

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450273

研究課題名(和文) ウイルス感染魚の鰓において特異的に出現する黒色顆粒の正体とその形成機構の解明

研究課題名(英文) Experimental evidence of a clinical sign peculiar to fish viral diseases characterized by the presence of intrabranchial black body under microscopy

研究代表者

一色 正 (ISSHIKI, Tadashi)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：30378319

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウイルス感染魚における鰓の黒色顆粒(以下、鰓黒点)の出現、ウイルスの組織別増殖性および死亡率の経時的観察、鰓黒点の組織学的検討、ならびに鰓黒点の単離とその性状解析等を行った。その結果、少なくとも鰓黒点は二次鰓弁の毛細血管内に存在するメラニンを含んだ物質であり、その出現は感染性ウイルスに対する生体防御能の活性化に伴って誘導されるメラニン顆粒の形成と密接に関わっていると推察された。

研究成果の概要(英文)：This study conducted observation of changes in the appearance of intrabranchial black body (IBB), the virus propagation in various organs and the mortality in the experimentally infected fish, histopathological examinations of IBBs, and characterization of IBBs isolated from the branchial cells. Light and electron microscopies revealed the presence of heterogenous IBBs comprising fine granules in the lamella capillaries and reducing substances in IBB including melanin. The appearance of IBB is suggested to be closely related to melanin synthesis induced by activation of defense mechanisms against infectious viruses.

研究分野：魚病学

キーワード：魚病 ウイルス 感染症 水産学 病理学

1. 研究開始当初の背景

海面養殖魚の主要疾病であるイリドウイルス病は、1990年に愛媛県内のマダイで初めて発生して以来、西日本各地の養殖場においてマダイ以外にもブリやカンパチなどを含む30種以上の魚類に発生している。本病の診断には、脾臓スタンプ標本のギムザ染色による異型肥大細胞の確認、あるいはモノクロナル抗体を用いた蛍光抗体法が普及し、都道府県の魚病検査機関において汎用されている。一方、光学顕微鏡による鰓の生標本観察は、細菌や寄生虫の感染の有無を調べるための必須かつ簡易な魚病検査法の一つである。鹿児島県水産試験場の魚病担当者らは、イリドウイルス病と診断されたマダイ病魚についても鰓の生標本観察を行っていたところ、本病魚の鰓には低倍率(40~200倍)で容易に確認できる微細な黒色顆粒(以下、黒点と表記する)が多数出現していることを初めて確認した。そして、蛍光抗体法でイリドウイルス病と診断された10種類の海産魚(マダイを含む)計826尾について、同様に鰓の生標本観察を行った結果、その98%にあたる812尾で鰓における黒点の出現を確認した。これらの結果に基づき、彼らは鰓の生標本観察による黒点の確認は、蛍光顕微鏡等を整備していない民間養殖場や漁業協同組合におけるイリドウイルス病の簡易診断法として利用できるのではないかと述べている。



図1. VHSVに感染したヒラメの鰓のウェットマウント標本の光学顕微鏡写真。微少な黒点が散在している。

一方、我々は1999年~2001年の3年間に魚病診断に供試した計2672尾の魚類(22種類)について、鰓の生標本観察とウイルス分離等の確定診断法とを併用して検査した結果、確定診断法によりイリドウイルス病と診断された検体魚のみならず、ウイルス性出血性敗血症(VHS)やウイルス性腹水症(VA)などの何らかのウイルス病(混合感染症を含む)と診断された症例別検体魚の91~100%において、鰓における同様な黒点の出現を確認した(図1)。なお、このような鰓における黒点の出現は、ウイルスが検出されず、細菌病あるいは寄生虫病と診断された検体魚には、全く確認されなかった。以上の検査結果から、イリドウイルス感染魚の鰓において共

通して確認されていた黒点の出現は、感染するウイルスの種類やその宿主魚種に関わりなく、ほぼ全ての魚病ウイルスに感染した各種魚類に共通して認められる現象であることが判明した。

以上のことから、本現象はウイルス感染に伴って特異的に誘導される魚類の生体防御反応を反映したバイオマーカーである可能性が高いと考えられるが、本現象に関する報告は上記以外には見あたらず、本現象を科学的に解析する研究も行われてこなかった。

