

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07920

研究課題名(和文) エドワジエラ・イクタルリ感染症原因細菌の河川動態に関する研究

研究課題名(英文) A study on the dynamics of *Edwardsiella ictaluri* in river

研究代表者

間野 伸宏 (MANO, Nobuhiro)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10339286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Edwardsiella ictaluri (Ei) を原因菌とするエドワジエラ・イクタルリ感染症は、主にアユに病原性を示す細菌感染症である。本研究では、モデル河川において海産遡上アユのEiの保菌状況を調べた。結果として、下流域の保菌率は3月下旬～5月上旬にかけて0～10%であったのに対し、中流域では5月上旬～6月上旬にかけて20～60%であった。採捕個体の胃内容物を調べたところ、高濃度のEiが検出された珪藻類 *Melosira varians* が優占的に観察されたことから、アユは遡上中にEiを含む藻類を摂餌することで、Eiに感染しているものと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

モデル河川では、冬季から春季の中流において石面付着藻類等から高濃度の *E. ictaluri* (Ei) が検出される水域(地点)が認められた。遡上アユは、石面付着藻類を摂餌することでEiに感染しているものと推察され、アユを放流する場合は、このような水域外で実施するべきである。なお、本研究期間を通じて、3～4月に下流域において採捕された遡上アユからは、Eiは殆ど検出されなかった。近年、遡上アユを汲み上げ放流に使用する試みがあるが、本研究結果からみて、保菌リスクの低い3～4月の下流域で採捕される遡上アユを使用すべきであるといえる。

研究成果の概要(英文)：Edwardsiella ictaluri infection caused by *Edwardsiella ictaluri* (Ei) is associated with mass mortality of ayu *Plecoglossus altivelis* in Japan. In this study, we performed an epidemiological survey of Ei among riverine ayu in a model river. As a result, the detection rate at the lower-reaches was low (less than 10%) between late March and early May, while those at the middle-reaches were 20-60% between early May and early June. Since the diatom *Melosira varians* with Ei was predominantly observed in the stomach of ayu collected at the middle-reaches, it was suggested that ayu are infected with Ei by feeding on algae containing Ei.

研究分野：魚病学

キーワード：アユ *Plecoglossus altivelis* *Edwardsiella ictaluri* エドワジエラ・イクタルリ感染症 感染源
河川

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エドワジエラ・イクタルリ感染症原因細菌 *Edwardsiella ictaluri* (以後 Ei) は、温水性淡水魚に病原性を示す魚病細菌である。これまで、主に北米や東南アジアのナマズ類で被害が報告されていたが、我が国でもアユにおいて 2007 年に本症の発生が確認された。そこで、河川における *E. ictaluri* の定着状況を明らかにすることを目的として、多摩川水系を対象に疫学調査を実施した。結果として、2012 および 2013 年の夏季において、特定の支流で *E. ictaluri* に起因するアユの大量死を確認した (Takeuchi *et al.*, 2016)。両年とも大量死後、同流域では友釣りによる釣獲量が激減し、遊漁者減少に伴う被害は甚大であった。また、大量死が認められた年は必ず猛暑であり、地球の温暖化に伴い本症による被害が増加していくことが危惧された (間野ら, 2019)。更に、分離した *E. ictaluri* を用いて感染実験を行った結果、ギバチ等の希少種を含む多くの在来性淡水魚にも病原性が認められた (Takeuchi *et al.*, 2019)。これらの結果は、*E. ictaluri* がアユだけでなく河川の魚類生態系にも悪影響をもたらす可能性があることを示している。

2. 研究の目的

1. の経緯を背景に、*E. ictaluri* に特異的に感染性を有するバクテリオファージ (以後ファージ) 量を指標とした *E. ictaluri* の河川動態調査を実施した。つまり、ファージの量が多い水域ほど *E. ictaluri* も多いと仮定し、四季を通じ多摩川の全水域で採水してファージ量を求めることで、*E. ictaluri* の河川動態の推定を試みた。結果として、アユが河川に認められない 2~3 月では Ei が多摩川の下流から中流や過去アユの大量死が認められてきた支流に集約し、4 月以降、河川全体に Ei が拡散する傾向が確認された。また、多摩川 4 月以降の *E. ictaluri* の拡散とアユの遡上や放流時期が一致しており、*E. ictaluri* の河川動態にアユが関与している可能性が疑われた。そこで本研究では、*E. ictaluri* の河川における局在や動態を調べるとともに、海産遡上アユが *E. ictaluri* を保菌する時期を調べることで、河川における *E. ictaluri* のアユに対する感染過程の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) *E. ictaluri* の河川局在および動態解析

