

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：80122

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05800

研究課題名(和文)腸管鞭毛虫の寄生が放流用シロザケ稚魚に及ぼす病害性の解明及びその防除技術開発

研究課題名(英文) Studies on the pathogenicity and control of the parasitic flagellate
Spironucleus salmonis infecting the intestine of juvenile chum salmon

研究代表者

水野 伸也 (MIZUNO, Shinya)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・水産研究本部 さけます・内水面水産試験場・研究主幹

研究者番号：70442655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：サケ稚魚の腸管鞭毛虫症の原因虫は*Spironucleus salmonis*と同定され、調査を行った約3割の孵化場稚魚から検出された。この感染は、稚魚に累積死亡率16%と海水適応能低下の病害性を及ぼした。感染源は河川内の野生魚とその排泄物であり、原因虫は用水を介して稚魚に感染した。用水の紫外線殺菌が、稚魚への原因虫感染を完全に予防した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

報告会及び広報誌を通して、原因虫が検出された孵化場に本病の病害性を紹介し、注意喚起することにより、現場で本病の防疫に対する意識を高めることができた。原因虫遺伝子の検出技術を魚病診断へ導入することにより、研究期間中に3件の不明病診断例を、腸管鞭毛虫症と診断することができた。魚病防疫指導を通して、孵化場へ予防技術の普及を図ることで、道内サケ人工増殖における腸管鞭毛虫症防疫への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study confirmed *Spironucleus salmonis* as the diplomonad flagellate infecting hatchery-reared chum salmon in Hokkaido. Infection of *S. salmonis* was detected from approximate 30% of juvenile hatchery-reared chum salmon collected for this study. Infection experiments with *S. salmonis* showed that the parasite infection caused the cumulative mortality of 16% and reduction of seawater adaptability in the juvenile salmon. We suggested that the infection sources of *S. salmonis* were wild fish, which inhabited the river, and feces of the fish. Infection of *S. salmonis* can be mediated by river water reared for juvenile chum salmon. Ultraviolet sterilization of rearing water prevented completely infection of *S. salmonis* in juvenile chum salmon.

研究分野：水産増殖学

キーワード：腸管鞭毛虫 *Spironucleus salmonis* サケ サクラマス 孵化場 海水適応能 野生魚

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- ・腸管鞭毛虫症は、原因となる原虫がサクラマスやニジマス等の宿主の腸に寄生し、死亡率増加等の被害性を宿主に及ぼす。
- ・研究代表者及び研究分担者が、道内の孵化場においてサケ稚魚に腸管鞭毛虫が大量に寄生する症例を初めて発見した。
- ・腸管鞭毛虫の寄生がサケ稚魚に及ぼす被害性は不明で、その防除技術も未開発である。

2. 研究の目的

道内におけるサケ稚魚の腸管鞭毛虫症の実態把握と防疫を目的として、原因虫の寄生動態、被害性および感染経路の解明と防除技術の開発を行う。

3. 研究の方法

- ・遺伝子解析により、サケ稚魚に寄生する腸管鞭毛虫を同定し、その定量系を開発する。
- ・本系を用いて、道内孵化場の稚魚について寄生動態を調べ、腸管鞭毛虫症の実態を把握する。
- ・原因虫の寄生が、稚魚の生残および生理機能に及ぼす影響を調査し、原因虫の被害性を明らかにする。
- ・感染試験により、感染源と推定される野生魚等から孵化場稚魚への感染性を調べ、野生魚を感染源とする原因虫感染経路の存在を示す。
- ・オレガノ精油添加飼料の給餌または紫外線照射水を用いた飼育が、サケ稚魚の腸管鞭毛虫症に与える予防効果を調べ、その防除技術を開発する。

(1) 腸管鞭毛虫症の実態解明 (2018年度～2019年度)

- ・ねらい：原因虫を定量可能にする。道内孵化場における原因虫の寄生動態を明らかにする。
- ・試験項目等：原因虫の遺伝子解析、原因虫遺伝子の定量系確立、原因虫の寄生度合とその季節変化の解析

