

令和元年6月12日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14964

研究課題名(和文) 魚類糞便を用いた健康診断法の開発：魚からのストレスメッセージを非侵襲的に読み解く

研究課題名(英文) Development of a novel method to invasively evaluate the health condition of the fish using fish stool multifaceted analysis

研究代表者

羽野 健志 (Hano, Takeshi)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・瀬戸内海区水産研究所・主任研究員

研究者番号：30621057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、魚類(マダイ)をモデル生物として、実験生物に全く痛みを与えずに環境ストレス(有害化学物質、高密度)を糞便中の変化から検出・評価する方法を開発することを目的として行った。室内環境で2つの環境ストレスに負荷したマダイの糞便中の代謝物、腸内細菌の栄養資化能、組成を調べた結果、いずれの調査項目も有意に変化していた。さらに、屋外環境で行った高密度試験では、糞便採取のタイミングが糞便中の変化を検出するうえで重要であることも明らかとなった。これらの結果から、環境ストレスに呼応して腸内環境は変化すること、適切なタイミングで糞便を採取すれば、環境ストレスを糞便中の変化から検出できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来は不要な排泄物として処分されてきた魚類糞便に着目し、その変化から健康状態を診断する手法の開発を目指して行った。海産魚(マダイ)に実環境中で想定される環境ストレス(化学物質、密殖)に曝し、糞便中の代謝物組成、腸内細菌叢を調査した結果、これらの指標が変化することを見出した。すなわち、魚の健康の異常を、糞便により非侵襲的に検出できる可能性が示唆された。将来的には、養殖現場での適用、例えば、養殖マグロなど慎重な取り扱いが求められる商品の健康診断への適用や、生簀内の糞便から生簀内の環境の健全度を診断する技術への適用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a novel method to invasively evaluate the health condition of the fish using fish stool analysis. Marine teleost aquaculture fish, *Pagrus major*, were reared under two distinct environmental stresses: harmful chemical exposure and high stock density. Feces collected from the fish were examined the alterations of their metabolite content, carbon source utilization by microbiota, and microbial community. First, fish were exposed to phenanthrene, one of toxic polycyclic hydrocarbons, for 2 weeks. As a result, fecal parameters, in accordance with the increased levels of stress markers, dramatically changed. Next, fish were reared under varying densities for 3 weeks: low (5 g/L) and high (15 g/L). We observed growth inhibition as well as alteration of fecal endpoints in the high stock density treatment. This study provides further insight into the effective use of fecal samples to potentially determine farmed fish health.

研究分野：水産生物環境学

キーワード：糞便 環境ストレス 代謝物 腸内細菌 非侵襲的評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生物体の健康状態が腸内細菌叢によって創造される「腸内環境」と密接に関連していることが明らかにされている (Fukuda et al. Nature 2011)。現在、生物体からの健康状態に関するメッセージを解読するべく、注目を集めているのが腸内環境の通行手形である「糞便」である。

「健康状態を知る」ことは「異常を検出する」ことに直結する。実環境中の水産生物は有害化学物質や貧酸素など様々な環境ストレスに曝されており、それらと生物体の「異常」を関連づける数多の研究が室内外で行われている。しかし、魚類の場合サンプリング時のハンドリングによるストレスが特に大きいため、環境ストレスによる「異常」のみを純粋に検出することは困難を極める。そこで、申請者が注目したのが、「触れず、殺さず」に健康状態に関する多くの情報を得ることのできる「糞便」である。しかし、魚類において「糞便」を環境ストレス影響指標として捉えた研究例はなく、またこれらを融合・集約した研究はこれまで全く行われてこなかった。

2. 研究の目的

魚類をモデル生物として、環境ストレスを与えた生物体の糞便中の細菌叢、代謝物の変化を、生物体内で生じた「異常」のメッセージとして読み解き、健康診断に適用する新たなストレス影響評価手法の開発を目的とする (図-1)。

3. 研究の方法

(1) 対象生物と方法

養殖主要魚種であり、かつ毒性試験の海産魚モデルとして使用推奨種であるマダイ (*Pagrus major*) を用いた環境ストレス負荷試験 (有害化学物質曝露、過密養殖) を行う。

