

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380112

研究課題名 (和文) 人工培養法を用いた海産白点虫の宿主—寄生体関係および防除に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on host-parasite relationship and control of *Cryptocaryon irritans* using artificial culture technique

良永 知義 (YOSHINAGA TOMOYOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20345185

研究成果の概要 (和文)：

海産魚の白点虫 *Cryptocaryon irritans* の in vitro 培養法を利用して、本寄生性繊毛虫によって引き起こされる海産魚白点病における宿主—寄生体関係ならびに予防治療に関する研究をおこなった。培養系内で虫体の餌となっている魚類細胞はアポトーシスを生じていることが、形態学、アポトーシスの特異的検出法 (Tunnel 法)、核 DNA の泳動像から確認され、本虫が宿主細胞にアポトーシスを引き起こし、これを餌として利用していることが強く示唆された。

In vitro 培養法を用いて、薬剤のアッセイをおこなったところ、イオノフォア系の抗生物質に虫体の殺作用があることが示された。そこで、イオノフォア系抗生物質であるサリノマイシンナトリウムとセンジュラマイシンについて、その経口投与のヒラメへの安全性を検討し、さらに、経口投与の宿主内虫体への影響を調べたところ、サリノマイシンナトリウムはヒラメに安全な濃度である飼料中濃度 200ppm の経口投与で、駆虫効果と成長抑制効果があることが示された。これらの結果に基づき、サリノマイシンナトリウムによる海産白点病の予防・治療効果をヒラメを用いて検討したところ、死亡の遅延効果が確認された。

研究成果の概要 (英文)：

We conducted a series of studies on *Cryptocaryon irritans*, the parasitic ciliate causing white spot disease of marine fish, using an in vitro culture technique for the ciliate, which we had developed. For analyses of host-parasite relationship between the parasite and fish, we examined the cultured fish cells that were used as feed of the parasite and transformed by the parasite in the medium used for in vitro culture, with morphology, DNA electrophoresis of genomic DNA and a detection method of apoptosis (TUNNEL method). Results obtained by the examination strongly indicated that the parasite cause apoptosis in fish cells and utilizing apoptotic cells as food. We developed an in vitro screening method of drug candidates for the disease utilizing the culture method. Using the method, we assayed in vitro efficacies of anti-protozoal drugs used for human and domestic animals and found that ionophoric antibiotics had killing effect on the parasite. After determining the safe concentration of oral administration of two ionophoric antibiotics, or sodium salinomycin and sodium semduramicin, in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, we examined the effects of oral administration of the two antibiotics on the parasitic stage of *C. irritans* in Japanese flounder and found killing effect and growth-inhibiting effect in the former antibiotic. Based on the these findings, we examined the efficacy of salinomycin for prevention and treatment of white spot disease of marine fish, in which we fed flounders artificial food pellets supplemented with salynomycin at 200 ppm. In the experiment, salynomycin significantly retarded death of flounder, indicating the drug can be a very good candidate drug for future medication of the disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
平成19年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成20年度	3,000,000	900,000	3,900,000
平成21年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：海産白点虫; *Cryptocaryon irritans*; in vitro 培養 ; *Miamiensis avidus*; 化学療法 ; ワクチン

1. 研究開始当初の背景

海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* は絶対寄生性の繊毛虫で、ほとんどの海産硬骨魚に寄生し、その重篤な寄生は宿主の死亡を引き起こす。

この寄生虫は1930年代に日本で発見された種であるが、現在では世界中に分布する種として知られている。本種による疾病、海産白点虫症は、元来、水族館や観賞魚水槽等の閉鎖的な環境で多発するとされていた。しかし、平成16年に高知県野見湾でカンパチを中心に11億円、平成15年には和歌山県の大島漁場でマダイに2億3千万円の被害を与えるなど、近年は海面生簀養殖でも頻発し大きな産業被害を出し、地域経済に影響を与えることも多い。また、この寄生虫病は持続的養殖生産確保法でも養殖環境の指標疾病として指定されており、海産魚の重要疾病のひとつとなっている。さらに、温水性海産魚の海面養殖が世界的に盛んになるにつれ、世界的にも注目を集めるようになった。

しかし、本虫に関する研究は非常に遅れており、有効な治療法や薬剤およびワクチンは開発されていない。海面魚類養殖では、網生簀を発生海域から潮通しのよい場所へ移動することが唯一の有効な対処法とされているが、通常の養殖漁場は生簀密度が高いため、この方法は実施困難である。そのため、一旦発生すると大被害につながることが多い。

研究の遅れの最も大きな原因は、他のほとんどの魚類寄生虫と同様に、人工培養法 (*in vitro* 培養法) が開発されていないことにある。そのため、実験材料の入手をはじめとして、研究・実験の全ては虫体を魚に人工的に感染させる実験感染系を用いて

