

2009. 12

特集号



(題字：相良祐輔学長)

# 国立大学法人 高知大学学報

## 高知大学学位授与記録第三十七号

総務課広報室発行

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、高知大学学位規則第15条に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

\*\*\*\*\*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*  
 \*\*\*\*\*

# 高知大学学報

本学は、次の者に博士（学術）の学位を授与したので、学位規則（昭和28年文部省令第9号）第8条の規定に基づき、その論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

## 目 次

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
甲黒博第11号	MOHD.EFFENDI BIN WASLI	Ecological study on soils and vegetation of fallow lands under shifting cultivation in Sarawak, Malaysia. (マレーシア・サラワク州の集約化された焼畑農業における休閑地の植生と土壌肥沃度)	1

学位記番号	氏 名	学 位 論 文 の 題 目	ページ
乙総黒博第1号	新元 一	<b>Phenotypic diversification of infectious red seabream iridovirus and vaccine development</b> (感染性マダイイリドウイルスの形質の多様化解析とワクチンの開発)	8

ふりがな 氏名（本籍） 学位の種類 学位記番号 学位授与の要件 学位授与年月日 学位論文題目	モハマド エフェンディ ビン ワスリ MOHD EFFENDI BIN WASLI（マレーシア） 博士（学術） 甲黒博第11号 学位規則第4条第1項該当 平成21年9月18日 Ecological study on soils and vegetation of fallow lands under shifting cultivation in Sarawak, Malaysia. (マレーシア・サラワク州の集約化された焼畑農業における休閑地の植生と土壌肥沃度)
発表誌名	Wasli, M.E., Tanaka, S., Kendawang, J.J., Seman, L., Unang, B., Lat, J., Abdu, A., Morooka, Y. & Sakurai, K. 2009. Vegetation condition and soil fertility of fallow land under intensified shifting cultivation systems in Sarawak, Malaysia. TROPICS, 18
	審査委員 主査 助 教 田中 壮太 副査 教 授 諸岡 慶昇 副査 教 授 大谷 和弘

論文の内容の要旨

It is widely recognized that shifting cultivation systems in the tropical regions require fallow with sufficiently long duration as the indispensable component to allow lands after cropping to recover its fertility as well as to control weed and disease infestation during the cropping phase. As the consequence of the current socioeconomic conditions including increasing population pressure, changes in land tenure and declines in labor availability, the shifting cultivation systems are undergoing significant alternation, that is, intensification of the systems with a reduction of the fallow period as well as increasing duration of cropping. Chemical fertilizers and agrochemicals are often applied to compensate the function of fallow.

In Sarawak, Malaysia, shifting cultivation is widely practiced by various groups of native peoples to produce various types of crops for their daily subsistence. Among the natives, the Iban people accounts for 29.1% of Sarawak's total population. The traditional shifting cultivation practices of the Iban were mostly conducted in fallow lands with relatively old ages or natural forests with one or two years cropping. However, with the alternation of socioeconomic conditions during the last few decades, as in the other tropical regions, their traditional shifting cultivation practices have been changing into more intensive land use systems. In spite of increasing importance of cash crop farming i.e. pepper and rubber due to their needs of cash income, they still continue to produce upland rice for their subsistence with the intensified shifting cultivation. As the results, in order to save labor and time, the fields for shifting cultivation tend to be located around cash crop farming fields which are located close to the residence, roadsides or riversides. Such allocation of farmlands also causes

## 論文の内容の要旨

intensification in shifting cultivation practices due to limited area used for farming. Although some researchers had claimed that intensified shifting cultivation systems would lead to land degradation, still limited information has been verified from the ecological viewpoint. The main objective of this study is to clarify the changes in fallow ecosystems and their functions with alteration of shifting cultivation practices of the Iban people in Sarawak, Malaysia (Fig. 1). For this purpose, 4 topics were studied as follows:

### **1) Vegetation conditions and soil fertility status of fallow lands under traditional shifting cultivation practices by the Iban - special reference to their traditional method in selecting sites for upland rice farming**

In this topic, soils and vegetation of fallow lands under a traditional form of the shifting cultivation practices were studied with special reference to the farmer's traditional knowledge to select suitable sites for farming with shifting cultivation. The study sites were established in the Mujong River region, where a rather traditional type of the shifting cultivation still maintained with a longer fallow period. It was revealed that when selecting sites for upland rice farming, the Iban comprehensively observed the vegetation condition of the fallow lands; in the early stages of fallow, lands were frequently dominated by plants that they perceived as indicating infertile soils (for example *Imperata cylindrica* and *Melastoma polyanthum*), and, therefore, were omitted from the candidate for farming. At the later stages of fallow, the farmers investigated the stem diameter of trees and selected sites with well recovering tree growth for the farming practices, which would provide sufficient amounts of ash at burning time as plant nutrients. Furthermore, the N availability of soils in fallow forests with well growing vegetation was higher than those with poor vegetation condition. It is suggested that N mineralization of soils in the well growing fallow lands could be induced rapidly and plentifully through burning practices. Thus, the traditional site selection method of the Iban based on the knowledge on vegetation condition was found reasonable and appropriate in supplying nutrients to rice plants through burning practices to achieve adequate rice production.

