成は秋から年明けにかけて約 30 ~ 100 g の魚で開始され，市場への出荷は 2 ~ 4 年育成された 1.5 ~ 3.0 kg サイズが主な対象となる。マハタの卸値は 2000 ~ 3000 円/kg であり，マダイ (同 700 ~ 800 円/kg) やブリ (同 650 ~ 800 円/kg) に比較してかなり高価である。

本種の安定養殖生産を阻む最大の要因は，中間育成期と養成期を通じて発生する VNN である。罹病魚は腹部を上にした異常遊泳をすることから「転覆病」とも呼ばれている (図 4)。国内でのマハタ養殖は他のハタ類同様に緒についたばかりであるため，その正確な生産量や魚病被害量を把握することは難しいが，種苗生産場や養殖場での聞き取り調査によるとマハタにみられる疾病の中では VNN に因る被害が例年最も多い。累積死亡率が 50% 以上に達する例も認められている。

前述のように，陸上施設で育成されたウイルス・フリーのマハタ稚魚を高水温期に海面生け簀で中間育成すると，高頻度に VNN が発生しかつその際の死亡率は極めて高い。感染源がベータノダウイルスに不顕性感染している野生魚であると考えられるた

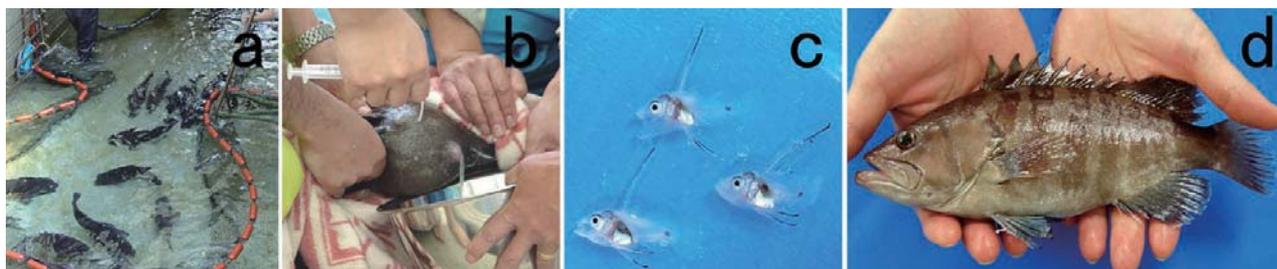


図 3 マハタの種苗生産 (a)親魚の取り上げ (b)採卵 (c)仔魚 (d)中間育成魚 (写真の一部は森広一郎博士提供)。



図4 腹部膨満と異常遊泳を特徴とするVNN罹病マハタ。

め、この水平感染を遮断することは困難である。VNNの発生は水温が低下する冬期に一度は終息するものの、越年漁で再びVNNの発生が見られ、経済的損失を被っている。マハタ養殖の生産性を高め、安定養殖を実現させるためには、VNNに有効なワクチンの開発が不可欠といえる。

2) ワクチンの種類

国内の既承認水産用ワクチンはすべて「不活化ワクチン」であり、遺伝子組換えタンパク質ワクチンや生ワクチン、あるいはDNAワクチンに対する認可の壁は強固である。そこでマハタVNNワクチン開発という喫緊の産業的要請に最速で答えるには、まずワクチンの種類の選定が鍵となる。

農水省のプロジェクト研究が開始される前に、マハタVNNのワクチン候補として、ウイルス外被タンパク質遺伝子(RNA2)を用いた大腸菌発現タンパク質抗原および不活化ウイルス抗原の2種類の有効性が報告されていた[28, 33]。いずれの抗原もマハタに注射接種すると中和抗体の産生とともに人為感染に対して優れた防御能が誘導される。ワクチンの商業的展開を念頭に置いた場合、認可の困難さは別にして、大量に安価に製造が可能である発現タンパク質抗原はワクチン候補として最有力である。しかし、この発現タンパク質抗原は1回の接種では不十分でブースター接種が必要である点に難があった。ヒトや陸上動物の世界ではブースター接種が珍しくないものの、1度の接種作業で数万~十万尾を扱う魚類養殖現場では、複数回の接種作業とその経費は経営体にとって大きな負担となる。この点、1回の接種で十分な防御能が付与される不活化ウイルス抗

原が実用性において優れており、最終的に不活化ウイルス抗原が選定された。

一方、チャイロマルハタ *E. coioides* 仔魚において大腸菌発現ウイルスタンパク質や不活化ウイルス抗原を用いた浸漬や経口投与の有効性を示す報告もある[15, 16]。経口法は魚類の大量免疫処理法として理想的と言えるが、一般的には経口投与は胃における消化と腸からの吸収効率に問題があるためその免疫付与効果において注射投与に劣るとされている。しかし、さらに実用化に向けて詳細な検討が行われれば、将来、経口VNNワクチンが開発される可能性も高い。なお、その他のVNNワクチン候補として有効性が報告されているものに、バキュロウイルス発現系を使って作製されたウイルス様粒子(virus-like particles)がある[17, 30]。

