



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	口白症感染耐過トラフグ血清を用いた口白症関連タンパク質の検出
Author(s)	高見, 生雄; 粉川, 愉記; 西澤, 豊彦 他
Citation	魚病研究, 42(1), 29-34 https://doi.org/10.3147/jsfp.42.29
Issue Date	2007-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38373
Type	journal article
File Information	yoshimizu-262.pdf



口白症感染耐過トラフグ血清を用いた 口白症関連タンパク質の検出

高見生雄^{1,2}・粉川愉記¹・西澤豊彦¹・吉水 守^{1*}

(2006年 8 月21日受付)

Detection of Kuchijirosho Associated Proteins by Western Blot with Sera of Tiger Puffer which Survived Kuchijirosho

Ikuo Takami^{1,2}, Yuki Kokawa¹, Toyohiko Nishizawa¹ and Mamoru Yoshimizu^{1*}

¹Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan

²Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Nagasaki 851-2213, Japan

(Received August 21, 2006)

ABSTRACT—Kuchijirosho (snout ulcer disease) is an infectious disease of tiger puffer *Takifugu rubripes* in Japan and Korea. Little is known about detailed characteristics on the causative agent of kuchijirosho, except it is a filterable agent. In the present study, kuchijirosho associated proteins (KAPs) with molecular weight of 100–120 kDa were detected in brain tissues of tiger puffer by western blot analysis with sera of tiger puffer which survived kuchijirosho, but not in the kidney or spleen tissues. Interestingly, KAPs existed in brain tissues of tiger puffer with no history of kuchijirosho, however, the KAPs were not recognized by those healthy fish sera. KAPs were fractionated in supernatant of brain tissue homogenate containing the kuchijirosho agent by ultra-centrifugation, while pathogenicity of the kuchijirosho agent was observed in the precipitated fraction rather than the supernatant. These results suggest that KAPs are not structural proteins of the kuchijirosho agent, and could be brain tissue proteins antigenically altered by infection of the kuchijirosho agent. It is also considered that the causative agent could be low in antigenicity to host fish because structural proteins of the causative agent was never recognized by host fish sera.

Key words: kuchijirosho, *Takifugu rubripes*, tiger puffer, kuchijirosho associated protein, snout ulcer disease

口白症は、中枢神経系、特に運動中枢障害に起因する狂奔および嘔み合いなどの異常行動、また口吻部の深部まで及ぶ激しいびらんおよび潰瘍化を特徴とする。罹病魚の脳、延髄および脊髄の神経細胞は変性・壊死し、特に大型神経細胞の顕著な萎縮像が認められる（中内ら、1985；和田ら、1985, 1986）。本症は、1981年より九州

地方の養殖トラフグ *Takifugu rubripes* で発生し、1986年頃までにその発症地域は中国・四国地方さらには近畿地方にまで拡大し、トラフグ養殖業に甚大な被害を与えている。本症は、水温15°Cでは発症しないが、20°C以上、特に25°Cで発症し、その経過は速く死亡率も高い（井上ら、1986）。また、罹病魚脳磨碎濾液を健常魚に接種することにより本症が再現されることから、本症が濾過性病原体による感染症であることが明らかにされた（井上ら、1986）。本症は、トラフグのみならずクサフグ *T. niphobles*、コモンフグ *T. poceilonotus*、ヒガンフグ

* Corresponding author
E-mail: yosimizu@fish.hokudai.ac.jp

¹ 北海道大学大学院 水産科学研究院

² 長崎県総合水産試験場

T. pardalis, さらにはマダイ *Pagrus major*, メバル *Sebastes inermis*, ブリ *Seriola quinqueradiata* でも発症することが人為感染試験により確認されている (Miyadai *et al.*, 2001; 高見ら, 2007a)。Inouye *et al.* (1992) は、トラフグ生殖腺由来初代培養細胞 (PFG) を用い、病魚脳および腎臓磨碎濾液から病原体の分離培養に成功し、さらに本病原体は大きさ 50 nm 以下で、有機溶剤および酸に感受性を有し、37°C では安定であるが 50°C で失活することを報告している。さらに高見ら (2007b) は、本病原体がホルマリンに対し比較的耐性であることを報告している。また、Miyadai *et al.* (2004) は、本病原体の浮遊密度が 1.096 g/cm³ で、紫外線、タンパク質分解酵素およびプロピオラクトンに感受性であることを報告している。しかし、本病原体に関するそれ以上の知見は無く、現在も詳細は明らかにされていない。したがって、本症の診断法および防除対策も未だ確立されていない現状にある。

