

(成果の概要)

1. 研究の背景

ヒラメは我が国の主要な養殖魚ですが、魚病による被害率(=被害額/生産額)が推定 13~31% (2004-2008 年)と極めて高く、養殖経営を圧迫しています。さらに、消費者の間では食品への安心・安全への関心が高まっており、抗菌性物質等の薬剤に依存しない養殖生産が期待されています。魚病による被害を軽減し、薬剤の使用を減少させるには、日頃から養殖魚の健康状態を把握し、早期に魚病対策を講じることが必要です。養殖魚の健康診断及び魚病の早期診断技術を確立することが生産者から強く求められています。

2. 研究の内容

- (1) 従来の魚病診断では、魚から腎臓や脾臓などの臓器を取りだし、その中に含まれると予想される病原体を寒天培地などを用いて 24 時間以上培養した上で、病原体を特定するための検査を行ない、感染の有無を判断する必要がありました。独立行政法人水産総合研究センター、大分県農林水産研究指導センター、日本獣医生命科学大学の研究グループは、魚を生かしたまま採集した微量の血液を用い、短時間で魚病診断を行える新たな診断技術を開発しました。
- (2) 着目したのは、血液中の種々のタンパク質です。私たち人間と同じように、魚も病原体に感染すると、それらに対抗するために特異的なタンパク質を生成します。これらのタンパク質の有無や量の変化を検出することで、より早期に病原体の感染を知ることができます。今回、本研究グループはヒラメの感染状態を検出する健康管理用解析チップの開発を行ないました。このチップは「抗体チップ」、「プロテインチップ」と呼ばれるもので、医学分野では研究が進んでいますが、養殖魚の魚病診断への応用は初めての試みです。
- (3) 「抗体チップ」はスライドガラス状の基盤の上に、ヒラメの血液中に放出されたタンパク質に特異的に結合する抗体(ガンマ・グロブリン)を並べたものです。ヒラメから採取した血液を専用の試薬とともに抗体チップと反応させて、蛍光スキャナーという機器で読み取ります(図1)。各抗体の発色パターンから、特異的なタンパク質の量の変動が検出され、「ウイルス感染」あるいは「細菌感染」が起きているかを診断できるとともに感染の進行度合も推測できます(図2)。
- (4) 「プロテインチップ」は小さなリトマス試験紙状のシートで、その上には、病原体の数種のタンパク質が並べられており、ヒラメの血液中の各病原体に対する抗体を検出することができます(図3)。つまり、ヒラメが感染した病気の種類を判定することができます。ヒラメから採取した血液を専用の試薬とともにプロテインチップと反応させると、感染した病気の種類に応じてチップが発色します。今回開発されたプロテインチップでは、ヒラメに大きな被害を及ぼすエドワジエラ症、レンサ球菌症と VHS ウイルス症を検出することができます。図4のように、エドワジエラ症に感染させたヒラメでは左側に、レンサ球菌症に感染させたヒラメでは右側に発色が現れて、それぞれの病気が正しく診断されました。

### 3. 今回の成果の意義及び今後の展望

少量の血液をチップに反応させることで、養殖魚の病気感染の兆候や病原体の感染履歴を短時間で診断することが可能になりました。これにより、養殖場で大きな被害を引き起こしている魚病の早期発見が可能となり、病気の蔓延防止、被害軽減への効果が期待されます。今後、この診断技術を簡略化し、現場で利用できる簡易ツールに改良していく予定です。そして、私たちが健康診断を受けるように、血液検査により養殖魚の健康管理を行うシステムづくりの第一歩にしたいと考えています。

#### (用語の解説)

【チップ】本文中で用いられているチップとは、ガラス、プラスチックやナイロン膜などの素材でできている小さな基盤の上に、たくさんの種類の検出用分子を規則正しく貼り付けたものです。検出用分子としてDNAを用いた場合にはDNAチップ、タンパク質を用いた場合にはプロテインチップ、抗体を用いた場合には抗体チップと呼ばれます。これらのチップを使用すると、多数の種類の分子を同時に測定することが可能です。