3) ワクチン株の選定、培養条件およびウイルスの不活化

多くの海産養殖魚種で問題となり高水温期に頻発するVNNは、遺伝子型RGNNV(血清型C)によって引き起こされると推定されている。この点を確認するため、過去12年間(1995~2006)にわたってマハタおよびその他の温水魚から分離されたベータノダウイルス計369株についてそれらの遺伝子型と血清型を解析したところ、すべてが遺伝子型RGNNVで血清型Cであった。そこで、愛媛県下でマハタ病魚から分離された同遺伝子型に属するSGE-hi00株がワクチン株候補として選定された(図5)。この株のマハタ稚魚に対する病原性は約 10^3 PFU/

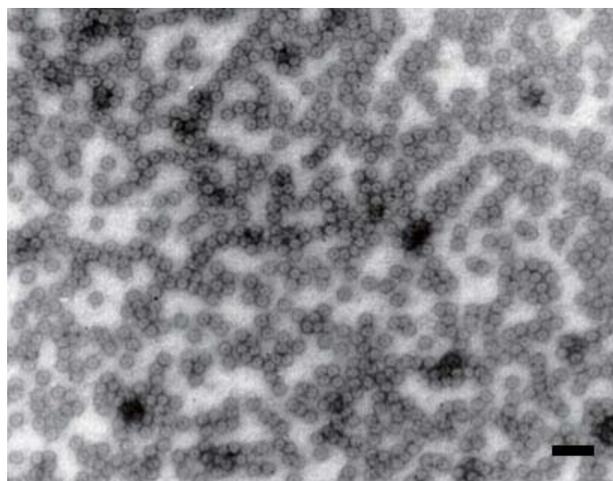


図5 純化されたベータノダウイルス(RGNNV), bar = 100 nm (写真提供 森 広一郎博士)。

尾（腹腔内接種）と強毒性であった。

不活化ワクチン作製では大量の抗原が必要となるためにウイルス培養方法が課題となる。ベータノダウイルスを培養する細胞としては数種類が知られているが、その中でE-11細胞 [13] が選定された。この細胞はSSN-1細胞系 [8] から1種類の細胞としてクローン化されたもので、複数の細胞種からなるSSN-1細胞系の持つ培養ならびにCPEの不安定性を克服するとともに、優れたウイルス増殖支持性を有する。実験室レベルでは、E-11細胞を用いて30°CでSGEhi00株を培養すると、96時間で最高 10^{11} PFU/mlにも達する。他の魚類ウイルスの培養細胞での増殖性をみるとせいぜい 10^9 PFU/mlどまりであることからみて、E-11細胞とこのウイルス株の組み合わせによるウイルス培養方法は、ワクチンの実用化にとって有利なものであった。

続く課題は不活化の方法になる。ベータノダウイルスは種々の物理化学的变化に強く、ウイルスの不活化剤として汎用されるホルマリンに対しても他のウイルスに比べ抵抗性が強い [2]。種々の濃度と反応温度・時間について検討した結果 [33]、ホルマリン濃度0.5%で4°C・10日間の処理が免疫原性に影響しない不活化条件として見出された。

これらの知見を基に、製薬会社における製造レベルでの調製方法が繰り返し検討され、試作ワクチンが作製された。この試作ワクチンは以後の安全性試験や臨床試験等に利用され、その成績は製造販売承認申請に利用されることとなった。本ワクチンの製造方法については2004年に特許出願し、特許権が取得されている（「ワクチンの調製方法、および予防方法」特許第4542368号）。

4) ワクチンの用法、用量および安全性

水産用注射ワクチンの接種部位としては筋肉内か腹腔内かの選択となる。少数の魚を対象とした試験研究ではどちらの部位でも安全性および有効性には差がないとの結果が得られた。しかし、大量の魚を短時間で処理する必要がある現場では、筋肉内注射では液漏れの恐れや注射針に刺さった鱗が重なって接種不良を招くため、確実性と作業性の高い腹腔内接種が採用された。

