

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 年～2011 度

課題番号：21580378

研究課題名（和文） 共棲発酵細菌の魚類インネート免疫増強による感染症防御法の確立

研究課題名（英文） Protection of infectious diseases of fish by co-cultured microbial product

研究代表者

児玉 洋（KODAMA HIROSHI）

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：20091449

研究成果の概要（和文）：*Lactobacillus paracasei*, *Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia membranifaciens* の共棲発酵培養産物を開発した。加熱不活化した培養物をコイあるいはトラフグに経口投与すると、それぞれ非定型 *Aeromonas salmonicida* による「穴あき病」、および *Enteromyxum leei* を原因とする粘液胞子虫性「やせ病」に対する防御効果を発揮した。共棲発酵培養産物は、宿主のインネート免疫を誘導することにより感染症抑制効果を発揮すると推測された。

研究成果の概要（英文）：A microbial culture was prepared by co-cultivation of *Lactobacillus paracasei*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia membranifaciens*. Oral administration of heat-inactivated co-cultured material to common carp or tiger puffer induced effective protection against infection with atypical *Aeromonas salmonicida* which causes ulcer disease, and myxosporean emaciation disease of tiger puffer caused by *Enteromyxum leei*, respectively. These results indicate that the co-cultured material, delivered in feeds, is effective in preventing infectious diseases through activation of innate immunity in fish.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用獣医学

キーワード：穴あき病，インネート免疫，感染防御，共棲発酵微生物，サイトカイン，粘液胞子虫性やせ病，*Aeromonas salmonicida*，*Enteromyxum leei*

1. 研究開始当初の背景

わが国は世界有数の水産養殖国であり、大規模な魚類養殖が行われている。しかし、種々の伝染病が多発して、毎年大きな経済的損害

をこうむっている。治療薬としての抗生物質や抗菌薬の多用は、薬剤耐性菌を出現させる危険性があるため、問題が大きい。これに対し、インネート免疫（基盤免疫）増強による感染防御能誘導は、ワクチンによる

特異免疫とともに、魚類感染症制圧のための有力な手段である。

2. 研究の目的

本研究では、*Lactobacillus paracasei*, *Saccharomyces cerevisiae* および *Pichia membranifaciens* を共棲発酵して得られる免疫賦活物質をコイあるいはトラフグに投与し、感染症を予防する方法の確立をめざす。これらは、単独投与では感染防御効果は低いが、共棲発酵により効果を発揮する。今回、コイの重要細菌感染症のひとつに位置づけられる「穴あき病」、およびトラフグ養殖で大きな問題となっている粘液胞子虫性「やせ病」をとりあげ、免疫賦活物質による感染防御効果の可能性試験を行うとともに、その免疫賦活および防御メカニズムの一端を明らかにする。穴あき病は、養殖ニシキゴイや食用コイに多発する細菌病で、非定型 *Aeromonas salmonicida* を原因とする。鱗の充出血から体表の広範な出血を経て、重度の潰瘍となり死亡する。一方、粘液胞子虫を病原とする「やせ病」に罹患したトラフグは脱水状態となり、体側筋が萎縮するとともに眼窩が落ち窪み、頬がこけ、頭骨が浮き上がるほど極度の削瘦状態を呈する。「穴あき病」および「やせ病」に対するワクチンは開発されていない。「穴あき病」に対してはこれまで抗生物質による治療がなされていたが、耐性菌の出現により有効性が著しく失われ、治療はますます困難になっている。また、「やせ病」に対する予防、治療法はない。今回、(1) 基盤免疫を増強する共棲発酵培養産物を飼料に添加してコイに与えた後、強毒 *A. salmonicida* を浸漬感染させ、感染防御試験を行う。また、感染防御メカニズムを解析する。(2) さらに、「やせ病」に関しても、本共棲発酵培養産物による感染防御効果を、野外試験により証明するとともに、その免疫賦活および防御メカニズムを解析する。

3. 研究の方法

(1) 「穴あき病」感染防御試験：本共棲発酵培養産物を飼料に添加してコイに与えた後、強毒 *A. salmonicida* を浸漬感染させ、感染防御試験を行う。また、野外試験において、共棲発酵培養産物を添加したコイ用餌料を投与しながら、「穴あき病」の発生を観察する。これらの試験において、魚の生死ならびに、体表およびえらの肉眼病変（出血、潰瘍、ほか）を観察する。死魚、および生残魚の皮膚病変部、皮膚、えらおよび内部諸臓器から菌を分離する。共棲発酵産物投与群と非投与群間で、魚の生死、病変の出現、および菌分離状況を推計学的に比較し、効果を総合判定する。

