

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07552

研究課題名(和文) 魚病細菌を腸管に含む動物プランクトンの給餌による魚類への抗病性付与

研究課題名(英文) Attempts to confer resistance to bacterial pathogens on fish by feeding bacteria to fish larva

研究代表者

菅 向志郎 (SUGA, Koushirou)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・准教授

研究者番号：60569185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：仔魚期に細菌を摂餌させることで、抗病性の付与を試みた。細菌数計測には定量PCRを適用した。3種類のDNA精製試薬で、細菌培養液を希釈後にDNAを精製した“菌液希釈”および、精製後に希釈した“DNA希釈”の各DNA溶液で定量PCRを行い、各DNA精製法が定量PCRに与える影響を調べた。キレックス樹脂を用いて精製したDNAでは、3種類のDNA精製試薬の中で最もCt値が低く、DNAの回収率が高いことが分かった。細菌を摂餌させた仔魚の生残率は対照区とほぼ同等であった。また、組織切片解析により、試験区と対照区では差が無いことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, attempted to confer resistance to bacterial pathogens on fish by feeding bacteria to fish larva. Quantitative PCR (qPCR) was applied for counting the number of bacteria.

In order to investigate the effect of different DNA purification kits in counting bacterial cells using qPCR, we compared two methods; the bacterial culture dilution method, in which the DNA is purified after 5 steps of a ten-fold serial dilution of bacterial culture, and the DNA dilution method, which the DNA is diluted after purification with the optimum cell number of bacteria. In both methods, we used three types of DNA purification kit. Our results showed the lowest Ct value and high DNA recovery rate were obtained using Chelex resin. The survival rate of the fish larva, which fed the zooplankton containing bacteria, was equivalent to that of the control. Tissue section analysis revealed that there was no difference the bacteria-fed fish larva and control.

研究分野：魚病学

キーワード：魚病細菌 抗病性

1. 研究開始当初の背景

魚類の細菌性疾病を予防するワクチン開発では、魚病細菌を魚類に接種する攻撃試験を実施する必要がある。安定した試験データを得るために、海水温度など様々な飼育条件を揃えても、対照区の試験魚が疾病を発症しない、もしくは発症しても死に至らず軽微な病症となる場合がある。この原因は試験に用いる種苗の健苗性の高さが影響していると推定される。この魚病細菌に抵抗性を示す健苗性は、何に起因するのか詳細は不明である。

この要因として、生体防御機能が発達していく仔魚期の飼育時に曝露される細菌が影響している可能性が考えられる。特に、給餌する生物餌料の培養槽には、細菌叢として優占する *Pseudomonas* 属や *Vibrio* 属に大きな違いが生じることは稀であるが、少ない割合で存在する菌種の変動は起こりうる。魚病細菌の多くは環境水中に常在し得る条件性病原菌であり、閉鎖水槽であるワムシ飼育水の優占菌種とはならなくとも魚病細菌が飼育水に混入する可能性が指摘されている。生物餌料の培養槽にわずかに混入する魚病細菌が生体防御システムを獲得し始める仔魚期に抗病性を付与している可能性がある。この仔魚期における抗病性獲得能をコントロールすることで、細菌性疾病に強い稚魚の作出を本研究で試みた。

2. 研究の目的

魚類における細菌性疾病の対策は、抗生物質投与の治療法からワクチン接種の予防法への転換が求められている。しかし、細胞内寄生細菌に対する効果的なワクチンは開発されていない。異なる種苗生産場で飼育された遺伝的にほぼ同一な魚に魚病細菌を接種した場合、病症に大きな差が生じることが知られている。これは、種苗生産場毎に培養している餌料生物の飼育水に僅かな魚病細菌もしくはその近縁菌種の混入があり、これら生きた細菌を含む餌料生物を仔魚が腸管に取り込むことで抗病性が生じることが原因であると推定した。これらの事象より、本研究は魚病細菌を含む餌料生物を仔魚に給餌させることで、細菌性疾病に対する抗病性を有した稚魚の作出を目的とした。そこで、(1) 全ゲノム配列にもとづく魚病細菌株の解析による菌株の選定、(2) 餌料生物および仔魚の体内に取り込ませた魚病細菌の計数法、(3) 魚病細菌による仔魚飼育への影響、(4) 飼育した仔魚の腸管の組織切片解析、以上の項目について研究し、細菌性疾病に抗病性を有する稚魚の作出における基礎的な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1: 全ゲノム配列にもとづく魚病細菌株の解析