以下、計画1) - 3) の実験を行い、以下の項目、について検討する。

以下に示す既知のストレスマーカーの変化を調べ、生物体へのストレス影響を評価する。計画2) 3) においては、成長指標 (全長・体重) も評価する。

計画1): チトクロム P450^{*1}、SOD 活性^{*2}

計画2) 3): SOD 活性

糞便を用いたア) メタボローム解析^{*3}、イ) 栄養資化能^{*4}、及びウ) 16SrDNA^{*5}に基づく腸内細菌叢の変化、を実施し、の環境ストレスを裏付ける指標を探索する。

【用語解説】

^{*1}: チトクロム P450: フェナントレンを含む数々の有害化学物質に誘導される薬物代謝酵素。既報 (Hano et al., 2017 Ecotox. Environ. Safety) に準じて EROD 活性を利用した比色定量法により測定する。

^{*2}: Superoxide dismutase (SOD): ストレス負荷時に細胞内に発生する活性酸素を分解するため生体内で合成される酵素。専用キットを用いて測定する。

^{*3}: メタボローム解析: アミノ酸、糖類等の内因性低分子化合物 (以下、代謝物) を網羅的に検出する手法。糞便中の各代謝物の量比からストレス影響を検出する。

^{*4}: 微生物群集の多様性を栄養要求性 (資化能) に基づき分類する手法。専用キットを用いて資化能を測定する。

^{*5}: 16SrRNA 遺伝子のこと。細菌類の系統分類の把握に利用する。

(2) 計画1) 有害化学物質曝露試験

有害化学物質には石油毒性成分であるフェナントレン (Phe) を選定し、Phe 曝露試験を屋内水槽で2週間行い、上記、について7-8日に1回の頻度で経時的に調べ、有害化学物質曝露によるストレスを糞便中の各種指標の変化から検出することを目指した。試験は水温20℃、14h明期10h暗期で行った。

(3) 計画2) 過密養殖試験 (屋内)

持続的養殖生産確保法で定められた許容飼育密度 (10 kg/m³) を参考に低密度 (約4.6 kg/m³) と高密度 (同14 kg/m³) を再現した室内水槽内で3週間行い、上記、を1, 3週目において調べ、過密養殖によるストレスを糞便中の各種指標の変化から検出することを目指した。試験は水温20℃、14h明期10h暗期で行った。

(4) 計画3) 過密養殖試験 (屋外)

低密度 (約5.1 kg/m³) と高密度 (同15 kg/m³) を再現した簡易生け簀を研究所併設の屋外水槽に設置し、自然水温、日照下で3週間行い、計画2) と同様上記、を調べた。

