Poly(I:C) のヒラメに対する毒性

松井崇憲・呉 明柱・西澤豊彦*

(2012年4月25日受付)

Toxicity of Poly(I:C) against Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*

Takanori Matsui, Myung-Joo Oh
and Toyohiko Nishizawa*Department of Aqualife Medicine, Chonnam National
University, Yeosu 550-749, Republic of Korea

(Received April 25, 2012)

ABSTRACT—We evaluated the effect of rearing temperature (13 and 17°C) on the toxicity of Poly(I:C) against Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (mean BW 8.2 g). In the fish reared at 17°C, we observed signs of toxicity such as redness or ulceration of the skin around the inoculation site or death in 41.7%, 16.7%, 16.7% and 0% of the fish injected with 800, 400, 200 and 100 µg Poly(I:C)/fish, respectively. In the fish reared at 13°C, we observed signs of toxicity in 83.3%, 75.0%, 25.0% and 33.3% of the fish that were injected with 800, 400, 200 and 100 µg Poly(I:C)/fish, respectively. Our results suggest that the toxicity of Poly(I:C) is higher in Japanese flounder reared at 13°C than in those reared at 17°C.

Key words: VHSV, live vaccine, toxicity, Poly(I:C), *Paralichthys olivaceus*, Japanese flounder

ウイルス性出血性敗血症 (viral hemorrhagic septicemia: VHS) は、本来ニジマスの病気として欧州では古くから知られていたが、1999年に日本沿岸の天然ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) から VHSV が分離されて以来^{1,2)}、日本および韓国におけるヒラメの養殖産業に甚大な被害をもたらしている^{3,4)}。VHSV は、ラブドウイルス科のノビラブドウイルス属に属するウイルスで、日本および韓国の VHSV 株は何れもゲノグループ IVa に分類され、欧米株とは若干異なると考えられている⁵⁻⁷⁾。これまでに VHS 対策の一つとして、フォルマリン不活化ワクチン、サブユニットワクチンおよび DNA ワクチン等、様々なワクチンが研究・開発されてきた⁸⁻¹¹⁾。近年、インター

フェロン誘導物質である合成 2 本鎖 RNA [polyinosinic-polycytidylic acid, Poly(I:C)] を投与することでヒラメを抗ウイルス状態とし、この間に VHSV を接種することで、魚を殺すことなしに VHSV に対する特異免疫を誘導する、いわゆる Poly(I:C)-免疫法の有効性が報告された¹²⁾。本免疫法は、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) の伝染性造血器壊死症 (infectious hematopoietic necrosis, IHN) およびマハタ (*Epinephelus septemfasciatus*) のウイルス性神経壊死症 (viral nervous necrosis, VNN) でも有効であることが報告されている¹³⁻¹⁵⁾。Poly(I:C) をヒトに投与すると、腎不全や過敏症などの副作用が認められるが¹⁶⁾、魚類での副作用についてはほとんど報告されていなかった。ヒラメの VHS における Poly(I:C)-免疫法の適温は 17°C であるが、13°C では Poly(I:C) 投与による毒性が若干ではあるが認められることが報告された¹⁷⁾。ヒラメの VHS は、春先の低水温期に発生する病気であることから、将来的に低水温期に VHSV を用いた Poly(I:C)-免疫法を実施する可能性が十分に考えられる。そこで本研究では、13°C および 17°C で飼育したヒラメに 100~800 µg の Poly(I:C) を投与し、その毒性について検討した。

供試魚として、Chonnam National University 水産研究所で飼育されていた平均体重 8.2 g のヒラメ計 120 尾を用いた。計 10 個の 4 L 水槽を準備し、5 個の水槽の飼育水温を 13°C に、残る 5 個の飼育水温を 17°C に設定後、各水槽にヒラメを 12 尾ずつ収容し、12 日間馴致させた。馴致後、Poly(I:C) (Sigma) を滅菌 DEPC 処理水に溶解し、800, 400, 200 および 100 µg/100 µL/fish となるよう筋肉内に接種した。なお、実験対照区のヒラメには、DEPC 処理水を 100 µL/fish となるよう筋肉内に接種した。Poly(I:C) 接種後、10 日間各水温で飼育し、死亡率の推移ならびにヒラメの外観上の変化を観察した。

ヒラメを 17°C で飼育し、Poly(I:C) を 800 µg/fish 接種した区では、接種後 2 日目に 1 尾死亡したのみであった (累積死亡率 8.3%, Fig. 1-A)。また、Poly(I:C) を 800, 400 および 200 µg/fish 接種した区では、各々 4 尾 (33.3%), 2 尾 (16.7%) および 2 尾 (16.7%) に、接種部位付近の皮膚が赤く変色し、やがて潰瘍が形成され、最終的には筋肉が露出するという外観上の変化が観察された (Figs. 1-B, 2)。この外観上の変化は、接種後 2~5 日目から観察され、皮膚の損傷が軽度の場合には試験期間内に回復するものもあったが、多くの個体では回復せず、筋肉が露出したままであった。なお、100 µg/fish 接種した区では死亡ならびに外観上の変化は認められなかった。

一方、13°C で飼育したヒラメに Poly(I:C) を 800 および 400 µg/fish 接種した区では、接種翌日から死亡が始まり、試験終了時の死亡率は 66.7% および 41.7% であった (Fig. 1-C)。また、Poly(I:C) を 200 µg/fish 接種した区

全南大学校 水産生命医学科

* Corresponding author

E-mail: jjnishi@chonnam.ac.kr

Fig. 1. Toxicity of Poly(I:C) against Japanese flounder reared at 17°C and 13°C. A) and C) mortality curves of fish, B) and D) total rates of lethal, redness of skin or ulceration in the skin around the inoculation site, A) and B) fish reared at 17°C, C) and D) fish at 13°C.

