

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26740030

研究課題名(和文) 化学物質の慢性暴露が病原体感染時のコイの免疫応答に与える影響

研究課題名(英文) Effects of chronic chemical exposure on immune system responses to pathogen infection in common carp

研究代表者

仲山 慶 (Nakayama, Kei)

愛媛大学・沿岸環境科学研究センター・講師

研究者番号：80380286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、コイを対象魚種とし、病原性細菌の感染による感染症の発症をエンドポイントとした化学物質の免疫毒性評価法を構築した。化学物質の暴露に加えて行う感染実験の細菌種の選択および感染経路を検討し、エロモナスサルモニサイダの浸漬感染が簡便かつ再現性の高い手法であることから、同種の利用を決定した。試験法の妥当性を評価するために、高濃度のデキサメタゾン暴露した個体で感染実験を実施した。暴露個体は感染から35日で全ての個体が斃死したが、無暴露個体では感染による死亡は観察されなかった。このように、免疫抑制作用を有する化学物質の存在下で感染症が誘発されたことから、本手法が有効であることが示された。

研究成果の概要(英文)：In order to assess chemically-induced immunosuppressive effects in fish, we have developed a test method for evaluation of the chemical effects on a natural host-pathogen interaction. In a preliminary test, when common carp (*Cyprinus carpio*) were exposed to  $1.0 \times 10^6$  colony forming unit (CFU)/mL *Aeromonas salmonicida*, 90% mortality was observed after 9 days post-infection (dpi). To validate the test method, carp were exposed to 1 mg/L dexamethasone (Dex), an immunosuppressive agent. One week after the exposure test started, fish from each group were bath infected at  $2.9 \times 10^4$  CFU/mL *A. salmonicida*. After 7 dpi, fish in the Dex-exposed and *A. salmonicida* infected group started to die, and 100% mortality was observed in the group after 35 dpi. On the other hand, bacterial infection-associated mortality was not observed in *A. salmonicida* infected fish without Dex exposure. Thus, the test method developed in this study is thought to be useful to evaluate immunotoxicity in fish.

研究分野：環境毒性学

キーワード：免疫毒性 細菌感染症 抗炎症薬 *Aeromonas* 慢性毒性 環境毒性学

### 1. 研究開始当初の背景

近年、魚類から海棲は乳類に至る水生生物の大量斃死が頻発している。その主な原因として、物理化学的な環境要因(水温や酸素濃度など)の急激な変化や、毒物の流入、感染症の発生などの環境ストレスが挙げられる。これらの環境ストレスのうち大規模な貧酸素の発生や化学物質の流出事故のように、単独の要因で生物群集に対して劇的な影響を及ぼすケースもあるが、それらが単独では致死影響を及ぼさない場合であっても、複合的に作用することで個体数の減少など重篤な影響を引き起こす可能性が指摘されている。なかでも、化学物質への慢性的な暴露に起因する免疫系の機能不全が、感染症のまん延による大量斃死を発生させることが報告されている。具体的な例を挙げると、米国では農薬の暴露量が増えるに従って両生類の吸虫感染リスクが増大することが示されている(Rohr et al., 2008. Nature)。また、スイスでは産業化に伴う化学汚染の発生がブラウトラウトの寄生虫感染症の拡大を引き起こしたことが示唆されている(Burkhardt-Holm et al., 2005. Environ Sci Technol)。このように、化学物質が感染症の発症リスクを増大させ、その結果として個体数が減少するというシナリオは現実のものとなっている。

その一方で、化学物質と感染症との関連性を解析する上で免疫毒性の評価は必須であるにもかかわらず、水生生物において化学物質が免疫系に及ぼす影響を評価する確固たる手法は確立されていないのが現状である。従来より魚類においては、各種化学物質を暴露した条件下で、免疫系の各パラメータ(貪食活性、呼吸バースト活性、抗体産生など)を測定する手法が取られてきたが、それらのパラメータの変化が感染症に対する感受性を変化させるか否かについては評価されていない。すなわち、真の意味での感染症の発症リスクに対する化学物質の作用は評価されていないのが現状である。

### 2. 研究の目的

本研究では、コイを対象魚種として、病原性細菌の感染によって引き起こされる免疫系の活性化および感染症の発症をエンドポイントとした化学物質の免疫毒性評価法を構築することを目的とした。まずは、複数種の細菌を用いて感染実験を実施し、再現良く感染症の発症を誘起する実験系を構築した。その後、化学物質を暴露した個体に対して感染実験を行い、発症への化学物質の影響を評価した。試験法の妥当性を評価するために、免疫抑制作用を有する合成糖質コルチコイドを陽性対照として用いた。

