

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月6日現在

機関番号：82708

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19302

研究課題名(和文)病魚自身の血清抗体を利用した簡単・迅速・安価な病原体特定手法の開発

研究課題名(英文) Development of a simple, rapid, inexpensive pathogen identification method using serum antibodies of diseased fish

研究代表者

松山 知正(Matsuyama, Tomomasa)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・グループ長

研究者番号：20372021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：病魚の血清抗体を利用した病原体の精製と、小規模なメタゲノム解析を組み合わせ、迅速かつ安価で簡単に実施できる病原体の特定方法の確立を目指した。既知の病原体をモデルとした解析では、ウサギで作成した抗血清を用いれば目的を達成することができた。しかし、病魚の血清を用いた場合では種々の検討を行っても病原体を精製することができなかった。魚類の抗体の抗原との結合力は病原体を精製するには弱すぎると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病魚の血清中には感染から1週間後以降には病原体に対する抗体が産生されており、その中には病原体の表面抗原に対する抗体も含まれていることが実験的に確かめられた。しかし、このような病魚の血清抗体を用いても病原体を精製することはできなかった。哺乳類の血清抗体を用いれば病原体を精製することが可能なことから、魚類の抗体は病原体を精製するには結合力が不十分であり、このような目的へ利用するには不向きと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to establish a simple, rapid and inexpensive method for identifying pathogens by combining pathogen purification using serum antibodies from diseased fish samples with small-scale metagenomic analysis. In the model analysis using known pathogens, the purpose could be achieved if the rabbit antiserum was used, but pathogen could not be purified using fish antiserum even after various examinations. The affinity of antigen and fish antibodies seems too weak to purify the pathogen.

研究分野：魚病類

キーワード：病原体 特定 抗体 精製

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

多様な魚種が養殖され、新規養殖魚種の開拓が盛んな我が国では、未知の病原体による新たな感染症が毎年のように発生している。病原体の分離培養が困難な疾病では、病原体の特定が遅れ、魚病被害が拡大する。医学や獣医学では、次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析技術の進歩により、不明であった病原体が特定されつつあるが、現行の解析手法を水産分野に応用するには、技術面やコスト面で問題がある。

次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析の欠点は、病原体のゲノムは宿主のゲノムに比較して圧倒的に小さいため、サンプルに僅かでも宿主のゲノムが混入すれば、得られるデータの殆どが、解析上意味を成さない宿主由来の配列に占められることである。通常の解析で得られる配列の殆どは宿主のゲノム由来の配列である。ヒトや家畜のように、宿主ゲノムが解読されていればコンピューター上で宿主由来配列を削除することができるが、魚病で対象とする多くの魚種のように宿主ゲノムが未解読な生物種では、宿主由来と病原体由来の配列を区別するのは困難である。また、大規模データの解析には専門的知識を要する。さらに、シーケンスコストは年々低下しているが、予算の限られる日常的な魚病診断に用いるには高額である。

分離培養ができない病原体の特定には、病原体の精製が有効である。しかし、正体不明の病原体を病魚から直接精製するためには、相当な経験と努力、時間が必要である。

2. 研究の目的

病原体を特異的に認識する血清中の抗体は、病原体に結合する優れたプローブである。病魚や病気から回復した個体の血清抗体を用いて、病原体を精製することが可能と考えられる。背景で述べた問題点を克服するために、本研究では、病魚自身の血清に含まれる抗体を利用した病原体の精製と、キャピラリーシーケンサーを用いた小規模なメタゲノム解析を組み合わせることで、迅速・安価で、誰でも簡単に実施できる病原体の特定手法の確立を目指す。これにより、病原体の早期特定、より迅速な疾病対策が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 魚類の血清抗体を吸着するリガンドの探索

哺乳類の抗体の精製を目的に市販されている、proteinA, proteinG などのリガンドを結合したアフィニティー担体を用いて、主要な養殖対象魚種の血清抗体を特異的に吸着するリガンドを探索した。すなわち、各担体にブリ、カンパチ、ヒラメ、マダイ、マハタ、イシダイ、ニジマス、ギンザケ、ウナギの血清を通過させ、PBS で洗浄した後に担体に結合したタンパク質を溶出し、SDS-PAGE 電気泳動に供して分子量から抗体の特異的な吸着の有無を確認した。