4. 研究成果

(1) 計画1) 有害化学物質曝露試験

血清中、及び肝臓中の SOD および EROD 活性を測定した結果、曝露区で有意に増加し、供試魚が Phe のストレスを受けていると推察された (図-2)。

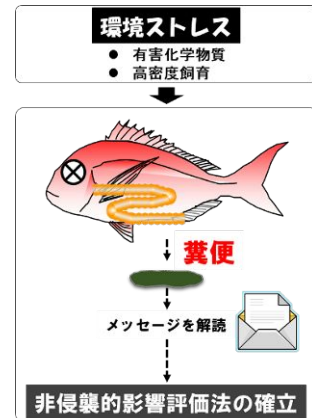


図-1 研究イメージ

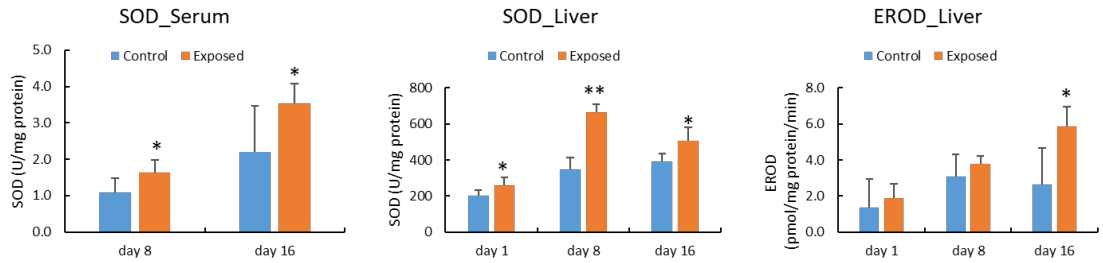


図-2 血清中 SOD，肝臓中 SOD，肝臓中 EROD 発現量 *: $p<0.05$, **: $p<0.01$

糞便中の変化：経時的に糞便の変化を確認したところ、1週目の曝露区で糞便が緑色を呈する現象が観察された（図-3、2週目には観察されず）。これは赤血球中のヘモグロビンの生分解性生物色素でビリベルジン（緑色）から生成されるビリルビン（茶色）が、抗酸化作用により自身は還元されビリベルジンが再度生成され糞便中に交じり排泄されたためと推察される。

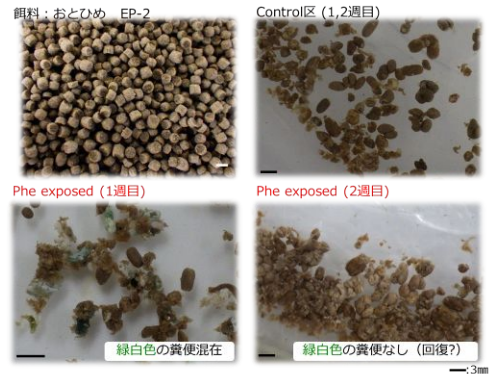


図-3 糞便の外観

ア) メタボローム解析：試験に先立ち、海水魚の糞便から代謝物を牽牛に検出するサンプルの前処理法を確立した（図-4）。解析の結果、ストレスに対応するためのエネルギーを補給する

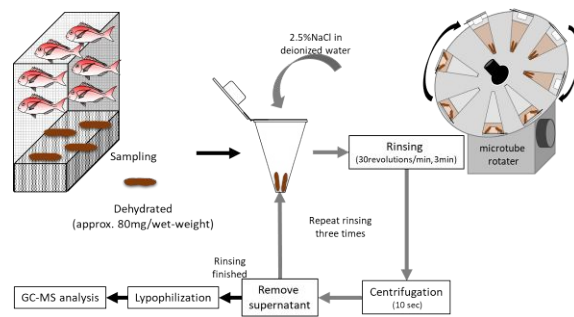


図-4 糞便の前処理方法

ための応答の結果と推察されるアミノ酸や糖類の減少、ブトレシン（生理活性アミン）（図-5） - トコフェロール（抗酸化物質）が曝露区で有意に減少した。イ) 栄養資化能：全資質の18%が変化し、特に、ブトレシン資化能が顕著に増加した（図-5）。以上を統合すると、メタボローム解析で見られたブトレシンの減少は、腸内細菌により餌料中のブトレシンの要求量が高まり積極的に消費された結果であると推察され、両者で合理的に説明が可能である。

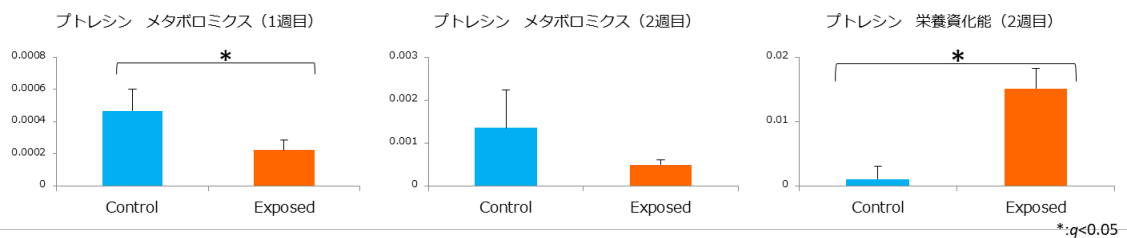


図-5 ブトレシンのメタボローム解析（左、中央）、資化能（右）の結果 縦軸は総体ピーク強度（左、中央）及び相対蛍光量（右）

ウ) 腸内細菌叢：1週目曝露区では、Gamma-Proteobacteria の割合が増加し、多様性指数も低くなる傾向が認められた。一方、2週目曝露区では Bacteroidetes、Alpha および Epsilon proteobacteria が占める割合が増加した（図-6）。