### **2) Vegetation condition and soil fertility of fallow land under continuous cropping and short fallow shifting cultivation systems in Sarawak, Malaysia**

In Lubok Antu and Engkari River areas where more intensified shifting cultivation was conducted compared with Mujong River area, vegetation condition and soil fertility of fallow lands were studied with special reference to the rationality of the farmer's traditional knowledge on the site selection. The shortened fallow periods with extensive cropping periods in the current shifting cultivation practice has lead to poor vegetation recovery, resulting in less ash input to soils at burning time. Compared with Mujong River area, the soil fertility status was lower with more acidic nature and poor nutrient contents.

Instead of relying on insufficient ash input, the farmers applied chemical fertilizers to maintain the soil fertility for sustaining rice yields. It was revealed that unlike the case of Mujong River, the Iban's traditional knowledge related to vegetation-based site selection method were no longer applicable although they still possessed such knowledge.

### **3) Comparisons of nutrient condition under two types of fallow after intensive shifting cultivation practices: *Imperata cylindrica* and *Dicranopteris linearis* lands**

Under the current intensive farming system, 2 grasses species (*Imperata cylindrica* and *Dicranopteris linearis* lands) were often found dominant in the fields after cropping. Located near to the residences, these grasslands were commonly utilized by the Iban farmers for upland rice farming under the current intensive system. In this topic, the nutrient stocks in soils and vegetation under these grasslands were analyzed in order to clarify potential productivity of such lands for upland rice farming with the shifting cultivation practices. The study sites were located in Lubok Antu area. According to the ecological aspects, *D. linearis* lands would be suitable for farming because of the larger amount of nutrient stocks in soils and aboveground vegetation than those in *I. cylindrica* lands. However, farmers preferred to use *I. cylindrica* lands for farming due to the persistence of thick root mats layers in *D. linearis* lands even after 2 to 3 years of burning and farming. It is suggested that under current fallow/cropping systems at *I. cylindrica* sites rather than *D. linearis* sites, chemical fertilizer application with less ash input could apparently sustain soil fertility.

### **4) Can old fallow lands become natural forest in relation to vegetation condition and soil fertility?**

While the lands located nearby the Iban's residential areas were intensively utilized, fallow lands located far from there were left unused and abandoned to convert into old secondary forests. In this topic, investigation was conducted in the Batang Ai National Park and the adjacent fallow lands on whether such ecosystems of old secondary forests would recover and reach the same ecological status to natural forests. The results showed that the vegetation under natural forests possessed better tree growth in diameter than those of old secondary forests (about 50 years) and young fallow lands (less than 5 years). Irrespective of forest types, all of the soils studied showed strongly acidic nature with low nutrient contents. No clear differences were observed in the soil physicochemical properties among the forest types although the soil pH in the young fallow lands were significantly lower than those under the old secondary forests and natural forests. The results suggested that because of poor soil fertility, a fallow period of 50 years would be insufficient for the land to recover its vegetation condition as equivalent to natural forests.

In conclusion, the alteration in shifting cultivation systems of the Iban in Sarawak, Malaysia has caused significant changes in the vegetation condition and soil fertility of fallow lands. From this study, it was revealed that the farmer's traditional shifting cultivation method had been a useful tool

## 論文の内容の要旨

in order to produce a sufficient rice yield in a single year with almost no fertilizer application. However, due to poor vegetation condition and soil fertility status of fallow lands under the current intensive systems, fertilizer and agrochemical application replaced the function of fallow to add nutrients as ash input and suppress weed growth. Along with changes in the ecological roles of fallow, if the farmers would continue rice cropping for their subsistence through the current form of shifting cultivation practice, appropriate selection and application of fertilizers and liming materials is indispensable to support rice production and conserve environments. On the other hand, large areas of old secondary forests recovered far from the residences. Taking into accounts the fact that in Sarawak, natural forests remains only as the protected area or national parks, such old secondary forests should be take important roles in forest conservation activities in the state.