(2) 病魚の血清と臓器の採材

ヒラメを用いて *Edwardsiella piscicida*（グラム陰性細菌）、*Streptococcus iniae*（グラム陽性細菌）、Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV, 一本鎖 RNA ウイルス)、ブリを用いて *Nocardia seriolae*（グラム陽性細菌）、*Ichthyobacterium seriolicida*（グラム陰性細菌）とマダイイリドウイルス (RSIV, 二本鎖 DNA ウイルス)、ギンザケを用いて Piscin orthoreovirus 2 (PRV2, 二本鎖 RNA ウイルス) の感染試験を実施した。ギンザケ以外の魚種では、供試魚の約半数が死亡した時点で無作為に取り上げた供試魚より腎臓および脾

臓を採材し、ディープフリーザーに保存した。ギンザケでは死亡が起こらなかったため、感染2週間後に同組織を採材した。血清は感染から1～4週間の間に採取し、各病原体に対する血清抗体価を ELISA 法により測定した。

(3) 血清抗体を吸着したアフィニティーカラムを用いた病原体の精製

(1) で選択した担体に(2)で調整した病魚の血清を通過させ、病魚の血清抗体を固相化したカラムを作成した。また、陽性対照として *E. piscicida* と RSIV についてはウサギ抗血清を用いて同様の操作を行った。病原体を本カラムに補足させるために、病魚の腎臓磨砕液を通過させた。カラムから宿主由来のゲノムを除去する目的で、DNase の添加やバッファーによる洗浄条件について検討した。カラムに直接 proteinase K を含む溶解液を添加し、カラムに補足されたサンプルを溶解した後に、溶出液から DNA あるいは RNA を精製した。精製過程において各フラクションに含まれる各病原体の量を既報の定量 PCR 系で、宿主由来のゲノムの混入量を新たに構築した定量 PCR 測定系を用いて定量した。また RSIV では、病魚の血清中にウイルス粒子の表在タンパクに対する抗体が存在することを確認するために、RSIV の 108 種の遺伝子のうち 73 種に対して作成した組換タンパクを抗原とした ELISA 法により、病魚血清中の抗体の各遺伝子産物との反応を測定した。さらに、*E. piscicida* と RSIV をモデルとして、病魚の血清とウサギ抗血清を用いた病魚臓器からの小規模なメタゲノム解析による病原体の検出を試みた。すなわち、病魚の腎臓磨砕液の遠心上清を 0.8 μm フィルターでろ過した後、DNase および RNase を添加し、磨砕液中の夾雑物および宿主由来の核酸を除去した。次に病魚血清あるいはウサギ抗血清を捕捉させたカラムに本磨砕液を通過させ、カラムにサンプルを捕捉させた後に PBS で洗浄した。カラムから抽出した DNA を phi29DNA ポリメラーゼで増幅した後に超音波で断片化して pGEM ベクターに組み込み、大腸菌に形質転換し、任意の 16 クローンについてインサートの配列を解読した。相同性解析により得られた配列の由来を推定した。

4. 研究成果

(1) 魚類の血清抗体を吸着するリガンドの探索

数社の製品について検証した結果、Ab-Capcher (Protenova 社) を用いた場合に、ウナギを除く試験した全ての魚種で血清抗体を吸着できることが明らかとなった。検証したいずれの担体を用いてもウナギの血清抗体は吸着しなかった。

(2) 血清抗体価の測定

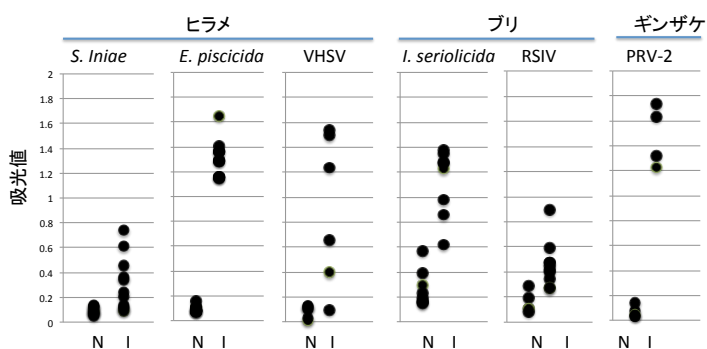


図1. ELISAによる血清抗体価の測定
測定した各個体のELISA吸光値を示した。
N:健康個体 I:人為感染した病魚

病魚および健康個体の ELISA 抗体価を測定したところ、いずれの感染試験においても、感染群には各病原体に対する抗体を保有する個体が認められ、平均抗体価は全ての疾病において感染群で有意に上昇していた (図 1)。