### 3. 研究の方法

#### ・腹腔内接種による感染実験

6種の細菌, *Aeromonas hydrophila* ( $4.4 \times$

$10^6$  cells/fish), *A. veronii* ( $4.9 \times 10^6$  cells/fish), *A. salmonicida* ( $5.4 \times 10^4$  または  $5.4 \times 10^5$  cells/fish), *Edwardsiella tarda* ( $7.1 \times 10^6$  cells/fish), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ( $1.7 \times 10^6$  cells/fish), *Lactococcus garvieae* ( $2.0 \times 10^6$  cells/fish) をそれぞれコイの腹腔内に接種し ( $n = 8$ ), 斃死の有無を観察した。飼育条件は、水温 25℃, 明暗周期 14 時間: 10 時間, 無給餌とした。

#### ・*A. veronii* 感染個体に対する低濃度の合成糖質コルチコイド暴露試験

魚体重約 10 g のコイの腹腔内に, *A. veronii* (3 日間暴露試験:  $0.76 \times 10^6$  cells/fish または 5 日間暴露試験:  $2.0 \times 10^6$  cells/fish) を接種し, 直ちに, 1  $\mu$ g/L のプロピオン酸クロベタゾールに暴露した。都合, 対照区, 感染区, 暴露区, 感染 + 暴露区の 4 区を設定した。実験開始から 7 日目まで *A. veronii* による感染症の発症および斃死の有無を観察した。実験開始から 3 および 5 日に頭腎を摘出し, その重量を測定した後に, 頭腎中に含まれる血球を分離し, 白血球を計数した。

#### ・*E. tarda* 感染個体に対するジクロロボス暴露試験

本試験は 2 回繰り返して実施した。1 回目は, 魚体重約 8.8 g のコイの腹腔内に, *E. tarda* を  $2.3 \times 10^5$  または  $2.3 \times 10^6$  cells/fish で接種し, 直ちに 1 mg/L のジクロロボスに暴露した。実験開始から 7 日目まで斃死の有無を観察した。2 回目の試験では, 魚体重約 10 g のコイの腹腔内に, *E. tarda* を  $2.6 \times 10^6$  cells/fish で接種し, 直ちに 1 mg/L のジクロロボスに暴露した。実験開始から 10 日目まで斃死の有無を観察した。両試験ともに, へい死時または実験終了時の頭腎重量を測定した。

#### ・*Aeromonas* 属細菌の浸漬感染条件の検討

3 種の *Aeromonas* 属細菌を用いて, コイに対する浸漬感染の条件を検討した。*A. veronii* を  $1.1 \times 10^7$  cells/mL で, *A. hydrophila* を  $1.4 \times 10^7$  cells/mL で, *A. salmonicida* を  $1.8 \times 10^6$  cells/mL (1 回目),  $1.0 \times 10^6$  cells/mL (2 回目) でそれぞれ感染させ, 斃死の有無を観察した。

#### ・*A. salmonicida* 感染個体に対する高濃度の合成糖質コルチコイド暴露試験

魚体重約 8 g のコイに対して, 1 mg/L のデキサメタゾンを暴露した。暴露水 20 L は 10 L ずつ朝夕 2 回に分けて交換した。暴露開始から 7 日後に  $2.9 \times 10^3$  cells/mL または  $2.9 \times 10^4$  cells/mL でコイを *A. salmonicida* に感染させた。感染後もデキサメタゾンの暴露は継続し, 斃死の有無を観察した。給餌は 2 日に 1 回行い, 魚体重の 1% 量の飼料を与え

た。

#### 4. 研究成果

##### ・腹腔内接種による感染実験

感染実験に用いた6種の細菌のうち、コイの斃死を引き起こしたのは *Aeromonas* 属細菌の3種と *E. tarda* であった。*E. tarda* 感染区では感染1日後に5尾、2日後に3尾が死亡し、全ての個体が斃死した。*A. hydrophila* および *A. veronii* では感染1日後にそれぞれ3尾および7尾が斃死し、死亡しなかった個体は、その後回復した。一方、*A. salmonicida* 感染区では感染後3日目から斃死が確認され、1日に数個体ずつが斃死し、感染から1週間後に全滅した。

