

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07561

研究課題名(和文) 冷水病原因菌の血清型を決定する遺伝子構造の解析と感染疫学マーカーの開発

研究課題名(英文) Analysis of gene structure to determine serotype of *Flavobacterium psychrophilum* and its application in the development of epidemiological marker

研究代表者

泉 庄太郎 (Izumi, Shotaro)

東海大学・海洋学部・准教授

研究者番号：90450379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：冷水病の血清型による簡便な疫学マーカーを開発するため、原因菌の血清型の決定に關与するDNA配列点変異や遺伝子構造変異を解析した。複数の変異を確認したが、各血清型に特徴的なものは見られなかった。この結果、血清型別の技術的改良と宿主特異性の確認においては期待された成果を上げることができなかった。

冷水病発生河川における疫学調査では、357株の冷水病原因菌株の分離に成功し、これらを既報の遺伝子タイプニング法で型別した。その結果、調査河川における冷水病が複数の感染源から構成されていることと出現頻度の高い遺伝子型の存在が判明した。このことにより、疫学調査としては一定の成果を上げることができた。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a simple and inexpensive epidemiological marker by serotyping for bacterial cold-water disease, DNA sequence mutations and genetic structure involved in serotype determination of *Flavobacterium psychrophilum* were analyzed. Several mutations were confirmed, but nothing characteristic for each serotype was found. Unfortunately, it was impossible to achieve the expected results in the technical improvement of serotyping and the confirmation of host specificity, in this research period.

In the epidemiological survey in the river where bacterial cold-water disease outbreaking, 357 strains of *F. psychrophilum* were successfully isolated and typed by the previously reported genotypings. As a result, bacterial cold-water diseases in this river consisted of multiple sources of infection and the existence of highly frequent genotype was found. We were able to gain the required achievement as an epidemiological survey.

研究分野：魚病学

キーワード：冷水病 血清型 疫学調査

### 1. 研究開始当初の背景

冷水病は、1940年代に北米の養殖ギンザケで初めて確認された、最も古くから知られる細菌性魚病の一つである。日本では1987年に養殖アユで初めて発生が確認され、その後、ギンザケ、ニジマス、ヤマメといったサケ科魚類、コイ、ウグイ、オイカワといったコイ科魚類にも広がりを見せた。特にアユにおいては養殖場だけでなく天然河川でもしばしば大量死を引き起こしており、発生から30年近く経った現在でも、重要な細菌性魚病である。しかし、日本においては同一河川を複数の漁業協同組合が管轄し、漁業協同組合毎に放流アユ種苗の由来が異なることも多く、さらに冷水病原因菌が極めて広い宿主範囲を持つことから、ひとつたびある河川で冷水病が発生すると、その対策を立てるために感染源や感染経路といった感染環を見極めることは非常に困難である。

そこで、申請者らは冷水病の感染環を解明するための疫学マーカーとして、吸収家兔血清を用いた血清型や、PCR-RFLP、プラスミドを用いた遺伝子型による型別法を開発した。中でもPCR-RFLPによる遺伝子型別法は、多くの研究室で必要な機器が既に揃っていることから水産増養殖の現場で広く活用されている。これは、感染環を明らかにする感染疫学研究に対する現場的ニーズが非常に高いことの表れである。しかし、遺伝子型別は簡便ではあるものの、必ずしも菌株の表現型を反映したものではなく、プラスミドを用いた遺伝子型においては培養中にプラスミドの脱落が見られるなど、再現性にも課題がある。これらの点において、血清型は宿主魚種との相関が高いこと、日本分離株にしか見られない特徴的な血清型が存在するなど地域性の検討も可能であること、さらに、再現性も高いことから、遺伝子型別に比べて血清型別によって得られる感染疫学的に重要な情報は多いといえる。それにもかかわらず血清型別が普及していない原因は、血清型判別用の抗血清キットが市販されている大腸菌等と違い、その実施の都度、吸収家兔血清の作成が必要であり、血清型別の実施には多大な時間と労力を要するからである。