行わなければならない。このことが研究の隘路となっており、重要な疾病であるにもかかわらず、培養可能なウイルスや細菌による疾病に比べて、研究グループの数も研究報告例も少ない。

応募者は、平成15年から平成17年に実施対科学研究補助費基盤研究 (C) において、海産白点虫の研究を飛躍的に進展させるための技術として本虫の人工培養法の開発に挑戦し、ゲル状の培地を重層した魚類培養細胞を本虫の餌とする人工培養法 (仮称：ゲル重層培養法) を開発し、虫体を発育・成長させることに世界で先駆けて成功した。さらに、人工培養法を用いて成長させた虫体を感染期幼虫にまで発育させ、魚に実験的に感染させることにも初めて成功した。

そのため、この開発した培養法を用いて海産白点病に関する基礎研究から防除のための応用研究を大きく推進できることが期待された。

2. 研究の目的

人工培養法では本虫が細胞を摂食し成長する様子を直接観察できる。そこでこの利点を利用して、宿主と本虫の宿主-寄生体関係の解明のための研究を、特に宿主細胞のアポトーシス(細胞の自殺)と本虫の摂餌機構に注目して行った。また、薬剤開発の一環として、人工培養法を用いた薬剤のスクリーニング法の開発を行うとともに、実際に薬剤の有効性のスクリーニングを行うとともに、スクリーニングによって有効であることが期待された薬剤について、その魚への安全性と有効性を検討した。さらに、ワクチン開発に資することを目的に、人工培養法を用いて増やした虫体による魚類の免疫法を検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 宿主-寄生体関係の解析

*C. irritans* が寄生した魚の細胞のアポトーシスは、*C. irritans* を感染させたブラックモリ *Poecilia hybrid* の鱗を常法に従ってパラフィン包埋し、この切片に TUNEL 法による蛍光染色を施してアポトーシス細胞を検出した。*In vitro* 培養における FHM 細胞のアポトーシスは、細胞を生きのまま染色できるヘキスト染色液で *in vitro* 培養系内の FHM 細胞と *C. irritans* を染色した後、FHM 細胞や *C. irritans* の核形態と、*C. irritans* の摂餌生態の観察を行った。この観察により、*C. irritans* 培養中の培養系から剥離して浮遊した FHM 細胞にアポトーシスが起きていることが予想されたので、その細胞をスライドガラス上に載せ、上記と同様の TUNEL 法を用いてアポトーシス細胞を検出した。さらに、魚体離脱虫体であるプロトモントの小胞に含まれる DNA 断片の大きさを解析した。いて詳細に調べた。

#### (2) 薬剤のスクリーニングと有効性確認

##### ① 薬剤のスクリーニング

薬剤を適当な溶媒に溶解して培地のゲルに加え、そこに *C. irritans* の幼虫（セロント）を接種するという *in vitro* スクリーニング法を開発し、これを用いて原虫の駆虫薬として医学分野、獣医分野で使用されている代表的な薬剤のスクリーニングをおこなった。

##### ② 薬剤の毒性試験

上記の実験で、イオノフォア系抗生物質であるサリノマイシンが有効であることが示されたので、サリノマイシンさらには同じイオノフォア系抗生物質であるセンジュラマイシンを飼料中濃度 100, 200, 400 ppm を添加した試料でヒラメを 2 週間飼育し、毒性を検討した。

##### ③ 薬剤の宿主内虫体への影響評価

上記の実験で殺効果が見出されたイオノフォア系抗生物質であるサリノマイシンナトリウムとセンジュラマイシンをそれぞれ 200ppm 添加した飼料をヒラメ種苗に毎日 1 回 5 日間給餌した後、セロントで浸漬攻撃し、魚体内で成長し、魚体を離脱した虫体を計数した。薬剤添加飼料を攻撃前のみ与える実験と攻撃前後に与える実験を別々に行った。

##### ④ 薬剤による治療・予防効果判定

未添加飼料あるいは 200ppm サリノマイシン添加飼料を 5 日間給餌したヒラメをセロントで浸漬攻撃し、ヒラメの生残を観察した。実験にはそれぞれ 3 水槽を用い、薬剤添加飼料の給餌は実験終了時まで毎日行った。

#### (3) ワクチン開発の試み

*in vitro* 培養系を用いた虫体の大量培養

法の開発を試みたが、十分な成果が得られなかった。そこで、比較研究として、同じせん毛虫の一種で、培地内で培養可能なヒラメのスクーチカ症の原因生物である *Miamiensis avidus* を用いて、ワクチネーション効果の検討をおこなった。まず最初に、実験をおこなうために不可欠な本虫の浸漬感染法を開発した。具体的には、低塩分環境での攻撃法を検討した。さらに、ホルマリン固定した虫体を用いて、ヒラメ幼魚を免疫し、そのうえで本研究で開発した低塩分環境での浸漬攻撃をおこない、免疫の効果を検討した。

### 4. 研究の成果

#### (1) 宿主-寄生体関係の解析

魚の鱗細胞においても *in vitro* 培養の FHM 細胞においても、*C. irritans* の周囲にはアポトーシス細胞が検出された。プロトモントの小胞の DNA 解析では、アポトーシス細胞に特徴的な 180bp のラダーを確認した。*In vitro* 培養のヘキスト染色では、核濃縮を起したアポトーシス細胞を含む FHM 細胞を *C. irritans* が摂餌している様子が観察できた。

これらの結果から、*C. irritans* は宿主細胞に apoptosis をおこさせ、これを餌として接種していることが強く示唆された。

#### (2) 薬剤のスクリーニングと有効性確認

##### ① 薬剤のスクリーニング

開発した培地を用いることによって、各種薬剤の効果のアッセイが極めて容易に、かつ短期間で可能となった。このアッセイ法を用いることにより、イオノフォア系の抗生物質が駆虫効果を持つことが示せられ、駆虫薬としての有効性が示唆された。

##### ② 薬剤の毒性試験

サリノマイシンナトリウム投与区では、試料中濃度 400 ppm では、摂餌量の顕著な低下と死亡が確認されたが、200 ppm では摂餌量の若干の低下が認められたが死亡個体は現れなかった。このことから、経口投薬試験の濃度を 200ppm とした。センジュラマイシン投薬区では摂餌量の低下、死亡とも認められなかった。

##### ③ 薬剤の宿主内虫体への影響評価

サリノマイシン 200ppm 経口投与をセロントによる攻撃の 5 日前からおこなった実験区では、宿主内で成長して宿主を離脱した虫体数が有意に少なく、また、えられた虫体も小型化した。攻撃後から投与をおこなった区でも、離脱虫体数が減少したが、その減少幅は小さく、有差は得られなかった。

##### ④ 薬剤による治療・予防効果判定

サリノマイシン投与区、陰性対照区のいずれでも 100%の死亡率をしめしたが、サリノマイシン投与区では死亡開始までの期間ならびに全個体が死亡するまでの期間の遅延効

果が見られ、サリノマイシン経口投与の有効性が認められた。

以上の薬剤に関する研究の成果は、「海産魚白点病予防治療剤」という名称で、東京大学から特許出願された。

### (3) ワクチン開発の試み

1/3 海水、あるいは 2/3 海水とう低調な海水中で、ヒラメを *Miamiensis avidus* で浸漬攻撃した場合、効率よくかつ再現性よくヒラメは発病させることができた。そこで、ホルマリン固定虫体でワクチネーションしたヒラメをこの方法で攻撃したところ、ワクチネーション区ならびに非ワクチネーション区の双方において、発病と病魚の死亡が高率に認められ、ワクチン接種の有効性は確認されなかった。

## 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 3 件)

Takagishi, N., Yoshinaga, T., Ogawa, K. Effect of hyposalinity on the infection and pathogenicity of *Miamiensis avidus* causing scuticociliatosis in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. Diseases of Aquatic Organisms, 86, 175-179. 2009. 査読あり

Yoshinaga T., Akiyama, K., Nishida, S., Nakane, M., Ogawa, K., Hirose, H. In vitro culture technique for *Cryptocaryon irritans*, a parasitic ciliate of marine teleosts. Diseases of Aquatic Organisms, 78, 155-169. 2007, 査読あり

良永知義. 大被害を及ぼす海産白点病 大発生メカニズムの解明が進む. 月刊「養殖」, 2009年10月号, 22-25, 査読なし

[学会発表] (計 4 件)

Yoshinaga, T., Nishida, S., M., Nakane, M., Ogawa, K. and Hirose, H. Involvement of host apoptosis in the feeding of *Cryptocaryon irritans*, the ciliate causing the white spot disease of marine fish; *in vitro* and *in vivo* studies. 7th International Symposium on Fish Parasites, 2007年9月26日, Viterbo, Italy

Yoshinaga T. Development and utilization of an *in vitro* culture technique for studies on *Cryptocaryon irritans*, the causative agent of white spot disease of

marine fishes 7<sup>th</sup> Symposium on Diseases on Asian

Aquaculture 2008年6月25日台北(台湾)

Takagishi, N., Yoshinaga, T., Ogawa, K. Effective challenge method for *Miamiensis avidus* causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*, 第 5 回日本魚病学会国際シンポジウム 2008年10月18日東京

林賢仁・良永知義・西田早予子・小川和夫. 海産魚の白点病に対するイオノフォア系抗生物質の予防治療効果. 平成22年度日本水産学会春季大会, 2010年3月29日, 藤沢

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 海産魚白点病予防治療剤

発明者: 良永知義, 林賢貞, 西田早予子

権利者: 東京大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-016279

出願年月日: 平成 22 年 1 月 28 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

良永知義 (東京大学・大学院農学生命科学研究科)

研究者番号: 20345185