本研究では、口白症に人為的に感染させ、生残したトラフグの血清を用い、自然発症魚の脳組織に存在する本症関連タンパク質 (kuchijirosho associated proteins, KAPs) を検出し、さらに本 KAPs の口白症診断法への応用について検討した。

材料および方法

供試魚

長崎県総合水産試験場の口白症人為感染耐過トラフグ (Nag-S) および神奈川県下の自然発症耐過トラフグ (Kan-S)、長崎県下の口白症発症トラフグ (Nag-M)、高知県および和歌山県下の健常トラフグ (Koh-H, Wak-H)、ならびに長崎県および佐賀県下の口白症発症歴不明トラフグ (Nag-U, Sag-U) 計 23 尾 (1 歳魚、体重 100~250 g) の脳、腎臓、脾臓組織および血清を実験に供した。なお、口白症感染耐過魚血清は、発症後 3~4 週に採血した。実験に供した血清および各組織は何れも使用するまで -80°C で保存した。また、高知県および神奈川県下のトラフグは渡辺研一博士 (水産総合研究センター) より、和歌山県下のトラフグは石丸克也博士 (近畿大学水産研究所) より分与を受けた。

抗トラフグ IgM 血清の作製

Edwardsiella tarda で感作したトラフグの血清を 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) で透析した後、DEAE-Sepharose カラムに添加し、NaCl 濃度勾配 (0~300 mM) で溶出した。凝集抗体価の認められた分画をプールし、80% 飽和硫酸アンモニウムで濃縮した。10 mM PBS (-) で透析した試料を Sephacryl S-300 カラムに添加し、10 mM PBS (-) で溶出後、凝集抗体価の認められた分画をプールし、60% 飽和硫酸アンモニウムで濃縮した。20

mM Na₂HPO₄-600 mM (NH₄)₂SO₄ (pH 7.0) で透析した試料を Phenyl-Sepharose カラムに添加し、(NH₄)₂SO₄ 濃度勾配 (600~0 mM) で溶出後、さらに蒸留水で溶出した。凝集抗体価の認められた分画をプールし、60% 飽和硫酸アンモニウムで濃縮したものを精製トラフグ IgM とした。精製トラフグ IgM を 10 mM PBS (-) で希釈後、完全フロイントアジュバント (Sigma) と乳化させ、ウサギの背部皮下に接種した。初回接種より 2 週間後同様の手順で乳化させた IgM を再接種し、さらに 2 週間後希釈 IgM を腹腔内接種した。最終免疫から 25 日後に全採血し、分離した血清を抗トラフグ IgM 血清とした。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) およびウエスタンブロット (WB)

トラフグの脳、腎臓および脾臓を 9 倍量の HBSS で磨碎した後、遠心分離 (20,000×g, 5 分) により得た上清に等量の SDS-変性緩衝液 (0.17 M Tris-HCl pH 6.8, 5.3% SDS, 13% β-mercaptoethanol) を加え 3 分間煮沸し、1/10 量のローディング液 (0.05% bromophenol blue, 70% glycerol) を加え、SDS-PAGE 用試料とした。SDS-PAGE は 7.5% 分離ゲルを用い、Laemmli (1970) の方法に準じて行った。ウエスタンブロット (WB) は、Towbin *et al.* (1979) の方法に準じ、転写用緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 200 mM glycine) を用い、10 V/cm で 20 分間の通電によりアクリルアミドゲル中に展開したタンパク質をニトロセルロース (NC) 膜 (Advantec) に転写した。NC 膜を 5 % スキムミルク-TS 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) で 30 分間ブロッキングした後、感染耐過、健常あるいは履歴不明トラフグ血清を 1 次血清、抗トラフグ IgM 家兎血清を 2 次血清、さらにアルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Dako) を 3 次血清とし、免疫染色を行った。発色には、NBT-X-リン酸液 (0.34 mg/mL nitroblue-tetrazolium, 0.17 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-toluidinium, 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) を用いた。

