

## 学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 アユの *Flavobacterium psychrophilum* に対する免疫応答性について

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物機能開発学 専攻

学生番号 D102247

氏 名 景 山 哲 史

アユ (*Plecoglossus altivelis altivelis*) は、サケ目、アユ科、アユ属に含まれる魚類であり、遺伝的に独立した種内の地理的品種である海産アユと琵琶湖産アユ (湖産アユ) が沖縄を除く日本国内の多くの湖沼河川に生息している。アユは、1年で一生を終える年魚であり、海産アユは海域と河川を行き来する両側回遊型の生活史を有しており、湖産アユは琵琶湖とその流入河川を行き来する陸封型の生活史を有している。アユは内水面の水産業 (河川漁業および養殖業) において重要な対象魚種として位置づけられている。アユ漁業は、河川漁業における漁獲量の約 10%を占めており、様々な伝統漁法により漁獲されている。一方、養殖業においては内水面の養殖生産量の約 15%を占めており、その用途として、食用および河川放流用に供されている。近年、アユの漁獲量および養殖生産量は減少傾向を続けており、漁獲量は、1991年の約 18,000 t から、2010年には約 3,400 t、養殖生産量も 1989年の約 13,000 t から、2010年には 6,000 t を下回り大きな落ち込みを示している。この要因として、河川漁業および養殖業で様々に指摘されているが、河川漁業および養殖業共に大きな被害を出している要因は病気の発生である。冷水病は、*Flavobacterium psychrophilum* を原因菌とする細菌感染症である。本病は、1987年に徳島県のアユ養殖場において、死亡したアユから *F. psychrophilum* が分離され、初めてその存在が確認された。その後、*F. psychrophilum* は全国の養殖場で確認され、近年は 30%前後のアユ養殖場で毎年発生が報告されている。さらに、冷水病は、養殖場だけでなく河川においても毎年発生しており、近年発生報告数は減少傾向にあるものの依然として被害が報告されている。また、アユの河川漁業と養殖業は放流や採捕によって密接な関係を築いている。これらのことから、冷水病の発生は漁獲量および養殖生産量の減少に大きく影響していると考えられている。これまでに、養殖業では薬剤や防疫対策によって、冷水病被害の抑制に成功した事例が知られている。一方、河川においては *F. psychrophilum* を保菌していない種苗の放流が推奨されているが、*F. psychrophilum* が広くまん延している現状において根本的な対策とはなっていない。河川漁業における冷水病対策としては、アユ種苗に *F. psychrophilum* に対する抵抗性を河川放流前に付与する必要がある。そこで本研究では、アユの *F. psychrophilum* に対する自然免疫および獲得免疫の免疫応答性について検討を行い、冷水病に対する予防免疫技術の開発に資することを目的とした。

第 2 章では、アユの自然免疫において *F. psychrophilum* に対する免疫応答性を明らかにすることを目的とした。アユは系統によって冷水病に対する感受性に違いが実験的に認められている。しかし、抵抗性系統のアユが *F. psychrophilum* 感染に対して行う生体防御能の詳細はわかっていない。本研究では、冷水病に対して抵抗性を示す抵抗性系統アユと高い感受性を有する感受性系統アユの 2 系統の人工産アユを供試して、*F. psychrophilum* の体内動態および免疫応答の経時的变化を比較した。*F. psychrophilum* の体内動態を調べるため、2 系統アユの脾臓内菌数を感染実験開始後 3 日に 1 回経時的に測定した。また、*F. psychrophilum* の感染に伴う 2 系統アユの免疫応答性を調べるため、6 日に 1 回採血を行い、血清凝集価および溶血価の値を経時的に測定した。その結果、2 系統アユともに実験開

始 6 日後に *F. psychrophilum* が検出され始め、12 日後に脾臓内菌数がそれぞれピークとなり、その後は菌数が減少した。このような経時的な増減傾向の推移は 2 系統で同傾向を示した。しかし、実験開始 6,9,12,15 日後のそれぞれの 2 系統間の脾臓内菌数には有意差が認められ、抵抗性系統アユは感受性系統アユより有意に菌数を低く抑制していた。このことから、抵抗性系統アユは *F. psychrophilum* 感染に対して体内菌数を低く抑制することにより死亡を回避していることが示唆された。また、抵抗性系統アユは、実験開始 6 日後の血清において *F. psychrophilum* に対する凝集反応が認められた。これらのことから、抵抗性系統アユは *F. psychrophilum* 感染に対して速やかな免疫応答が起こり、体内菌数を低く抑制することにより死亡率を低く抑制していることが示唆された。