では、接種後2日目に1尾が、また100 µg/fish接種した区では接種後2日目および5日目に1尾ずつ計2尾が死亡し、各区の累積死亡率は各々8.3%および16.7%であった (Fig. 1-C)。また、800, 200 および 100 µg/fish 接種区の16.7%で、また400 µg/fish接種区の33.3%で、皮膚の赤変および潰瘍形成などの毒性が認められた (Fig. 1-D)。

なお、DEPC処理水を接種した実験対照区においては、飼育水温が17°Cおよび13°Cの何れの区においても死亡ならびに外観上の変化は認められなかった (Fig. 1)。

以上の結果をまとめると、17°C飼育区では、800 µg/fish接種区の1尾以外で致死毒性は認められなかったが、≥200 µg/fish接種区で16.7%~33.3%の魚に皮膚の変色あるいは潰瘍形成などの毒性が認められた。これに対し13°C飼育区では、800 µg/fish区で83.3%、100 µg/fish区でも33.3%の魚で致死毒性、皮膚の変色あ

るいは潰瘍形成が認められた。即ち、13°C飼育におけるPoly(I:C)のヒラメに対する毒性は17°C飼育に比べ大幅に高いことが示された。合成RNAであるPoly(I:C)は、魚体内のRNaseにより速やかに分解されるため、高温飼育での毒性が相対的に低いことは容易に推察されるが、わずか4°Cの違いでPoly(I:C)の毒性にこれ程の差異が認められたことは興味深い結果である。Nishizawa *et al.*¹⁷⁾は、13°Cで飼育したヒラメに200 µg/fishのPoly(I:C)を接種した場合、一部の魚で致死毒性が認められることを指摘した。本実験結果は、これを改めて裏付ける結果である。ヒラメでは、17°CでPoly(I:C)-免疫法を実施することで、最も高い予防効果が誘導されることが報告されている¹⁷⁾。また、ヒラメでは、Poly(I:C)を12.5 µg/fish接種することで90%の魚が、また25 µg/fish接種することで100%の魚が抗ウイルス状態になることから¹²⁾、Poly(I:C)による毒性を考慮する必要性はない

Fig. 2. Photographs of redness of skin and ulceration in the skin around the inoculation site with Poly(I:C). A) redness of skin and B) ulceration in the skin around the inoculation site.

と考えられる。しかしながら、ヒラメのVHSは、春先の低水温期に発症する病気であり、冬場の低水温期にPoly (I:C)-免疫法を実施する際には、Poly(I:C)による毒性に注意を払う必要があるかもしれない。

謝 辞

This study was supported by the Technology Development Program for Fisheries (No. 110091-3) supported by the Ministry for Food, Agriculture, Forestry, and Fisheries, Republic of Korea.

文 献

- 1) Takano, R., T. Nishizawa, M. Arimoto and K. Muroga (2000): *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **20**, 186–192.
- 2) Takano, R., K. Mori, T. Nishizawa, M. Arimoto and K. Muroga (2001): *Fish Pathol.*, **36**, 153–160.
- 3) Isshiki, T., T. Nishizawa, T. Kobayashi, T. Nagano and T. Miyazaki (2001): *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 87–99.
- 4) Kim, W. S., S. R. Kim, D. Kim, J. O. Kim, M. A. Park, S. Kitamura, H. Y. Kim, D. H. Kim, H. J. Han, S. J. Jung and M. J. Oh (2009): *Aquaculture*, **296**, 165–168.
- 5) Nishizawa, T., H. Iida, R. Takano, T. Isshiki, K. Nakajima and K. Muroga (2002): *Dis. Aquat. Org.*, **48**, 143–148.
- 6) Elsayed, E., M. Faisal, M. Thomas, G. Whelan, W. Batts and J. Winton (2006): *J. Fish Dis.*, **29**, 611–619.
- 7) Kim, W. S., S. J. Jung, J. O. Kim, D. W. Kim, J. H. Kim and M. J. Oh (2011): *J. Fish Pathol.*, **24**, 1–9.
- 8) Lorenzen, N. and N. J. Olesen (1997): *Developments in Biological standardization Fish Vaccinology*, vol. 90. Basel: Karger, pp. 201–209.
- 9) Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Einer-Jensen, J. Heppell, T. Wu and H. Davis (1998): *Fish Shellfish Immunol.*, **8**, 261–270.
- 10) Lorenzen, N., E. Lorenzen, K. Einer-Jensen and S. E. LaPatra (2002): *Fish Shellfish Immunol.*, **12**, 439–453.
- 11) Heppell, J., N. Lorenzen, N. K. Armstrong, T. Wu, E. Lorenzen, K. Einer-Jensen, J. Schorr and H. L. Davis (1998): *Fish Shellfish Immunol.*, **8**, 271–286.
- 12) Takami, I., S. R. Kwon, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2010): *Dis. Aquat. Org.*, **89**, 109–115.
- 13) Kim, H. J., N. Oseko, T. Nishizawa and M. Yoshimizu (2009): *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 105–113.
- 14) Nishizawa, T., I. Takami, Y. Kokawa and M. Yoshimizu (2009): *Dis. Aquat. Org.*, **83**, 115–122.
- 15) Nishizawa, T., I. Takami, M. Yoshimizu and M. J. Oh (2011a): *Aquaculture*, **331**, 100–104.
- 16) Robinson, R. A., V. T. DeVita, H. B. Levy, S. Baron, S. P. Hubbard and A. S. Levine (1976): *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**, 599–602.
- 17) Nishizawa, T., I. Takami, M. Yang and M. J. Oh (2011b): *Vaccine*, **29**, 8397–8404.