

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03058

研究課題名（和文）ホタテガイのフランシセラ感染症の総合的対策にむけた基盤的研究

研究課題名（英文）Studies on comprehensive control of francisellosis in Yesso scallops

研究代表者

伊藤 直樹（Itoh, Naoki）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・准教授

研究者番号：30502736

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）：ホタテガイの主要生産地である北海道南部において、ホタテガイの致死性細菌感染症であるフランシセラ症の発生状況を調査し、海域や年度によって発生状況が異なること、さらに広範囲の養殖場で本症が発生しているを明らかにした。感染実験において急激な水温上昇は感染個体の死亡のトリガーになることが示唆されたが、振動の影響は認められなかった。養殖種苗とする稚貝の場合、中間育成手法は本症の発生に影響をもたらすことも示され、特に飼育密度を早期に下げるとは本症の改善に結びつくと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ホタテガイは我が国で重要な水産物であるが、その持続的な生産の脅威となるフランシセラ感染症に関する知見は少なく、問題解決が進んでいなかった。本研究により、本症の発生は漁場環境や生産手法の影響を強く受けることが示唆され、問題解決に向けた調査研究の方向性が示されたことは産業的に意義があると言える。また原因細菌の感染に加えて、宿主であるホタテガイの生理条件が本症の発生と深く関与していること、特に、良好な条件で飼育されているホタテガイ稚貝では原因細菌をある程度排除できることも示された。この結果から、不明な点が多い二枚貝の生体防御と感染症に関する研究の方向性が示唆されたことは、学術的な意義が大きい。

研究成果の概要（英文）：In the southern part of Hokkaido, a major production area for scallops, the occurrence of a fatal bacterial infection francisellosis of scallops was investigated. It was revealed that the occurrence of the disease varies depending on culture area and year, and that the disease occurs in a wide range in Hokkaido area. Infection experiments suggested that rapid increases in water temperature can trigger the death of infected individuals, but no impact of vibration was observed. In the case of seed scallops used for aquaculture, it was also shown that the intermediate rearing method can influence the occurrence of this disease, and it was believed that reducing the rearing density at an early stage would contribute to the improvement of the disease.

研究分野：魚病学

キーワード：二枚貝 感染症 養殖 疫学 感染実験 細菌 防疫

1. 研究開始当初の背景

国内のホタテガイは養殖と漁獲により生産されるが、その総生産額は1000億円を超える。また輸出金額も水産物では最大の591億円(2015年)を誇り、国内水産業を牽引する最重要水産物である。しかし、2016年頃より北海道内浦湾(噴火湾)でホタテガイの大量死が顕在化、地域経済への影響が懸念されている。ホタテガイの大量死については環境要因によるものが知られていたが、近年、申請者らによって細菌 *Francisella haliotcida* による感染症が関与する可能性が示唆された。本症はホタテガイのほか、ムラサキイガイやアワビ類にも病原性を示すことが報告されており、他の有用貝類への影響も懸念されるため、対策研究はホタテガイ産業のみならず、水産学的に喫緊の課題である。

F. haliotcida (以降、Fh)によるホタテガイのフランシセラ症はカナダの養殖ホタテガイから報告され(Meyer et al., 2017)、その後、申請者らが国内での発生を確認(Kawahara et al. 2018)、さらに、その被害性は感染実験で実証された(Kawahara et al. 2019)。一方、疾病対策に必要な基盤情報は、疫学情報等マクロな情報も、病原体の性状、疾病発症機序などのミクロな情報も依然として乏しい。また養殖用種苗として使用する稚貝の供給はホタテガイ生産に不可欠でありながら、稚貝に対するFhの影響も明らかにされていない。

2. 研究の目的

獲得免疫能がない軟体動物の場合、脊椎動物の感染症対策に用いられるワクチン開発は不可能である、また、天然の植物プランクトンを餌としている二枚貝では、生産時の化学療法も不可能である。そのため本病への対策は病原体の拡散防止ならびに病原体が存在する中での養殖技術の改良と育種による耐病性品種作出によらざるを得ない。そこで、本研究では拡散防止ならびに養殖技術改良のために必要となるフランシセラ感染症に関する基礎的知見の集積を目指した。