このことから、Phe に対応して腸内環境も変化しており、ストレスに対応する腸内環境の変化が推察された。

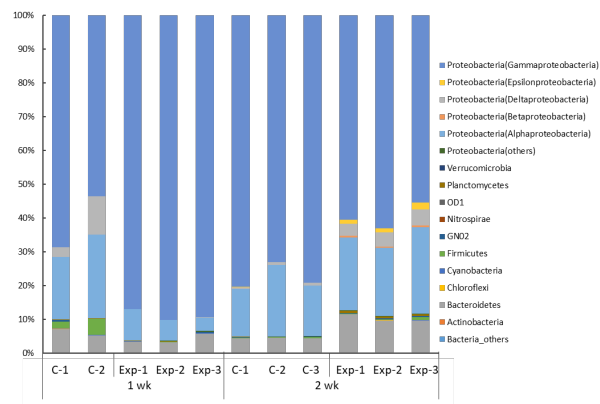


図-6 腸内細菌叢の変化

(2) 計画2) 過密養殖試験（室内）
成長指標：試験開始2週目より低密度区の個体の平均体重が高密度区に比べ統計学的に有意に増加した（試験終了時で約10%増）。また、肝臓中の SOD が1週目のみに高密度区で有意に増加した。

さらに高密度区では外観上傷やヒレの擦れが散見されたことから供試魚が過密養殖によりストレスを受けていると判断した。

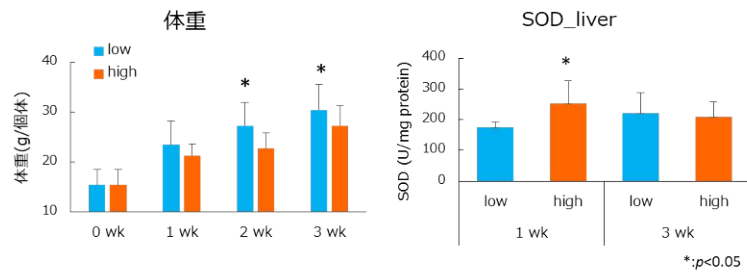


図-7 飼育写真、体重、肝臓中 SOD 発現量

糞便中変化

ア) メタボローム解析：糞便から検出された 97 代謝物のうち、3 週目で 8 代謝物が変動していた。その中でも、N-アセチルグルコサミンが高密度区で有意に増加した。当該代謝物は、餌料中のキチンの分解で生成され、ヒアルロン酸（軟骨成分）の原料であり、速やかに生物体に吸収・利用される。高密度区での増加は、密殖で成長が抑制され、生物体に利用されずに糞便として排泄されたものと推察される。

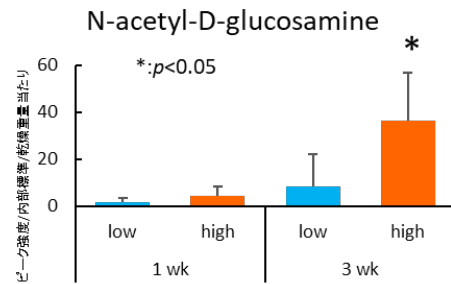


図-8 N-アセチルグルコサミンの変化

イ) 腸内細菌の資化能：1, 3 週目で資化能を調査したところ、3 週目で全資質の 16% が変化し、主成分分析では顕著な 2 つのクラスターを形成した。

ウ) 細菌叢の変化：高密度区で gamma proteobacteria が占める割合が 3 週目で顕著に増加し (図-9) また、多様性指数も減少した。

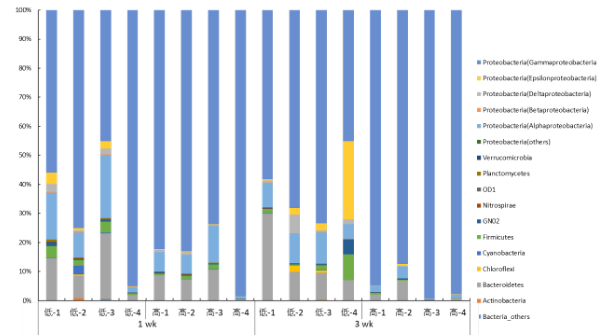


図-9 腸内細菌叢の変化

以上の結果、密殖により生物体 (マダイ) は成長抑制によるストレスを受けており、それらが裏付けられる形で腸内環境が変化していることが推察された。

(3) 計画3) 過密養殖試験 (室外 図-10)