2. 研究の目的

黒点の出現した魚と黒点自体を病理学的及び免疫学的な側面から解析することにより、黒点の正体とその形成機構を明らかにするための基礎的知見を得る。

3. 研究の方法

(1) 鰓黒点の出現経過の観察

VHS: 供試ウイルスにはVHSウイルス(VHSV) KRRV-9822株を用いた。供試魚には種苗生産されたヒラメ当歳魚(平均体長9.3cm, 平均体重12.3g)を用いた。実験感染では供試魚に4.05 logTCID₅₀のウイルスを1尾あたり0.1 mLずつ腹腔内注射したのち、水温12で飼育し、死亡尾数を計数するとともに生存魚を経時的にサンプリングし、鰓における黒点の観察およびウイルス感染価の測定に供試した。また、死亡魚も全てサンプリングした。なお、ウイルスを接種しない対照群を設けて、同様に処理を行った。鰓における黒点の観察は供試魚の有眼側の第一鰓弓を全鰓弁とともに切り取り、ウェットマウント標本作製し、光学顕微鏡を用いて倍率100~400倍で観察した。黒点を有する個体については、黒点の出現量を肉眼所見に基づいて6段階で評点化した(以下、黒点強度とする)。そして、黒点強度1以上を黒点陽性魚および0を黒点陰性魚とした。ウイルス感染価の測定は黒点の出現部位である鰓、VHSVの標的器官である心臓および魚類の主要な二次リンパ器官である脾臓と腎臓の混合物(以下、脾臓・腎臓と表記する)を測定用試料として摘出し、定法に従ってTCID₅₀法による価を求めた。

VA: 供試ウイルスにはブリ腹水症ウイルス(YTAV) Y-6株を用いた。供試魚には種苗生産されたヒラマサの当歳魚(平均体長8.7cm, 平均体重11.4g)を用いた。実験感染では供試魚に7.80 logTCID₅₀のウイルスを1尾あたり0.05 mLずつ腹腔内注射したのち、水温20で飼育し、に準じて死亡尾数の計数、生存魚と死亡魚のサンプリング、鰓における黒点の観察およびウイルス感染価の測定を行った。なお、黒点強度は10段階で評点化し、ウイルス感染価の測定では心臓の代わりにYTAVの標的器官である肝臓を測定用試料とした。

(2) 鰓黒点の出現を誘導する条件の検討

供試ウイルスにはVHSV(KRRV-9822株), YTAV(Y-6株)およびマダイイリドウイルス(RSIV)を用いた。供試魚には種苗生産されたヒラメ当歳魚(平均体長10.2cm,平均体重14.2g)を用いた。接種源にはホルマリンで不活化した供試ウイルス,供試ウイルスから抽出したゲノム核酸(RSIV由来のDNA,VHSV由来のssRNA,YTAV由来のdsRNA),DNaseあるいはRNaseでゲノム核酸を消化した供試ウイルスを用いた。また,陰性対照としてLPS,および陽性対照として培養した供試ウイルスを用いた。実験では各接種源を0.1mL/尾ずつ供試魚の腹腔内に接種し,(1)に準じて鰓における黒点の出現を観察した。

(3) 鰓黒点の組織学的検討

鰓黒点が確認され,かつVHS,VAあるいはRSIV病(RSIVD)と診断された4魚種(ヒラメ,ブリ,マダイ,スズキ)の自然発病魚,およびVHSVあるいはYTAVに実験感染した3魚種(ヒラメ,ブリ,ヒラマサ)の病魚を供試した。供試病魚の鰓は10%リン酸緩衝ホルマリン水あるいはブアン液で固定し,定法に従ってパラフィン切片を作製後,ヘマトキシリン・エオシン染色,およびシュモール反応を施し,光学顕微鏡で観察した。また,黒点が顕著に発現している鰓の小片をカルノフスキ液で固定し,定法に従って超薄切片を作製後,酢酸ウランとクエン酸鉛による二重染色を施し,電子顕微鏡で観察した。