(2) 原因虫の被害性及び感染経路の解明 (2018年度～2019年度)

- ・ねらい：原因虫の寄生が、稚魚の死亡率、成長及び海水適応能に及ぼす影響を明らかにする。野生魚及び寄生稚魚から非寄生稚魚への感染性を明らかにする。
- ・試験項目等：稚魚の死亡率、成長および原因虫寄生度合の解析、稚魚の海水移行試験および血漿 Na⁺量解析、野生魚の原因虫寄生度合の解析、野生魚、寄生稚魚あるいはその糞便から非寄生稚魚への感染試験

(3) 腸管鞭毛虫症の防除技術開発 (2020年度)

- ・ねらい：腸管鞭毛虫症の予防に有効なオレガノ油の飼料添加濃度及び飼料給餌期間を解明する。紫外線照射による用水の殺虫が、腸管鞭毛虫症の予防に有効かどうかを明らかにする。
- ・試験項目等：オレガノ精油添加飼料を給餌した稚魚への原因虫感染試験、紫外線照射水を用いた稚魚の飼育試験

4. 研究成果

(1) 腸管鞭毛虫症の実態解明

- ・原因虫リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) 断片の塩基配列は、既知 8 種の腸管鞭毛虫の中で *Spironucleus salmonis* と最も高い相同性 (99% 以上) を示したことから、この原因虫を遺伝的に *S. salmonis* と同定した (図 1)。
- ・確立した原因虫 rDNA のリアルタイム PCR 定量系は、 $1.0 \times 10^0 \sim 1.0 \times 10^7$ rDNA コピー/μl の間で測定可能であり、rDNA コピー数と個体数の関係は、回帰式 [rDNA コピー数] = $338 \times$ [個体数] - 768 で示された。
- ・寄生稚魚の原因虫分布は、前腸 > 後腸 > 幽門垂 > 糞便の順で多かったため、以後の解析には遺伝子検出部位として前腸を用いた。
- ・調査した 11 箇所孵化場のうち、3 箇所の稚魚から、原因虫の寄生が検出された (検出率 27%)。
- ・A 孵化場では、サクラマス当歳魚に 2018 年 6 月より腸管鞭毛虫の寄生が確認され、翌年 5 月にスマルト放流されるまでその寄生は継続した。一方、サケ稚魚には、2018 年及び 2019 年春季の飼育期間中に、原因虫の寄生はみられなかった。
- ・A 孵化場の取水河川において、原因虫の寄生は、野生のサケ及びサクラマスの親魚と稚幼魚

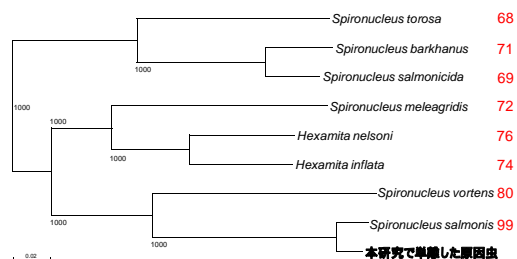


図 1 リボソーム RNA 遺伝子塩基配列に基づいたサケ稚魚に寄生する腸管鞭毛虫の系統解析
赤数字は本研究で単離した rDNA の配列との相同性を、黒数字は検証回数を 1000 とした時のブートストラップ値を示す