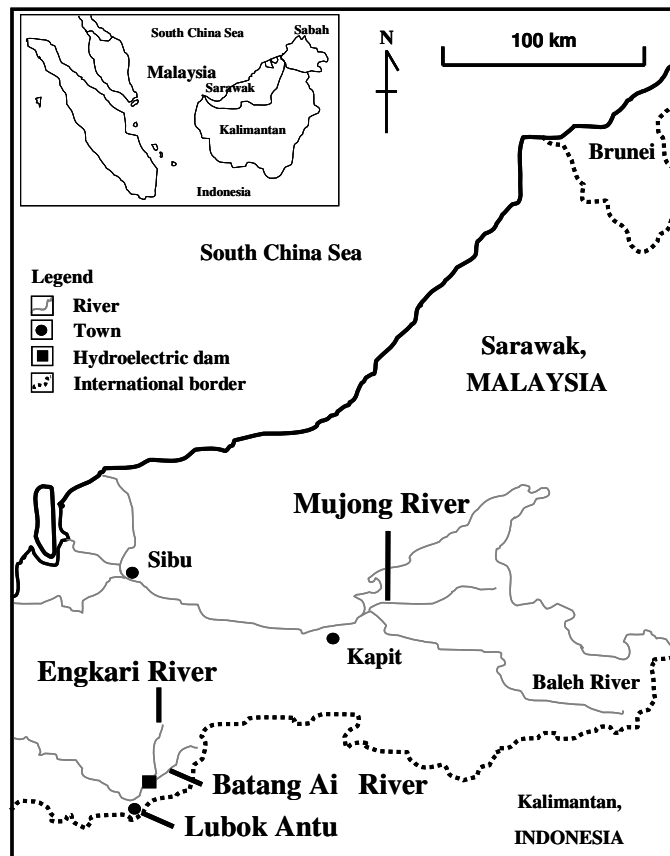


Fig.1 Map of study areas \*

\* Topic 1 was conducted at Mujong River; Topic 2 at Lubok Antu and Engkari River areas, Topic 3 at Lubok Antu area and Topic 4 at Batang Ai River area.

## 論文審査の結果の要旨

東南アジアの多くの国々では、原生林は、農地への転用や商業伐採のため二次林化や断片化が進み、保護林などとして残存しているにすぎない。新たに森林を開拓せず、しかも既存の農地を荒廃させることなく持続的に利用し、農業生産を維持すること、またその方策を見つけることが、現地社会の発展や地域住民の生活の安定化をもたらすだけでなく、残された熱帯雨林の保全にも貢献すると考えられる。

焼畑農業は、熱帯地域における地域住民の主要な農業形態の一つである。伝統的な焼畑では、長期間の休閑が、そのサイクルに取り入れられ、次回作のための土壌肥沃度の回復や病虫害や雑草害の抑制が図られている。本学位論文研究が行われたマレーシア・サラワク州においても、さまざまな民族が、焼畑農業により主食の陸稲をはじめとする多くの種類の作物を栽培し、自給自足の生活を送っていた。中でもイバン人は、州人口のおよそ3割を占める最大の民族集団である。彼らの焼畑の本来の形態は、天然林を利用する移動型焼畑や、比較的長い休閑期間をとまなう1作のみの定住型焼畑であったと考えられている。しかし、近年の社会経済状況の変化により、現代の焼畑は、連作や休閑期間の短縮化、化学肥料や農薬の使用に見られるように、より集約化した定着的な農法へと急速に変容している。また、現金収入源としてのパラゴムやコショウへの依存度が増大している。焼畑への依存度が今もなお高いような「奥地」を除けば、労働力や労働時間の軽減を図るため、アクセスの良さが重要視され、ゴム園やコショウ畑が道路や河川沿い、あるいは住居の近くに置かれ、それら換金作物栽培地の周辺の限られた土地を使って集約的な焼畑が行われている。

本学位論文は、このようなイバン人の焼畑の変容に着目し、特に休閑地生態系やその機能の変容について、土壌と植生の両面からの解明を試みている。本論文の成果は、次のようにまとめることができる。

まず、その年に火入れ・作付けを行う土地を選定するためのイバン人の知恵に着目して、伝統的焼畑農業における休閑地の植生や土壌肥沃度を評価している。調査は、比較的長期の休閑期間が維持されている **Mujong** 川流域のイバン人コミュニティーを対象に行われた。その結果、イバン人は、焼畑用地選定の際には、休閑地の植生を総合的に判断し、肥沃度が低いことを示す草本が優先している休閑地、特に休閑期間の短い休閑地を焼畑の候補地から除くこと、さらに、肥沃度が高いことを示す植物が多く存在している場合であっても、幹の直径が細い場合のような木本の生育が悪い時には候補地から除くことが明らかにされた。さらにこのような植生の状況と土壌肥沃度との関連付けを試み、肥沃度が低いことを示すとされた植物が多い休閑地は、土壌の窒素供給能が低いということを示唆している。このようなイバン人の焼畑用地選定の基準を土壌学的に解釈すると、まず焼いた時の灰の供給量が重要であると言える。しかし、灰には窒素分がほとんど含まれていないので、植物への窒素の供給は、焼土効果による土壌からの供給に依存する。つまり、肥沃度が低いことを示すとされた植物が多い休閑地は土壌の窒素供給能が低いことが示唆されるため、土壌の窒素供給能が、イバン人の焼畑適地、不適地の判断に関係していると結論している。