VNNワクチンの安全性を確認するために、マハタを用いてGLP（Good Laboratory Practice）適用

試験を行った。まず、試験開始前に予備的にマハタ（平均体重約7g）に対して墨汁を用いた接種を行い、接種部位および注射針のサイズの検討ならびに液漏れおよび消化管内への誤接種の有無を確認した。基本的な接種方法が確定したのち、GLP適用試験としてワクチンの適用量群、高用量群を設定し、臨床観察、増体率や血液学的性状等の調査項目について対照群と比較した。その結果、本ワクチンの適用量単回腹腔内投与はマハタに対する安全性に問題はないと判断された。本ワクチン（マハタウイルス性神経壊死症不活化ワクチン）の「用法および用量」や「使用上の注意」については農林水産省動物医薬品検査所の医薬品等データベースを参照されたし（http://www.nval.go.jp/asp/asp_dbDR_idx.asp）。

5) 中和抗体価を利用したワクチンの有効性評価

本ワクチンの有効性の評価にはマハタ血清のウイルス中和抗体価（ ND_{50} ）を指標とすることが出来る。今回承認されたVNNワクチンはこのウイルス中和試験が国家検定に採用されており、本邦の水産用医薬品の検定基準としては初めてのことである。

本ワクチンの開発過程において、攻撃後の生残率の他に免疫魚の血清の ND_{50} を用いてワクチンの有効性評価が進められた。マハタに投与するウイルス抗原量を増加させると、投与抗原量依存的に攻撃試験後の生残率が上昇し、また ND_{50} もそれと平行して上昇した。これら投与抗原量、生残率、 ND_{50} の値に相関性が認められたことから、本ワクチンの有効性評価には、マハタ血清の ND_{50} を以て攻撃試験の代替とすることが可能と考えられた。条件を一定にした室内試験において、種々の抗原量で免疫したマハタを二濃度のウイルスで攻撃し、対照群に比較していずれも有意に生残率が改善された例を確認した結果（Fisherの直接確率計算法）、 ND_{50} が115以上あればマハタに十分な免疫効果をもたらす有効なワクチンであるという判定基準が採用された。付け加えて言うならば、本ワクチンは ND_{50} 値と免疫有効率（relative percent survival: RPS）についても強い相関性が認められた。RPSはワクチンの有効性の評価の一つとして知られ、RPS値が60%を越えると効果が高いとの評価基準がある [1]。 ND_{50} 値が100以上で有意差が（ $p < 0.05$ ）、さらに200以上であればRPSが60%を越えるとの結果が得られてい

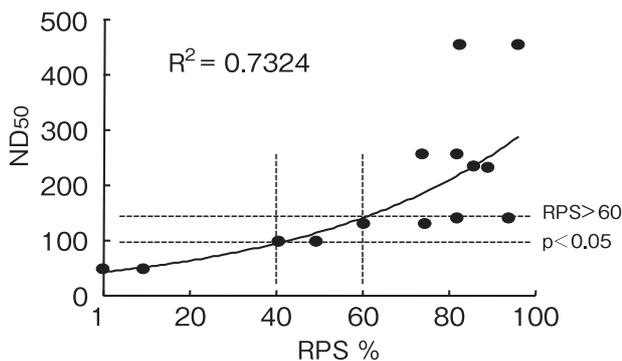


図6 ウイルス中和抗体価 (ND₅₀) と免疫有効率 (RPS)。Yamashita *et al.* (2009b) [34] を一部改変。

る (図6) [34]。

これまでの水産用ワクチンの有効性評価は、その殆どが人為感染に対する試験魚の生残率に基づいている。しかし攻撃試験による有効性評価は、宿主要因や環境要因に加えて攻撃ウイルス量の多寡が感染防御成績に影響し、試験者の経験への依存度が大きい。また、攻撃作業、攻撃後の観察期間における人と飼育水槽の割り当てを行わねばならない。このような点を鑑みると、国家検定のような試験において安定した評価を得るためには *in vitro* 評価系が望ましい。VNN ワクチンの場合、マハタは SPF 種苗を試験魚に用いることが出来、免疫誘導期間の飼育と採血だけで良い。ウイルス中和試験は血清を必要量確保すれば再試験も容易である。

6) 野外における臨床試験

本プロジェクト研究の最終段階として、GCP (Good Clinical Practice) 省令に準拠した臨床試験を愛媛県内と三重県内の計5漁場で実施した (図7)。



図7 VNN ワクチン臨床試験におけるマハタへのワクチン接種の様子 (愛媛県)。

マハタ人工種苗を試験魚として供試し、試験群にはワクチンを接種し、対照群は無接種とした。試験魚は陸上水槽で3週間飼育後、愛媛県内の漁場 A, B, C, そして三重県内の漁場 D, E の合計5箇所の漁場に振り分けられ、VNN の流行を調べると共にワクチンの安全性と有効性を調査した。観察期間の終了はVNN が終息すると考えられる11月末ないし12月初旬とした。

