

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H04964

研究課題名(和文) 魚類卵膜軟化症の発症・促進機構の解明に基づく防除技術の確立

研究課題名(英文) Pathogenic mechanism and control of soft egg disease in salmonids

研究代表者

笠井 久会 (Kasai, Hisae)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：50399995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵膜軟化症は、外部の衝撃から胚を保護するのに必要な卵膜の硬度が何らかの原因により失われ、卵が潰れやすくなる疾病である。本研究により、卵膜軟化症が環境由来の細菌感染症で、短桿菌が卵膜表面を徐々に溶解することによって発症することを突き止めた。卵膜軟化症を発症した卵膜に付着する細菌について群集構造解析を行い、病原細菌の候補を見出すとともに、原因菌の分離や特異検出系の構築を実施した。さらに、ポリフェノールが卵膜軟化を抑制する機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵膜軟化症はサケの卵期の主な減耗要因であるが、発症原因および機構は解明されておらず、発症の程度を表す明確な指標も定められていない。本研究は、卵膜軟化症の発症原因の特定から科学的エビデンスに基づく防除法の確立まで体系立てて行ったものであり、本研究結果で得られた成果は疾病予防へとつながる基盤的な情報となる。サケ科魚類の増養殖による安定的な生産に重要かつ直接的な貢献をもたらすものであり、それらの学術的意義や社会的意義は極めて高い。

研究成果の概要(英文)：Soft egg disease in salmonids causes loss of firmness of the egg membrane, increasing vulnerability of the embryo to external impact. In this study, we show that the disease is caused when bacteria from the environment gradually dissolve the surface of the egg membrane. We analyzed bacteria attached to egg membranes, and found candidate pathogenic bacteria to be short bacilli. Artificial culture of the pathogen was possible and a specific detection method was subsequently developed. Furthermore, we demonstrate how polyphenols can inhibit egg membrane softening.

研究分野：魚病学

キーワード：卵膜軟化症 サケ

1. 研究開始当初の背景

卵膜軟化症は、外部の衝撃から胚を保護するのに必要な卵膜の硬度が何らかの原因により失われ、卵が潰れやすくなる疾病である(図1)。卵膜軟化症が発生すると、症状は改善することなく悪化の一途を辿り、卵がふ化前に潰れ死卵となる。卵膜軟化症は海外では soft-egg disease と称され(Donald,1971)、古くから記載があるが、原因究明には至っていない。



図1. 卵膜軟化症の病卵。卵膜の一部が薄くなり、一部早期ふ化が起っている。

卵膜は、厚みが1 μm に満たない外層と、層状で厚みが数十 μm 程度の内層に分かれ、受精後にトランスグルタミナーゼによる卵膜タンパク質の架橋結合が生じて硬化する。受精卵は、積算温度(毎日の飼育水温を積算)250 $^{\circ}\text{C}$ 程度で発眼し、450 $^{\circ}\text{C}$ 程度でふ化する。ふ化の過程において、胚の頭部付近からふ化酵素と呼ばれる亜鉛プロテアーゼが分泌され、卵膜を溶解する。

以上のように、卵膜の正常な硬化と溶解の仕組みが国内外の研究者により明らかにされているが、ふ化前に卵膜が強靱さを失う卵膜軟化症の発症原因は諸説あるのが現状で、発症機構に関しては一切不明である。発症原因に関する報告は、外的な要因と内的な要因に大別され、外的な要因として細菌の関与(武田,1930)や水温・溶存酸素あるいは水質の影響(伊澤ら,1998)が疑われている。内的な要因では、親魚由来の因子(Barnes et al.,2003)、採卵時期による卵質の影響などが疑われている。しかしながらいずれの報告も決定的な証拠を提示するには至っていない。その主な原因として卵膜軟化症の明確な指標が定められていないこと、卵の交換飼育など複数の施設にまたがる試験が実施されなかったことが考えられる。

