

海洋性ウイルスの泡沫への濃縮機能を利用した高感度検出法の開発

宮崎大学大学院工学研究科 学生会員 ○鈴木 孝彦
 宮崎大学農学部 河野 智哉, 米加田 徹, 酒井 正博, 伊丹 利明
 宮崎大学工学部 鈴木 祥広

1. はじめに

短期間でクルマエビに大量死をもたらす海洋性病原ウイルス WSDV(White Spot Disease Virus)は、東南アジアを中心に世界中のクルマエビ養殖業に甚大な被害をもたらしている。1993年には、外国からもちこまれた WSDV が西日本のクルマエビ養殖に壊滅的な被害をもたらしたという事例もある¹⁾。しかしながら、WSDV の感染メカニズムや集積組織に関する情報は不明であり、一度感染したエビに対する効果的な治療法は存在していない。さらに、WSDV を海水から高感度に検出する方法は確立しておらず、ノロウイルス等の回収法として知られる陰電荷膜濃縮法²⁾においても、WSDV には有効でない³⁾。したがって、WSDV の検出とその除去は、エビ養殖場の経営にとって極めて重要な課題である。そこで本研究では、海水中に分散した WSDV の高感度検出法の開発を目的とし、ウイルスの泡沫への濃縮機能を利用した WSDV の除去および濃縮における基礎的研究を行った。

2. 材料と方法

2. 1 試料の調整

実験に用いる WSDV として、冷凍させた WSDV 感染エビを解凍し肉片約 0.2g を滅菌生理食塩水中でホモジナイズした後、ガラス繊維ろ紙(口径 25mm, GF/B 型)を用いて肉片を取り除き、単体の WSDV がフリーに存在するウイルス汚染海水(原水)を作成した。カゼインの標準溶液(10,000mg/L)は、試薬を 0.01M の NaOH 水溶液に溶解して作成した。鉄の標準溶液(10,000 mg/L)は、塩化第二鉄溶液(39%重量含有)を蒸留水で希釈して作成した。鉄イオンの錯化剤には、鉄キレート試薬である Deferoxamine mesylate 溶液(0.076mol/L)を用いた。

2. 2 泡沫分離法

本研究では、泡沫分離法⁴⁾および鉄コロイド・泡沫分離法における WSDV の除去・濃縮について、図 1 の泡沫分離装置を用いて検討した。泡沫分離の手順として、まずウイルス汚染海水(180mL)を準備し、強い界面活性を示すカゼインを 1mg/L になるように添加した。攪拌後、泡沫分離(一定流量 0.3L/min)を行い、原水、処理水、および回収された泡沫水の WSDV をそれぞれ定量・比較し、WSDV の除去・濃縮率を算出した。鉄コロイド・泡沫分離法については、WSDV の除去に最適な鉄およびカゼインの量をあらかじめ検討し、鉄 1mg/L とカゼイン 1mg/L の条件で行った。まずウイルス汚染海水に鉄を添加し、攪拌後に発生した鉄コロイドをカゼインによる泡沫分離で泡沫水中に回収し、除去・濃縮率を算出した。実験はそれぞれ 3 回の繰り返し実験を行った。

2. 3 鉄コロイドの溶解

鉄コロイド・泡沫分離法後に回収された泡沫水の全量を遠心分離(3000rpm, 10min)し、上澄水をおよそ取り除いた後、残り全量(約 1ml)を 1.5ml 遠心チューブに移し、再度、遠心分離(12000rpm, 3min)を行った。分離した上澄水と鉄コロイドをそれぞれ回収した。鉄コロイドは 0.1M の HCl で溶解し、鉄キレート試薬と TE Buffer を添加した後、0.1M の NaOH で中和した。中和液は Milli-Q 水によって 180μL に調整し、これを鉄コロイド溶解液とした。

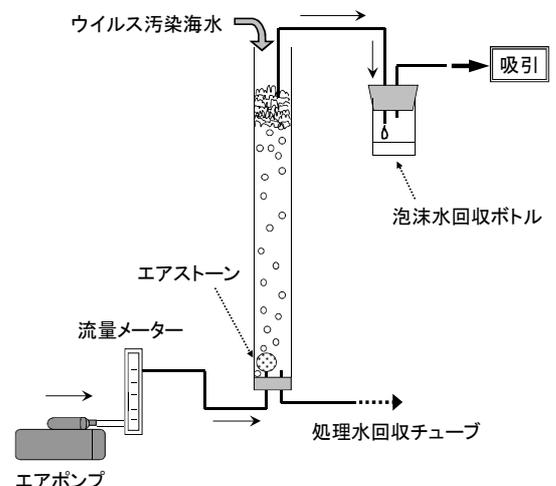


図 1 泡沫分離装置

キーワード WSDV, クルマエビ, 泡沫分離法, 鉄コロイド, Real-time PCR 法

連絡先 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台 1 丁目 1 番地 鈴木 孝彦 TEL 0985-58-7111