第 3 章では、アユが *F. psychrophilum* 感染に対して獲得した免疫能について検討を行った。これまでの報告により、*F. psychrophilum* に高い感受性のある湖産系アユにおいても *F. psychrophilum* 感染の後、生残した個体は冷水病に対して高い抵抗性が認められている。そのため、*F. psychrophilum* の感染に対して、アユは免疫応答により、特異的免疫能を獲得すると考えられている。しかし、アユの *F. psychrophilum* に対して獲得する特異免疫応答の詳細はわかっていない。本研究では、人為的に *F. psychrophilum* 感染させたアユの生残魚から血清(免疫血清)を採取して感染実験に供試した。免疫血清を得るために、アユの飼育池に冷水病により死亡したアユを投入して冷水病の発生を誘導した。死亡が終息した後、生残魚から血清を採取した。免疫血清は 2 系統アユから採取し、それぞれ試験に供試した(免疫血清 1 および 2)。免疫血清 1 の殺菌活性能を調べるため、*in vitro* において免疫血清 1 と *F. psychrophilum* 菌液を混合し、1,5,24 時間後に菌数測定を行った。また、免疫血清 1 と *F. psychrophilum* 菌液を混合した懸濁液をアユの腹腔内に接種し、死亡率および接種 1~8 日の脾臓内菌数の変化を調べた。次に、免疫血清 1 を希釈した場合の効果についても調べた。これらの試験結果は、*in vitro* における試験では、免疫血清 1 と対照血清 1 (*F. psychrophilum* 未感染のアユから得た血清) の殺菌活性能に差が見られなかった。一方、血清と菌液を混合した懸濁液をアユに接種した試験では、実験開始 1 日後には免疫血清 1 と対照血清 1 で大きく脾臓内菌数に差が認められ、その後も、差が見られた。それに伴い、対照血清 1 を投与されたアユは死亡率が  $97.5 \pm 3.5\%$  (平均死亡率  $\pm$  S.D.) と高くなったが、免疫血清 1 を投与されたアユは  $10.0 \pm 7.1\%$  と死亡率が低く抑制され、両者の間には有意差が認められた。また、希釈すると免疫血清 1 投与区の死亡率は  $85.0 \pm 0.0\%$  と効果が低下したものの対照血清 1 よりは有意に高い生残率を示した。次に、免疫血清 2 を用いてアユの受動免疫試験を実施した。すなわち、免疫血清 2 をアユの腹腔内に接種した後、24 時間供試アユを蓄養し、*F. psychrophilum* で攻撃を加えた。また、免疫血清 2 の防御効果に対する特異性の有無を確認するため、細菌性出血性腹水病の原因菌である *Pseudomonas plecoglossicida* を用いて同様の受動免疫試験を実施した。その結果、*F. psychrophilum* に対する受動免疫試験では、免疫血清 2 区では  $40.0 \pm 0.0\%$  に対して対照血清区で  $70.0 \pm 8.7\%$  と有意に死亡率が低く抑えられ、免疫血清 2 の受動免疫効果が認められた。一方、*P. plecoglossicida* に対する受動免疫試験では、実験開始 8 日後には累積死亡率が 78.3~88.3% に達し、実験終了時に免疫血清 2 を接種した試験区と対照血清 2 を接種した試験区間の死亡率に有意な差が認められなかった。

これまでアユの冷水病対策として、ワクチン開発研究が盛んに行われてきた。しかし、数多くの試作ワクチンが作られたものの実用化に至ったものはない。これは、アユの *F. psychrophilum* に対する免疫機構が明らかになっていないため、試作ワクチンの効果検証が正確に行われていなかったためと考えられた。そこで、本研究ではアユの *F. psychrophilum* 感染に対する免疫応答性について検討を行った。その結果、冷水病に対して抵抗性を有する系統は *F. psychrophilum* の体内侵入に対して速やかに免疫応答が起こり、*F. psychrophilum* の体内増殖を抑制することにより死亡を回避していること、また、*F. psychrophilum* 感染アユから採取した免疫血清中には、*F. psychrophilum* 特異的な防除因子を有していることを明らかにした。これらの結果は、効果的な冷水病の対策手法に繋がると期待されている。このように特定の魚(宿主)と病原体の関係性について検討を行い、それを基に対策手法を開発しようとする試みは、これまであまり例がなく、アユの冷水病においては本研究がその先駆けであると考えられた。