2. 研究の目的

- (1) 卵膜軟化症の発症・促進機構の解明を目指すとともに、細菌が原因であることが立証された場合は病原菌の特定および分離培養を試みるとともに、特異検出法の確立を行う。
- (2) 病卵と正常卵について液体クロマトグラフ・質量分析装置(LC/MS)、電気泳動を用いた網羅的物質解析を行い、代謝物プロファイルを比較することで病気のマーカーとなる物質の存在を探る。
- (3) 卵膜軟化症の防除法確立を目的にカテキン溶液による防除効果およびその作用機序について明らかにする。

3. 研究の方法

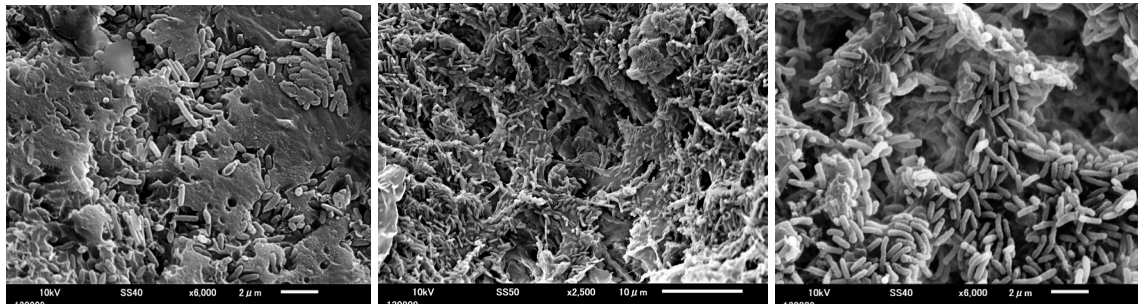
- (1) 北海道区水産研究所のさけます事業所3か所および北海道大学にてサケ卵を管理し、それぞれに未処理群、カテキン処理(1000 mg/L, 1時間, 三井農林)群を設けた。恒常的に発症の見受けられる事業所には中空糸ろ過水(0.2 μm)飼育群を設けた。積算温度100 $^{\circ}\text{C}$ 毎に、各収容場所で卵膜の状態の比較観察およびデジタルフォースゲージ(IMADA)による卵の破断強度測定と走査型電子顕微鏡(SEM)による卵膜の経時観察を行った。次いで、原因細菌の特定を目指し、卵膜軟化症の発症卵および未発症卵の卵膜に付着する微生物群集構造の比較を行うことで、病卵に特異的な細菌の検出および細菌叢の変遷を解析した。さらに、発症卵で優占する特定の OTU (P1) について、P1 の分離培養を試みるとともに、P1 の特異検出系を作出した。
- (2) 発症時の卵膜タンパク質の変化を観察するため、受精から孵化までの卵膜タンパク質を SDS-PAGE や LC/MS/MS を用いて観察した。さらに発症卵と未発症卵の卵膜タンパク質を SDS-PAGE で展開後、N 末端アミノ酸配列分析およびマトリックス支援レーザー脱離イオン飛行時間型質量分析(MALDI-TOF/MS)に供試することでタンパク質の切断部位およびタンパク質の推定を行った。さらに、LC/MS/MS を用いて恒常的に卵膜軟化症が発症する施設と発症歴のない施設の飼育水中の成分を比較し、発症環境に特有の物質を探索することで環境要因の推定を試みた。
- (3) サケ卵をガレート型カテキンおよび遊離型カテキン溶液に浸漬後、恒常的に発症が見られる施設に収容し、積算温度400 $^{\circ}\text{C}$ までの発症率を積算温度100 $^{\circ}\text{C}$ 毎に測定した。発症率は、卵破断強度測定において5.0 N以下の値を示した卵の割合より求めた。さらに、卵浸漬後の溶液に残存するカテキン量を HPLC により測定し、卵膜へのカテキン吸着量を推定した。加えて、なめし剤(ホルマリン、タンニン酸、カリウムみょうばん)およびガロイル基の単量体である没食子酸溶液および各種ポリフェノール溶液(テアフラビン、タンニン酸)への浸漬による発症率の抑制効果を検討するとともに、卵への酵素処理による人為的な卵膜軟化方法を検討することで、ポリフェノール類の卵膜軟化を抑制する機構の解明を試みた。

