
クルマエビ血球が産生するフリーラジカルに
関する基礎的研究

16580155

平成 16 年度～平成 17 年度科学研究補助金
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成 17 年 3 月

研究代表者 伊丹利明
宮崎大学 農学部 教授

<はしがき>

クルマエビの急性ウイルス血症(PAV)をはじめとする新興感染症は、国内外のエビ養殖産業に多大な被害を与え、多くの経営体を休業や廃業に追い込んだ。たとえば、日本のクルマエビ生産においては、昭和 63 年にピークとなり年間約 3,000 トンの生産をあげたが、PAV の発生した平成 8 年には約 1,500 トンと生産量は半減した。その後、生産量は若干回復したものの、2,000 トンにとどまっている。また、日本は世界でも有数のエビ輸入国であり、世界の養殖エビ生産の約 1/3 にあたる約 25 万トンを中心に東南アジアから輸入している。しかし、生産国での疾病多発による過剰投薬が原因して、輸入エビからの抗生物質が検出されたことが大きく報道されるなど、養殖エビ類の食の安全性確保が緊急の課題となっている。

このような新興感染症の蔓延の原因の 1 つに、養殖環境の悪化とそれに伴うエビの感染防御能力の低下が考えられる。これらを改善するために養殖環境の改善への取り組みや抗生物質を使わないで免疫賦活剤などによる防御能力の向上させる試みがいくつか行われている。このような試みも、実験室内では効果が見られるが、実際の養殖現場では結果が一定しないなど多くの問題点を抱えている。この原因の 1 つに、エビ類の健康指標となる客観的な測定方法がないことがあげられる。我々は、クルマエビの生体防御能の指標として、血球の貪食活性、フェノールオキシダーゼ活性および血球の走化性について報告した。しかし、これらの活性は直接的な殺菌活性や殺ウイルス活性を表すものではなく、間接的な傍証に過ぎない。そこで、本研究においてはより直接的な殺滅効果をもつフリーラジカルに焦点を当てて、その検出方法、産生条件、生体内での動態などを明らかにして、生体防御能力の評価に応用しようとするものである。本報告書は、平成 16 年度および 17 年度の成果をまとめたものである。

研究組織

研究代表者:伊丹利明 (宮崎大学 農学部 教授)

研究分担者:吉田照豊 (宮崎大学 農学部 助教授)

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年度	1,700,000	0	1,700,000
平成 17 年度	1,700,000	0	1,700,000
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究発表

(1) 学会誌等

1. Itami, T., Mekata, T., Maeda, M., Yoshida, T. Detection of superoxide and nitric oxide in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* hemocytes. UPV Journal of Natural Sciences, 10(1), 135-144, 2005.
2. Maeda, M., Kusumoto, K., Mizuki, E., Itami, T., Ohba, M. Long-term maintenance of primary ovarian cultures from the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Fish Pathology, 40(4), 187-190, 2005.
3. Maeda, M., Mizuki, E., Itami, T., Ohba, M. Replication of white spot syndrome virus in ovarian primary cultures from the kuruma shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. Journal of Virological Methods, 116(1), 89-94, 2004.

(2) 口頭発表

1. Itami, T., Mekata, T., Maeda, M., Yoshida, T. Novel detection methods of superoxide and nitric oxide in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* hemocytes. 7th Asian Fisheries Forum 04, Penang, Malaysia, Nov. 30-Dec. 4, 2004
2. Itami, T., Mekata, T., Maeda, M., Yoshida, T. Detection of superoxide and nitric oxide in kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus* hemocytes. 6th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture, Colombo, Sri Lanka, Oct. 25-28, 2005
3. Itami, T., Yoshida, T., Mekata, T., Hirono, I., Aoki, T. The biodefense system and its activation with immunostimulants for the control of disease in shrimp. International Symposium on Nutrition & Feeding in Fish 2004, Phuket, Thailand, May, 3-6, 2004.

(3) 出版物

1. 伊丹利明, 永井 毅, 藤本岩夫「エビ養殖読本」, 水産社(東京), 276 頁 2004 年

研究の目的

クルマエビの生体防御因子を明らかにするために、直接的に殺菌作用および殺ウイルス効果をもつフリーラジカルの検出方法を確立することを目的とした。具体的には、検出細胞培養系の確立とフリーラジカルの検出試薬の検討に始まり、免疫賦活剤投与による生体防御機能亢進時、ストレス負荷時およびウイルス感染時におけるフリーラジカルの動態を把握する。さらに、一酸化窒素に着目して、一酸化窒素合成酵素の遺伝子の探索を目的とした。

研究成果概要

1. フリーラジカルの検出に必要な、クルマエビの初代培養細胞系を卵巣細胞の上皮細胞から確立した。この細胞系の利点は、一度に大量の細胞を入手できることから、実験系が均一となり、安定した結果が得られるようになった。
2. フリーラジカルの検出用試薬としては、従来用いられていたNBTやGriess法では正確には検出できないことが明らかとなった。
3. 一酸化窒素検出にはDAF-2、スーパーオキシド検出にはCLAおよびヒドロキシラジカル検出にはAPFが適していることが明らかとなった。
4. 刺激剤としては、PMA、LPSおよびインターフェロンが有効であることが明らかとなった。
5. 一酸化窒素は、刺激直後にも微量は産生されるが、刺激後 16 時間でも産生が誘導されることが明らかとなった。
6. ストレスやウイルス感染によって、フリーラジカルの産生性が抑制されることが明らかとなった。
7. 免疫賦活剤の投与によるフリーラジカル産生性の変化は顕著ではなかったことから、免疫賦活剤による影響は少ないものと考えられた。
8. 一酸化窒素産生酵素遺伝子を degenerate primer 法を用いて、検出することができた。現在、全塩基配列について調査中である。