分離海域などが異なる魚病細菌を液体培地で培養後、低融点アガロースで包埋し、Lysozyme および Proteinase K により DNA を精製し、DNA ゲルプラグを作成した。DNA ゲルプラグは TE Buffer で洗浄した後、1 mM PMSF にて処理することで Proteinase K を不活化した。タンパク分解酵素の不活化処理済み DNA ゲルプラグを適量切り出し、制限酵素緩衝液で bufferize した後、制限酵素により消化した。制限酵素処理 DNA ゲルプラグは、1% Pulse Field Certified Agarose、泳動装置には CHEF-DR III を用いて電気泳動を行った。各菌株の制限酵素消化 DNA 断片のパターンを解析し、Band sharing index (BSI) による類似度をもとに菌株を分類した。

実験 2: 定量 PCR による魚病細菌の計数

定量 PCR に用いる標的遺伝子は、*Edwardsiella* の線毛遺伝子群スペース領域に存在する DNA 配列 (全 848 bp) を選定した。*Edwardsiella* のゲノム DNA を Wizard Genomic DNA Purification Kit (以下非シリカ膜) で精製し、本領域を標的とするプライマーを用いて PCR を行い、本領域を増幅した。増幅 DNA 断片は、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer を用いて塩基配列を解析した。Universal ProbeLibrary の UPL Assay Design Center より、前述で塩基配列を確認した領域を標的とするプライマーを設計し、プローブを選定した。

菌培養液の 10 倍希釈系列を作り、4 段階の濃度 ($10 \sim 10^4$ 倍) に調製した。原液 (1.5 mL チューブ 2 本分)、 $10 \sim 10^3$ 倍希釈液それぞれ 900 μ L、 10^4 倍希釈液 1000 μ L をキレックス樹脂、非シリカ膜、およびシリカ膜の精製キットを用いて、それぞれ DNA を精製した。キレックス樹脂は、細菌用精製手順に従って DNA を精製した。非シリカ膜は、組織培養細胞および動物組織用精製手順に従って DNA を精製した。シリカ膜は、グラム陰性菌用精製手順に従って DNA を精製した。それぞれの試薬において 3 回ずつ精製を行った。精製後は滅菌超純水を用いて、原液の 10 倍希釈系列を作り、4 段階の濃度 ($10 \sim 10^4$ 倍) に調製した。

液体培地を用いて菌培養液を希釈後に精製した DNA (原液、 $10 \sim 10^4$ 倍希釈) と精製後に滅菌超純水を用いて希釈した DNA (原液、 $10 \sim 10^4$ 倍希釈) を鋳型として定量 PCR を行った。PCR 反応条件は、LightCycler Nano を用いて 2-Step Amplification で行った。95°C で 10 分間の熱処理を 1 回実施した。

後、熱変性を 95°Cで 10 秒間、アニーリングおよび、伸長反応を 60°Cで 30 秒間、この 2 つのステップを 1 サイクルとして 50 回繰り返した。全てのサンプルについて 3 回の定量 PCR を行った。

実験 3：魚病細菌による仔魚飼育への影響

ヒラメ卵は各水槽 (100 L) に 1100 個ずつ收容した。飼育水 (100 L) 中に 3~8 個体 / mL のワムシが存在するように、試験区では、魚病細菌含有ワムシ、対照区は通常培養ワムシを給餌した。

飼育終了時のヒラメ仔魚 (24~25 日齢) をピーカーで約 1~8 個体ずつ採取し、計数してから飼育水に浸した網または飼育水を入れたピーカー、バケツに收容した。この作業を繰り返し、水槽内の全てのヒラメ仔魚を計数した。

回収したヒラメ仔魚を塩分 36 の滅菌海水 2 L を用いて洗浄した。洗浄後、1 / 2000 濃度に希釈した FA 100 を含む滅菌海水 200~600 mL が入っているタッパーまたはピーカーに移し、深麻酔により仔魚を安楽死させた。これらのヒラメ仔魚を Davidson 固定液の入ったスクリー管に移して冷蔵庫 (4°C) にて静置し、固定した。固定後に洗浄し、両試験区から無作為に選んだ 80 個体ずつのヒラメ仔魚の体長をデジタルマイクロスコープを用いて測定した。測定したヒラメ仔魚の体長をもとに、t 検定を行った。