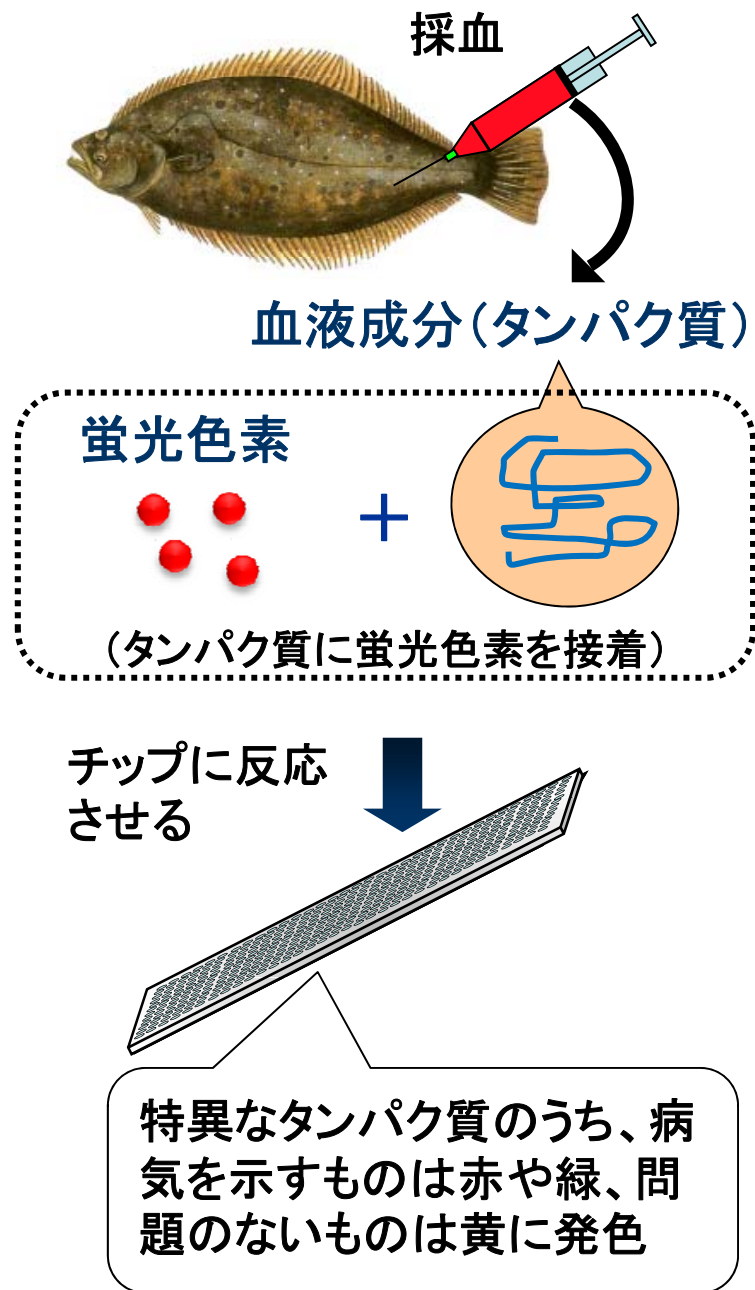
【抗体】脊椎動物の主に血液中に存在し、自分の体には元々存在しない特定のタンパク質（抗原）に結合します。例えば、体内に侵入してきた細菌・ウイルスなどの病原体は抗原であり、抗体はこれらの病原体に結合して、病原体の分解を促します。本文中の「抗体チップ」では、ヒラメの各種のタンパク質に対して結合できるマウス由来の抗体が多数貼り付けられていて、ヒラメの特定のタンパク質が結合した場合には、貼り付けられている抗体の色が変化します。また、「プロテインチップ」には、いろいろな病原体のタンパク質が貼り付けられており、調べるヒラメがその病原体に感染して抗体ができている場合には、貼り付けられているタンパク質の色が変化します。

