

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450263

研究課題名(和文) 飼育ストレスが魚類腸管内のビブリオ科細菌に及ぼす影響

研究課題名(英文) Response of the family Vibrionaceae in the intestinal tracts of fish subjected to the stressful conditions

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：(1)トラフグの腸内容物を配合飼料と混合して構築したスラリーが腸内細菌群集のモデル系として使用可能であるか否かを検証したが、構成菌叢が腸内細菌叢と大きく異なったことから、モデル系として使用するには大幅な改良を要することが判明した。

(2)飼育密度や飼育温度を変えてトラフグを飼育し、それらのストレスがビブリオ科細菌の増加を引き起こすか否かについて検討したところ、飼育密度が高くなるとビブリオ科細菌数が増加する傾向が観察された。この結果は、飼育密度が高いときに生じるストレスによってトラフグ腸管内のビブリオ科細菌の増殖が促進されたことを示唆する。

研究成果の概要(英文)：(1) As a model system of intestinal contents of pufferfish (*Takifugu rubripes*), the slurry which was prepared by mixing the grinded feeds and intestinal contents of pufferfish was evaluated. However, the bacterial community in the slurry was remarkably different from that of feeds and intestinal contents, suggesting that this system needs to be improved for the study of intestinal microbiology of pufferfish.

(2) Pufferfish was reared in glass aquaria under the stressful conditions of fish density and temperatures, and the family Vibrionaceae in the intestinal tract of pufferfish was monitored. As a result, the trend that the family Vibrionaceae was enhanced to some extent as the fish density increased in the aquaria. This fact suggests that Vibrionaceae may proliferate rapidly under stressful conditions such as high density of rearing fish.

研究分野：農学

 キーワード：腸内細菌叢 トラフグ プロバイオティクス ビブリオ科細菌 飼育密度 飼育温度 配合飼料 q P
C R

1. 研究開始当初の背景

魚類の腸管内には有益な細菌だけでなく感染症を発症させる魚病細菌も多く存在している。魚類の感染症は宿主、病原体および環境ストレスの条件が合致することで発症するため、高密度で飼育するストレスの多い養殖環境では感染症が発症しやすくなる。ストレスが海産魚類に過度にかかると、腸管内のビブリオ科細菌が増加する現象がこれまでに観察されたことから、海産魚類に環境ストレスをかけることによって日和見感染症が発症すれば、環境ストレス 腸管内でのビブリオ科細菌の増加 日和見感染症の発症との図式が構築されるため、海産魚類の日和見感染症の防除やプロバイオティクスの開発などの重要な基礎的知見となりうる。

2. 研究の目的

(1) 魚類の腸内細菌叢を解析する際、対象となる宿主魚類を解剖して腸管を取り出し、内容物を絞り出して試料とすることが一般的である。しかし、動物保護の観点から犠牲となる個体数を最少に抑えることが望まれている。そこで、給餌している飼料と魚から採取した腸管内容物を混合して調製したスラリーをインキュベーター内で培養したシステムを構築した。このシステム内で腸内細菌叢が再現することができれば、本研究が飛躍的に発展する可能性が高いことから、細菌群集の動態を解析することによって、このシステムの腸内モデルとしての有効性を検証することを目的とした。

(2) ビブリオ科細菌は海産魚類の日和見感染細菌（ビブリオ病原菌）として知られている。従来の研究から、海産魚類にストレスがかかることでビブリオ科細菌が増加している可能性が示唆されている。そこで本研究では、種々の密度で飼育したトラフグ稚魚の腸管内および飼育水中のビブリオ科細菌の動態を qPCR や全菌数の測定などを用い

て明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) トラフグ腸内細菌のモデル系構築：プラスチック製遠沈管に配合飼料、滅菌人工海水およびトラフグ稚魚の腸内容物を加えたスラリーを4本調製した。その内2本は好气的条件下、残り2本は嫌气的条件下、25℃で3日間培養した。培養開始時を0日目とし、1日おきに各スラリーから一部を採取した。採取した試料は生菌数および全菌数の測定、qPCR法によるビブリオ科細菌数の計測およびクローンライブラリー法による細菌叢の測定に用いた。生菌数の測定には TCBS 寒天培地、PYBG 寒天培地およびシステイン添加 PYBG 寒天培地を用い、TCBS および PYBG 寒天培地は好気培養、システイン添加 PYBG 寒天培地は嫌気培養に供した。

(2) トラフグ飼育水でのビブリオ科細菌の動態：57 L 容量の循環ろ過水槽にトラフグの稚魚を0、3および10尾収容した3実験区を設け、28日間給餌飼育した後、魚体を取り上げた。経時的に採取した試水は、1/20 PYBG 寒天培地および TCBS 寒天培地に接種して培養した後、各試料から20菌株を分離した。また、試水の一部は DAPI で染色して全菌数を求めた。さらに、試水をろ過したフィルターから DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子を増幅してクローンライブラリーを構築し、主要な微生物群集を明らかにした。最後に、qPCR法を用いて、試水中のビブリオ科細菌を定量した。

(3) トラフグ腸内細菌群に及ぼす飼育密度の影響：FRP水槽（700 L）で飼育したトラフグ稚魚を6つの循環ろ過式ガラス水槽（52 L）に10尾、20尾および30尾（各々2水槽）収容した。トラフグは市販の配合飼料で飼育した。収容10日後に各水槽から10尾ずつ取り上げ、腸内容物を採取した。飼育水は収容

直後と飼育 10 日後に行った。飼育水については 1/20 PYBG 寒天培地および TCBS 寒天培地を用いた生菌数, DAPI 染色による全菌数の測定および qPCR によるビブリオ科細菌数の計測を行い, 腸内容物については後者の 2 項目を測定した。

トラフグ腸内細菌群に及ぼす飼育温度の影響: FRP 水槽 (20)で飼育したトラフグ稚魚を 6 つの循環ろ過式ガラス水槽 (20)に 10 尾ずつ収容した。6 つの水槽は 20 , 25 および 30 (各々2 水槽) に設定した。トラフグ収容後から温度を 1 /日の速度で上げ, 25 および 30 に達してからその温度で 9 日間飼育した。飼育後, 各水槽からトラフグを 5 尾ずつ取り上げ, 腸内容物を採取し, 試料とした。また, 飼育開始直後および実験終了時の飼育水も試料とした。飼育水および腸内容物の各試料は 1/20 PYBG 寒天培地, TCBS 寒天培地を用いた生菌数, DAPI による全菌数および qPCR によるビブリオ科細菌数の計測に用いた。

4 . 研究成果

(1) トラフグ腸内細菌のモデル系構築: 配合飼料の生菌数は PYBG 寒天培地において 2.5×10^3 CFU/g であったが, TCBS 寒天培地では細菌は検出されなかった。スラリーは好気培養, 嫌気培養に関わらずどの培地においても 0 日目から 1 日目にかけて著しく増加し, 以降はほぼ同レベルを保つ傾向が見られた。全菌数は 0 日目から 2 日目にかけて増加し, 3 日目は 2 日目とほぼ同レベルを示した。また, 配合飼料と腸内容物を比較すると腸内容物の方が高い全菌数を示した。ビブリオ科細菌数は生菌数と同様に 0 日目から 1 日目にかけて著しく増加し, 以降はほぼ同レベルに留まった。一方, 配合飼料と腸内容物を比較すると全菌数とは異なり, 配合飼料の方がビブリオ科細菌数の高い傾向が見られた。クローンライブラリー法によって測定した細菌叢では, 腸内容物では *Alphaproteobacteria*

綱が最も多く, 配合飼料では *Gammaproteobacteria* 綱のみが検出された。スラリーでは, 0 日目に *Alphaproteobacteria* 綱が最も多く出現したが, 翌日には *Gammaproteobacteria* 綱が優占し, その後は日数を経るごとに他の綱の細菌に遷移した。腸内容物から多く検出された *Alphaproteobacteria* 綱が 1 日目を以降検出されず, 1 日目に多く検出された *Gammaproteobacteria* 綱も培養日数を経るごとに割合が減少し, 代わりに他綱の割合が増加していく傾向が見られた。また, 使用した配合飼料に高密度で存在していた *Gammaproteobacteria* 綱はほとんど分離することができなかった。このことから, 今回のようなスラリーでは魚類の腸内細菌叢を再現することは難しいことが示唆された。

(2) トラフグ飼育水でのビブリオ科細菌の動態: トラフグ飼育水の全菌数は $10^4 \sim 10^8$ cells/mL の範囲であった。生菌数は, 1/20 PYBG 寒天培地で $10^2 \sim 10^6$ CFU/mL, TCBS 寒天培地では検出限界 (2.0×10^1 CFU/mL) 以下 $\sim 10^5$ CFU/mL であった。一方, qPCR 法による定量的結果, 飼育水中のビブリオ科細菌の密度は, トラフグ収容前で $10^1 \sim 10^4$ cells/mL であり, 飼育期間中は $10^7 \sim 10^8$ cells/mL に増加したが, 魚体取り上げ後は $10^1 \sim 10^2$ cells/mL にまで減少した。また, トラフグ未収容水槽でのビブリオ科細菌の密度は, 実験期間を通じて $10^1 \sim 10^4$ cells/mL の範囲であった。さらに, TCBS 寒天培地および 1/20 PYBG 寒天培地を用いて分離した細菌および 16S rDNA クローンライブラリー法で検出されたビブリオ科細菌は 16 種に上った。また, 飼育したトラフグの腸内容物の全菌数は, 腸内容物で $10^9 \sim 10^{11}$ cells/g, 飼育水で $10^5 \sim 10^8$ cells/mL の範囲であった。飼育水中のビブリオ科細菌数は, 飼育直前では $10^1 \sim 10^4$ cells/mL であったが, 飼育期間中は 10^6 cells/mL 程度にまで増加し, 取り