4. 研究成果

- (1) 試験を行った4か所中3か所において積算温度 300°C以降に本病の発症が認められた。発症時期や程度は場所ごとに異なった。卵破断強度は未発症群では吸水後から積算温度 100°Cにかけて向上し、その後大きな変化はみられなかった。最も顕著な症状がみられた施設では、積算温度 300°Cから急激に卵破断強度が低下し、5.0 Nを下回る卵の割合が300°Cで38-82%、400°Cには82-98%に達した。同施設の飼育用水を中空糸ろ過処理した飼育群では5.0 Nを下回る卵の割合は300°Cでわずか0-2%、400°Cで12-26%であり、発症の抑制効果が認められた。以上のことから、本病は環境由来の細菌が原因で発症する可能性が示唆された。

本病の発症が認められた未処理群の卵膜表面には、積算温度 200°Cから付着した短桿菌が卵膜表面を覆うように拡がり、表面が一部溶解する様子や窪みが観察された(図2)。積算温度 300°Cでは膜表層の陥没や孔が複数見られるようになり、溶解した表層部には無数の短桿菌の存在が認められた。この孔が確認されるまで卵膜内面の構造に溶解の様子や細菌は観察されなかったが、孔の確認された卵膜では断面および内面には主に長桿菌が確認され、内層の網目状構造が溶解している様子が確認できた。本病未発症群の卵膜にも少数の細菌の付着は観察されるが、卵膜の様子に変化は見られなかった。このことから本病は環境由来の細菌感染症で、短桿菌が卵膜表面を徐々に溶解することによって発症し、その後溶解した部分から他の細菌が卵膜内部に侵入することで溶解が急速に進むものと考えられた。

卵膜付着細菌について群集構造解析を行った結果、卵膜軟化症の発症以前には8.8%にしかなかった *Flavobacteriaceae* 科に属する OTU が、発症後の卵膜では65.3%を占めるまでに増加し、その92.3%がある一つの系統型(P1)であることが明らかとなった。病卵で優占していた OTU を検出することができたため、病卵から抽出した核酸のクローニングにより、16S rRNA の全長配列を取得し、系統解析に供した。その結果、この系統型は *Flavobacterium psychrophilum* に96.2%、*F. swingsii* に97.4%の配列類似性を示すことが明らかとなった。分離培養においては、卵膜限界希釈培養においてのみP1と非常に類似した配列をもつ細菌の増殖が認められた。さらにP1に特異なプライマーを作出し、PCRによるP1の検出系を構築した。



B: 積算200°C時のSEM観察像

C: 積算400°C時のSEM観察像

D: 積算400°C時のSEM観察像
(高倍率)

図2. 病卵のSEM観察像.

- (2) 八雲事業所収容卵において卵膜軟化症の発症が認められ始める積算 300°Cから 19, 30, 40 kDa のバンドが出現した。未発症卵では積算 400°Cまでバンドパターンに変化が見られなかったことから、卵膜軟化症は孵化時のような卵膜の分解が早期の段階で起きていることが明らかとなった。ふ化後卵膜においても、発症卵膜で確認されたバンドと同じ位置にバンドが出現したため、各々のバンドのN末端から10残基のアミノ酸配列を決定し比較した。その結果、発症卵および孵化後卵膜において最もメジャーなバンドである30 kDaにおいて8残基のアミノ酸配列が一致した。これらの配列についてBLAST検索を行ったところ、サクラマスの卵膜タンパク質(Choriogenin L)と高い相同性を示した。一方、40 kDaのバンドについては決定できた範囲ではアミノ酸配列が異なることが明らかとなった。加えて、LC/MS/MS分析により得られたトータルイオンスペクトルを比較すると、類似している部分はあるが完全には一致しなかったことから、卵膜軟化症による卵膜の軟化と孵化酵素による軟化が類似している可能性があるものの完全に同一の現象ではないことが示された(図3)。

