

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14901

研究課題名（和文）環境水を用いた非侵襲的な魚病検査手法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a non-invasive diagnostic tool for fish diseases using environmental water

研究代表者

竹内 久登（Takeuchi, Hisato）

愛媛大学・南予水産研究センター・助教

研究者番号：80802157

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、環境水をサンプルとした非侵襲的な魚病検査手法を確立することを目的とした。マダイ飼育水中からマダイ由来のメッセンジャーRNA（mRNA）の検出に成功し、また魚病細菌感染魚の飼育水中で、一部の免疫や炎症反応に係るmRNAの発現量が増加することを見出した。さらに魚体組織中の当該mRNA発現が飼育水中発現と同様の傾向を示した。以上のことから、飼育水中の環境RNAを魚病検査に活用できるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖場における魚病発生を早期に探知するためには、魚病検査を密に行うことが不可欠であるが、現行の検査方法は取り上げによる魚体へのダメージから養殖業者に敬遠されていた。本研究により、環境水中のRNAをマーカーとすることで、魚を取り上げることなく、非侵襲的に魚病検査を行える可能性が示された。このことは、水から魚体の病原体感染を知る手法の開発への一歩として、魚病検査や魚病学の発展に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to establish a non-invasive diagnostic tool for fish disease using environmental water. We successfully detected red sea bream-derived messenger RNA (mRNA) in the rearing water of red sea bream, and found that the expression levels of mRNAs related to immune and inflammatory responses increased in the rearing water of fish infected with fish pathogenic bacteria. Furthermore, the expression of these mRNAs in fish tissues showed a similar trend to that observed in the rearing water. From these findings, it was considered that environmental RNA in rearing water could be utilized for fish disease diagnostic.

研究分野：魚病学

キーワード：魚病 養殖 環境DNA 環境RNA マダイ エドワジエラ症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界的な水産物の需要拡大を意識し、我が国の養殖業界では生産規模拡大やブランド力強化に向けた取り組みが始まっているが、一方で養殖現場では様々な魚病が頻発し、生産効率や商品価値を著しく低下させている。被害抑制のためには密な検査により魚病発生を早期に探知し、発生拡大の前に封じ込め・治療を行うことが不可欠であるが、現行の検査方法は取り上げによる魚体へのダメージから養殖業者に敬遠されており、ゆえに魚体を取り上げずに魚病の発生を探知できる、非侵襲的な検査手法の確立が求められてきた。そのため、近年では環境水から原因病原体を検出する手法が注目されているものの、病原体は生体外への放出量が少ないと検出が困難となるため、適切な魚病検査手法とはならない可能性がある。

そこで申請者は、病原体より高濃度で環境水から検出できる可能性がある指標として、魚体から水中へ放出される生体物質(水中生体物質)に着目した。予備的検討において、養殖魚種であるアユを病原細菌 *Edwardsiella ictaluri* に感染させ、放出された水中生体物質に含まれるアユ由来のミトコンドリア DNA (環境 DNA) の濃度変化を測定してみた。その結果、感染魚飼育水中の環境 DNA 濃度は同数のアユを飼育していた非感染区に比べ最大で 4 倍以上の値を示した。このことは、病原体感染により水中生体物質量が増加したことを意味しており、これらが魚体の感染履歴を示す可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、わが国の代表的な養殖魚であるマダイ、およびマダイのエドワジエラ症の原因細菌である *Edwardsiella anguillarum* をモデルとして、環境水を用いた非侵襲的魚病検査手法の確立を目的とした。病原体感染魚から放出される水中生体物質の特定、水中生体物質の定量手法確立、および 養殖場での魚病発生に対する水中生体物質の応答性解明、の 3 つの課題に取り組んだ。

3. 研究の方法

病原体感染魚から放出される水中生体物質の特定

E. anguillarum を人為感染させたマダイ(感染群)および非感染マダイ(対照群)(各群 2 群ずつ設定, n=18/群)を海水かけ流し式水槽内で飼育し、感染 1、2、3、4、6 および 8 日後に飼育水を経時的に採水するとともに、魚体を感染 2、4、6 日後に 6 尾ずつ取り上げ、体表粘液、腸管および鰓弁を魚体試料として採取した。感染 2 および 4 日後の飼育水から水中生体物質由来の RNA (環境 RNA) を抽出して次世代シーケンズ解析(NGS 解析)により網羅的に同定した。感染群および対照群で結果を比較し、病原体感染魚の飼育水中で特異的な変動を示す水中生体物質を絞り込んだ。