上げ後は $10^3 \sim 10^6$ cells/mLまで減少した。これに対し、腸内容物中のビブリオ科細菌数は飼育直前で $10^7 \sim 10^8$ cells/g, 飼育後で $10^5 \sim 10^{11}$ cells/gであった。全菌数は、腸内容物で $10^9 \sim 10^{11}$ cells/g, 飼育水で $10^5 \sim 10^8$ cells/mLの範囲であった。飼育水中のビブリオ科細菌数は、飼育直前では $10^1 \sim 10^4$ cells/mLであったが、飼育期間中は 10^6 cells/mL程度にまで増加し、取り上げ後は $10^3 \sim 10^6$ cells/mLまで減少した。これに対し、腸内容物中のビブリオ科細菌数は飼育直前で $10^7 \sim 10^8$ cells/g, 飼育後で $10^5 \sim 10^{11}$ cells/gであった。

(3) トラフグ腸内細菌群に及ぼす飼育密度の影響：飼育水の生菌数はどちらの培地でも実験開始 0 日目と比較して 10 日後の方が高かった。飼育水的全菌数もほとんどの水槽で増加し、腸内容物では、収容個体数が 20 尾以上の水槽で FRP 水槽の個体よりも高い値を示した。飼育水のビブリオ科細菌数はほとんどの水槽で増加する傾向を示したが、一部の水槽では減少することが観察された。腸内容物中のビブリオ科細菌数は FRP 水槽よりも 20 尾および 30 尾収容の水槽の方が多かった。過密飼育における飼育実験では、個体数の少ない水槽より多い水槽の方がビブリオ科細菌数はわずかではあったが増加する傾向が見られた。

トラフグ腸内細菌群に及ぼす飼育温度の影響：飼育温度を変えて飼育したトラフグ水槽では、飼育水およびトラフグの腸内容物における 1/20 PYBG 寒天培地および TCBS 寒天培地の生菌数、全菌数、ビブリオ科細菌数は 3 段階の温度に設定した 6 水槽間で顕著な差異は認められなかった。水温が腸内のビブリオ科細菌に及ぼす影響は 20~30 の範囲では顕著ではなかった。そのため、トラフグ稚魚では個体密度の方が水温よりもストレスを感じやすいことや、昇温速度が 1 /日と緩やかな変化であったためにストレス

として作用しにくかった可能性なども考えられた。

今後は、コルチゾールなどストレスを定量化できる項目を加えて、ストレス条件下での腸内細菌叢の動態について検討する必要がある。

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 10 件)

T. Tsunashima, R. Yamada, K. Abe, S. Noguchi, S. Itoi, S. Nakai, N. Takai and H. Sugita: Phylogenetic position of Scombroproidae within teleostei: the complete mitochondrial genome of the gnomefish, *Scombroproops gilberti*. *Mitochondrial DNA* 27: 2016, 3446-3448 (DOI: 10.3109/19401736.2015.1063135). 査読有

T. Tsunashima, S. Itoi, K. Abe, T. Takigawa, S. Inoue, T. Kozen, N. Ono, S. Noguchi, S. Nakai, N. Takai, M.-C. Huang and H. Sugita: The complete mitochondrial genome of the gnomefish *Scombroproops boops* (Teleostei, Perciformes, Scombroproidae) from the Pacific Ocean off the Japanese Islands. *Mitochondrial DNA* 27: 2016, 785-786 (DOI: 10.3109/19401736.2014.987242). 査読有

S. Itoi, A. Kozaki, K. Komori, T. Tsunashima, S. Noguchi, M. Kawane and H. Sugita: Toxic *Takifugu pardalis* eggs found in *Takifugu niphobles* gut: implications for TTX accumulation in the pufferfish. *Toxicon* 108: 2015, 141-146. 査読有

