

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 5 月 19 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780185

研究課題名（和文）無菌飼育が稚仔魚の免疫発達に及ぼす影響

研究課題名（英文）The establishment of germ-free fish in guppy *Poecilia reticulata*

研究代表者

間野 伸宏（MANO NOBUHIRO）

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：10339286

研究成果の概要（和文）：

本研究では、卵胎生魚であるグッピーの雌から無菌解剖により稚魚を採取することにより、100日以上飼育が可能な無菌魚の作出に成功した。無菌魚は有菌魚に比べ成長が早く、腎臓や消化管の粘膜固有層にみられる白血球系細胞が著しく少ない特徴が認められた。これらの結果は、環境微生物が稚魚期の生理代謝や生体防御能に強い影響を及ぼしていることを示すものであり、無菌魚は微生物と魚類の関係を探る上で有効性の高いツールになるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Germ-free (GF) animals are animals that have no microorganisms or parasites living in or on it. In the present study, we established the GF fish (GFF) from ovoviviparity fish guppy *Poecilia reticulata*, and compared the body growth and lymphoid tissues of GFF and conventional fish (CF) groups. Rearing of GFF obtained was possible for over 100 days and the body growth differed in the two groups. GFF also have a reduced number of leucocytes distributed in the lamina propria of intestine and kidney tissues compared with CF. These results indicate that the GFF is an excellent tool for analyzing of the relationship between fish metabolism containing immune modulation and aquatic microorganism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：水産学（一般）

科研費の分科・細目：水産学. 水産学一般

キーワード：水産学, 微生物, 免疫学, 仔稚魚

1. 研究開始当初の背景

魚類の種苗生産過程では、稚仔魚期の飼育環境に細心の注意が必要となる。これは多くの魚種において稚仔魚の斃死率が最も高く、その後の成長も左右する時期だからである。稚仔魚期の斃死率が高い要因の一つには、免疫力が未発達であるためといわれる。魚類では親から子に抗体などの免疫物質が移行する受動免疫の現象が認められておらず、孵化後1週間は抗体などの主要な免疫物質の発現量も少なく、稚仔魚の免疫能は成魚に比べ著しく弱いと考えられている。

哺乳類では、子の成長に伴い親から受動された免疫物質は体内から消失していくのに対応して、主に母乳由来の細菌が消化管内に定着することにより未成熟なリンパ球や食細胞などの免疫担当細胞が刺激され、子自身の免疫能が向上していく。魚類でも LPS などの細菌外膜成分がリンパ球や食細胞を活性化させることが知られており、稚仔魚の免疫発達においても消化管等の粘膜組織に定着した細菌が重要な役割を果たしている可能性が高い。哺乳動物では生体内・外ともに完全無菌な状態を維持した無菌マウスが確立されており、腸内細菌が宿主の消化吸収、アレルギー、癌、寿命などにも腸内細菌が深く関与していることが明らかとなっている。しかし、魚類ではゼブラフィッシュで無菌魚の作出成功例があるものの、3週間以上の飼育が難しいことが報告されており、特に稚魚期と環境微生物の関係解析のためには、長期飼育が可能な無菌魚の作出が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では長期飼育が可能な無菌魚の作出系を構築し、有菌魚と比較することでその特徴を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試魚

実験には成熟した卵胎生魚であるグッピー *Poecilia reticulata* の成熟した雌を用いた。

(2) 無菌魚の作出

無菌解剖により親魚から採取した稚魚を抗生物質含有改変淡水魚用平衡生理食塩水中に移し、魚体を消毒した。滅菌水道水中に移して抗生物質を除いた後、培養細胞用滅菌フラスコ内で飼育した。餌料には滅菌微粒子配合餌料を使用し、数日に1回給餌した後、1/3程度程度の換水を行った。なお、上記と同一の手順で得た無菌魚の飼育水 50ml に 100 μ l の割合で親魚水槽水を加えたものを有菌魚

として、無菌魚との比較解析に用いた。

(3) 無菌確認

定期的な無菌確認には、水換え時に採取した飼育水を用いた、すなわち、飼育水を4種類の液体培地に接種し、好気的条件下の攪拌培養により増菌の有無を確認した。また 16S rDNA ユニバーサルプライマーを用いた PCR 法により、微生物由来核酸の検出を行った。さらに生存魚体の一部を麻酔し、上記の全試験を実施することで、無菌の最終確認を実施した (図 1)。

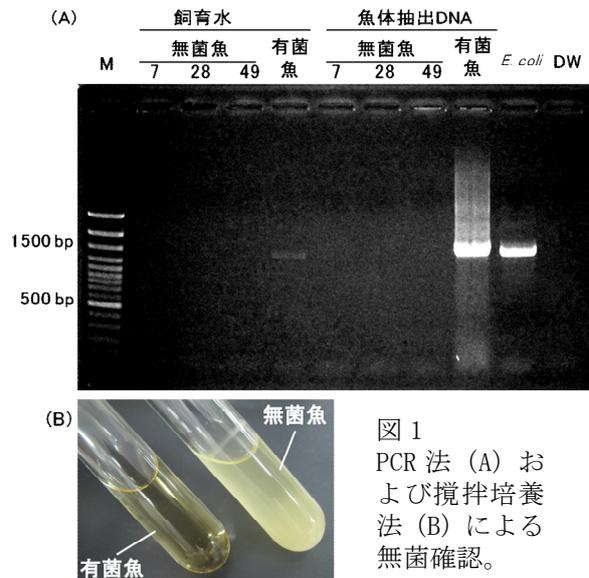


図 1 PCR 法 (A) および攪拌培養法 (B) による無菌確認。

(4) 成長測定

無菌魚の飼育容器に貼り付けた方眼紙を用いて、1週間毎に魚体の全長を測定した。

(5) 組織観察

魚体の一部を取り上げ、ブアン液で固定後、定法に従いパラフィン薄切標本を作製した。HE 染色後、光学顕微鏡を用いて観察を行った。

4. 研究成果

(1) 無菌魚の作出

無菌魚の作出成功率は約 90%であった。また 1尾の親魚から 10~15尾の無菌魚が得られた (図 1)。なお、これまでの最長飼育期間は 137日間である。

(2) 成長測定

無菌魚は有菌魚に比べ成長が早く (図 2)、飼育開始 2週間後から有意差 ($p < 0.05$) が認められた (図 3)。

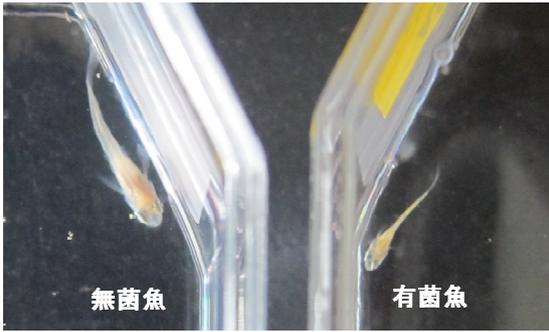


図2 飼育開始60日後の無菌および有菌魚。

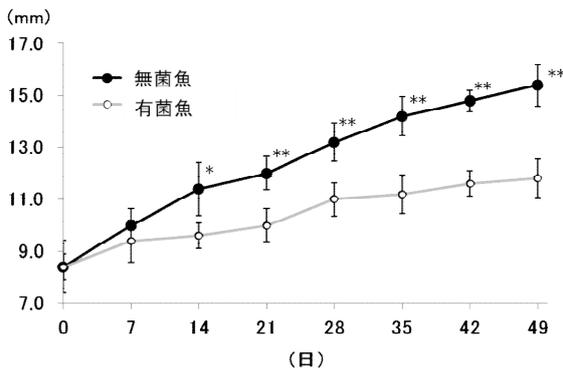


図3 無菌および有菌魚の全長の経時的变化。
(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

(3) 組織観察

稚魚の頭部から尾部までの連続薄切標本を作製して観察を行った結果、腸管および腎臓組織において有菌魚と異なる組織像が観察された。

有菌魚の腎臓組織では、間質に多数の白血球系細胞が認められたのに対し、無菌魚では同細胞の数が少なく、主に赤血球で占められていた。また尿細管の上皮細胞の形態にも差異が認められた(図4)。腸管組織においても、有菌魚では粘膜固有層にみられる白血球系細胞が有菌魚に比べ著しく少ない特徴が確認された。なお、粘液細胞等の分泌細胞に違いは観察されなかった(図5)