(2) 「穴あき病」感染防御メカニズム：共棲

発酵培養産物投与および対象魚の脾臓ならびに頭腎リンパ球から mRNA を抽出し、発現した IFN γ 、IL-1 β 、TNF α および CXCa 遺伝子 mRNA を real time PCR を用いて定量し、基盤免疫応答と感染防御との関連を検討する。

(3) 「やせ病」感染防御試験：共棲発酵培養産物をトラフグ用餌料に吸着させ、給餌する。餌料を投与しながら、「やせ病」の発生経過を観察する。定期的に計測を行い、病気の進行度を「削瘦指数」として数値化する。腸管粘膜の粘液胞子虫遺伝子を PCR により検出する。また、腸管粘膜塗抹標本を染色し、粘液胞子虫を検出する。血液諸性状値を自動血液生化学分析装置を用いて分析し、「やせ病」の病態を解析する。共棲発酵培養産物投与群と非投与群間で、魚の生死、「削瘦指数」の推移、および遺伝子増幅による粘液胞子虫の検出結果を推計学的に比較し、効果を総合判定する。

(4) 「やせ病」感染防御メカニズム：共棲発酵培養産物投与および対象魚の脾臓ならびに頭腎リンパ球から mRNA を抽出し、発現した IFN γ 、IL-1 β 、IL-15、および TNF α 遺伝子 mRNA を半定量 PCR で検出し、基盤免疫応答と感染防御との関連を検討する。

(5) 共棲発酵培養産物からの有効成分の分離：酸・アルカリおよびエタノール抽出、さらにゲルろ過およびイオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、有効成分を分離する。分離したそれぞれの画分について、理化学性状を分析する。

4. 研究成果

(1) 「穴あき病」感染防御効果：共棲発酵培養産物投与コイに強毒 *A. salmonicida* を浸漬感染させ、感染防御試験を行った。共棲発酵培養産物投与群では症状の程度、死亡率ともに対照群に比べ顕著な軽減が見られた（図1、図2）。サイトカイン mRNA 発現については、IL-1 β が顕著に増加していることから、マクロファージやリンパ球が活性されたと考えられた。また脾臓における CXCa ケモカイン mRNA 発現の増加から、好中球数の増加や活性化も示唆された。したがって、共棲発酵培養産物投与による非特異的基盤免疫の上昇を、「穴あき病」抵抗性を上昇させる要因の一つと推測した。野外試験においては、今回「穴あき病」の発生は見られなかったが、*Aeromonas hydrophila* 感染による死亡が見られ、死亡率は対照群に比べ、共棲発酵培養産物投与コイで有意に低かった。

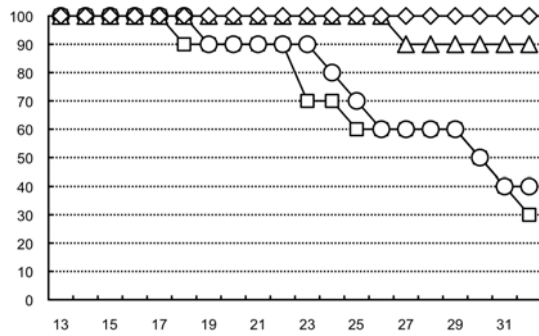


図 1. 共棲発酵培養産物のコイ「穴あき病」感染防御効果。3% (◇), 0.5% (△), 0.1% (○) を含む固形飼料を体重の 1% ずつ 25 日間投与, あるいは対照 (□) コイを *A. salmonicida* 浸漬感染。32 日間生死を観察。3% あるいは 0.5% 投与群と対照群との間に有意差あり ($P < 0.01$)。縦軸は生存率, 横軸は感染後日数。

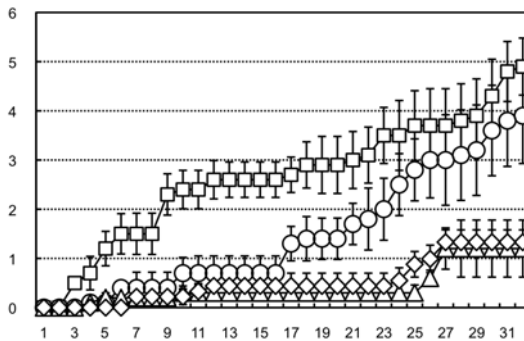


図 2. 同実験における各群コイの平均肉眼病変スコア。スコア (0) 病変なし, (1) うろこの軽微膨隆, (2) 軽度の皮膚出血, うろこの脱落, (3) 皮膚の中等度出血, 軽度の潰瘍, (4) 重度出血, 重度潰瘍, および (6) 死亡。縦軸は病変スコア, 横軸は感染後日数。