3. 研究の方法

(1) ホタテガイ成貝を対象としたフランシセラ感染症疫学調査

北海道南部海域に位置するA養殖場とB養殖場で本養成するホタテガイ成貝を対象とし、A養殖場については2020年度から2021年度、B養殖場については2020年度から2022年度の期間、フランシセラ感染症の疫学調査を実施した。毎月、養殖用ロープ1本を取り上げ、当該ロープで飼育するホタテガイの生残率を計測、その後、ランダムに選んだ30個体について、フランシセラ感染症でしばしば見られる閉殻筋部の膿瘍形成の有無を観察し、その後、閉殻筋部におけるFhの保菌率をPCR法で調査した。なお、サンプル採取時には環境データ(水温、塩分、クロロフィル量)の測定も行い、漁場環境とフランシセラ発症との関係についても検討した。

また、2022年に北海道東部海域で生産されたホタテガイの閉殻筋に膿瘍状の構造が見られるという情報が得られたため、当該サンプルを取り寄せ、Fhの診断も実施した。

(2) 中間育成中の養殖用種苗・稚貝におけるフランシセラ感染症の疫学調査

自然界で発生したホタテガイ稚貝は7月頃に網目状のコレクターで回収され、8月ごろから中間育成施設のカゴに収容され、本養成を開始する翌年の3月末まで飼育される。そこで、この中間育成中の稚貝におけるFhの影響について、北海道南部海域に位置するA養殖場で中間育成する稚貝を毎月採取し、稚貝の生残率とFhの感染率を調査した。また、稚貝の大量死亡時によく見られることが報告されている貝殻の外部異常(変形・欠刻)についても合わせて調査した。本調査は2020年から2021年に実施した。

るB海域では夏頃に時折高いFh感染率が認められ、2021年には3月時点で40%を超える死亡も認められた(図1)。地理的に離れたA養殖場とB養殖場での様相の違いから、漁場によってFhの流行状態やそれに伴って発生する死亡状況は異なることが示唆された。今後は、両漁場におけるFhの流行状態と漁場環境を精査することで、フランシセラ感染症に及ぼす環境の影響を評価することが求められる。

また、2022年に調査対象海域ではない北海道東部海域で生産されたホタテガイについて、膿瘍部位を調べたところ、Fhが検出された。このことから、フランシセラ感染症は北海道のホタテガイ養殖場に広まっていると考えられた。

(2) 中間育成中の養殖用種苗・稚貝におけるフランシセラ感染症の疫学調査

上述したように、A養殖場で生産する成貝では2020年以降、ホタテガイの顕著な大量死は起きておらず、Fhの検出率も低かった。2020年および2021年に稚貝を対象とした調査でも生残率は高く推移し、Fh保有率と貝殻変形率も低く推移した(図2)。このことから、A養殖場ではフランシセラ感染症が調査期間にはほぼ発生していなかったと考えられた。このような年による発生の変動は、漁場環境の変化によるものである可能性が考えられる一方で、実際に生産されている稚貝を採取した調査であるため、近年の生産量激減を受けて生産者が生産手法を変え、その結果、状況が改善された可能性も否めない。