感染実験

長崎県総合水産試験場で飼育していた SPF トラフグ (平均体重 20 g) を各試験区当たり 20 尾ずつ 100 L 容水槽に収容し、計 4 試験区を設定した。試験区 1 には、人為感染発症魚の脳組織磨碎液を、試験区 2 には同磨碎液の超遠心分離 (100,000×g, 60 分) 上清分画を、試験区 3 には同超遠心分離沈殿分画懸濁液を各々 0.1 mL/尾ずつ背部に筋肉内接種した。また陰性対照区 (試験区 4) には、Hanks' balanced salt solution (HBSS) を接種した。試験魚は、無給餌で 2 週間流水飼育し (5 回転/日, 23.6~26.3°C)、累積死亡率を算出した。

結 果

感染耐過および健常トラフグ血清を用いた本症関連タンパク質の検出

口白症発症および健常トラフグの脳組織タンパク質の SDS-PAGE (7.5%ゲル) 像を Fig. 1-A に、また感染耐過トラフグ (Nag-S) および健常魚 (Koh-H) 血清による免疫染色像を Fig. 1-B および -C に各々示した。感染耐過魚血清では、100~120 kDa のタンパク質が発症魚脳組織から検出されたが、各個体間でそれらの分子量に若干の差異が認められた (Fig. 1-B, Lane 1~9)。また、同血清を用いた免疫染色で健常魚の脳タンパク質からも 100~120 kDa のタンパク質が検出された (Fig. 1-B, Lane 10, 11)。以降、本研究では、感染耐過魚血清で検出されたこれらのタンパク質を kuchijirosho associated proteins (KAPs) と称することとする。しかしながら、健常魚血清を用いた免疫染色では、100~120 kDa の

KAPs は何れの発症魚および健常魚の脳組織からも検出されなかった (Fig. 1-C)。

口白症発症トラフグの脳、腎臓および脾臓からの KAPs 検出

口白症発症および健常トラフグ (Nag-M, Wak-H) 各々 2 尾の脳、腎臓および脾臓を SDS-PAGE に供し、感染耐過魚 (Nag-S) 血清による免疫染色像を Fig. 2 に示した。先に示した如く、発症魚および健常魚の脳組織タンパク質から 100~120 kDa の KAPs が検出されたが、供試魚何れの腎臓および脾臓組織からも KAPs は検出されなかった。