(2) 「やせ病」感染防御効果：共棲発酵培養産物の予防効果を、野外実証実験により証明した。50 日間の試験期間で、体重増加率は非投与群の 106% に対し、共棲発酵培養投与群は 123% を記録した。「削瘦指数」から「やせ病」と判定される個体の出現率は、対照の 10/98 (10.2%) に対し、共棲発酵培養産物投与群は 1/63 (1.6%) にとどまった (図 3)。PCR による粘液胞子虫遺伝子の検出率も、対照群で高かった。血液検査、肝機能検査の結果、「やせ病」罹患トラフグは、腸管への粘液胞子虫寄生による機能障害により、エネルギー源であるアルブミンやブドウ糖濃度が異常に低下し、また肝細胞が傷害されていることを発見した。サイトカイン mRNA 発現を調べた結果、炎症性サイトカインが顕著に増加していることから、マクロファージやリンパ球が活

性されたと考えられた。したがって、共棲発酵培養産物投与による非特異的免疫の上昇を、「やせ病」抵抗性を上昇させる要因の一つと推測した。陸上海水水槽を用いて実施した野外試験において、共棲発酵培養産物投与群の体重増加率は、対照と比べ有意に高かった。ただ、観察期間中やせ病の発生は見られず、PCR による粘液胞子虫遺伝子の検出も陰性であった。また、血液検査、肝機能検査の結果にも特に異常は観察されなかった。現在観察を継続中である。

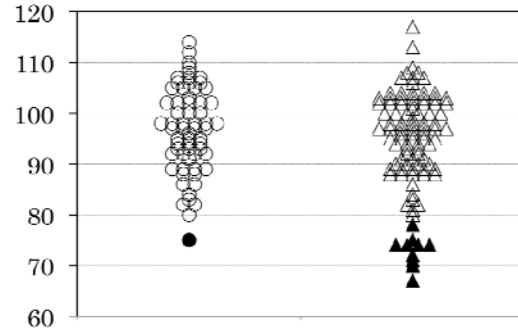


図 3. 共棲発酵培養産物のトラフグ「やせ病」発症阻止効果。1% (○) を含む固形飼料を体重の 1% ずつ 50 日間投与し、「やせ病」発症の割合を対照 (△) と比較。●, ▲ はそれぞれ「やせ病」発症個体を示し、両群の間に発症率に有意差あり ($P < 0.05$)。縦軸は削瘦指数 (胴幅 ÷ 頭幅 × 100) で、削瘦指数 80 以下を「やせ病」と判定。両群のトラフグは共棲発酵培養産物投与開始時、*Leptotheca fugu* に感染していたことを PCR で確認。

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 Kodama, H., Nakamura, H., Kashima, M., Iwasaki, T. and Togase, H. Protection against atypical *Aeromonas salmonicida* infection in common carp by oral administration of a mixed microbial culture of *Lactobacillus paracasei*, *Pithia membranifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Vet. Med. Sci., 査読有り, 73: 1319-1325, 2011.
- ② 児玉洋. トラフグの粘液胞子虫性やせ病の病態と、酵母・乳酸菌共棲発酵培養物による予防. MP アグロジャーナル, 査読無し, 第 6 号, 20-24, 2011.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 大谷健太, 矢賀部和也, 岩崎忠, 児玉洋, 堀谷勇介, 竹中重雄, 梅瀬英夫. トラフグにおける粘液胞子虫性やせ病の病態と血液性状値解析. 第 152 回日本獣医学会, 2011.9.20, 堺.
- ② Kodama, H., Nakamura, H., Kashima, M., Iwasaki, T. and Togase, H. Protection against fish infectious diseases by oral administration of a co-cultured product of bacteria and yeast. 9th Int. Vet. Immunol. Symp., 2010.8.16, Tokyo.
- ③ 児玉洋, 加島実, 中村秀顕, 岩崎忠, 梅瀬英夫. 酵母・乳酸菌混合培養物による非特異免疫応答増強効果. 第 149 回日本獣医学会, 2010.3.26, 武蔵野.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉 洋 (KODAMA HIROSHI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号 : 20091449

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :