

令和元年9月9日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04967

研究課題名(和文)国内未侵入Perkinsus属原虫防疫のための基礎的研究

研究課題名(英文)Basic research for biosecurity against the protozoan Perkinsus species

研究代表者

良永 知義 (YOSHINAGA, TOMOYOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：20345185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：国内のアサリに寄生するPerkinsus olseniとオーストラリア産アワビ類に寄生するP. olseniを分子生物学的手法、形態学的、生化学的の比較により、アサリ由来株とアワビ由来株は、異なる起源をもつことが示唆された。また、これらの株のアサリと国内産アワビ類への感染実験により、アワビ由来株は、国内産アワビに感染し、死亡を引き起こさないが、アサリ株に比較すると、国内産アワビ類に親和性を持つことが示唆された。さらに、Perkinsus olseniの栄養体、前遊走子嚢ならびに遊走子の塩素処理と紫外線照射による殺虫条件を明らかにし、その結果に基づき、畜養場における排水の消毒法を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内のアサリとオーストラリアのアワビ類に寄生するPerkinsus olseniが、異なる集団に属しており、オーストラリアのアワビ類のP. olseniは輸入防疫の対象とする必要があることを示唆された。また、国際的にも防疫対象となっているP. olseniの全発育段階について、消毒条件を明らかにすることができた。これらの結果は、P. olseniの国際的な防疫のために必要な基本的な知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Molecular, morphological and biochemical comparisons among one strain of the protozoan Perkinsus olseni infecting Australian abalone and several strains of the same species infecting Manila clam in Japan suggest that that of Australian abalone and those of domestic Manila clam have different origins. Furthermore, the Australian strain showed higher affinity to two abalone species in Japan than the Japanese strain. The results suggest that P. olseni in Australia should be subjected to import risk management.

Parasitocidal effects of choline treatment and ultraviolet light exposure were evaluated against trophozoites, prezoosporangia and zoospores of P. olseni. Based on the evaluation, a method to treat drainage water from storage facilities of animals infected with P. olseni was proposed.

研究分野：魚病学

キーワード：Perkinsus olseni 防疫 アワビ アサリ 殺虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 国際的防疫対象種である *P. olseni* は日本のアサリ *Ruditapes philippinarum* にも広範囲に感染しており、アサリ資源の減耗要因になっていることが示唆されている。本種は宿主特異性が低く、アサリ以外ではオーストラリアのアカアワビ *Haliotis rubra* とウスヒラアワビ *H. laevigata* に対して明確な病害性が報告されている。しかし、日本のアワビ類において *P. olseni* による被害は報告されていない。このことから、オーストラリアのアワビ類寄生性 *P. olseni* はアサリ寄生性 *P. olseni* と異なる特性をもち、侵入すると我が国のアワビ類に被害を生じる可能性が疑われた。そのため、アサリに寄生する *P. olseni* とオーストラリア産 *P. olseni* について、その異同の検討、識別法の開発、さらにはオーストラリア産 *P. olseni* の国内産アワビへの病害性の検討は、喫緊の課題であった。

(2) カナダ西岸に日本から委嘱されたホタテガイ *Patinopecten yessoensis* において *P. qugwadi* 感染により、ホタテガイの大量死が発生している。稚貝の死亡率は 80% 前後にまで達している。本種については、分離培養株が樹立しておらず、その生理や生態に関する研究が全く進んでいない。平成 28 年の水産防疫関連規則の改正より日本の水産防疫対象疾病に指定されたこともあり、本種に関する知見の集積が重要な課題となっていた。

(3) 平成 28 年の水産防疫関連規則の改正により、防疫上危険な疾病に感染する可能性のある水産動物は、食用として輸入されていても蓄養場で保管される場合は輸入防疫の対象となった。しかし、排水が適切に消毒される場合は輸入防疫の対象とはならず、輸入にあたって事前許可が不要となる。しかし、*Perkinsus* 属の各発育段階についての消毒条件に関する知見は少なく、これらに対する消毒法の確立も喫緊の課題となっていた。

2. 研究の目的

(1) オーストラリア産アワビ類由来の *P. olseni* と国内産アサリ由来の *P. olseni* について、その異同を携態学的、分子生物学的に比較する。さらに、これらのアサリならびに国内産アワビ類への病害性を感染実験によって明らかにする。

(2) カナダのホタテガイに寄生する *P. qugwadi* の培養株を樹立し、これを用いて、本種の培養特性、病原性、診断法を検討する。

(3) 培養が容易で、栄養体、前遊走子、遊走子を準備しやすい *P. olseni* を *Perkinsus* 属の代表として、これらの発育段階の消毒特性を明らかにするとともに、蓄養場における排水の消毒法を提案する。

3. 研究の方法

(1) 国内産アサリより *P. olseni* を 4 株樹立し、既存の 1 株を加えて、国内産アサリ由来株 5 株と既存のオーストラリア産アワビ由来株 1 株について、rRNA 遺伝子の ITS 領域と NTS 領域の塩基配列を比較するとともに、同一培養条件 (25℃、PBM 培地) 下で培養し、経時的に観測し、シゾゴニー開始時の栄養体の大きさを比較した。また、国内アサリ由来株 3 株とオーストラリアアワビ由来株 1 株の PMB 培地内での酵素活性 (19 種) を、市販の酵素活性半定量キット (APIZYM) を使用して比較した。さらに、*P. olseni* 未感染の日本産アワビ類 (トコブシ、メガアワビ) とアサリを、*P. olseni* の国内アサリ由来株 3 株とオーストラリアアワビ由来株 1 株の遊走子に暴露して感染実験を行った。

(2) カナダ漁業・海洋省の Gary Meyer 氏の協力で、*Perkinsus qugwadi* 感染症が過去に発症した海域に、ホタテガイ種苗を垂下し、3 か年にわたって養殖試験を行った。

(3) *P. olseni* の栄養体、前遊走子囊、遊走子を、様々な濃度・時間で塩素処理を行い、あるいは様々な量の紫外線で殺虫処置を行い、その生残を検討した。なお、栄養体の生死の判断は、処理後の栄養体を感染アサリ鰓組織とともに RFTM 培地内で培養し、前遊走子囊への発達の可否で判断した。前遊走子囊の生死は、前遊走子囊を海水に移した場合の放出管の形成の可否で判断した。さらに、遊走子については、処理した遊走子の未感染アサリ種苗に対する感染の有無で判断した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子の塩基配列による比較：複数の国内アサリ由来株とオーストラリアアワビ由来株の rRNA 遺伝子の ITS 領域と NTS 領域の塩基配列を比較した。その結果、国内アサリ株の ITS 領域はすべて同一であったが、オーストラリアアワビ由来株と国内アサリ由来株の間には 2 塩基の違いが認められた。NTS 領域は、オーストラリアアワビ由来株、国内アサリ由来株ともに反復単位間に相違が認められ、その相違の度合いは、オーストラリア由来株がアサリ株に比してより大きかった。ただし、配列から推定される系統樹では国内アサリ由来株の一部がオーストラリアアワビ由来株と系統上近い位置に分類され、これらを識別する明確な違いは検出でき

なかった(図1)。栄養体の形態による比較:国内アサリ由来株5株とオーストラリアアワビ由来株について、同一培養条件下でシゾゴニー開始時の栄養体の大きさを比較した。その結果、オーストラリアアワビ由来株は国内アサリ由来株に比して $31.7 \pm 5.1 \mu\text{m}$ (平均 \pm SD)と大型であったが、国内アサリ由来株間でも $12.2 \pm 3.0 \mu\text{m} \sim 21.5 \pm 5.6 \mu\text{m}$ と変異が大きく、株間に有意差も認められた。(図2) 栄養体の培養液中の酵素活性による比較:国内アサリ由来株3株とオーストラリアアワビ由来株の栄養体を1か月程度PBM培地で培養したのち、培養液中の酵素活性を市販の酵素活性半定量キット(API ZYM)を使用して19種類の酵素の活性を比較した。その結果、オーストラリアアワビ株のみリパーゼ活性が認められなかった。日本産アワビ類、アサリへの感染実験による比較:国内アサリ株はアサリでは2週間以内に増殖が確認されたが、日本産のトコブシ、メガイアワビでは感染はしたものの虫体の増殖が見られなかった。一方、オーストラリアアワビ株は、アサリ体内では増殖するとともに、トコブシ・メガイアワビ体内でも、病害性を示すまでには至らなかったが、国内アサリ由来株に比較してトコブシ・メガイアワビ体内でも増殖する傾向を示した。国内アサリ株とオーストラリアアワビ株は共にアサリに対する病害性を持つが、後者は、日本のアワビ類に対して親和性のあるものの、強い病害性は持たないと考えられた。

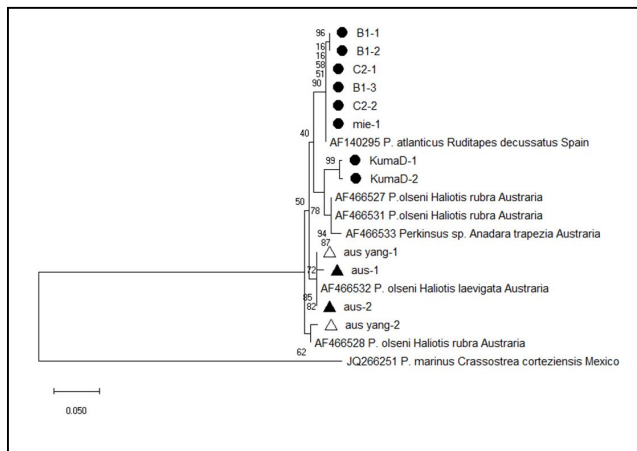


図1 P. olseni の rDNA 遺伝子 NTS 領域を使用して作成した系統樹. aus: オーストラリアアワビ株, B1: 野島 B1 株, C2: 野島 C2 株, kumaD: 熊本県株, mie: 三重県株
●: 本研究で得た国内アサリ株の配列、◻: 本研究で得たオーストラリアアワビ株の配列、◻: Yang(2016)が得たオーストラリア産の株の配列

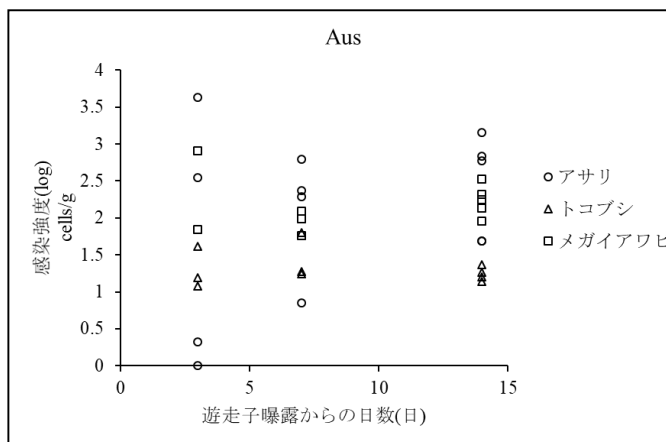


図2 . P. olseni オーストラリア由来株のアサリおよび国産アワビ類への感染実験

これらの結果から、オーストラリア産アワビ由来株は、国内アサリ由来株は同一の集団に属するのではなく、異なる起源をもつことが示唆された。オーストラリア産アワビ由来株は国内のアワビ類への病害性は明確にはできなかったが、ある程度の親和性があると推察される。以上の結果から、オーストラリア産アワビ由来株の国内アワビ類へのリスク要因になるという結果は得られなかったものの、国内株とは期限が異なることから、P. olseni は国内に分布しているものの、オーストラリア産アワビに寄生する P. olseni は輸入防疫の対象にすることが望ましいと考えられた。

(2) 発生海域に垂下したホタテガイへの感染は1,2年目は全くみられず、3年目に低レベルの感染が組織学的に認められたにとどまった。得られた感染個体が少なかったため、P. qugwadi の分離株の樹立には至らなかった。

(3) P. olseni の各発育段階の殺虫に必要な紫外線量と有効塩素濃度は、それぞれ、栄養体では $1.0 \times 10^5 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ 、3 ppm(15 分間)、前遊走子嚢では $2.0 \times 10^5 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ 、20 ppm(10 分間)、遊走子では $5.0 \times 10^3 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ 、300 ppm (10 分間)であった。塩素消毒で遊走子を殺虫するためには300 ppmの有効塩素濃度が必要であるが、このような高濃度による排水処理は蓄養場ではほぼ不可能である。また、日本の下水処理施設で使用されている塩素消毒の有効塩素量 2~4 ppm であり、下水への排水によって遊走子は無害化できない可能性が高い。中圧紫外線装置では $5.0 \times 10^5 \mu\text{Ws}/\text{cm}^2$ 程度の照射が可能である。循環式水槽を用いるなどの方法で排水量を減らしつつ、かつフィルターなどを用いて水中懸濁物を除去した後に、中圧紫外線装置による殺虫処理する方法が有効であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

安原正堯・伊藤直樹・良永知義、*Perkinsus olseni* の殺虫方法の検討、日本魚病学会、2019

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：伊藤直樹

ローマ字氏名：Naoki Itoh

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院農学生命科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：30502736

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：Gary Meyer

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。