口白症トラフグ脳磨砕液の超遠心分離上清および沈殿分画からの KAPs 検出

口白症発症トラフグ (Nag-M) の脳磨砕液の超遠心分離上清および沈殿分画を SDS-PAGE に供し、感染耐過

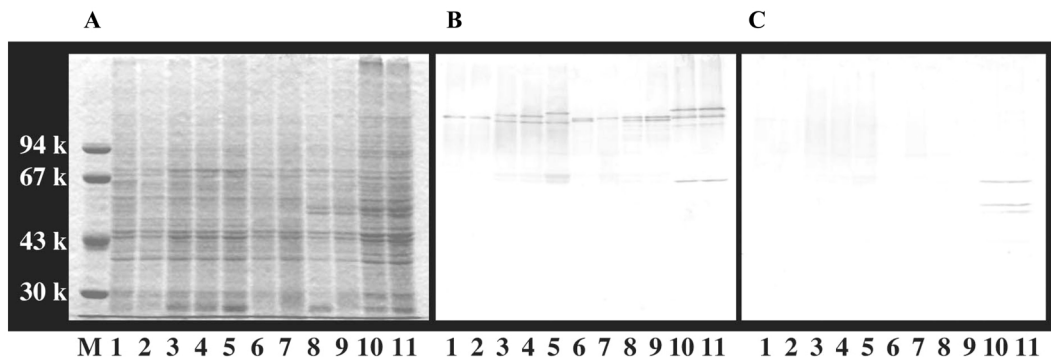


Fig. 1. Detection of kuchijirosho associated proteins (KAPs) in brain tissues of tiger puffer by SDS-PAGE and western blot analyses. A) SDS- polyacrylamide gel (7.5%) electrophoresis (SDS-PAGE) of tiger puffer brain tissue proteins stained with Coomassie brilliant blue, B) western blot analysis for immunostaining with serum of survived fish from kuchijirosho (Nag-S), C) immunostaining with serum from an apparently healthy fish (Koh-H), M: molecular markers, Lanes from 1 to 9 : brain tissue proteins of moribund fish with kuchijirosho, Lanes from 10 to 11: brain tissue proteins of apparently healthy fish.

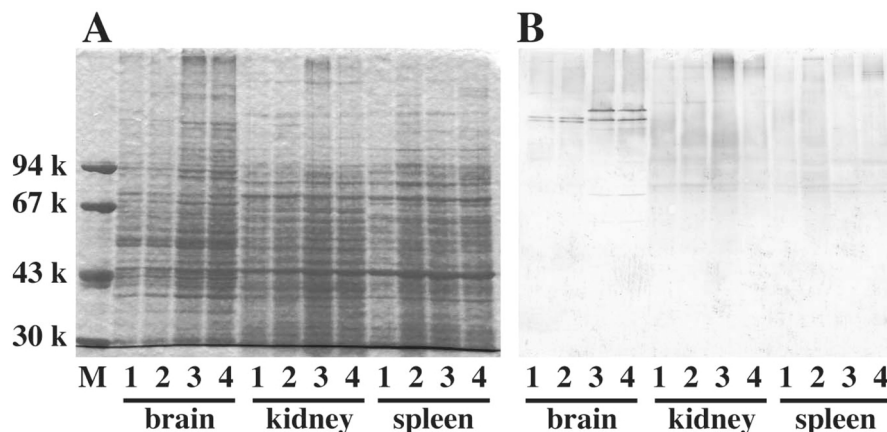


Fig. 2. Detection of kuchijirosho associated proteins (KAPs) from brain, kidney and spleen tissues by SDS-PAGE and western blot analyses. A) SDS-PAGE (7.5%) of proteins of brain, kidney and spleen and staining with Coomassie brilliant blue, B) western blot analysis for immunostaining with serum of survived fish from kuchijirosho (Nag-S), M: molecular markers, Lanes 1 and 2: moribund fish with kuchijirosho, Lanes 3 and 4: apparently healthy fish.

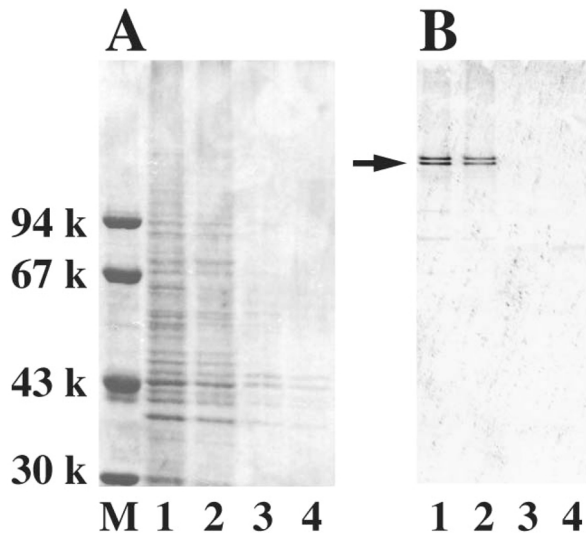


Fig. 3. Buoyant density of kuchijirosho associated proteins (KAPs) in brain tissues. A) SDS-PAGE (7.5%) of brain proteins of moribund fish with kuchijirosho, B) western blot analysis for immunostaining with serum of survived fish from kuchijirosho (Nag-S), M: molecular markers, Lanes 1 and 2: supernatant fractions of brain tissue homogenates by ultra-centrifugation ($100,000 \times g$, 60 min), Lanes 3 and 4: precipitated fractions by the ultra-centrifugation. Arrow: KAPs in supernatante fractions.

