



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ニジマスのウイルス感染時およびpolyribonucleosinic-polyribocytidylic acid (PIC) 投与時における血中タンパク質の発現変動に関する研究
Author(s)	西川, 翔太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第13536号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13536
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91690
Type	doctoral thesis
File Information	Shotaro_Nishikawa.pdf



ニジマスウイルス感染時および
polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid (PIC)
投与時における血中タンパク質の発現変動
に関する研究

Identification of protein profiles in plasma of
rainbow trout associated with salmonid virus
infection and polyribonucleosinic-polyribocytidylic
acid (PIC) administration.

北海道大学大学院水産科学院
海洋応用生命科学専攻
Graduate School of Fisheries Sciences Division of
Marine Life Science

西川 翔太郎
Shotaro Nishikawa

平成 31 年 (2019)

目 次

緒言-----	1
第 1 章 伝染性造血器壊死症およびサケ科魚ヘルペスウイルス病発症時の病態解明	
目的-----	6
材料および方法-----	7
・ 供試魚	
・ 供試細胞ならびに供試ウイルス	
・ 感染実験およびサンプリング	
・ ウイルス検査	
・ ニジマス血漿の生化学的検査	
・ 蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動 (2D-DIGE) のための血漿前処理	
・ 一次元電気泳動ならびに二次元電気泳動	
・ 2D-DIGE ゲルスポットの同定	
・ 瀕死魚の各臓器の病理組織学的観察	
結果-----	12
・ 感染魚の動態およびウイルス分離	
・ ウイルス病発症がニジマス血漿の生化学検査測定値に与える影響	
・ 各感染症発症による血漿中タンパク質発現プロファイルへの影響	
考察-----	31
第 2 章 PIC のニジマスに対する免疫賦活作用とその許容量に影響する要因の解明	
目的-----	36
材料および方法-----	37
・ 供試魚	
・ 供試 PIC	
・ PIC 投与後の魚体サイズによる影響の評価	

・ PIC 投与後の飼育水温が Mx 遺伝子発現量に与える影響の評価 ・ PIC 塩基長が Mx 遺伝子発現に与える影響の評価 ・ Mx 遺伝子の発現量解析 ・ 統計解析	41
結果-----	41
・ 魚体サイズが PIC への許容量に及ぼす影響 ・ PIC 投与後の飼育水温が Mx 遺伝子発現量に与える影響 ・ PIC の塩基鎖長が Mx 遺伝子発現量に与える影響	45
考察-----	45
第3章 PIC 投与によるニジマスの生理・生化学的影響	
目的-----	48
材料および結果-----	48
・ 供試魚 ・ 供試 PIC ・ PIC 投与が Mx 遺伝子発現量に与える影響の評価 ・ Mx 遺伝子の発現量解析 ・ PIC 投与がニジマス血漿の生化学成分ならびに血漿中タンパク質発現プロファイルに与える影響の評価 ・ ニジマス血漿の生化学的検査 ・ 2D-DIGE のための血漿前処理 ・ 一次元電気泳動ならびに二次元電気泳動 ・ 2D-DIGE ゲルスポットの同定 ・ 各臓器の病理組織学的観察 ・ 統計解析	52
結果-----	52
・ PIC 投与が Mx 遺伝子発現量に与える影響 ・ PIC 投与がニジマス血漿の生化学成分に与える影響	

- ・ PIC 投与がニジマス血漿中タンパク質発現プロファイルに与える影響
- ・ PIC 投与による身体所見ならびに病理組織学的所見

考察-----	59
総合考察-----	66
謝辞-----	70
参考文献-----	71

緒 言

我が国では数多くのサケ・マス類が生産され、食用や放流用、養殖用の種苗、遊漁等の用途に利用されている。ニジマス *Oncorhynchus mykiss* は、1877 年に日本に移植されて以来、海面・内水面の両方で養殖が盛んに行われており、内水面養殖においては主要な対象魚種となっている。しかしながら、近年の内水面養殖におけるマス類の生産量は横ばいであり、ニジマスの生産量に関しては減少傾向にある。その原因のひとつとして感染症を中心とした魚病被害による経済的損失が挙げられる。本魚種の持続的生産のためには魚病対策が重要である。

伝染性造血器壊死症 Infectious hematopoietic necrosis (IHN) は、日本において、せつそう病に次いで多く発生しているウイルス感染症である。原因ウイルスは IHNV である。1970 年にアラスカから輸入したベニザケ発眼卵とともに IHNV が日本に持ち込まれ、支笏湖産ヒメマスならびに輸入したベニザケ幼魚で初めて発生した (Yoshimizu 1996)。翌 1971 年には北海道で発生が認められ、1974 年以降、長野県、静岡県等の在来マスおよびニジマス稚魚においても本病が発生しており、猛威を振るっている。IHN 発症魚は眼球突出や腹水貯留による膨張、貧血症状による鰓の退色、胸鰭基部や肛門付近、体側に V 字状出血等の外観症状に加え、病理組織学的所見として前腎臓造血組織や脾臓に壊死、腸管固有層顆粒細胞の壊死等の症状を呈するのが特徴である (Amend et al. 1969; Yasutake et al. 1965; Yasutake and Amend 1972)。IHN は主に稚魚期に発症し、感染魚の死亡率は 70~80% に達する。加齢とともに死亡率は低下し、2 年魚では発症することはないとされていたが、近年は大型魚 (魚体重 10 g 以上) の発症例も増加し、時に成魚や親魚の死亡例もみられている。

我が国において、IHN 同様サケ・マス類増養殖に多大な被害を与えているのがサケ科魚ヘルペスウイルス病 *Oncorhynchus masou virus disease* (OMVD) である。本疾病発症魚は腎臓の壊死出血や肝臓の壊死、体表に潰瘍形成等の症状を呈し、特に肝臓には退色肝や白斑の形成、肝炎症状等顕著な病変をもたらすことが知られている (降幡ら 2003)。また、本疾病原因ウイルスは OMV であり、腫瘍原性を有することから、感染耐過魚の口部や鰭部に腫瘍が形成される (Kimura et al. 1991; Kumagai et al. 1994)。

ヤマメやギンザケ増養殖において OMVD の発症が多数報告されていたが、防疫対策の徹底により北海道ならびに北日本においては終息したと思われた。しかしながら 1990 年以降ニジマスのヘルペスウイルス病が各地で発生し、成魚の大量死を引き起こした (降幡ら 2003)。

IHN や OMVD のような症状のほか、魚類感染症罹患魚に見られる異常として鰓の退色や粘液過多、体表に潰瘍形成、臓器の出血や腫脹、腫瘍形成等があり、これら器官に生じる異常について病理組織学的研究が展開されてきた (舟橋ら 1974; 宮崎・江草 1976; 木村・栗倉 1977; 畑井ら 1977; Yasutake 1978; 界外ら 1984; 界外・宮崎 1985; Sano et al. 1985; 江草・反町 1986; 和田ら 1986; 井上ら 1992; Andres and Yoshimizu 1994; 桃山ら 1994; 三輪・井上 1999)。ウイルス病の場合、上述のように各ウイルスの標的器官に病変が認められるが、症状の発生機序ならびに病態生理学的知見は未だ乏しい。このことは、これまでのウイルス感染症に関する研究が原因ウイルスの性状や宿主の外見的異常の原因究明、防除・防疫対策に重点が置かれてきた (吉水 2007) ためと考える。

オミクス (-omics) 解析は生命現象を包括的に解析・解明しようとする学問分野であり、その対象はゲノムに始まり、現在は代謝物まで広がっている。中でもプロテオーム解析は特定の細胞・組織・器官に存在するタンパク質全体を対象とする解析である。近年、クロマトグラフィーや質量分析機器等の分析化学技術の進歩とそれにより得られる大量の分析結果を処理可能なハード・ソフトウェアの開発により、プロテオーム解析を用いた病態解明や予後の予測、疾患バイオマーカーの探索および創薬に関する研究報告数は年々増えている (Steel et al. 2003; Alfonso et al.; Csermely et al. 2005; Rao et al. 2007; Grunert et al. 2011; Besnard et al. 2012; Ghisaura et al. 2014)。魚類を対象とした研究分野においては環境変化等によるストレスや給餌効率、薬剤の評価にプロテオーム解析が用いられてきている (Martin et al. 2003; Brunt et al. 2008; Baumgarner et al. 2013; Saray et al.; Yue et al.; Nuez-Ortín et al. 2018)。冷水病やせつそう病等の病態解析にプロテオーム解析を用いた研究もいくつか報告されているが (Ræder et al. 2007; Sudheesh et al. 2007; Braceland et al. 2015; Long et al. 2015; Liu et al. 2017; Marcos-López et al. 2017), その数は未だ少ない。血液は体内の細胞から放出された数

多くの物質が存在しており、身体に生じた変化を受けそのプロファイルは鋭敏に変化する。医学や獣医学の分野では、血液成分から身体の異常や障害が発生している臓器の特定、原因の絞り込みが可能であり、一般的な健康診断法として血液検査が広く用いられている。獣医学分野においても、ウシをはじめとした家畜においては、血液成分の基準値に基づく診断に加え、家畜に対するストレス指標として血液成分値の使用が進められており、アニマルウェルフェアの実現に向けて、動物を死亡させることなく各種診断を行うための研究が進められている（三角ら 2001; 井澤ら 2007）。一方、魚類においては腎臓やその他臓器を用いた破壊検査が一般的であり、血液を用いる非破壊検査法は一般的ではない。血球を中心とした血液に関する研究は古くから行われており、汚染物質やハンドリング等によるストレス、季節変動による血液性状への影響については研究されているが（石岡 1984; Olesen and Jorgensen 1986; Pottinger et al. 1994; Espelid et al. 1996; Roncarati et al. 2006; Peres et al. 2013; Panase et al. 2018）、感染症発症時の血液性状に関する知見は乏しく、診断に利用できるほどには至っていない。近年、大型魚の IHN が問題となっていることに加え、4 倍体等染色体操作により得られた貴重な親魚候補については破壊検査の実施が困難であり、非破壊検査の充実が求められる状況にある。

ところで、現在のウイルス感染症対策においては、治療ではなくワクチンを用いた予防に重点が置かれている。魚類ウイルスに対するワクチン開発は盛んに進められており、現在我が国では、アユやサケ科魚類のビブリオ病不活化浸漬ワクチン、マハタのウイルス性神経壊死症不活化ワクチン、ブリのレンサ球菌症不活化ワクチン、ヒラメのエドワジエラ症不活化ワクチン、イリドウイルス病ワクチンならびに多価ワクチンが市販されている（農林水産省 2018）。ワクチンは生体に不活化もしくは弱毒化させた病原体を接種することで特異的な免疫を予め獲得させ、対象の病原体が侵入した際に起こる二次応答を利用して感染症の発症を阻止する手法である。しかしその特性上、対象の感染症以外には効果が発揮されない。さらに魚類の獲得免疫はヒトや家畜に比べ弱く、魚種や個体による差も大きい（Vilain et al. 1984; Scapigliati et al. 1997; Uchida et al. 2000）。加えて、水温や季節変動、魚体サイズおよびストレスに依存するという問題点もある（Avtalion 1969; Sánchez et al. 1993; Espelid et al. 1996; Magnadóttir et al. 1999;

Tort 2011)。そこで近年注目されているのが魚類のもつ自然免疫を活性化させる免疫賦活剤である。免疫賦活剤とは非特異的な免疫機能を向上させる作用をもつ物質の総称であり（高橋ら 2001）、合成化合物や栄養素、核酸等様々な種類が知られている（酒井 2001）。

Polyribonucleosinic-polyribocytidylic acid (PIC) はポリイノシン (poly-I) とポリシチジン (poly-C) の二本のヌクレオチド鎖から構成される合成二本鎖 RNA である (Chamberlin et al. 1965)。PIC は哺乳類において細胞内エンドソーム表面に存在する Toll-like receptor (TLR) 3 や細胞質に存在する Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I), Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) により認識され、インターフェロン (IFN) の産生を誘導する (Yoneyama et al. 2004; Kato et al. 2008; Matsumoto and Seya 2008)。すなわち PIC を投与された検体は自然免疫が活性化され、病原ウイルスに対し抵抗性が増加することが報告されており (Field et al. 1967; Park and Baron 1968; Richmond and Hamilton 1969)、近年ではワクチンアジュバントとしての利用が検討されている (Ichinohe et al. 2005; 2010; Phoolcharoen et al. 2011)。PIC は魚類に対しても免疫賦活作用を示し、多くの魚種においてその効果が報告されており (Jensen et al. 2002; Lockhart et al. 2004; Purcell et al. 2004; Plant et al. 2005; Saint-Jean and Perez-Prieto 2007; Fernandez-Trujillo et al. 2008)、新たな免疫法としての利用が検討されている (Nishizawa et al. 2011)。一方で、PIC の過剰投与により病態が悪化することが哺乳類において報告されており (Zelevnick and Bhuyan 1969; Phillips et al. 1971)、本毒性は PIC の鎖長の違いや PIC を認識後のカスケードの違いにより生じているとされている (Morahan et al. 1972; Stewartii and de Clercq. 1974; Matsumoto et al. 2015)。魚類においても同様に PIC 投与により毒性が現れることが報告されている。松井ら (2012) はヒラメ *Paralichthys olivaceus* に PIC を投与し、投与後の飼育水温が 17℃ の場合はヒラメに毒性が現れなかったのに対し、13℃ では一部の魚に致死毒性が現れることを示した。さらに、PIC を接種した箇所の表皮に発赤や潰瘍形成が生じることも示している (松井ら 2012)。サケ科魚類においても、タイセイヨウサケ *Salmo salar* の幼魚に対し PIC を投与し、水温 6℃ で飼育した場合において高い致死性を示すことが報告されている (Salinas et al. 2004)。このように PIC の魚類に

対する毒性には水温が大きく関係していると考えられる。サケ科魚類は冷水魚であり、低水温下での PIC 投与も考えられ、その際の影響について明らかにする必要がある。また、PIC の免疫賦活作用も PIC の塩基長、すなわち二本鎖全長ならびに PIC を構成する poly-I, poly-C のそれぞれの鎖長に影響を受けることが知られている (Morahan et al. 1972; Black et al. 1973; Machida et al. 1976; Zhou et al. 2013)。近年は PIC の塩基長を調製時にコントロールすることも可能となり、PIC の塩基長が免疫賦活作用と毒性に与える影響を明らかにすることも可能となった (Nakano et al. 2018)。ニジマスに対しより賦活作用効果が高い PIC が明らかとなれば、低投与量で自然免疫を賦活することも可能となりコストの削減にも繋がる。

本稿第 1 章では、伝染性造血器壊死症 (IHN) およびサケ科魚ヘルペスウイルス病 (OMVD) の病態の基礎的知見を得ることを目的として、ウイルス感染によるニジマス血漿中のタンパク質発現プロファイルならびに生化学成分への影響を、二次元電気泳動ならびに生化学検査により明らかにした。次いで第 2 章では、ニジマスにおけるウイルス病防除対策に自然免疫賦活剤である PIC 使用を検討するにあたり、飼育水温ならびに PIC の塩基長が PIC の自然免疫賦活作用に与える影響を明らかにした。さらに第 3 章では、PIC 投与により生じる負の薬理作用について、体内で生じている現象の原因探索を行った。最後に総合考察ではニジマスの増養殖におけるウイルス感染症防除対策について有効な検査手法ならびに疾病予防策について提言した。

第 1 章 IHN および OMVD 発症時の病態解明

目 的

血液には体内の細胞から放出された数多くの物質が存在しており、その組成は生活習慣やストレス、加齢、疾病の有無等の影響を鋭敏に反映する。特に血漿は様々な栄養素、代謝による老廃物、酵素等が含まれており、体内で生じる代謝によってその成分量が変化するため、各器官の異常や生理状態の変化を推定することが可能である。血液検査はヒトや家畜において様々な臓器障害やその程度、機能評価ならびに病態把握のため一般的に行われており、疫学データも多い。魚類においても血液に関する研究は古くから行われており、多くの魚種について広範囲にわたってなされている。魚類のストレス応答や飼料添加物の効果の評価、感染症における病態解析等血液性状を指標とした研究は多い（池田・見奈美 1982; 石岡 1984; Pottinger et al. 1994; Chen et al. 2003; 2004）。魚類の疾病の診断等への応用も試みられているが（池田ら 1976）、ヒトや家畜に比べ厳密な基準値が設定されるまでには至っておらず、血液を用いた健康診断は一般的ではない。

近年、質量分析技術とバイオインフォマティクス等の周辺技術の発達により対象に存在するタンパク質（プロテオーム）を網羅的に解析することが可能となった。前述の通り、血漿は身体の生理状態をリアルタイムで反映するため、血漿のプロテオームを明らかにすることができれば定期的な健康診断において異常の早期発見も可能となり、新たな血液診断法の開発にもつながる。また、疾病特有に増加もしくは減少するタンパク質を探索することができれば、疾病バイオマーカーになり得る。そこで本章では、ニジマスを対象に、IHNV ならびに OMV 感染による血漿中タンパク質発現プロファイルならびに血液生化学成分への影響を明らかにすることを目的とした。ウイルス感染前後の血漿を二次元電気泳動により展開し、感染症発症による血中タンパク質の変動を比較するとともに、発症により増加するタンパク質を探索した。また、血液の生化学成分 19 項目についても測定し、感染症発症による影響を調べた。

材料と方法

供試魚

北海道恵庭市にある北海道立総合研究機構さけます・内水面水産試験場（以下、道さけます内水試）から分与を受けたニジマスを供試魚として用いた。供試魚は道さけます内水試から北海道大学函館キャンパス先端環境制御実験棟（以下、先端環境制御実験棟）に輸送し、試験開始まで 0.5 トン円形水槽で脱塩素水道水を用いて流水飼育した。Yano et al. (2013) の方法により雌雄判別後、雌のみを試験対象とした。試験開始 1 週間前に供試魚を 60 cm 水槽に 7 尾ずつ収容し、馴致飼育した。給餌は 1 日 1 回とし、市販のサケ・マス用飼料ペレットを魚体重に対し 1%程度与えた。

供試細胞ならびに供試ウイルス

IHNV は、1996 年にニジマス病魚から分離された IHNV Nag96 株 (Nishizawa et al. 2006) を供試した。OMV は、2000 年にニジマス病魚から分離された OMV RtNa0010 株 (降幡ら 2003) を供試した。これらウイルスの培養には RTG-2 細胞を用い、ウイルス接種後、細胞変性効果 (CPE) が見られるまで 15°C で培養した。RTG-2 細胞の培養には、FBS (Gibco), MEM (日水), L-グルタミン (コスモ・バイオ), 7.5% NaHCO₃, M-Tris, ペニシリン (SIGMA) およびストレプトマイシン (SIGMA) を添加した MEM₁₀-Tris 培地を用いた。ウイルスの力価測定は、マイクロプレートタイター法により行った。すなわち、96 well プレートに単層培養した RTG-2 細胞にウイルスを接種した後、15°C で 2 週間培養し CPE を観察し、Karber 法に基づき 50%感染終末点 (50% tissue culture infectious dose; TCID₅₀) を求めた。

感染試験およびサンプリング

馴致したニジマス (平均魚体重 238 g) にピットタグによる個体識別を行い、同時にニジマス尾柄部から採血を実施した。得られた血液に 10 U/mL となるようヘパリン水溶液を添加し、直ちに遠心分離し (3,000×g, 20 min, 4°C), 血漿を得た。ここで得られた血漿を対照群血漿とし、使用するまで -80°C で保存した。採血後 1 週間飼育したの

ち、IHNV は $4.5 \log \text{TCID}_{50}/300 \mu\text{L}/\text{fish}$, OMV は $3.5 \log \text{TCID}_{50}/300 \mu\text{L}/\text{fish}$ となるよう腹腔内接種した。ウイルス接種後、馴致飼育時と同条件で飼育し、飼育中に瀕死状態となった検体から同様に採血し、脾臓、腎臓、肝臓を採取した。得られた血液に上記同様の処理を行い、血漿を得た（感染群血漿）。得られた血漿は実験に供試するまで -80°C で保存した。また、瀕死状態となったニジマスを計数し、累積死亡率を算出した。対照群として HBSS（日水）を腹腔内接種したニジマスを別途用意し、同様の方法で飼育した。給餌は 1 日 1 回とし、市販のサケ・マス用飼料ペレットを魚体重に対し 1% 程度与えた。

ウイルス検査

瀕死状態のニジマスから得られた腎臓の一部をストマッカー袋に入れ、9 倍量の HBSS を加えてホモジナイズした。作製したホモジナイズ液を 1.5 mL マイクロチューブに移し、遠心分離 ($4000 \times g$; 20 min , 4°C) した後上清を回収した。48well プレートで 15°C , 1 日培養した RTG-2 細胞に回収した上清を $50 \mu\text{L}/\text{well}$ となるよう接種し、 15°C で 14 日間培養した。観察中に CPE が確認された検体については RTG-2 細胞に盲継代を行い、盲継代後も CPE が生じた検体をウイルス感染により瀕死状態になったニジマスと判断した。

ニジマス血漿の生化学的検査

各ウイルス感染前後の血漿中の生化学成分を血漿富士ドライケム 4000s (FUJIFILM) を用いて測定した。乳酸脱水素酵素 (LDH), アミラーゼ (AMYL), グルコース (GLU), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), カルシウム (Ca), 総蛋白 (TP), トリグリセリド (TG), アルブミン (ALB), クレアチニン (CRE), マグネシウム (Mg), 尿素窒素 (BUN), 無機リン (IP), 総ビリルビン (TBIL), アスパラギン酸トランスフェラーゼ (AST), HDL コレステロール (HDL-C), アンモニア (NH_3), クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK), アルカリフォスファターゼ (ALP), 総コレステロール (TCHO) の 19 項目について、1 項目あたり $10 \mu\text{L}$ の血漿を富士ドライケムスライド (FUJIFILM) に滴下し測定した。測定は個体別に行い、測定結果は IBM SPSS

Statistics (IBM) を用いて統計学的に処理し、ウィルコクソンの符号付順位検定を用いて比較を行った。

蛍光ディファレンスゲル二次元電気泳動 (2D-DIGE) のための血漿前処理

各群で各々12尾ずつプールした血漿を Multiple Affinity Removal Column (MS-3) (Agilent) で処理した後、Amicon Ultra-0.5 を用いて微量高速冷却遠心機 (機種) にて $8,000 \times g$, 30 分間遠心限外ろ過し被検試料とした。被検試料およびキャリブレーション用の全被検試料を等量ずつ混合したプール試料 2 μL に 200 μM N, N-ジメチルホルムアミド溶液に溶解した 200 pmol の蛍光色素 Cy (Cy2, Cy3 および Cy5) を 2 μL 加え、氷上で 30 分間インキュベートすることにより蛍光標識した。次に 10 mM リジン溶液を 2 μL 添加し氷上で 10 分間インキュベートした後に、2 $\times$ 2D-DIGE 用サンプルバッファ (8 M 尿素, 4% (w/v) CHAPS, 20 mg/mL ジチオトレイトール; DTT, 2vol% IPG buffer pH3-11 NL) を 6 μL 加え、さらに 10 分間氷上でインキュベートした。最後にマルチシェーカーで 2,500 rpm で 5 分間振盪し、2D-DIGE 用試料とした。2D-DIGE 用試料の作製は化学物質評価研究機構 (埼玉) に委託し実施した。

一次元電気泳動ならびに二次元電気泳動

上記の蛍光色素 (Cy3, Cy5) でラベルした被検試料ならびに Cy2 でラベルしたプール試料を混合した後に試料を展開した。一次元電気泳動は、ゲルストリップ (Immobiline DryStrip pH3-11 NL 24 cm (GE Healthcare)) にカップローディングホルダーを用いて試料を添加し、Multiphor II Electrophoresis system (GE ヘルスケア) を用いて行った。フォーカシングは、トータルで 44.2 kVh (300 V; 4hr, 300-3500 V; 5 hr, 3500 V; 10 hr) で行った。泳動後、平衡化溶液 (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M 尿素, 30vol%グリセロール, 2% (w/v) ドデシル硫酸ナトリウム水溶液) に 0.25% (w/v) DTT を添加した溶液および同様に 4.5% (w/v) ヨードアセトアミド溶液; IAA を添加した溶液に各 10 分間ずつ漬けて平衡化した。平衡化終了後、Ettan DALT II システムおよび 12% (w/v) 均一ポリアクリルアミドゲルを用いて二次元電気泳動を実施した。同一ゲルに泳動した試料ならびにラベリングした蛍光物質の組み合わせは Table 1-1 に示した。

Table 1-1. 各ゲルにおける泳動試料と蛍光ラベリングの対応表

ゲルNo.	蛍光ラベル	試料名
1	Cy2	IHNV感染前群+OMV感染前群 (1)
	Cy3	IHNV感染前群 (1)
	Cy5	OMV感染前群 (1)
2	Cy2	IHNV感染群+OMV感染群 (1)
	Cy3	IHNV感染群 (1)
	Cy5	OMV感染群 (1)
3	Cy2	IHNV感染前群+OMV感染前群 (2)
	Cy3	OMV感染前群 (2)
	Cy5	IHNV感染前群 (2)
4	Cy2	IHNV感染群+OMV感染群 (2)
	Cy3	OMV感染群 (2)
	Cy5	IHNV感染群 (2)
5	Cy2	IHNV感染前群+OMV感染前群 (3)
	Cy3	IHNV感染前群 (3)
	Cy5	OMV感染前群 (3)
6	Cy2	IHNV感染群+OMV感染群 (3)
	Cy3	IHNV感染群 (3)
	Cy5	OMV感染群 (3)

電気泳動後、Typhoon9400 (GE ヘルスケア) を用いてゲル画像の取込みを行った。各 CyDye を適切な波長で励起し蛍光を読み取った (Cy2: 励起 488 nm, 蛍光 520 nm; Cy3: 励起 532 nm, 蛍光 580 nm; Cy5: 633 nm, 蛍光 670 nm)。取り込んだゲルイメージ画像を Decyder ver. 7.0 (GE ヘルスケア バイオサイエンス) を用いて解析し、画像品質の確認ならびに定量比較解析を行った。これら作業は化学物質評価研究機構に委託し実施した。