さらに、イバン人の焼畑用地選定法について、**Mujong** 川流域に比べ、焼畑の集約化が進行している **Lubok Antu** 地域と **Engkari** 川流域において研究を行っている。このような現代の



## 論文審査の結果の要旨

焼畑では、伝統的焼畑に比べ、土壌肥沃度は低下していること、植生回復が貧弱であること、そのため、灰投入による土壌肥沃度の向上がもはや望めないことが明らかにされた。実際に、農民は、土壌肥沃度の維持、すなわち自給米の生産量の維持のために化学肥料の施用に依存していた。Mujong 川流域でみられた焼畑用地選定のための知恵は依然として保たれているものの、実際には利用する機会は失われていると結論している。

次に、集約的な焼畑の休閑地でよくみられる 2 つのタイプの草地、*Imperata cylindrica* が卓越する草地と *Dicranopteris linearis* が卓越する草地生態系の養分量を比較している。調査は、Lubok Antu 地域で行われた。養分蓄積量は、地上部植生及び土壌とも *D. linearis* 型草地の方が *I. cylindrica* 型草地より高く、焼畑による陸稲栽培に適していると評価された。しかし、実際のところ農民は、*I. cylindrica* 型草地を焼畑に使用することを好み、それは、*D. linearis* 型草地の場合、その厚いルートマットが火入れ後 2、3 年を経ても残存し、陸稲栽培の障害になるためであることが明らかにされた。*I. cylindrica* 型草地を利用する現代の焼畑では、少ない灰投入量を代替するような化学肥料の利用が必要不可欠であると示唆している。

最後に、放棄された二次林と原生林の植生や土壌の差異について検討を行っている。イバン人のコミュニティ周辺の土地は高い頻度で使用されているのに対し、コミュニティから遠方の休閑地は、利用されず事実上放棄されている。原生林が保護林としてしか残存していない現状では、このような放棄二次林の存在は、森林保全や種の多様性の保存を考える上で重要となっている。そこで、原生林が保全されている Batang Ai 国立公園と、隣接する 50 年以上の放棄二次林、5 年以下の初期休閑地を対照に、植生及び土壌を比較・検討している。植生では、それぞれの土地区分の種の類似度が低く、原生林の木本は、他の土地利用区分に比べ胸高直径が大きいことが明らかにされた。一方、土壌肥沃度は、いずれの土地区分でも酸性が強く、養分に乏しかった。本地域では、固有の土壌肥沃度が低いため、50 年程度の歳月では、二次林が原生林と同様の植生にまで回復するには至らないことが明らかにされた。

このような成果から、サラワク州において、焼畑農業による陸稲の生産を継続するには適切な施肥管理が必要不可欠であること、森林保全の観点から放棄二次林の維持・保全策を早急に打ち出す必要があることを結論として導き出している。

サラワク州における焼畑研究の多くは、社会学、民俗学的な観点から行われてきた。土壌に関する研究では、火入れから作物栽培に着目したものが多かった。森林に関する研究は、ランビルヒルズ国立公園において実施されてきた一連の研究に代表されるように原生林に関するものが大半を占め、休閑二次林の知見はほとんど得られていない。一方、本学位論文は、イバン人の焼畑休閑地に着目し、その植生や土壌を生態学的に評価したものである。本学位論文の最大の特徴は、そのような生態学的評価を実施するに際して、焼畑の変容やイバン人が培ってきた知恵のような焼畑に関連する社会的、民俗学的要因を積極的に考慮している点にある。これは、まさしく黒潮圏海洋科学研究科が目指している分野横断型、文理融合型研究の一形態であると高く評価できる。

## 論文審査の結果の要旨

平成 21 年 7 月 22 日に高知大学朝倉キャンパス・メディアホールにおいて開催された学位論文公開審査会での口頭発表と質疑に関する応答は適切であった。また、平成 21 年 8 月 10 日高知大学物部キャンパスにおいて、提出された学位論文の内容および関連専門分野について口頭により最終試験を行ったところ、申請者の応答は適切であった。

以上の結果から、審議の結果、申請者は最終試験に合格したものと判断し、博士（学術）を授与するに値するものと審査委員全員一致で判定した。

ふりがな	しんもと はじめ
氏名（本籍）	新元 一（広島県）
学位の種類	博士（学術）
学位記番号	乙総黒博第1号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成21年9月17日
学位論文題目	<b>Phenotypic diversification of infectious red seabream iridovirus and vaccine development</b> (感染性マダイイリドウイルスの形質の多様化解析とワクチンの開発)
発表誌名	Hajime Shinmoto, Ken Taniguchi, Takuya Ikawa, Kenji Kawai, and Syun-ichirou Oshima Phenotypic diversity of infectious red seabream iridovirus isolated from cultured fish in Japan 2009: Applied and Environmental Microbiology
	審査委員 主査 准教授 大島 俊一郎 副査 教授 山岡 耕作 副査 准教授 久保田 賢 副査 教授 川合 研児