魚 (Nag-S) 血清で免疫染色した結果を Fig. 3 に示した。100~120 kDa の KAPs は、上清分画で検出されたが、沈殿分画からは検出されなかった。

口白症発症、感染耐過、健常および履歴不明トラフグの脳組織からの KAPs 検出

長崎県下の口白症発症トラフグ (Nag-M) 7 尾、神奈川県下の感染耐過魚 (Kan-S) 3 尾、長崎県下の発症歴不明魚 (Nag-U) 6 尾および和歌山県下の健常魚 (Wak-H) 3 尾の脳組織タンパク質を電気泳動し、長崎県の感染耐過魚 (Nag-S) 血清 (2 ロット)、高知県および和歌山県下の健常魚 (Koh-H, Wak-H) 血清 (4 ロット)、長崎県および佐賀県下の発症歴不明魚 (Nag-U, Sag-U) 血

清 (3 ロット) を用いた免疫染色を行い、KAPs の検出を試みた (Table 1)。感染耐過魚血清で免疫染色した場合、実験供試魚全ての脳組織から 100~120 kDa の 2 本の KAPs が検出されたが、検体間で検出された KAPs の分子量に若干の差異が認められた。また、健常魚血清で免疫染色した場合、KAPs は発症魚および健常魚にかかわらず何れの脳組織検体からも検出されなかった。一方、発症歴不明魚血清を用いて KAPs の検出を試みた結果、長崎県下のトラフグ血清 2 ロットでは 100~120 kDa の 2 本の KAPs が発症魚および健常魚の脳組織から検出されたが、佐賀県下のトラフグ血清では KAPs は何れの検体からも検出されなかった。

KAPs の病原性試験

口白症発症トラフグの脳組織磨砕液の超遠心分離上清分画 (KAPs 含) および沈殿分画 (KAPs 不含) をトラフグに筋肉内接種し、その病原性について検討した (Fig. 4)。なお、陽性対照区には発症魚脳組織磨砕液を、陰性対照区には HBSS を各々接種した。陽性対照区では、接種後 8 日目から死亡がはじまり、接種後 14 日目に

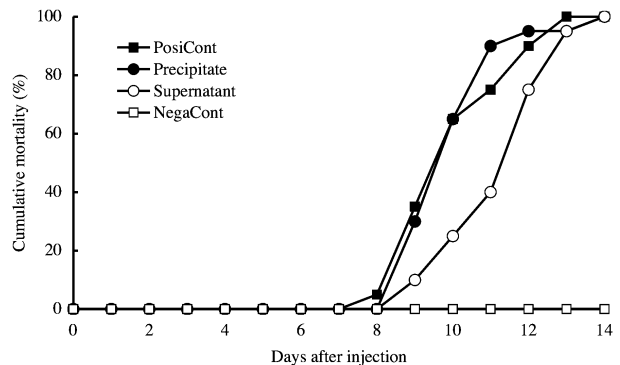


Fig. 4. Pathogenicity of ultra-centrifuged fraction of brain-tissue homogenate of affected tiger puffer with kuchijirosho. ■: brain-tissue homogenate (positive control), ●: precipitated fraction containing non KAPs, ○: supernatant fraction containing KAPs, □: HBSS (negative control).