2. 4 DNA 抽出および定量法

原水, 泡沫分離処理の処理水と泡沫水, 鉄コロイド処理の泡沫水(未処理)と遠心分離後の上澄水および鉄コロイド溶解液について, WSDV の DNA を各試料から抽出した後, Real-time PCR 法によるコピー数で定量した。

3. 結果と考察

3. 1 WSDV の除去

カゼインによる泡沫分離実験での原水, 処理水, および泡沫水の WSDV をそれぞれ定量した結果, いずれのコピー数もほぼ一致した値を示した。カゼインのみを利用した泡沫分離法では, WSDV の除去は困難であることがわかった。次に,

鉄コロイド・泡沫分離法による実験結果を図 2 に示す。原水の WSDV は処理によって著しく減少し, 除去率は 99.5% となった。鉄コロイドを生成させてから泡沫分離処理することによって, 極めて効果的に WSDV が除去されることがわかった。WSDV は鉄コロイドとともに泡沫水に分離・回収されていると考えられた。

3. 2 WSDV の濃縮

表 1 には, 鉄コロイド・泡沫分離法において回収された泡沫水について, 未処理の泡沫水, 遠心分離後の上澄水および鉄コロイド溶解液の WSDV の測定結果を示す。高濃度に WSDV が濃縮されていると推察された未処理の泡沫水の WSDV 濃度は原水よりも低かった。また, 上澄水の WSDV 濃度は処理水と同等の極めて低いオーダーであった。これに対して, 鉄コロイドからは 3.2×10^{11} copy/ml の極めて高濃度の WSDV が検出され, 約 200 倍も高く検出された。すなわち, 鉄コロイド・泡沫分離法で除去された WSDV の大部分が鉄コロイドに吸着され, 鉄コロイドとともに泡沫水に濃縮されたと考えられる。

4. まとめ

(1) WSDV は, 強い界面活性を示すカゼインのみによる泡沫分離処理では除去が困難である。

(2) 鉄コロイドを発生させ, 泡沫分離処理することによって, 海水中に存在する WSDV の 99.5% 以上を除去することができる。

(3) 鉄コロイドを濃縮した泡沫水から鉄コロイドを回収し, 溶解処理することによって極めて高感度に WSDV を検出できる。

参考文献

- 1) 中野平二(2005)クルマエビの急性ウイルス血症, 日本水産学会誌, 71, 639-644.
- 2) 片山浩之, 嶋崎明寛, 大垣眞一郎(2002)陰電荷膜を用いた酸洗浄・アルカリ誘出によるウイルス濃縮法の開発, 水環境学会誌, 25, 469-475.
- 3) 鈴木孝彦, 河野智哉, 米加田徹, 酒井正博, 伊丹利明, 鈴木祥広(2009)分散気泡を利用したエビ病原性ウイルス(WSDV)の分離・除去, 日本水環境学会九州支部研究発表会講演要旨集, 14-15.
- 4) 鈴木祥広, 丸山俊朗(2000)魚類の体表面粘質物を利用した泡沫分離法による懸濁物除去に関する基礎的研究, 水環境学会誌, 23, 181-186.

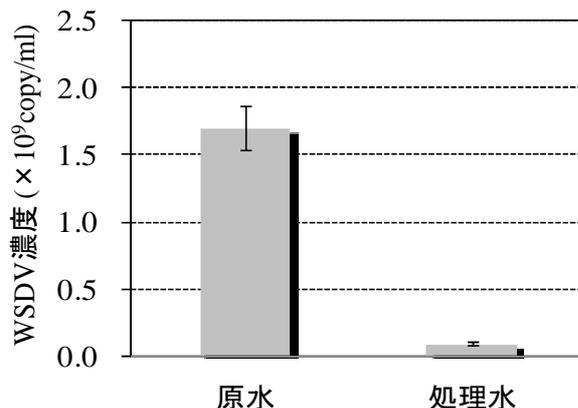


図 2 鉄コロイド・泡沫分離法の実験結果 (n=3, \pm SD)

表 1 鉄コロイド・泡沫分離後の各サンプルの WSDV 濃度 (copy/ml)

	原水	処理水	泡沫水	
			上澄水	鉄コロイド
未処理	1.7×10^9 $\pm 1.6 \times 10^8$	9.4×10^6 $\pm 1.3 \times 10^6$	7.2×10^8 $\pm 2.3 \times 10^8$	
鉄溶解	1.7×10^9 $\pm 1.9 \times 10^8$	2.1×10^7 $\pm 1.6 \times 10^7$	1.5×10^7 $\pm 1.3 \times 10^7$	3.2×10^{11} $\pm 7.7 \times 10^{10}$

(n=3, \pm SD)