2017年9月から2018年1月までの期間において、飼育水の成分プロファイルを主成分分析を用いて解析した結果、Score plot上で施設ごとに群にまとまる傾向が見出され、恒常的に発症の見受けられる事業所においては10, 11, 12月の群、9月および1月の3群に分かれた(図4)。この結果から、千歳事業所の飼育水と八雲事業所の飼育水の成分プロファイルが異なることが示された。次に、loading plotからそれぞれの群を特徴づける化合物を検討したところ、セリン(Ser)、アスパラギン酸(Asp)、トリプトファン(Trp)、β-アラニン(Ala)、プロリン(Pro)、トレオニン(Thr)、ロイシン(Leu)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu)およびフェニルアラニン(Phe)計10種類の遊離アミノ酸とラクトース、乳酸が八雲事業所の飼育水中に特異的に存在することが示された。

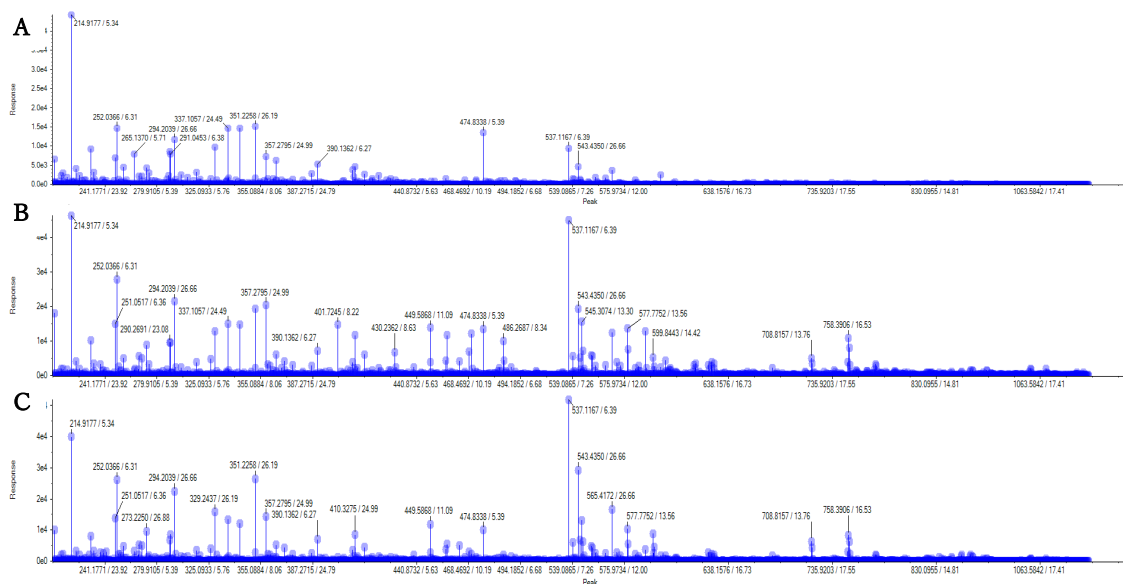


図3. LC/MS/MSにより得られた各卵膜タンパク質のトータルイオンスペクトル。
A: 正常卵膜, B: ふ化後卵膜, C: 発症卵膜。

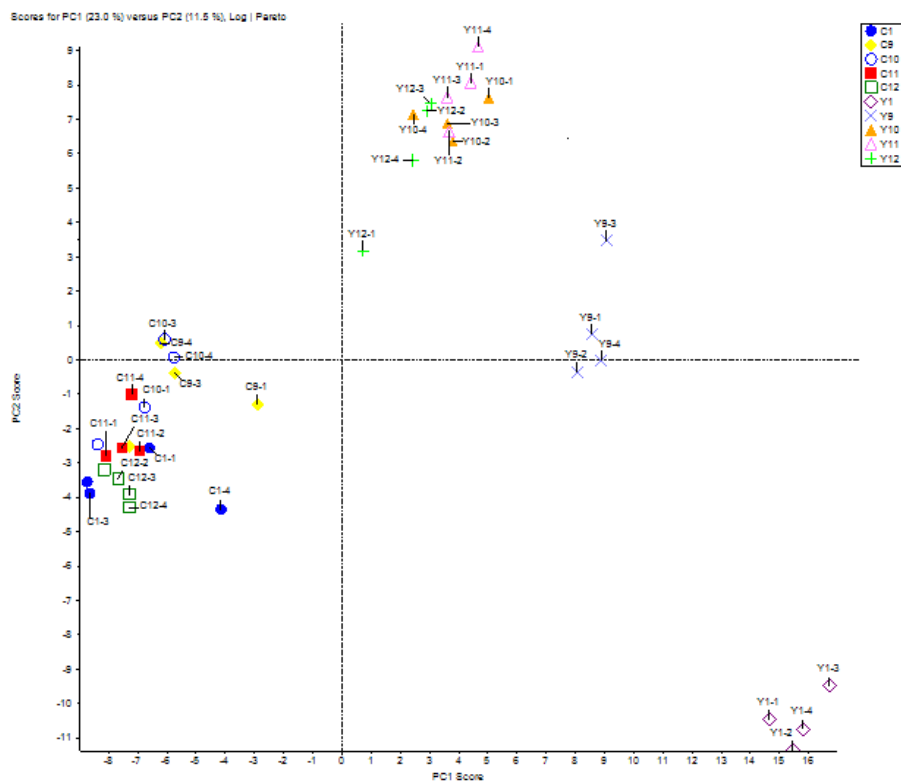


図4. 2017-2018年に採水した発症施設および未発症施設飼育水のScore plot。
C1: 未発症施設1月飼育水, C9: 未発症施設9月飼育水, C10: 未発症施設10月飼育水, C11: 未発症施設11月飼育水, C12: 未発症施設12月飼育水, Y1: 発症施設1月飼育水, Y9: 発症施設9月飼育水, Y10: 発症施設10月飼育水, Y11: 発症施設11月飼育水, Y12: 発症施設12月飼育水。

- (3) サケ卵をガレート型カテキンおよび遊離型カテキン溶液に浸漬して発症率の経過観察を行った結果、積算温度 400°Cにおける対照区の発症率は 55%であったところ、ガレート型カテキン溶液区では最も低濃度である 250 mg/l においても発症率は 7%であり、500 mg/L 以上では発症は完全に抑制され高い防除効果が認められた。