から検出されたが、ニジマス、ブラントラウト、カジカ類、ハゼ類、ヤツメウナギ類からは検出されなかった。

(2)原因虫の病害性及び感染経路の解明

- ・腸管鞭毛虫の寄生したサケ稚魚を注水量の異なる水槽で10週間飼育し、寄生数と病害性を比較した。低換水率区(1時間当たり3.7回)では平均寄生数が2週間後より急増し、4週目に3,500虫体となったが、高換水率区(1時間当たり11.1回)では、寄生数の増加が緩やかであった。6~8週目には、低換水率区の寄生群とコントロール群間で有意な成長の差がみられた。10週間の累積死亡率は、低換水率区寄生群で16%、高換水率区寄生群で10%、コントロール区ではそれぞれ0.6%と1.6%であった。
- ・寄生を受けた野生のサケ稚魚及びサクラマス幼魚、孵化場の寄生稚魚の糞便それぞれを感染源とした4週間の感染試験では、全ての供試感染源から稚魚への水平感染が成立した。この結果から、一部の野生魚あるいはその排泄物を感染源として、原因虫が飼育用水を介して孵化場稚魚に感染することが証明された。感染4週目の感染群の稚魚を用いた48時間海水移行試験では、同魚の生残率は20%まで低下し(図2A)、血漿Na⁺量は157%まで増加した(図2B)。以上の結果から、原因虫の感染は稚魚に海水適応能の低下を及ぼし、降海後の初期減耗要因になる可能性が示された。

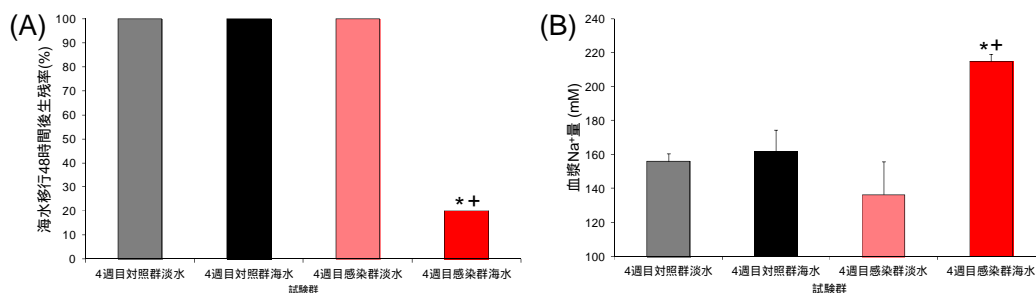


図2 腸管鞭毛虫感染試験4週目に行った被感染サケ稚魚の海水移行試験48時間後の生残率(A)および血漿Na⁺量(B)

(*)感染群淡水または(+)対照群海水との有意差($P < 0.05$)を示す

- ・サクラマス稚魚に腸管鞭毛虫を同居感染させたところ、平均寄生数は2週目より急増し、4週目にピーク(4,700虫体)となり、その後減少した。感染魚の死亡率は寄生数に比例して増加し、10週間の累積死亡率は18%となった(対照区は1.3%)。感染魚の成長は寄生数の増加した4週目から6週目にかけて停滞し、6週目から8週目にかけては対照群との間に有意差が見られた。

(3)腸管鞭毛虫症の防除技術開発

- ・一般的なサケ稚魚の原虫駆虫法である食酢水浴または食塩水浴には、腸管鞭毛虫の駆虫効果がなかった。
- ・寄生のない稚魚にオレガノ精油添加飼料を予防給餌後(外割添加濃度0~0.1%、予防給餌期間0~2週間)、4週間の原因虫感染試験を行い、オレガノ給餌による予防効果を調べた。その結果、精油無添加の対照飼料給餌に対し、0.02%添加飼料を2週間給餌した時に最大の予防効果(寄生強度を37%に抑制)が得られた(図3)。

- ・培養した原因虫の紫外線感受性を調べた結果、 $3.0 \times 10^6 \mu W \cdot s/cm^2$ 以上の紫外線照射で原因虫は不活化した。
- ・飼育用水の紫外線殺虫効果を検証するため、2つの水槽それぞれに寄生を受けていない同数の稚魚(試験開始前)を收容し、一方(対照群)を原因虫汚染水で、他方(紫外線照射群)を市販紫外線殺菌装置(照射性能: $4.4 \times$