H抗原である鞭毛、F抗原である繊毛、K抗原である莢膜のいずれも持たない冷水病原因菌の血清型別は、O抗原である外膜上のLPS多糖部分の違いによって決定されている。大腸菌やサルモネラ菌においては、O抗原血清型関連遺伝子群のうち、O抗原フリッパーゼやO抗原ポリメラーゼ等の遺伝子構造の違いが、血清型に関与することが既に明らかとなっている。また、このO抗原遺伝子構造の違いを基にした分子生物学的手法による血清型別法も人畜細菌感染症分野では既に実用化されている。

### 2. 研究の目的

病原細菌の血清型別は病原性の大小を推定するだけでなく、感染疫学的にも重要な情報を提供している。申請者らは、サケ科魚類やアユに甚大な被害をもたらす冷水病の原因菌(*Flavobacterium psychrophilum*)において複数の血清型を発見し、感染環を推定する感染疫学的研究を行ってきた。その過程で、血清型に宿主魚種との相関関係や地域性があることが示唆され、冷水病の感染制御においても血清型別は有用であると考えられた。しかし、血清型の判定には吸収血清の作製など、多大な時間と労力を要する。また、血清型と宿主魚種の間に見られた関係が、いわゆる宿主特異性であるとの確証は得られていない。そこで、本研究では冷水病原因菌の血清型決定遺伝子構造解析と、それによる血清型別の技術的改良、および血清型と宿主との関係解明を図る。研究成果は魚病細菌分野だけでなくCFBグループ細菌においても世界的知見となる。

### 3. 研究の方法

小課題「冷水病原因菌における血清型決定遺伝子群の遺伝子構造」

冷水病原因菌の血清型(O抗原構造)に関連する遺伝子群の遺伝子構造解析を行い、血清型を決定している遺伝子配列や塩基配列の変異等を明らかにする。

小課題「冷水病原因菌の分子生物学的手法による血清型別法の開発と宿主特異性の確認」

上の小課題「冷水病原因菌における血清型決定遺伝子群の遺伝子構造」の結果を基に、抗血清を使用せず、分子生物学的手法を利用した簡便で実用性の高い血清型別の方法を開発する。また、申請者らがこれまでに収集した多数の冷水病原因菌株に対してこの血清型別法を適用し、血清型と宿主魚種との相関関係を明らかにすることにより、冷水病原因菌株に宿主特異性が存在することを確認する。

小課題「冷水病発生河川における感染疫学調査」

本項目は、上の2つの小課題で明らかとなった、学術的・技術的成果の実証の場と位置付けられる。冷水病が頻繁に発生する河川において、放流種苗や冷水病発病魚等から収集・保存した冷水病原因菌株を、小課題「冷水病原因菌の分子生物学的手法による血清型別法の開発と宿主特異性の確認」の分子生物学的手法による血清型別法で解析し、その結果と聞き取り調査結果とを照合することにより、冷水病の感染源や感染経路を明らかにする。