多摩川水系全域において、毎月河川水や石面付着藻類等の河川環境構成物を採取し、抽出した DNA を鋳型として、qPCR 法により各試料中の *E. ictaluri* を定量した。

(2) 河川におけるアユの動態解析

(1) で得られた河川水の抽出 DNA を用いて、アユ由来の eDNA (以後アユ eDNA) を対象とした qPCR 法 (Yamanaka and Minamoto, 2016) により、特に 3~6 月 (遡上期) におけるアユの河川動態を推定した。

(3) アユの Ei 保菌状況調査

主に 3~6 月にかけて下流および中流域で採捕したアユを対象として、平板培養法や増菌培養法の組み合わせ (Takeuchi *et al.*, 2016) により *E. ictaluri* の保菌検査を実施した。また同時期に多摩川水系に放流されたアユの種苗についても同検査を実施した。なお、採捕アユについては、側線横列鱗数や耳石の形態観察により人工種苗との識別を行った。

4. 研究成果

(1) *E. ictaluri* の河川局在および動態

河川水中の *E. ictaluri* の qPCR 結果を図 1 に示した。*E. ictaluri* は 4~5 月では下流~中流域を中心に検出され、支流の一部水域においても検出された。6 月に入ると検出範囲は拡大し、検出量も増加傾向を示した。8 月では検出地点が河川全域に拡大し、特に支流において検出量が著しく増加した。9~11 月になると検出量は中~上流域および支流域において減少傾向を示した。

上記調査と平行して、qPCR 法により石面付着藻類中に含まれる *E. ictaluri* を定量した。結果として、石面付着藻類の *E. ictaluri* の変動は河川水と同様の傾向を示し、3~4 月にかけては下流~中流の一部水域でのみ検出された。

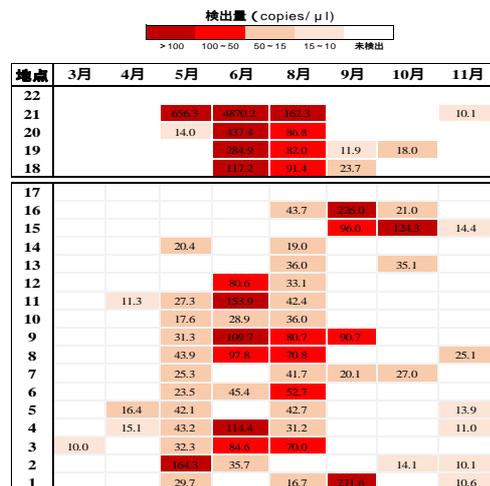


図 1 河川水中における *E. ictaluri* の qPCR 結果。

(2) 河川におけるアユの動態

アユ eDNA は 4 月中旬に下流域で検出され、その後経時的に検出地点数は増加し、5 月下旬には河川全域で検出された。なお、9~11 月までは河川全域で検出されたが、12 月に入ると地点数

は大幅に減少し、1月は下流域の2地点のみであった。

なお、下流域で算出したアユ eDNA と下流域に設置されていた定置網で採捕された遡上アユの採捕量と比較したところ、正の相関 ($r=0.723$: CORREL 関数) が認められた。また、*E. ictaluri* のコピー数との相関性を遡上期と降下期に分けて解析したところ、アユ eDNA は遡上期においてのみ、*E. ictaluri* のコピー数と正の相関 ($r=0.435$) がみられた。

(3) アユの *E. ictaluri* 保菌状況調査

2018年の下流および中流域で採捕したアユにおける *E. ictaluri* の保菌率を図2に示した。3~6月にかけて下流および中流域で採捕したアユの保菌検査を実施した結果、下流域では3月にイレギュラーの陽性個体が確認されたものを除き、6月になるまで陽性個体は確認されなかった。一方で、中流域では5月上旬より検査した全ての臓器から *E. ictaluri* が検出され、6月に入ると陽性率が急激に増加した。

検査に使用したアユについては側線横列鱗数や耳石形態に基づく由来判別を実施し、大部分の個体が天然魚(海産遡上魚)であると判断した。PCR産物についてはDNAシーケンス解析を実施し、*E. ictaluri* の登録配列と100%一致することを確認した。上記水域に放流された人工種苗由来のアユにおける保菌検査では陽性個体は確認されなかった。なお、本調査期間中の夏季においてアユの大量死が認められたが、これはエロモナス症原因菌細菌 *Aeromonas veronii* に起因する細菌感染症であり、Eiと混合感染を生じている個体も確認された(Takeuchi *et al.*, 2018)。