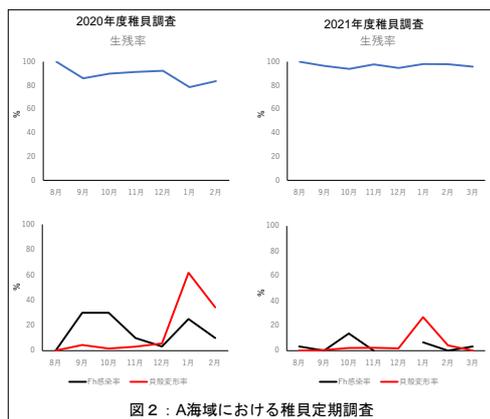


図2: A海域における稚貝定期調査

(3) 中間育成条件とフランシセラ感染症との関係

2020年度に実施した実験では、仮分散密度が高く、さらに本分散を10月に実施した実験区では、実験終了時である3月には累積死亡率が顕著に高くなることがわかった(図3)。また、この条件では、Fh感染率と貝殻変形率も当該実験区では高く、殻長も小さかった(図3)。そのため、9月から10月の期間に本分散することなく高密度で飼育された稚貝はFhに罹りやすくなり、その結果、死亡と貝殻の変形、さらには成長の低下が起こると考えられた。なお、2021年度も同様の実験を実施したところ、2020年度ほど明確ではなかったものの、仮分散密度が高く、さらに本分散時期が10月と遅い実験区では高い死亡率が認められている。

この現象の詳細を探るため、2021年度には仮分散密度は高いが本分散作業時期を9月と10月と変えた実験区を設け、9月から3月まで定期的にモニタリングした。その結果、9月に本分散を行なった実験区ではFhの感染率は12月以降顕著に低下するものの、10月に本分散を行なった区では逆に上昇した(図4)。qPCRによる解析では12月にFhの菌量が増加しており、10月本分散群ではFhの増殖を抑制することができなくなっていることが示唆された。また、死亡は

12月と2月に、貝殻変形は1月に多いことから、Fhが一旦増加し、その後、減少に転じる頃に死亡や貝殻の変形が起こると考えられた。

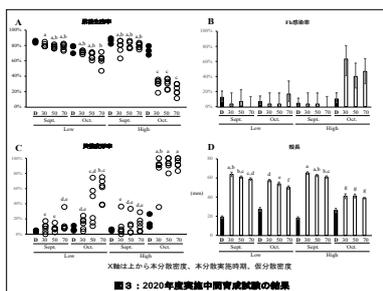


図3: 2020年度実施中間育成試験の結果

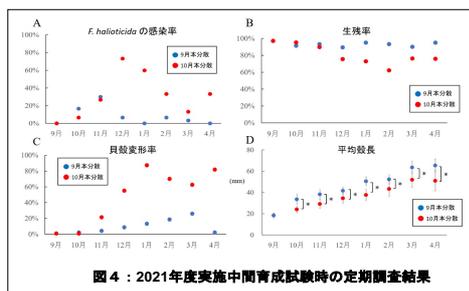


図4: 2021年度実施中間育成試験時の定期調査結果

(4) フランシセラ症感染症に対する環境要因の影響

Fh 懸濁液を用いた浸漬攻撃試験は、5~10℃の範囲で水温を調節しなかった場合、55 日間に渡り攻撃区でも死亡はほとんど発生しなかったが、水温を 18℃まで上昇させたところ、攻撃区で死亡が発生した(図5)。対照区では死亡が発生しなかったことを鑑みると、Fh の感染した個体では急激な温度変化などのストレスにより死亡すると考えられた。一方、振動区も振動を与えなかった実験区でも升温までには死亡率に大きな違いはなく、どちらも升温後に攻撃区で顕著な死亡が発生した(図6)。このことから、振動や急激な水温上昇自体はホタテガイの死亡原因にはならないこと、一方、Fh に感染したホタテガイの場合、急激な温度変化は死亡を引き起こすが、振動は影響を及ぼさないことが強く示唆された。