内田潤也、糸井史朗、杉田治男：海洋環境からの乳酸菌分離の試み、日本乳酸菌学会誌 24: 2014, 40. 査読有

S. Takanashi, A. Miura, K. Abe, J. Uchida, S. Itoi and H. Sugita: Variations in bile tolerance among *Lactococcus lactis* strains derived from different sources. *Folia Microbiologica*, 59: 2014, 289-293 (DOI 10.1007/s12223-013-0297-8). 査読有

S. Itoi, J. Uchida, S. Takanashi, T. Narita, K. Abe, S. Naya and H. Sugita (2014) The clam *Meretrix lamarckii* (Bivalvia: Veneridae) is a rich repository of marine lactic acid bacterial strains. *Annals of Microbiology* 60: 2014, 1267-1274 (DOI 10.1007/s13213-013-0771-1). 査読有

C. H. Chen, Y. Tanaka, Y. Komiya, S. Itoi and H. Sugita: Predominant intestinal bacteria of the pufferfish (*Takifugu rubripes* Temminck & Schlegel, 1850) reared in an indoor tank as determined by the clone library analysis and culture method. *Journal of Applied Ichthyology* 29: 2013, 1374-1377 (DOI: 10.1111/jai.12215). 査読有

[学会発表](計 10 件)

山田理子、綱島忠相、梶谷雄介、糸井史朗、杉田治男: 分子生物学的手法による有毒ヒラムシ *Planocera* 属の検出法の開発. 平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 29 日、東京海洋大学(東京都・港区).

南島諒輔、永田務、鈴木健太、内藤史美、糸井史朗、杉田治男: 培養条件下でのトラフグ腸内細菌叢に及ぼす配合飼料の影響. 日本水産増殖学会大 14 回大会、2015 年 11 月 13 日、東京海洋大学館山ステーション(千葉県・館山市)

山田理子、綱島忠相、奥原和也、糸井史朗、杉田治男: *Planocera* 属幼生がクサフグ稚魚の毒化に及ぼす影響. 平成 27 年度日本

水産学会秋季大会、2015 年 9 月 23 日、東北大学(宮城県・仙台市).

綱島忠相、山田理子、萩谷盛雄、梶谷雄介、糸井史朗、杉田治男: TTX を保有するヒラムシ類の系統学的地位および保有毒量の経年変化. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会、2015 年 9 月 23 日、東北大学(宮城県・仙台市).

U. Watanabe, H. Takeyama, M. Ito, T. Aoki, M. Hattori, W. Suda, J. Hikima, M. Sakai, H. Sugita, J. Wongtavatachai, M. Lukkana, S. Jantrakajorn, S. Unajak, M. Rapeepat, C.F. Lo, H.C. Wang. 16S rDNA-based metagenome analysis of microorganisms from *Tilapia* culture ponds in Thailand. 平成 26 年度日本水産学会秋季大会、2014 年 9 月 21 日、九州大学(福岡県・福岡市).

内田潤也、崎田洋、市川大介、小糸智子、糸井史朗、杉田治男: 淡水産二枚貝からの乳酸菌の分離およびその特性 - 海産二枚貝類由来株の表現形質との比較 -. 平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道大学(北海道・函館市).

相良和之、高橋佑典、南島諒輔、糸井史朗、杉田治男: 飼育トラフグの腸管内における *Vibrio* 科細菌の動態. 平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 28 日、北海道大学(北海道・函館市).

J. Uchida, S. Sakita, D. Ichikawa, S. Takanashi, T. Narita, K. Abe, S. Itoi and H. Sugita: Isolation of lactic acid bacteria from the intestinal tract of bivalves. 10th International Marine Biotechnology Conference, 2013 年 11 月 13 日, Brisbane (Australia).

相良和之、高橋佑典、南島諒輔、糸井史朗、
杉田治男：トラフグ飼育水におけるピブ
リオ科細菌の動態. 日本水産増殖学会第
12回大会、2013年10月14日、鹿児島大
学（鹿児島県・鹿児島市）.

内田潤也、崎田祥、市川大介、糸井史朗、
杉田治男：二枚貝のタイラギおよびタガ
イ腸内容物からの乳酸菌分離の試み. 日
本水産増殖学会第12回大会、2013年10
月14日、鹿児島大学（鹿児島県・鹿児
島市）.

〔図書〕(計3件)

杉田治男（編著）：恒星社厚生閣、増補改
訂版・養殖の水と餌 - 陰の主役たち. 2014
年、200 p.

杉田治男（共著）：朝倉書店、環境と微生
物の事典. 2014年、pp. 300-301.

杉田治男（編著）：恒星社厚生閣、水族館
と海の生き物たち. 2014年、193 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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし