

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05784

研究課題名(和文) 仔稚魚期の免疫・脂質代謝を利用した抗病性種苗生産システムの開発

研究課題名(英文) Development of an anti-disease seedling production system using immunity and lipid metabolism in juvenile fish

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：稚魚に短鎖脂肪酸および中鎖脂肪酸を含有した飼料を給餌することで、重要な免疫機構を担っている腸管組織に与える影響を組織切片解析により調べた。その結果、通常の飼料で飼育した対照区と比較して、試験区では腸管上皮における防御能に関与する杯細胞が有意に増加することが明らかとなった。また、新たな魚病対策を開発するためには、感染モデル魚が必要である。個体差が小さく小型容器で個体別飼育が可能なマングローブキリフィッシュは、ブリ類に大きな被害を与える連鎖球菌に対して病原性を有しており、細菌性疾病における感染モデル魚になる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗菌性物質に対する薬剤耐性菌の増加を抑えるため、養殖魚だけでなくヒトや家畜などに対する抗生物質の使用が制限されている。よって、養殖において抗生物質に代わる新たな細菌性疾病を治療・予防する手法の開発が必要である。腸内細菌が産生する短鎖・中鎖脂肪酸を含有した飼料を給餌することで、腸管の防御能を担う杯細胞が増加したことから、本飼料は細菌性疾病の新たな予防法として有効である可能性を見出した。また、多くの治療・予防法を開発するためには、短期間で多くの試験を実施することが重要である。これを実現させるための感染モデル魚として、マングローブキリフィッシュが適していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The effects of feeding juvenile fish diets containing short- and medium-chain fatty acids on intestinal tissues, which play an important role in the immune system, were investigated through tissue section analysis. The results showed that the number of goblet cells involved in defense in the intestinal epithelium increased significantly in the test area compared to the control area where the fish were reared on a normal diet. In order to develop new fish disease countermeasures, infected model fish are necessary. Mangrove Killifish (*Kryptolebias marmoratus*), which can be bred individually in small containers due to small individual differences, is pathogenic to *Streptococcus*, which causes significant damage to yellowtail, and may serve as a model fish for infection in bacterial diseases.

研究分野：魚病学

キーワード：魚病細菌 仔稚魚

1. 研究開始当初の背景

魚類の細菌感染症であるエドワジエラ症は *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被害が甚大な疾病である。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ため、養殖業者にとって長い期間疾病対策を要する細菌感染症である。

本症に限らず養殖現場における魚病対策としては、抗生物質などの水産用医薬品が主に用いられている。しかし、抗菌性物質に対する薬剤耐性菌の増加、および薬剤が無効なウイルス病の流行などにより、魚病対策における抗菌剤の有用性は低下していることから、治療からワクチンを使用する予防へと病気への対応が変化している。現在、日本で承認・市販されている水産用ワクチンは、すべて病原体をホルマリンなどにより殺した不活化ワクチンである。不活化ワクチンは、宿主の液性免疫を強く誘導する一方で細胞性免疫を誘導する能力は弱いため、*E. tarda* 等の細胞内寄生細菌による感染症を防ぐことは難しいのが現状である。細胞内寄生細菌への対処法として、細胞障害性T細胞が主となって働く細胞性免疫を誘導することが必要あり、これには弱毒ワクチンが有効であることが報告されている。しかし、現状では不活化ワクチン以外が水産用医薬品として使用が承認される可能性はあまり高くないため、他の方法による対処法の開発が必要である。

魚類の多くは肉食性であり、タンパク質やアミノ酸の要求量は哺乳類と比較してはるかに大きく、哺乳類では主に炭水化物と脂肪からエネルギー生産を行っているのに対して、殆どの魚類では全エネルギーの40%以上をタンパク質の異化によって得ている。魚類は、主要エネルギー源であるタンパク質が不足すると、脂質がエネルギー源として使われるようになる。肝臓や脂肪組織中に蓄積された脂質は、脂肪動員作用のあるホルモンによって、遊離脂肪酸として血中に放出されて利用される。さらに、脂質が不足すると、筋肉中のタンパク質がアミノ酸に分解され糖新生や脂肪合成の基質として利用される。このように魚類では、初めに利用されるエネルギー源が不足すると、脂質代謝への切り替えが起こる。主要な第一のエネルギー源を削減し、強制的に脂質代謝を促した場合について多くの研究が行われている。魚類では餌止めによって免疫関連因子に正の効果があることが報告されている。絶食させたハマチの血液像を観察した研究では、47日目以降に好中球とその他の白血球が増加したと報告されている。また、マウスに必要なカロリーの90%を脂肪、1%未満を炭水化物で摂取させる高脂質飼料を給餌した際には、免疫細胞が増加することが明らかになっている。また、ケトン食療法により、マウスの腸内細菌叢が変化し、腸内の炎症を誘発する細胞の働きを抑制していたことが報告されている。さらに、ケトジェニックダイエットで主要なエネルギーを脂質にすることで結核菌への感染防御効果が誘因されることが報告されている。これらのことから、腸内細菌叢が橋渡しとなって、脂質代謝と免疫機構が関係していると考えられる。食餌は腸内細菌叢の構成に影響を与える重要な外来因子であることから、飼料中に有用な物質を含有し、腸内細菌をコントロールすることで腸管への影響を検討する研究が多種多様に行われている。

腸内細菌は代謝産物として短鎖脂肪酸を産生し、短鎖脂肪酸は免疫細胞に作用することが知られている。短鎖脂肪酸とは、腸内細菌が難消化性糖類を分解して産生する有機酸の一種で、大腸上皮細胞のエネルギー源になるとともに全身のエネルギープールに貢献する。中でも酪酸は、腸管の粘膜増殖作用とともに抗炎症作用も有しており、顕著な炎症修復効果が期待できる。魚類において酪酸ナトリウムを飼料に含有した給餌実験では、絨毛形態の改善や杯細胞数の増加、免疫グロブリンの増加といった効果が報告されている。また、酪酸は脂肪蓄積の抑制効果があるとされており、脂質代謝の亢進にも役立っていると考えられる。これらの背景から、脂質代謝の亢進、短鎖・中鎖脂肪酸含有飼料の給餌により、従来、疾病対策が存在しない養殖魚の細菌性疾病の新規な対策を構築することで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、高脂質飼料、短鎖・中鎖脂肪酸の給餌による仔稚魚に与える影響を調べるため、消化管、肝臓などの組織切片を作製し、対照との比較・解析を行った。また、新たな治療・予防法の開発にあたって、短期間で数多くの実験が可能な感染モデル魚が必要となってくる。感染モデル魚としてマングローブ・キリフィッシュ (*Kryptolebias marmoratus*) を選定した。キリフィッシュは脊椎動物で唯一自家受精を行うため、クローン系統の産出が可能であり、同一系統の個体は個体差が少ない。そして、幅広い水温・塩分で生息可能など、飼育とハンドリングが容易で、実験生物として有利な特性を有する。また、キリフィッシュは成熟するまで約120日と短く、成体の大きさは約4cmほどである。そのため、短いサイクルかつ多くの数を飼育できる。このことより、キリフィッシュで繰り返し実験を行い、有効性が認められた実験を対象魚種にフィードバックすることで、効率的な実験を行

うことができる。よって、魚病細菌の感染モデル魚としてキリフィッシュが使用可能か検証することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 短鎖・中鎖脂肪酸の給餌によるトラフグ稚魚の腸管解析

トラフグ稚魚は、200 L パンライト水槽を使用し、UV 殺菌装置、ろ過器を設置した室内の閉鎖循環で飼育した。光照射は6時～19時の13時間行い、水温は24℃を維持した。市販の海産種苗用飼料を数日給餌した後、短鎖・中鎖脂肪酸含有飼料を給餌した。給餌は1日4回、稚魚の体重の4～5%となるよう給餌した。飼育後、稚魚を海水の入ったバケツに移し、終濃度1/10000のFA100で麻酔した。氷海水で深麻酔し安楽死させた後、解剖し、腸管を切り出した。臓器はカミソリで厚さ5 mm以下の組織片とした。10%ホルマリン溶液に入れて冷蔵庫にて2日固定した。固定試料を水道水、70%アルコールで数回洗浄し、固定液を除いた。容器の中身を70%アルコールから70%→80%→90%→95%→100%エタノールⅠ・Ⅱと順に1時間ごとに置換し、脱水・脱脂した。包埋の前にアルコールを仲介剤に置換した。仲介剤には安息香酸メチルⅠ・Ⅱ・Ⅲを用い、試料が沈んだら次の安息香酸メチルに置換した。試料をパラフィンで包埋し、薄切用の包埋試料を作製した。包埋試料は、マイクロトームで薄切し、種々の操作後、HE染色封入スライドを作製し、顕微鏡で組織切片の解析を行った。腸管上皮における単位面積当たりの杯細胞数は、絨毛1本の面積を計測し、その中に含まれる杯細胞数を計数し、杯細胞数を面積で割って算出した。

(2) 魚病細菌に対するキリフィッシュの病原性試験

キリフィッシュは、120 mLの小型容器に滅菌海水を60 mL程度入れ、飼育した。飼育水温は27.5℃に調整し、光周期は12 L : 12 Dの条件とした。給餌は週に2回行った。卵殻除去後のアルテミア培養液をプランクトンネットでろ過し、滅菌海水で洗浄した。その後、滅菌海水を300 mL加えた。その培養液をキリフィッシュ1個体あたり約300 μLずつ（アルテミア約600個体）給餌した。魚病細菌は、ビブリオ、連鎖球菌を用いた。キリフィッシュを麻酔し、魚体重を測定した。魚病細菌の攻撃試験は、マイクロシリンジ、32 Gの注射針を使用した。菌量は、魚体重100 mgに対して0.5 μLずつ背中の筋肉に注射した。

4. 研究成果

(1) 短鎖・中鎖脂肪酸の給餌によるトラフグ稚魚の腸管解析

組織切片では、短鎖・中鎖脂肪酸の給餌により腸管上皮組織において、吸収した脂質の再合成脂質粒子の増加によってHE染色されなかった組織像が観察された（図1）

対照区は 196.4 ± 216.9 個/ μm^2 、中鎖脂肪酸区7日目は 87.7 ± 123.5 個/ μm^2 、中鎖脂肪酸区14日目は 62.8 ± 110.6 個/ μm^2 、短鎖脂肪酸区7日目は 90.9 ± 103.3 個/ μm^2 、短鎖脂肪酸区14日目の平均は 139.0 ± 97.5 個/ μm^2 となった（平均±SD）。

Dunnnett検定では、対照区と中鎖脂肪酸7日目のp値は0.04、対照区と中鎖脂肪酸14日目のp値は0.12、対照区と短鎖脂肪酸区7日目のp値は0.04、対照区と短鎖脂肪酸区14日目のp値は0.89となった。中鎖脂肪酸・短鎖脂肪酸区7日目で対照区より有意に減少した（表）。

図1 稚魚の組織切片画像

- A : 対照区、B : 中鎖脂肪酸区7日目、
- C : 中鎖脂肪酸区14日目、
- D : 短鎖脂肪酸区7日目、
- E : 短鎖脂肪酸区14日目

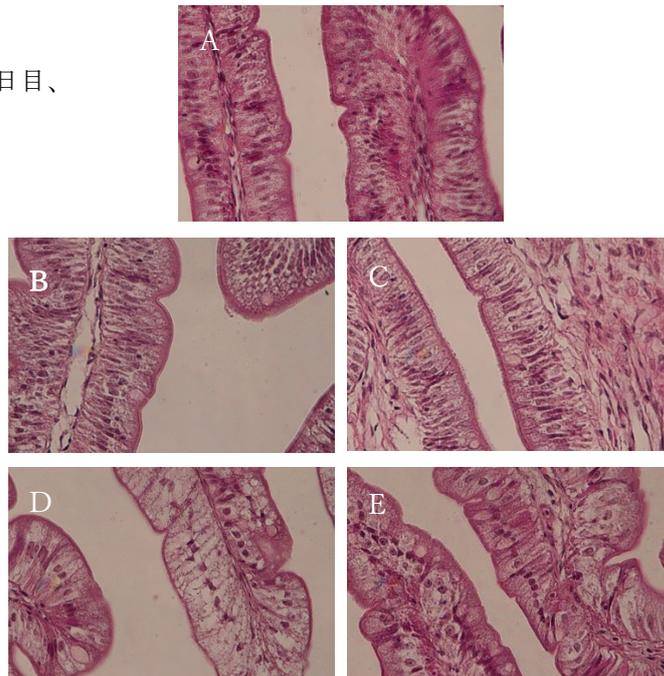


表 稚魚腸管の杯細胞数の算出結果

実験区	平均±SD (個/ μm^2)	p 値
対照区	196.4±216.9	—
中鎖脂肪酸区 7 日目	87.7±123.5	0.04*
中鎖脂肪酸区 14 日目	62.8±110.6	0.12
短鎖脂肪酸区 7 日目	90.7±103.3	0.04*
短鎖脂肪酸区 14 日目	139.0±97.5	0.89

(2) 魚病細菌に対するキリフィッシュの病原性試験

多くの養殖魚に感染発症させるビブリオに対して攻撃試験を行った。その結果、 10^4 オーダーでの攻撃試験でも斃死は見られなかったことから、ビブリオに病原性を示さないことが分かった。連鎖球菌は、シマアジで被害が増加している菌株に対してビブリオ同様、病原性は無かった。しかし、ブリ類で被害の報告のある菌株では、攻撃後、3~7 日間まで斃死を確認し、ブリ類に疾病被害を及ぼしている連鎖球菌は、マングローブキリフィッシュに病原性を有していた(図2)。この結果、キリフィッシュは特定の魚病細菌に対して感染モデル魚となる可能性があることを見出した。

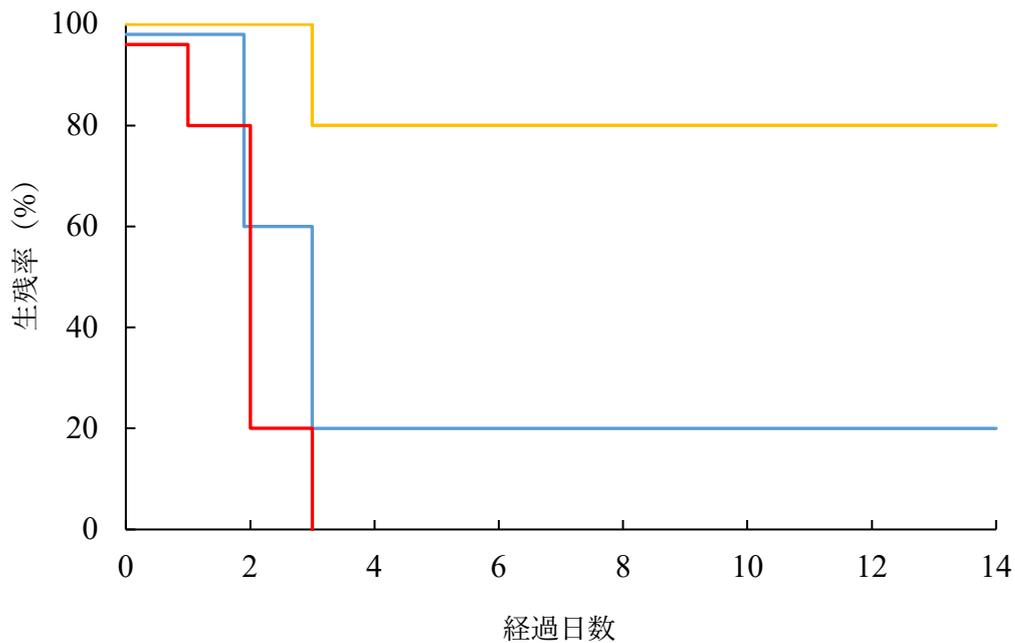


図2 連鎖球菌で攻撃したキリフィッシュの生存率

黄色 : 0.73×10^3 、青色 : 0.73×10^2 、赤色 : 0.73×10^1 (CFU/100 mg BW)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 猪俣 絢女、平坂 勝也、菅 向志郎
2. 発表標題 短鎖・中鎖脂肪酸を含む飼料を給餌したトラフグ稚魚の腸管組織解析
3. 学会等名 令和4年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安里 海優香、三浦 健太郎、菅 向志郎
2. 発表標題 魚病細菌感染モデル魚としての海産メダカの検証
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会九州支部大会
4. 発表年 2023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
---------	---------