

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05824

研究課題名(和文) ヒラメの幼若期における免疫獲得機構を利用した新規ワクチンの研究

研究課題名(英文) Research on the development of a novel vaccine using the mechanism of immune acquisition in juvenile flounder

研究代表者

菅 向志郎 (Suga, Koushirou)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：60569185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：養殖魚における細菌性疾病を防除するためには、腸管免疫の強化が効果的な予防法となる可能性がある。これを実証するため、免疫機能が発達する仔稚魚に魚病細菌を含んだ動物プランクトンであるワムシを給餌させる実験を行った。その結果、本手法により仔稚魚の腸管組織が発達することを組織切片解析により明らかにした。また、この予防法の確立のための効率的な感染実験をおこなう必要がある。この感染実験のモデル魚として、受精卵が通年入手出来、遺伝的に個体差が生じないキリフィッシュが病原性試験に適用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗生物質が効かない薬剤耐性菌の出現を抑制するため、養殖魚に限らず家畜やヒトの細菌による病気の治療において、抗生物質の使用を減らすことが世界的に求められている。このため、抗生物質を用いた治療から、ワクチンによる予防へ転換することが必要である。本研究では、免疫が発達する魚の飼育初期段階で食べさせる動物プランクトンに着目し、餌を工夫することで腸管免疫が強化できる可能性を見出した。また、この実験を効率的に行うため、飼育が容易なモデル魚が使用できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Developing intestinal immunity may be an effective preventive method to control bacterial diseases in aquaculture.

In this study, we performed experiment to feed zooplankton containing fish disease bacteria to juvenile fish. The results of this experiment showed that the intestinal tissue of juvenile fish developed by histological section analysis. Experimental fish model for infection experiments are needed to control of bacterial diseases. We showed that killifish, for which clonal self-fertilized eggs are available year-round, can be used as a model fish for the pathogenicity testing.

研究分野：魚病学

キーワード：細菌 仔稚魚 プランクトン

1. 研究開始当初の背景

エドワジエラ症は *Edwardsiella tarda* を原因菌し、国内外問わず多くの魚種で発生が報告されている。国内では、マダイやヒラメの養殖において本症による被害が問題となっている。本症による被害が報告されている養殖魚において、短期間で大量斃死することは少ないが、餌食いのよい夏場の高水温期において、長期間に亘って死亡が継続する。ヒラメのエドワジエラ症は、侵入細菌に対して好中球が反応する化膿性炎が主な病症である。罹患したヒラメにおいて、腹水貯留による腹部膨満や肛門からの脱腸などが特徴的な症状である。一般的な魚病対策として、抗生物質やワクチンがあげられる。ヒラメ、マダイ、その他の魚種のエドワジエラ症には承認された抗生物質はない。ウナギでは、オキシリン酸、フロルフェニコール等が承認されているものの、耐性菌の存在が知られている。さらに、*E. tarda* は好中球の食作用に対して抵抗性を有し、貪食細胞中で増殖することが報告されており、ワクチン投与により体内で抗体が産生され、食細胞による貪食作用が促進されたとしても、食細胞内での殺菌機構に抵抗性を示し、生き残る。ワクチンの開発は長年行われており、ホルマリン不活化死菌や菌体から抽出した LPS の有効性が示されており、国内でヒラメに対する多糖アジュバンド添加不活化ワクチンが承認、市販された。このワクチンはホルマリンで不活化した *E. tarda* にフコイダンを添加し、2 週間隔で 2 回注射することで、9 ヶ月間強い免疫が期待される。しかし、2 回接種することは養殖魚だけでなく人的な負担が大きいくことなどから、現在は認証から外れて市販されていない。このように、養殖場で被害の大きい *E. tarda* 感染症の防疫には、様々な研究が行われているが、承認され有効性の高い防疫法がないのが現状である。