2D-DIGE ゲルスポットの同定

定量比較解析によりスポット強度が有意に増加したスポットについて、スポットピッカー (GE Healthcare) を用いてゲルのピッキングを行った。ゲルのピッキングは化学物質評価研究機構に委託し実施した。切り出したスポットは 96well プレートを用いて試験に使用するまで-30℃で保存した。次に、ゲル片のトリプシン消化を行った。1.5 mL マイクロチューブに移したゲル片に対し 50%(v/v)アセトニトリル/25 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液を 100 µL 添加し、10 分間振とうすることでゲルの洗浄を行った。振とう後、上清を取り除き、新しい 50%アセトニトリル/25 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液を同量加え、さらに 10 分間振盪した。上清を取り除いた後、100%アセトニトリルを 100 µL 添加し 10 分間脱水し、アセトニトリルをピペットで除去した後に液が完全に飛ぶまで凍結乾燥を行った。次に乾燥したゲル片に DTT 溶液 (10mM DTT, 25 mM 炭酸水素アンモニウム) を 100 µL 加え、56℃で 45 分間インキュベートした。インキュベート後、DTT 溶液を取り除き、IAA 溶液 (55 mM IAA, 25 mM 炭酸水素アンモニウム) を 100 µL 添加し、暗所で 30 分間インキュベートした。IAA 液を除去後、上記の洗浄と脱水を実施した後、凍結乾燥を行った。完全に乾燥したゲル片に対し 10 µg/mL となるよう調製したトリプシン溶液を 10 µL 加え、氷上で 30 分間インキュベートした。トリプシン溶液がゲルに完全に吸水されたのを確認した後に、37℃で 14 時間インキュベートしゲル内消化を行った。反応後、抽出液 (50%アセトニトリル/5%トリフルオロ酢酸) を 50 µL 加え、30 分間超音波処理し、ペプチド断片を抽出した。抽出後の液を別のマイクロチューブに移した。これを 2 回繰り返す。得られた抽出液を濃縮遠心機で濃縮したものを LC/MS/MS 用のサンプルとした。得られたサンプルは北海道大学創成

研究機構グローバルファシリティセンター機器分析受託部門に委託し、高速液体クロマトグラフィー (Paradigm MS2, Michrom BioResources, Colum; Zaplous alpha, Rep C18 0.1x150 3 μ m 120A (AMR)) に供試したのちに LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific) にて質量分析を行った。得られたスペクトル情報をもとにデータベース検索を行った。検索ソフトは Proteome Discoverer 1.4.0.288, 検索エンジンは SEQUEST HT, データセットは UniProt の *Oncorhynchus mykiss* (SwissProt+TrEMBL) を用いた。

瀕死魚の各臓器の病理組織学的観察

上記で採取した各臓器をブアン液にて約 24 時間固定した。固定した組織は適切な厚さになるようメスで切り出し、100%エタノールに 90 分間浸漬し脱水を行った。脱水後、キシレンに 90 分間浸漬し、パラフィンで包埋した。100%エタノールならびにキシレン置換は 3 回ずつ行い、毎回新しい液に浸漬した。作製したパラフィンプロックから 4 μ m の組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオシン染色 (HE 染色) を施した。

結 果

感染魚の動態およびウイルス分離

IHNV もしくは OMV を腹腔内接種したニジマスの累積死亡率を Fig. 1-1 に示した。IHNV 感染群はウイルス接種 2 日後から 9 日後まで死亡が認められ、11 尾の死亡が確認された。IHNV 接種 14 日後までの累積死亡率は 78.6%であった。OMV 感染群はウイルス接種 3 日後から 8 日後まで死亡が認められ、12 尾の死亡が確認された。OMV 接種 14 日後までの累積死亡率は 85.7%であった。一方、対照群において、死亡は確認されなかった。IHNV および OMV 感染により瀕死状態となったニジマスには転覆や緩慢遊泳等異常遊泳が認められた。また、瀕死魚の中には肝臓に出血や退色が認められる個体を確認された。加えて、脾臓が腫大している個体も見受けられた。一方、腎臓は肉眼で観察できる症状は確認されなかった。病理組織学的所見としては肝臓、脾臓にお

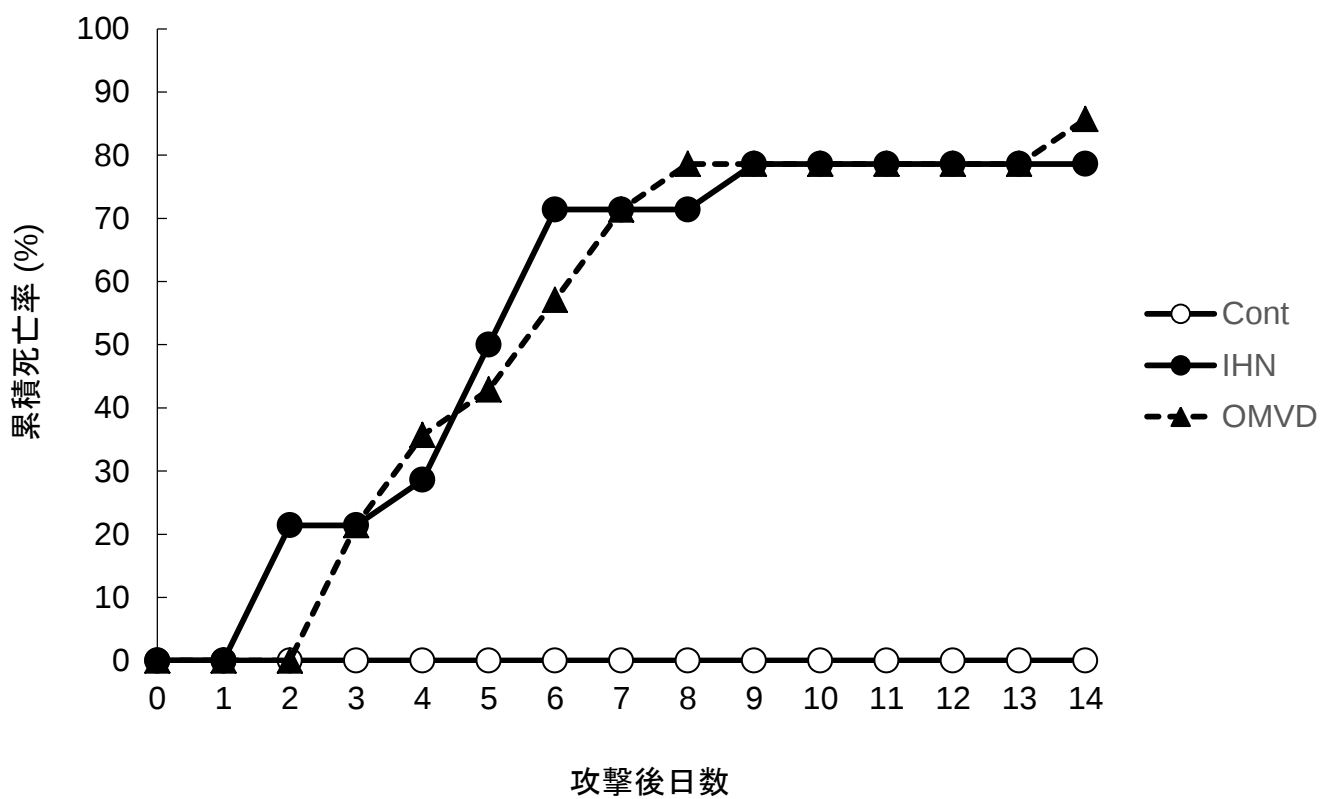


Fig. 1-1. 感染試験における累積死亡率.

いて壊死やうっ血様の症状が確認された (Fig. 1-2)。

瀕死状態のニジマス腎臓を RTG-2 細胞へ接種した結果、全ての検体において CPE が認められた。この結果から、本試験で瀕死状態となったニジマスは全て IHNV ならびに OMV 感染により瀕死状態になったと判定した。

ウイルス病発症がニジマス血漿の生化学検査測定値に与える影響

IHNV ならびに OMV 感染前後のニジマス血漿を生化学検査に供試した結果を Fig. 1-3~1-8 に示した。IHNV 感染群の血漿中において、測定した 19 項目のうちクレアチニン (CRE)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、尿素窒素 (BUN)、アスパラギン酸トランスフェラーゼ (AST)、リン (IP) の 6 項目の生化学検査測定値が有意に増加した (Fig. 1-3)。一方、トリグリセリド (TG)、総タンパク質 (TP)、アルブミン (ALB)、HDL コレステロール (HDL-C)、総コレステロール (TCHO) の 5 項目の生化学検査測定値が有意に減少していた (Fig. 1-4)。アンモニア (NH₃)、総ビリルビン (TBIL)、アミラーゼ (AMYL)、カルシウム (Ca)、クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、マグネシウム (Mg)、グルコース (GLU) の 8 項目については IHNV 感染前後において生化学検査測定値に有意差は認められなかった (Fig. 1-5)。OMV 感染群の血漿中においては、アンモニア (NH₃)、クレアチニン (CRE)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、尿素窒素 (BUN)、アスパラギン酸トランスフェラーゼ (AST)、クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK)、マグネシウム (Mg)、リン (IP) の 9 項目の生化学検査測定値が有意に増加した (Fig. 1-6)。一方、トリグリセリド (TG)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総タンパク質 (TP)、アルブミン (ALB)、HDL コレステロール (HDL-C)、総コレステロール (TCHO) の 6 項目の生化学検査測定値が有意に減少した (Fig. 1-7)。総ビリルビン (TBIL)、アミラーゼ (AMYL) およびカルシウム (Ca) の 3 項目については OMV 感染前後において生化学検査測定値に有意差は認められなかった (Fig. 1-8)。

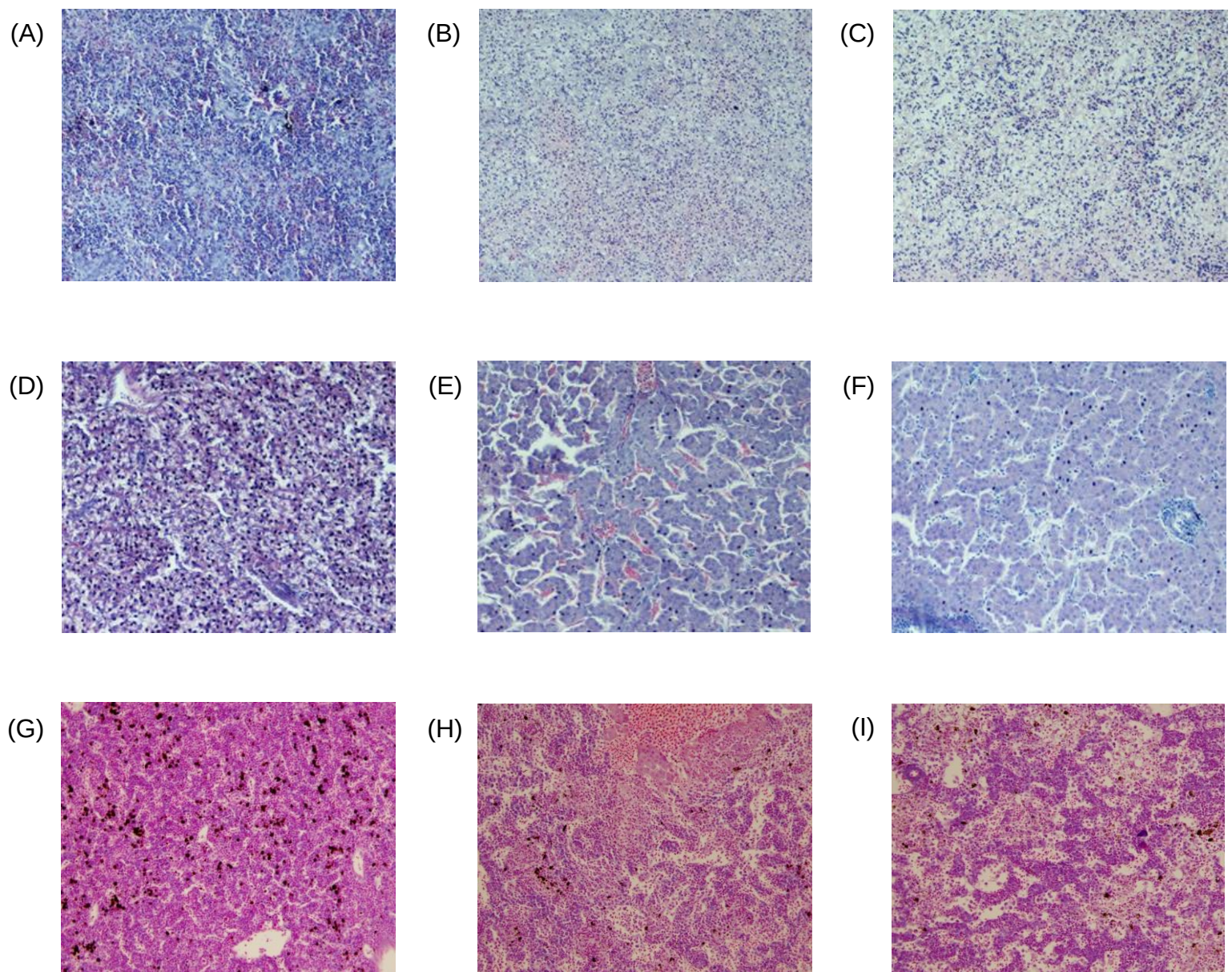


Fig. 1-2. 各臓器の病理組織学的所見.

(A) 対照群脾臓 (B) OMV感染群脾臓 (C) IHNV感染群脾臓
 (D) 対照群肝臓 (E) OMV感染群肝臓 (F) IHNV感染群肝臓
 (G) 対照群腎臓 (H) OMV感染群腎臓 (I) IHNV感染群腎臓.

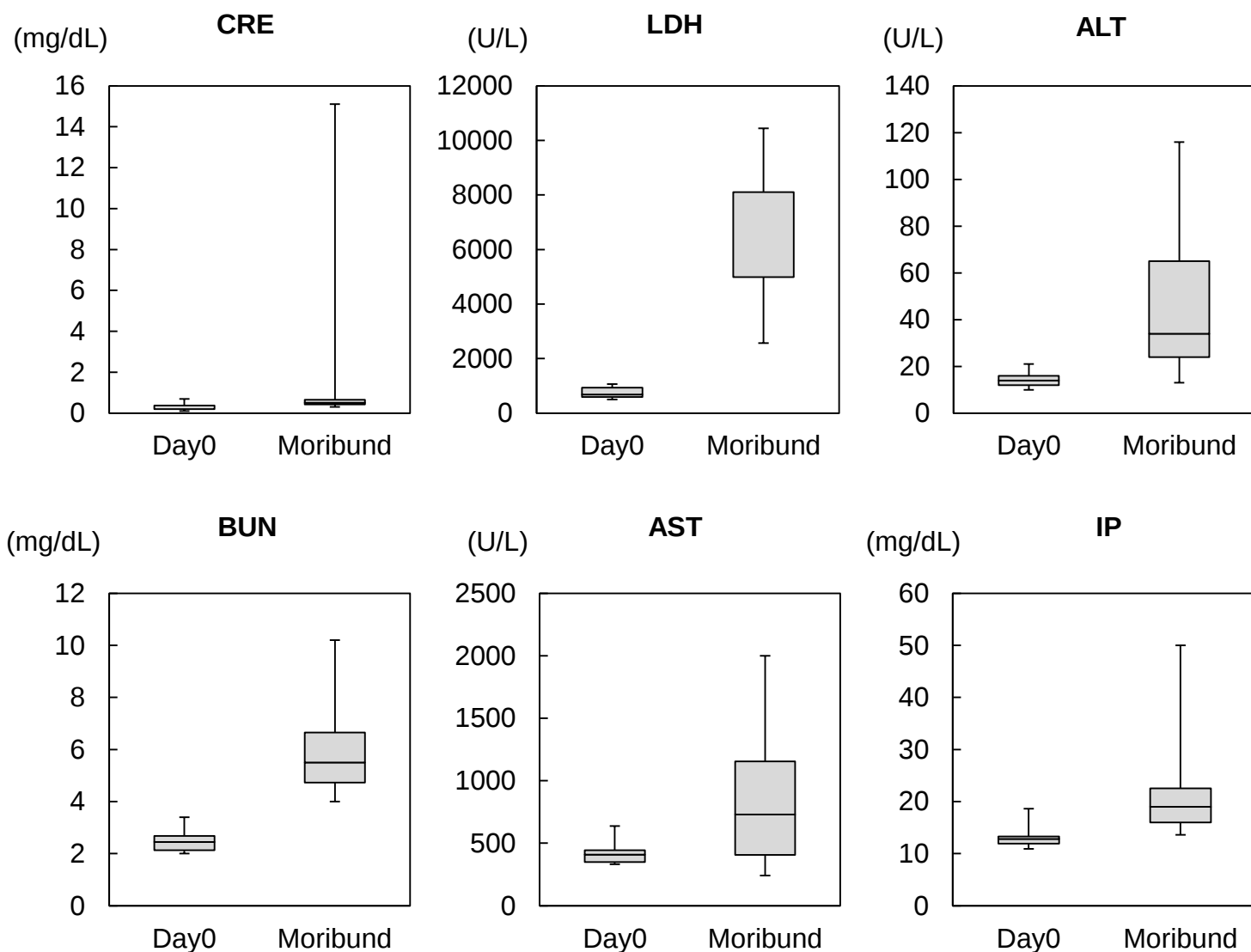


Fig. 1-3. IHNV感染群で有意に増加した生化学検査測定値.

Day0: IHNV感染前, Moribund: IHNV感染後. CRE: クレアチニン, LDH: 乳酸脱水素酵素, ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ, BUN: 尿素窒素, AST: アスパラギン酸トランスフェラーゼ, IP: リン.

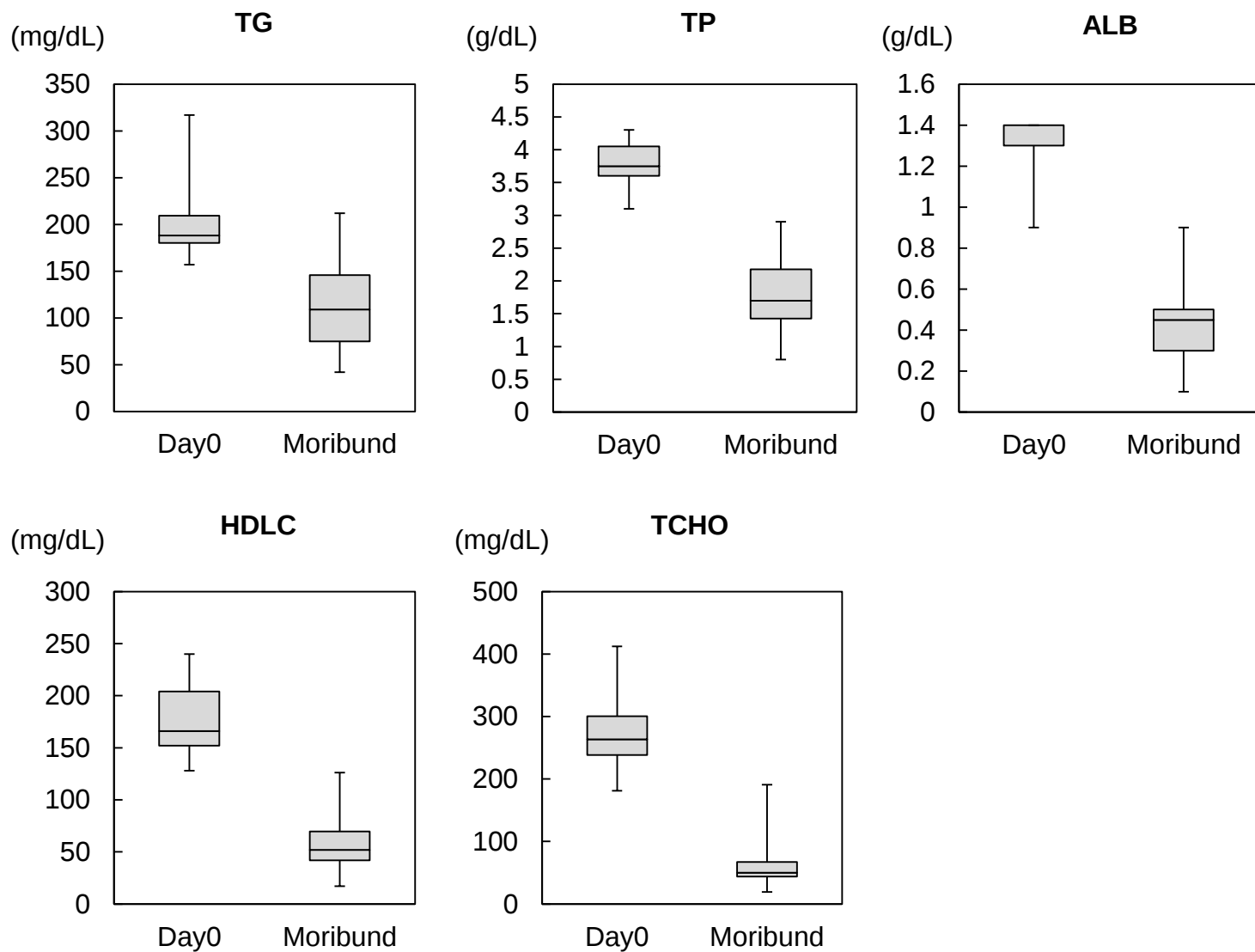


Fig. 1-4. IHNV感染群で有意に減少した生化学検査測定値.

Day0: IHNV感染前, Moribund: IHNV感染後. TG: トリグリセリド, TP: 総タンパク,
ALB: アルブミン, HDLC: HDLコレステロール, TCHO: 総コレステロール.

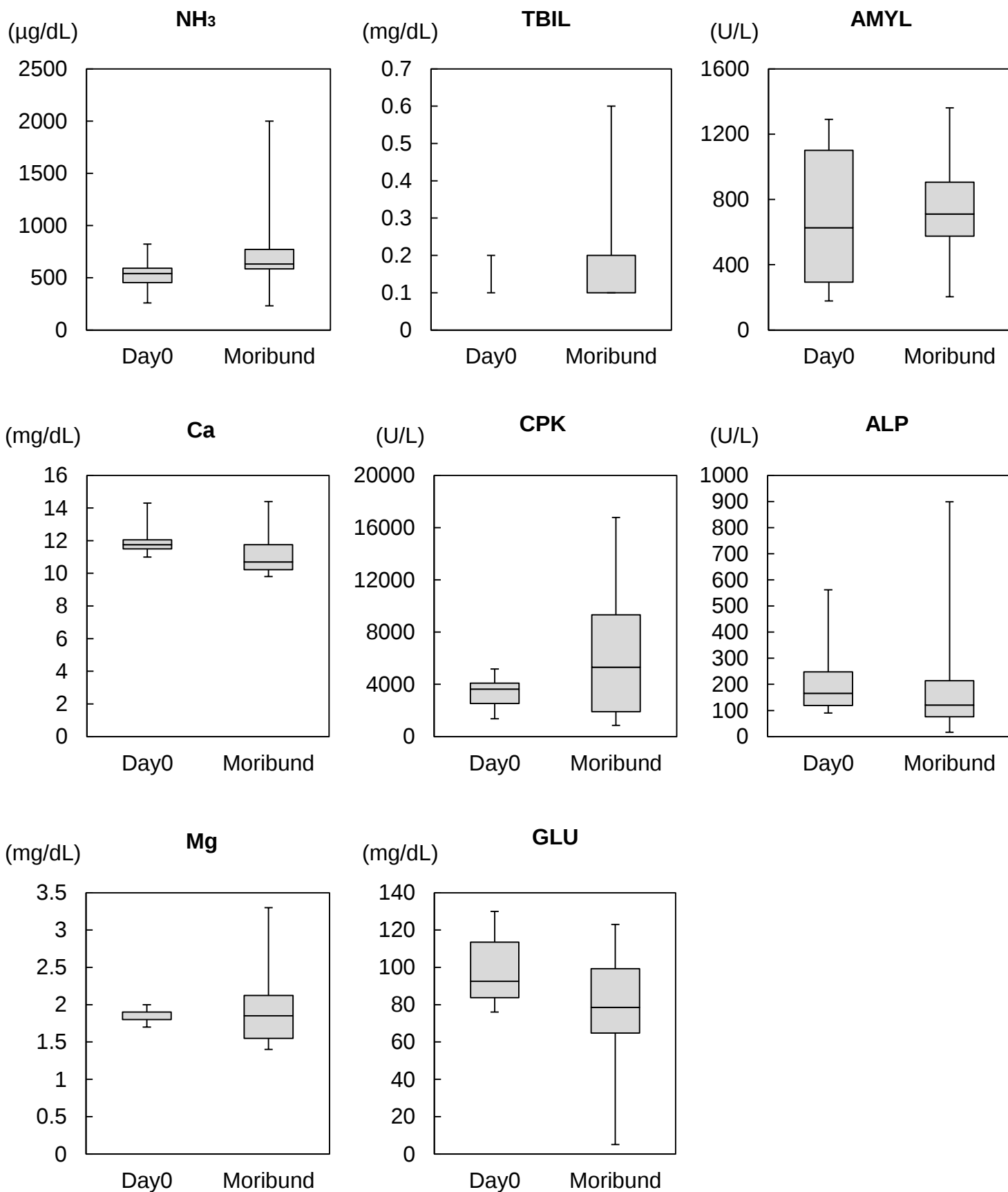


Fig. 1-5. IHNV感染前後で有意な差が見られなかった生化学検査測定値.

Day0: IHNV感染前, Moribund: IHNV感染後. NH₃: アンモニア, TBIL: 総ビリルビン, AMYL: アミラーゼ, Ca: カルシウム, CPK: クレアチンキナーゼ, ALP: アルカリフォスファターゼ, Mg: マグネシウム, GLU: グルコース.

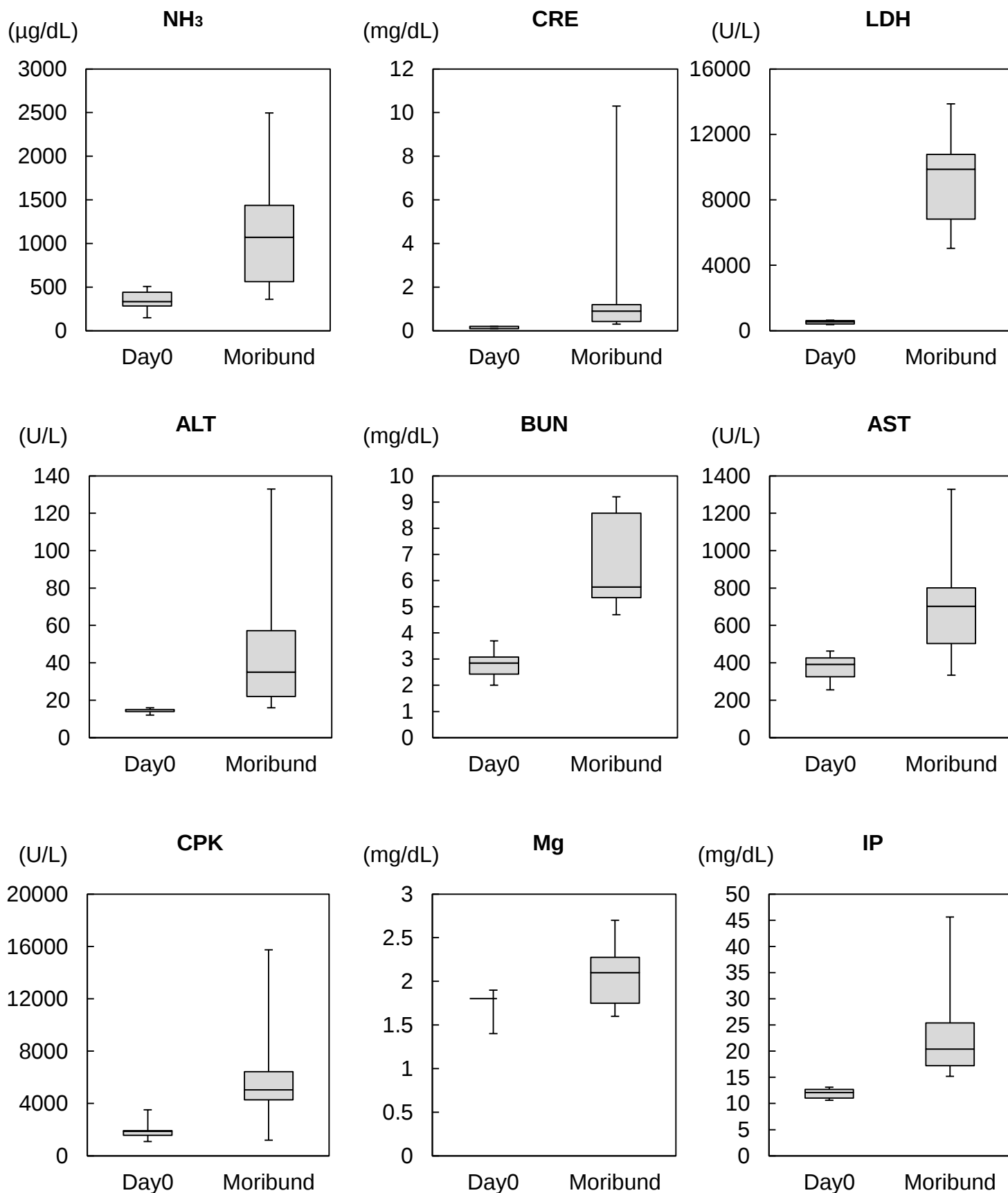


Fig. 1-6. OMV感染群で有意に増加した生化学検査測定値.