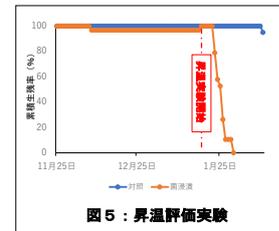


図5：昇温評価実験

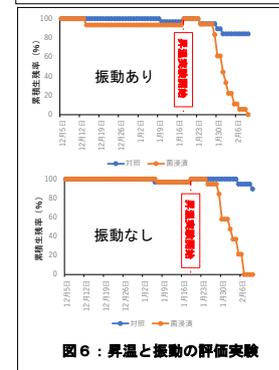


図6：昇温と振動の評価実験

(5) 生産現場における迅速診断法開発

培養した Fh で免疫したウサギの血清を用い、Fh 感染ホタテガイ組織に対する免疫染色を行ったところ、血球内に明確な陽性反応を認められた(図7)。当該血清の Fh に対する特異性を検討するため Fh と同属である魚病細菌に対する凝集試験を実施したが、凝集性が認められたことから、Fh 特異血清ではなかった。しかし、この Fh 同属細菌は貝類から検出された例がないため、ホタテガイの Fh を検出する目的での使用は可能であると判断した。そこで、この血清から精製した IgG を結合させた金コロイドを作成し、Fh に対する反応性を検討したが、最適な反応条件の決定までには至らなかった。今後は更なる条件検討を行う必要がある。

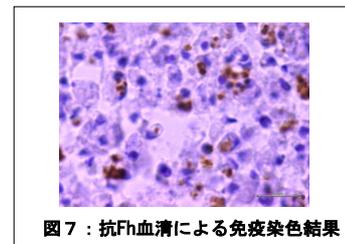


図7：抗Fh血清による免疫染色結果

(6) 研究のまとめ

以上の研究より、ホタテガイの死亡を引き起こす Fh はホタテガイの主要生産海域である北海道周囲に既に拡散していることが強く示唆された。その一方、Fh が引き起こすフランシセラ感染症の発生状況は海域や年により異なっており、漁場環境は本症の発生に強く影響することが考えられた。今後は、複数の養殖海域で本症の発生状況のモニタリングを行い、本症の発生に影響する漁場環境を抽出することが望まれる。

本研究では実験的に与えた急激な水温上昇がホタテガイの死亡をもたらすことが強く示唆された。今回与えた水温上昇は自然界で現実的に発生しうる範囲を超えているとは言え、水温の急激な変動が短期的に本症による死亡を引き起こす可能性はありうる。一方、時折、振動による死亡への影響は実験結果からは考えにくいと判断された。

さらに、稚貝では中間育成時の条件がフランシセラ症の発生に関わることが示唆された。生産者は時々の状況に応じて生産手法を柔軟に変更させるようであり、海域や年度による本症の発生の違いは、そのような生産者の活動を反映した可能性も否定できない。しかし、実験結果らは最適な生産手法により、稚貝における被害を軽減させることが可能であることが強く示唆された。

本研究では Fh に対して反応性を有する抗血清の作成には至ったが、金コロイドを用いた簡便な検査手法の開発までには至らなかった。PCR や qPCR による検出手法は現場レベルでの診断としてはハードルが高く、LAMP 法などの他の手法も視野に入れた簡易診断手法の開発は今後も望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Furumoto Yuichi, Kanamori Makoto, Natsuike Masafumi, Kawahara Miku, Yoshinaga Tomoyoshi, Itoh Naoki	4. 巻 58
2. 論文標題 Francisella haliotica Infection of Intermediately Cultured Juvenile Scallops Mizuhopecten yessoensis in Southern Hokkaido	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 8~14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3147/jsfp.58.8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古本佑一・金森誠・河原未来・良永知義・伊藤直樹
2. 発表標題 中間育成時のホタテガイ稚貝におけるFrancisella haliotica感染調査
3. 学会等名 令和3年日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Naoki Itoh
2. 発表標題 What have we learned from field surveys for shellfish diseases?
3. 学会等名 The 6th International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development 2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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	良永 知義 (Yoshinaga Tomoyoshi) (20345185)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授 (12601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	夏池 真史 (Natsuike Masafumi) (30772222)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・水産研究本部 函館水産試験場・研究主任 (80122)	
研究分担者	佐藤 敦一 (Sato Nobukazu) (90564774)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・水産研究本部 さげます・内水面水産試験場・主査 (80122)	
研究分担者	金森 誠 (Kanamori Makoto) (40584149)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・水産研究本部 函館水産試験場・主査 (80122)	
研究分担者	三坂 尚行 (Misaka Naoyuki) (90442657)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・水産研究本部 栽培水産試験場・研究主幹 (80122)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関