図-10 屋外水槽に設置した生簀と生簀内の供試魚

成長指標：試験終了時に低密度区の個体の平均体重が高密度区に比べ統計学的に有意に増加した (図-11)。肝臓中および血清中の SOD は顕著に変化しなかったものの、高密度区では外観上傷やヒレの擦れが散見されたことから供試魚が過密養殖によりストレスを受けていると判断した (図-12)。

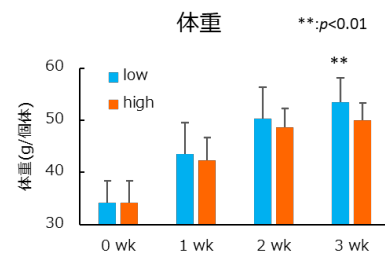


図-11 体重の変化

糞便中の変化：ア) メタボローム解析、イ) 腸内細菌の資化能、ウ) 細菌叢解析では、密殖により生物体 (マダイ) は成長抑制 (ストレス) を裏付ける変化を糞便中から検出することはできなかった。これは、サンプリング時の腸内環境がそれぞれストレスを感じる前 (1 週目) ストレスに対応して腸内環境がすでに変化し、正常

に戻った後（3週目）であると推察され、ストレスに呼応した糞便中の変化を捕捉するにはサンプリングのタイミングが重要であることが示唆された。



図-1 2 低密度（上段）と高密度（下段）の供試魚の外観

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Takeshi Hano, Mana Ito, Katsutoshi Ito, Motoharu Uchida Sample treatment optimization for fish stool metabolomics, Journal of chromatography B, 査読有, 1092, 2018, 258-267 <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.06.014>

〔学会発表〕(計4件)

羽野健志、伊藤真奈、伊藤克敏、内田基晴 魚類糞便を用いたストレス評価手法の検討～高密度飼育の影響を非侵襲的に検出する～平成31年度日本水産学会春季大会 2019年
羽野健志、伊藤真奈、伊藤克敏、内田基晴 メタボローム解析に資するための魚類糞便の前処理方法の最適化～平成30年度日本水産学会春季大会 2018年

羽野健志、伊藤真奈、伊藤克敏、内田基晴 多環芳香族炭化水素（フェナントレン）曝露による魚類糞便中代謝物・細菌叢の変化～ストレス影響の非侵襲的な評価手法の確立を目指して～第23回日本環境毒性学会研究発表会 2017年

羽野健志、伊藤真奈、伊藤克敏、内田基晴 魚類糞便を用いたストレス評価手法の検討～有害化学物質の影響を非侵襲的に検出する～平成29年度日本水産学会春季大会 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

〔その他〕ホームページ等：第23回日本環境毒性学会ポスター賞受賞（H29.9.2）
<http://feis.fra.affrc.go.jp/seika/29.09.02postersyo/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：伊藤 克敏
ローマ字氏名：Ito Katsutoshi
所属研究機関名：国立研究開発法人
水産研究・教育機構
部局名：瀬戸内海区水産研究所
職名：主任研究員
研究者番号：80450782

研究分担者氏名：伊藤 真奈
ローマ字氏名：Ito Mana
所属研究機関名：国立研究開発法人
水産研究・教育機構
部局名：瀬戸内海区水産研究所
職名：研究員
研究者番号：60735900

研究分担者氏名：内田 基晴
ローマ字氏名：Uchida Motoharu
所属研究機関名：国立研究開発法人
水産研究・教育機構
部局名：瀬戸内海区水産研究所
職名：主幹研究員
研究者番号：70371961

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。