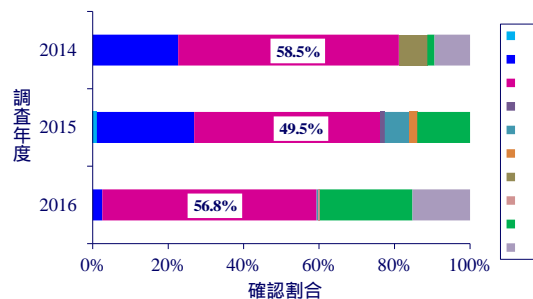
#### 4. 研究成果

小課題「血清型決定遺伝子群の遺伝子構造解析」においては、冷水病原菌のLPSコアの生合成に関わる酵素タンパク LpsA, LPS糖鎖の生合成に関わる酵素タンパク WzxE, LPS糖鎖の生合成に関わる膜タンパクであるABCトランスポーターをコードする遺伝子領域にそれぞれPCRプライマー対を設計した。これらのプライマーによって血清型が異なる複数の冷水病菌株から予想した大きさのPCR産物が得られた。さらにこれらのPCR産物から、LpsA, WzxE およびABCトランスポーター遺伝子領域の塩基配列を決定し、すべての領域において菌株間に塩基配列の変異があることを確認した。しかし、これらの塩基配列変異の中に各血清型に特徴的なものは見られなかった。次に、血清型の決定に関与している遺伝子領域の候補を Flippase 遺伝子とその上流の13遺伝子座とし、全ゲノム配列が既報の冷水病原菌CSF259-93株の当該領域約14000bpのデータを基にして20個のプライマーを設計した。これらのプライマーによる網羅的PCRによって候補領域のシクシー、欠損や挿入等の変異を確認し、必要に応じて変異部位の塩基配列を決定した。その結果、血清型不明のテンチ由来株において、ピロリン酸キナーゼ遺伝子領域を含むPCRで他株より約1200bp長いPCR産物が確認され、この領域の塩基配列を決定したところ、ピロリン酸キナーゼ遺伝子下流にトランスポザン遺伝子を含む塩基の挿入変異が見られた。しかし、この変異も各血清型に特徴的なものとはいえなかった。以上のように血清型の違いに関与している遺伝子構造の解析結果が不調であったことから、小課題「血清型別の技術的改良と宿主特異性の確認」においては期待された成果を上げることができなかった。

小課題「冷水病発生河川における感染環を解明する疫学調査」においては、調査河川である群馬県神流川の各管轄漁協の放流実績と放流後の魚類生息状況や河川環境について聞き取り調査と現地の河川調査を行った。河川で試験採捕した16魚種から冷水病原菌の分離を試みたところ、3か年で357株の冷水病原菌株の分離培養に成功し、これらを-80°Cのグリセロールストックに保存しコレクション化した。これらの冷水病原菌の菌株コレクションは小課題「血清型別の技術的改良と宿主特異性の確認」で開発された血清型別法に供する予定であったが、「血清型別の技術的改良と宿主特異性の確認」においては期待された成果を上げることができなかったことから、これらの菌株を既報のPCR-RFLPによる冷水病原菌遺伝子型タイプピング法で型別した。その結果、複数の遺伝子タイプが検出され、同河川における冷水病の流行が複数の感染源から構成される可能性が示唆された。さらに、3か年連続で出現頻度の高い遺伝子タイプを確認し、神流川に

おける冷水病の流行型が判明し、冷水病頻発河川における疫学調査として一定の成果を上げることができた。

遺伝子タイプの確認割合



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

K. Suzuki, S. Izumi, H. Tanaka, and T. Katagiri, "Identification and expression analysis of IRAK-4 cDNA and its gene from the ayu *Plecoglossus altivelis*", Fisheries Science (2016), 82(1), 47-57, 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

「神流川で発生したアユ冷水病の流行型」, 新井肇・渡辺峻・鈴木究真・泉庄太郎, 平成30年度日本水産学会春季大会

「神流川におけるアユ冷水病の伝播経路の解明」, 新井肇・渡辺峻・湯浅由美・鈴木究真・田中英樹・久下敏宏・泉庄太郎, 平成28年度日本水産学会秋季大会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

泉 庄太郎 (IZUMI, Shotaro)

東海大学・海洋学部・准教授

研究者番号: 90450379

(2)研究分担者

新井 肇 (ARAI, Hajime)

群馬県水産試験場・研究員

研究者番号: 60450384

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

鈴木 究真 (SUZUKI, Kyuma)

群馬県水産試験場・研究員

研究者番号：80450386

渡辺 峻 (WATANABE, Syun)

群馬県水産試験場・研究員

研究者番号：30739024