実験 4：仔魚腸管の組織切片解析

飼育終了時に固定し、70%エタノールに置換したヒラメ仔魚をアルコール系列(70、80、90、95、100%エタノール)で脱水および脱脂した。100%エタノールに置換後、仲介剤に置換し、室温にて保存した。安息香酸メチルに置換後、病理組織用包埋剤パラベット 60 GR (以下パラフィン) を用いて、ベンゼン (各 15 分)、ベンゼン・パラフィン (1:1、30 分)、パラフィン (各 60 分) と順次漬けて置換した。パラフィンに置換後、ヒラメ仔魚の腹部側を下にして、包埋した。包埋後、固まったパラフィンを整形して、台木付けを行い、3 μm の厚さで薄切して組織切片を作製した。乾燥後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、マリノールを用いて封入した。薄切切片は、Axioskop を用いて、各飼育期間の対照区および魚病細菌給餌区のヒラメ仔魚 3 尾ずつの腸管の写真を撮影した。さらに、BZ-X710 を用いて、画像解析を行い、腸管の面積に対する輪状襞の面積および外周長に対する内周長の比率を算出した。

4. 研究成果

実験 1

泳動後のバンドパターンについて、類似性の有無により BSI を算出した。その結果、ヒラメ分離株の類似性は、ウナギ分離株と 0.6 と高く、マダイ分離株とは 0.15 と低い値となった。ウナギ分離株とマダイ分離株では 0.14 と低い値であった。このことから、マダイ分離株は、ヒラメおよびウナギ分離株とは遺伝的に大きく異なることが明らかとなった。この結果より、本研究ではヒラメ分離株を使用した。BSI は以下の式で算出した。

$$BSI = 2 \times N_{XY} / (N_X + N_Y)$$

N_{XY} : X 菌株と Y 菌株の共通バンド数

N_X : X 菌株の全てのバンド数

N_Y : Y 菌株の全てのバンド数

BSI が 1 の時に同一となり、0 であれば類似性は無しとなる。

実験 2

3 種類の DNA 精製試薬において、菌液希釈と“DNA 希釈”を鋳型として定量 PCR を行った検量線を図 1 に示した。

キレックス樹脂を用いて精製した DNA において、“菌液希釈”の DNA 量は、同じ菌濃度換算の“DNA 希釈”と比較して約 10%減少していたが、3 種類の DNA 精製試薬の中では最も Ct (Threshold Cycle) 値が低く、DNA の回収率が高いことが分かった。非シリカ膜およびシリカ膜では、キレックス樹脂と比較して“DNA 希釈”の Ct 値が高く、DNA の回収率が低かった。また、どちらも同じ菌濃度換算の“DNA 希釈”と比較した時の“菌液希釈”の DNA 量の差は、Ct 値が高くなるにつれて大きくなっていった。

非シリカ膜では、菌濃度約 1.0×10^4 cells/μL の時、同じ菌濃度換算の“DNA 希釈”と比べて Ct 値は 2~3 上昇、すなわち DNA 量が 67~87%に減少した。

キレックス樹脂の検量線を用いて、非シリカ膜とシリカ膜の DNA 量の減少率を比較すると、“菌液希釈”と“DNA 希釈”では、どちらも Ct 値が高くなるにつれて差が大きくなり、“菌液希釈”において、非シリカ膜では 80~97%および、シリカ膜では 76~80%、“DNA 希釈”において、非シリカ膜では 74~87%およびシリカ膜では 80~89%の DNA 量が減少して算出された。これらの結果より、定量 PCR による細菌の計数には、キレックス樹脂を用いた DNA 精製が最適であることが明らかとなった。

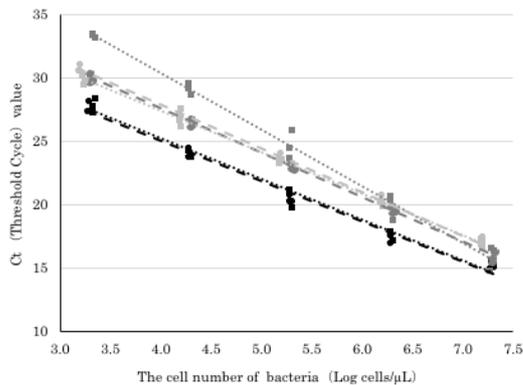


図1 3種類のDNA精製法で精製した魚病細菌ゲノムDNAの定量PCRの検量線

■は菌液希釈、●はDNA菌液希釈、

黒色の線はキレックス樹脂、濃い灰色の線は非シリカ膜、薄い灰色の線はシリカ膜を示す。r²値およびp値は、キレックス樹脂ではそれぞれ、菌液希釈で0.985、3.75E-13、DNA希釈で0.986、1.64E-13、非シリカ膜ではそれぞれ、菌液希釈で0.987、1.04E-13、DNA希釈で0.997、9.76E-18、シリカ膜ではそれぞれ、菌液希釈で0.995、1.98E-16、DNA希釈で0.997、1.56E-17であった。(p < 0.01)