【エドワジエラ症】細菌 *Edwardsiella tarda* による病気で、ヒラメ養殖で発生する魚病の中で最大の被害をもたらすものであり、稚魚・成魚を問わず周年発生が見られます。ヒラメ以外にも、マダイ、ウナギ、テラピアなどの多くの魚種に感染します。

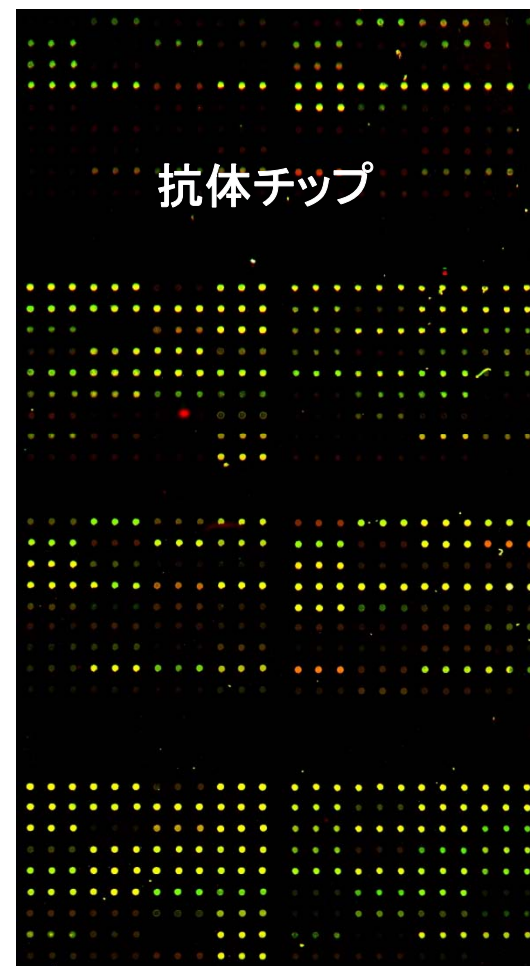
【レンサ球菌症】細菌病の一種で、ヒラメでは *Streptococcus iniae* あるいは *Streptococcus parauberis*、が主な病原体です。高水温期に多く、ヒラメ養殖ではエドワジエラ症に次いで大きな被害をもたらしています。

【VHS ウイルス症（ウイルス性出血性敗血症）】ラブドウイルスの一種であるVHSVによる病気で、稚魚・成魚を問わず低水温期に発生し、多くの場合に慢性的な死亡をもたらします。ヒラメのウイルス病の中で、最も大きな被害をもたらす病気です。

# 図1 抗体チップでの検出法



# 図2 抗体チップの反応例



抗体チップの解析: チップ上の各スポットの発色のパターンにより、ヒラメの状態(感染の有無や感染度合など)が判定できる。

図3 プロテインチップでの検出法

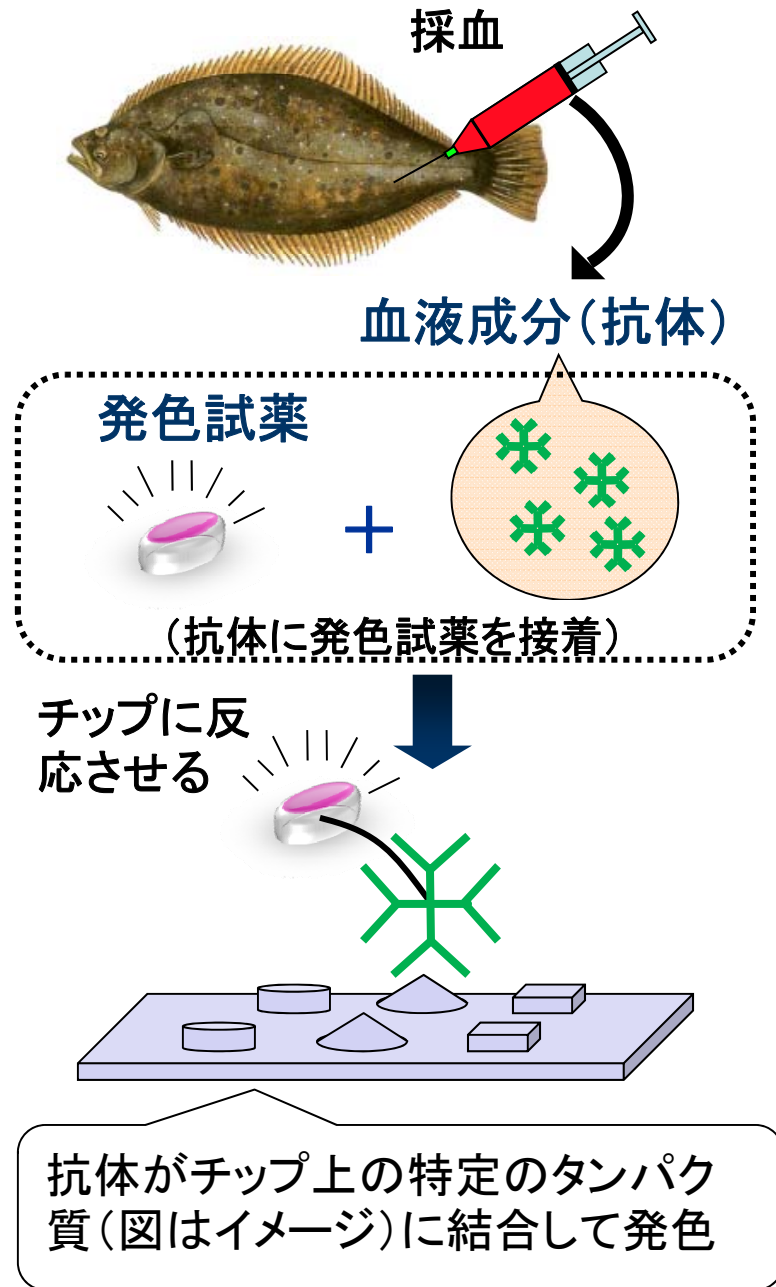
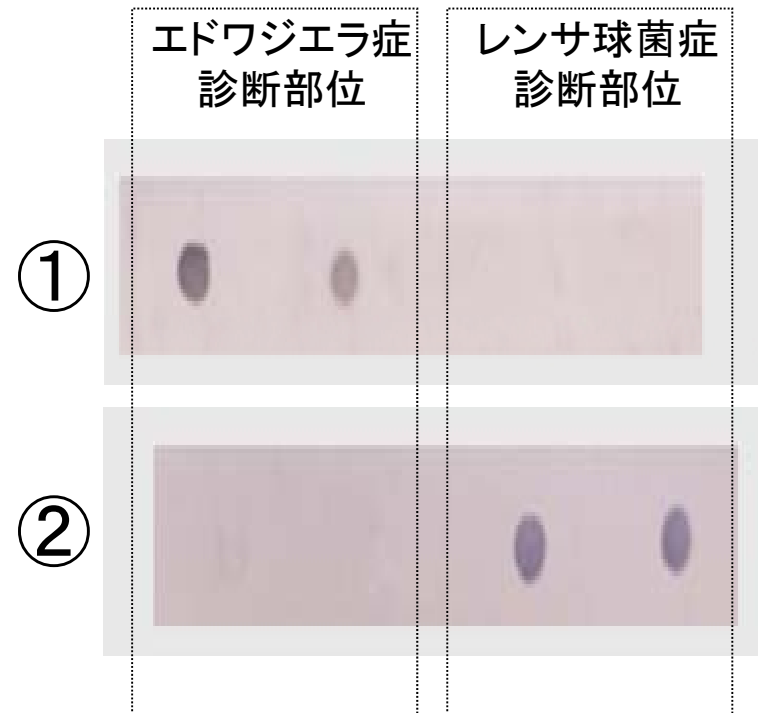


図4 プロテインチップによる診断例



①: エドワジエラ症に感染したヒラメの血液を反応させたチップ

②: レンサ球菌症に感染したヒラメの血液を反応させたチップ