その結果、ワクチン接種後3週間 (陸上水槽飼育期間) においてワクチン投与を起因とする異常は認められなかった。また、海面生け簀に冲出した後も、ワクチンに起因する臨床症状や一般状態の異常は認められなかったことから、ワクチンの安全性について問題はないと考えられた。試験魚の平均増体重 (試験開始時と終了時の平均体重の差) がいずれの漁場においても試験群は対照群と同等もしくはそれ以上の数値であったことから、本ワクチンは生産性にも悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。

今回の臨床試験では、いずれの漁場においてもVNN の自然発生が見られ、試験群は対照群と比較して有意に死亡率が低いことが認められた (図8)。死亡魚の診断では、死因の一部としてハダムシ症や人為的な作業上のストレスあるいは弱小個体の脱落などが含まれているものの、殆どはVNN による死亡であった。VNN の発生は、冲出し後9週間の全期間にわたって認められ、高水温期に死亡尾数が多く、水温が低下する観察期間の後半にかけて終息した。以上のことから、GCP 適用下で本ワクチンの有効性が確かめられたと結論付けた。なお、漁場 A ~ E のRPS はそれぞれ43, 33, 17, 65, 53%となった。RPS の評価基準としては低い値もあるが、臨床試験では目的とする疾病の流行の強弱 (病勢) が不明であり、また環境や宿主動物の条件が室内試験のように制御できないことから実質のワクチン効果が現れ難いことに起因すると考えられる。

7) ワクチンの使用形態

養殖現場での使用を念頭において、本ワクチンによるマハタの免疫スケジュールを再整理してみる。本ワクチンに期待される効果は、マハタ種苗を海面生け簀へ収容する前に十分な免疫を付与し、VNN による死亡を減じることにある。

変温動物である魚類の免疫応答は水温の影響が顕

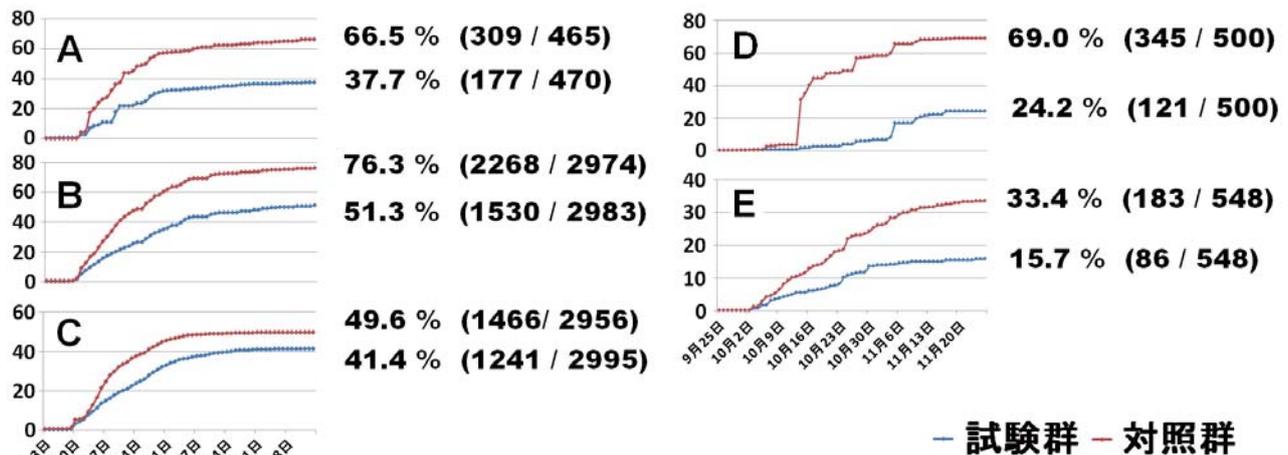


図8 VNN ワクチン臨床試験における5漁場の死亡尾数及び死亡率。

A, B, C は愛媛県内, D, E は三重県内の漁場を示す。数字は、累積死亡率（累積死亡尾数 / 沖出し時の収容尾数）。いずれの漁場においても試験群（青線）と対照群（赤線）の死亡尾数の間に有意な差が認められた（ χ^2 乗検定）。

著である。マハタのような温水魚では一般的に 10°C 以下では抗体産生が抑制され、逆に冷水魚であるサケ科魚類は 5°C でも十分な抗体産生能が認められる。マハタの VNN は日中の水温が 25°C を越えると頻発し [10]、これは RGNNV の増殖至適温度が $25 \sim 30^{\circ}\text{C}$ であることと符合する。しかし、マハタはハタ類の中ではクエ *E. bruneus* などと比べてやや低い水温（飼育至適水温：約 20°C ）に適応している魚種であり、抗体産生能力は 25°C より 20°C で高いことからみて、 25°C を越える水温での VNN 多発にはマハタの免疫応答能力の低下が関与していると推測される。 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ 水温下で不活化ワクチンを接種すると、2 週間程度で中和抗体の産生が始まり 4～7 週間でピークとなって、抗体産生能力はその後 10 週間以上高いレベルで持続する [33]。