(4) 鰓黒点の単離とその性状解析

供試魚には,VHSVに実験感染したヒラメの鰓を用いた。鰓細胞の分離はトラフグの上皮組織内から白血球を分離する方法を一部改変して行った。まず,血液を凝固させないように,ヘパリン入りPBS中で鰓組織を破碎した。次に,余分な残渣をレンズペーパーとメッシュで越し取ったのち,細胞成分のみを回収した。その後,遠心分離を行い,鰓細胞を分離した。分離直後の鰓の細胞懸濁液の塗抹標本作製し,ディフ・クイック染色を施して観察した。また,分離した鰓細胞をフローサイトメトリーで解析した。さらに,細胞懸濁液をパーコールの密度勾配遠心で血球細胞とその他の顆粒とを分離し,懸濁液に溶血剤を加え赤血球を崩壊させ,細胞懸濁液から黒点を分離した。そして,黒点の塗抹標本作製し,PI染色とCFSE染色を施し,観察した。

4. 研究成果

(1) 鰓黒点の出現経過の観察

VHS: 実験感染における累積死亡率および生存魚の黒点出現率の推移を図2に示す。ウイルス接種群における死亡は接種6日後に始まり,10日後まで急増し,11日後には累積死亡率が68%となった。その後,18日後まで死亡は確認されなかったが,19日後から27日後にかけてわずかな死亡が確認され,28日後の累積死亡率は84%に達した。鰓黒点は死亡が始まる3日前の接種3日後に初めて確

認され,死亡が開始する前日の接種5日後には100%となった。その後も,黒点出現率は9日後を除き,17日後まで100%で推移したのち,徐々に減少した。また,死亡魚については,全ての個体で鰓黒点が観察された。なお,対照群では死亡は確認されず,鰓黒点も観察されなかった。

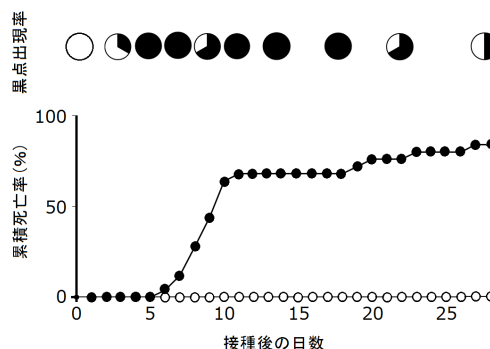


図2. VHSV接種群(●)および対照群(○)における累積死亡率(折れ線グラフ)ならびにVHSV接種後に経時的に検査した生存魚における鰓黒点の出現率(円グラフ)。黒点陽性魚(●);黒点陰性魚(○)

黒点強度の頻度分布を求め,生存魚と死亡魚に分けて比較した結果,黒点強度は生存魚よりも死亡魚で明らかに高かった。

黒点陽性魚と黒点陰性魚を区別して各組織のウイルス感染価を個体別に比較検討したところ,いずれの実験においても,黒点出現率が100%になるまでの間に検査された黒点陰性魚の各組織におけるウイルス感染価は,ウイルス接種後の時間の経過とともに増加した。ウイルス接種後に初めて出現した黒点陽性魚は,これらの黒点陰性魚よりも全ての組織において高いウイルス感染価を示した。特に,脾臓・腎臓における感染価が最も高かった。黒点出現率が100%になったのち,接種17日後までの間に検査された黒点陽性魚の各組織におけるウイルス感染価は,6.00 logTCID₅₀/g以上の高い値を示した。接種22日後以降に検査した黒点陽性魚の中には,心臓あるいは鰓においてウイルス感染価の低下を示す個体が確認された。黒点出現率が100%になったのち,接種9,22および28日後に各1尾の黒点陰性魚が見られた。このうち,接種9日後の個体では,鰓および心臓と,脾臓・腎臓との間には著しいウイルス感染価の相違が見られ,最後者は前2者よりも顕著に低い値を示した。実験期間後半の接種22および28日後に検査した計2尾の黒点陰性魚では,遂に心臓および脾臓・腎臓におけるウイルス感染価が検出限界値以下まで激減した。

VA: 実験感染の結果,ウイルス接種区における死亡は接種2日後から始まり,3日後にかけて死亡率が急激に増加し,累積死亡率は82%となった。その後,6日後までは毎日僅かな死亡が継続し,7日後には治まったが,最終的な累積死亡率は94%となった。なお,