Day0: OMV感染前, Moribund: OMV感染後. NH₃: アンモニア, CRE: クレアチニン, LDH: 乳酸脱水素酵素, ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ, BUN: 尿素窒素, AST: アスパラギン酸トランスフェラーゼ, CPK: クレアチンキナーゼ, Mg: マグネシウム, IP: リン.

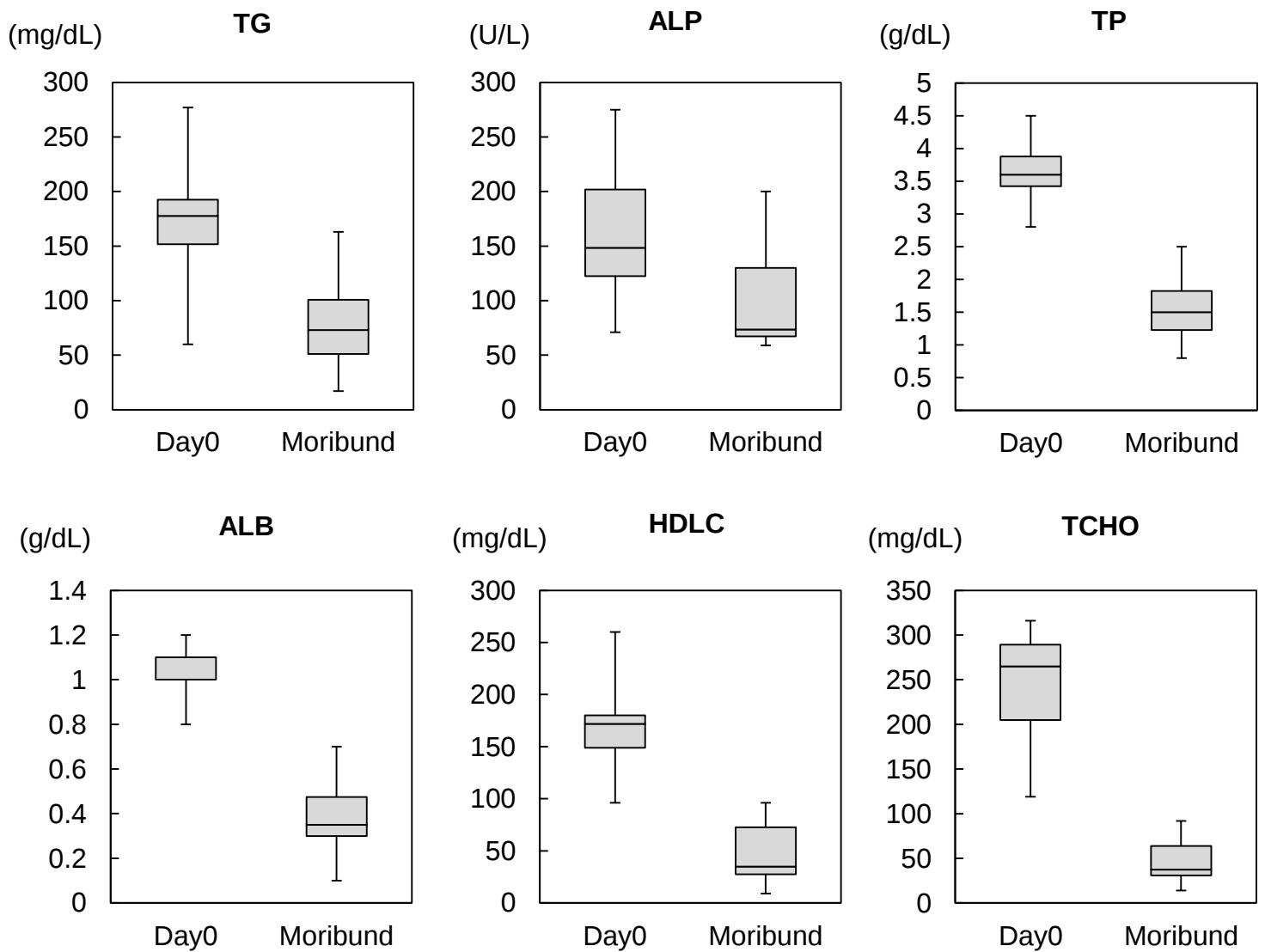


Fig. 1-7. OMV感染群で有意に減少した生化学検査測定値.

Day0: OMV感染前, Moribund: OMV感染後. TG: トリグリセリド, ALP: アルカリフォスファターゼ, TP: 総タンパク, ALB: アルブミン, HDLC: HDLコレステロール, TCHO: 総コレステロール.

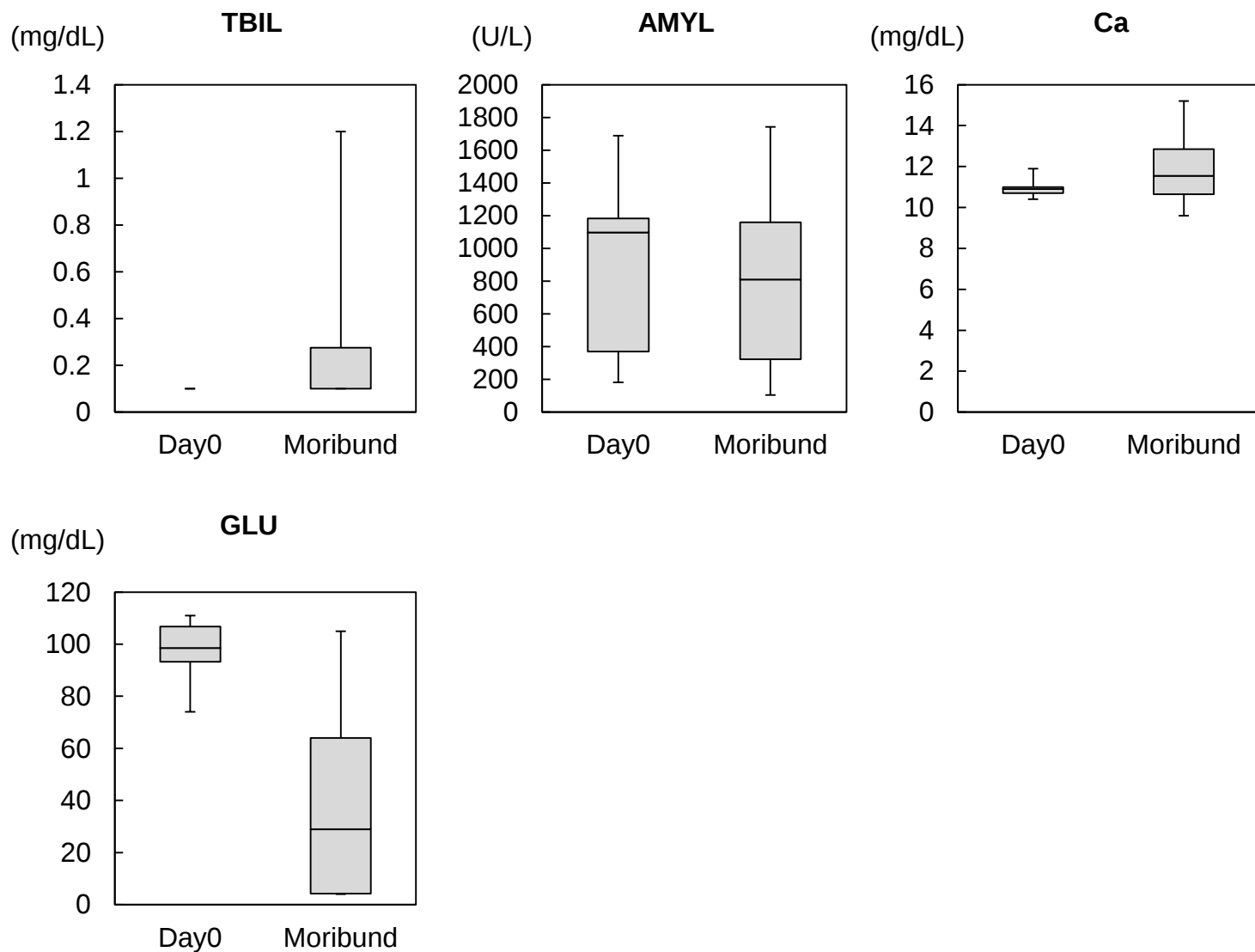


Fig. 1-8. OMV感染群で有意な差が見られなかった生化学検査測定値.

Day0: OMV感染前, Moribund: OMV感染後. TBIL: 総ビリルビン, AMYL: アミラーゼ, Ca: カルシウム, GLU: グルコース.

各感染症発症による血漿中タンパク質発現プロファイルへの影響

感染試験において瀕死状態となったニジマスから得られた血漿をプールし、2D-DIGE に供試した結果を Fig. 1-9 および 1-10 に示した。また、各泳動ゲルにおいて検出された総スポット数を Table 1-2 に示した。二次元電気泳動により展開した 6 枚のゲルにおいて 4422~5083 スポットが検出された。これらスポットに対し、Decyder BVA を使用して IHNV 対照群、IHNV 感染群、OMV 対照群ならびに OMV 感染群間で統計解析を実施し、試料群間において 3 倍以上有意に変動したスポット数を Fig. 1-11, Table 1-3 に示した。IHNV 感染前群ならびに OMV 感染前群を比較したところ、8 スポットで強度が増加し、15 スポットで強度の減少が確認された。IHNV 感染前後における血漿群間で比較したところ、324 スポットで強度の増加、276 スポットで強度の減少が確認された。また、OMV 感染前後においては 368 スポットで強度増加、246 スポットで強度減少が確認された。

二次元電気泳動においてスポット強度が 3 倍以上増加したスポットを LC/MS/MS により同定した結果を Table 1-4 に示した。IHNV ならびに OMV 感染により、免疫に関与するタンパク質である補体因子 C3、プレセレベリン様タンパク質、インテレクチン、アポリポタンパク質 A-I-1、物質の移動を担う輸送タンパク質（アルブミン、ハプトグロビン、ヘモグロビンサブユニット β 、セロトランスフェリン）、エネルギー代謝に関与するタンパク質（乳酸脱水素酵素、クレアチンキナーゼ、ピオチニダーゼ、3'(2'), 5'-ビスリン酸スクレオチダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素）、クロマチンを構成する主要タンパク質のひとつであるヒストン H2B、High mobility protein B、シグナルトランスインデューサーおよびアクチベーター、卵黄タンパク質の前駆体であるビテロジェニンならびに細胞骨格を構成するタンパク質であるケラチンが増加していることが示された。また、IHNV 感染血漿群でのみ α 1-アンチプロテアーゼ、レチノール結合タンパク質、 α 1, 4-グルカンホスホリラーゼが、OMV 感染血漿群でのみフルクトース-ビスリン酸アルドラーゼが検出された。また、uncharacterized protein ではあるがウイルス感染により増加したタンパク質が数多く検出された。

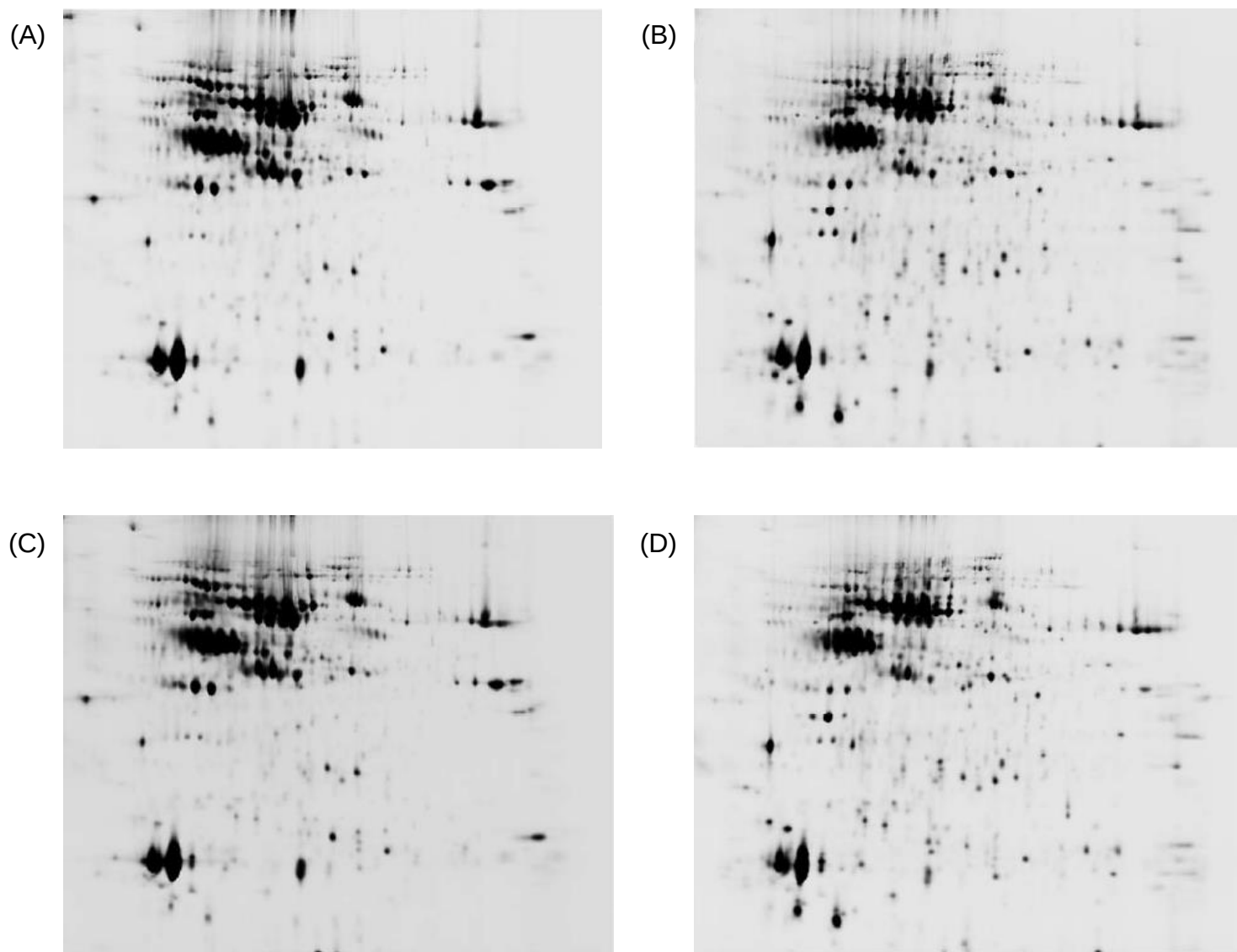


Fig 1-9. ウイルス感染前後のニジマス血漿中タンパク質の二次元電気泳動図.

(A) Rt-Ih: IHNV感染前, (B) Rt-Id: IHNV感染後, (C) Rt-Oh: OMV感染前, (D) Rt-Od: OMV感染後.

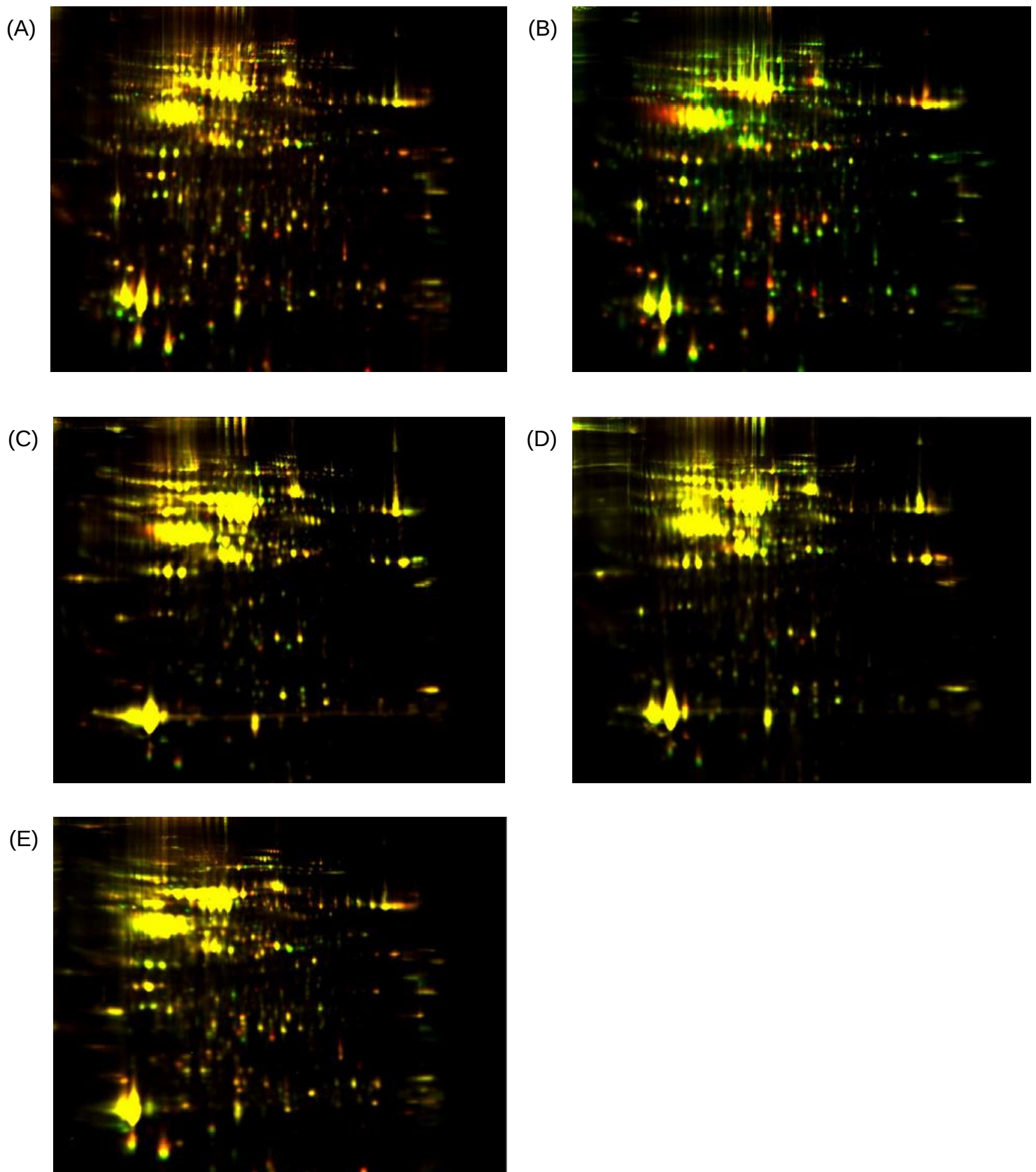


Fig. 1-10. ウイルス感染症発症前後で発現変動するニジマス血漿中タンパク質の可視化.
 緑 (Cy3) あるいは赤 (Cy5) が強いスポットとして検出される.

(A) Cy3: Rt-Id Cy5: Rt-Od, (B) Cy3: Rt-Od Cy5: Rt-Id, (C) Cy3: Rt-Oh Cy5: Rt-Ih,
 (D) Cy3: Rt-Ih Cy5: Rt-Oh, (E) Cy3: Rt-Id Cy5: Rt-Od. 略語はFig. 1-8 参照.

Table 1-2. 各ゲルにおける検出スポット総数

ゲルNo.	サンプル名	蛍光ラベル	検出スポット総数
1	IHNV感染前群	Cy3	4422
	OMV感染前群	Cy5	
	Pool	Cy2	
2	IHN感染群	Cy3	4794
	OMV感染群	Cy5	
	Pool	Cy2	
3	OMV感染前群	Cy3	4818
	IHNV感染前群	Cy5	
	Pool	Cy2	
4	OMV感染群	Cy3	5081
	IHNV感染群	Cy5	
	Pool	Cy2	
5	IHNV感染前群	Cy3	4877
	OMV感染前群	Cy5	
	Pool	Cy2	
6*	IHNV感染群	Cy3	5083
	OMV感染群	Cy5	
	Pool	Cy2	

* マスターゲル

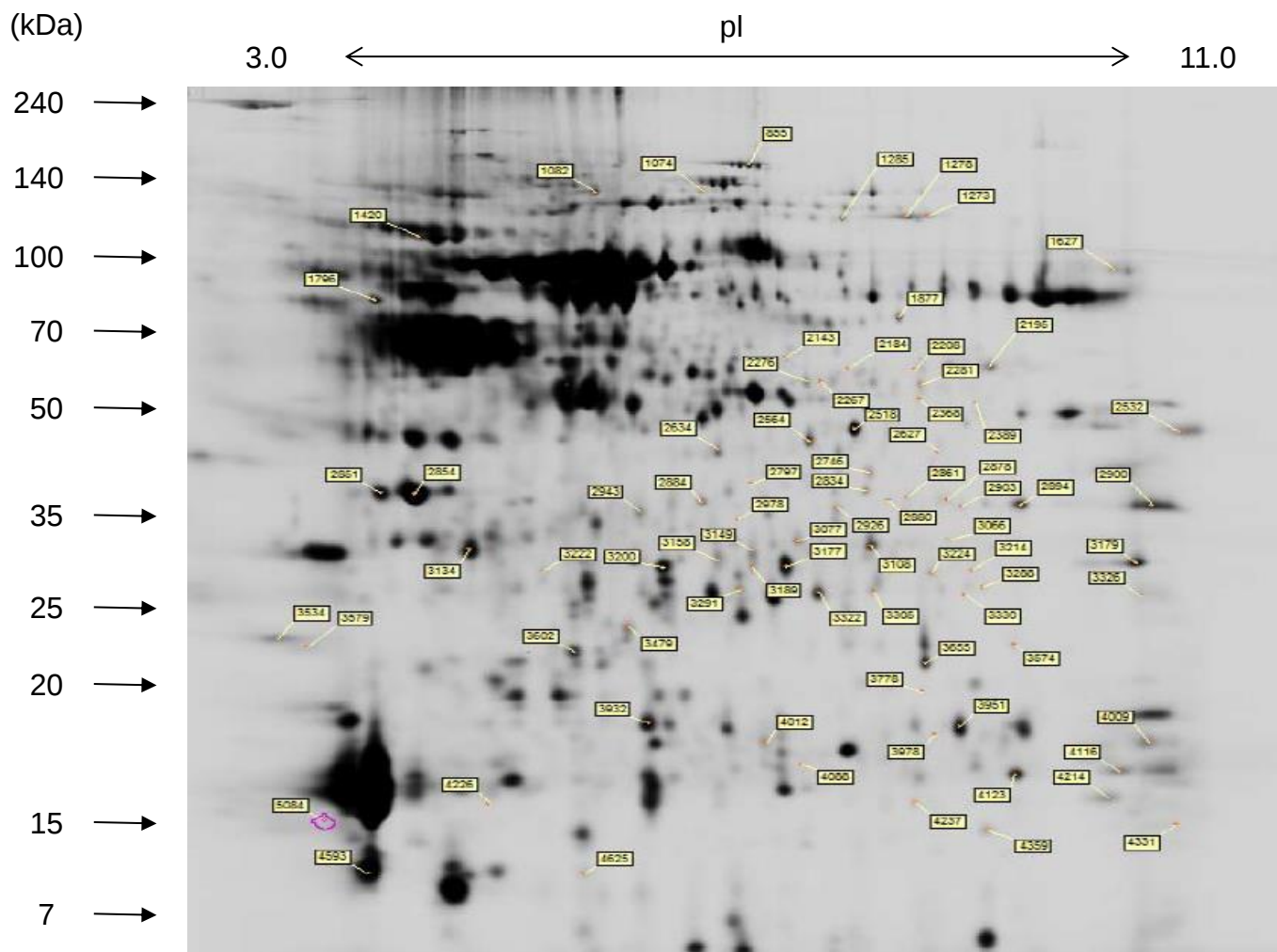


Fig. 1-11. IHNVならびにOMV感染により増加したスポット.