実験3

飼育1回次の生残率は対照区と試験区はそれぞれ、92、82%となり、魚病細菌添加による生残率に大きな違いは無かった。飼育終了時の平均体長は、対照区、試験区でそれぞれ、7.054 ± 0.725、7.049 ± 0.832 (mm)となり、有意差は無かった。これらのことから、魚病細菌の添加は、仔魚の生残および成長に与える影響は無いことが明らかとなった。

実験4

組織切片を観察した結果、各飼育期間の対照区および魚病細菌給餌区(試験区)の免疫細胞数に違いは見られず、炎症も見られなかった(図2)。画像解析を行い算出した腸管の面積に対する輪状襞の面積は、魚病細菌10⁷添加では対照区、試験区ともに0.60、魚病細菌10⁸添加では対照区で0.63、試験区で0.70であった。腸管の外周長に対する内周長の比率は、10⁷添加では対照区、試験区ともに1.22、10⁸添加では対照区で1.26、試験区で1.28であった。これらの結果より、魚病細菌を給餌させても仔魚の腸管組織に大きな違いは生じないことが明らかとなった。

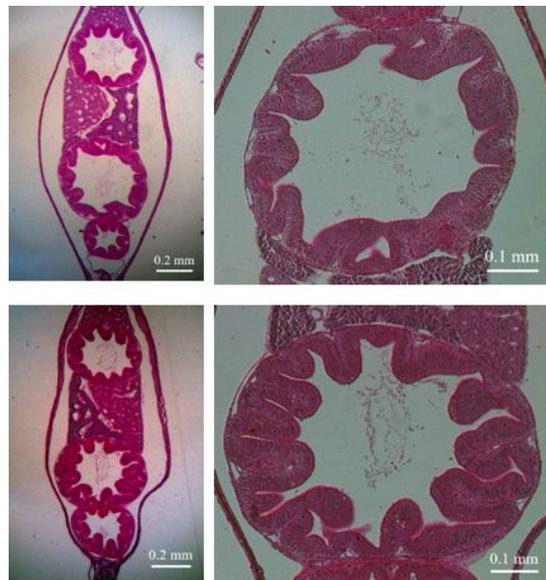


図2 ヒラメ仔魚の腸管組織切片

A: 対照区 腸管全体、B: 対照区 *拡大。
C: 試験区 腸管全体、D: 試験区 *拡大。
画像の上は頭部側、下は尾鰭側であり、A~Dはいずれも肛門側から前額面に沿って薄切した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) 朝重 紅音、菅 向志郎、金井 欣也 : 異なるDNA精製法が定量PCRによる *Edwardsiella tarda* の計数に与える影響. 長崎大学水産学部研究報告(査読無)99, 2018, pp. 7-11
<http://hdl.handle.net/10069/37991>

(2) C. Tu, K. Suga, K. Kanai: A multiplex PCR assay for differentiation of *Streptococcus parauberis* serotypes. Fish Pathology(査読有)50(4), 2015, pp. 213-215
<https://doi.org/10.3147/jsfp.50.213>

〔学会発表〕(計2件)

(1) 朝重 紅音、菅 向志郎、金井 欣也 : 異なるDNA精製法が定量PCRに与える影響. 平成29年度日本水産学会九州支部大会、2017年12月2日「長崎大学水産学部(長崎県・長崎市)」

(2) 菅 向志郎、榎津 晨子、金井 欣也 : 魚病細菌に対するウルトラファインバブルの効果. 平成29年度日本魚病学会春季大会、2017年3月11日「日本大学生物資源科学部(神奈川県・藤沢市)」

6 . 研究組織

(1)研究代表者

菅 向志郎 (SUGA, Koushirou)
長崎大学・
水産・環境科学総合研究科 (水産)・准教授
研究者番号：60569185

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

金井 欣也 (KANAI, Kinya)
長崎大学・
水産・環境科学総合研究科 (水産)・教授
研究者番号：40145222

阪倉 良孝 (SAKAKURA, Yoshitaka)
長崎大学・
水産・環境科学総合研究科 (水産)・教授
研究者番号：20325682

(4)研究協力者

無し