陸上施設で孵化させ殺菌海水で飼育されたマハタ種苗は、8 月下旬から 9 月上旬に $10 \sim 15\text{g}$ サイズの稚魚となる。これはワクチン接種作業に適当な手のひらサイズであり、尚且つこの時期の飼育水温はマハタの抗体産生に適する $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ の範囲に収まる。ワクチン接種後、マハタ稚魚を約 3 週間ウイルス・フリーの環境で飼育し、十分な抗体価の上昇を待ってから海面生簀に収容する。もし 9 月にマハタ稚魚を無処理の状態では海面生簀に収容するならば、ほぼ例外なく 1～2 週間で VNN が発生する。従って、本ワクチンはこの時期の VNN 感染によるマハタ稚魚の死亡を低減させることが主たるねらいとなる。付け加えるならば、本ワクチンの効果は VNN によ

る死亡を減じるだけではない。VNN に高い感受性を示すマハタ稚魚を高水温期に海面生け簀に収容することによって、①陸上施設での維持にかかる経費を減らし、②潮通しの良い広いスペースで飼育することで成長増進を図り、③疾病発生時の食欲減退を解消することができる。すなわち、マハタの増体率の改善や出荷時期におけるサイズの大型化に繋がる効果が期待出来る。なお、マハタに付与された免疫効果が、水温低下する冬期を経て、翌年の高水温期まで持続するかどうかは今のところ不明である。今後の検証が待たれる。

8) VNN を含むウイルス病予防における新たな挑戦

本ワクチンは十分な免疫が成立するまでに 3 週間程度の期間を要するため、当該期間においては VNN 発生海域への移動を避けることが使用上の注意として記載されている。種苗生産施設にとって、陸上施設で継続して飼育すること、また接種と生け簀への導入の作業が二度に分かれることは負担と考えられる。そこでこの対応策として、弱毒性アクアビルナウイルス (ABV) を利用することを考えた。すなわち、ABV ゲノムのような二本鎖 RNA はインターフェロン誘導能力が優れており、しかも感染から短時間 (1 日以内) で魚は抗ウイルス状態となるという利点がある。ただし、その抗ウイルス状態の持続期間は比較的短い (2～3 週間程度)。ここで使用した ABV はヒラメ病魚 (稚魚) から分離されたものであったが、マハタに対して致死的病原性は

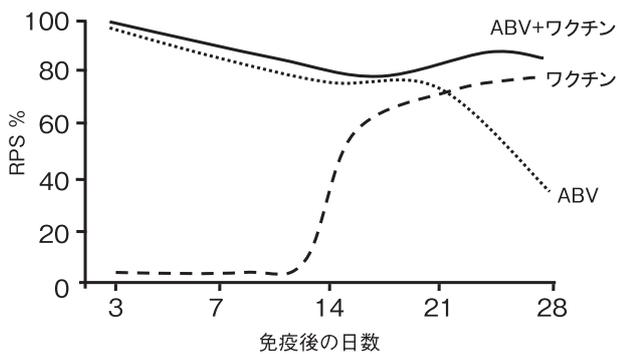


図9 マハタにおけるアクアビルナウイルス (ABV) と VNN 不活化ワクチンの同時接種による免疫効果。Yamashita *et al.* (2009a) [35] に基づき作図。

ない。ABV 単独接種区、不活化ワクチン単独接種区、ABV と不活化ワクチンの同時接種区、それに対照区を設定し、それらを接種後 3 日、7 日、14 日、21 日および 28 日目に RGNNV ウイルスで攻撃した。図 9 に示したように、ABV 単独区は 3～21 日目の攻撃に対して強い防御力を有したが、28 日目の攻撃に対してはそれが低下した。不活化ワクチン単独区では、14 日目の攻撃から認められた防御能は 28 日目も持続した。これらに対し ABV と不活化ワクチンを同時に接種した場合は、3～28 日目のいずれの攻撃に対しても強い防御力を発揮した。すなわち、ABV が誘導する抗ウイルス活性を有するインターフェロン関連タンパク質による非特異的防御とワクチンが誘導する中和抗体による特異的防御が互いの欠点を補いあい、即効性かつ持続性を併せ持つことになる。弱毒性 ABV が使用可能となれば、不活化ワクチン接種後速やかに海面生簀に魚を収容でき、理想的な免疫処理方法であると言えよう [35]。