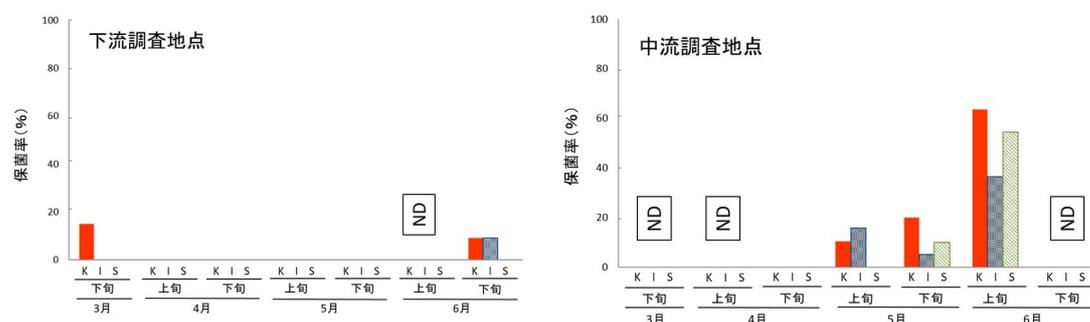


図2 2018年における下流(左)および中流(右)で採捕されたアユの *E. ictaluri* の保菌率。

ND: 未検査(アユが採捕できなかったため) K: 腎臓 I: 腸管 S: 脾臓

(4) 総括

採捕個体の胃内容物を調べたところ、*E. ictaluri* が検出された石面付着藻類(珪藻類: *Melosira varians*) が優占的に観察されたことから、アユは遡上中に Ei を含む藻類を摂餌することで、*E. ictaluri* に感染しているものと推察された。本研究の結果は、アユが下流から中流域にかけて遡上している間に *E. ictaluri* が局在している石面付着藻類を摂餌することで、*E. ictaluri* に感染・保菌していることを示している。

< 引用文献 >

- Takeuchi H. *et al.*, Infection Status of Ayu and Other Wild Fish with *Flavobacterium psychrophilum* and *Edwardsiella ictaluri* in the Tama River, Japan. *Fish Pathology*, 51, 2016, 184-193.
- Yamanaka H. and Minamoto T., The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*, 62, 2016, 147-153.
- Takeuchi H. *et al.*, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* associated with mortality of riverine ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish Pathology*, 53, 2018, 86-89.
- Takeuchi H. *et al.*, Evaluation of Pathogenicity of *Edwardsiella ictaluri* to riverine fish species using an immersion method. *Fish Pathology*, 54, 2019, 61-63.
- 間野伸宏・竹内久登・難波亜紀, 魚類防疫技術書 河川におけるアユのエドワジエラ・イクタルリ感染症, 公益社団法人日本水産資源保護協会, 2019, 1-21.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hisato Takeuchi, Aki Namba, Kazutomo Hori, Shosaku Kashiwada, Nobuhiro Mano	4. 巻 53
2. 論文標題 Aeromonas veronii biovar sobria associated with mortality of riverine ayu Plecoglossus altivelis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 86-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3147/jsfp.53.86	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hisato Takeuchi, Daiki Nakano, Mayu Iwadare, Ryuji Tomono, Toshihiro Imai, Kazutomo Hori, Hiroaki Izumi, Aki Namba, Sonoko Shimizu, Toshihiro Nakai, Nobuhiro Mano	4. 巻 54
2. 論文標題 Evaluation of Pathogenicity of Edwardsiella ictaluri to riverine fish species using an immersion method.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 61-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3147/jsfp.54.61	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 K. Hori, H. Takeuchi, T. Imai, D. Inoue, M. Sawazaki, T. Takase, S Tuzi, H. Yamanaka, N. Mano
2. 発表標題 Estimation of Seasonal migration in riverine ayu Plecoglossus altivelis using environmental DNA (eDNA)
3. 学会等名 Aquaculture europe 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 間野伸宏・竹内久登・堀一智・宇部匠海・西川湧馬・前里馨・尾川美和 難波亜紀・中井敏博・高瀬智洋
2. 発表標題 海産遡上アユを対象としたエドワジエラ・イクタルリ感染症原因菌 Edwardsiella ictaluri の保菌状況および保菌源に関する研究
3. 学会等名 令和2年日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 間野伸宏・竹内久登・難波亜紀	4. 発行年 2019年
2. 出版社 公益社団法人日本水産資源保護協会	5. 総ページ数 21
3. 書名 魚類防疫技術書 河川におけるアユのエドワジエラ・イクタルリ感染症	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山中 裕樹 (YAMANAKA Hi roki) (60455227)	龍谷大学・理工学部・講師 (34316)	
研究 分担者	難波 亜紀 (NAMBA Aki) (20445737)	日本大学・生物資源科学部・研究員 (32665)	