Table 1. Detection of KAPs from brain tissues by western blot analysis with tiger puffer sera with or without disease history of kuchijirosho (snout ulcer disease)

Antigen	n	Detection of KAPs by western blot with fish sera (positive / sample number)							
		with kuchijirosho history		with unknown history			without kuchijirosho history		
		Nag-S-1	Nag-S-2	Nag-U-1	Nag-U-2	Sag-U	Koh-H	Wak-H-1	Wak-H-2
Nag-M	7	7 / 7	7 / 7	7 / 7	7 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7	0 / 7
Kan-S	3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3
Nag-U	6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	6 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6	0 / 6
Wak-H	3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	3 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3	0 / 3

Nag, Kan, Sag, Koh and Wak denoted Nagasaki, Kanagawa, Saga, Kohchi and Wakayama Prefectures, respectively. M, S, U and H denoted moribund fish with kuchijirosho, survivor from kuchijirosho history, unknown kuchijirosho history and without kuchijirosho history, respectively.

は全検体が発症死亡した。また、KAPs 不含遠心沈殿分画接種区においても、接種 8 日目から死亡が認められ始め、累積死亡率の推移は陽性対照区と同様であった（累積死亡率100%）。一方、KAPs 含遠心分離上清分画を接種した区では、接種後 9 日目から発症死亡が認められ、接種後14日目には累積死亡率が100%に達したが、陽性対照区あるいは沈殿分画接種区に比べ、累積死亡曲線の明らかな遅れが認められた。なお、実験対照区で死亡したトラフグは何れも口白症を発症していなかった。

考 察

口白症は濾過性病原体による感染症であるが（Inouye *et al.*, 1992, Miyadai *et al.*, 2001）、病原体の詳細は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、口白症の診断法の確立を目的に、本症発症トラフグ組織より口白症病原体あるいは口白症関連タンパク質（kuchijirosho associated proteins, KAPs）の検出を試みた。口白症感染耐過トラフグ血清の何れを用いた免疫染色においても、検体間で分子量に若干の差は認められるものの、100～120 kDa のタンパク質が全ての脳組織から検出された（Fig. 1-B, Table 1）。しかしながら、同タンパク質は、健常魚血清を用いた免疫染色では何れの検体からも検出されなかった（Fig. 1-C, Table 1）。したがって、感染耐過魚血清により検出された 100～120 kDa のタンパク質は、口白症関連タンパク質である可能性が示唆された。高見らは、口白症病原体の感染価を臓器別に測定し、口白症病原体が脳のみならず腎臓あるいは脾臓にも脳と同程度存在することを確認している（未発表）。しかし、100～120 kDa の KAPs は脳組織からのみ検出され、腎臓や脾臓組織からは検出されなかった（Fig. 2）。これは、KAPs が口白症関連タンパク質であることを裏付ける結果であると考えられる。

口白症発症トラフグの脳組織磨砕液の超遠心分離分画で、KAPs は沈殿分画には存在せず、上清分画のみから検出された（Fig. 3）。さらに、各遠心分画の病原性について検討したところ、沈殿分画により強い病原性が確認された（Fig. 4）。本実験で用いた遠心分画条件（100,000 ×g, 60分）は、比較的浮遊密度の低いラブドウイルス（ ρ : 1.17–1.20）等でも十分に沈殿回収できる条件である（Nishizawa *et al.*, 1991）。したがって、上清分画に含まれる KAPs の浮遊密度は、ウイルス粒子に比べ大幅に低いと考えられた。また、KAPs の分子量（100～120 kDa）が一般的なウイルスの構造タンパク質としては大きすぎることで、SDS-PAGE による染色性から推察される KAPs の脳組織内存在量は 1–10 mg/g 組織以下で、発症魚の患部組織中に存在する感染体の量としては極めて低いこと、さらに検体間で KAPs の分子量に差が認められること（Fig. 1-B）を考えると、KAPs は口白症病原体

の構造タンパク質ではなく、口白症罹病魚の組織内で誘導されたタンパク質であると考えられた。一方、Miyadai *et al.* (2004) は、本症病原体の浮遊密度が 1.096 g/cm³ と報告している。本実験においても遠心分画を用いた病原性試験において沈殿分画に強い病原性が認められた（Fig. 4）。さらに、沈殿分画中に感染耐過魚血清が認識するタンパク質が検出されなかったことから（Fig. 3-B Lanes 3–4）、口白症病原体はウイルス粒子程度の密度を有するものの、その抗原性は極めて低いと考えられた。

