

平成 22 年 4 月 27 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20710025

研究課題名 (和文) 重油の魚類感染症および神経異常発生に与える影響

研究課題名 (英文) Effects of heavy oil on occurrence of infectious disease and nervous development anomaly

研究代表者 北村 真一 (KITAMURA SHIN-ICHI)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・准教授

研究者番号：40448379

研究成果の概要 (和文)：重油暴露したウイルス保有魚の斃死率は対照区と比較して有意に上昇することが明らかになった。マイクロアレイ実験から、斃死の原因はNK細胞のアポトーシス誘導低下によるウイルス病であることが示唆された。一方、重油暴露したヒラメ胚から孵化した仔魚は三叉神経の異常が認められ、その原因は神経ガイダンスに関わる *sema3A* の発現プロファイルの変化が関与していることが明らかにされた。

研究成果の概要 (英文)：In this study, the effects of heavy oil on occurrence of fish infectious disease and nervous development anomaly were investigated. From the result of an experimental infection, we found that heavy oil exposure induced high mortality in viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV)-carrier Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. The expressions of antiviral activity related genes such as interferon and apoptosis induction were relatively lower in the dual group (virus + heavy oil) compared with those of VHSV infection group. Thus, the antiviral activities were suppressed in the fish affected by the dual stressor, which might lead to extensive viral replication in the host cells, resulting in the occurrence of the disease. On the other hand, we observed nervous developmental anomaly in the fish hatched from heavy oil-exposed embryo. From the result of *in situ* hybridization experiment using *sema3A* probe, it is suggested that changes of the gene expression profile was responsible for the anomaly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：重油・ヒラメ・感染症・神経発生

## 1. 研究開始当初の背景

海洋の代表的な化学物質汚染として、タンカー事故等による重油汚染が挙げられる。例えば、日本では1997年に島根県沖で座礁したタンカー“ナホトカ号”から流出したC重油による深刻な海洋汚染が報告されている。またスペインでは、2002年にプレステージ号の沈没により数万トンの重油流出が起こるなど、世界全域で年間に海洋中に流出する総重油量は約500万トン程度であると見積もられている。

重油はベンゼンやナフタレンなどの多環芳香族炭化水素(PAHs)や重金属などの毒性元素を含んでおり、成分のうちタール分はオイルボールになって海底に沈み、廃油成分が長期的に環境中に放出されることから、海洋生物に影響を及ぼすことが懸念されている。

重油を構成する成分である重金属およびPAHsが魚類の免疫系に与える影響についてはいくつかの報告があるものの、感染症の発生率に対する影響を調べた報告はほとんどない。

また、化学物質が免疫系に与える影響を調べた研究の大部分は単独の化学物質を用いて評価されたものであり、様々な物質の混合物である重油の魚類免疫系に対する影響を感染症と関連付けて研究した例はない。

一方、環境毒性学分野では、化学物質の神経発生に対する毒性に関しては遅々として進んでいないのが現状である。重油流出事故が起きた場合には、重油と魚卵は海流に同調して、海洋を漂うと考えられるために、暴露卵から孵化した仔魚は神経毒性を受けている可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

(1) 深刻な海洋汚染を引き起こす重油が真の免疫毒性と言っても過言ではない感染症の発生に与える影響を感染・暴露実験で明らかにすることを目的とする。また、上記複合ストレスによる魚類の応答を明らかにする。

(2) 魚類の胚に重油を暴露し、神経発生に対する影響を個体および分子レベルで明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)

① 重油暴露が魚類感染症の発生に及ぼす影響を明らかにするために、ウイルス保有魚に重油を暴露し、斃死率がどのように変化するかを調べた。

実験方法としては、平均体重9グラムのヒラメに、ウイルス性出血性敗血症ウイルス(VHSV)を $1 \times 10^2$  tissue culture infectious dose (TCID)<sub>50</sub>/fish および  $1 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub>/fish の濃度で筋肉内に接種した。海水温は、15度

に制御し飼育した。4日後、これらのグループを4つの区に分け、暴露なし(対照区)、0.003g/L、0.03g/Lおよび0.3g/Lの濃度で重油を暴露し、斃死率を算出した。