#### 論文の内容の要旨

1980年代の終盤から現在にかけて、世界の漁獲量は約9,000万トンとほぼ一定で推移している。一方、養殖量は徐々に増加し、2004年には約4,500万トンに達しており、養殖業はますます重要な水産タンパク質供給産業となっている。我が国では、1950年代から養殖が本格的な産業として確立し発展を遂げてきた。近隣のアジア諸国でも1970年代以降に海産魚養殖が盛んになり、北欧・北米のサケ養殖も1980年代には養殖産業が確立し、生産量はほぼ一貫して上昇基調にある。

養殖産業は収益性を求めるため、過密養殖となるのは必然的である。過密な飼育は魚にストレスを与えるとともに病原体の伝播が起こりやすい。多くの場合、病気発生などの損害を出して、逆に収益性を引き下げる結果となっている。我が国でとくに魚病による被害が大きくなったのは、1960年代中頃から養殖ブリでノカルディア症、類結節症、連鎖球菌症などの細菌性疾病が蔓延したことに始まる。その後、ブリのウイルス性腹水症、マダイイリドウイルス（RSIV）病、海産魚種苗生産場で発生するウイルス性神経壊死症などのウイルス性疾病が多発するようになった。なかでもRSIV病による被害は大きく、発生すると累積死亡率が60%にも達することがあり、現在では我が国の海産魚養殖で最も被害の大きい疾病であると考えられている。本病の対策として1999年からホルマリン不活化ワクチンが実用化され、その有効性が認められた。しかし、その効果が十分でない事例が多く見られるようになり、さらに有効なワクチンの開発が望まれている。

魚類のイリドウイルス感染症は、アジアおよび太平洋地域で発生例が多く報告されており、発生魚種も100以上に及んでいる。発生が報告されている多くは、養殖対象魚や鑑賞用熱帯魚であり、各国とも養殖産業に大きな経済的被害が生じている。イリドウイルス科ウイルスのうち、魚類に感染するのはリンフォシスティウイルス属、ラナウイルス属およびメガロサイティウイルス属のウイルスである。そのうち、とくに高い死亡率を示すのはメガロサイティウイルス属のウイ

## 論文の内容の要旨

ルスであり、我が国で問題となっている RSIV もこの属に属している。

我が国の RSIV 病による被害の特徴として、感染魚種の拡大が挙げられる。1990 年の発見時にはマダイでのみ感染が確認されたが、1991 年にはスズキ、ブリ、カンパチでも発生し、1995 年には 20 種もの魚種で発生が報告され、現在では 30 種を超えている。近隣アジア諸国においても、異なる魚種での新規感染事例が相次いで報告されるようになった。元来、イリドウイルス科のウイルスは変異性の高いことが知られており、罹患魚種の拡大や不活化ワクチンの予防効果が十分に得られなくなった理由として、流行イリドウイルスに変異の起こっていることが考えられる。実際に、日本および韓国の罹患魚から分離されたイリドウイルスには遺伝子上の多様性が認められている。RSIV に多様性が存在するならば、本ウイルスの宿主拡大、不顕性感染、新規ワクチンの開発、毒性や性状など多面的な研究と対策が必要である。しかしながら、現在まで本ウイルスの多様性については遺伝子の比較研究に留まっており、病気発症とウイルスの性状の関係についてはほとんど調べられていない。本研究は、RSIV 流行株の性状を詳しく調べることによって感染流行の現状を明らかとし、異なる性状の流行株が存在することを念頭においた有効性の高い新規ワクチンの開発という RSIV 対策を提案するものである。

まず、流行株の性状の差異を検討するため、日本西部の養殖場から RSIV 病罹患魚を収集しウイルスを分離した。これらのうち U-1 株 (2002 年マダイ由来)、KST-Y-1 (2004 年ブリ由来) および U-6 株 (2005 年ブリ由来) の 3 株を供試株とし、遺伝子および形質的性状の相違について検討し、遺伝子の相違は主要カプシドタンパク質 (major capsid protein, MCP) のシーケンスおよび 7 領域での制限酵素処理多型 (RFLP) で評価した。形質的性状の相違は *in vitro* および *in vivo* の両面で評価した。*in vitro* の評価として、供試細胞にマダイ 鱭由来の CRF-1 細胞を用い、細胞毒性はウイルス接種後の細胞生残率を MTT 試験 (ミトコンドリアの酵素活性≡生細胞量を測定) で調べ、細胞内増殖性はウイルスゲノム総量の変化と電子顕微鏡観察による細胞内ウイルス粒子形成の時期について調べた。*in vivo* の評価として、供試魚に平均体重 8 g のマダイを用いて、実験感染による死亡率、ウイルスの体内動態および病理組織変化について調べた。また、各株のホルマリン不活化ウイルスワクチンを作製し、これで免疫したマダイに感染 (攻撃試験) を行い抗原性について比較した。