9) ワクチンの市場性

ワクチンの市場性を論じるにあたって、まず、VNN による被害が大きな問題となっているハタ類に目を転じてみる。ハタ類は、英名 grouper、中国語圏では石斑魚という呼称を持ち、中国、台湾及び華僑の文化が根付く東南アジア諸国では、中華料理の高級魚としての位置づけをもつ。消費は 600～700 g のプレートサイズ (尾頭付きで 1 尾のせ) が主流で、魚種にもよるが kg 単価はおよそ 800～1200 円で取引され、これは現地物の物価を考えれば決して安い値段ではない。当然のことながら、これらの国々では養殖魚種としてハタ類の重要度は高い。出荷時のサイズは日本より小さいことから、日本の

ハタ類養殖に比較して出荷サイクルが早く、かつ熱帯・亜熱帯性気候の利点も加わって、年 2 回出荷されるケースもみられる。台湾などでは、種苗生産業者、中間育成業者、出荷サイズまで育成する業者など、成長のステージにおいて分業体制が進み、国が輸出をバックアップする姿勢も見える。これらの国々では、日本で養殖されるハタ類とは異なり、南方系のハタ類を目にすることが多い。アカマダラハタ *E. fuscoguttatus*、タマカイ *E. lanceolatus*、チャイロマルハタ、ヤイトハタ *E. malabaricus*、スジアラ *Plectropomus leopardus*、サラサハタ *Clomileptes altivelis*、またハイブリッド種 (アカマダラハタ×タマカイ) などである。

日本国内で養殖魚種として着目されるハタ科魚類にはマハタの他にクエ、キジハタ、スジアラ、チャイロマルハタ、ヤイトハタがある。これらの中でも近年有望視されているのはクエである。台湾や中国南部でもクエは人気魚種の一つである。クエはマハタに比べてより高水温を好み国内では成長が遅いことから、人工種苗を基にしたクエ養殖の着手はマハタにやや遅れを取っていた感がある。しかし、クエの知名度や市場価格はマハタよりも高く、クエ養殖の広がりを示す動きが最近伝わってくるようになった。クエの種苗生産尾数は国内で年間 50 万尾に達していると推定されている。クエの種苗生産と人工種苗を基にした出荷までの養殖過程はマハタとよく似ており、マハタと同様に今後の普及が期待される高級養殖魚種といえるだろう。前述のようにハタ類は国際的競争力を持つ魚であることから、近い将来、国産ハタ類の海外輸出がビジネスとして成立する日が来るかもしれない。

さて、これらハタ類の種苗生産施設および養殖施設において、国を問わず大きな問題となっているのが VNN である。興味深いことに、流行株は遺伝子型 RGNNV (血清型 C) に限られる。今後の展開に期待がかかるクエも遺伝子型 RGNNV に感受性の高い魚種であり、クエの海面養殖でも VNN 対策は避けては通れない。本ワクチンがクエに対してもマハタ同様に有効であることは既に確かめられている。

また、世界的にはハタ類以外の海産養殖魚種にも VNN による被害が報告されている。アジアスズキはアジア圏においてハタ類と同様に高価な養殖魚種の一つであるが、同じく遺伝子型 RGNNV による

被害が報告されている。アジアズキに対する本ワクチンの安全性と有効性は、フィリピンとタイで実施した試験により明らかにされた。ヨーロッパズキは地中海地域での主要養殖魚種であり、これもRGNNVの感染による被害が甚大である。さらには、BFNNVはRGNNVと同じ血清型Cであることから、本VNNワクチン（遺伝子型RGNNV・血清型C）は大西洋オヒョウや大西洋タラなどの冷水魚に対しても同様の効果が期待できる。養成期に発生するVNNはRGNNVかBFNNVのどちらかであるので、本ワクチンが適用できる魚種範囲は広い。これまで魚類ワクチンとしては、世界的にはサケ・マス類、日本ではブリ、マダイ、ヒラメといった大規模生産魚種に限ってその市場価値が認められてきた。この点、VNNワクチンは魚種と地域を越えて広い市場性をもつと言えよう。

市場価格が低迷する中で餌料や燃料などの諸経費が上昇し、これに病気の発生が追い打ちをかけ、海産魚の養殖業の将来は明るくない。この低迷を脱却する方策のひとつが市場価値の高い養殖魚種の開拓である。日本のみならず、韓国、中国、台湾と東南アジア各国で高い市場価値をもつハタ類の大量生産の成否は、海産魚養殖業の今後の発展の試金石となるであろう。その行く手を阻むVNNを克服する鍵は、養殖現場でのVNN不活化ワクチンの評価にかかっている。