②次に①の実験結果を踏まえて、平均体重10グラムのヒラメ稚魚にウイルスドーズを実験①よりも低くし、同様の実験を行うとともに、複合ストレスの影響をマイクロアレイ実験で調べた。すなわち、VHSVを $1 \times 10^1$ TCID<sub>50</sub>/fishで感染し、4日後、0.03g/Lの濃度で重油を暴露し、斃死率を算出した。

暴露2日後に魚類の造血器官である腎臓をマイクロアレイ実験に供した。マイクロアレイ実験は、ヒラメの腎臓・脾臓・肝臓・脳・胚(複数の発生期)および稚魚のホールボデーの expressed sequence tags (ESTs)解析結果に基づき、11,000プローブがスポットされたプラットフォームを用いて、単色法にて行った。

心臓は、ウイルス力価の測定に用いた。ウイルス力価の測定は、ファットヘッドミノアの尾柄由来のFHM株化細胞を用いて行った。

(2) 産卵24時間後のヒラメ胚を入手し、0.01g/Lおよび0.07g/Lの濃度で重油を24時間暴露し、その後は重油を含まない海水で飼育した。孵化仔魚を回収し、一般的に神経染色に用いられるβ-チューブリン抗体を用いて神経染色を行った。また、末梢神経の異常の原因を明らかにするために、神経ガイダンス因子である *sema3A* の発現プロファイルの変化を *in situ* hybridization にて明らかにした。

## 4. 研究成果

### (1)

①ウイルスのみを感染した対照区の斃死率は、 $1 \times 10^2$ TCID<sub>50</sub>/fish では69%で、 $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/fish では81%であった(data not shown)。また、重油のみを暴露した対照区では、最高濃度の0.3g/L暴露区で25%の魚が死亡したものの、その他の濃度では斃死は認められなかった。

$1 \times 10^2$ TCID<sub>50</sub>/fish の濃度でウイルス感染したヒラメに0.003g/L、0.03g/L、および0.3g/Lの濃度で重油暴露した場合のヒラメの斃死率は、それぞれ100%、94%および100%であった。一方、 $1 \times 10^3$ TCID<sub>50</sub>/fish の濃度でウイルス感染したヒラメに0.003g/L、0.03g/L、および0.3g/Lの濃度で重油暴露した場合のヒラメの斃死率は、それぞれ75%、100%および100%であった。

本実験では、ウイルスのみの感染区の斃死率が高く、対照区と実験区で有意差が認められなかった。しかしながら、ウイルス保有魚に重油暴露を行った区では、ほぼ全ての区で

100%の斃死率が得られ、ウイルス保有魚に重油を暴露することで、斃死が誘導されることが示唆された。

②対照区、ウイルス感染区および重油暴露区の斃死率は、0%であったが、複合ストレス区の斃死率は50%であった。このことから、斃死が起こらない濃度のウイルス感染および重油暴露においても、これらが複合することによって、魚類が斃死することが明らかにされた。

複合ストレス区の斃死の原因を究明するために、生存魚の心臓中のウイルス力価を測定したところ、複合ストレス区では、ウイルス感染区と比較して、有意な差は認められなかったもののウイルス力価は高い傾向にあった( $10^3$ - $10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/g;ウイルス感染区,  $10^5$ - $10^{8.25}$ TCID<sub>50</sub>/g;複合ストレス区)。これまでの我々の研究結果から、ウイルス性出血性敗血症(VHS)で斃死した魚の心臓中のウイルス力価は $10^7$ TCID<sub>50</sub>/g以上であることが分かっている。本研究において、この値を示した魚は複合ストレス区のみであったことから、斃死の原因はVHSであることが示唆された。

次に、複合ストレス区において、なぜVHSが発症するのかをマイクロアレイ実験で調べた。その結果、ウイルス感染に対する防御反応であるNatural killer (NK)細胞によるアポトーシス誘導・インターフェロン関連遺伝子の発現量がウイルス感染区および複合ストレス区では、対照区および重油暴露区と比較して増加していた。これはウイルス感染に対する宿主の防御反応として、通常の反応である。しかしながら、興味深いことに、ウイルス感染区と複合ストレス区におけるこれらの遺伝子発現量を比較すると、複合ストレス区は、ウイルス感染区と比較して有意に発現量が低かった。特に、NK細胞がウイルス感染細胞にアポトーシスを誘導するためのパーフォリン、グランザイム、カスパーゼ酵素群などの遺伝子発現に抑制が認められた(図1)。