(3) 血清抗体を吸着したアフィニティーカラムを用いた病原体の精製

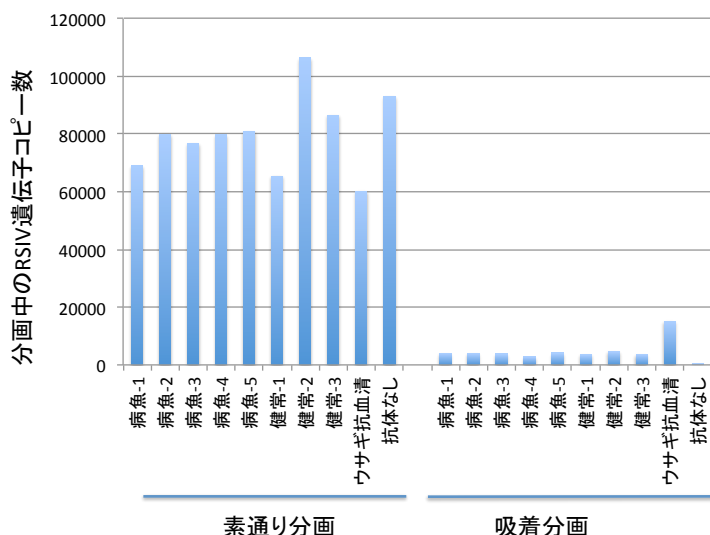


図2. ブリあるいはウサギの血清を用いたRSIVの精製

例として、ブリの病魚および健康魚血清とウサギ抗血清を用いた RSIV の精製に関する解析結果を図 2 に示す。病魚の血清を吸着したカラムを用いた場合でも、健康魚の血清を吸着した場合と同様に、カラムに添加した RSIV の殆どは素通り分画に分布し、吸着分画にはわずかしが存在しなかった。すなわち、RSIV に感染したブリの血清抗体を用いても RSIV 粒子をカラム上に補足できない

ことが明らかとなった。一方で、RSIV に対して作成したウサギ抗血清を用いた場合には、吸着分画にも RSIV が検出されている。よって、病魚血清によって RSIV を吸着分画に精製できないのは、実験操作ではなくブリの抗体に原因があると考えられる。そこで、ブリの抗体が認識する RSIV 抗原を、組換タンパクを抗原とした ELISA 法により特定した。その結果、ブリ病魚の抗体は RSIV 粒子の構造タンパクの多くを認識しており、Major capsid protein や myristated membrane protein などの表在タンパク質も認識していた（発表論文）。このようにブリ病魚の血清には RSIV の表在タンパクを認識する抗体が含まれており、原理的には抗体を利用した病原体の精製が可能はずである。しかし、バッファーの組成や洗浄方法等を検討したり、カラムとブリ抗体との結合をより強固にするためにブリの抗体に対するモノクローナル抗体を用いたアフィニティーカラムを作成してブリの抗体をカラムに捕捉して検討しても、結果は同様であった。さらに、他の病原体と病魚血清の組み合わせにおいても、同様の結果であった。なお、宿主由来の核酸は、サンプルに DNaseI および RNaseA を添加し、30 分程度室温におくことで殆ど除去する事ができたが、ミトコンドリア DNA は除去できなかった。

ウサギ抗血清を用いれば病原体を補足で来たことから、*E. piscicida* と RSIV をモデルとして、ウサギ抗血清と病魚の血清を用いた病魚臓器からの小規模メタゲノム解析による病原体の検出を試みた。ウサギ抗血清を用いた場合では、*E. piscicida* では 16 クローン中の 4 クローンを、RSIV では 8 クローンをそれぞれ対象とした病原体の配列であった。ウサギの抗血清を用いれば実験の開始から配列の取得と病原体の推定まで 3 日間で完了することが可能であった。病魚の血清を用いた場合では、病原体由来の配列は得られず、16 クローンの遺伝子の殆どは宿主のミトコンドリアであり、一部に宿主ゲノムと思われる配列が含まれていた。

このように、魚類の血清抗体を利用した病原体の精製は困難であった。カラムには魚類の抗体が捕捉されていること、哺乳類の抗体では病原体の精製が可能であることを考慮すると、魚類の抗体の病原体に対する結合力が病原体の精製に利用するには不十分であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

Matsuyama, T., Sano, N., Takano, T., Sakai, T., Yasuike, M., Fujiwara, A., Kawato, Y., Kurita, J., Yoshida, K., Shimada, Y. & Nakayasu, C. (2018). Antibody profiling using a recombinant protein-based multiplex ELISA array accelerates recombinant vaccine development: Case study on red sea bream iridovirus as a reverse vaccinology model. *Vaccine*, 36(19), 2643-2649.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。