興味深いことに、KAPs は感染耐過魚血清を用いた免疫染色で健常魚脳組織からも検出され、さらに健常魚と発症魚の脳組織中における KAPs 量に大きな差異は認められなかった（Fig. 1, Lanes 10–11, Fig. 2 Lanes 3–4）。これは、KAPs が魚体内で新たに合成されたタンパク質ではなく、既存の脳組織内タンパク質の抗原性が口白症発症により変化し、KAPs として新たに抗原認識されたのではないかと考えている。高見ら（2007a）は、口白症発症トラフグの脳組織磨砕液をブりに接種することで発症すること、さらに発症ブリの脳組織内にも 100～120 kDa の KAPs が検出されることを報告しており、これは KAPs が口白症関連タンパク質であることを裏付けるものであり、さらに KAPs が魚種を超えて存在することを示している。

最後に、発症歴不明トラフグ血清を用いて 100～120 kDa の脳組織内 KAPs との反応性について検討したところ、長崎県下のトラフグ血清 2 ロットが KAPs 反応陽性であり、逆に佐賀県下のトラフグ血清は KAPs 反応陰性であった（Table 1）。本研究では、KAPs の機能についての詳細を明らかにすることはできなかったが、トラフグ血清の KAPs との反応により口白症における感染履歴の把握ならびに血清診断の可能性が示されたと考えられる。

謝 辞

貴重なトラフグ試料をご提供いただきました渡辺研一博士（水産総合研究センター）ならびに石丸克也博士（近畿大学水産研究所）に感謝致します。トラフグ IgM を精製するに当たりご協力頂きました長崎大学水産学部金井欣也教授に感謝致します。

文 献

- 井上 潔・安元 進・安永統男・高見生雄（1986）：養殖トラフグ口白症の病原体分離と復元実験。魚病研究, 21, 129–130.
- Inouye, K., K. Yoshikoshi and I. Takami (1992): Isolation of causative virus from cultured tiger puffer (*Takifugu rubripes*) affected by kuchijirosho (snout ulcer disease). *Fish Pathol.*, 27, 97–102.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.

- Miyadai, T., S. Kitamura, H. Uwaoku and D. Tahara (2001): Experimental infection of several fish species with the causative agent of kuchijirosho (snout ulcer disease) derived from the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 193–199.
- Miyadai, T., E. Hashimoto, K. Hashimoto, T. Watari, M. Ohtani and D. Tahara (2004): Partial purification of Kuchijirosho causative agent by sodium iotalamate density gradient centrifugation. *Fish Pathol.*, **39**, 213–214.
- 中内良介・宮崎照雄・塩満捷夫 (1985): トラフグの口白症の病理組織学的研究. 魚病研究, **20**, 475–479.
- Nishizawa, T., M. Yoshimizu and T. Kimura (1991): Buoyant density of hirame rhabdovirus (HRV) in cesium chloride and sucrose. *Fish Pathol.*, **26**, 47–48.
- 高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水 守 (2007a): 口白症ト
ラフグ脳磨碎濾液を用いた人為感染試験によるプリでの発症. 魚病研究, **42**, 35–39.
- 高見生雄・西澤豊彦・吉水 守 (2007b): トラフグ口白症に対する感染防御誘導の試み. 魚病研究, **42**, 67–69.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979): Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350–4354.
- 和田新平・藤巻由紀夫・畑井喜司雄・窪田三朗・磯田政恵 (1985): 養殖トラフグの“口白症”自然発生例の病理組織学的所見. 魚病研究, **20**, 495–500.
- 和田新平・畑井喜司雄・窪田三朗・井上 潔・安永統男 (1986): 養殖トラフグの口白症の病理組織学的所見. 魚病研究, **21**, 101–104.