また、*L. garvieae* は本試験の感染細胞数ではコイの外見的異常は引き起こさなかった。他方、*P. damsela* の接種は、コイの斃死は引き起こさなかったものの、粘液の過剰放出や脱鱗などの症状を誘発した。

##### ・*A. veronii* 感染個体に対する低濃度の合成糖質コルチコイド暴露試験

*A. veronii* 感染による斃死は、プロピオン酸クロベタゾールの暴露によって影響を受けなかった。また、感染区のコイでは頭腎重量(図1)および頭腎中白血球数が有意に増加し、細菌の感染に対する典型的な応答を示していた。一方、感染+暴露区では5日目には対照区と差が無く、プロピオン酸クロベタゾールの暴露によって、細菌感染によって生じる過剰な炎症反応が抑制されていたと考えられた。以上のことから、1 µg/L 程度の低濃度の合成糖質コルチコイドは、感染症の発症を誘発するほどの免疫抑制作用は示さないが、抗炎症作用を示すことが明らかとなった。

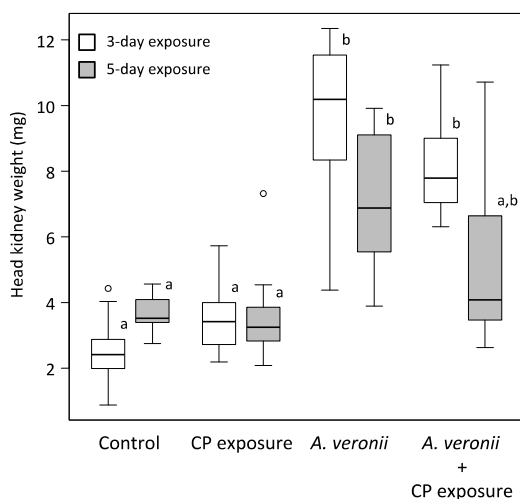


図1. *Aeromonas veronii* 感染とプロピオン酸クロベタゾールの暴露によるコイの頭腎重量の変化。

##### ・*E. tarda* 感染個体に対するジクロールボス暴露試験

1回目の試験では、接種した *E. tarda* の細胞数は問わず、感染のみではコイの斃死は観

察されなかったが、暴露+感染区では30%の斃死が引き起こされた。また、対照区でも20%の斃死が生じた。この時の頭腎重量の平均値は、対照区が3.8 mg、暴露区が4.8 mgであったのに対し、感染区で9.1~9.5 mg、暴露+感染区で16.4~16.7 mgであった。

2回目の試験では、暴露区で33%、感染区で73%、暴露+感染区で100%の斃死が観察された。この時の頭腎重量の平均値は、対照区が3.3 mg、暴露区が3.7 mg、感染区が10.2 mg、暴露+感染区が11.8 mgであった。

以上の結果から、*E. tarda* 感染個体に対してジクロールボスを暴露することにより、斃死率が上昇する傾向にはあったが、1回目と2回目の試験での結果が大きく異なり、今回用いた暴露濃度ではジクロールボスが *E. tarda* による感染症を誘発したとは結論づけられなかった。過去の研究でジクロールボスは免疫毒性を有することが疑われていたが (Dunier et al., 1991. *Ecotoxicol Environ Saf*), 本試験で用いた暴露濃度 (1 mg/L) がコイに対する96時間 LC<sub>50</sub> 値 (9.41 mg/L, Ural & Çalta, 2005. *Bull Environ Contam Toxicol*) と大差ないことから、ジクロールボスによる免疫抑制作用は急性毒性が現れる濃度付近でないと生じないことが推察された。

##### ・*Aeromonas* 属細菌の浸漬感染実験

上記までの試験では、細菌を腹腔内に接種することで感染させていたが、接種がコイのストレスになることに加え、予め化学物質に暴露した個体に細菌を感染させる場合、コンタミのリスクが高いことから、感染時のハンドリングを必要としない浸漬感染の試験条件を検討することとした。

本試験では、*A. hydrophila* および *A. veronii* の浸漬感染はコイの斃死を引き起こさなかった。一方、*A. salmonicida* に感染させた個体では感染3日後から体表の出血(とくに、下顎や尾柄部の充出血)が観察され、感染から8~10日程度で90%以上が斃死した。