MCP 領域のシーケンスを行った結果、3 つの分離株の MCP 領域の塩基配列に相違は認められなかった。しかしながら、その他の領域について RFLP 解析を行った結果、制限酵素処理後のバンドパターンに相違が認められ、3 つの分離株が保持する遺伝子にはそれぞれ異なる配列が存在することが明らかとなった。*in vitro* の試験において、U-6 株および U-1 株は KST-Y-1 株よりも強い細胞毒性、高い増殖性および早期の粒子形成を示した。*in vivo* の試験では、U-6 株は急激な発症および高い死亡率を引き起こすのに対して、KST-Y-1 株および U-1 株は緩やかな発症および比較的低い死亡率を示した。以上の結果から、病原性に関する性状は 3 株間でそれぞれ異なることが明らかとなった。次に行った免疫・攻撃試験では、ワクチン株と攻撃株が一致した場合には感染防御効果が認められたが、ワクチン株とは異なる株で攻撃を行ったときには感染防御効果が得られなかった。このことから、3 株間には抗原性に差異があることも明らかとなった。以上のことから、異なる養殖場あるいは魚種由来の分離ウイルスは、異なる遺伝子および形質の特性を持つことが明らかとなった。同時に、異なる特性を持つウイルスが同じ宿主に感染すること、また逆に一つのウイルス分離株が異なる宿主に感染することも可能であることも示された。

## 論文の内容の要旨

上述のようにウイルス株ごとに抗原性が相違したことは、流行する株の種類を考慮しながら、不活化ワクチン用の株を厳密に選定する必要があることを示すものである。

以上のことを踏まえて、より有効なワクチンの作製を試みた。新規ワクチンには、RSIVの抗原的多様性に応じて必要な抗原をコードする遺伝子を組み込んで発現させることが可能な大腸菌発現システムを用い、これによって発現したウイルス抗原をコンポーネントワクチンとして免疫実験に供試した。発現させる導入遺伝子には、RSIV U-6株のカプシドタンパク質をコードする18R、351RおよびMCP領域を用いた。まず、これら3領域の遺伝的安定性を確認するために、U-6株のこれら領域の遺伝子配列を決定し、近縁他種のイリドウイルスにおける配列との同一性を調べた。つぎに、各遺伝領域をpet-41aベクターに導入したのち、大腸菌を形質転換させて導入遺伝子を発現する大腸菌株を作製した。この菌を培養し、発現誘導を行ったのちホルマリンで不活化した菌体をワクチンとした。これらのワクチンをマダイ腹腔内に注射免疫し、3週間後に攻撃試験を行って防御効果を調べた。最も高い効果を示した導入遺伝子については、より高い効果を目指して、細菌感染症に広く免疫賦活効果を示すことが報告されている*Edwardsiella tarda*の外膜タンパク質の一種であるGAPDHとの融合タンパクとして発現させる株を作製した。これについても、マダイを用いた免疫・攻撃試験を行い防御効果を検討した。さらに、これらワクチンの防御効果を解析するために、ワクチン接種の有無による体内ウイルス分布の相違を調べ検討した。

コンポーネントワクチンの防御効果を調べた結果、351R領域の発現タンパク質に有意な感染防御効果が認められた。この導入領域のアミノ酸配列について、流行株および海外分離株と比較したところ100%一致し、RSIVでは極めて安定した領域であることが明らかとなり、この領域をもとにした大腸菌組み換えコンポーネントワクチンが流行ウイルスの差異によらず、広くRSIV病に有効であることが示唆された。*E. tarda* GAPDHとの融合タンパク質についても、十分な感染防御効果を示したのでワクチンの更なる改良の可能性が示された。感染後のウイルス動態を調べた結果、ウイルス量は鰓で少なく、血中で多く測定されたことから、本コンポーネントワクチンの効果は免疫後に産生される抗体がウイルスが捕捉することで、体内のウイルスの広がりや増殖を抑制するものと推定された。

この研究では、現在重要な魚病であるマダイイリドウイルスについて、流行株には形質的に多様性のあることを明らかにし、従来の単一株ウイルス粒子を用いた不活化ワクチンに変わる広範な効果が期待できるコンポーネントワクチンを提案した。RSIV病が15年以上も発生を繰り返し続け、さらに被害が広がっている背景として、環境中には病原性や抗原性が異なるRSIVの存在が明らかになった。このことは、市販ワクチンの効果が限定的であることも裏づける。形質が異なるウイルスが流行する事例は、魚病ではブリ腹水症ウイルスや伝染性サケ貧血症ウイルス、ヒトの病気ではインフルエンザなどが知られており、イリドウイルス以外でも確認されている一般的な事象である。本研究で明らかにしたワクチンの改良技術は、これらのウイルス病ワクチンに対しても応用できるものである。本研究では、本ウイルスの安定な遺伝子領域を導入して合成したワクチンを作製し、有効性を確認した。この技術により、多魚種で発生しているRSIV以外の魚類イリドウイルス感染症にも、広く効果を発揮するワクチン開発が可能と考えられた。