参考文献

- Amend, D. F. 1981. Potency testing of fish vaccines. *Dev. Biol. Standard.* **49** : 447-454.
- Arimoto, M., Sato, J., Maruyama, K., Mimura, G. and Furusawa, I. 1996. Effect of chemical and physical treatments on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Aquaculture* **143** : 15-22.
- Ball, L. A. and Johnson, K. L. 1998. Nodaviruses of insects. pp. 225-267. *In* : The Insect Viruses (Miller, K. L. and Ball, L. A. eds.), Plenum, New York.
- Bigarre, L., Cabon, J., Baud, M., Heimann, M., Body, A., Lieffrig, F. and Castric, J. 2009. Outbreak of betanodavirus infection in tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), in fresh water. *J. Fish Dis.* **32** : 667-673.
- Bloch, B., Gravningen, K. and Larsen, J. L. 1991. Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. Aquat. Org.* **10** : 65-70.
- Breuil, G., Bonami, J. R., Pepin, J. F. and Pichot, Y. 1991. Viral infection (picorna-like virus) associated with mass mortalities in hatchery-reared sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture* **97** : 109-116.
- Chi, S. C., Shieh, J. R. and Lin, S. J. 2003. Genetic and antigenic analysis of betanodaviruses isolated from aquatic organisms in Taiwan. *Dis. Aquat. Org.* **55** : 221-228.
- Frerichs, G. N., Rodger, H. D. and Peric, Z. 1996. Cell culture isolation of piscine neuropathy nodavirus from juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *J. Gen. Virol.* **77** : 2067-2071.
- Glazebrook, J. S., Heasman, M. P. and de Beer, S. W. 1990. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis.* **13** : 245-249.
- Fukuda, Y., Nguyen, H. D., Furuhashi, M. and Nakai, T. 1996. Mass mortality of cultured seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, associated with viral nervous necrosis. *Fish Pathol.* **31** : 165-170.
- Iwamoto, T., Mise, K., Mori, K., Arimoto, M., Nakai, T., Okuno, T. 2001. Establishment of an infectious RNA transcription system for *Striped jack nervous necrosis virus*, the type species of the betanodavirus. *J. Gen. Virol.* **82** : 2653-2662.
- Iwamoto, T., Mori, K., Arimoto, M. and Nakai, T. 1999. High permissivity of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.* **39** : 37-47.
- Iwamoto, T., Nakai, T., Mori, K., Arimoto, M. and Furusawa, I. 2000. Cloning of the fish cell line SSN-1 for piscine nodaviruses. *Dis. Aquat. Org.* **43** : 81-89.
- Iwamoto, T., Okinaka, Y., Mise, K., Mori, K., Arimoto, M., Okuno, T. and Nakai, T. 2004. Identifica-