Table 1-3. サンプル群間で3倍以上の増減が検出されたスポット ($p<0.05$)

比較解析したサンプル	増加	減少
IHNV感染群/IHNV感染前群	324	276
OMV感染群/OMV感染前群	368	246
OMV感染前群/IHNV感染前群	8	15
OMV感染群/IHNV感染群	40	28

Table 1-4. 両ウイルス感染により3倍以上の増減が検出されたスポット

		IHNV				OMV					
Spot No.	identified protein	fold change	p-value	fold change	p-value	accession No.	score	coverage	MW (kDa)	calc. pI	
855	Vitellogenin	-	-	-	2.28	0.003	Q92093	194	21	183	8.94
1273	Histone H2B	5.92	0.003	0.003	4.35	0.0063	P69069	15	36	13.6	10.37
1278	Uncharacterized protein (Fragment)	13.36	0.00019	0.00019	10.35	5.00E-05	A0A060WN18	10	2	137.7	6.23
1285	Serotransferrin	3.14	0.00033	0.00033	5.27	2.40E-05	Q9PT13	8	6	75	6.33
1627	Serotransferrin	-	-	-	2.33	0.00062	Q9PT13	64	22	75	6.33
1796	Biotinidase 2 (Fragment)	3.07	0.0015	0.0015	4.45	0.0011	Q9DFF7	12	21	14	8.21
1877	Simple type II keratin K8a (S1)	7.21	0.00029	0.00029	10.42	0.00002	Q90YH3	17	9	59.1	5.38
2143	Serum albumin 1 protein (Fragment)	2.07	0.012	0.012	4.53	0.00014	D5H440	15	17	30.7	7.25
2184	Uncharacterized protein	3.08	0.00036	0.00036	3.21	0.00077	A0A060XLI7	4	6	32	7.33
2195	Complement C3 (Fragment)	4.51	0.015	0.015	3.8	0.0061	P98093	75	11	182	6.54
2208	Vitellogenin	4.3	0.0018-	0.0018-	-	-	Q92093	66	11	183	8.94
2267	32,5-bisphosphate nucleotidase 1	4.33	0.0019-	0.0019-	-	-	C1BFL2	4	6	33	5.39
2276	Complement C3 (Fragment)	3.24	0.0013	0.0013	3.23	0.00087	P98093	39	8	182	6.54
2281	Alpha-1-antiproteinase-like protein	3.23	0.000032-	0.000032-	-	-	Q7ZZW1	44	14	47.5	6.34
2368	Alpha-1-antiproteinase-like protein	10.43	0.000082	0.000082	8.56	0.0007	Q7ZZW1	44	21	47.5	6.34
2518	Vitellogenin	5.71	7.2E-06	7.2E-06	11.42	5.5E-07	Q92093	501	34	183	8.94
2532	Simple type II keratin K8a (S1)	17.43	0.0011	0.0011	26.41	2.80E-05	Q90YH3	18	5	59.1	5.38
2564	Uncharacterized protein	5.67	1.10E-05	1.10E-05	9.31	1.40E-06	A0A060YWQ3	44	22	44.5	6.93
2627	Simple type II keratin K8a (S1)	7.55	0.0011	0.0011	10.24	0.00057	Q90YH3	5	5	59.1	5.38
2634	Serotransferrin	3.18	0.0012	0.0012	5.48	0.00052	Q9PT13	60	22	75	6.33
2746	Serotransferrin	3.66	0.00022	0.00022	7.06	8.90E-07	Q9PT13	26	7	75	6.33
2797	Uncharacterized protein	3.24	0.021	0.021	3.42	0.0042	A0A060YH08	5	0	79.5	5.25
2834	Creatine kinase, muscle	3.95	0.00013	0.00013	8.97	2.00E-06	S0F2P2	13	15	42.9	6.93
2851	Serum albumin (Fragment)	9.02	6.70E-05	6.70E-05	9.7	2.80E-05	A5H0J9	11	16	18.7	5.27
2854	Serum albumin (Fragment)	17.98	2.00E-05	2.00E-05	29.6	6.50E-07	A5H0J9	16	16	18.7	5.27
2861	Serum albumin 1 protein (Fragment)	3.96	1.00E-04	1.00E-04	3.47	1.20E-04	D5H440	3	7	30.7	7.25
2878	Serotransferrin	3.03	0.00025	0.00025	3.57	0.001	Q9PT13	6	6	75	6.33
2880	High mobility group protein B1	11.35	0.00025	0.00025	7.49	0.00005	C1BFH6	2	9	22.3	8.16
2884	Simple type II keratin K8a (S1)	3.04	0.012	0.012	13.4	0.0003	Q90YH3	7	3	59.1	5.38
2894	Fructose-bisphosphate aldolase	26.27	2.50E-06	2.50E-06	45.21	3.60E-07	A0A060XHN5	2	15	40.8	7.64
2900	Fructose-bisphosphate aldolase	6.33	5.70E-05	5.70E-05	11.03	2.30E-05	A0A060WUI1	9	12	39.6	8.34
2903	Signal transducer and activator of transcription	37.89	3.5E-06	3.5E-06	18.53	4.8E-06	A0A0P0ZHJ4	2	1	93.2	5.47
2926	Serine--pyruvate aminotransferase	4.31	0.000088-	0.000088-	-	-	A0A060VNA3	2	4	47	8.7
2978	Complement C3 (Fragment)	7.08	0.00022	0.00022	2.08	0.0028	P98093	13	4	182	6.54
3066	Uncharacterized protein	3.47	0.0077	0.0077	4.19	0.00031	A0A060X960	22	16	58.5	6.86

Table 1-4. 続き

Spot No.	identified protein	IHNV		OMV			score	coverage	MW (kDa)	calc. pI
		fold change	p-value	fold change	p-value	accession No.				
3077	Thrombin B chain variant 1 (Fragment)	7.53	0.000011	12.74	2.9E-06	Q9DFD1	6	9	19.86	6.91
3108	Uncharacterized protein	12.83	0.00033	10.69	5.20E-05	A0A060XJ51	21	16	44.31	7.28
3134	Complement C3 (Fragment)	3.12	0.0076	3.93	5.80E-05	P98093	16	3	181.98	6.53
3149	Malate dehydrogenase	4.78	4.60E-05	5	3.00E-05	A0A060VZR8	12	12	37.13	7.16
3158	Beta-actin	4.73	0.0077	3.19	4.10E-05	Q9I8X4	14	14	41.66	5.57
3177	Haptoglobin 2 (Fragment)	6.09	0.0042	3.99	0.00013	Q9DFG0	27	36	8.46	5.73
3179	Type II keratin E1	14.22	3.1E-07	42.7	0.000029	Q90W76	14	6	62.3	5.56
3200	Haptoglobin 1 (Fragment)	8.19	0.0035	5.24	5.90E-05	Q9DFG1	24	32	10.31	7.04
3214	High mobility group protein B1	20.8	0.00016	22.68	1.30E-05	C1BFH6	2	9	22.28	8.16
3222	Simple type II keratin K8a (S1)	7.51	0.023	8.81	0.044	Q90YH3	4	3	59.06	5.37
3224	Complement component C9 (Fragment)	17.51	0.00048	18.24	0.00086	P06682	3	2	63.99	6.62
3288	High mobility group protein B1	10.79	0.0052	11.57	0.00061	C1BFH6	3	9	22.28	8.16
3291	Haptoglobin 1 (Fragment)	4.67	0.011	2.24	0.01	Q9DFG1	14	32	10.31	7.04
3305	Malate dehydrogenase	9.62	0.00052	10.94	8.3E-07	A0A060VZR8	21	23	37.13	7.16
3322	L-lactate dehydrogenase	17.63	9.10E-05	23.1	1.80E-05	A0A060WGR2	11	8	36.25	7.22
3326	Uncharacterized protein	2.31	0.0007	-	-	A0A060WXT8	6	1	61.92	6.2
3330	Uncharacterized protein	11.26	0.00017	16.55	7.10E-07	A0A060XL17	6	6	32.04	7.32
3479	Serotransferrin	4.23	0.0015	3.5	0.00048	Q9PT13	25	11	75.03	6.32
3534	Uncharacterized protein	-	-	3.43	0.0047	A0A060Z9B8	13	15	22.72	5.6
3574	Vitellogenin	12.6	2.20E-05	17.88	8.10E-06	Q92093	28	6	183.01	8.93
3579	Uncharacterized protein	-	-	4.09	0.0012	A0A060YXK5	11	26	9.38	5.8
3602	Simple type II keratin K8a (S1)	3.8	7.50E-05	5.16	6.50E-06	Q90YH3	11	6	59.06	5.37
3655	Hemoglobin subunit beta-4	-	-	3.99	0.00003	P02141	76	38	16.12	7.1
3778	Hemoglobin subunit beta-4	3.85	0.023	4.79	0.0012	P02141	193	47	16.12	7.1
3932	Simple type II keratin K8a (S1)	5.9	0.023	3.43	5.00E-05	Q90YH3	14	6	59.06	5.37
3951	Simple type II keratin K8a (S1)	14	0.00014	19.24	6.40E-08	Q90YH3	11	5	59.06	5.37
3978	Simple type II keratin K8a (S1)	6	0.0013	4.81	0.00015	Q90YH3	10	5	59.06	5.37
4009	Simple type II keratin K8a (S1)	3.15	0.0011	4.93	0.00044	Q90YH3	17	5	59.06	5.37
4012	Signal transducer and activator of transcription	3.78	0.0066	3.24	0.0042	A0A0P0ZJH4	3	0	93.23	5.46
4088	Apolipoprotein A-I-1	4.83	0.0076	-	-	O57523	6	20	29.68	5.37
4116	Apolipoprotein A-I-1	3.68	0.006	4.36	0.0013	O57523	68	34	29.68	5.37
4123	Apolipoprotein A-I-1	5.04	0.0022	6.27	0.00058	O57523	84	39	29.68	5.37
4214	Vitellogenin	6.41	0.00042	14.62	0.000052	Q92093	140	16	183.01	8.93
4237	Uncharacterized protein	2.17	0.00023	7.09	1.3E-06	A0A060XTR8	4	5	36.06	7.37

Table 1-4. 続き

Spot No.	identified protein	IHNV		OMV		accession No.	score	coverage	MW (kDa)	calc. pI
		fold change	p-value	fold change	p-value					
4331	Alpha-1,4 glucan phosphorylase	8.96	0.00005	3.81	0.00022	A0A060W299	2	3	57.24	6.44
4359	Uncharacterized protein	24.57	0.00045	75.78	0.000022	A0A060XM78	4	6	40.89	8.54
4593	Precerebellin-like protein	3	4.60E-05	3.75	0.00087	Q9PT14	22	35	19.81	5.54
4625	Retinol-binding protein 4-B	4.56	0.016-	-	-	P24775	10	18	20.04	6.18
5084	Apolipoprotein A-I-1	4.09	0.00062-	-	-	O57523	129	35	29.68	5.37

考 察

本章では IHNV 感染ならびに OMV 感染により変化するニジマス血漿中の生化学成分値およびタンパク質発現プロファイルを明らかにした。ニジマスの性差が結果に影響しないよう雌個体のみを用い、それぞれのウイルスをニジマス腹腔内に接種し、得られた瀕死魚から採血を行い、ヒトの血液検査で一般的に用いられる生化学成分 19 項目を IHNV ならびに OMV 感染したニジマスの血漿に対し測定したところ、クレアチニン、乳酸脱水素酵素、アラニンアミノトランスフェラーゼ、尿素窒素、アスパラギン酸トランスフェラーゼ、リンの測定値が両感染症発症魚において有意に増加し、トリグリセリド、総タンパク質、アルブミン、HDL コレステロール、総コレステロールの測定値が有意に減少していることが示された。次いでウイルス感染前後のニジマス血漿におけるタンパク質発現量を 2D-DIGE により比較したところ、IHN 発症後には 324 スポットが、OMVD 発症後には 368 スポットが発症前に比べて有意に増加していることが示された。各感染症発症により増加したタンパク質を同定したところ、腎臓や肝臓において生成・産生されるタンパク質や免疫に関連するタンパク質、物質輸送に関連するタンパク質、エネルギー代謝に関連するタンパク質、核酸転写に関連するタンパク質ならびにケラチンであることが明らかとなった。乳酸脱水素酵素はほぼすべての生物に存在し、解糖系で生成されたピルビン酸を乳酸に変換する酵素である。肝臓や腎臓に多く存在し、組織が破壊されることで血液中に流出するためヒトにおいては健康診断の検査項目に採用されている。今回、ウイルス感染魚の血漿中に乳酸脱水素酵素が多量存在することが二次元電気泳動ならびに生化学検査の結果から示された。さらに、肝細胞内に多く存在する酵素である AST ならびに ALT の生化学検査測定値に上昇が認められたことから、ウイルス感染による肝臓への障害が生じていると考えられる。実際、肝臓の病理組織学的所見として壊死やうつ血様症状も観察されていた。加えて、OMV 病発症魚の血漿においてはアンモニアの測定値も上昇が確認されており、IHN 発症魚に比べ肝臓への障害が大きいことが考えられる。また今回の試験では尿素窒素ならびにクレアチニンについても数値の上昇が認められた。尿素窒素はヒトにおいてアンモニアを無毒化した際に生じる代謝産物であり、腎臓でろ過されて尿中に排出される。高等魚類においてはアン

モニアを尿素に変換するオルニチン回路を持たないため、尿素を生合成することはない(岩田 1998)。よってアンモニアおよびクレアチニンの生化学検査測定値では腎臓に障害が生じているかを判定することは難しいが、腎臓にも存在するアルブミンや乳酸脱水素酵素の検査測定値が上昇していること、病理組織学的所見として腎臓組織に壊死が認められる個体も一部存在したことから、腎臓に障害が生じている可能性は高い。

生物は病原体感染や外傷等により急性期反応 (Acute phase reaction; APR) と呼ばれる反応が短期間のうちに発生する。急性期反応中に生じるタンパク質を急性期タンパク質 (Acute phase protein; APP) と呼び、臨床では炎症等の組織損傷を伴う疾患の有無や予後判定に用いられる。APP は APR 時に肝臓で生合成が促進され、血漿中に放出される。本研究において IHNV 感染ならびに OMV 感染を受けたニジマス血漿中には補体因子が多く検出された。補体因子 C3 は APP のひとつとして知られている (Steel et al. 1994)。硬骨魚類において、補体因子が哺乳類同様の機能をもつか不明な点が多いが、免疫細胞が貪食作用しやすいよう病原体の溶解やオプソニン化作用、炎症反応を起こすことが明らかとなっている (Fearon and Locksley 1996; Carroll and Prodeus 1998; Sahu and Lambris 2001; Claire et al. 2002)。ヒトにおいては補体因子 C3 の他に C 反応性タンパクや血清アミロイドタンパク、 α -2 マイクログロブリン、ハプトグロビン、 α 1-アンチプロテアーゼ、レクチン、サイトカイン等が APP に該当する (Steel et al. 1994)。今回の実験において、APP のうち補体因子ならびにハプトグロビン、さらに IHNV 感染群血漿のみではあるが α 1-アンチプロテアーゼが検出された。ハプトグロビンは肝臓で生合成され、血中に遊離したヘモグロビンと結合する性質をもつタンパク質である。リンホシスチスウイルスに自然感染したヨーロッパヘダイならびにヨーロッパシーバスにおいて、ハプトグロビンの mRNA 発現量が増加することが報告されている (Cordero et al. 2017)。溶血等で産生されたヘモグロビンは通常ハプトグロビンにより処理されるが、一部処理されなかったものは腎臓に傷害を与える。ウイルス感染とハプトグロビンの増加の相互関係は不明だが、哺乳類においてはヘモグロビンに含まれる Fe は過剰産生により疾患の発症にも関係していることに加え、今回 IHNV や OMV に感染したニジマスにおいてハプトグロビタンパク質が増加していたという結果からも、ハプトグロビンが免疫において重要な役割を担っていると考えられる。プレセレベ

リン様タンパク質も APP のひとつとして知られている。ニジマスにおいてはホルマリ
ン不活化 *Vibrio anguillarum* を接種された際に血漿中濃度が増加することが確認され
ている (Gerwick et al. 2000)。ニジマスのもつプレセレベリン様タンパク質は哺乳類の
もつ免疫複合体に類似していることが報告されており (Gerwick et al. 2000), 機能は未
知であるが, 生体防御に大きく関与していると考えられる。

インテレクチンはレクチンファミリーのひとつであり, ラクトフェリン受容体として
知られている (Suzuki et al. 2001; Akiyama et al. 2013)。魚類においてはホルマリ
ン不活化した *V. anguillarum* を腹腔内接種されたニジマスの肝臓において mRNA の発現
上昇が確認されているとともに, 肝臓の洞様毛細血管内に局在していることが報告され
ており, グラム陰性菌に対して生体防御機構のひとつとして働くことが示唆されている
(Bayne et al. 2001; Gerwick et al. 2007; Russell et al. 2008)。今回体内に侵入したウ
イルスに対しても生体防御反応としてインテレクチンが生産されたと考えられるが, イ
ンテレクチンは VHSV に結合しないという報告もあり (Reid et al. 2011), その生理活
性の詳細は不明である。

アポリポタンパク質 A-I-1 は硬骨魚類においてアポリポタンパク質 A-II とともに高
密度リポタンパク質を構成する成分である。主な働きは脂質の輸送であるが, その他に
も抗ウイルス作用, 抗菌作用, 抗炎症作用があることが報告されている (Wu et al.
2004; Villarroel et al. 2007; Hoover-Plow et al. 2009; Low et al. 2014)。本研究におい
ても IHNV および OMV 感染によりアポリポタンパク質 A-I-1 の増加が認められ, 両ウ
イルスに対しアポリポタンパク質が生体防御の役割を担っていると考えられる。

ウイルス感染後の血漿において増加していることが示されたフルクトース-1, 6-ビス
リン酸アルドラーゼ, リンゴ酸脱水素酵素は糖代謝における解糖系ならびに TCA 回路
において生理活性をもつ酵素である (Horecker et al. 1975; Minárik et al. 2002)。また,
ビオチニダーゼは N6-ビオチニル-L-リシンをビオチンに変換する酵素であり, ビオチ
ンは糖代謝やアミノ酸代謝において多数の酵素に対し補酵素として働くことが知られ
ている (渡邊 1996; Mock 2001)。他にも核酸代謝においてアデノシン 3'-5'-リン酸をア
デノシン-5'-リン酸 (AMP) に変換する 3' (2'), 5'-ビスリン酸ヌクレオチダーゼの増加も
確認された。ウイルス増殖の際に宿主の細胞増殖機構を利用するが, ウイルス感染によ

り細胞分裂が盛んに行われるようになったことに起因するのかもしれない。

今回の研究で得られた最も興味深い結果は、IHNV ならびに OMV 感染によりビテロジェニンタンパク質の増加が認められたという結果である。ビテロジェニンは卵黄タンパク質前駆体であり、通常雌性ホルモンのひとつであるエストラジオールの刺激を受けて肝臓で合成される。合成されたビテロジェニンは血液を介し卵巣へ運ばれるため、成熟魚の血液中被見られる。本試験ではウイルス感染により肝細胞が障害を受け、ビテロジェニンが血中に放出された可能性が考えられる。一方で、ビテロジェニンが抗細菌活性や抗酸化作用をもつという報告もされており (Sun et al. 2015), ウイルスに対しても抗ウイルス活性を示す可能性が考えられる。ビテロジェニン産生が魚類における新規の生体防御機能であるか否かについて、今後も研究を継続する必要がある。また、今回はウイルス感染により増加が見られた血漿中プロテオームのみを解析対象としたが、有意に減少したスポットも引き続き解析する必要がある。

以上、IHNV ならびに OMV に感染して 1 週間経過したニジマスの血漿におけるタンパク質発現プロファイルおよび生化学成分を調べた結果、ウイルス感染により腎臓や肝臓が障害を受け、各器官の代謝物ならびにウイルス感染に対し宿主が産生した急性期タンパク質が多く検出されることが明らかになった (Fig. 1-12)。したがって、これらのウイルス感染により変動が見られたタンパク質および生化学成分は疾病バイオマーカー候補となり得ると考えられる。

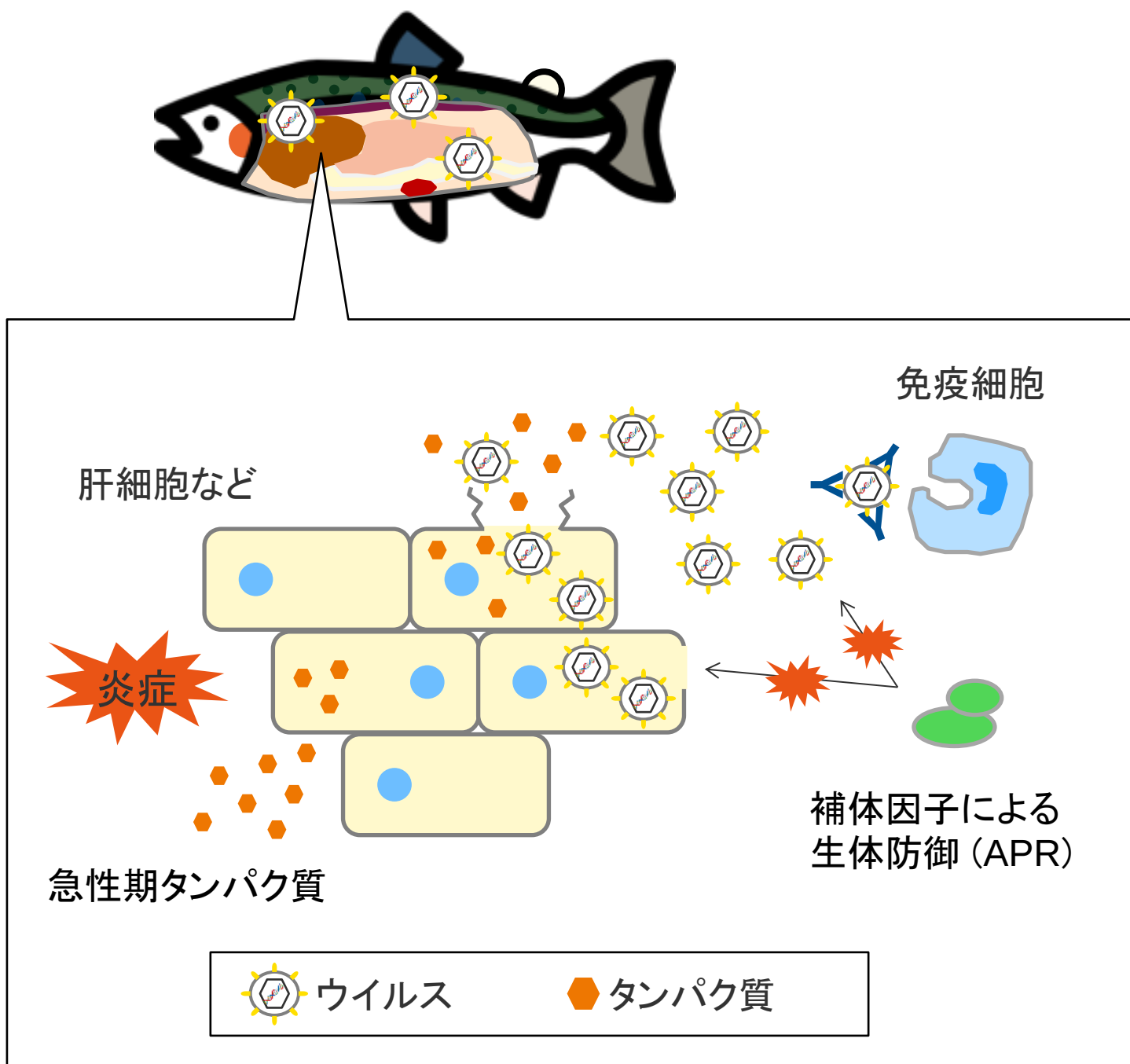


Fig. 1-12. ウイルス感染により魚体内で生じている現象の概略図.

第2章 PIC のニジマスに対する免疫賦活作用とその許容量に影響する要因の解明

目 的

PIC は poly-I と poly-C の二本のヌクレオチドからなる合成二本鎖 RNA である (Chamberlin et al. 1965)。PIC は哺乳類において TLR 刺激物質であり、PIC の刺激を受けた TLR は IFN の産生を誘導する。すなわち PIC を投与することで自然免疫が活性化され、病原ウイルスに対する抵抗性が増加することが報告されている (Field et al. 1967; Park and Baron 1968; Richmond and Hamilton 1969)。この PIC の自然免疫賦活作用を活かしてワクチンアジュバントとしての利用も検討されている (Ichinohe et al. 2005; 2010; Phoolcharoen et al. 2011)。魚類においても哺乳類同様に PIC を投与することで抗ウイルス状態を誘導することが可能であり、サケ科魚においてもその効果が報告されている (Eaton 1990; Jensen et al. 2002)。さらに PIC を投与されたマハタ *Epinephelus septemfasciatus* は red-spotted grouper nervous necrosis virus に対し抵抗性を示すことが報告されており (Nishizawa et al. 2009; Thanasaksiri et al. 2014)、魚類においても新しい免疫法として検討されている (Nishizawa et al. 2011)。Mx タンパク質は IFN により産生が誘導される抗ウイルス作用をもつタンパク質であり (Lindenmann 1962; Leong et al. 1998; Ko et al. 2002)、自然免疫活性化の指標として用いられる (Purcell et al. 2004)。魚類において PIC 投与により Mx 遺伝子発現量が増加するという報告されている (Nagaard et al. 2000; Jensen et al. 2002; Nishizawa et al. 2009; Takami et al. 2010; Thanasaksiri et al. 2014)。また、PIC 投与後の飼育水温と Mx 遺伝子発現量には相関があることが報告されている。Dios et al. (2010) はゼブラフィッシュ *Danio rerio* を用いた試験で PIC 投与したゼブラフィッシュを高水温で飼育すると免疫反応が活性化することから、Mx 遺伝子発現量と飼育水温が関係することを示した。また Thanasaksiri et al. (2014) はマハタを用いた試験で PIC 投与後の飼育水温によって Mx 遺伝子発現量が変化することを示した。しかしながらこれら魚種は温水魚であり、冷水魚における水温と Mx 遺伝子発現量の関係性については明らかにされていない。

一方 PIC の負の側面として、PIC の過剰投与によりしばしば病態を悪化させることが哺乳類において報告されている (Zeleznick and Bhuyan 1969; Phillips et al. 1971)。PIC 投与による負の薬理作用は PIC 自体の直接作用と Type-I IFN や炎症性サイトカインの過剰産生による副作用の両方が起因していると考えられている。魚類においても PIC 投与による副作用が報告されており、松井ら (2012) は PIC を投与したヒラメを水温 13℃ 下で飼育すると水温 17℃ 下で飼育した場合に比べ致死率が高まることを示している。さらに、PIC を投与した表皮に発赤や潰瘍のような症状が観察されている (松井ら 2012)。加えて、Salinas et al. (2004) は PIC が投与後水温 6℃ で飼育したタイセイヨウサケの幼魚に対し高い致死率を示すことも報告しており、水温が免疫反応に影響する魚類においては PIC 投与後の動態を解明する必要がある。

哺乳類において PIC の免疫賦活作用と毒性は PIC の塩基長、すなわち二本鎖全長ならびに PIC を構成する poly-I および poly-C のそれぞれの鎖長に影響を受けることが知られている (Morahan et al. 1972; Black et al. 1973; Machida et al. 1976)。長鎖の PIC は高い免疫賦活作用を有する一方で毒性も強い。近年は PIC の塩基長を制御することも可能となり、PIC の塩基長が免疫賦活作用や毒性に与える影響を明らかにすることも可能となった。

本章では冷水魚であるニジマスにおいて自然免疫と PIC の塩基長ならびに飼育水温の関係性を明らかにすることを目的とし、PIC 投与されたニジマスを高水温ならびに低水温で飼育したときの脾臓における Mx 遺伝子の発現量を経時的に解析するとともに、塩基長の異なる 6 種類の PIC を投与した場合のニジマス脾臓における Mx 遺伝子発現量を解析した。

材料と方法

供試魚

道さけます内水試から分与を受けたニジマスを供試魚として用いた。供試魚の平均魚体重は 109 g (高水温試験時)、145 g (低水温試験時)、65 g (PIC 鎖長比較試験時) であつ

た。また、北海道大学で孵化させたニジマス（平均魚体重 12 g）も試験に用いた。供試魚は全て脱塩素水道水を用いて流水飼育した。

供試 PIC

試験に用いた鎖長の異なる 6 種類の PIC は協和発酵バイオ株式会社より分与を受けた。最長塩基長の PIC は GE Healthcare から市販されているものを使用した。PIC 塩基長は Nakano et al. (2018) の方法に従い決定し、その塩基長を Table 2-1 に示した。全ての PIC は 500-5000 $\mu\text{g/mL}$ となるよう生理食塩水に溶解し、供試するまで-30°Cで保存した。