本試験の結果を受け、これ以降の試験では *A. salmonicida* を用いることとした。



図2. *Aeromonas salmonicida* 感染症の発症個体。

##### ・暴露+感染試験の妥当性評価

1 mg/L のデキサメタゾンに 1 週間暴露したコイに  $2.9 \times 10^4$  cells/mL で *A. salmonicida* を感染させたところ、感染から 7 日目に斃死が観察され、35 日目には全ての個体が死亡した。一方、デキサメタゾンの無暴露区では同じ細胞密度の *A. salmonicida* を感染させたにもかかわらず、斃死個体は観察されなかった。 $2.9 \times 10^3$  cells/mL 区でも、デキサメタゾンの暴露で 10% の斃死が引き起こされたが、無暴露区では斃死は観察されなかった。

本試験の結果から、免疫抑制作用を有するデキサメタゾンの高濃度暴露が、*A. salmonicida* を感染させたコイに同感染症を発症させることが示された。先行研究にて、10 mg/L のデキサメタゾン暴露が *P. damselae* に感染させたセネガルヒラメの斃死を引き起こすことが報告されており、この結果と一致していた (Salas-Leiton et al., 2012. Fish Shellfish Immunol.)

本研究によって、コイを対象に *A. salmonicida* の感染実験と化学物質の暴露試験を組み合わせることで、実環境中の宿主と病原体の組み合わせで、感染症の発症をエンドポイントとした免疫毒性の評価が可能となった。

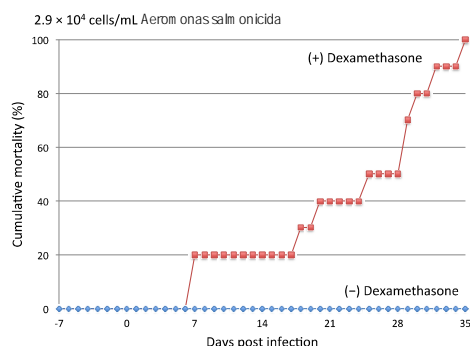


図3. *Aeromonas salmonicida* を感染させたコイにデキサメタゾンを暴露した際のへい死率。

## 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)

Nakayama K, Sato K, Shibano T, Isobe T, Suzuki G, Kitamura SI. Occurrence of glucocorticoids discharged from a sewage treatment plant in Japan and the effects of clobetasol propionate exposure on the immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*) to bacterial infection. Environmental Toxicology and Chemistry 35, 946-952, 2016. 【査読有り】  
DOI: 10.1002/etc.3136

[学会発表](計5件)

仲山 慶, 佐藤健太郎, 北村真一, 磯部友

彦, 鈴木 剛. 下水処理水中の医薬品由来合成糖質コルチコイドのリスク評価—統合暴露影響評価のための機器分析, *in vitro* 試験, *in vivo* 試験の併用事例. 環境ホルモン学会 第18回研究発表会 シンポジウム「化学物質の環境リスクをバイオアッセイで評価する」, 2015年12月10日, 自治医科大学(栃木県・下野市).  
仲山 慶, 佐藤健太郎, 北村真一, 磯部友彦, 鈴木 剛. 下水処理水中の合成糖質コルチコイドのリスク評価: 活性寄与物質の同定とコイの病原体に対する感受性への影響. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2015年9月17日~18日, 神戸学院大学(兵庫県・神戸市).  
仲山 慶, 佐藤健太郎, 北村真一, 磯部友彦, 鈴木 剛. 下水処理水中の合成糖質コルチコイドの分析・モニタリングと影響評価. 第24回環境化学討論会 自由集会「影響指向環境評価法とは何か—Integrated Exposure and Effects Analysis (IEAA) バイオアッセイスクリーニングと化学分析を組み合わせた環境資料の総合的評価法」, 2015年6月24日, 札幌コンベンションセンター(北海道, 札幌市).

Nakayama K, Sato K, Ikeda H, Imajuku D, Kitamura SI, Isobe T, Suzuki G. Risk evaluation of glucocorticoids discharged from sewage treatment plants in Japan: Effects on the response to bacterial infection in fish. SETAC North America 35th Annual Meeting, November 9-13, 2014, Vancouver, Canada.  
仲山 慶, 池田宏文, 今宿 團, 佐藤健太郎, 北村真一. 細菌性感染症に対するコイの免疫応答に及ぼす化学物質の影響. 第20回日本環境毒性学会研究発表会, 2014年9月10日~11日, 富山国際会議場(富山県・富山市).

[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]  
ホームページ等  
<http://www.team-fische.com/bio/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

該当無し

(3)連携研究者  
該当無し