

ゼブラフィッシュの感染症

丸山 滋

日本チャールス・リバー株式会社

要 約

ゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類は、飼育の容易さなどから、近年、実験動物として国際的に注目されてきており、多くの施設で遺伝子操作によるモデル動物の作出と、それらを使用した研究を通して創薬への活用も進められている。一方で、実験の再現性を確保するために重要な実験動物の遺伝子学的統御や微生物学的統御が確立されている国は少なく、国内においてもそれらを実施している施設がほとんどないのが現状である。小型魚類の研究利用増加に伴い国内外の施設との動物授受が今後さらに活発になることが予測され、施設間の感染性微生物伝播の懸念からも、小型魚類利用施設における微生物学的な評価・管理は重要となってきた。本稿では国外で使用され、微生物学的評価・管理の基礎が確立されつつあるゼブラフィッシュに焦点をあて、その一部を紹介する。

1. 背景

近年、生命科学の研究においてゼブラフィッシュを含む小型魚類を使用した研究が急速に増えている。その理由として、いずれも小型魚類が他の実験動物にはない特徴を有している点にあると考えられる。小型魚類は個体が小さいため限られたスペースで多数の動物を収容することができる。また、胚や幼魚が透明であるため体外から器官などの観察が可能であり、臓器の発達過程の観察、薬剤投与や核酸注入、組織標識の視覚化などが容易である。さらに、ゼブラフィッシュにおいては全ゲノムが解明されており、遺伝子操作によるモデル動物を作出するうえで大きなメリットとなっている。加えてゼブラフィッシュは卵が比較的大きく、トランスジェニック動物作出の際の鏡検下での操作が容易であることも遺伝子操作分野での活用範囲を広めたひとつである。多産であり短期間で多数の個体を確保できることも含め、実験者にとってのメリットも多く、近年、小型魚類、特にゼブラフィッシュは発生生物学、薬理学、毒性学、腫瘍学をはじめ、多くの医薬品開発過程において活用されている [2, 9, 10]。

実験の信頼性、再現性を高めるために均一で安定した品質の実験動物を多数確保することが肝要であることは、ゼブラフィッシュを使用する研究にお

いても同様である。実験に使用する個体の品質を維持するため、水温や水質など水槽環境の整備とともに、動物の健康状態を維持することが重要である。感染症は実験動物の健康状態を損なう要因の大きなひとつであり、また不顕性感染であっても実験結果に影響を与える可能性がある。マウス・ラットなど哺乳類の実験動物では、動物福祉的な面も含め、定期的な微生物モニタリングによる動物の健康状態維持という概念が定着している一方で、ゼブラフィッシュにおいては国内外を問わず微生物学的なコントロールに関する基盤が整わない現状がある。しかし近年では、米国ではゼブラフィッシュのバイオリソースセンターのひとつである ZIRC (Zebrafish International Resource Center) が既に微生物学的統御における積極的な取り組みを行っており、欧州においても FELASA (Federation for Laboratory Animal Science Associations) を中心にガイドライン作成など整備に向けての環境が整ってきている。このようなゼブラフィッシュの微生物学的統御に対する国際的な動きのなか、日本においても適切な対応をとっていくことがゼブラフィッシュ使用施設にとって重要であると考えられる。

2. 主な感染症

ゼブラフィッシュ使用施設から陽性報告の多い4項目を抜粋し以下に紹介する。なお、これら以外にも微生物モニタリング対象として欧米で実施されている微生物が多数あり、中には臨床症状を示すものも含まれている。本項の最後に微生物モニタリング対象に関する資料を記載するので、併せてご参照いただきたい。

○ *Mycobacterium* spp.

マイコバクテリウム属に属する菌種の総称。グラム陽性桿菌。ゼブラフィッシュに感受性のあるマイコバクテリウム属菌には *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. haemophilum*, *M. marinum*, *M. peregrinum* があり、いずれも非定型抗酸菌である。乾燥や消毒に抵抗性がある。ほとんどの菌種が土壌や水環境に広く分布し、実験動物施設においても一般的である。水循環が管理されたシステムを用い飼育環境が適切に維持されている場合は臨床症状を示さないが、過密飼育や水質汚染などのストレス下では顕著に症状が発現する場合があります。一般状態として斃死、衰弱、元気消失、えら周囲の充血、腹部膨満など、解剖所見として各臓器の点状壊死などの報告がある。いくつかの菌種はヒトへの伝播の報告もあり、人獣共通感染症としての管理を要する。陽性が判明している魚体への接触時は個人保護具装着が必須である。[1, 4, 11, 13]

○ *Aeromonas hydrophilia*

水環境に一般的に見られる運動性グラム陰性桿菌。ゼブラフィッシュを含む淡水魚に敗血症、腹部膨満、眼球突出、立鱗症状等を示す。これらの症状は、一般に松かさ病（立鱗病）、赤斑病、ポップアイ等の名称で知られる。魚類の常在菌であり通常は保菌していても無症状であるが、飼育環境の悪化、過密飼育等による魚体へのストレスが発症の引き金となる [5, 13]。