PIC 投与後の魚体サイズによる影響の評価

供試魚（平均魚体重 12 g ならびに 145 g）を 12 尾ずつ 6 つのグループに分け、魚体あたり 100 μg , 200 μg , 400 μg , 800 μg および 1000 μg となるよう PIC (uPIC70-400) を腹腔内投与した。対照群には PIC 溶解に使用した生理食塩水を 200 μL 投与した。PIC 投与後、脱塩素水道水で飼育し、10 日間の死亡率を観察した。本試験時の平均水温は 4.6°Cであった。

PIC 投与後の飼育水温が Mx 遺伝子発現量に与える影響の評価

平均魚体重 109 g ならびに 145 g のニジマスを 12 尾ずつ 10 つのグループに分け、魚体あたり 100 μg , 200 μg , 400 μg , 800 μg となるよう PIC (PIC400-400) を腹腔内投与した。対照群には PIC 溶解に使用した生理食塩水を 200 μL 投与した。PIC 投与後、平均水温 17.4°Cもしくは 4.6°Cの脱塩素水道水で 10 日間飼育し、投与 1, 3, 7, 10 日後に水槽ごとに脾臓を採取した。得られた脾臓は RNA later (Invitrogen) に浸漬し、発現量解析時まで-30°Cで保存した。

Table 2-1. 供試したPICの塩基長

PICの名称	塩基長 (kbp)	
	Lp	Lw
uPIC70-400	0.4	0.3
uPIC50-400	0.4	0.4
uPIC50-400L	0.7	0.6
uPIC100-400	0.5	0.4
uPIC100-400L	0.8	0.5
PIC400-400	1.1	0.5
PIC-HMW	4.5	NA

Lp: 波長260 nmのピークに含まれるPIC塩基長

Lw: 平均塩基長

NA: 該当データなし

PIC 塩基長が Mx 遺伝子発現に与える影響の評価

平均魚体重 65 g のニジマス を 12 尾ずつ 6 つのグループに分け、塩基長の異なる 6 種類の PIC をそれぞれ 1 種類ずつ 3 mg/kg fish となるよう腹腔内投与した。PIC 投与後、脱塩素水道水（平均水温 8.7℃）で 10 日間飼育した。脾臓は PIC 投与 0, 1, 3, 7 日後に上記と同様の方法で採取した。

Mx 遺伝子の発現量解析

脾臓からの Total RNA 抽出には QuickGene SP Kit RNA tissue (KURABO) を用いて行った。抽出はキットに添付されているプロトコルに従って行った。RNA は 50 µL の DEPC 処理水で溶解し、-80℃で保存した。RT-PCR は Reverse transcriptase XL (AMV) (TAKARA) とランダムプライマー (TAKARA) を用いて添付プロトコルに従って実施した。qPCR による Mx 遺伝子ならびにハウスキーピング遺伝子 (Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0; ARP) の検出は ABI 7300 Real time PCR System (Applied Biosystems) を用いて Purcell et al (2004) の方法に従って実施した。qPCR は Premix Ex Taq (Probe qPCR) (TAKARA) を用いて 95℃, 1 分間を 1 サイクルしたのち、95℃で 15 秒間、60℃で 60 秒間の反応を 45 サイクルした。PCR 産物の増幅効率を評価するため、10 倍希釈した組み換えプラスミド (Mx 遺伝子ならびに ARP 遺伝子) を使用しアッセイプレートごとにスタンダードカーブを作製した。遺伝子発現量は ABI Sequence Detection System software により作製されたスタンダードカーブに基づき算出した。鋳型 RNA 量の差は ARP 遺伝子を用いて標準化した。

統計解析

算出した Mx 遺伝子発現量について、SPSS Statistics version 25.9. (IB501XL) を用いて統計解析を行った。脾臓を採取した時期ごとにクラスカルウォリス検定による群間比較 ($p < 0.05$) を行った。

結 果

魚体サイズが PIC への許容量に及ぼす影響

100 $\mu\text{g}/\text{fish}$ から 1000 $\mu\text{g}/\text{fish}$ の PIC を投与したニジマス（平均魚体重 12 g）における PIC に対する耐性を Fig. 2-1 に示した。PIC 免疫試験中の水温は 4.6°C であった。平均魚体重 145 g のニジマスはどの PIC 投与群においても死亡は確認されなかったのに対し、平均魚体重 12 g のニジマスにおける累積死亡率は PIC 投与量 200, 400, 800 ならびに 1000 $\mu\text{g}/\text{fish}$ で 25, 58, 85, 73% であった。PIC を 100 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 投与したニジマス群において死亡魚は確認されなかった。結果として本試験におけるニジマスの PIC の許容量は 100 $\mu\text{g}/12\text{ g}$ すなわち 8.3 mg/kg fish であった。平均魚体重 12 g のニジマス群における死亡魚には脱鱗、眼球突出、腹水、体表の出血、脾臓の腫大の症状が観察された (Fig. 2-2)。

PIC 投与後の飼育水温が Mx 遺伝子発現量に与える影響

PIC 投与後のニジマス脾臓における Mx 遺伝子発現量の経時的变化を Fig. 2-3 に示した。PIC 投与後に高水温下 (17.4°C) で飼育したニジマスの脾臓における Mx 遺伝子発現量は投与 1 日後にピークが見られ、投与 3 日後には対照群における Mx 遺伝子発現量と同程度まで低下していた。PIC 投与 1 日後の Mx 遺伝子発現量は PIC 100, 200, 400 ならびに 800 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 投与群でそれぞれ 15.7 倍, 18.8 倍, 23.5 倍, 27 倍であり、投与量依存的に増加していた (Fig. 2-3a)。一方で、PIC 投与後に低水温 (4.6°C) で飼育していたニジマス群における Mx 遺伝子発現量は緩やかに増加しており、そのピークは投与 3 日後であった。対照群と比較すると、Mx 遺伝子発現量は PIC 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g}/\text{fish}$ 投与群で 9 倍, 14.7 倍, 27.3 倍, 19.6 倍であった。また、PIC 投与 10 日後の Mx 遺伝子発現量は最大発現時の 30% 以上の値で維持されていた (Fig. 2-3b)。これらの結果より、PIC 投与による Mx 遺伝子発現量は飼育水温の影響を受けることが示された。加えて、PIC 投与後に低水温で飼育した場合、Mx 遺伝子発現量は長期間高い値が維持されることが示された。

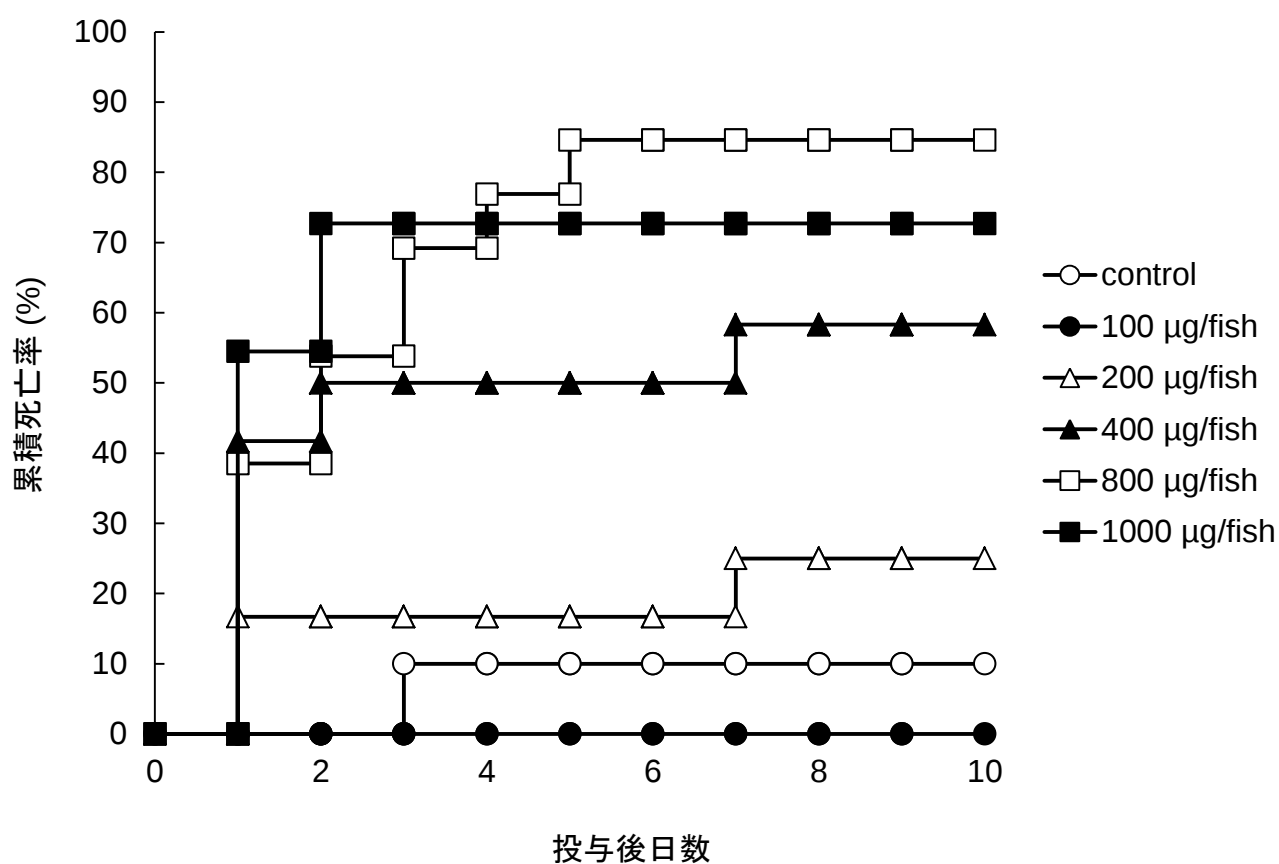


Fig. 2-1. PIC投与後に低水温下 (4.6°C) で飼育した平均魚体重12 gのニジマスの死亡率.

(a)



(b)



(c)



(d)



Fig. 2-2. PIC投与により死亡した魚が呈する症状.

(a) 脱鱗, (b) 眼球突出, (c) 体表の擦れ, (d) 眼球突出および腹水貯留.

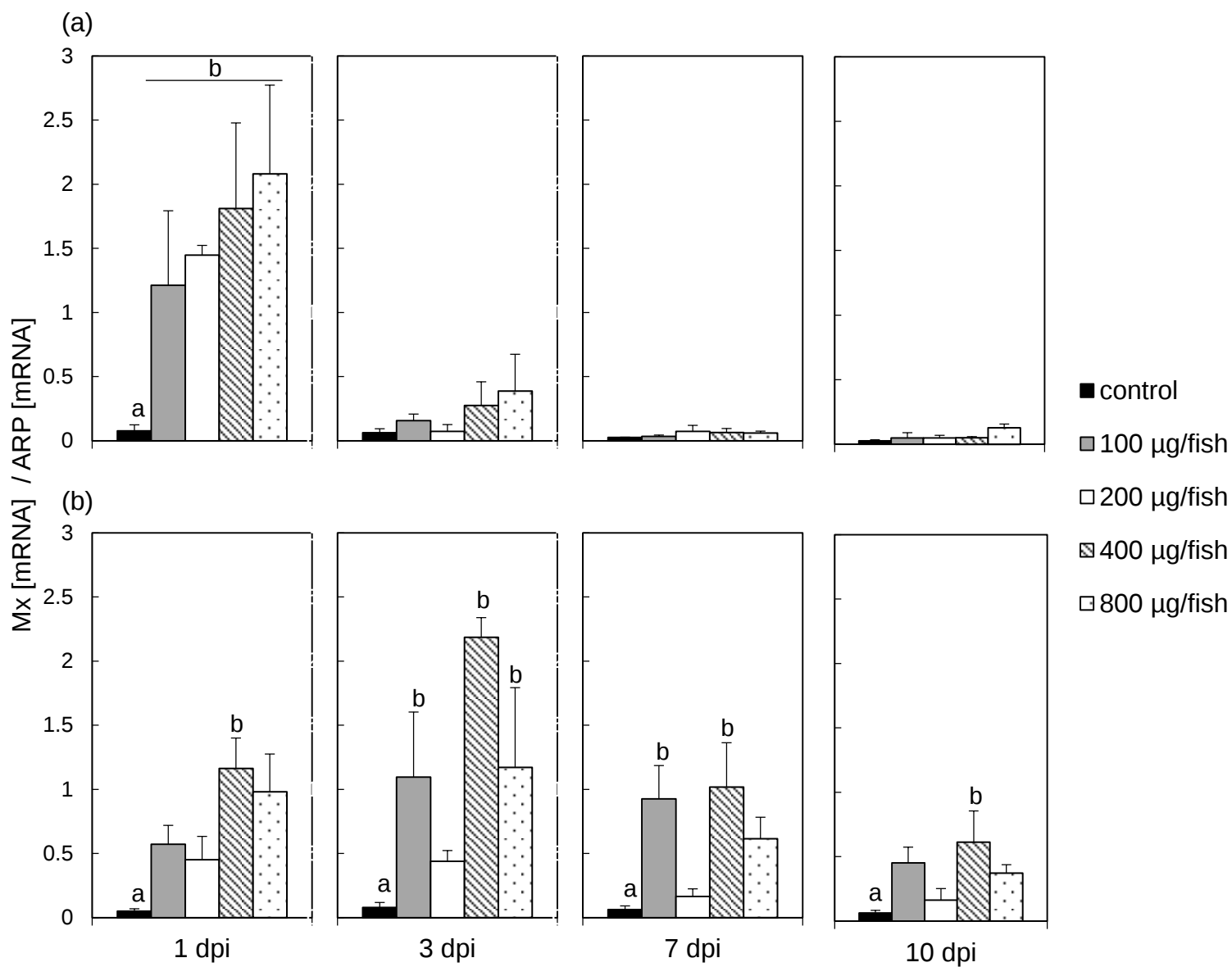


Fig. 2-3. PIC投与後のニジマス脾臓におけるMx遺伝子発現量の経時的変化.
エラーバーは平均±S.E.を示す. 異なるアルファベットは有意差が有ることを示す ($p < 0.05$).

(a) 高水温下で飼育 (17.4°C), (b) 低水温下で飼育 (4.6°C).

PIC の塩基鎖長が Mx 遺伝子発現量に与える影響

塩基長の異なる 6 種類の PIC を投与したニジマスの脾臓における Mx 遺伝子発現量を Fig. 2-4 に示した。本試験時の平均水温は 8.7℃であった。全ての PIC 投与群において投与 1 日後ならびに 3 日後に Mx 遺伝子発現量が増加し、7 日後には対照群と同程度まで低下していた。これら Mx 遺伝子発現量は PIC の塩基長に非依存的であることが示された。

考 察

ニジマスやタイセイヨウサケ等のサケ・マス類は世界中で増養殖が行われており、様々な水温帯で飼育される。PIC は自然免疫を賦活することで被投与魚を抗ウイルス状態にするため、ワクチンアジュバントとしての利用が検討されているが、飼育される水温や魚体サイズによって PIC の自然免疫賦活作用や毒性が異なることが報告されている (Salinas et al. 2004; 松井ら 2012)。サケ・マス類は成長過程や季節によって魚体サイズや生育水温が大きく異なるため、これらの要因を考慮する必要がある。本研究ではまず魚体サイズ、飼育水温もしくは PIC の塩基長が自然免疫賦活作用ならびに PIC に対する許容量に与える影響について検討した。はじめに、魚体サイズと PIC 許容量の関係性について検討したところ、ニジマスの PIC に対する許容量は 100 µg/12 g (8.3 mg/kg fish) であった。これはマウス、ラット、モルモットの許容量である 20 mg/kg に比べ低い結果であった (Zelevnick and Bhuyan. 1968; Phillips et al. 1971)。また PIC 投与後の飼育水温による自然免疫賦活作用の変化を明らかにするため、自然免疫賦活の指標である Mx 遺伝子発現量を解析した。PIC を投与した後、高水温下で飼育したニジマスの脾臓における Mx 遺伝子発現のピークは投与 1 日後であり、投与量に依存していた。その後、Mx 遺伝子発現量は急激に低下し、投与 3 日後までに PIC 投与前程度となった。一方で、低水温下で飼育した場合、Mx 遺伝子発現量のピークは高水温下飼育時とは異なり投与量との相関は認められず、発現量の低下は緩やかであった。PIC を腹腔内投与したマハタにおいても、高水温下の飼育では Mx 遺伝子がより早期且つより

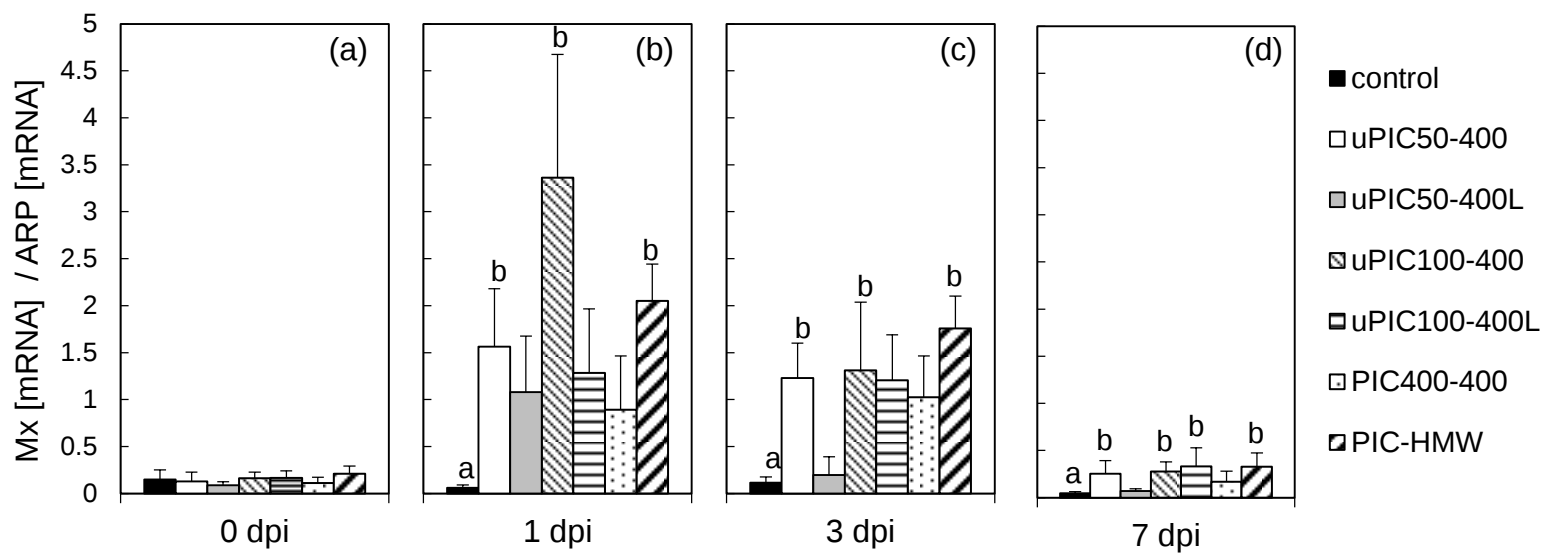


Fig. 2-4.塩基長の異なる6種類のPICを3 mg/kg fish投与したニジマスの脾臓におけるMx遺伝子発現量. 異なるアルファベットは有意差が有ることを示す ($p < 0.05$).

(a) 0 dpi, (b) 1 dpi, (c) 3 dpi, (d) 7 dpi.

強く発現することが報告されている (Thanasaksiri et al. 2014)。魚類において Mx 遺伝子ならびにタンパク質は Type-I IFN により産生誘導される (Nygaard et al. 2000; Altmann et al. 2002; Robertsen et al. 2003; McBeath et al. 2007)。低水温下において Mx 遺伝子発現量が長期間維持されたのは IFN 産生の延長と関係していると考えられ、その結果として副作用を引き起こした可能性が考えられる。これらの結果から、毒性が出現しないよう投与量について注意する必要があるが、PIC 投与後の低水温飼育は抗ウイルス状態を長期間維持でき有効であると考えられる。

哺乳類細胞において、dsRNA は Type-I IFN の産生を誘導する。エンドソーム表面に存在する TLR や細胞質に存在する RIG-I, MDA5 は dsRNA センサーであり、RIG-I や MDA5 は dsRNA を認識する際にその塩基長を判断することで知られており (Kato et al. 2008)、PIC の塩基長についても同様に免疫賦活に重要である (Lampson et al. 1970; Machida et al. 1976)。また骨髄系細胞においては短塩基長の PIC により強い自然免疫が誘導されることも示されている (Mian et al. 2013)。硬骨魚類の場合、IFN の活性化を誘導する分子経路の詳細は明らかにされていないが (Verrier et al. 2011)、PIC の塩基長は自然免疫賦活作用に影響しないことが本試験の結果より示された。魚類における dsRNA の認識は哺乳類に比べ寛容である可能性が考えられ、硬骨魚類において IFN 産生を活性化させるカスケードにおけるメディエーターの特定と性状の解明が必要である。

本章では PIC はニジマス自然免疫を賦活するが、飼育水温 4.6°C 下では投与量 16.7 mg/kg で致死性を示すことが明らかとなった。これは低水温により IFN の長期間の産生が引き起こされたことによる副作用であると考えられる。さらに PIC の塩基長は自然免疫賦活作用に影響しないことも示された。PIC を冷水魚に使用する場合はこれらの要因を考慮する必要がある。また、PIC が自然免疫だけでなく、病原体に特異的な生体防御機構である獲得免疫に対しても賦活化することが可能であれば疾病防除に役立つワクチンアジュバントとなり得る。

第3章 PIC 投与によるニジマスの生理・生化学的影響

目 的

PIC は自然免疫を強く活性化するため、ヒトや魚類におけるワクチンアジュバントとしての利用が検討されている (Ichinohe et al. 2005; 2010; Phoolcharoen et al.; Nishizawa et al. 2011)。第2章ではニジマスにおいて、PIC 投与後に自然免疫活性化の指標である Mx 遺伝子発現量の増加が確認され、ワクチンアジュバントとしての利用の可能性を示した。さらに、低水温下では Mx 遺伝子の発現期間が延長されるものの、毒性が高まることも示した。PIC 投与による毒性はヒトにおいてのみならず魚類においても複数報告されている。(Zelevnick and Bhuyan 1969; Phillips et al. 1971; Salinas et al. 2004; 松井ら 2012)。PIC 投与により生じる負の薬理作用は Type-I IFN や炎症性サイトカインの過剰産生によるものであると考えられているが、魚類においてはその詳細な薬理作用は明らかとなっていない。PIC をワクチンアジュバントとして利用を検討していくにあたり、被投与魚への影響を把握する必要がある。前章にて、ニジマスの PIC に対する許容量は 8.3 mg/kg fish であることが示され、それ以下の投与量である 3 mg/kg fish においても Mx 遺伝子の有意な発現量増加が認められている。本章では、PIC を 3 mg/kg fish となるよう投与したときのニジマスの生理および生化学的变化に及ぼす影響を明らかにするため、PIC 投与前後のニジマス血液の生化学成分を比較するとともに、血液中におけるタンパク質発現プロファイルを解析した。

材料と方法

供試魚

道さけます内水試から分与を受けたニジマスを用いた。供試魚の平均魚体重は 600 g であった。供試魚は試験開始まで円形水槽にて脱塩素水道水を用いて流水飼育した。

供試 PIC

試験に用いた PIC は協和発酵バイオ株式会社より分与を受けた。PIC は 3 mg/mL となるよう生理食塩水に溶解し、試験に使用するまで-30℃で保存した。

PIC 投与が Mx 遺伝子発現量に与える影響の評価

平均魚体重 600 g のニジマスに 3 mg/kg fish となるよう PIC (uPIC100-400) を腹腔内投与した。対照群には PIC 溶解に使用した生理食塩水を 600 µL 投与した。PIC 投与後、同円形水槽にて平均水温 12℃の脱塩素水道水を用いて飼育し、投与 3 日後に検体から脾臓を採取した。得られた脾臓は試験使用時まで-80℃で保存した。

Mx 遺伝子の発現量解析

脾臓からの Total RNA 抽出には QuickGene SP Kit RNA tissue (KURABO) を用いた。抽出はキットに添付されているプロトコルに従い行った。RNA は 50 µL の DEPC 処理水で溶解し、-80℃で保存した。RT-PCR は Reverse transcriptase XL (AMV) (TAKARA) とランダムプライマー (TAKARA) を用いて添付プロトコルに従い実施した。qPCR による Mx 遺伝子ならびにハウスキーピング遺伝子 (Acidic Ribosomal Phosphoprotein P0; ARP) の検出は ABI 7300 Real time PCR System (Applied Biosystems) を用いて Purcell et al (2004) の方法に従って実施した。qPCR は Premix Ex Taq (Probe qPCR) (TAKARA) を用いて 95℃, 1 分間を 1 サイクルしたのち、95℃で 15 秒間、60℃で 60 秒間の反応を 45 サイクルした。PCR 産物の増幅効率を評価するため、10 倍希釈した組換えプラスミド (Mx 遺伝子ならびに ARP 遺伝子) を使用しアッセイプレートごとにスタンダードカーブを作製した。遺伝子発現量は ABI Sequence Detection System software により作製されたスタンダードカーブに基づき算出した。鋳型 RNA 量の差は ARP 遺伝子を用いて標準化した。

PIC 投与がニジマス血漿の生化学成分ならびに血漿中タンパク質発現プロファイルに与える影響の評価

平均魚体重 600 g のニジマス 12 尾の腹腔内にピットタグを打ち、個体識別を行うと

同時にニジマス尾柄部から採血を実施した。得られた血液にヘパリン水溶液 (10 U/mL Blood) を添加し、抗凝固処理を行った。ヘパリン処理後の血液は直ちに遠心分離 ($2,000 \times g$, 20 min, 4°C) し、血漿を得た。ここで得られた血漿を免疫前血漿とし、試験に使用するまで-80°Cで保存した。採血後 4 日間円形水槽にて馴致した後、ニジマス 12 尾に対し PIC (uPIC100-400) を 3 mg/kg fish となるよう腹腔内投与し、同円形水槽にて流水飼育した。また、遺伝子解析試験ならびに病理組織学的観察に用いるための対照群としてニジマス 3 尾に 0.8%生理食塩水を投与し、同様に飼育を行った。PIC 投与 3 日後、上記同様にニジマス尾柄部から採血を実施し、ヘパリン処理後、血漿を得た。これを免疫後血漿とし、試験に使用するまで-80°Cで保存した。また、PIC 投与群ならびに対照群から脾臓、腎臓、肝臓も採取した。

ニジマス血漿の生化学的検査

PIC 投与前後の血漿中の生化学成分を富士ドライケム 4000s (FUJIFILM) を用いて第 1 章と同様の方法で測定した。測定項目については、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アミラーゼ (AMYL)、グルコース (GLU)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、カルシウム (Ca)、総蛋白 (TP)、トリグリセリド (TG)、アルブミン (ALB)、クレアチニン (CRE)、マグネシウム (Mg)、尿素窒素 (BUN)、無機リン (IP)、総ビリルビン (TBIL)、アスパラギン酸トランスフェラーゼ (AST)、HDL コレステロール (HDLc)、アンモニア (NH₃)、クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総コレステロール (TCHO) の 19 項目について測定を実施した。