水中生体物質の定量手法確立

NGS 解析で検出された RNA (cDNA) 配列から特異的プライマーを設計し、定量 PCR 法による分子生物学的定量系を構築した。さらに、の経時採水試料および魚体組織中の RNA を確立した定量 PCR 系で定量し、経時変化を解析した。

養殖場での魚病発生に対する水中生体物質の応答性解明

2023 年 3、6 および 9 月において、愛媛県愛南町のマダイ養殖海域 4 カ所において環境 RNA 検出調査を行った。各海域のマダイ養殖生簀近傍で海水を採取しフィルターろ過を行い、ろ過フィルターを試料として、で確立された定量 PCR 検出系により環境 RNA マーカーの定量検出を試みた。検出結果をエドワジエラ症の発生傾向と比較することで、魚病発生に対する水中生体物質の応答性を検証した。

4. 研究成果

病原体感染魚から放出される水中生体物質の特定

NGS 解析の結果、飼育水からマダイ由来のメッセンジャー RNA 配列の取得に成功し、感染 2 日後ではアミロイド A タンパク、4 日後ではアルギナーゼ関連 RNA が、感染群で最も高発現する RNA として選定された。さらに感染群での 2 および 4 日後の結果を比較すると、ヘプシジン関連 RNA が 4 日後において有意に発現上昇していた(表 1)。これらは医学分野では免疫や炎症反応時のマーカーとして活用されていることから、これらをマーカー候補 RNA として選定することとした。

表 1 NGS 解析で取得された RNA の発現比較結果

比較群		順位	関連するタンパク質	Bに対するAの発現増加比
A	B			
2日後; 感染群	2日後; 非感染群	1	血清アミロイドAタンパク	138.46
		2	血清アミロイドAタンパク	107.17
		3	アルギナーゼ	171.73
		4	アルギナーゼ	132.67
		5	L-アミノ酸オキシダーゼ	74.15
4日後; 感染群	4日後; 非感染群	1	アルギナーゼ	632.42
		2	アルギナーゼ	969.99
		3	MFS型輸送体	312.36
		4	L-乳酸デヒドロゲナーゼ	48.45
		5	アルカリフォスファターゼ	191.76
4日後; 感染群	2日後; 感染群	1	インターロイキン-22	71.00
		2	低密度リポタンパク質受容体	19.05
		3	インターロイキン-17F	17.77
		4	ヘプシジン	17.31
		5	グルコース輸送体	6.67

水中生物物質の定量手法確立

NGS 解析で得られた塩基配列から、マーカー候補 RNA、および内部標準（リボソーム小サブユニット SA）RNA の特異的プライマーを設計し、これらのプライマーを用いた定量 PCR 定量系を構築した。の経時採水試料および魚体組織中 RNA におけるマーカー候補 RNA を定量し、内部標準候補で補正して相対発現量を算出したところ、全ての RNA マーカーは感染群において対照群に比べ最大数十倍以上で発現しており、感染群-1 と 2 の両方で概ね同様の傾向を示していた。さらに、アルギナーゼは感染 6 日後、血清アミロイド A タンパクは 1~2 日後、およびヘプシジンは 4~6 日後に最大値を示していた（図 1）。これらの結果から、選定した RNA マーカーは再現性高く感染を感知でき、また感染状態の変化を追跡できるものと考えられた。また、マーカー候補 RNA の魚体中での発現を推定するため、魚体試料中のマーカー候補 RNA の発現量を解析したところ、アルギナーゼでは表皮粘液、血清アミロイド A タンパクでは腸管、およびヘプシジンでは鰓弁において環境 RNA マーカーと同様に、対照群に比べて数十~数百倍の発現を示す個体が認められた（図 2）。以上の結果より、生体から飼育水中に放出された環境 RNA は生体の感染状態を反映しており、取り上げを必要としない魚病検査を行える非侵襲性検査マーカーとなる可能性が示唆された。