E. tarda の魚類への主な感染経路は、腸管および鼻孔であることが報告されている。よって、本症の防除には、感染経路である腸管の免疫が重要であることが示唆される。腸管の主な機能は必要な栄養物の吸収であるが、同時に細菌やウイルスなどの病原微生物や抗原に直接接触している腸管粘膜は、抗原に対する有効な生体防御機構を担っている。魚類の腸管には、哺乳類でみられるような明瞭に分化したリンパ装置や分泌型 IgA のような抗体は認められないが、腸管粘膜上皮細胞間には上皮細胞間リンパ球 (IELs) が散在している。この IELs には T 細胞、ナチュラルキラー細胞、好酸球、マクロファージが存在していることから、魚類においても腸管は免疫において重要な役割を担っている。魚類の T 細胞も哺乳類と同様に、細胞障害性を持つ細胞障害性 T 細胞および、抗原特異的に増殖しヘルパー活性を持つヘルパー T 細胞に相当する細胞が存在する。*E. tarda* などの細胞内寄生細菌への対応として、腸管内で細胞障害性 T 細胞が主役の細胞性免疫を誘導することによって、エドワジエラ症を予防することが可能である。

2. 研究の目的

エドワジエラ症の *E. tarda* の性質や感染経路、魚体の生体防御機構など、病原細菌と宿主の両面から本症の予防法の確立を目指した。生体防御機構の側面からは、種苗生産において海産仔魚の初期餌料であるシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis* (以下ワムシ) の腸管内に本菌を取り込ませた *E. tarda* 含有ワムシをヒラメ仔魚に給餌することで、*E. tarda* がヒラメ仔魚に与える影響を調べるため、ヒラメ仔魚の組織切片を作製し、腸管の計測・解析を行った。また、ヒラメ仔魚を用いた研究では、受精卵が必要であり、年間に実施する飼育実験の回数は限られる。そこで、受精卵が通年に亘り入手可能なキリフィッシュを用いた感染実験系を構築するための基礎研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) *E. tarda* 含有ワムシ給餌ヒラメ仔魚の腸管解析

ヒラメ仔魚の飼育には 100 L パンライトタンク 6 槽を使用した。*E. tarda* 含有ワムシを給餌した実験区、無処理ワムシを給餌した対照区のそれぞれに 3 槽ずつ使用した。水槽には塩分 33 の人工海水を 100 L 入れ、エアープンプを用いて 0.04 L/min で常時通気した。飼育水槽の飼育温度は、水槽クーラーを用いて水温 16(±1) に調整した水道水の入った角水槽の中に収容し、水温 16(±1) を維持した。水槽は室内に設置し、24 時間常に光照射した。ヒラメ仔魚は 34 日間飼育した。

仔魚へのワムシの給餌は、各飼育水中に 5~20 個体 / mL のワムシが存在するようにワムシを準備した。*E. tarda* 含有ワムシは、ワムシ培養液中に 1.0×10^8 cells/mL となるように *E. tarda* を添加した。ナンノクロロプシスは、実験区と対照区用の給餌ワムシ培養液に 1×10^7 cells/mL になるように添加し、1 時間通気した。通気後、プランクトンネットを用いて、実験区と対照区用のワムシを回収した。ヒラメ仔魚への給餌は、給餌開始から 3 日目までは水槽内のワムシが 5 個体/mL になるように、4~6 日目は 10 個体/mL に、以降は計測時の水槽内のワムシの数に合わせて、15~18 個体/mL となるように給餌した。

腸管解析に供する仔魚は、各水槽から 10 尾ずつ採取した。採取したヒラメ仔魚は Davidson 溶

液に浸漬・固定した。固定後、70%アルコールで洗浄し、固定液を除いた。次に、アルコール系列で脱水し、中介剤の安息香酸メチルに置換した。その後、ベンゼンに置換し、パラフィン包埋した。パラフィン包埋仔魚は前額面で薄切し、HE染色することで組織切片標本を作製した。

画像解析は、組織切片標本を撮影した画像の3カ所の腸管に対して行い、魚体内で口の方向から腸管前部、腸管中部、腸管後部とした。腸管の断面画像は、腸管の外膜に対して内膜がどれだけ長い、腸管断面全体に対して腸管の膜間がどれだけ大きいかを算出するため、ImageJを用いて内周 / 外周、(腸管の膜面積 = 腸管の断面積 - 腸管内腔の断面積) / 腸管の断面積を求め、内周 / 外周を長さ比とした。得られたデータの統計処理は、welchのt検定を行った。

(2) キリフィッシュを用いた感染実験系の構築

飼育には、蓋に直径1 cm程度の穴をあけた小型容器(120 mL/53 mm)を用いた。容器内には1/2海水(塩分17)を70 mL程度入れ、インキュベーター内で水温27.5(±1)に調整し、光周期は12L:12Dの条件で飼育した。

感染実験に用いる菌液は、1/5000濃度に希釈した魚類甲殻類麻酔剤FA100を含む1/2海水(塩分17)70 mLの溶液に、キリフィッシュを10分程度浸漬させて麻酔し、魚体重を測定することで、魚体重当たりの接種量を算出した。攻撃は、容量10 µLのマイクロシリンジを用い、31 Gの注射針を使用した注射法で行った。菌量は0.5 µL/100 mg BWをそれぞれ接種した。接種箇所は、左背部筋肉で、実験区は、エドワジエラで 0.5×10^3 , 10^4 , 10^5 cells / 100 mg BW、レンサ球菌(I型)で 0.5×10^1 , 10^2 , 10^3 cells / 100 mg BW、対照区は滅菌PBSをそれぞれ接種した。

4. 研究成果

(1) *E. tarda* 含有ワムシ給餌ヒラメ仔魚の腸管解析

腸管中部の画像(図1)を解析した結果、対照区の長さ比の平均は1.16、標準偏差は0.21、面積比の平均は0.51、標準偏差は0.19となった。実験区の長さの平均は1.66、標準偏差は0.11、面積比の平均は0.67、標準偏差は0.10となった(図2)。Welchのt検定では、長さ比のp値は $3.08E-12$ 、面積比のp値は $5.73E-7$ となった($p < 0.05$)。この結果、実験区の方が長さ比と面積比とも有意に大きかった。

この結果から、腸管中部において、絨毛、腸壁が実験区で有意に発達したことが明らかとなった。*E. tarda*が仔魚の腸内に存在したことで、腸管内の生理代謝や生体防御への影響を及ぼした結果、絨毛・腸壁の発達が引き起こされたのではないかと推定した。