### 論文の内容の要旨

本研究は、流行株の多様性を評価した上で統一性を見出し、その統一性の部分で感染を制御する手法を示したものである。この対策手法は、経済的にも人的にも、投入できる資源に乏しい養殖業の実情に即しており、また、他の魚病の多くにも応用が期待される。

## 論文審査の結果の要旨

我が国の水産増養殖業において、マダイイリドウイルス (RSIV) 病による被害は大きく、発生すると累積死亡率が 60%にも達することがあり、現在では最も被害の大きい疾病と考えられている。本病の対策として 1999 年からホルマリン不活化ワクチンが実用化され、その有効性が認められた。しかし、その効果が十分でない事例が近年になって多く見られるようになり、さらに有効なワクチンの開発が望まれている。

我が国の RSIV 病による被害の特徴として、感染魚種の拡大が挙げられる。1990 年の発見時にはマダイでのみ感染が確認されたが、1991 年にはスズキ、ブリ、カンパチでも発生し、1995 年には 20 種もの魚種で発生が報告され、現在では 30 種を超えている。近隣アジア諸国においても、異なる魚種での新規感染事例が相次いで報告されるようになった。元来、イリドウイルス科のウイルスは変異性の高いことが知られており、罹患魚種の拡大や不活化ワクチンの予防効果が十分に得られなくなった理由として、流行イリドウイルスに変異の起こっていることが考えられる。実際に、日本および韓国の罹患魚から分離されたイリドウイルスには遺伝子上の多様性が認められている。RSIV に多様性が存在するならば、本ウイルスの宿主拡大、不顕性感染、新規ワクチンの開発、毒性や性状など多面的な研究と対策が必要である。しかしながら、現在まで本ウイルスの多様性については遺伝子の比較研究に留まっており、病気発症とウイルスの性状の関係についてはほとんど調べられていない。

このような背景のもと、本研究では RSIV 流行株の性状を詳しく調べることによって感染流行の現状を明らかとし、異なる性状の流行株が存在することを念頭においた有効性の高い新規ワクチンの開発という RSIV 対策を提案するものである。

第 1 章では、流行株の性状の差異を検討するため、日本西部の養殖場から RSIV 病罹患魚を収集しウイルスを分離した。これらのうち U-1 株 (2002 年マダイ由来)、KST-Y-1 (2004 年ブリ由来) および U-6 株 (2005 年ブリ由来) の 3 株を供試株とし、遺伝子および形質的性状の相違について検討し、遺伝子の相違は主要カプシドタンパク質 (major capsid protein, MCP) のシーケンスおよび 7 領域での制限酵素処理多型 (RFLP) で評価した。形質的性状の相違は *in vitro* および *in vivo* の両面で評価した。*in vitro* の評価として、供試細胞にマダイ 鱭由来の CRF-1 細胞を用い、細胞毒性はウイルス接種後の細胞生残率を MTT 試験 (ミトコンドリアの酵素活性≡生細胞量を測定) で調べ、細胞内増殖性はウイルスゲノム総量の変化と電子顕微鏡観察による細胞内ウイルス粒子形成の時期について調べた。*in vivo* の評価として、供試魚に平均体重 8 g のマダイを用いて、実験感染による死亡率、ウイルスの体内動態および病理組織変化について調べた。また、各株のホルマリン不活化ウイルスワクチンを作製し、これで免疫したマダイに感染 (攻撃試験) を行い抗原性について比較した。

MCP 領域のシーケンスを行った結果、3 つの分離株の MCP 領域の塩基配列に相違は認められなかった。しかしながら、その他の領域について RFLP 解析を行った結果、制限酵素処理後のバンドパターンに相違が認められ、3 つの分離株が保持する遺伝子にはそれぞれ異なる配列が存在することが明らかとなった。*in vitro* の試験において、U-6 株および U-1 株は KST-Y-1 株よりも強い細胞毒性、高い増殖性および早期の粒子形成を示した。*in vivo* の試験では、U-6 株は急激な発症および高い死亡率を引き起こすのに対して、KST-Y-1 株および U-1 株は緩やかな発症および