○ *Pseudoloma neurophilia*

微孢子虫に属する寄生虫。2001年に現在の名前がつけられた比較的新しい病原体だが、ゼブラフィッシュ飼育施設では既に一般的で、ペット用魚類にも広く見られる。中枢神経系や骨格筋等に寄生し、脊髄奇形、運動失調、成長不良、削瘦などを引き起こす。削瘦が顕著なことから「skinny disease」と呼ばれている。後述の通り卵の塩素消毒でも取り去ることができない場合もあることから、現在構築されている

クリーン化方法では、完全な排除が困難な病原体のひとつである。このため、感染が認められた施設におけるクリーン化の方法について、改めて構築の検討が進められている [7, 12, 13]。

○ *Pseudocapillaria tomentosa*

蟠虫綱の線虫に属する寄生虫。細長い紐状の虫体で、雌は大きく体長7-12 mm、雄は約半分（4-7 mm）の長さである。病原性は高く、感染魚は削瘦、元気消失に加えて体色が暗化する。腸管内に寄生し、腸炎を引き起こす。新生物の形成の原因である可能性も示唆されている。生活環が未だはっきりわかっておらず汚染源も特定できていないが、施設に混入した場合は他個体に拡がるため、貴重な系統でない限り、汚染魚は淘汰が推奨される [6, 13]。

【微生物モニタリング実施項目に関する資料】

- ・ IDEXX Laboratories: Zebrafish Health Monitoring Profiles. <http://www.idexxbioresearch.com/zebrafish-health-monitoring-profiles>
- ・ Charles River Laboratories: Zebrafish PCR. <http://www.criver.com/files/pdfs/research-models/zebrafish-pcr-panels.aspx>

3. 発生状況

ZIRCがオンライン上で紹介しているゼブラフィッシュの感染症データ [14]によると、米国において最も多く見られる感染症は *P. neurophilia* および *Mycobacterium* spp. であり、*P. tomentosa* などが続いている。米国チャールス・リバーの社内データにおける過去の微生物モニタリング結果からも *Mycobacterium* 属菌種の検出は一般的である。

残念ながら日本国内においては未だ微生物学モニタリングを行う環境が整っていない現状から、入手可能なデータが存在しない。弊社における2016年の調査では、実験用ゼブラフィッシュ供給業者由来の魚体から *P. tomentosa* が半数以上から検出された他、*M. chelonae*, *M. fortuitum*, *A. hydrophilia*, *P. neurophilia*, *P. hyphessobryconis* も検出された [8]。検出した微生物の多くは前述の通り適切な飼育管理下では不顕性に推移すること、供試対象が市販の実験用個体であることを考慮すると、日本国内でも海外同様、これらの感染症が各実験施設に拡がっている可能性が懸念される。

4. 診断方法

多くのゼブラフィッシュ感染症においてはPCRで

の検出が可能であり、短時間で多くの項目を網羅できる利点からも、PCRを活用したスクリーニングが定期的な評価方法としては有効と考えられる。個体が小さいため、全身を材料とすることにより、臓器特異性のある感染症を網羅的に確認することが可能である。魚体以外にも、水槽水やそれをろ過するためのフィルターなども有効な材料となりうる。

一方、小型魚類の実験動物としての利用の歴史は40年以上と長く、その間多くの施設で病理学的な評価が利用されてきた[11]。寄生虫においては虫体あるいは虫卵のそのものを顕微鏡下で観察が可能であり、熟練により特別な機器を必要とせずに同定可能である。また、ゼブラフィッシュは小型であり、全身をプレパラートとして観察可能であることも利点のひとつである。病理組織学的な評価も加えることで、異常が見られた個体については病態の視覚的な確認も併せて実施可能である。

細菌性の微生物においては培養法も用いられてきたが、数日の培養期間を要する菌種があることや、培地観察には熟練を要すること、使用サンプルにより細菌数が少なく検出できない場合もあること等を考慮する必要がある。菌分離により肉眼的に微生物を観察できる点や、ごく一般的な理化学機器のみで実施可能な点等から、補佐的な位置づけでの活用が有用と考える。

5. 予防

一般的に哺乳類の実験動物と同様の考え方が適用されるが、魚類独自の特性を加味する必要がある。魚類の飼育環境は水中であり、同一水系の個体は水中に排泄された同居動物の排泄物に常時さらされていることから、動物を取り巻く微生物学的な環境を考える上で、共有している水系ごとを一群として考える必要がある。