一方遊離型カテキン溶液では最も高い濃度である 1000 mg/l 区でも発症率は 35%に達し十分な防除効果は認められなかった。八雲採卵群の試験では遊離型カテキンの濃度を 1000~8000 mg/L としたが、全ての濃度で 60%以上の発症率を示した。ガレート型カテキン溶液の 100 mg/l 区と遊離型カテキン溶液の 8000 mg/l 区は同程度の発症率 (68%および 60%) を示し、防除効果は濃度比でおよそ 80 倍と顕著な差がみられた。以上のことから、カテキンの卵膜軟化症防除効果は

ガロイル基の導入によって著しく増大することが明らかとなり、緑茶抽出物の卵膜軟化症防除効果にはガロイル基が関与していると考えられた。さらに各カテキンの卵膜への吸着率を比較したところ、ガレート型カテキンは遊離型カテキンに比べ高い傾向がみられたものの有意差は認められなかった。つまり、2種のカテキンの防除効果の差異は、単にその吸着のしやすさによって説明されるものではないことが明らかとなった。

ホルマリンおよびカリウムみょうばん溶液区ではすべての濃度で発症率は43~95%であり、十分な防除効果は認められなかった一方で、タンニン酸溶液区ではすべての濃度で発症率が0%であり、高い防除効果が認められた。没食子酸溶液および各種ポリフェノール溶液の比較においては、没食子酸を除いた全てのポリフェノール溶液で防除効果が得られた。各ポリフェノールの防除効果を比較したところ、積算温度420℃での濃度 3.0×10^{-4} Mにおける発症率は、カテキンで70%、テアフラビンで1.7%、タンニン酸で0%となり、テアフラビンおよびタンニン酸がカテキンよりも高い防除効果を発揮することが明らかとなった。以上のことから、ポリフェノール化合物は卵膜軟化症の防除に非常に高い効果を発揮するとともに、ガロイル基とそれを含む化合物の構造の差異が防除効果に影響を及ぼしていると考えられた。さらに各試験区の卵における生菌数をミスラ法により測定したところ、すべての試験区において対照区との有意差は見られなかった。これによりカテキン類やポリフェノール類による卵膜軟化症の防除効果は、生菌数の抑制によるものではないと推測された。