2D-DIGE のための血漿前処理

PIC 投与前血漿ならびに投与後血漿を各 12 尾分ずつプールし被検試料とした。2D-DIGE のための血漿前処理は第 1 章と同様の方法とし、免疫前血漿を混合した評価用試料には Cy3、PIC 投与後血漿を混合した評価用試料には Cy5、各評価用試料を等量ずつ混合した内部標準試料には Cy2 により蛍光ラベリングした。2D-DIGE 用試料の作製は化学物質評価研究機構 (埼玉) に委託し実施した。

一次元電気泳動ならびに二次元電気泳動

一次元電気泳動ならびに二次元電気泳動は第 1 章で述べた方法と同様の方法で行った。泳動ゲル毎の誤差を考慮するため、3 枚のゲルに泳動を実施した。泳動は 3 W 一定、15℃で泳動先端が完全に溶出するまで約 15 時間行った。電気泳動後、直ちに Typhoon9400 (GE ヘルスケア) を用いてゲル画像の取込みを行った。各 CyDye を適切な波長で励起し蛍光を読み取った (Cy2: 励起 488 nm, 蛍光 520 nm; Cy3: 励起 532 nm, 蛍光 580 nm; Cy5: 633 nm, 蛍光 670 nm)。取り込んだゲルイメージ画像を Decyder ver. 7.0 (GE ヘルスケア バイオサイエンス) を用いて解析し、画像品質の確認ならびに定量比較解析を行った。これら作業は化学物質評価研究機構に委託し実施した。

2D-DIGE ゲルスポットの同定

定量比較解析によりスポット強度が有意に変動したスポットについて、スポットピッカー (GE Healthcare) を用いてゲルのピッキングを行った。切り出したスポットは 96well プレートを用いて試験に使用するまで 30℃で保存した。ゲル片のトリプシン消化、ならびに LC/MS/MS は第 1 章に示した方法で実施した。ゲルのピッキングは化学物質評価研究機構に委託し実施した。

各臓器の病理組織学的観察

上記で採取した各臓器をブアン液にて約 24 時間固定した。固定した組織は適切な厚さになるようメスで切り出し、100%エタノールに 90 分間浸漬し脱水を行った。脱水後、キシレンに 90 分間浸漬し、パラフィンで包埋した。100%エタノールならびにキシレン置換は 3 回ずつ行い、毎回新しい液に浸漬した。作製したパラフィンプロックから 4 μm の組織切片を作製し、ヘマトキシリンエオシン染色 (HE 染色) を施した。

統計解析

算出した Mx 遺伝子発現量について、SPSS Statistics version 25.9. (IB501XL) を用いて統計解析を行った。脾臓を採取した時期ごとにクラスカルウォリス検定による群間比較 ($p<0.05$) を行った。また、生化学成分値については、同ソフトによりウィルコク

ソン符号付順位検定による比較 ($p<0.05$) を行った。

結 果

PIC 投与が Mx 遺伝子発現量に与える影響

PIC 投与後のニジマス脾臓における Mx 遺伝子発現量の経時的変化を Fig. 3-1 に示した。PIC 投与後のニジマスの脾臓における Mx 遺伝子発現量は投与 1 日後にピークが見られ、投与 3 日後には 1/3 程度まで低下していた。PIC 投与 1 日後の Mx 遺伝子発現量は対照群の 12 倍であった。

PIC 投与がニジマス血漿の生化学成分に与える影響

PIC 投与したニジマスの血漿を生化学検査に供試した結果を Fig. 3-2～3-4 に示した。測定した 19 項目のうち、アンモニア (NH₃), カルシウム (Ca), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), 尿素窒素 (BUN), アスパラギン酸トランスフェラーゼ (AST), クレアチンフォスフォキナーゼ (CPK), マグネシウム (Mg), 総タンパク質 (TP), アルブミン (ALB) の 9 項目の測定値が PIC 投与により有意に増加 (Fig. 3-2), クレアチニン (CRE), アルカリフォスファターゼ (ALP), リン (IP) の 3 項目が有意に減少していることが示された (Fig. 3-3)。総ビリルビン (TBIL), 乳酸脱水素酵素 (LDH), アミラーゼ (AMYL), トリグリセリド (TG), グルコース (GLU), HDL コレステロール (HDL-C), 総コレステロール (TCHO) の 7 項目の測定値については PIC 投与前後で生化学検査測定値に有意差は見られなかった (Fig. 3-4)。

PIC 投与がニジマス血漿中タンパク質発現プロファイルに与える影響

PIC を投与したニジマスから得られた血漿をプールし, 2D-DIGE に供した結果を Fig. 3-5 に示した。また, 各泳動ゲルにおいて検出された総スポット数を Table 3-1 に示した。二次元電気泳動により展開した 3 枚のゲルにおいて 1639 から 1814 スポットが検出された。これらスポットに対し, Decyder BVA を使用して統計解析を実施し, PIC

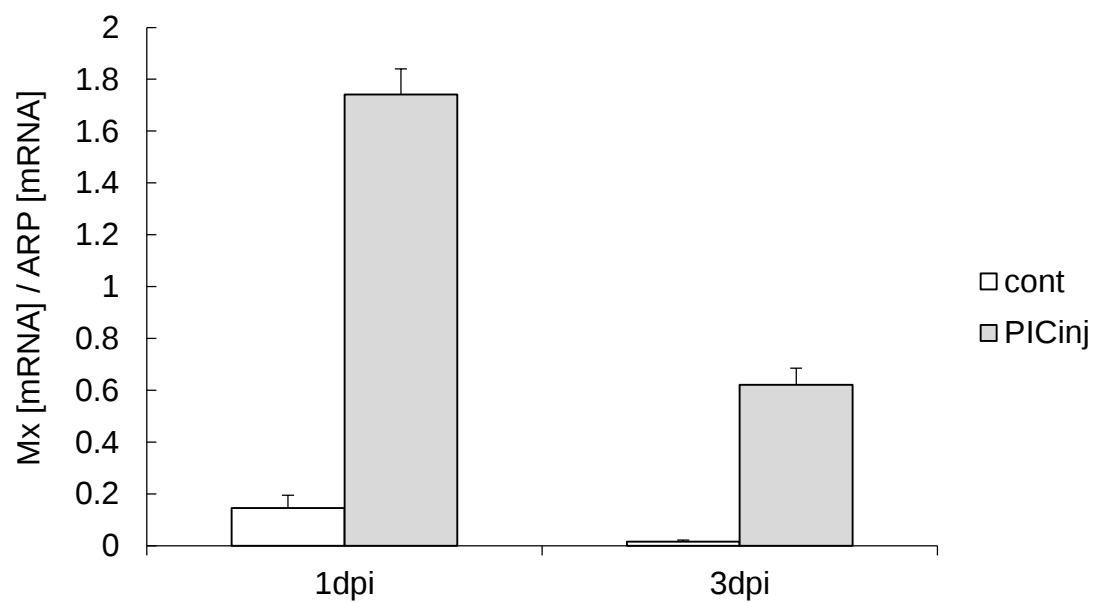


Fig. 3-1. PIC投与後のニジマス脾臓におけるMx遺伝子発現量の経時的変化.
エラーバーは平均±S.E.を示す.

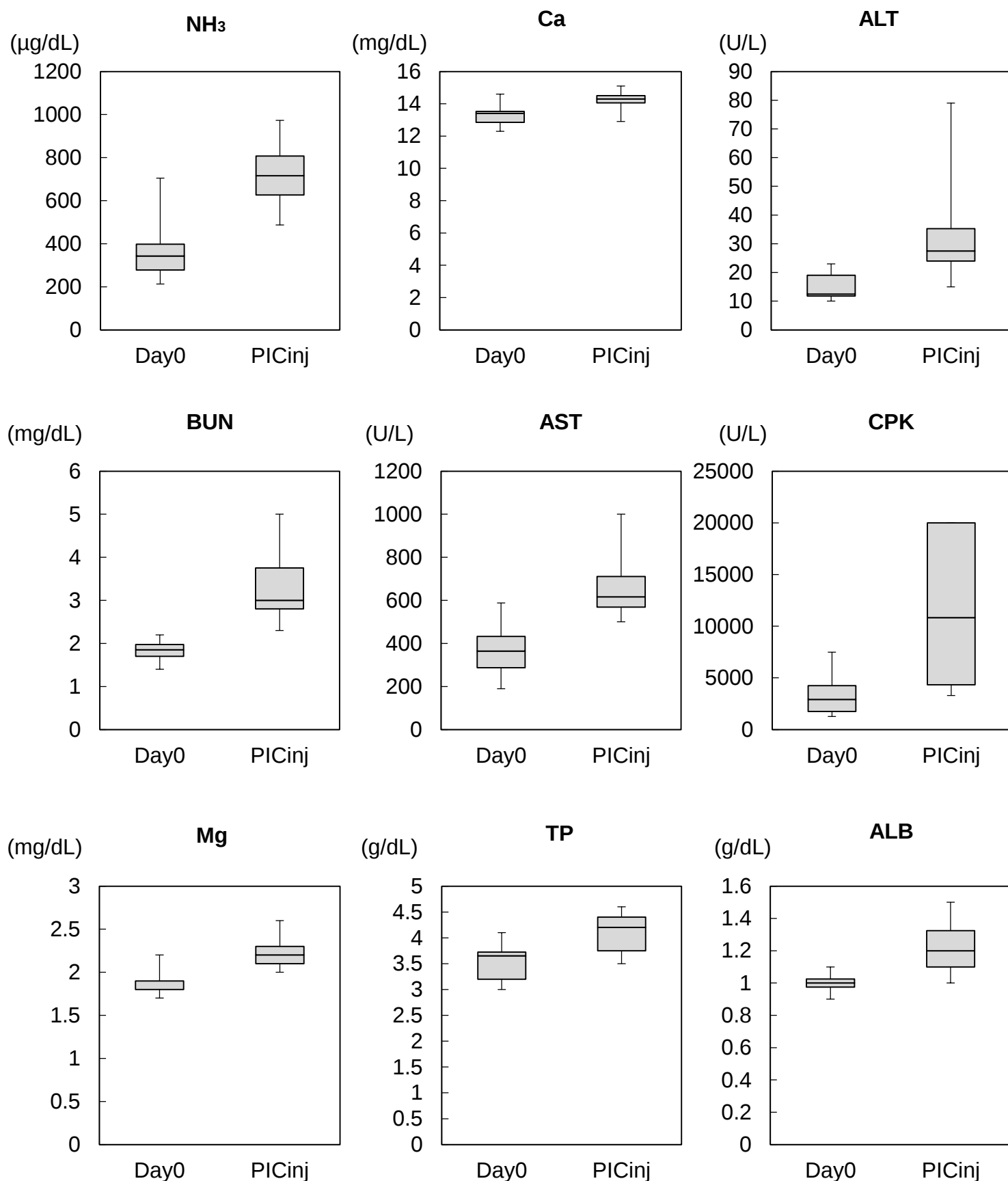


Fig. 3-2. PIC投与により有意に増加した生化学検査測定値.

Day0: PIC投与前, PICinj: PIC投与後. NH₃: アンモニア Ca: カルシウム, ALT: アラニンアミノトランスフェラーゼ, BUN: 尿素窒素, AST: アスパラギン酸トランスフェラーゼ, CPK: クレアチンキナーゼ, Mg: マグネシウム, TP: 総タンパク, ALB: アルブミン.

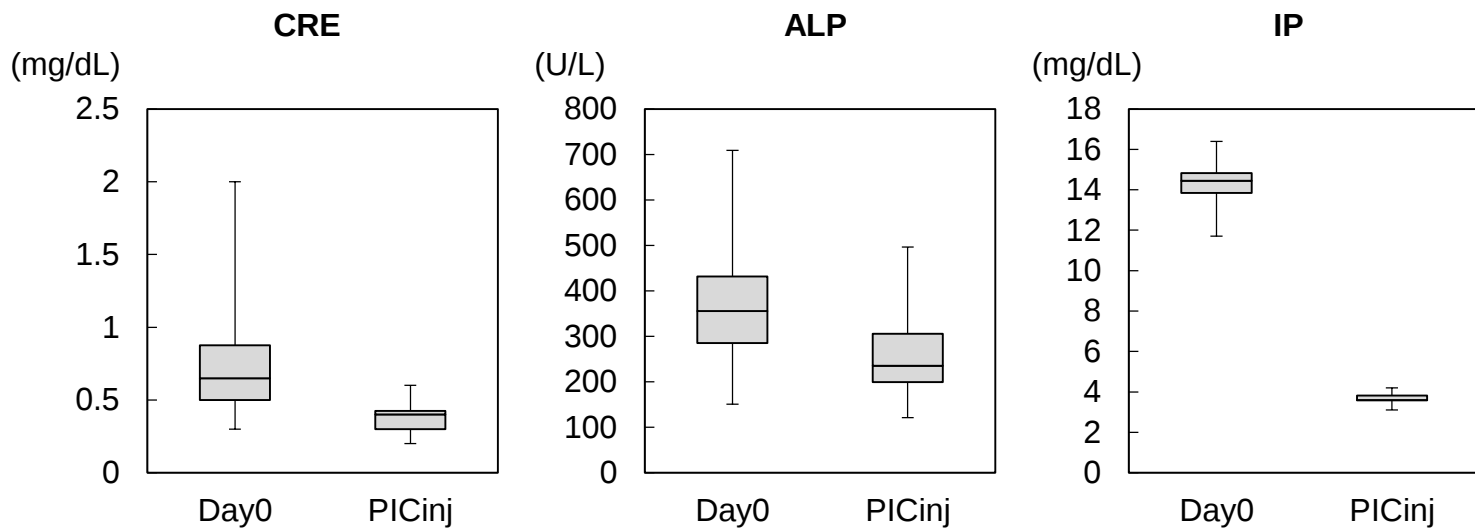


Fig. 3-3. PIC投与により有意に減少した生化学検査測定値.

Day0: PIC投与前, PICinj: PIC投与後. CRE: クレアチニン, ALP: アルカリフォスファターゼ, IP: リン.

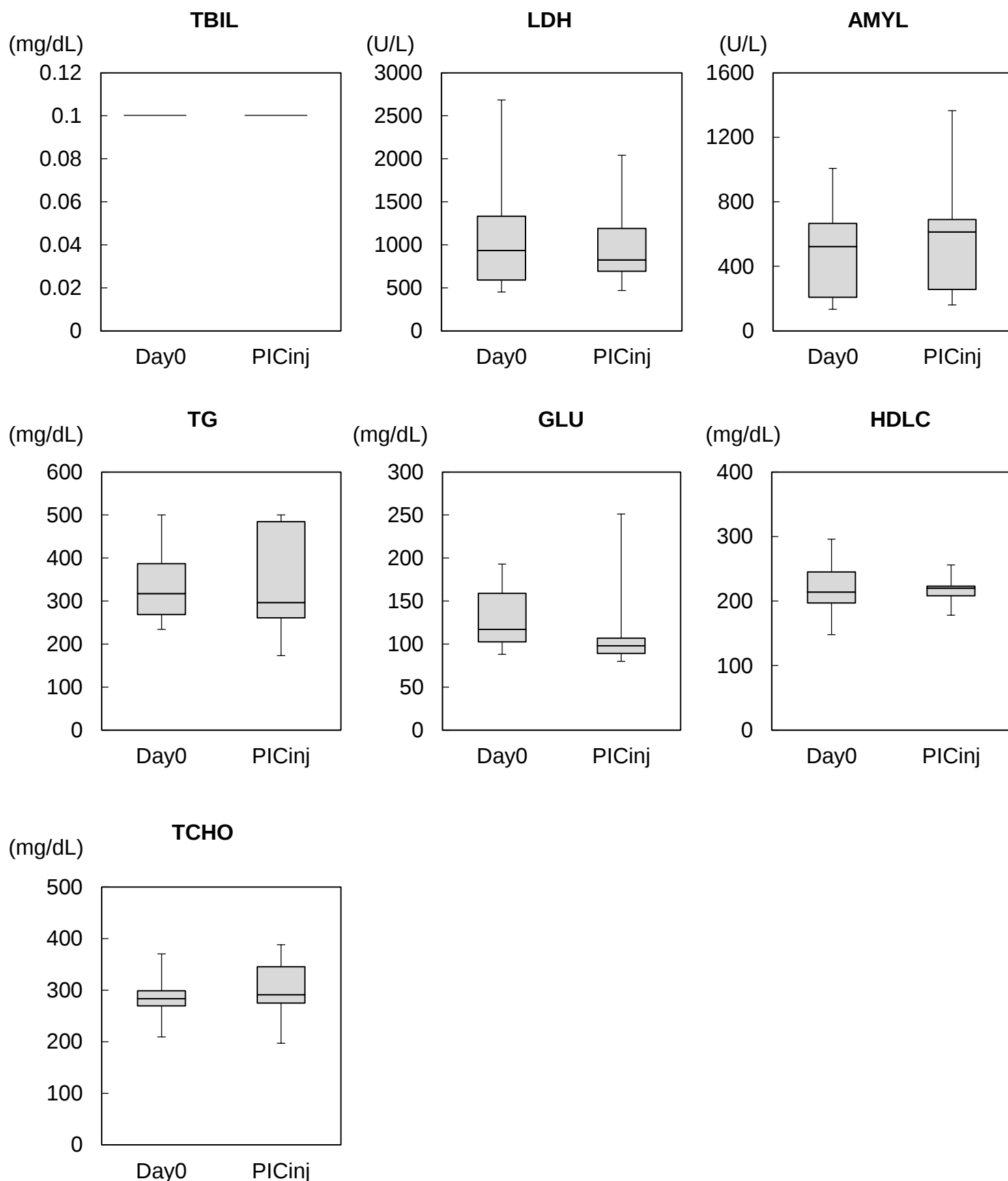


Fig. 3-4. PIC投与により有意差が見られなかった生化学検査測定値.

Day0: PIC投与前, PICinj: PIC投与後. TBIL: 総ビリルビン, LDH: 乳酸脱水素酵素, AMYL: アミラーゼ, TG: トリグリセリド, GLU: グルコース, HDLC: HDLコレステロール, TCHO: 総コレステロール.

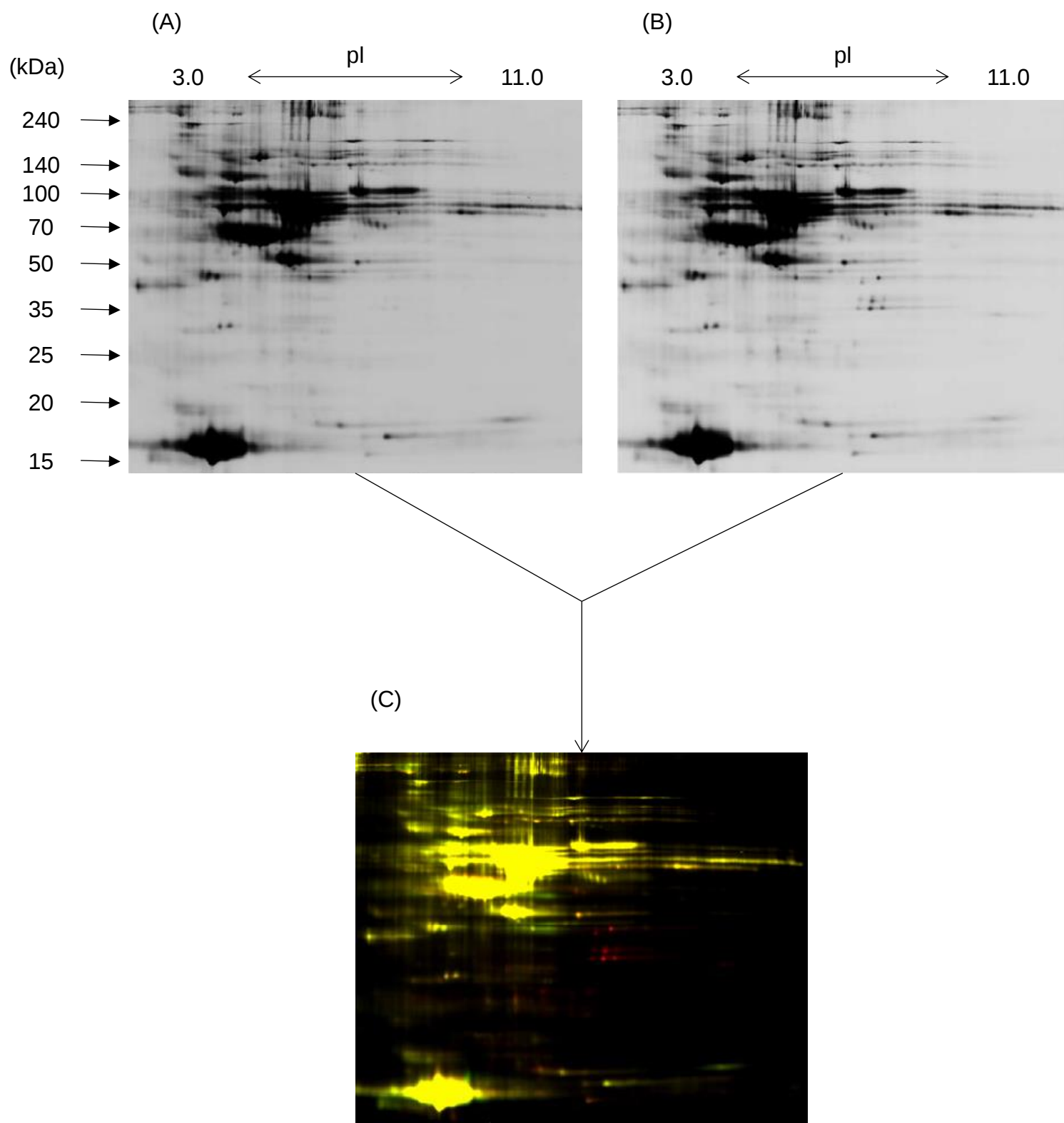


Fig. 3-5. PIC投与前後のニジマス血漿中タンパク質の2D-DIGE像.

(A): PIC投与前, (B): PIC投与後, (C): (A) および (B) の蛍光をマージ.

Table 3-1. 二次元電気泳動において検出された総スポット数

ゲルNo.	サンプル名	蛍光ラベル	検出スポット数
1	Day0	Cy3	1706
	PIC	Cy5	
	pool	Cy2	
2*	Day0	Cy3	1814
	PIC	Cy5	
	pool	Cy2	
3	Day0	Cy3	1639
	PIC	Cy5	
	pool	Cy2	

* マスターゲル

投与前後で 1.5 倍以上有意に変動していたスポットを Fig. 3-6 に示した。PIC 投与後の血漿において、20 スポットが強度増加、6 スポットが強度減少していることが示された (Table 3-2)。

二次元電気泳動においてスポット強度が増加もしくは減少した 26 スポットのうちゲル画像解析により同一と考えられるスポットを除いた 16 スポットについて、LC/MS/MS により同定した結果を Table 3-3 に示した。PIC 投与により、ヘモペキシン様タンパク質、フィブリノーゲン γ A、アポリポタンパク質 A-I-1、補体因子 B/C2、ケラチン、クレアチンキナーゼ、ビテロジェニン、ハプトグロビン、high mobility group protein が変動していることが示された。また、同定されたタンパク質の他に uncharacterized protein ではあるが PIC 投与により増加したタンパク質が 5 つ検出された。

PIC 投与による身体所見ならびに病理組織学的所見

PIC を投与されたニジマスにおいて外観症状に変化は見られなかった。脾臓、腎臓、肝臓については肉眼観察では目立った症状は見られなかったが、病理組織学的観察では壊死が見られる検体も存在した (Fig. 3-7)。

考 察

PIC は自然免疫賦活作用をもち、強力なアジュバントとなり得る。第 2 章において、PIC はニジマスの自然免疫を賦活するが、飼育水温 4.6℃下では投与量 16.7 mg/kg で致死毒性を示すことが明らかとなった。PIC 投与により出現する毒性は自然免疫において産生される炎症性サイトカイン等の働きによる副作用であると考えられているが、その詳細は不明である。本章では PIC 投与により変化するニジマス血漿中の生化学成分値およびタンパク質発現プロファイルを明らかにした。PIC を投与されたニジマスから脾臓を摘出し、Mx 遺伝子発現量を定量したところ、本遺伝子の上方発現が確認され、自然免疫が賦活されていることが示された。同時期の血漿において、ヒトの血液検査で

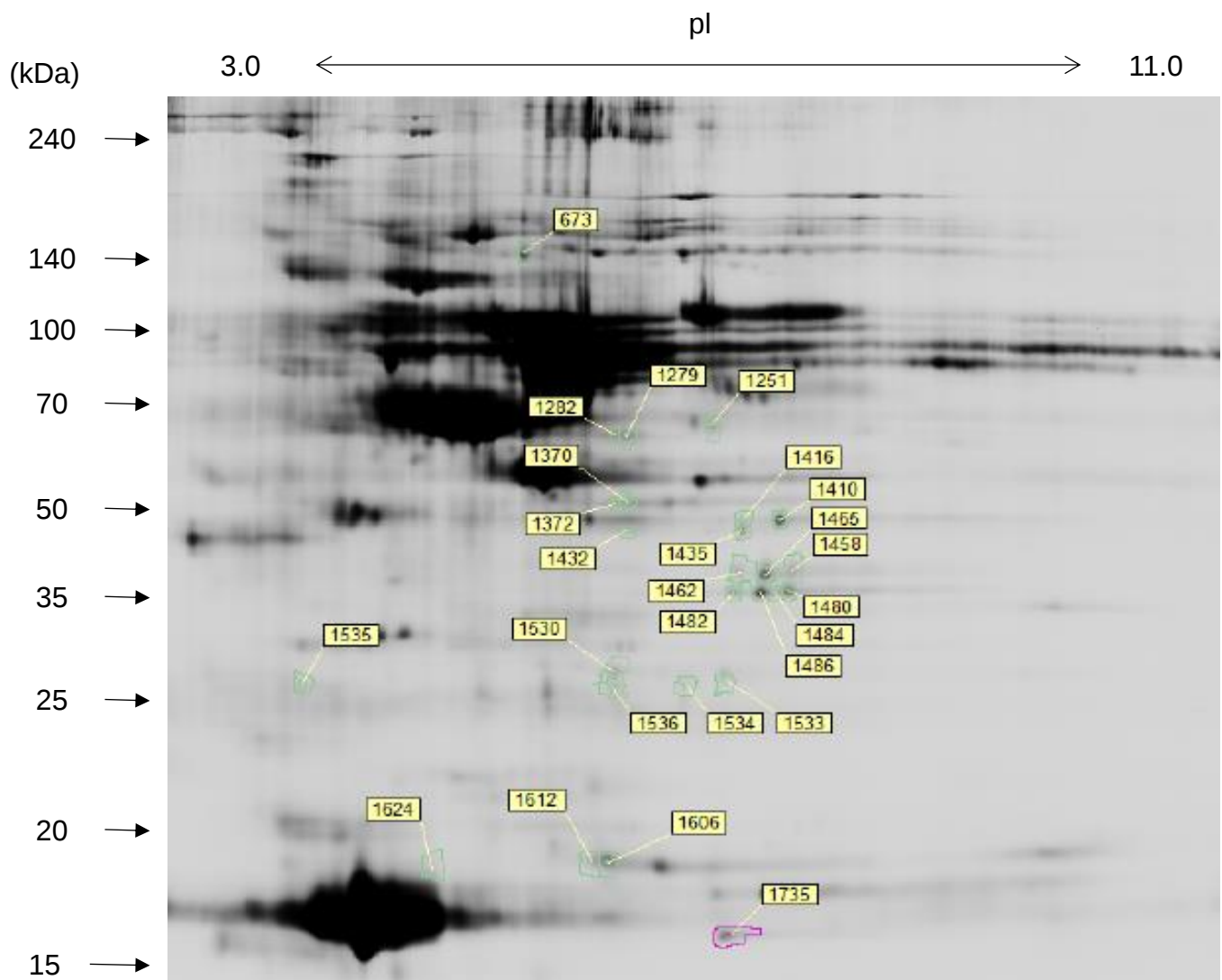


Fig. 3-6. PIC投与により有意に変動したスポット.

