

機関番号 : 12614

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20580199

研究課題名 (和文) 養殖の多魚種化に対応する細菌性疾患の新たな予防方法の開発

研究課題名 (英文) Study of new prophylactic method against bacterial diseases along with diversifying aquaculture fish species

研究代表者

片桐孝之 (KATAGIRI TAKAYUKI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号 : 50361811

研究成果の概要 (和文) : 日本の最近の魚類養殖における多種類化傾向が進み、それに伴って予防も対策もできない魚病が発生している。魚種や疾病に限定されない新たな魚病技術を開発することが業界からの要望として強く発信されている。本研究では、感染症のなかでも細菌感染症に焦点を絞り、その対策の一助とするために以下の研究を行った。

病原菌は宿主の細胞表面に存在するスフィンゴ糖脂質の糖鎖部を認識して結合し、感染を引き起こす。また、病原菌自身も表面に糖鎖を持っており、宿主の免疫監視機構から逃れる、又は糖鎖を介した宿主との細胞間認識により、感染に役立っている。その為、細菌性疾患の予防を考える上で、欠かせない物質である。しかし、魚類における病原菌とスフィンゴ糖脂質に関する知見は乏しいのが現状である。本研究では多くの病原菌の受容体として知られるスフィンゴ糖脂質の一種の、ganglioside asialo-GM1 (GA1) とアユ (*Plecoglossus altivelis*) において β 溶血性連鎖球菌症を引き起こす *Streptococcus iniae* をモデルとして病原菌とスフィンゴ糖脂質の関連性を検討した。

S. iniae が GA1 に対し、結合能を持つか TLC-overlay assay 法を用いて検証した。その結果、GA1 を展開した TLC プレートに *S. iniae* の菌液に浸した試験区では GA1 が展開された位置にスポットが検出され、*S. iniae* の菌液に浸さなかった試験区ではスポットが検出されなかった。この結果から、*S. iniae* が GA1 に対し結合能を持つことが示唆された。

次に、アユの脳内において GA1 が存在するか、アユの脳からフォルチ分配法を用いて抽出したスフィンゴ糖脂質を TLC で展開し、GA1 標準品の Rf 値と比較をした。その結果、アユの脳からは 4 種類のスフィンゴ糖脂質が検出され、その 1 つが GA1 であった。

さらに、アユの臓器における *S. iniae* と GA1 の分布の関連性を検討した。浸漬感染法により *S. iniae* に感染させたアユの脳、腸、心臓から凍結切片を作製し、*S. iniae* 及び GA1 に対する免疫組織染色を施した。*S. iniae* に対する免疫組織染色では、脳膜に浸潤した炎症細胞付近に *S. iniae* 像が観察され、GA1 に対する免疫組織染色では、脳膜内側の神経線維と顆粒層の小神経細胞に GA1 が確認された。しかし、腸及び心臓には GA1 の存在は認められなかった。

つまり、*S. iniae* は GA1 に結合することから、両者に関連性は認められたが、臓器内での分布には直接的な関連性は認められなかった。しかし、*S. iniae* により特異病変が作られる脳に、GA1 が多量に存在することから、脳まで伝播した *S. iniae* は GA1 を介して脳内感染を引き起こすと考えられ、魚類においても病原菌とスフィンゴ糖脂質は深く関連していると考えられた。

研究成果の概要 (英文) : In recent years, the Japanese government promoted to choose fish peculiar which adapt to the area to cultivate. As a result, there are many kinds of aquaculture fish now. On the other hand, the medicines which meet Pharmaceutical Affairs Law are only used for the fishes with a much volume of production. Therefore development of the prevention technology for bacterial diseases which are not covered by the law is demanded.

Adherence of bacteria to host tissue surfaces has been considered as an important initial event in colonization and pathogenesis. Cell surface glycosphingolipids have long been implicated as receptors in this process. There is ganglioside asialo GM1 (GA1) which is a kind of glycosphingolipid and *Streptococcus* species might bind GA1.

TLC-overlay assay revealed that *S. iniae* has the ability to bind GA1. This fact might

indicate that *S. iniae* recognize GAI as a receptor for intruding fish body and also expand lesions in the fish brain. To confirm the distribution of GAI in the brain of Ayu, glycosphingolipids were purified from brain using Folch methods. Purified glycosphingolipids were developed on the TLC plate and then, compared Rf value with GAI. Four bands were observed and one of them was identical to GAI. Furthermore, Ayu were immersed in cocktail of *S. iniae* and enucleated brain to prepare cooled-knife method for the immunohistochemistry. Positive signal for the *S. iniae* was observed adjacent to velamentum cerebrale. The other hand, positive signal for the GAI was seen in the nerve fiber and the nerve cell dispersed in granular layers. This observation indicates that correlation between *S. iniae* and GAI was unclear though, these two certainly bind.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：ガングリオシド、*Streptococcus iniae*、細菌性疾病