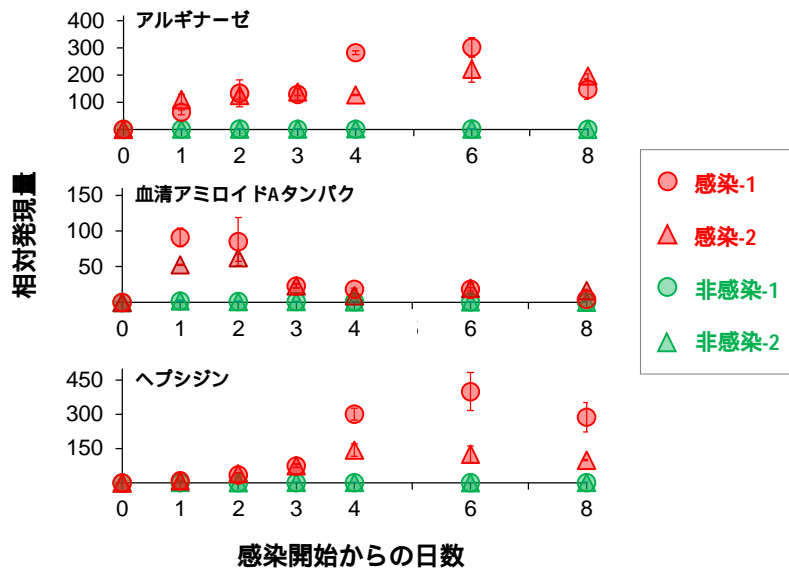


図 1 マダイ飼育水中のマーカー候補 RNA 発現解析結果.