## 論文審査の結果の要旨

比較的に低い死亡率を示した。以上の結果から、病原性に関する性状は 3 株間でそれぞれ異なることを明らかにした。次に行った免疫・攻撃試験では、ワクチン株と攻撃株が一致した場合には感染防御効果が認められたが、ワクチン株とは異なる株で攻撃を行ったときには感染防御効果が得られなかった。このことから、3 株間には抗原性に差異があることも明らかとなった。以上のことから、異なる養殖場あるいは魚種由来の分離ウイルスは、異なる遺伝子および形質の特性を持つことを明らかにした。同時に、異なる特性を持つウイルスが同じ宿主に感染すること、また逆に一つのウイルス分離株が異なる宿主に感染することも可能であることも示された。上述のようにウイルス株ごとに抗原性が相違したことは、流行する株の種類を考慮しながら、不活化ワクチン用の株を厳密に選定する必要があることを示した。

第 2 章では、以上のことを踏まえて、より有効なワクチンの作製を試みた。新規ワクチンには、RSIV の抗原的多様性に応じて必要な抗原をコードする遺伝子を組み込んで発現させることが可能な大腸菌発現システムを用い、これによって発現したウイルス抗原をコンポーネントワクチンとして免疫実験に供試した。発現させる導入遺伝子には、RSIV U-6 株のカプシドタンパク質をコードする 18R、351R および MCP 領域を用いた。まず、これら 3 領域の遺伝的安定性を確認するために、U-6 株のこれら領域の遺伝子配列を決定し、近縁他種のイリドウイルスにおける配列との相同性を調べた。つぎに、各遺伝領域を pet-41a ベクターに導入したのち、大腸菌を形質転換させて導入遺伝子を発現する大腸菌株を作製した。この菌を培養し、発現誘導を行ったのちホルマリンで不活化した菌体をワクチンとした。これらのワクチンで腹腔内注射にマダイをより免疫し、3 週間後に攻撃試験を行って防御効果を調べた。最も高い効果を示した導入遺伝子については、より高い効果を目指して、細菌感染症に広く免疫賦活効果を示すことが報告されている *Edwardsiella tarda* の外膜タンパク質の一種 (GAPDH) との融合タンパクとして発現させる株を作製した。これについても、マダイを用いた免疫・攻撃試験を行い防御効果を検討した。さらに、これらワクチンの防御効果を解析するために、ワクチン接種の有無による体内ウイルス分布の相違を調べ検討した。

コンポーネントワクチンの防御効果を調べた結果、351R 領域の発現タンパク質に有意な感染防御効果が認められた。この導入領域のアミノ酸配列について、流行株および海外分離株と比較したところ 100%一致し、RSIV では極めて安定した領域であることが明らかとなり、この領域をもとにした大腸菌組み換えコンポーネントワクチンが流行ウイルスの差異によらず、広く RSIV 病に有効であることが示唆された。*E. tarda* GAPDH との融合タンパク質についても、十分な感染防御効果を示したのでワクチンの更なる改良の可能性が示された。感染後のウイルス動態を調べた結果、ウイルス量は鰓で少なく、血中で多く検出されたことから、本コンポーネントワクチンの効果は免疫後に産生される抗体がウイルスを捕捉することで、体内のウイルスの広がりや増殖を抑制するものと推定された。この研究では、現在重要な魚病であるマダイイリドウイルスについて、流行株には形質的に多様性のあることを明らかにし、従来の単一株ウイルス粒子を用いた不活化ワクチンに変わる広範な効果が期待できるコンポーネントワクチンを提案した。RSIV 病が

15 年以上も発生を繰り返し続け、さらに被害が広がっている背景として、環境中には病原性や抗原性が異なる RSIV の存在が明らかになった。形質が異なるウイルスが流行する事例は、魚病ではブリ腹水症ウイルスや伝染性サケ貧血症ウイルス、ヒトの病気ではインフルエンザなどが知



## 論文審査の結果の要旨

られており、イリドウイルス以外でも確認されている一般的な事象である。

本研究で明らかにしたワクチンの改良技術は、これらのウイルス病ワクチンに対しても応用できるものである。本研究では、本ウイルスの安定な遺伝子領域を導入して合成したワクチンを製し、有効性を確認した。この技術により、多魚種で発生している RSIV 以外の魚類イリドウイルス感染症にも、広く効果を発揮することが期待される。

以上、本学位論文は、イリドウイルス流行株の多様性を評価した上で統一性を見出し、その統一性の部分で感染を制御する手法を示したものである。この対策手法は、イリドウイルスという1つのウイルス感染症にのみ有効な対策法を示したものではなく、多くの感染症に対して普遍的に活用できる手法であり、経済的にも人的にも、投入できる資源に乏しい養殖業の実情に即しており、今後の感染症対策の進展に寄与するものと考えられる。

また、黒潮圏科学の見地から、本研究は、感染症対策としてこれまで行われてきた部分最適の発想ではなく、全体の最適を考慮に入れた新しい考え方のワクチンを提示した研究であり有意義である。

本学位論文ならびに学位論文公開審査会の結果を総合的に判断し、全委員一致して本論文が博士（学術）の学位を授与するに値するものと判定した。