

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月26日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580211

研究課題名（和文）魚類の日和見感染症を防除するプロバイオティクスの開発

研究課題名（英文）Development of probiotics for preventing opportunistic infections of fish

研究代表者

杉田 治男（SUGITA HARUO）

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：50139052

研究成果の概要（和文）：アユ、ワカサギおよびキンギョの腸管内における AHL 生産細菌の多くは *Aeromonas* 細菌であった。また、*Shewanella* 属は AHL を分解する細菌としてキンギョから分離された。これらの結果は、AHL を分解する *Shewanella* 属細菌をプロバイオティクスとして利用することで *Aeromonas* 属細菌による日和見感染症が防除できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The intestinal tracts of ayu (*Plecoglossus altivelis*), Japanese smelt (*Hypomesus nipponensis*) and goldfish (*Carassius auratus*) were colonized with the AHL-producing aeromonads. On the other hand, members of genus *Shewanella* were isolated as AHL-decomposer from the intestinal tract of goldfish. These results suggest that the AHL-decomposing *Shewanella* seems to be one of the candidate of probiont for preventing aeromoniasis of freshwater fish.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：プロバイオティクス、魚類、腸内細菌叢、AHL、日和見感染症、16S rRNA 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

過密状態で魚類を飼育する養殖場では、大きなストレスが魚類に生じることによって日和見感染症が多発する。日和見感染症を引き起こす *Aeromonas* 属細菌や *Listonella* (*Vibrio*) *anguillarum*などの日和見病原菌(日和

見感染菌)は病原性が弱く魚類の腸管や飼育水に常在するため、日和見感染症の発症を予防するためには、主として魚類へのストレスを軽減させることが挙げられる。また日和見病原菌は養殖施設の至る所から検出される

ため、衛生管理だけで防除することは困難であることが申請者らによって報告されている。しかし、近年、経口投与することによって腸内細菌のバランスを整え、疾病を防除して宿主の健康を増進させるプロバイオティクスに対する関心が高まりつつあり、日和見感染症を予防するにはプロバイオティクスの導入が効果的であると考えられる。

一方、細菌の病原因子としては、プロテアーゼ、溶血因子、シデロフォアや腸管上皮や粘液への付着性などが知られているが、これらの物質の発現にはクオラムセンシング（以下、QS と略記）機構が働いていることが *L. anguillarum* や *A. hydrophila* などの日和見病原菌で報告されている。魚類の主要腸内細菌であるグラム陰性細菌では、細胞内の Lux I family タンパクが生産するオートインデューサーであるアシル化ホモセリンラクトン（以下、AHL と略記）が一定濃度に達すると、細胞内で Lux R family タンパクとよばれる AHL リセプタータンパクと複合体が形成され、これが特定のプロモーター下流域にある遺伝子の発現を活性化させることが知られている。また AHL は AHL リセプタータンパクをつくる細菌であれば、異種間でもオートインデューサーとして作用することができる。このように QS 機構は、細菌密度が高い魚類腸管内では、AHL を介在とした微生物間の相互作用が活発に起こっていることが推察されるが、水産分野では、分離した数株について検討した研究が数例あるだけであり、腸内細菌群全体を対象とした報告は国内外を問わずない。また AHL を分解する細菌由来の酵素も報告されており、AHL 分解細菌を用いて腸管内における AHL 濃度を低下させることによって日和見感染症を防除することが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ヒラメ、トラフグ、アユ、コイ、キンギョなどの養殖魚から腸内細菌を分離して①AHL の生産能および分解能を調べて各魚種におけるこれら AHL 関連細菌の分布状況を推定するとともに、②AHL が *L. anguillarum* や *Aeromonas hydrophila* のような日和見病原菌のプロテアーゼ生産性やバイオフィーム形成能に及ぼす影響について調べることにより、魚類腸管内における QS 機構の役割を明らかにする。さらに、③日和見病原菌、それ以外の AHL 生産菌および AHL 分解菌同士の相互作用について解析し、AHL 分解菌によるプロバイオティクスとしての有効性を検討した後、④AHL 分解細菌を魚類（トラフグおよびコイ）に経口投与することによる日和見感染症の発症防除効果について検証する。

3. 研究の方法

(1)試料

実験には、神奈川県水産技術センター内水面試験場構内で飼育されたアユおよびワカサギ5尾、研究室で飼育したキンギョを使用した。

(2)細菌学的検査

供試魚から腸内容物を取り出し 10 倍系列に希釈した。希釈した試料を Trypticase soy (TS) 寒天培地 (BBL) , マッコンキー寒天培地 (栄研化学) , GAM 寒天培地 (日水製薬) および変法 FM 寒天培地 (日水製薬) に接種し、好氣的または嫌氣的条件下、20℃で 10 日間培養した。各培地から無作為に 20 株ずつを釣菌して TS または GAM 培地上で画線・培養を数回繰り返す、純粋培養を得た。本研究では、通性嫌気性細菌は好気性細菌に含めて扱うこととした。

(3)AHL 生産能の測定

分離菌株の AHL 生産能は、Chromo-

bacterium violaceum CV026 株を用いて調べた。好気性細菌は TS 培地に、偏性嫌気性細菌は GAM 培地に接種し、それぞれ好氣的または嫌氣的条件下、20℃で数日間培養した。次に出現したコロニーから 1 cm 程度離して CV026 株を接種し、好氣的条件下、25℃で2日間培養して CV026 株のコロニーが紫色を呈した場合、当該菌株を AHL 生産菌と判定した。

(4)分離菌株の分子系統解析

TS 寒天培地から分離した AHL 生産菌について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読し、同定した。解読した配列データは DDBJ/GenBank/EMBL のデータベースを対象とする BLAST 検索や EZ-taxon の Web 検索サイトを行い、近縁種を見出した。さらに Clustal W を用いて分子系統解析を行い、種の同定を行った。本研究で解析した塩基配列は DDBJ に登録した。

4. 研究成果

(1) アユ

アユの腸内容物、飼育水および配合飼料から TS およびマッコンキー培地を用いて分離した 260 株の内、133 株が AHL を生産した。GAM および改変 FM 培地を用いて同じ試料から分離した 242 株の内、152 株が偏性嫌気性細菌、90 株が通性嫌気性細菌であった。偏性嫌気性細菌はいずれも AHL を生産しなかったのに対し、通性嫌気性細菌では 52 株が AHL を生産した。

腸内容物の好気性細菌数、偏性嫌気性細菌数および従属栄養細菌数は、それぞれ $1.8 \times 10^7 \sim 9.3 \times 10^8$ CFU/g、 $2.1 \times 10^5 \sim 3.6 \times 10^8$ CFU/g および $2.1 \times 10^7 \sim 1.3 \times 10^9$ CFU/g であったのに対し、AHL 生産者は $2.8 \times 10^6 \sim 2.8 \times 10^8$ CFU/g であり、従属栄養細菌数の 1.2~60.7% を占めた。飼育水の好気性細菌数、偏性嫌気性細菌数および従属栄養細菌数は、それぞれ

3.8×10^4 CFU/ml、 4.1×10^3 CFU/ml および 4.2×10^4 CFU/ml であり、AHL 生産者は 1.3×10^4 CFU/ml で、全体の 31.0% を占めた。配合飼料では偏性嫌気性細菌および AHL 生産菌は検出できず、AHL 生産能のない好気性細菌が 8.9×10^4 CFU/g 検出されたのみであった。

TS 寒天培地から分離した AHL 生産菌 32 株の内、継代途中で生育しなくなった 2 株を除く 30 株について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を解読し、分子系統解析を行った。その結果、腸管由来の 1 株は *Aeromonas media* と 100% の相同性を示した。腸管および飼育水から分離した 3 株は *Aeromonas popoffii* と 98.9~100% の相同性を示した。腸管および飼育水から分離した 25 株は *Aeromonas veronii* と 99.7~100% の相同性を示した。飼育水由来の 1 株は *Chromobacterium aquaticum* と 99.8% の相同性を示した。これらの同定結果は分子系統樹によって支持された。以上の結果から、アユの腸管および飼育水から分離した AHL 生産菌は *A. media*、*A. popoffii*、*A. veronii* および *C. aquaticum* と同定することが妥当であると判断された。

(2)ワカサギ

ワカサギの腸内容物、飼育水および配合飼料の生菌数はそれぞれ、 $2.2 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^7$ CFU/g、 3.2×10^3 CFU/ml および 2.4×10^4 CFU/g であった。これらの数値は、淡水魚類に関するこれまでの数値とほぼ一致していた。

ワカサギの腸管、飼育水および配合飼料から分離した 136 株について 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づいて同定したところ、15 属 28 種に分類された。またこれらの AHL 生産能について調べたところ、半数の 68 株が生産菌であり、それらはいずれも *Aeromonas* 属に分類される細菌 (*A. aquariorum*, *A. eucrenophila*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. hydrophila* subsp. *ranae*, *A. media*, *A. sobria*, *A.*

taiwanensis, *A. veronii*) であった。飼育水からは4属7種の細菌が検出され、*Acinetobacter parvus*, *Aeromonas veronii*, *P. shigelloides*などが優占した。配合飼料からは6属9種が検出され、*Staphylococcus saprophyticus*が優占した。これに対しワカサギの腸内容物からは8属17種が検出されたが、優占種は個体によって異なっていた。その内、*Aeromonas*属、特に*A. sobria*や*A. veronii*は5個体中4~5個体から検出され、優占した。また個体3および5では乳酸球菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*が優占していた。

AHL生産菌は、配合飼料からは検出されなかったものの、飼育水では 9.7×10^2 CFU/ml (30%)、腸管内容物で $1.7 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^7$ CFU/g (5~100%) であり、飼育水やワカサギの腸管内に多く生息していることが判明した。

ワカサギでは、浸漬攻撃によって実験的に *A. hydrophila*に感染することが報告されている。*Aeromonas*属細菌では、AHLを介在として溶血素やプロテアーゼのような病原因子の転写が活発化することによって日和見感染症を発症することが報告されている。また、AHLを生産する細菌がワカサギの腸内に優占することは、これらの物質がオートインデューサーとしてQS機構を活性化させ、ときに宿主魚類に日和見感染症を発症させることを示唆するものである。さらに、本研究でAHL生産能が認められた *A. hydrophila*, *A. media*, *A. sobria*, *A. veronii*などの細菌は、他の淡水魚からも優占菌として分離されていることから、これらの魚類の *Aeromonas*症発症などにもQS機構が関与する可能性が示唆される。

(3) キンギョ

魚類病原細菌の一部はクオラムセンシン

グ機構を用いて細胞同士のコミュニケーションを行うことが知られており、魚類腸管の優占菌である *Aeromonas* 属などでは、介在物質 (オートインデューサー) として *N*-アシルホモセリンラクトン (AHL) を使うことが多い。そこで、キンギョの腸内細菌などについてAHL生産能やAHL分解能などについて調査をした。その結果、AHL生産菌の大部分は *Aeromonas* 属細菌であり、本物質を偏性嫌気性細菌は生産しなかった。また、AHL分解細菌としては *Shewanella* 属細菌が主なものであった。今後は、AHL分解能の性質について調べ、プロバイオティクスとしての有効性を検証する予定である。

(4) 海産魚類

海産魚類の日和見感染菌の代表である *Vibrio* 科細菌に特異的なプライマーを用いた定量法の有効性について検証した。その結果、①本プライマーを用いたPCR法を用いてクサフグ、トラフグおよびヒラメの腸内容物から構築したクローンライブラリー全310クローンが *Vibrio* 科細菌であることから、本プライマーは主に *Vibrio* 科細菌の16S rDNAの一部を増幅していることが判明した。② *Vibrio* 科の23菌株のみでDNAが増幅したのに対し、*Vibrio* 科以外の89菌株では増幅が認められなかった。③本プライマーを用いたリアルタイムPCR法による *Vibrio* 科細菌の定量では、*Vibrio* 科細菌数は沿岸魚類腸管内の全菌数の0.0001~50.1%を占めたことから、個体によって大きく変動することが判明した。本研究で開発した定量PCR法によって *Vibrio* 科細菌の迅速定量が可能となったことから、魚類の飼育環境と *Vibrio* 科細菌の関連性について今後検討する予定である。

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 8 件)

- ① 陳 家輝、相良和之、糸井史朗、杉田治男、ヒイラギ腸管内の硫酸還元細菌について. 水産増殖, 査読有, 60 巻, 2012, 519-521.
- ② 田中祐輔、陳 家輝、小崎照邦、込宮雄介、糸井史朗、杉田治男、クローンライブラリー法による沿岸魚類腸内細菌群集の解析. 水産増殖, 査読有, 60 巻, 2012, 333-340.
- ③ S. Itoi, Y. Kanomata, S. Uchida, K. Kadokura, T. Nishio, T. Oku, H. Sugita, Effect of the C-terminal domain of *Vibrio proteolyticus* chitinase A on the chitinolytic activity in association with pH changes. *Letters in Applied Microbiology*, 査読有, 54 巻, 2012, 441-446.
- ④ H. Sugita, H. Mizuki, Bacterial diversity of the upper and lower intestines of the common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) reared in an indoor tank. *Journal of Applied Ichthyology*, 査読有, 28 巻, 2012, 647-648.
DOI: 10.1111/j.1439-0426.2012.01965.x
- ⑤ 陳 家輝、小川真幸、相良和之、糸井史朗、杉田治男、養殖ワカサギ腸内細菌のN-アシルホモセリンラクトン生産能. 日水誌, 査読有, 78 巻, 2012, 259-261.
- ⑥ H. Sugita, H. Mizuki, S. Itoi, Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. *Aquaculture Research*, 査読有, 43 巻, 2012, 481-488.
DOI:10.1111/j.1365-2109.2011.02851.x
- ⑦ 小川真幸、陳 家輝、糸井史朗、杉田治男、養殖アユ腸管から分離されたN-アシルホモセリンラクトン生産菌. 水産増殖,

査読有, 59 巻, 2011, 595-600.

- ⑧ H. Sugita, K. Sugiyama, S. Itoi, Culturable bacterial flora in the intestinal tract of Japanese pufferfish *Takifugu rubripes*. *Aquaculture Science*, 査読有, 58 巻, 2010, 437-438.

[学会発表] (計 18 件)

- ① 高梨志保里、宮之本昂也、糸井史朗、杉田治男. 海洋性乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* のトラフグ腸管への定着性に関する研究. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013.03.29、東京海洋大学 (東京).
- ② 相良和之、陳 家輝、糸井史朗、杉田治男. *Vibrio* 科細菌検出プライマーの有効性. 平成 25 年度日本水産学会春季大会, 2013.03.27、東京海洋大学 (東京).
- ③ K. Sagara, C. H. Chen, S. Itoi, H. Sugita. Sulfate-reducing bacteria in the intestinal tract of spotnape ponyfish *Leiognathus nuchalis*. 10th Japan-Korea, Korea-Japan Joint Symposium on Aquaculture 2012, 2012.12.08, Nagasaki.
- ④ J. Uchida, A. Miura, S. Itoi, H. Sugita. Colonization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains in the intestinal tract of goldfish. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012.07.14, Kochi, Japan.
- ⑤ C.H. Chen, Y. Tanaka, K. Sagara, S. Itoi, H. Sugita. Microbial communities in intestinal tracts of Japanese coastal fish. The 9th Asia-Pacific Marine Biotechnology Conference, 2012.07.13, Kochi, Japan.
- ⑥ 杉田治男. I 腸内細菌研究の現状認識. 3. 魚類の腸内細菌叢. シンポジウム: 水産「プロバイオティクス」の創成 (企画責任者: 杉田治男、吉水守、澤辺智雄). 平成 24 年度日本水産学会春季大会, 2012.03.30、東京海洋大学 (東京).

- ⑦ 三浦愛、糸井史朗、杉田治男. 乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*の海水魚類腸管への定着性. 平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012.03.28、東京海洋大学(東京) .
- ⑧ 陳家輝、田中祐輔、相良和之、糸井史朗、杉田治男. 沿岸魚類の腸内細菌群集について. 平成 24 年度日本水産学会春季大会、2012.03.28、東京海洋大学(東京)
- ⑨ A. Miura, S. Takanashi, S. Itoi, H. Sugita. Possibility of marine *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strain as probiotic for the pufferfish *Takifugu rubripes*. The International Symposium on Muscle Biochemistry, University of Tokyo, 2011.10.28, Tokyo.
- ⑩ S. Takanashi, S. Itoi, H. Sugita. Advantage of chitin oligosaccharides utilization in *Lactococcus lactis* strain from marine environment. The International Symposium on Muscle Biochemistry, University of Tokyo, 2011.10.28, Tokyo
- ⑪ 三浦 愛、糸井史朗、杉田治男. 由来の異なる *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*の宿主選択性. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会、2011.10.01、長崎大学(長崎) .
- ⑫ C.H. Chen, Y. Tanaka, T. Kozaki, S. Itoi, K. Yoshihara, H. Sugita. Sulphate-reducing bacteria in the eelgrass bed of the Izu Peninsula, Japan. IUMS2011, 2011.09.07, Sapporo.
- ⑬ Y. Tanaka, C.H. Chen, T. Kozaki, Y. Komiya, S. Itoi, H. Sugita. Microflora of the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. IUMS2011, 2011.09.07, Sapporo.
- ⑭ 田中祐輔、陳 家輝、小崎輝邦、糸井史朗、杉田治男. クローンライブラリィ法による沿岸魚類腸内細菌叢の解析. 平成 23 年度日本水産学会春季大会、2011.03.30、東京海洋大学(東京) .
- ⑮ Y. Tanaka, C.H. Chen, T. Kozaki, S. Itoi, H. Sugita. Microbial communities in the intestinal tracts of coastal fish. 2010 Korea-Japan, Japan-Korea Joint Symposium on Aquaculture, 2010.11.13, Busan, Korea.
- ⑯ M. Ogawa, S. Itoi, H. Sugita. The AHL-producing bacteria in the intestinal tracts of ayu *Plecoglossus altivelis*. 2010 Korea-Japan, Japan-Korea Joint Symposium on Aquaculture, 2010.11.13, Busan, Korea.
- ⑰ C.H. Chen, T. Kozaki, Y. Tanaka, S. Itoi, K. Yoshihara, H. Sugita. Microbial communities in the eelgrass bed of the Izu Peninsula, Japan. 2010 Korea-Japan, Japan-Korea Joint Symposium on Aquaculture, 2010.11.13, Busan, Korea.
- ⑱ S. Itoi, H. Sugita. Characterization of a marine lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from the pufferfish. 9th International Marine Biotechnology Conference, 2010.10.10, Quigdao, China.

〔図書〕(計 2 件)

- ① 石田祐三郎・杉田治男(編著): 増補改訂版・海の環境微生物学、2011、恒星社厚生閣、249 p.
- ② 杉田治男(日本食品微生物学会監修): 食品微生物学辞典、2010、中央法規、341 p.

6. 研究組織

(1)研究代表者

杉田 治男 (SUGITA HARUO)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 50139052