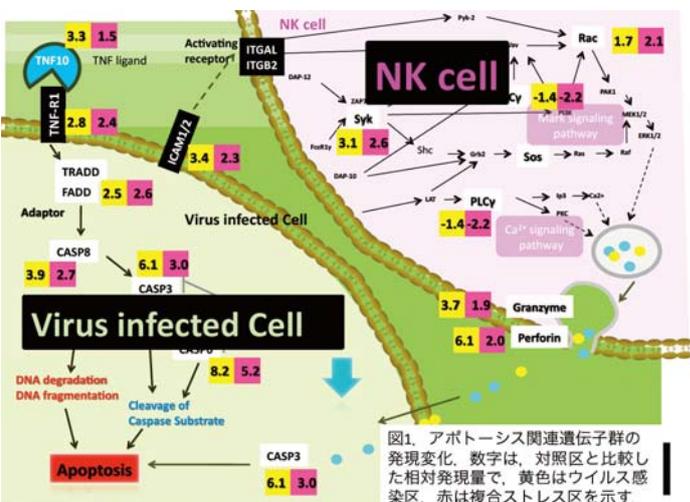


図1. アポトーシス関連遺伝子群の発現変化。数字は、対照区と比較した相対発現量で、黄色はウイルス感染区、赤は複合ストレス区を示す。

このことから、ウイルス感染区では抗ウイルス活

性が十分に働き、ウイルス複製が抑制されていると考えられるが、複合ストレス区においては、抗ウイルス関連の遺伝子発現が抑制され、ウイルスが活発に複製していると考えられた。

斃死率、ウイルス力価およびマイクロアレイ実験の結果を総合して、複合ストレス区においては、抗ウイルス活性関連遺伝子群の発現が抑制されることで、VHSVが体内で容易に複製し、VHSが発症する可能性が示された。

以上のように、本研究課題では、化学物質暴露による感染症発生メカニズムの解明に成功した。

(2) 重油暴露の神経発生異常に与える影響

重油が神経発生に与える影響を明らかにするために、0.01 g/Lおよび0.07g/Lの濃度でヒラメ胚に暴露した。その結果、対照区および0.01g/L暴露区では形態学的変化は認められなかったが(図2a, b), 0.07g/L暴露区の孵化仔魚では、脊椎が湾曲するなどの形態異常が認められた(図2c)。これらのサンプルを神経細胞を特異的に検出できるβ-チューブリン抗体を用いて神経染色したところ、対照区では正常な神経発生が観察されたが(図2d), 0.01 g/Lおよび0.07g/Lの両区において三叉神経系の迷走が認められた(図2e, f)。これらのことから、重油暴露は奇形が現れない程度の低濃度でさえ、ヒラメの神経発生に毒性を示すことが明らかにされた。

これらの神経迷走は、神経発生において重要な神経ガイダンス因子が撓乱されていると考え、*sema3A*の発現プロファイルを*in situ* hybridizationにて調べた。その結果、対照区では本遺伝子は整然と発現していた(図2 g, j)。一方、0.01 g/Lおよび0.07g/L暴露区では本遺伝子の発現は対照区と比較して広範囲に及んでおり、明らかに異なるプ