感染症の侵入を防ぐためには検疫システムを構築する必要がある。ゼブラフィッシュ飼育施設の多くは、他施設からの動物導入にあたり、導入動物を隔離飼育し、得られた卵の表面を消毒し一般飼育施設に移すことで不要な微生物の侵入を防いでいる。生体に肉眼的な異常が見られないだけで直接導入動物を飼育施設に受け入れることは、不顕性感染症の病原体を持ち込むことにつながるため避けるべきである。また、卵の消毒でも全ての感染症について排除は不可能である。卵の消毒は細菌、真菌、原虫のいずれも量を減らすことは可能であるが、一部には残存する可能性も考慮すべきである。特に *Mycobacterium* spp. および *P. neurophilia* は垂直感染、

卵内感染の報告がある[3, 7, 12]。

卵の消毒は次亜塩素酸ナトリウム水溶液による浸漬が広く利用されている。一般的に25～50ppmの溶液に5～10分浸漬する方法が活用されているが、受精後の時間経過とともに塩素耐性が変化することを利用し、より高い塩素濃度での浸漬を提案した報告もある[3]など、上述の *Mycobacterium* spp., *P. neurophilia* 等を効果的に除去するための卵の消毒方法に関する検討は現在も進められている。また、*P. neurophilia* 対策として、魚体から手術により卵を摘出し、消毒処理された精子を用いた人工受精によりフリー化した例もある。

6. おわりに

前述の通り、ひとたび感染症が発生すると、哺乳類と同様に研究への影響は甚大である。顕著な症状を呈し斃死も伴う感染症はもちろん、不顕性や日和見の感染症もまた、実験結果へのノイズとなり、当初のプロトコルにはない変更を余儀なくさせる、あるいは実験そのものを中止する事態も想定される。限られた紙面のため今回は一部の紹介に留まっているが、今後の施設管理における参考となれば幸いである。なお、日本の小型魚類に関する微生物学的統御は欧米の動向に追随しているため、本稿では欧米で一般的なゼブラフィッシュに焦点を当てた内容としたが、日本国内ではメダカが古くから使われてきた歴史から、他国と比較しメダカの使用数が非常に多い。その微生物学的統御はゼブラフィッシュと同様に初歩段階であり、種特異性の高い微生物においてはメダカ特有の感染症もあると考えられていることから、今後の課題としてメダカ特有の感染症についても特定し、その評価方法や排除方法の構築が望まれる。

参考文献

1. Astrofsky, K.M., Schrenzel, M.D., Bullis, R.A., Smolowitz, R.M., and Fox, J.G. 2000. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium* spp. infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rerio*) facilities. *Comp. Med.* 50: 666–672.
2. Driever, W., Stemple, D., Schier, A., and Solnica-Krezel, L. 1994. Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.* 10:152–159.
3. Kent, M.L., Buchner, C., Barton, C., and Tanguay, R.L. 2014. Toxicity of chlorine to zebrafish embryos. *Dis. Aquat. Organ.* 16; 107: 235–240.

4. Kent, M.L., Whipps, C.M., Matthews, J.L., Florio, D., Watral, V.G., Bishop-Stewart, J.K., Poort, M.J., and Bermudez, L. 2004. Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 138: 383–390.
5. Li, J., Ni, X.D., Liu, Y.J., and Lu, C.P. 2011. Detection of three virulence genes *alt*, *ahp* and *aerA* in *Aeromonas hydrophila* and their relationship with actual virulence to zebrafish. *J. Appl. Microbiol.* 110: 823–830.
6. Michael, L., Janell, K., Jennifer, L., and Jan, M. 2002. *Pseudocapillaria tomentosa*, a nematode pathogen, and associated neoplasms of zebrafish (*Danio rerio*) kept in research colonies. *Comp Med.* 52: 354–358.
7. Murray, K.N., Dreska, M., Nasiadka, A., Rinne, M., Matthews, J.L., Carmichael, C., Bauer, J., Varga, Z.M., and Westerfield, M. 2011. Transmission, diagnosis, and recommendations for control of *Pseudoloma neurophilia* infections in laboratory zebrafish (*Danio rerio*) facilities. *Comp. Med.* 61: 322–329.
8. Nishida, H. 2016. Zebra fish Health Monitoring. Poster at the 22nd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting.
9. Nowik, N., Podlasz, P., Jakimiuk, A., Kasica, N., Sienkiewicz, W., and Kaleczyc, J. 2015. Zebrafish: an animal model for research in veterinary medicine. *Pol. J. Vet. Sci.* 18: 663–674.
10. Postlethwait, J. and Talbot, W. 1997. Zebrafish genomics: from mutants to genes. *Trends Genet.* 13: 183–190.
11. Reed, B. and Jennings, M. 2011. Guidance on the housing and care of zebrafish (*Danio rerio*). RSPCA.
12. Sanders, J.L., Watral, V., and Kent, M.L. 2012. Microsporidiosis in zebrafish research facilities. *ILAR J.* 53: 106–113.
13. Zebrafish International Resource Center (ZIRC): Zebrafish disease manual. https://zebrafish.org/wiki/health/disease_manual/start
14. Zebrafish International Resource Center (ZIRC): ZIRC Animal Health Reports. https://zebrafish.org/wiki/health/health_reports/start