- tion of host-specificity determinants in betanodaviruses by using reassortants between striped jack nervous necrosis virus and sevenband grouper nervous necrosis virus. *J. Virol.* **78** : 1256–1262.
15. Kai, Y. H. and Chi, S. C. 2008. Efficacies of inactivated vaccines against betanodavirus in grouper larvae (*Epinephelus coioides*) by bath immunization. *Vaccine* **26** : 1450–1457.
 16. Lin, J. H. Y., Chen, M. S. and Yang, H. L. 2007. An oral nervous necrosis virus vaccine that induces protective immunity in larvae of grouper (*Epinephelus coioides*). *Aquaculture* **268** : 265–273.
 17. Liu, W., Hsu, C. H., Chang, C. Y., Chen, H. H. and Lin, C. S. 2006. Immune response against grouper nervous necrosis virus by vaccination of virus-like particles. *Vaccine* **24** : 6282–6287.
 18. Mori, K., Mangyoku, T., Iwamoto, T., Arimoto, M., Tanaka, S. and Nakai, T. 2003. Serological relationships among genotypic variants of betanodavirus. *Dis. Aquat. Org.* **57** : 19–26.
 19. Mori, K., Mushiake, K. and Arimoto, M. 1998. Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.* **33** : 443–444.
 20. Mori, K., Nakai, T., Muroga, K., Arimoto, M., Mushiake, K. and Furusawa, I. 1992. Properties of a new virus belonging to Nodaviridae found in larval striped jack (*Pseudocaranx dentex*) with nervous necrosis. *Virology* **187** : 368–371.
 21. Mori, K., Nakai, T., Nagahara, M., Muroga, K., Mukuchi, T. and Kanno, T. 1991. A viral disease in hatchery-reared larvae and juveniles of redspotted grouper. *Fish Pathol.* **26** : 209–210.
 22. Munday, B. L., Kwang, J. and Moody, N. 2002. Betanodavirus infections of teleost fish : a review. *J. Fish Dis.* **25** : 127–142.
 23. 虫明敬一・有元 操. 2000. シマアジのウイルス性神経壊死症 (VNN) に関する防除対策. 栽培技研 **28** : 47–55.
 24. Nishizawa, T., Furuhashi, M., Nagai, T., Nakai, T. and Muroga, K. 1997. Genomic classification of fish nodaviruses by molecular phylogenetic analysis of the coat protein gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **63** : 1633–1636.
 25. Nishizawa, T., Mori, K., Furuhashi, M., Nakai, T., Furusawa, I. and Muroga, K. 1995. Comparison of the coat protein genes of five fish nodaviruses, the causative agents of viral nervous necrosis in marine fish. *J. Gen. Virol.* **76** : 1563–1569.
 26. Oliveira, J. G., Souto, S., Dopazo, C. P., Thiéry, R., Barja, J. L. and Bandin, I. 2009. Comparative analysis of both genomic segments of betanodaviruses isolated from epizootic outbreaks in farmed fish species provides evidence for genetic reassortant. *J. Gen. Virol.* **90** : 2940–2951.
 27. Sano, M., Nakai T. and Fijan N. 2011. Viral diseases and agents of warmwater fish. pp.166–244. In : Fish Diseases and Disorders, Vol. 3 : Viral, Bacterial and Fungal Infections, 2nd ed. (Woo P.T.K. and Bruno D.W. eds.), CABI, London.
 28. Tanaka, S., Mori, K., Arimoto, M., Iwamoto, T. and Nakai, T. 2001. Protective immunity of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* Thunberg, against experimental viral nervous necrosis. *J. Fish Dis.* **24** : 15–22.
 29. Thiéry, R., Cozien, J., de Boisseson, C., Kerbart-Boscher, S. and Nevarez, L. 2004. Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggest a low host-fish species specificity. *J. Gen. Virol.* **85** : 3079–3087.
 30. Thiéry, R., Cozien, J., Cabon, J., Lamour, F., Baud, M. and Schneemann, A. 2006. Induction of a protective immune response against viral nervous necrosis in the European sea bass *Dicentrarchus labrax* by using betanodavirus virus-like particles. *J. Virol.* **80** : 10201–10207.
 31. Thiéry, R., Johnson, K. L., Nakai, T., Schneemann, A., Bonami, J. R., Lightner, D. V. 2011. Family Nodaviridae. pp.1061–1067. In : Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (King A. M. Q., Adams M. J., Carstens E. B. and Lefkowitz E. J. eds.), Elsevier Academic Press, London.
 32. 土橋靖史・栗山 功・黒宮香美・柏木正章・吉

- 岡 基. 2002. マハタ種苗生産におけるウイルス性神経壊死症 (VNN) の防除対策の検討. 水産増殖 **50** : 355-361.
33. Yamashita, Y., Fujita, Y., Kawakami, H. and Nakai, T. 2005. The efficacy of inactivated virus vaccine against viral nervous necrosis (VNN). *Fish Pathol.* **40** : 15-21.
34. Yamashita, H., Mori, K., Kuroda, A. and Nakai, T. 2009b. Neutralizing antibody levels for protection against betanodavirus infection in sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg), immunized with an inactivated virus vaccine. *J. Fish Dis.* **32** : 767-775.
35. Yamashita, H., Mori, K. and Nakai, T. 2009a. Protection against viral nervous necrosis conferred by simultaneous inoculation of aquabirnavirus and inactivated betanodavirus in the sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* (Thunberg). *J. Fish Dis.* **32** : 201-210.
36. Yoshikoshi, K. and Inoue, K. 1990. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.* **13** : 69-77.

研修者・見学者受け入れ状況 (平成 23 年 4 月から平成 24 年 3 月)

来所日・期間		所属機関・人数		研修・見学内容
平成 23 年	8 月 26 日	帯広畜産大学基礎獣医学研究部門	1 名	施設見学
	10 月 25 日～10 月 26 日	広島県西部家畜保健衛生所	1 名	抗体検査技術習得
平成 24 年	2 月 29 日～3 月 2 日	長野県伊那家畜保健衛生所	1 名	抗体検査技術習得
	3 月 5 日～3 月 9 日	国立大学法人 東京農工大学	1 名	学外実習
	3 月 12 日～3 月 14 日	マルイ農協ファーム	1 名	原虫継代技術習得



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和 30 年 9 月 1 日創刊(隔月 1 回発行)
 (通巻 575 号) 平成 24 年 6 月 25 日印刷 平成 24 年 7 月 1 日発行(第 58 巻第 4 号)
 発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町 9 丁目 2221 番地の 1
 TEL : 0428(33)1056(企画学術部) FAX : 0428(33)1036
 発行人 林 志鋒
 編集室 委員/堤 信幸(委員長), 大嶋 篤, 山下 龍
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)