対照区では、接種1日後に1尾の死亡があったが、その後の死亡は発生しなかった。日間死亡率と黒点強度の推移を図3に示す。黒点は生存魚および死亡魚ともに死亡が観察され始めたウイルス接種2日後から確認され始め、その強度は接種3日後にかけて増加した。死亡魚ではその後も増加が続き、5日後にピーク（平均強度7）に達した。生存魚は3日後にピーク（平均強度4）になり、4日後も同様な値を保った。最終サンプリングとなった7日後は平均強度0.5まで大きく減少した。日間死亡率は接種2日後に急激に上昇してピーク（55.3%）になった。4日後には減少し、その後は死亡が終息する接種7日後まで低い値（2.1~8.5%）で推移した。

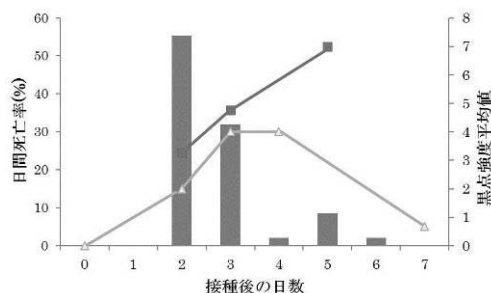


図3. YTAV 死亡率観察区における日間死亡率(棒グラフ)ならびにウイルス接種後に経時的に採取した生存魚(○)および死亡魚(●)の黒点強度の日別平均値

生存魚および死亡魚の黒点強度の頻度分布を図4に示す。生存魚での分布範囲は0~5の低い値に限られていたが、死亡魚では1~10までのより広い範囲に分布しており、病状の進行した魚は黒点強度が高くなる傾向にあることが示唆された。

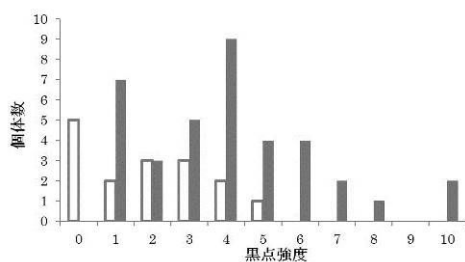


図4. YTAV 接種後に経時的に採取した生存魚(○)および死亡魚(●)における黒点強度の頻度分布

生存魚および死亡魚の各組織のウイルス感染価を測定した結果、脾臓・腎臓および肝臓においては高いウイルス感染価が検出されたが、鰓での価は低かった。また、鰓に黒点を確認される生存魚の約23%および死亡魚の約22%の個体では、鰓でのウイルス感染価は検出限界値以下であった。統計解析の結果、生存魚における肝臓のウイルス感染価と鰓黒点の発現強度との間には正の相関が認

められた。しかし、脾臓・腎臓あるいは鰓の各ウイルス感染価と鰓黒点の強度との間には、いずれも相関が認められなかった。ウイルス接種7日後に採取した2尾の生存魚は黒点陰性であり、かつ外部および内部の肉眼的所見にも異常が観察されなかったものの、それらの肝臓からは5.25 logTCID₅₀/g以上の高いウイルス感染価が測定された。

以上の研究結果から、いずれのウイルス病においても、黒点の発現量は生存魚より死亡魚の方が多く、黒点は死亡に先行して発現すること、および症状の回復と共に消失していくことが明らかとなった。VHSに関する研究から、鰓黒点の出現・消失には、その出現部位である鰓、あるいはVHSVの標的器官である心臓よりも、二次リンパ器官である脾臓・腎臓における感染性ウイルスの存在が、より深く関与していると推察された。VAに関する研究から、鰓黒点の出現にはウイルス感染の初期に誘導される生体防御機構が関与している可能性があるかと推察された。

(2) 鰓黒点の出現を誘導する条件の検討

いずれの接種源を接種されたヒラメにおいても、陰性対照のLPSを接種したヒラメと同様に鰓黒点の出現は誘導されなかった。なお、陽性対照の培養ウイルスを接種されたヒラメでは(1)と同様に鰓黒点の出現が誘導された。

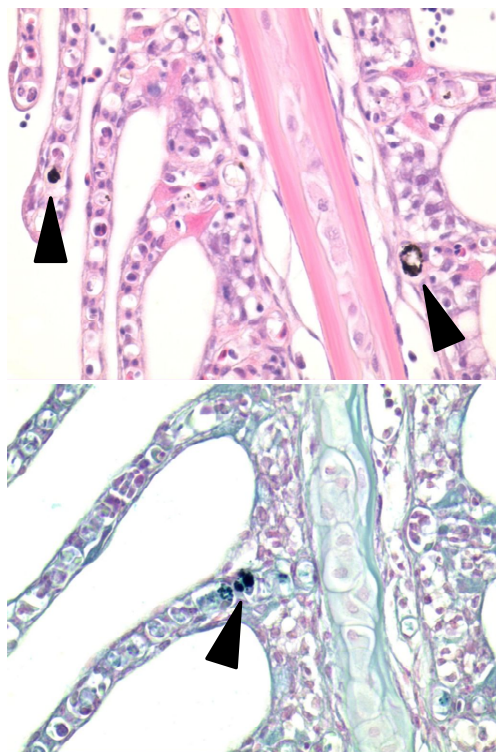


図5. 黒点の出現した鰓の組織切片の光学顕微鏡写真。二次鰓弁の毛細血管内に黒色顆粒の集塊(矢頭)が観察される。H&E染色(上図)。シュモール反応(下図)。

(3) 鰓黒点の組織学的検討

自然発病魚および実験感染魚のいずれの鰓黒点も、感染したウイルスあるいは感染を受けた魚の種類に依らず、次に述べるとおりの共通した組織学的所見を示した。すなわち、顕微鏡観察の結果、二次鰓弁の毛細血管内に黒点と思われる顆粒の集塊が多数確認され、それらの顆粒はシュモール反応に陽性を呈した(図5)。電顕観察の結果、二次鰓弁の毛細血管内に存在する黒点は、高電子密度の細かい粒子から構成され、薄い膜状構造物に内包されていることが確認された(図6)。これらの所見から、黒点はメラニンから構成される物質である可能性が高いと思われた。

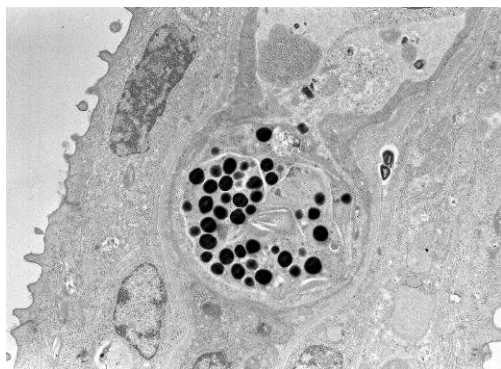


図6. 二次鰓弁の毛細血管内に存在する黒色顆粒の電子顕微鏡写真.