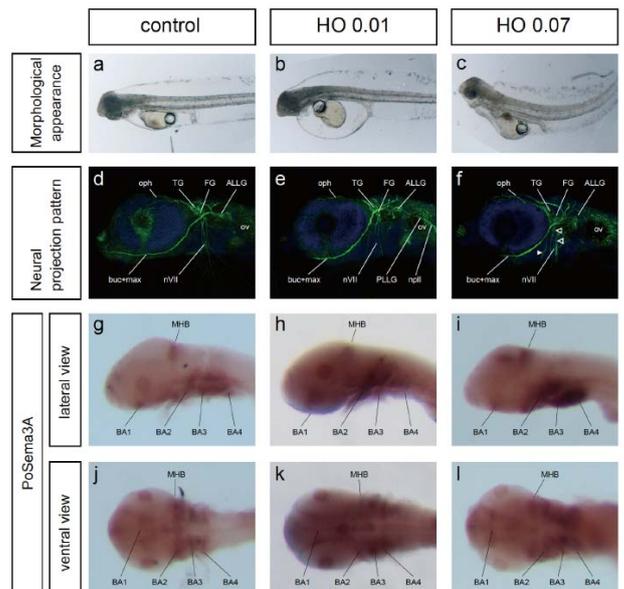


図2. 重油を暴露したヒラメの形態(a-c), 神経染色(d-f), *sema3A*の*in situ* hybridization(g-l)。

ロファイルが観察された(図 2h, k, i, l).

特にエラの周囲で顕著な異常発現プロファイルがみられた. 本遺伝子の発現異常が起こった場所は, 神経染色で確認された発生異常と同じ場所であることから(図 3), 本遺伝子の発現プロファイルの変化は神経発生異常に関わっていることが強く示唆された.

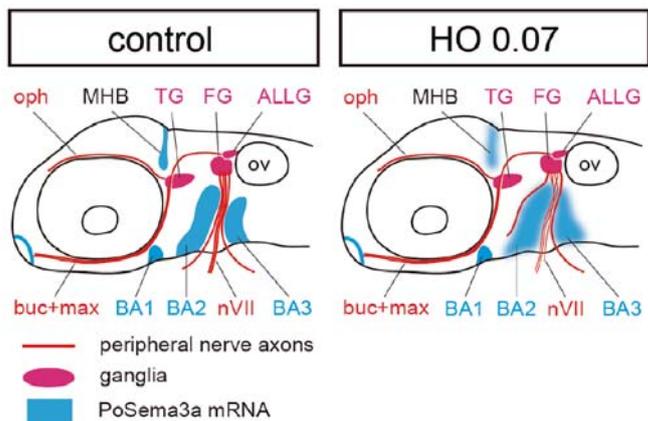


図3. 重油を暴露したヒラメの神経発生異常の模式図

以上のことから, 重油暴露は, *sema3A* の発現プロファイルに変化をもたらし, その結果として神経発生異常が起こることが示唆された. 三叉神経系は, 遊泳などに重要な役割を果たすことから, 今後は行動変化に着目した試験が必要となるであろう.

以上のように, 本課題では, 重油が魚類感染症の発生および神経発生異常に与える影響を個体・分子レベルで解明することに成功した.

#### 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1件)

①Jun-Young Song, Kei Nakayama, Yasunori Murakami, Shin-Ichi Kitamura (2008) Immune gene expression levels correlate with the phenotype. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Biological Responses to Chemical Pollutants, 1: 111-122.

HP: <http://www.terrapub.co.jp/onlineproceedings/ec/brcp/pdf/BRCF12.pdf>

[学会発表] (計2件)

①Jun-Young Song, Kei Nakayama, Yasunori Murakami, Sei-ichi Uno, Jiro Koyama,

Shin-Ichi Kitamura (2009) Effects of heavy oil pollution on outbreaks of fish infectious diseases, Aquaculture Science Meets Environmental Science, January, Ehime University.

②Jun-Young Song, Kei Nakayama, Yasunori Murakami, Shin-Ichi Kitamura (2009) Effects of heavy oil pollution on outbreaks of viral disease in fish. 第15回日本環境毒性学会・バイオアッセイ研究会合同研究発表会, 東京, 日本, 10月, 講演要旨集, 18-19.

[図書] (計1件)

Yasunori Murakami, Kei Nakayama, Shin-Ichi Kitamura, Hisato Iwata, Shinsuke Tanabe (2008) Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry Vol. 1: Biological Responses to Chemical Pollutants, TERRAPUB, Tokyo, Japan.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北村 真一 (KITAMURA SHIN-ICHI)  
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・  
准教授  
研究者番号: 40448379

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし

##### (4) 研究協力者

仲山 慶 (NAKAYAMA KEI)  
愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・  
助教  
研究者番号: 80380286

村上 安則 (MURAKAMI YASUNORI)  
愛媛大学・理工学研究科・准教授  
研究者番号: 50342861