Table 3-2. PIC投与により有意に変動したスポット

Spot No.	スポット容積 (PIC/Day0, -X=1/X)	p-value
673	1.56	0.0045
1251	1.62	0.00038
1279	-1.68	0.0012
1282	-1.75	0.0046
1370	-1.90	2.30E-05
1372	-2.25	5.70E-05
1410	5.48	0.0001
1416	3.43	0.00053
1432	-1.58	1.20E-05
1435	5.38	9.40E-06
1458	5.15	1.40E-07
1462	10.18	2.30E-08
1465	9.52	4.00E-06
1480	6.62	8.10E-07
1482	9.65	2.60E-05
1484	9.06	5.60E-05
1486	9.55	7.60E-08
1530	5.05	3.30E-05
1533	4.85	1.90E-06
1534	4.29	0.00039
1535	2.30	1.90E-05
1536	3.90	2.60E-05
1606	1.91	0.00026
1612	3.18	1.00E-05
1624	-2.01	0.0044
1735	1.58	0.0048

Table 3-3. PIC投与により変動したタンパク質

Spot No.	identified protein	fold change	p-value	Accession No.	score	coverag e	MW [kDa]	calc. pI
1279	Hemopexin-like protein (Fragment)	-1.68	0.0012	P79825	25.04	21.75	50.4	6.04
1370	Uncharacterized protein	-1.9	2.30E-05	A0A060XUK2	19.77	18.98	48.7	5.8
1432	Putative fibrinogen gamma A chain (Fragment)	-1.58	1.20E-05	Q9DFD8	17.03	23.21	6	8.66
1624	Apolipoprotein A-I-1	-2.01	0.0044	O57523	129.46	53.05	29.7	5.38
673	Complement factor B/C2	1.56	0.0045	F1DRC4	23.25	13.48	83.9	6.71
1251	Type II keratin E1	1.62	0.00038	Q90W76	54.45	7.12	62.3	5.57
1410	Uncharacterized protein	5.48	0.0001	A0A060YWQ3	73.73	41.52	44.5	6.93
1435	Uncharacterized protein	5.38	9.40E-06	A0A060YWQ3	84.14	42.26	44.5	6.93
1465	Uncharacterized protein	9.52	4.00E-06	A0A060WKG4	26.09	31.05	42.7	7.06
1486	Creatine kinase, muscle	9.55	7.60E-08	S0F2P2	61.14	39.9	42.9	6.93
1530	Vitellogenin	5.05	3.30E-05	Q92093	67.84	13.68	183	8.94
1533	Haptoglobin 2 (Fragment)	4.85	1.90E-06	Q9DFG0	2.25	12.99	8.5	5.73
1535	Simple type II keratin K8a (S1)	2.3	1.90E-06	Q90YH3	4.42	3.53	59.1	5.38
1536	Uncharacterized protein	3.9	2.60E-05	A0A060YZR6	12.57	9.78	39.5	9.11
1606	High mobility group protein B1	1.91	2.60E-04	C1BFH6	2.47	9.79	22.3	8.16
1735	Apolipoprotein A-I-1	1.58	4.80E-03	O57523	7.54	30.53	29.7	5.38

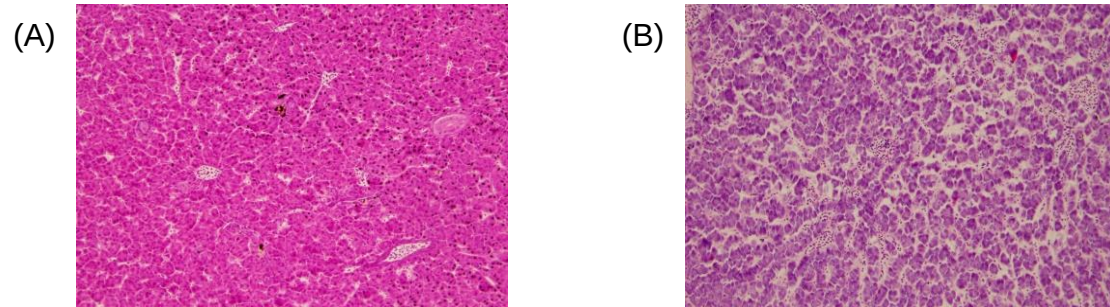


Fig. 3-7. 肝臓の病理組織学的所見.

(A) 対照群 (B) PIC投与群.

一般的に用いられる生化学成分 19 項目を測定し、投与前後で比較したところ、アンモニア、カルシウム、アラニンアミノトランスフェラーゼ、尿素窒素、アスパラギン酸トランスフェラーゼ、クレアチンフォスフォキナーゼ、マグネシウム、総タンパク質、アルブミンが PIC 投与により有意に増加し、クレアチニン、アルカリフォスファターゼ、リンが有意に減少していることが示された。次いで、二次元電気泳動にて PIC 投与前後のニジマス血漿におけるタンパク質発現量を比較したところ、20 スポットが強度増加、6 スポットが強度減少していることが示された。このうちヘモペキシン様タンパク質、フィブリノーゲン γ A、ハプトグロビンは肝臓で生合成されるタンパク質であった。哺乳類における肝臓の役割は代謝された糖の合成・分解、死亡の消化・吸収を補助する胆汁の生成およびアルコールやアンモニア、毒物等の有害物質を無毒化する解毒作用である。今回上昇が確認された生化学成分のうち、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) ならびにアスパラギン酸トランスフェラーゼ (AST) は肝臓の損傷を示すものである。哺乳類においては早期かつ高度な肝障害により $AST > ALT$ となり、肝障害回復期では $AST < ALT$ となることが知られている (滝川ら 2005)。今回の試験では全ての個体において $AST > ALT$ であり、早期の肝障害を呈していることが示唆された。また、薬物性肝障害診断基準では薬剤による肝障害のタイプが分類されており、ALT の数値が正常基準値上限の 2 倍以上かつ ALP が正常範囲または ALT/ALP 比 ≥ 5 であれば肝細胞障害型、ALT が正常範囲かつ ALP が正常基準値上限の 2 倍以上または ALT/ALP 比 ≤ 2 であれば胆汁うっ滞型、ALT が正常基準値上限の 2 倍以上かつ ALP が正常基準値上限以上または $2 < ALT/ALP < 5$ であれば混合型と定められている。本試験において個体間の差はあれどおよそ ALT/ALP 比が 2~3 程度であった。魚類における ALT ならびに ALP 基準値は定められてはいないが、仮に上記の基準に沿って判断した場合、PIC 投与により肝細胞障害および胆汁うっ滞が生じていると考えられる。実際、肝臓の病理組織学的観察では壊死が見られる個体もあった。魚類以外の生物で肝臓への影響が疑われる例として、PIC を投与したビーグル犬の血液凝固能が低下したという報告 (Gralnick et al., 1972) が挙げられる。これは、肝臓における血液凝固因子の産生機能が障害を受けたものと推察され、PIC の肝臓への影響が示唆される。マウスにおいては、麻酔薬ハロタンに起因する肝臓障害が PIC 投与により悪化することが報告されている

(Cheng et al. 2009)。またラットから分離されたグリア細胞のひとつである希突起膠細胞を死滅させるという報告もあり (Steelman and Li. 2011), PIC は肝臓以外にも障害を与える可能性がある。

ヘモペキシンならびにハプトグロビンは血中に遊離したヘムやヘモグロビンと結合することで知られるタンパク質であり, 肝臓で生合成される。今回どちらのタンパク質も PIC 投与後に減少していることが示された。血中に遊離したヘムやヘモグロビンは活性酸素を産生することが報告されている (Sassa 2006; Hada et al. 2014; Rifkind et al. 2015)。PIC 投与により肝臓に障害を与えられていることに加え, ヘモペキシンやハプトグロビンの減少に起因するヘムならびにヘモグロビンの増加が実際に起きているか否かについて, 今後検討する必要がある。

一方で本研究では IFN 等の免疫関連分子の有意な増加は観察されなかった。魚類における IFN の血中濃度については明らかになっていないが, 二次元電気泳動でのタンパク質検出限界は 1 ng/spot 程度とされており, IFN の血中濃度がそれ以下であれば検出は難しいと考えられる。しかしながら PIC 投与により IFN 産生の指標となる Mx 遺伝子の発現量が上昇することが示されており (Nygaard et al. 2000; Jensen et al. 2002; Nishizawa et al. 2009; Takami et al. 2010; Thanasaksiri et al. 2014), PIC 投与によりサイトカインストーム様の現象が魚体内で生じている可能性も考えられる。PIC 投与による IFN 産生量増加や免疫細胞の活性については更なる研究が必要である。

本章では PIC 投与により肝臓へ障害が生じることが明らかとなった。また, PIC 投与により生じると考えられている IFN 等の過剰産生は確認されなかった。PIC 投与による毒性の出現が肝臓への障害のみによるものであるとは言い切れないが, 肝臓への負担が大きく, 死因の一要因となっていると考えられる。今後, 魚類に対し PIC をワクチンアジュバントとして利用する場合は十分な免疫活性作用が得られ, 副作用の少ない投与量を検討する必要があると考えられる。

総合考察

水産増養殖業の発展に伴い、多様な魚種が孵化放流、種苗生産あるいは養殖の対象となるなか、魚類病原微生物による感染症が発生し、水産業に大きな被害を与えている (Kimura and Yoshimizu. 1991; Muroga 2001; 若林 2002; Bergmann and Fichtner. 2008)。現在の我が国のサケ・マス類増養殖における感染症対策としては作業者の手指ならびに使用器具の消毒や飼育施設の消毒、飼育用水の殺菌、抗体検査を用いた既往歴の把握およびウイルス検査等による親魚選別、卵消毒による垂直伝播の防止、飼育水温の管理、ワクチン投与による感染予防等が行われている (Yoshimizu. 2009)。ヒトや家畜とは異なり、魚類においては治療よりも予防に重点が置かれている。これは個体数が多い魚に対し治療を行った場合、その労力やコストが生産額に見合わないためである。それゆえ、増養殖現場において新たな感染症が発生した場合、予防対策を早急に講じるため、疾病の早期診断法の確立、病原体の殺菌・不活化条件の決定ならびにワクチン開発等に関する研究が進められてきた。

魚類の感染症における症状には特徴的なものが多く、その肉眼的観察や病理組織学的研究は古くから行われているにもかかわらず、それら症状がどのような機序で発生しているのかは未だ明らかにされていない部分が多い。本研究で対象とした IHN および OMVD についても造血器の壊死や肝炎等の症状やその病理組織学的所見は報告されている一方で、病態生理学的知見は乏しい。血液は身体に生じる生理現象を鋭敏に反映する器官であり、疾病により生じている現象をモニタリングすることが可能である。ヒトや家畜において疾病罹患時の血液性状についてよく研究されており、血液を健康診断に用いることは一般的である。魚類の血液性状についても古くから研究されているにもかかわらず、病態生理学的知見の少なさから血液を用いた健康診断法および病原体診断法は少ない。そこで第 1 章では代表的なサケ科魚類のウイルス感染症である IHN および OMVD 発症における病態の基礎的知見を得ることを目的として、ウイルス感染によるニジマス血漿中のタンパク質発現プロファイルならびに生化学成分への影響について検討した。

まず、新たな感染症防除対策として血液を用いた定期的なモニタリングや疾病バイオ

マーカーによる感染症検出手法の開発のための基礎的な知見を得ることを目的とし、代表的なサケ科魚ウイルス感染症発症時の血中タンパク質発現プロファイルを解析した。人為感染により作出した IHN および OMVD 発症瀕死個体から血漿を得て解析した結果、乳酸脱水素酵素をはじめ肝臓への障害を表す項目の測定値が有意に増加した。加えて、急性期反応に関わるタンパク質が多く検出され、ウイルス感染後 1 週間程度は炎症反応が強く生じていることが示唆された。今回作出した病魚は、IHN では肝臓の出血や退色、脾臓腫大が認められ、病理組織学的所見としては肝臓、脾臓において壊死やうつ血様の症状が確認されている。OMVD も同様の所見であった。本病理組織学的所見を裏付けるように、肝臓障害で変動する血液成分がウイルス感染時のニジマス血漿においても変化しており、これらタンパク質は魚類感染症診断の上でも重要な指標になり得る。また、本研究では腎臓障害で変動する生化学成分の上昇も確認されたが、哺乳類と魚類では体内で生じたアンモニアの処理方法が異なるため (岩田 1998)、これら数値を指標とする場合は腎臓障害との関連が裏付けられる代謝経路を同時に提示する必要がある。一方、IHN あるいは OMVD 発症魚において特異的に増加あるいは減少する成分を 2D-DIGE 解析により見出した。IHN では Spot No. 2267, 3326 および 4625, OMVD 病では Spot No. 3534, および 3579 である。これらのうち Spot No. 2267 および 4625 は LC/MS/MS により 3'(2'),5'-ビスリン酸ヌクレオチダーゼ、レチノール結合タンパク、と同定されたが、他のスポットは全て uncharacterized protein となった。3'(2'),5'-ビスリン酸ヌクレオチダーゼはアデノシン-3', 5'-ビスリン酸を加水分解する酵素で、アデノシン-リン酸 (AMP) を生成する (Ramaswamy and Jakoby. 1987)。ここで生成された AMP は ATP 生成に利用される (Farooqui and Balasubramanian. 1970)。またレチノール結合タンパクは肝臓に貯蓄されたビタミン A を各器官に輸送する特異輸送タンパク質である (Kanai et al. 1968)。これらタンパク質は感染症診断におけるバイオマーカーの候補であり、今後は他の疾病におけるこれらタンパク質の挙動について明らかにすることで特異性を見極める必要がある。それに加え、ウイルス感染初期に関する病態生理学的知見も今後明らかにする必要があると考える。

次に、新たな免疫賦活剤として効能評価が進む PIC の作用および処方を、魚体の血液性状の変化に基づき検討した。ウイルス病対策のひとつにワクチン投与による予防が

ある。ワクチンは獲得免疫における二次応答のしくみを利用した予防法であり、魚類のみならずヒトや家畜においても利用されている。医学分野においては、自然免疫の分子機構の解明に伴い抗原およびアジュバントを適切な樹状細胞に標的することによる次世代ワクチン開発が進められている（青枝・石井 2012）。水産分野においては、Kim et al. (2009) が予め PIC をニジマスに投与することで IHNV に対する免疫が誘導されることを示し、PIC の自然免疫賦活剤としての有効性を示した。しかしながら、他魚種において水温に依存して毒性が生じることも示され（Salinas et al. 2004; 松井ら 2012）、水温と毒性の関係について詳細を明らかにする必要がある。そこで第 2 章ならびに第 3 章ではサケ・マス類に対して PIC を免疫賦活剤として用いるにあたり、水温が PIC の自然免疫賦活作用ならびに毒性に与える影響を検討した。また、PIC の毒性が魚体に対しどのような障害を与えているのかについて検討した。その結果、ニジマスに PIC を投与し、低水温で飼育することで抗ウイルス状態が長期間維持されることが示された。このことにより、低用量で十分な免疫効果が得られるため、コストの低減も見込める。一方で、低水温下では PIC を 16.7 mg/kg fish 以上投与すると致死毒性が出現することも明らかとなり、投与量については今後十分な検討を行っていく必要がある。なお、このときの死亡魚には脱鱗、眼球突出、腹水、体表の出血、脾臓の腫大の症状が観察され、PIC 投与が魚体に多大な影響を与えることが示された。このときの魚体内での変化について、第 1 章と同様の手法で解析を行ったところ、PIC 投与により少なくとも肝臓に障害が生じていることが明らかとなった。このときの PIC 投与量は 3 mg/kg fish であり、致死的な量ではない。先のウイルス感染症においては、ウイルスが肝細胞で増殖することで壊死が引き起こされ、ニジマス血漿中におけるタンパク質発現プロファイルに変化が生じたと考えられるが、PIC による肝臓障害の発生機序は今のところ明らかになっていない。一般に肝臓は薬剤代謝器官であるため PIC 投与により負担が生じている可能性があるが、PIC により活性化した NK 細胞が自己の肝細胞を攻撃する例が報告されており（Ochi et al. 2004）、自己免疫疾患が起こる可能性を踏まえ肝臓障害の発生機序について検討を進める必要があるだろう。PIC の使用に当たっては、投与量により副作用をコントロールしていく必要がある。PIC を魚類に投与する場合、腹腔内もしくは筋肉に注射する手法がとられている。連続注射器を用いることで薬剤投与にかかる労力はある程

度抑えられるが、それでも浸漬法や経口投与に比べ注射法による薬剤投与は作業者の負担が大きい。PIC を経鼻投与することで免疫を誘導する手法も研究されており (Tacchi et al. 2014), 哺乳類とは異なり体表全体から薬剤を取り入れることが可能である魚類においては粘膜を介した浸漬法は有効であると考えられる。

哺乳類においては PIC の塩基長により免疫賦活効果が異なることが報告されており (Morahan et al. 1972; Black et al. 1973; Machida et al. 1976; Zhou et al. 2013), 魚類への効果は解明すべき重要な点である。本研究により、ニジマスにおいては PIC の免疫賦活効果は塩基長と相関がないことが明らかとなった。IFN の活性化を誘導させる分子経路の詳細は明らかにされていないが (Verrier et al. 2011), 魚類における dsRNA の認識は哺乳類に比べ寛容である可能性が考えられる。PIC の有効性は幅広い魚種において報告されており (Jensen et al. 2002; Lockhart et al.; Purcell et al. 2004; Plant et al. 2005; Saint-Jean and Perez-Prieto 2007; Fernandez-Trujillo et al. 2008), PIC による免疫賦活の仕組みが進化的に広く保存されていることが伺われる。比較免疫学の観点からも、硬骨魚類における IFN 産生を活性化させるカスケードにおけるメディエーターの特定と性状の解明が必要である。

魚類ウイルス病の診断を行う際、外観症状や内臓器官の観察を行い、病変部より分離・培養したウイルスを同定することが基本である。しかし近年、簡易診断キットの開発や分子生物学的技術の普及に伴い、病原体の分離・培養を行わず病原体特異遺伝子あるいはタンパク質の検出が実施される傾向にある。死因に繋がらない病原体を検出することで誤った診断がなされる危険を避けるためにも、特定の病原体を検出するような手法だけでなく、病原体の分離を伴わない、宿主の健康状態に基づく感染症発症の予兆を診断するような手法の開発・導入が必要であると考ええる。魚病学分野においても病態生理学的知見を集積し、病気の兆候に早く気付くことで産業被害を最小限に抑えることが重要であろう。さらに、疾病の予防についても従来の防疫対策に加え、PIC のように自然免疫活性化に着目した物質を利用することにより、ワクチンが効きづらい疾病等への対応策を増やしておく必要があると考える。本研究において明らかとなったウイルス感染症における病態生理学的知見ならびに PIC に関する基礎的知見が魚類感染症の防除・防疫対策に結び付き、ひいてはサケ・マス類の安定生産につながることを期待する。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御指導および御教鞭を賜り、また厳密なる御校閲を頂きました北海道大学大学院水産科学研究院准教授 笠井久会博士に深甚なる謝意を表するとともに、種々の適切な御助言と御校閲頂いた北海道大学大学院水産科学研究院教授 澤辺智雄博士ならびに同教授 尾島孝男博士に心より感謝申し上げます。また、本研究を進めるに上で有益な御助言と御協力を頂きました北海道大学大学院水産科学研究院助教授 田中啓之先生、化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所 山中秀徳様、はこだて未来大学准教授 Bagenda Dominic 博士ならびにポーランド科学アカデミー Andrzej Ciereszko 博士に感謝の意を表します。

貴重な試料を提供してくださった地方独立行政法人 山口県産業技術センターイノベーション推進センタ 中野哲郎様、ならびに地方独立行政法人 北海道立総合研究機構 さけます・内水面水産試験場の関係者各位に厚くお礼申し上げます。

実験上多大な御協力を頂くとともに、お互い叱咤激励し合ってきた学友諸氏ならびに後輩諸氏に深く感謝致します。

参考文献

- Akiyama, Y., K. Oshima, T. Kuhara, K. Shin, F. Abe, K. Iwatsuki, D. Nadano and T. Matsuda (2013) A lactoferrin-receptor, intelectin 1, affects uptake, sub-cellular localization and release of immunochemically detectable lactoferrin by intestinal epithelial Caco-2 cells. *J. Biochem.*, **154**, 437-448.
- Alfonso, P., A. Núñez, J. Madoz-Gurpide, L. Lombardia, L. Sanchez and I. Casal (2005) Proteomic expression analysis of colorectal cancer by two-dimensional differential gel electrophoresis. *Proteomics*, **5**, 2602-2611.
- Altmann, S. M., M. T. Mellon, D. L. Distel, and C. H. Kim (2003) Molecular and Functional Analysis of an Interferon Gene from the Zebrafish, *Danio rerio*. *J. Virol.*, **77**, 1992-2002.
- Amend, D. F., W. T. Yasutake and R. W. Mead (1969) A Hematopoietic Virus Disease of Rainbow Trout and Sockeye Salmon. *T. Am. Fish. Soc.*, **98**, 796-804.
- Anders, K. and M. Yoshimizu (1994) Role of viruses in the induction of skin tumours and tumour-like proliferations of fish. *Dis. Aquat. Org.*, **19**, 215-232.
- 青枝大貴, 石井 健 (2012) 自然免疫と次世代ワクチン開発. *Drug Delivery System*, **27**, 19-27.
- Avtalion, R. R. (1969) Temperature Effect on Antibody Production and Immunological Memory, in Carp (*Cyprinus carpio*) Immunized Against Bovine Serum Albumin (BSA). *Immunology*, **17**, 927-932.
- Baumgarner, B. L., A. S. Bharadwaj, D. Inerowicz, A. S. Goodman, P. B. Brown (2013) Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestinal epithelia: Physiological acclimation to short-term starvation. *Comp. Biochem. Phys. D*, **8**, 58-64.
- Bayne, C. J. and L. Gerwick (2001) The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.*, **25**, 725-743.
- Bergmann, S. M. and D. Fichtner (2008) Diseases Caused by Virus: Viral Diseases

- in Salmonids. In "Fish Diseases" (ed. by J. C. Eiras, H. Segner, T. Wahli and B. G. Kapoor), Science Publishers, United States of America, pp.41-85.
- Besnard, J., G. F. Ruda, V. Setola, K. Abecassis, R. M. Rodriguez, X. Huang, S. Norval, M. F. Sassano, A. I. Shin, L. A. Webster, F. R. C. Simeons, L. Stojanovski, A. Prat, N. G. Seidah, D. B. Constam, G. Richard Bickerton, K. D. Read, W. C. Wetsel, I. H. Gilbert, B. L. Roth and A. L. Hopkins (2012) Automated design of ligands to polypharmacological profiles. *Nature*, **492**, 215-222.
- Black, D. R., F. Eckstein, E. DeClercq and T. C. Merigan (1973) Studies on the Toxicity and Antiviral Activity of Various Polynucleotides. *Antimicrob. Agents Ch.*, **3**, 198-206.
- Braceland, M., M. F. McLoughlin, J. Tinsley, C. Wallace, D. Cockerill, M. McLaughlin and P. D. Eckersall (2015) Serum enolase: a non-destructive biomarker of white skeletal myopathy during pancreas disease (PD) in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.*, **38**, 821-831.
- Brunt, J., R. Hansen, D. J. Jamieson and B. Austin (2008) Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. *Vet. Immunol. Immunop.*, **121**, 199-205.
- Carroll, M. C. and A. P. Prodeus (1998) Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 36-40.
- Chamberlin, M. J. and D. L. Patterson (1965) Physical and chemical characterization of the ordered complexes formed between polyinosinic acid, polycytidylic acid and their deoxyribo-analogues. *J. Mol. Biol.*, **12**, 410-428.
- Chen, C., G. A. Wooster, R. G. Getchell, P. R. Bowser, M. B. Timmons (2003) Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozone-treated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, **218**, 89-102.

- Chen, C., G. A. Wooster and P. R. Bowser (2004) Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. *Aquaculture*, **239**, 421-443.
- Cheng, L., Q. You, H. Yin, M. Holt, C. Franklin and C. Ju (2009) Effect of PolyI:C Co-treatment on Halothane-Induced Liver Injury in Mice. *Hepatology*, **49**, 215-226.
- Claire, M., H. Holland and J. D. Lambris (2002) The complement system in teleosts. *Fish Shellfish Immun.*, **12**, 399-420.
- Cordero, H., C. H. Li, E. Chaves-Pozo, M. A. Esteban, A. Cuesta (2017) Molecular identification and characterization of haptoglobin in teleosts revealed an important role on fish viral infections. *Dev. Comp. Immunol.*, **76**, 189-199.
- Csermely, P., V. Ágoston and S. Pongor (2005) The efficiency of multi-target drugs: the network approach might help drug design. *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 178-182.
- Dios, S., A. Romero, R. Chamorro, A. Figueras and B. Novoa (2010) Effect of the temperature during antiviral immune response ontogeny in teleosts. *Fish Shellfish Immun.*, **29**, 1019-1027.
- Eaton, W. D. (1990) Anti-viral activity in four species of salmonids following exposure to poly inosinic:cytidylic acid. *Dis. Aquat. Org.*, **9**, 193-198.
- 江草周三, 反町 稔 (1986) ブリ稚魚の Yellowtail Ascities Virus (YAV) 感染症の病理組織学的研究. *魚病研究*, **21**, 113-121.
- Espelid, S., G. B. Løkken, K. Steiro and J. Bøgward (1996) Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Shellfish Immun.*, **6**, 95-110.
- Farooqui, A. A. and A. S. Balasubramanian (1970) Enzymatic dephosphorylation of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate to adenosine 5'-phosphosulfate in sheep brain. *Biochim. Biophys. Acta.*, **198**, 56-65.

- Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996) The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, **272**, 50-53.
- Fernandez-Trujillo, A., P. Ferro, E. Garcia-Rosado, C. Infante, M. C. Alonso, J. Bejar, J. J. Borrego, M. Manchado (2008) Poly I:C induces Mx transcription and promotes an antiviral state against sole aquabirnavirus in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Fish Shellfish Immun.*, **24**, 279-285.
- Field, A. K., A. A. Tytell, G. P. Lampson and M. R. Hilleman (1967) Inducers of interferon and host resistance, II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes. *Biochemistry-US*, **58**, 1004-1010.
- 舟橋紀男, 宮崎照雄, 小寺和郎, 窪田三朗 (1974) アユのビブリオ病の病理組織学的研究. *魚病研究*, **8**, 136-143.
- 降幡 充, 細江 昭, 武居 薫, 小原昌和, 中村 淳, 本西 晃, 吉水 守 (2003) ニジマスにおけるヘルペスウイルス病の発生. *魚病研究*, **38**, 23-25.
- Gerwick, L., W. S. Reynolds, C. J. Bayne (2000) A precerebellin-like protein is part of the acute phase response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Dev. Comp. Immunol.*, **24**, 597-607.
- Gerwick, L., G. Corley-Smith, C. J. Bayne (2007) Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish Shellfish Immun.*, **22**, 157-171.
- Ghisaura, S., R. Anedda, D. Pagnozzi, G. Biosa, S. Spada, E. Bonaglini, R. Cappuccinelli, T. Roggio, S. Uzzau and M. F. Addis (2014) Impact of three commercial feed formulations on farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) metabolism as inferred from liver and blood serum proteomics. *Proteome Sci.*, **12**, 44-61.
- Gralnick, H. R., L. L. Shott, R. P. Zendzian and E. Homan (1972) Hemostatic Toxicity of Poly I-C. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **22**, 146-149.
- Grunert, T., N. R. Leitner, M. Marchetti-Deschmann, I. Miller, B. Wallner, M.

- Radwan, C. Vogl, T. Kolbe, D. Kratky, M. Gemeiner, G. Allmaier, M. Müller and B. Strobl (2011) comparative proteome analysis links tyrosine kinase 2 (Tyk2) to the regulation of cellular glucose and lipid metabolism in response to poly(I:C). *J. Proteomics*, **74**, 2866-2880.
- Hada, H., T. Shiraki, M. Watanabe-Matsui, K. Igarashi (2014) Hemopexin-dependent heme uptake via endocytosis regulates the Bach1 transcription repressor and heme oxygenase gene activation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1840**, 2351-2360.
- 畑井喜司雄, 江草周三, 高橋 誓, 大江孝二 (1977) 真菌性肉芽腫症起病真菌に関する研究—I. 病アユからの真菌の分離およびその病原性. *魚病研究*, **12**, 129-133.
- Hoover-Plow, J., E. Hart, Y. Gong, A. Shchurin and T. Shneeman (2009) A physiological function for apolipoprotein (a): a natural regulator of the inflammatory response. *Exp. Biol. Med.*, **234**, 28-34.
- Horecker, B. L., Tsolas, O. & Lai, C. Y. (1975). The Enzymes, edited by P. D. Boyer, Vol. 7, pp. 213-258. New York, London: Academic Press.
- Ichinohe, T., I. Watanabe, S. Ito, H. Fujii, M. Moriyama, S. Tamura, H. Takahashi, H. Sawa, J. Chiba, T. Kurata, T. Sata and H. Hasegawa (2005) Synthetic Double-Stranded RNA Poly(I:C) Combined with Mucosal Vaccine Protects against Influenza Virus Infection. *J. Virol.*, **79**, 2910-2919.
- Ichinohe, T., A. Aina, Y. Ami, N. Nagata, N. Iwata, A. Kawaguchi, Y. Suzuki, T. Odagiri, M. Tashiro, H. Takahashi, D. R. Strayer, W. A. Carter, J. Chiba, S. Tamura, T. Sata, T. Kurata and H. Hasegawa (2010) Intranasal Administration of Adjuvant-Combined Vaccine Protects Monkeys From Challenge With the Highly Pathogenic Influenza A H5N1 Virus. *J. Med. Virol.*, **82**, 1754-1761.
- 池田弥生, 尾崎久雄, 早山萬彦, 池田静徳, 見奈美輝彦 (1976) ノカルジア菌を接種したハマチの血液成分に関する診断学的研究. *B. JPN. Soc. Sci. Fish.*, **42**, 1055-1064.

- 池田弥生, 見奈美輝彦 (1982) ブリの連鎖球菌症における血液性状. *B. JPN. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 1383-1388.
- 井上 潔, 山野恵祐, 前野幸男, 中島員洋, 松岡 学, 和田有二, 反町 稔 (1992) 養殖マダイのイリドウイルス感染症. *魚病研究*, **27**, 19-27.
- 石岡宏子 (1984) 麻酔および取り扱いストレス時の血液性状変化. *南西水研報*, **16**, 53-62.
- 岩田勝哉 (1998) 魚類の窒素代謝. *比較生理学総説*, **15**, 184-192.
- 井澤修平, 城月健太郎, 菅谷 渚, 小川奈美子, 鈴木克彦, 野村 忍 (2007) 唾液を用いたストレス評価 –採取及び測定手順と各唾液中物質の特徴–. *日本補完代替医療学会誌*, **4**, 91-101.
- Jensen, I., A. Albuquerque, A. Sommer and B. Robertsen (2002) Effect of poly I:C on the expression of Mx proteins and resistance against infection by infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immun.*, **13**, 311-326.
- 界外 昇, 宮崎照雄 (1985) ヒラメの白点病の病理組織像. *魚病研究*, **20**, 61-64.
- 界外 昇, 宮崎照雄, 窪田三朗 (1984) ブリ稚魚変形症の原因菌および病理組織. *魚病研究*, **19**, 173-179.
- Kanai, M., A. Raz and D. S. Goodman (1968) Retinol-Binding Protein: the Transport Protein for Vitamin A in Human Plasma. *J. Clin. Invest.*, **47**, 2025-2044.
- Kato, H., O. Takeuchi, E. Mikamo-Satoh, R. Hirai, T. Kawai, K. Matsushita, A. Hiiragi, T. S. Dermody, T. Fujita and S. Akira (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid – inducible gene-I and melanoma differentiation – associated gene 5. *J. Exp Med.*, **205**, 1601-1610.
- Kim, H. J., N. Oseko, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2009) Protection of rainbow trout from infectious hematopoietic necrosis (IHN) by injection of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) or Poly(I:C). *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 105-113.
- 木村喬久, 栗倉輝彦 (1977) わが国で初めて見出された養殖サケ科魚類の細菌性腎臓病

- (Bacterial Kidney Disease) について. *B. JPN. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 143-150.
- Kimura, T. and M. Yoshimizu (1991) Viral diseases of fish in Japan. *Annu. Rev. of fish Dis.*, **1**, 67-82.
- Ko, J., H. Jin, A. Asano, A. Takada, A. Ninomiya, H. Kida, H. Hokiya, M. Ohara, M. Tsuzuki, M. Nishibori, M. Mizutani and T. Watanabe (2002) Polymorphisms and the Differential Antiviral Activity of the Chicken *Mx* Gene. *Genome Res.*, **12**, 595-601.
- Kumagai, A., K. Takahashi and H. Fukuda (1994) Epizootics Caused by Salmonid Herpesvirus Type 2 Infection in Maricultured Coho Salmon. *Fish Pathol.*, **29**, 127-134.
- Lampson, G.P. , A.K. Field, A.A. Tytell, M.M. Nemes and M.R. Hilleman (1970) Relationship of molecular size of rIn:rCn (poly I:C) to induction of interferon and host resistance. *P. Soc. Exp. Biol. Med.*, **135**, 911-916
- Leong, J.C., G. D. Trobridge, C. H. Y. Kim, M. Johnson and B. Simon (1998) Interferon-inducible Mx proteins in fish. *Immunol. Rev.*, **166**, 349-363.
- Lindenmann, J. (1962) Resistance of mice to mouse-adapted Influenza A virus. *Virology*, **16**, 203-204.
- Liu, P., Y. Du, L. Meng, X. Li and Y. Liu (2017) Proteomic analysis in kidneys of Atlantic salmon infected with *Aeromonas salmonicida* by iTRAQ. *Dev. Comp. Immunol.*, **72**, 140-153.
- Lockhart, K., S. K. Gahlawat, D. Soto-Mosquera, T. J. Bowden, A.E. Ellis (2004) IPNV carrier Atlantic salmon growers do not express Mx mRNA and poly I:C-induced Mx response does not cure the carrier state. *Fish Shellfish Immun.*, **17**, 347-352.
- Long, M., J. Zhao, T. Lia, C. Tafalla, Q. Zhang, X. Wang, X. Gong, Z. Shen and A. Li (2015) Transcriptomic and proteomic analyses of splenic immune mechanisms of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) infected by *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida*. *J. Proteomics*, **122**, 41-54.

- Low, C-F., M. N. Shamsudin, H-Y. Chee, M. Aliyu-Paiko and E. S. Idrus (2014) Putative apolipoprotein A-I, natural killer cell enhancement factor and lysozyme g are involved in the early immune response of brown-marbled grouper, *Epinephelus fuscoguttatus*, Forskal, to *Vibrio alginolyticus*. *J. Fish Dis.*, **37**, 693-701.
- Machida, H., A. Kuninaka and H. Yoshino (1976) Relationship between the Molecular Size of Poly I • Poly C and Its Biological Activity. *J. Microbiol.*, **20**, 71-76.
- Magnadóttir, M., H. Jónsdóttir, S. Helgason, B. Björnsson, T. Ø. Jørgensen and L. Pilström (1999) Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) II. The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comp. Biochem. Phys. B.*, **122**, 181-188.
- Marcos-López, M., H. D. Rodger, I. O'Connor, M. Braceland, R. J. S. Burchmor, P. D. Eckersall, E. MacCarthy (2017) A proteomic approach to assess the host response in gills of farmed Atlantic salmon *Salmo salar* L. affected by amoebic gill disease., *Aquaculture*, **470**, 1-10.
- Martin, S. A. M., O. Vilhelmsson, F. Médale, P. Watt, S. Kaushik, D. F. Houlihan (2003) Proteomic sensitivity to dietary manipulations in rainbow trout. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1651**, 17-29.
- 松井崇憲, 呉 明柱, 西澤豊彦 (2012) Poly(I:C) のヒラメに対する毒性. *魚病研究*, **47**, 104-106.
- Matsumoto, M., M. Tatematsu, F. Nishikawa, M. Azuma, N. Ishii, A. Morii-Sakai, H. Shime and T. Seya (2015) Defined TLR3-specific adjuvant that induces NK and CTL activation without significant cytokine production in vivo. *Nat. Commun.*, **6**, 6280-6292.
- Matsumoto, M. and T. Seya (2008) TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **60**, 805-812.
- McBeath, A. J. A., M. Snow, C. J. Secombe, A. E. Ellis and B. Collet

- (2007) Expression kinetics of interferon and interferon-induced genes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following infection with infectious pancreatic necrosis virus and infectious salmon anaemia virus. *Fish Shellfish Immun.*, **22**, 230-241.
- Mian, M. F., A. N. Ahmed, M. Rad, A. Babaian, D. Bowdish and A. A. Ashkar (2013) Length of dsRNA (poly I:C) drives distinct innate immune responses, depending on the cell type. *J. Leukocyte Biol.*, **94**, 1025-1036.
- Minárik, P., N. Tomášková, M. Kollárová, M. Antalík (2002) Malate dehydrogenases--structure and function. *Gen. Physiol. Biophys.*, **21**, 257-265.
- 三角一浩, 新里 健, 青木 修, 瀬戸山健太郎, 三浦直樹, 柳田宏一, 坂本 紘 (2001) 肉用牛の輸送ストレスに対する削蹄の効果. *日獣会誌*, **54**, 837-840.
- 宮崎照雄, 江草周三 (1976) ニホンウナギ *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究-I. 自然感染-化膿性造血組織炎型. *魚病研究*, **11**, 33-43.
- 三輪 理, 井上 潔 (1999) 日本沿岸で発生している貧血を特徴とするヒラメの疾病の病理組織学的研究. *魚病研究*, **34**, 113-119.
- Mock, D. M. (2001) "Biotin in Handbook of Vitamins". Ed by Rucker R. B., pp. 397-426, Marcel Dekker, New York, NY (USA).
- Morahan, P. S., A. E. Munson, W. Regelson, S. L. Commerford and L. D. Hamilton (1972) Antiviral Activity and Side Effects of Polyribonucleosinic-Cytidylic Acid Complexes as Affected by Molecular Size. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**, 842-846.
- Muroga, K. (2001) Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture*, **202**, 23-44.
- 桃山和夫, 平岡三登里, 中野平二, 河邊 博, 井上 潔, 大迫典久 (1994) 1993年に西日本で発生した養殖クルマエビの大量死: 病理組織観察. *魚病研究*, **29**, 141-148.
- Nakano, T., E. Yamamura, H. Fujita, T. Sone and K. Asano (2018) Novel methods for

- nucleotide length control in double-stranded polyinosinic-polycytidylic acid production using uneven length components. *Biosci. Biotech. Bioch.*, **82**, 1347-1359.
- Nishizawa, T., S. Kinoshita, W.-S. Kim, S. Higashi and M. Yoshimizu (2006) Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Dis. Aquat. Org.*, **71**, 267-272.
- Nishizawa, T., I. Takami, Y. Kokawa and M. Yoshimizu (2009) Fish immunization using a synthetic double-stranded RNA Poly(I:C), an interferon inducer, offers protection against RGNNV, a fish nodavirus. *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 115-122.
- Nishizawa, T., I. Takami, M. Yang, M-J. Oh (2011) Live vaccine of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) for Japanese flounder at fish rearing temperature of 21 °C instead of Poly(I:C) administration. *Vaccine*, **29**, 8397-8404.
- 農林水産省 (2018) 水産用医薬品の使用について. 第 31 報, pp. 19-24.
- Nuez-Ortín, W. G., C. G. Carter, P. D. Nichols, I. R. Cooke and R. Wilson (2018) Liver proteome response of pre-harvest Atlantic salmon following exposure to elevated temperature. *BMC Genomics*, **19**, 133-146.
- Nygaard, R., S. Husgard, A. Sommer, J. C. Leong and B. Robertsen (2000) Induction of Mx protein by interferon and double-stranded RNA in salmonid cells. *Fish Shellfish Immun.*, **10**, 435-450.
- Ochi, M., H. Ohdan, H. Mitsuta, T. Onoe, D. Tokita, H. Hara, K. Ishiyama, W. Zhou, Y. Tanaka and T. Asahara (2004) Liver NK Cells Expressing TRAIL Are Toxic Against Self Hepatocytes in Mice. *Hepatology*, **39**, 1321-1331.
- Olesen, N. J. and P. E. V. Jørgensen (1986) Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout *Salmo gairdneri* under various environmental conditions. *Dis. Aquat. Org.*, **1**, 183-189.
- Panase, P., S. Saenphet, K. Saenphet (2018) Biochemical and physiological

- responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Lin subjected to cold shock of water temperature. *Aquaculture Reports*, **11**, 17-23.
- Park, J. H. and S. Baron (1968) Herpetic Keratoconjunctivitis: Therapy with Synthetic Double-Stranded RNA. *Science*, **162**, 811-813.
- Peres, H., S. Santos and A. Oliva-Teles (2013) Selected plasma biochemistry parameters in gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. *J. Appl. Ichthyol.*, **29**, 630-636.
- Phillips, B. M., R. E. Hartnagel, P. J. Kraus, R. P. Tamayo, E. H. Fonseca and R. L. Kowalski (1971) Systemic Toxicity of Polyinosinic Acid: Polycytidylic Acid in Rodents and Dogs. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **18**, 220-230.
- Phoolcharoen, W., J. M. Dye, J. Kilbourne, K. Piensook, W. D. Pratt, C. J. Arntzen, Q. Chen, H. S. Mason and M. M. Herbst-Kralovetza (2011) A nonreplicating subunit vaccine protects mice against lethal Ebola virus challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20695-20700.
- Plant, K. P., H. Harbottle, R. L. Thune (2005) Poly I:C induces an antiviral state against Ictalurid Herpesvirus 1 and Mx1 transcription in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Dev. Comp. Immunol.*, **29**, 627-635.
- Pottinger, T. G., T. A. Moran and J. A. Morgan (1994) Primary and secondary indices of stress in the progeny of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) selected for high and low responsiveness to stress. *J. Fish Biol.*, **44**, 149-163.
- Purcell, M. K., G. Kurath, K. A. Garver, R. P. Herwig, J. R. Winton (2004) Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination. *Fish Shellfish Immun.*, **17**, 447-462.
- Ræder, I. L. U., S. M. Paulsen, A. O. Smalås and N. P. Willassen (2007) Effect of fish skin mucus on the soluble proteome of *Vibrio salmonicida* analysed by 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Microb. Pathogenesis*, **42**, 36-45.

- Ramaswamy, S. G. and W. Jakoby (1987) (2')3',5'-Bisphosphate Nucleotidase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10044-10047.
- Rao, P. V., X. Lu, M. Standley, P. Pattee, G. Neelima, G. Girish, K. V. Dakshinamurthy, C. T. Roberts and S. R. Nagalla (2007) Proteomic identification of urinary biomarkers of diabetic nephropathy. *Diabetes care*, **3**, 30-39.
- Reid, A., K. M. Young, J. S. Lumsden (2011) Rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* ladderlectin, but not intelectin, binds viral hemorrhagic septicemia virus IVb. *Dis. Aquat. Org.*, **95**, 137-143.
- Richmond, J. Y. and L. D. Hamilton (1969) Foot-and-mouth disease virus inhibition induced in mice by synthetic double-stranded RNA (polyriboinosinic and polyribocytidylic acids). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 81-86.
- Rifkind, J. M., J. G. Mohanty and E. Nagababu (2015) The pathophysiology of extracellular hemoglobin associated with enhanced oxidative reactions. *Frontiers in Physiology*, **5**, 1-7.
- Robertsen, B., V. Bergan, T. Røkenes, R. Larsen, A. Albuquerque (2003) Atlantic salmon interferon genes: cloning, sequence analysis, expression, and biological activity. *J. Interf. Cytok. Res.*, **23**, 601-612.
- Roncarati, A., P. Melotti, A. Dees, O. Mordenti and L. Angellotti (2006) Welfare status of cultured seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) and seabream (*Sparus aurata* L.) assessed by blood parameters and tissue characteristics. *J. Appl. Ichthyol.*, **22**, 225-234.
- Russell, S., K. M. Young, M. Smith, M. A. Hayes, J. S. Lumsden (2008) Identification, cloning and tissue localization of a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intelectin-like protein that binds bacteria and chitin. *Fish Shellfish Immun.*, **25**, 91-105.
- Sahu, A. and J. D. Lambris (2001) Structure and biology of complement protein C3, a connecting link between innate and acquired immunity. *Immunol. Rev.*,

180, 35-48.

- Saint-Jean, S. R. and S. I. Pérez-Prieto (2007) Effects of salmonid fish viruses on Mx gene expression and resistance to single or dual viral infections. *Fish Shellfish Immun.*, **23**, 390-400.
- 酒井正博 (2001) 実用化に向けた新しい免疫賦活物質の研究 (特集 病気に負けない魚づくり (上) 抗病性を高める免疫賦活物質) . *養殖*, **38**, pp. 70-72.
- Salinas, I., K. Lockhart, T. J. Bowden, B. Collet, C. J. Secombes, A. E. Ellis (2004) An assessment of immunostimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. *Fish Shellfish Immun.*, **17**, 159-170.
- Sánchez, C., M. Babin, J. Tomillo, F. M. Ubeira and J. Domínguez (1993) Quantification of low levels of rainbow trout immunoglobulin by enzyme immunoassay using two monoclonal antibodies. *Vet. Immunol. Immunop.*, **36**, 65-74.
- Sano, T., H. Fukuda and M. Furukawa (1985) Herpesvirus cyprinid: Biological and oncogenic properties. *Fish Pathol.*, **20**, 381-388.
- Saray, P., S. Roytrakul, T. Pangeson, A. Phetrungnapha (2018) Comparative proteomic analysis of hepatopancreas in *Macrobrachium rosenbergii* responded to Poly (I:C). *Fish Shellfish Immun.*, **75**, 164-171.
- Sassa, S. (2006) Biological implications of heme metabolism. *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **38**, 138-155.
- Scapigliati, G., F. Chausson, E. L. Cooper, D. Scalia and M. Mazzini (1997) Qualitative and quantitative analysis of serum immunoglobulins of four Antarctic fish species. *Polar Biol.*, **18**, 209-213.
- Steel, D. M. and A. S. Whitehead (1994) The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol. Today*, **15**, 81-88.
- Steel, L. F., D. Shumpert, M. Trotter, S. H. Seeholzer A. A. Evans, W. T. London, R.

- Dwek, T. M. Block (2003) A strategy for the comparative analysis of serum proteomes for the discovery of biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Proteomics*, **3**, 601-609.
- Steelman, A. J. and J. Li (2011) Poly(I:C) promotes TNF α /TNFR1-dependent oligodendrocyte death in mixed glial cultures. *J. Neuroinflamm.*, **8**, 89-102.
- Stewartii, W. E. and E. DeClercq (1974) Relationship of cytotoxicity and interferon-inducing activity of polyribonucleosinic acid. Polyribocytidylic acid to the molecular weights of the homopolymers. *J. Gen. Virol.*, **23**, 83-89.
- Sudheesh, P. S., B. R. LaFrentz, D. R. Call, W. F. Siems, S. E. LaPatra, G. D. Wiens, K. D. Cain (2007) Identification of potential vaccine target antigens by immunoproteomic analysis of a virulent and a non-virulent strain of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Dis. Aquat. Org.*, **74**, 37-47.
- Sun, C. and S. Zhang (2015) Immune-Relevant and Antioxidant Activities of Vitellogenin and Yolk Proteins in Fish. *Nutrients*, **7**, 8818-8829.
- Suzuki, Y. A., K. Shin and B. Lönnnerdal (2001) Molecular cloning and functional expression of a human intestinal lactoferrin receptor. *Biochemistry*, **40**, 15771-15779.
- Tacchi, L., R. Musharrafieh, E. T. Larragoite, K. Crossey, E. B. Erhardt, S. A.M. Martin, S. E. LaPatra and I. Salinas (2014) Nasal immunity is an ancient arm of the mucosal immune system of vertebrates. *Nat. Commun.*, **5**, 5205-5215.
- 高橋幸則, 伊丹利明, 近藤昌和 (2001) 免疫賦活物質の基礎知識 (特集 病気に負けない魚づくり (上) 抗病性を高める免疫賦活物質) . *養殖*, **38**, pp. 60-63.
- Takami, I., S. Kwon, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2010) Protection of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* from viral hemorrhagic septicemia (VHS) by Poly(I:C) immunization. *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 109-115.
- 滝川 一, 恩地森一, 高森頼雪, 村田洋介, 谷口英明, 伊藤 正, 渡辺真彰, 綾田 穰,

- 前田直人, 野本 実, 村田浩之, 大森 茂, 久持顕子, 炭田知宜 (2005) DDW-J 2004 ワークショップ薬物性肝障害診断基準の提案. *肝臓*, **46**, 85-90.
- Thanasaksiri, K., N. Sakai, H. Yamashita, I. Hirono and H. Kondo (2014) Influence of temperature on Mx gene expression profiles and the protection of sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus*, against red-spotted grouper nervous necrosis virus (RGNNV) infection after poly (I:C) injection. *Fish Shellfish Immun.*, **40**, 441-445.
- Tort, L. (2011) Stress and immune modulation in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, **35**, 1366-1375.
- Uchida, D., H. Hirose, P. K. Chang, F. Aranishi, E. Hirayabu, N. Mano, T. Mitsuya, S. B. Prayitno, M. Natori (2000) Characterization of Japanese eel immunoglobulin M and its level in serum. *Comp. Biochem. Phys. B.*, **127**, 525-532.
- Verrier, E. R., C. Langevin, A. Benmansour and P. Boudinot (2011) Early antiviral response and virus-induced genes in fish. *Dev. Comp. Immunol.*, **35**, 1204-1214.
- Vilain, C., M. Wetzel, L. Du Pasquier and J. Charlemagne (1984) Structural and functional analysis of spontaneous anti-nitrophenyl antibodies in three cyprinid fish species: carp (*Cyprinus carpio*), goldfish (*Carassius auratus*) and tench (*Tinca tinca*). *Dev. Comp. Immunol.*, **8**, 611-622.
- Villarroel, F., A. Bastías, A. Casado, R. Amthauer, M. I. Concha (2007) Apolipoprotein A-I, an antimicrobial protein in *Oncorhynchus mykiss*: Evaluation of its expression in primary defence barriers and plasma levels in sick and healthy fish. *Fish Shellfish Immun.*, **23**, 197-209.
- Wu, Y., S. Wang and X. Peng (2004) Serum acute phase response (APR) –related proteome of loach to trauma. *Fish Shellfish Immun.*, **16**, 381-389.
- 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.

- 若林久嗣 (2002) 魚類の感染症－我が国の現状と課題－. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **68**, 815-824.
- 渡邊敏明 (1996) ビオチン: ビタミンの辞典, p. 299-323. 朝倉書店, 東京.
- Yano, A., B. Nicol, E. Jouanno, E. Quillet, A. Fostier, R. Guyomard and Y. Guiguen (2013) The sexually dimorphic on the Y-chromosome gene (sdY) is a conserved male-specific Y-chromosome sequence in many salmonids. *Evol. Appl.*, **6**, 486-496.
- Yasutale, W. T., T. J. Parisot and G. W. Klontz (1965) Virus diseases of the salmonidae in western united states. II. Aspects of pathogenesis. *Ann. NY Acad. Sci.*, **126**, 520-530.
- Yasutake, W. T. and D. F. Amend (1972) Some aspects of pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis (IHN). *J. Fish Biol.*, **4**, 261-264.
- Yasutake, W. T. (1978) Histopathology of yearling sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) infected with infectious hematopoietic necrosis (IHN). *Fish Pathol.*, **14**, 59-64.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004) The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.*, **5**, 730-737.
- Yoshimizu, M. (1996) Disease problems of salmonid fish in Japan caused by international trade. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **15**, 533-549.
- 吉水 守, 笠井久会 (2007) 魚類ウイルスとその疾病防除対策. *日本動物用医薬品協会会報*, **27**, 1-17.
- Yoshimizu, M. (2009) Control Strategy for Viral Diseases of Salmonid Fish, Flounders and Shrimp at Hatchery and Seed Production Facility in Japan. *Fish Pathol.*, **44**, 9-13.
- Yue, X., P. Huan, Y. Hu and B. Liu (2018) Integrated transcriptomic and proteomic analyses reveal potential mechanisms linking thermal stress and

depressed disease resistance in the turbot *Scophthalmus maximus*. *Sci. Rep.*, **8**, 1896-1908.

Zelevnick, L. D. and B. K. Bhuyan (1969) Treatment of Leukemic (L-1210) Mice with Double-Stranded Polyribonucleotides. *Exp. Biol. Med.*, **130**, 126-128.

Zhou, Y., M. Guo, X. Wang, J. Li, Y. Wang, L. Ye, M. Dai, L. Zhou, Y. Persidsky and W. Ho (2013) TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. *Innate Immun.*, **19**, 184-192.