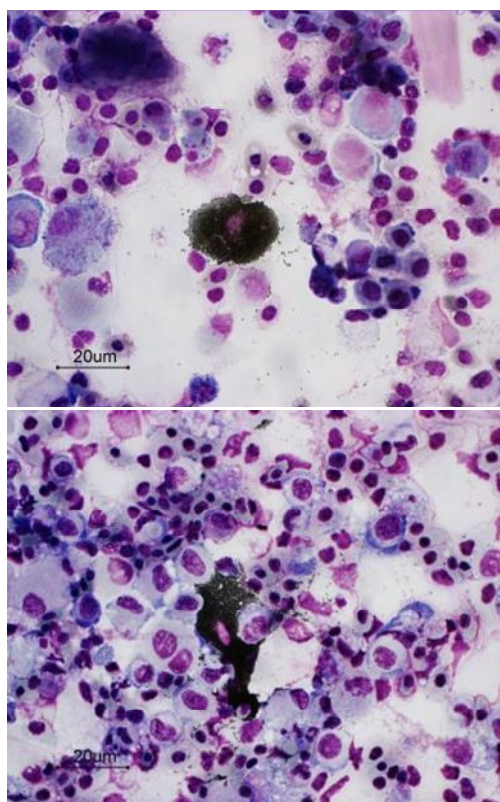


図7. 鰓から分離した細胞懸濁液の塗抹標本の光学顕微鏡写真. 円形(上図)あるいは不定形(下図)の黒色顆粒が観察される。ディフ・クイック染色。

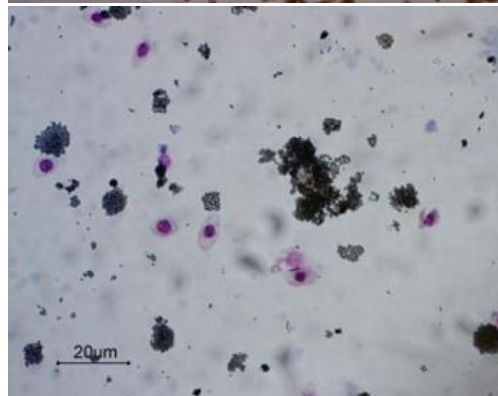
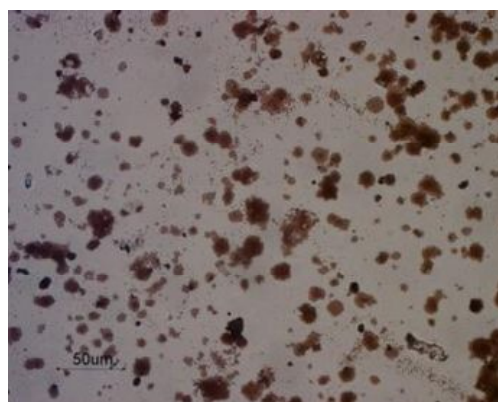


図8. 鰓細胞から単離した黒点の塗抹標本の光学顕微鏡写真. 無染色(上図). ディフ・クイック染色(下図).

(4) 鰓黒点の単離とその性状解析

分離直後の鰓の細胞懸濁液中には、多型性を示す黒点が多数確認できた(図7)。塗抹標本上での黒点は黒色微粒子の凝集体のように見え、サイズを測定できた顆粒では円形状のもので直径が平均 15 µm、不定形のもので長辺の長さが最大 24 µm であり、細粒状に砕けているものもあった。

分離した鰓細胞をフローサイトメトリーで解析した結果、健康魚と病魚のサイトグラムのプロフィール間に大きな差は見られなかった。さらに、特異的な蛍光シグナルを発する鰓細胞の集団は検出されなかった。これらのことから、フローサイトメトリーによっては黒点を特異的に検出することはできなかったと判断した。

鰓細胞の懸濁液から黒点の分離を試みた結果、黒色の顆粒を単離することができた(図8)。単離された黒点は、鰓細胞の塗抹標本上で観察されたものと同じく、円形を呈する黒色微粒子の凝集体であった。この黒点にPI染色あるいはCFSE染色を施した結果、死細胞あるいは生細胞を示す特異蛍光のシグナルは確認できなかった。

(3) および(4)の解析結果から、少なくとも黒点はメラニン顆粒を含む物質であると判断された。今回の方法によっては黒点に関わる細胞については調べることはできなかったが、細胞の処理過程で黒点に関わる細胞

胞が崩壊した可能性も否定できず，分離段階ごとの観察，分離条件の再検討が必要だと思われる。いずれにしても，鰓黒点の出現はウイルス感染によって誘導されるメラニン顆粒の形成と密接に関わっていることが強く示唆された。

近年，マツカワやヒラメなどのカレイ目魚類において，メラニン形成を支配するメラノコルチン受容体遺伝子（Mcr）がクロ・ニングされるとともに，その遺伝子の発現が確認された。一方，メラニンの微量分析法が開発され，魚類のメラニン定量にも応用されている。今後は，ヒラメを用いてウイルス感染に伴うメラニン形成の挙動を検討し，ウイルス感染に対するメラニン形成の生体防御学的意義を見いだす必要があると思われる。現在，鰓黒点を発現したヒラメの鰓や二次リンパ組織中における Mers 遺伝子の発現，ド・パ反応によるチロシナーゼの確認，およびメラニンの定量等を進めている。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

一色 正 (ISSHIKI, Tadashi)
三重大学・生物資源学研究科・准教授
研究者番号：30378319

(2)研究分担者

(3)連携研究者

末武弘章 (SUETAKE, Hiroaki)
福井県立大学・海洋生物資源学部・准教授
研究者番号：00334326

(4)研究協力者

長谷川 奈緒 (HASEGAWA, Nao)
三重大学・生物資源学研究科・博士前期課程学生