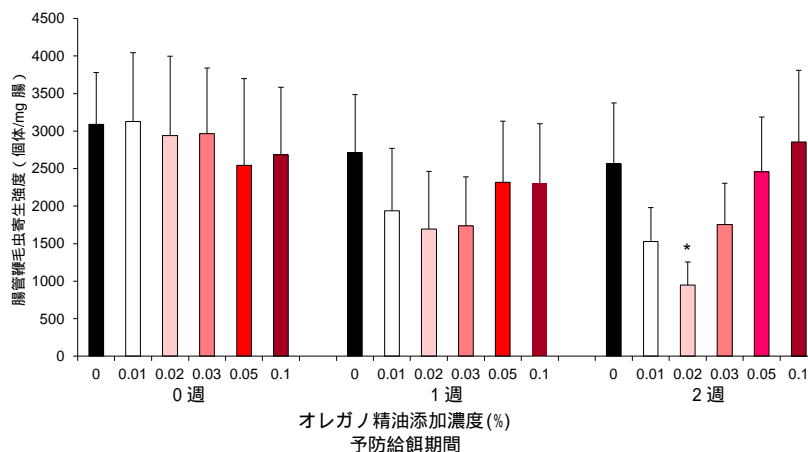


図3 オレガノ精油添加飼料予防給餌後の感染試験におけるサケ稚魚の腸管鞭毛虫の寄生強度

* $P < 0.05$: 同週の添加濃度0%との有意差を示す

$10^6 \mu W \cdot s/cm^2$)を通した原因虫汚染水で2週間飼育した。その結果、紫外線照射装置による飼育用水の殺虫は、稚魚への原因虫の感染を2週間完全に予防した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Shinya Mizuno, Shigehiko Urawa, Yoshitomo Katsumata, Takumi Morishita, Masatoshi Ban	4. 巻 55
2. 論文標題 Ultrastructural and molecular phylogenetic identification of the diplomonad flagellate <i>Spironucleus salmonis</i> infecting hatchery-reared salmonid fishes in Hokkaido	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 8-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Shinya Mizuno, Shigehiko Urawa, Yoshitomo Katsumata, Takumi Morishita, Yui Minowa, Masatoshi Ban	4. 巻 55
2. 論文標題 Quantitative analysis of diplomonad flagellate <i>Spironucleus salmonis</i> infection in intestines of hatchery and wild salmonid fishes in Hokkaido	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 61-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Shinya Mizuno, Shigehiko Urawa, Mahito Miyamoto, Makoto Hatakeyama, Nobuhisa Koide, Hiroshi Ueda	4. 巻 42
2. 論文標題 Experimental evidence on prevention of infection by the ectoparasitic protozoans <i>Ichthyobodo salmonis</i> and <i>Trichodina truttae</i> in juvenile chum salmon using ultraviolet disinfection of rearing water	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Fish Diseases	6. 最初と最後の頁 129-140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jfd.12920	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 水野伸也・勝又義友・浦和茂彦
2. 発表標題 紫外線照射による飼育用水の殺虫がサケ稚魚の腸管鞭毛虫症の予防に与える効果
3. 学会等名 令和元年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野伸也・浦和茂彦・森下匠・箕輪ゆい・勝又義友・伴真俊
2. 発表標題 サケ稚魚に寄生する腸管鞭毛虫の定量解析
3. 学会等名 平成31年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水野伸也・浦和茂彦・森下匠・勝又義友・伴真俊
2. 発表標題 腸管鞭毛虫の寄生がサケ稚魚の海水適応能に及ぼす影響
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigehiko Urawa, Shinya Mizuno, Masatoshi Ban
2. 発表標題 Impact of Spironucleus salmonis on the growth and mortality of juvenile masu salmon <i>Oncorhynchus masou</i>
3. 学会等名 8th International Symposium on Aquatic Animal Health (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shigehiko Urawa, Shinya Mizuno
2. 発表標題 Effects of water exchange rate on the diplomonad flagellate <i>Spironucleus salmonis</i> infection in juvenile salmonid fish
3. 学会等名 19th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish (国際学会)
4. 発表年 2019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	浦和 茂彦 (URAWA Shigehiko) (60425460)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・北海道区水産研究所・研究員 (82708)	
研究 分担者	伴 真俊 (BAN Masatoshi) (80425462)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・北海道区水産研究所・課長 (82708)	

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