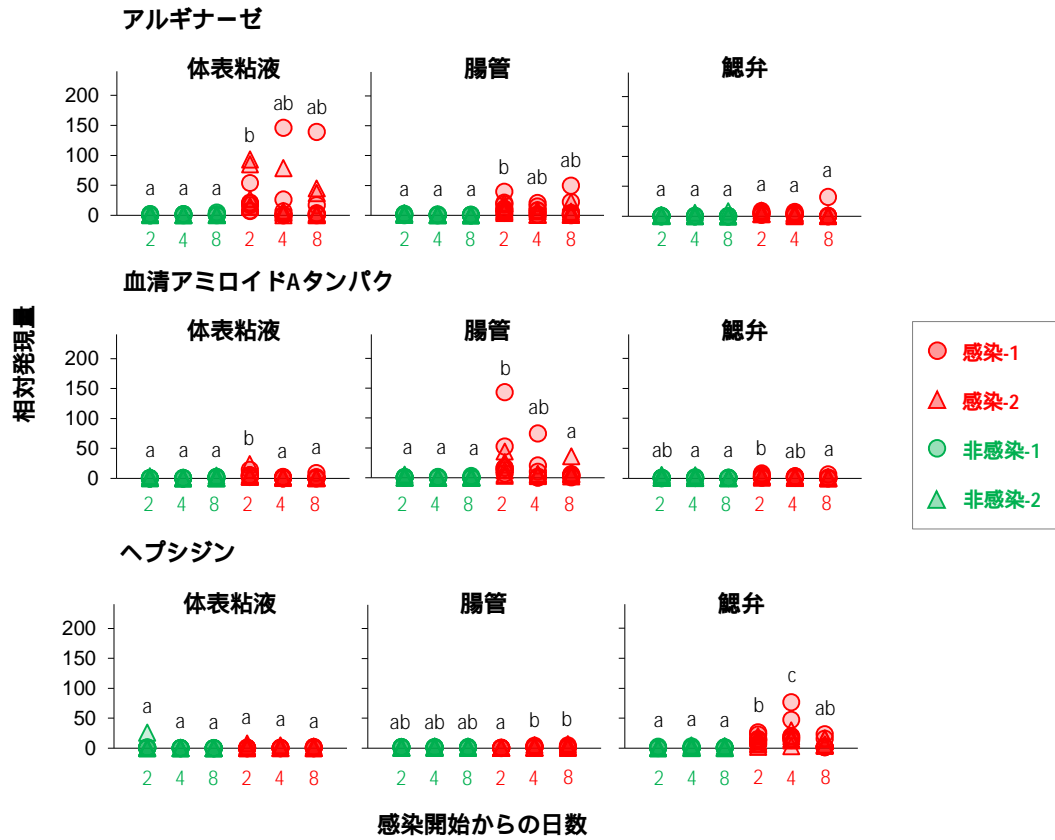


図2 マダイ魚体組織（体表粘液，腸管，鰓弁）中のマーカー候補 RNA 発現解析結果。

養殖場での魚病発生に対する水中生体物質の応答性解明

内部標準、およびアルギナーゼ RNA を標的として養殖場海水中の環境 RNA 解析を行ったところ、いずれの RNA も全てのマダイ養殖海域で検出され、環境 RNA マーカーは実海域においても検出可能であることが明らかとなった。一方で、養殖海域において *E. anguillarum* に起因するエドワジエラ症は6-10月に頻発するが、アルギナーゼのコピー数および内部標準 RNA に対する相対発現量は海域2および3では予想に反して3月から9月にかけて低下する傾向が見られた。水温や塩分等の環境要因とも相関が見られなかったことから、検査適用性の判定のためにはさらに継続的な調査が必要であるものと考えられた。

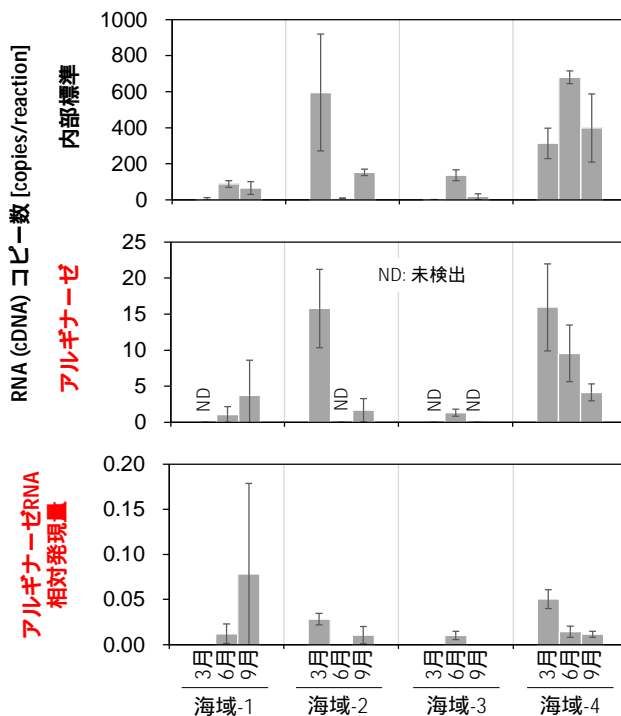


図3 マダイ養殖海域におけるマーカー候補 RNA 発現解析結果。

以上の結果より、環境 RNA をマーカーとして利用することで、魚を取り上げない魚病検査を行える可能性が示唆された。しかしながら一方で、その実環境（養殖場）における検出精度や魚病発生との関連性が不明確であったことから、今後も検査手法開発に向けて調査および解析を継続する予定である。

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 Takeuchi Hisato, Kawakami Hidemasa, Mano Nobuhiro, Yamanaka Hiroki, Shimizu Sonoko	4. 巻 90
2. 論文標題 Environmental DNA-based quantification of Edwardsiella bacteria and fish-derived materials in rearing water of infected ayu Plecoglossus altivelis and red sea bream Pagrus major	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 93 ~ 103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-023-01724-3	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 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内久登・山中裕樹・釣健司・原川翔伍・川上秀昌・清水園子
2. 発表標題 エドワジエラ菌感染により発現変化するマダイ飼育水中環境RNAの探索
3. 学会等名 令和4年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹内久登・原川翔伍・清水園子・川上秀昌
2. 発表標題 感染死亡魚を介したマダイエドワジエラ症の蔓延に関する研究
3. 学会等名 令和5年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------