1. 研究開始当初の背景

現在の魚類養殖における多様化は、地域ブランドを創出しようという国の呼びかけと各県の取り組み努力により達成された結果であるが、法整備の遅れとともに新たな問題がクローズアップされている。これは、薬事法に規定されている水産用医薬品では、数十種類におよぶ養殖対象種すべてをカバーできず、治療も予防も全く出来ない多くの魚種が存在することである。日ごろの魚病対策には養殖業者の飼育方法改善の努力により行われているが、科学的な論拠に乏しく、しばしば大量死を招くなど被害は避けられない。魚種や疾病に限定されない新たな魚病技術を開発することが業界からの要望として強く発信されている。病原性細菌は宿主に感染するため、宿主の持つスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドをレセプターとして認識して結合する。つまり、宿主と病原性細菌の接触・結合を防げば、魚体内への侵入を抑え、感染症を低減することができる。特に腸管は、多くの魚類病原性細菌の進入門戸として考えられている。そこで、魚類の腸管に共通して存在するガングリオシドを探索し、それを飼料に混ぜることで、細菌表面をコートして腸管上皮細胞との接触・結合を阻止できる可能性がある。腸管上皮細胞と結合できない細菌は、腸管を通して排泄されるか、あるいは腸管免疫により排除されて体内に留まることはない。

β 溶血性連鎖球菌症の原因菌である

*Streptococcus iniae*は、淡水、海水魚に広く病原性を有する細菌であり、魚への感染経路、体内での伝播経路は未だ証明されていない。しかし、腸管上皮の壊死や脳に出血をともなう高度な壊死性病変を引き起こし、本菌の特徴的な症状として認識されている。現在までに、*S. iniae*がティラピアでガングリオシドの一種に結合すること、それは脳および腸管で局在していることを免疫組織染色法で証明されている。つまり、*S. iniae*が魚類に感染する場合、ガングリオシドの一種をレセプターとして介し、腸管上皮より感染が成立する。さらに、血流に乗って脳に伝播したのち、脳・神経系に存在するガングリオシドに結合し、そこで増殖して脳・神経系に重篤な機能障害をおこすのではないかと考えている。

2. 研究の目的

以上から、体内への病原菌の感染経路を遮断できれば、養魚における魚病の発生を格段に減らすことが出来る。つまり、病原菌が腸管上皮細胞に接着するのを阻害する可能性が開ける。有効なワクチンが存在しない細菌性疾病に対し、それらの感染機構および経路の解明を通し、安全な感染予防技術の開発の一助とすることである。

3. 研究の方法

(1) アユ (*Plecoglossus altivelis*) への *S. iniae* 感染系の確立

S. iniae TB0613株をTryptic Soy培地を用いて28°Cで24時間振とう培養した。4.5Lの井戸水で $0.5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^8$ cfu/mlの菌数になるように懸濁し、ここに平均体重16gのアユ20尾を投入して30分間浸漬感染させた。その後、70L容量のタンクに移して井戸水(23°C)で流水飼育して死亡率をみた。また、脳薄切切片のH-E染色およびギムザ染色を行った。

(2) ある種のStreptococcus属細菌がガングリオシドアジアロGM1(以下GA1)に結合するという報告があるため、本菌がGA1に結合するかどうか検討した。

標品GA1の展開にはTLCプレートを用い、定法に従い展開、風乾、オルシノール硫酸試薬法による発色、固定化とブロッキングを行った。これを*S. iniae*(1×10^8 cfu/ml)の菌液に浸し、3時間インキュベートした。さらにその後の操作は定法に従い行った。次いで、抗*S. iniae*抗体希釈液を滴下し室温で3時間インキュベートした。これに2次抗体を滴下し、インキュベート後、発色試薬でバンドを確認した。

(3) アユ魚体内にGA1が存在するかどうか、また何種類のスフィンゴ糖脂質が存在するかどうか脳を用いて検討した。

5尾のアユの脳を真空凍結させた。これをフォルチ法で総脂質を抽出した。さらに定法に従い、スフィンゴ糖脂質の抽出を行ってTLCプレートを用いて展開した。これをオルシノール硫酸試薬で発色し、バンドを確認した。

(4) (3)により、GA1がアユの脳内に存在することが示されたが、脳での局在は明らかとなっていない。そこで、GA1の局在と*S. iniae*感染したアユの脳での菌の局在を比較した。病魚は(1)により採材した。病魚より脳を取り出した。ドライアイスで冷却したアセトンを準備し、プラスチック製包埋皿に脳を乗せ、O.C.Tコンパウンドを脳が浸るまで滴下した。これをアセトンで急速凍結した。以後、定法に従いクリオスタットで7 μ m薄切切片を作製し、使用まで-80°Cで保存した。この薄切切片を風乾し、アセトンでO.C.Tコンパウンドを除去した。100倍希釈した正常ヤギ血清でブロッキングを行い、希釈抗*S. iniae*抗体を滴下して4°Cで一晩インキュベートした。二次抗体(ヒストファインシンブルステイン)を加えてインキュベートしたのち、AEC溶液による染色を行い、50%グリセリンで封入して検鏡した。

GA1に対する免疫染色を行うため、健康魚の脳、腸、心臓を取り出して、上記の通りに凍結切片を作製した。ブロッキングを行った切片上に抗GA1抗体を滴下し、室温で15時間インキュベートし、この抗体に対する蛍光二次抗体を加えて1時間室温でインキュベ

ートした。これを蛍光顕微鏡を用いて検鏡して*S. iniae*の局在と比較した。

(5) *S. iniae*の侵入門戸としての腸におけるスフィンゴ糖脂質の確認を行うため、腸より(3)の方法で総脂質、次いでスフィンゴ糖脂質の抽出を行った。これをTLCプレートで展開させ、これに*S. iniae*菌液を滴下して28°Cで3時間インキュベートした。これに抗*S. iniae*抗体を滴下し、室温で3時間結合反応を行った。次いで、二次抗体を同様に滴下してさらに室温で3時間インキュベートした。発色試薬を滴下して30分後にバンドを確認した。

4. 研究成果

(1) 3日目からアユの死亡が観察され、9日目には12尾が死亡した。一方、非感染区では1尾の死亡も認められなかった。死亡魚からは*S. iniae*が分離されたほか、特徴的な外部症状である眼球突出と出血、肛門の拡張が認められた。顕微鏡観察の結果、特徴的な脳膜炎と炎症細胞の浸潤が認められた。さらに連鎖球菌が多数観察された。以上により、アユへの*S. iniae*感染が確立できた。

(2) TLCプレートには2本のバンドが検出された。従って、*S. iniae*はGA1に結合することが判った。2本のバンドはセラミド分子種の違うGA1を受容体とすることが予想された。

(3) スフィンゴ糖脂質を展開したレーンで4本のバンドが検出された。4本のうちの1本は標準品GA1同位置に検出された。従って、アユ脳にはGA1が存在し、少なくともほかの3種類のスフィンゴ糖脂質が存在することが明らかとなった。検出されたバンドの強さはGA1よりもほかのバンドが濃く、GA1よりも存在量が多いことがわかったが、アユの脳に存在するGA1が*S. iniae*の受容体として結合する可能性が示された。この結合によって、アユの脳に脳膜炎という特異病変を誘導する可能性が示唆された。

(4) *S. iniae*に対する免疫組織染色では、アユの脳膜に浸潤している炎症細胞付近に*S. iniae*が検出され、脳膜上及び脳膜外に*S. iniae*は分布していることが明らかとなった。一方、GA1に対する免疫組織染色では、GA1はアユの脳膜の内側に並んで分布している神経線維から検出され、脳の内部へ伸びる様に分布していた。神経線維が伸びた先では、顆粒層の小神経細胞に多量のGA1が分布していた。また、腸及び心臓におけるGA1の免疫組織染色では、両組織にGA1の分布は観察されなかった。

*S. iniae*が脳膜上に分布し、GA1が脳膜内側の神経線維に分布していたことから、*S. iniae*とGA1の分布に直接的な関連性はないと考えられた。つまり、脳まで伝播してき

た *S. iniae* は GA1 を介して脳膜炎を起こしているわけではないと推測された。(2)の結果より、アユの脳には4種類のスフィンゴ糖脂質が存在していることから、GA1を除いた3種類のスフィンゴ糖脂質が *S. iniae* が脳膜炎を引き起こすことに関与している可能性が考えられた。しかし、GA1が *S. iniae* が特異病変を作る脳に多量に存在していることから、脳内に侵入した *S. iniae* は GA1 を介して、脳内部まで伝播し、脳内感染を引き起こしたことも示唆された。つまり、脳まで伝播した *S. iniae* がアユの脳膜上に存在する他のスフィンゴ糖脂質を介し、脳膜炎を引き起こし、脳内部に侵入してからは、GA1を介して顆粒層まで伝播するというメカニズムで脳内感染を引き起こしたかもしれない。

また、腸及び心臓には GA1 が存在していないことから、腸や心臓の感染には GA1 が関与するのではなく、他のスフィンゴ糖脂質及び他のファクターが関連していると考えられた。

(5) 得られたバンドの強度は弱いですが、1本の特異的なバンドが確認された。従って、*S. iniae* は腸にあるレセプターと結合すること、さらに、この結合によりアユの腸内に侵入することが示唆された。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片桐孝之 (KATAGIRI TAKAYUKI)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教
研究者番号：50361811

(2) 研究分担者

延東 真 (ENDO MAKOTO)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：80128355

(3) 連携研究者

舞田正志 (MAITA MASASHI)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号：60238839

(4) 連携研究者

二見邦彦 (FUTAMI KUNIHICO)
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教
研究者番号：00513459