これらの結果は、魚類の常在性腸内細菌等の微生物が宿主(特に稚魚期)の成長を含む生理代謝や生体防御能に強い影響を及ぼしていることを示すものである。本研究により確立された手法で得られた無菌魚は長期飼育が可能であり、微生物の投与実験など、魚類と微生物の関係を探る上で有効性の高いツールになるものと期待される。

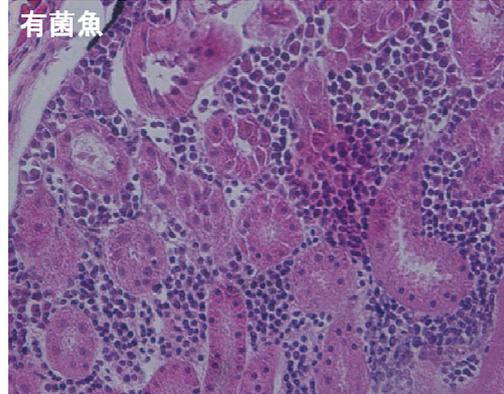
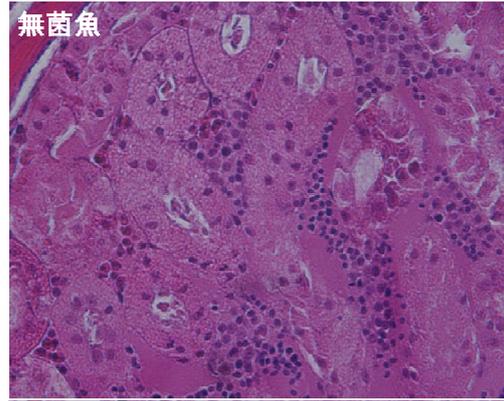


図4 飼育開始3週間後の無菌および有菌魚の腎臓組織像。HE染色。×400。

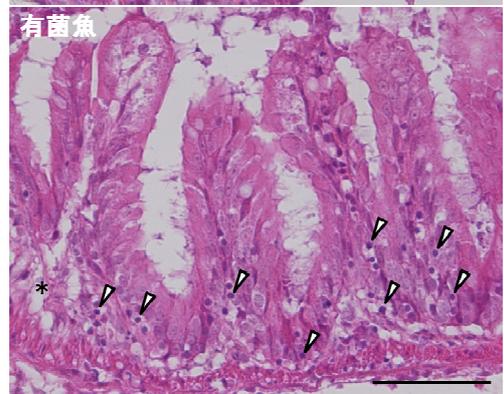
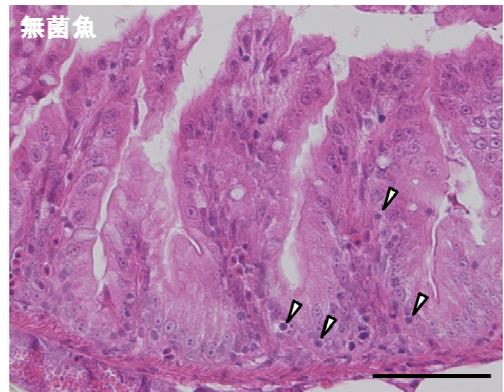


図5 飼育開始3週間後の無菌および有菌魚の腸管組織像。HE染色。×400。

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)

[学会発表] (計 1 件)

①村上大雅、間野伸宏、無菌飼育がグッピーに及ぼす影響. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会 (平成 23 年 10 月 1 日) (長崎大学).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

間野 伸宏 (MANO NOBUHIRO)
日本大学・生物資源科学部・講師
研究者番号: 10339286

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: