

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580283

研究課題名(和文) 無菌魚を用いた魚類プロバイオティクスの機能検証とその応用による最適投与法の検討

研究課題名(英文) A new germ-free fish model of guppy related to probiotic administration

研究代表者

間野 伸宏 (MANO, Nobuhiro)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：10339286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：不明な点の多いプロバイオティクスの役割を *in vivo* で調べるため、グッピーの成魚より得た無菌魚(GF)と、環境水で有菌化した魚体(CONV)または乳酸菌 *P. acidilactici* 浸漬処理魚(Pro)の間での成長、白血球局在、および糖鎖構造の違いを調べた。GFやProは、孵化21日後でCONVと比べ有意な成長が認められた。組織観察では、GFに比べProやCONVの消化管や腎臓内の成熟白血球数の有意な増加が確認された。更に、実験区間で皮膚や食道表面の粘液物において違いあることが観察された。GFによる本研究モデルは、魚類におけるプロバイオティクスの機能研究に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To investigate the poorly understood modes of action of putative probiotics *in vivo*, we analyzed the differences of growth, leucocyte localization and distribution of glycoconjugates between germ-free fish (GF) prepared from guppy and conventionalized fish (CONV) treated with reared water or monoassociated fish (Pro) administrated with lactic acid bacteria *Pediococcus acidilactici*. The growth of GF and Pro on day after hatching (DAH) 21 was significantly higher compared to the CONV. Histological analysis revealed a significant increase in number of matured leucocytes in the intestine and kidney of Pro and CONV on DAH14 and 21 compared to that of GF. In addition, we observed that there is a difference among the mucosa surfaces of skin and esophagus between groups. The presented models combined with GF can be used to study the rules and actions related to probiotics in fish.

研究分野：魚病学，魚類免疫学

キーワード：微生物 免疫 仔稚魚 魚病 プロバイオティクス 歩留まり 成長 水産

1. 研究開始当初の背景

(1)申請者らは、前回の科学研究費助成事業(若手B:課題番号21780185)において、卵胎生魚であるグッピー(雌)から無菌解剖により稚魚を採取する事で、100日以上飼育可能な“無菌(GF)魚”の作出に成功した。

(2)近年、魚類養殖分野でも、薬事法改正に伴う抗生物質等の治療薬剤の使用制限や消費者の安全嗜好を背景に、有用微生物を用いて病気を予防する“プロバイオティクス”が注目されている。これまで多くの研究者により魚体の免疫能・抗毒性・ストレス耐性の向上や消化吸收・成長促進等に寄与する有用微生物が報告されているものの、養殖現場ではプロバイオティクス法は安定した評価が得られていない。すなわち、投与効果が安定せず、養殖生産者自身が最適な投与法を模索しているのが現状である。哺乳類では、マウス等の無菌動物を用いて正確に検証された有用細菌のみが用いられている。また、水中生活者である魚類は餌料以外にも飼育水や底泥などを常に取り込んでいるため、生体内外の細菌群の構成・動態が陸上動物より複雑であると考えられており、プロバイオティクス菌株をより安定的に魚類腸管に定着させ、その有用性を引き出すためには、常在性細菌の影響を受けない無菌(GF)魚を用いた有用細菌の機能検証が必用である。

2. 研究の目的

本研究では、前申請において確立したグッピーによるGF魚飼育系を用い、乳酸菌投与が魚体の成長、生体防御能、および生理代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)無菌魚

東南アジア産グッピー成魚(雌)を用いて、前回の科学研究費助成事業で確立した改変手法に従い無菌的に得たGF魚を用いた。なお、飼育期間中の無菌確認は、飼育水を経時的に採取して液体培地に接種・培養する培養法および16S rRNA領域を対象としたユニバーサルプライマーによるPCR増幅法により実施した。

(2)供試細菌

プロバイオティクス菌種として魚類養殖で有用報告のある乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* 109619株を用いた。なお、本菌株は、事前検討を行った6菌株中最も良好な増殖が認められたものである。

(3)実験手順

(1)の手順で無菌(GF)魚を作出した。また比較のため、作出して3日後のGF魚の飼育槽に5.0μm濾過フィルターでろ過した親魚水槽水を接種したものを有菌(CONV)魚と

した。更に、GF魚に(2)の菌懸濁液を展着(5.1~9.0×10³ CFU/g)した滅菌稚魚用配合飼料を与えたものをプロバイオティクス投与(Pro)魚とした。なお、給餌は全てGF作出3日後から開始した。飼育に伴う解析項目の詳細は下記に示す。

成長

魚体の成長は、水槽底に貼り付けた目盛線を用いて、魚体を取り上げることなく経時的に全長を測定することにより実施した。

生体防御能

生体防御能は、薄切標本観察による白血球系細胞の組織局在により評価した。すなわち、GF魚作出14または21日後に魚体を取り上げ、麻酔した後、ブアン液で固定した。常法に従いパラフィン薄切標本を作製し(図1)、頭部(図1A)および胴部(B)を主な観察部位として、ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色、T細胞やNK細胞が発現するチロシンキナーゼに特異性を示す市販抗体(Zap-70)を用いた免疫組織化学染色、および貪食系細胞に特異的結合性が確認されたSBAレクチンによる糖鎖組織化学染色を実施した。

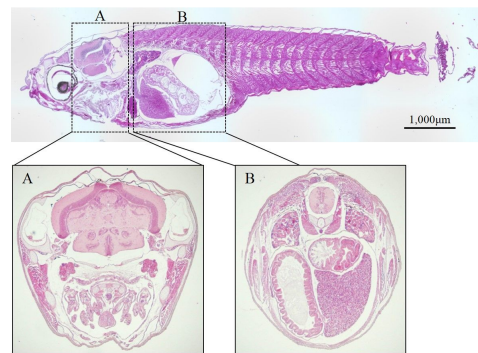


図1 グッピー稚魚の薄切標本像。HE染色。
A: 頭部, B: 胴部。

生理代謝

同一手順でパラフィン薄切標本を作製した。AB-PAS染色による多糖染色や7種類のレクチンを用いた糖鎖組織化学染色を実施し、各実験魚の多糖類や糖鎖の組織局在・構成の差異を観察することにより、GFやPro魚の生理代謝の特徴を解析した。

4. 研究成果

(1)GF魚作出

一尾の親魚につき15~23(平均19±3)尾のGF魚が得られた。GF魚作出に関する手技改良に伴い、同作出の成功率も2割近く向上した。

(2)成長

全長の経時変化を図2に示した。GF魚作出7日後から、CONV魚とGFやPro魚の間で成長に差が認められた。2週間後になるとGF

および Pro 魚ともに、CONV 魚に比べ有意に高い成長が確認され ($p < 0.05$)、CONV との間で有意な差はみられなかったものの、3 週間後に最も高い成長が認められたのは Pro 魚であった。これらの結果は、Pro 投与により、魚体の成長促進をもたらす微生物群が存在し、本飼育系により菌株選択が可能であることを示すものである。

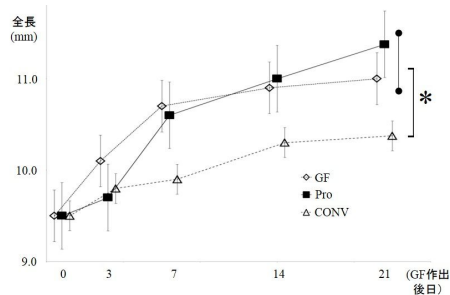


図 2 全長の経時的変化。

(3) 生体防御能

HE 染色の結果、腎臓の細胞間質に認められる白血球様細胞が、実験を開始して 2 週間以降、GF 魚では Pro や CONV 魚と比べ著しく少ないことが確認された (図 3)。

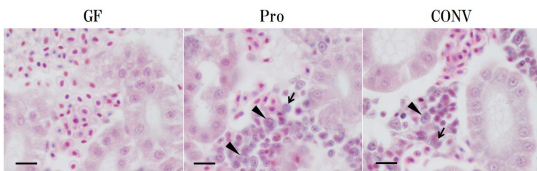


図 3 腎臓組織の HE 染色。Scale bars: 10 μm 。arrows: リンパ球様細胞。arrow heads: 好中球様細胞。

で使用した固定標本を用いて免疫組織化学染色および糖鎖組織化学染色を実施したところ、特に GF 魚の消化管組織において、Pro や CONV 魚に比べリンパ球や貪食系白血球が著しく少ないことが確認された (図 4)。

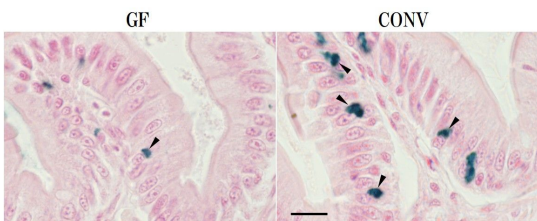


図 4 DBA レクチンによる腸管組織の糖鎖組織化学染色。GF 魚ではマクロファージ系細胞 (arrow heads) が殆ど認められない。Scale bar: 10 μm 。

およびの結果は、魚類の造血や消化管組織における白血球の分化発達 (細胞性免疫の発達) と常在微生物が密接に関係していることを意味する。

(4) 生理代謝

AB-PAS 染色を実施したところ、染色性にお

いて試験区間で差異は認められなかった。しかし、同染色に陽性反応を示す頭部および胴体部の皮膚粘液細胞の数は、CONV および Pro 魚ともに GF に比べ有意に多く、微生物が魚類の粘液分泌活性に影響をもたらすことが明らかとなった (図 5: $p < 0.05$)。

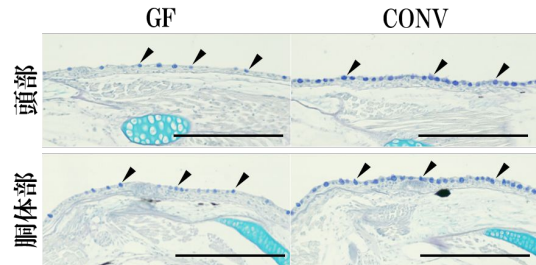


図 5 頭部および胴体部皮膚の AB-PAS 染色。Scale bars: 200 μm 。arrow heads: 粘液細胞。

レクチンによる糖鎖組織化学染色を実施した結果、SBA および DBA レクチンでは、試験区間で皮膚の粘液細胞に対する結合性に差異が確認された。すなわち、SBA レクチンは GF 魚の皮膚粘液細胞に対して結合性を示したのに対し、CONV および Pro 魚では結合性が減退した。一方、DBA レクチンでは、GF 魚では殆ど結合性が確認されなかったのに対して CONV および Pro 魚では著しく増加する傾向がみられた (図 6)。これらの結果は、微生物が粘液中の糖鎖組成に影響をもたらすことを示唆している。

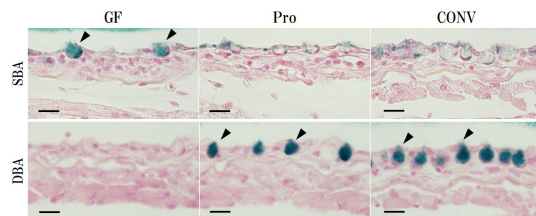


図 6 DBA および SBA レクチンによる皮膚組織の糖鎖組織化学染色。Scale bar: 10 μm 。arrow heads: 粘液細胞。

皮膚組織以外でも、RCA₁₂₀ レクチンにおいて、上腕動脈、腹部大動脈、および背部大動脈の血管内皮細胞に対する結合性が試験区間で異なっていた。すなわち、GF 魚では弱い結合性しか認められなかったのに対し、CONV および Pro 魚では強い結合性が確認され、血管壁に形成される糖鎖 (グリコカリックス) の形成に微生物が影響を及ぼしているものと考えられた (図 7)。

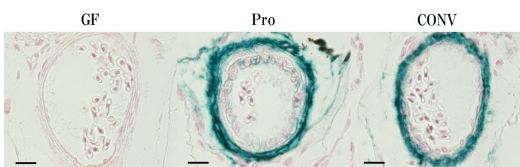


図 7 RCA120 レクチンによる腹部大動脈の糖鎖組織化学染色。Scale bar: 10 μm 。

(5)まとめ

本研究においてPro魚より得られた生体防御能や生理代謝の結果は、比較対照として設定したCONVに類似していた。しかし、Pro魚の成長はCONVより遥かに良好であり、特に血管内皮に認められるグリコカリックスの形成を促進する傾向が認められた。グリコカリックスは血流の循環と密接に関係していることが知られており、Pro魚において良好な成長が認められた要因の一つかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

檜山剛典、下平英理、村上大雅、間野伸宏、無菌飼育がグッピー稚魚の糖鎖局在に及ぼす影響、平成27年度日本水産学会春季大会、2015年3月28日、東京海洋大学(東京都)

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

間野 伸宏(MANO, Nobuhiro)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号: 10339286

(2)研究分担者

難波 亜紀(NAMBA, Aki)

日本大学・生物資源科学部・研究員

研究者番号: 20445737

中西 照幸(NAKANISHI, Teruyuki)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号: 00322496