次いで、ポリフェノール類（カテキン、テアフラビン、タンニン酸）に浸漬処理した卵に対して上記のトリプシン処理を行い、軟化率を求めた。24時間後の対照区の軟化率は100%であったのに対し、カテキン処理区は濃度依存的に卵膜の軟化を抑制した。 3.0×10^{-4} Mのカテキン処理区では軟化率が71.7%と十分な抑制効果は認められなかったが、同濃度におけるテアフラビンおよびタンニン酸処理では軟化率がそれぞれ8.3%および0%となり、高い抑制効果が認められた。つまり、ポリフェノール類は酵素による卵膜軟化を抑制し、その効果は実際の卵膜軟化症の防除効果と類似の傾向を示した。

引用文献

- Barnes, M.E., Cordes, R.J., Sayler, W.A. and Hanten, R.P. (2003) Soft - Egg Disease in Landlocked Fall Chinook Salmon Eggs: Possible Causes and Therapeutic Treatments. *North American Journal of Aquaculture*, 65: 126-133.
- Donald P. Toney (1971) Soft Egg Diseases and Acriflavine. *The Progressive Fish-Culturist*, 33: 159.
- 伊澤敏穂・新谷康二・村上豊・北村隆也・坂井勝信 (1998): 卵膜軟化症の発症原因. *魚と水*, 35: 19-28.
- 竹田志麻之輔 (1930) 西別孵化場鮭卵被害状況. *鮭鱒彙報*, 2: 1-4.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 笠井久会, 吉水 守	4. 巻 84
2. 論文標題 サケ資源を安定的に維持するための防疫対策	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本水産学会誌	6. 最初と最後の頁 933
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2331/suisan.WA2555-13	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 工藤雅子・小松代祐生・記内 優・伴 真俊・笠井久会
2. 発表標題 ポリフェノールとなめし剤によるサケ (<i>Oncorhynchus keta</i>) の卵膜軟化症予防効果
3. 学会等名 平成30年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 記内 優・小松代祐生・工藤雅子・伴 真俊・笠井久会
2. 発表標題 卵膜軟化症発症時におけるサケ卵膜タンパク質の構造変化
3. 学会等名 平成30年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kasai, H., Nishikawa, K., Ban, M. and Yoshimizu, M.
2. 発表標題 Prevention of soft egg disease of chum salmon using green tea extract
3. 学会等名 A.F.S. Fish Health Section Meeting (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 笠井久会, 伴 真俊
2. 発表標題 サケマス類の卵膜軟化症の原因と対策
3. 学会等名 平成28年度サケ学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 笠井久会, 伴 真俊
2. 発表標題 サケマス類の卵膜軟化症の原因と対策
3. 学会等名 平成28年度さけます報告会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 小松代祐生, 記内 優, 松本善行, 大久保 勉, 伴 真俊, 中山 勉, 酒井隆一, 笠井久会
2. 発表標題 カテキンの構造がサケ (Oncorhynchus keta) の卵膜軟化症防除効果に与える影響
3. 学会等名 平成29年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 笠井久会・八木橋大亮・小松代祐生・西川恵介・鈴木健吾
2. 発表標題 卵膜軟化症発症卵の卵膜に付着する微生物群集の構造
3. 学会等名 令和2年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八木橋大亮・笠井久会
2. 発表標題 サケ (Oncorhynchus keta) における孵化酵素活性と孵化酵素遺伝子 発現量の消長および卵膜軟化症との関連性 令和2年度日本魚病学会春季大会 2. 発表標題 (2/
3. 学会等名 令和3年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2021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	酒井 隆一 (Sakai ryuichi) (20265721)	北海道大学・水産科学研究院・教授 (10101)	

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