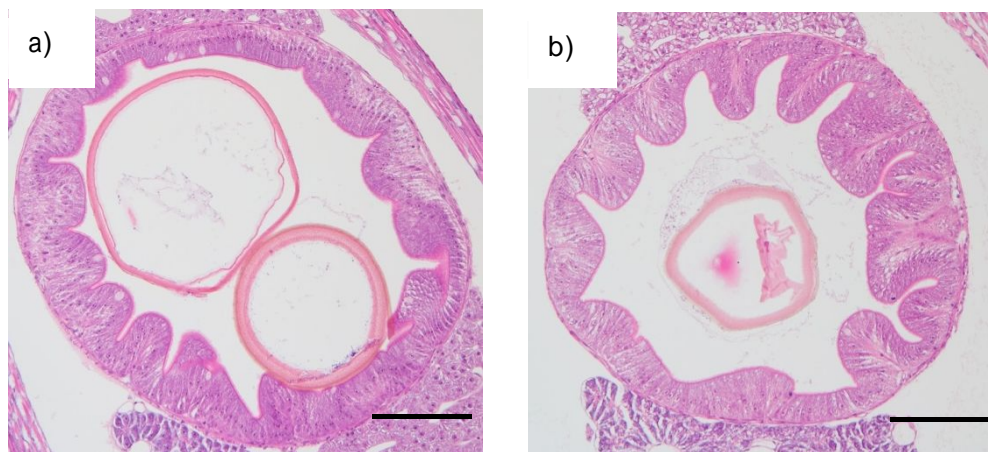


図1 腸管中部組織切片画像

a) 対照区腸管中部、b) 実験区腸管中部

Scale bar = 100 µm

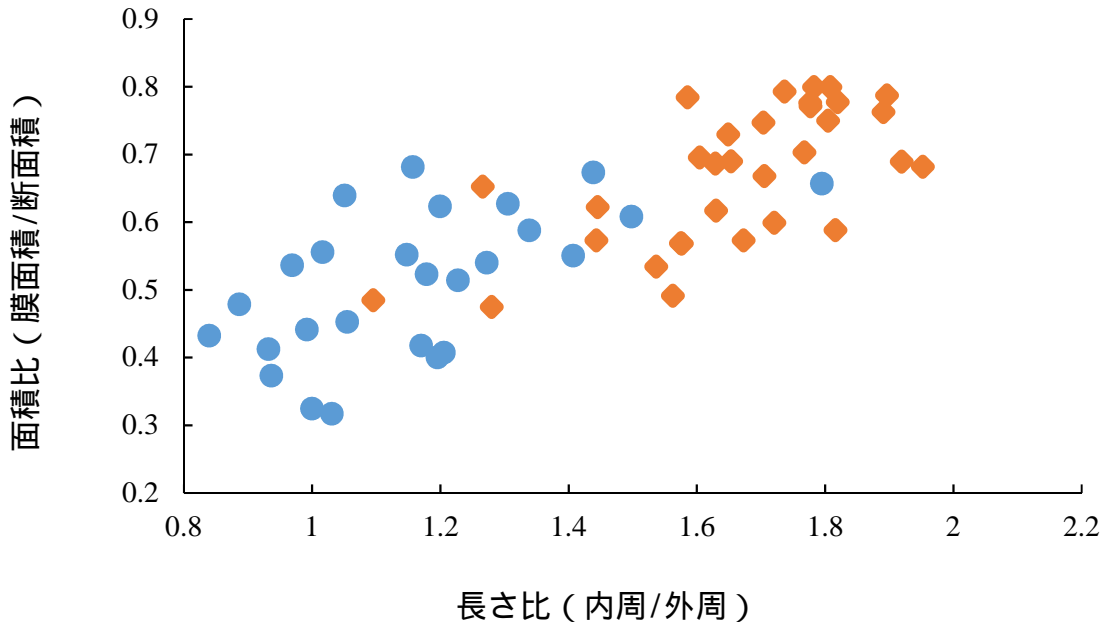


図2 *E. tarda*給餌ヒラメ・対照区の腸管中部の長さ比・面積比の散布図
対照区は青丸 (n = 26)、実験区は橙菱 (n = 32) で示した。

(2) キリフィッシュを用いた感染実験系の構築

エドワジエラでの攻撃試験では、筋肉への接種後 144 時間で、 0.5×10^3 区で死亡個体は見られず、 0.5×10^4 区は 119 時間で 1 個体死亡し、生残率は 90%、 0.5×10^5 区は 40, 60, 84, 134 時間で 1 個体ずつ、45 時間で 2 個体死亡し、生残率は 25% であった。対照区では斃死しなかった。

レンサ球菌 (1 型) では、 10^2 区で死亡個体は見られず、 10^3 区、 10^4 区では 14 日後の生残率はそれぞれ 20、40% であった (図 3)。対照区では斃死しなかった。

これらの結果より、両細菌の筋肉内注射による攻撃を行うことで、エドワジエラ症およびレンサ球菌症のモデル魚としてキリフィッシュが使用出来ることが明らかとなった。キリフィッシュは受精卵を周年入手可能で有り、かつ自家受精を行うことから実験に用いる個体に遺伝的な差が無いいため、安定した感染実験を行うことが可能である。

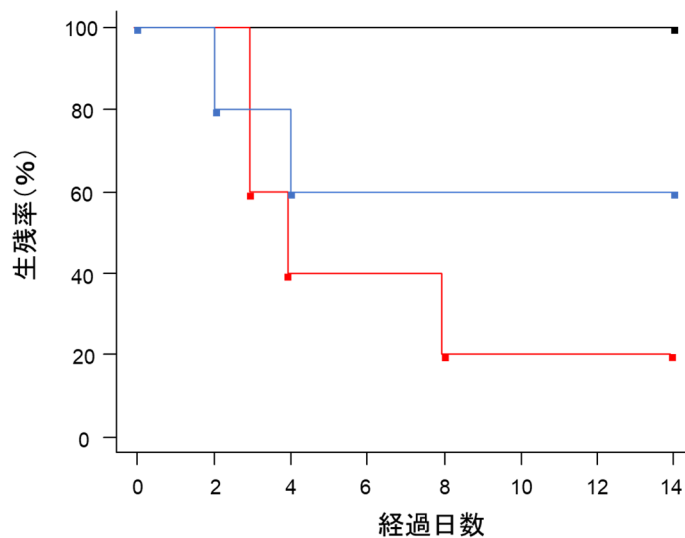


図 3 攻撃試験における生残率の経過日数による変化
黒線は 10^2 、赤線は 10^3 、青線は 10^4 (CFU / 50 mg BW) (n=5)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富田 湧也、菅 向志郎、金井 欣也
2. 発表標題 選択的膜透過性色素によるウルトラファインバブルの殺菌効果の検証
3. 学会等名 日本魚病学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平坂 勝也 (Hirasaka Katsuya) (70432747)	長崎大学・海洋未来イノベーション機構・准教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------