

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06208

研究課題名(和文) マボヤ被嚢軟化症原因鞭毛虫の分布調査と宿主範囲の解明

研究課題名(英文) Investigation of the distribution and host range of the flagellate causing soft tunic syndrome of sea pineapple.

研究代表者

柳田 哲矢 (Yanagida, Tetsuya)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：40431837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、2007年以降に国内のマボヤ養殖で問題となっている被嚢軟化症の原因鞭毛虫(ホヤムシ)の宿主範囲と国内分布域を明らかにすることを目的とし、軟化症の発生履歴がない国内海域でのホヤ類の調査を行った。山口県等の沿岸15ヶ所からマボヤを含むホヤ類を約500個体検査したが、ホヤムシは検出されず、ホヤムシは軟化症が発生している東北沿岸にのみ分布していることが示唆された。一方で、遺伝子解析によってマボヤを含む複数種のホヤ類からホヤムシに近縁な鞭毛虫が見出されたことにより、ホヤムシ以外にもホヤ類に寄生する未知の鞭毛虫が存在する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、ホヤムシの分布域はマボヤ養殖で被嚢軟化症が発生している東北地方沿岸に現局している可能性が示された。マボヤ自体は本研究で調査した瀬戸内海等にも分布しているため、本研究の結果は、ホヤムシがもともと国内に存在したのではなく、海外から移入したという従来の仮説を支持するものといえる。また、ホヤムシはホヤ類の被嚢に寄生することが知られている唯一の鞭毛虫だが、本研究により、ホヤムシがホヤ類に寄生するに至った進化的な経緯を解明する道が開けた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the distribution and host range of the flagellate *Azumibodo hoyamushi*, the causative agent of the soft tunic syndrome (STS) of an edible ascidian *Halocynthia roretzi*, was investigated. About 500 ascidians including *H. roretzi* were collected from 15 regions where STS has never been reported, and none of them were infected with *A. hoyamushi*. The result suggests that *A. hoyamushi* only distributed along the coastal areas of Tohoku region, where STS has been reported in the ascidian aquaculture. On the other hand, evolutionarily closely related flagellates were detected from ascidians collected in this study, indicating the possibility of existence of the unknown flagellates parasitic to ascidians.

研究分野：寄生虫学

キーワード：被嚢軟化症 ホヤ 鞭毛虫

1. 研究開始当初の背景

マボヤ *Halocynthia roretzi* は日本の東北地方と韓国南部で盛んに養殖が行われているが、韓国では約 20 年前から被嚢軟化症による甚大な被害が発生している。本症は、鞭毛虫 (*Azumibodo hoyamushi*, ホヤムシ) がマボヤの被嚢と呼ばれる硬い外皮に寄生することによって起こる感染症で、感染したマボヤは被嚢が軟化して死亡する。我が国でも、被嚢軟化症は 2007 年以降に発生するようになり、マボヤ養殖における重要な課題となっている。現状では本症に効果的な治療法はなく、被害を軽減するためには防除対策を確立する必要がある。そのためには、感染環の解明が最重要の課題である。本研究の開始当初は、1) ホヤムシがマボヤ間で水平伝播する¹、2) エボヤ *Styela clava* も感染する²ことが明らかになっていた。一方で、国内にマボヤが広く分布し、また、100 種以上のホヤが棲息するにも関わらず、ホヤムシの感染状況は東北地方の被嚢軟化症が発生している発養殖場周辺で、マボヤ、エボヤなどごく少数のホヤについてしか調べられていなかった。そのため、ホヤムシの国内分布域と宿主範囲は未解明で、本症の対策を行う上で重要な課題として残されていた。なお、本症が韓国より 10 年遅れて日本でも発生した経緯から、ホヤムシは韓国から日本に人為的に移入したと推察されていた。しかし、日韓のホヤムシ集団は遺伝的にある程度分化していることが示された³ことから、日本にも独自のホヤムシ集団が分布していたことが示唆された。すなわち、本症が現在発生している東北地方以外にもホヤムシが分布している可能性があり、国内分布を明らかにする必要があると考えられた。

また、ホヤの被嚢という特殊な組織に特化して寄生する鞭毛虫はホヤムシ以外に知られていないが、様々なホヤを調べることにより他の寄生性鞭毛虫が見つかるのではないかと考えられた。そのため、これらを材料として分子系統解析を行うことにより、ネオボド目鞭毛虫がホヤへの寄生能を獲得した進化的経緯を解明できると期待された。

【参考文献】¹Kumagai et al. (2011) Dis Aquat Org 95: 153-161. ²Kumagai et al. (2014) Fish Pathol 49: 206-209. ³柳田 他 (2018) 平成 29 年度日本寄生虫学会大会

2. 研究の目的

本研究では、1) マボヤ養殖に大きな被害を及ぼす被嚢軟化症の感染環を解明するために、ホヤムシの宿主範囲と国内分布域を明らかにすること、2) ホヤムシが被嚢というホヤ特有の組織に寄生するに至った進化的経緯を明らかにすること、の 2 点を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、国内各所からマボヤを中心に種々のホヤ類をサンプリングし、ホヤムシの国内分布と宿主範囲を明らかにすることを試みた。また、ホヤから検出されたホヤムシ以外の鞭毛虫類について種の同定を行い、分子系統解析によって進化的な関係性を明らかにすることも試みた。さらに、ホヤムシが被嚢に局限して寄生する理由を明らかにするため、マボヤの体液(血リンパ)にホヤムシを排除する能力があるかどうか検証した。

(1) 国内でのホヤ類のサンプリングとホヤムシの検出

マボヤは東北以外にも広く分布しており、瀬戸内海にも群生していることが知られている。そこで、山口県と広島県の瀬戸内海沿岸を中心に、海岸でホヤ類の採集を行った。採集したホヤ類の種同定は、形態観察とリボソーム DNA (rDNA) を対象とした遺伝子解析によって行った。

ホヤからのホヤムシの検出には、顕微鏡観察と遺伝子解析を併用した。採集したホヤの被囊表面を水道水で洗浄した後に70%エタノールで消毒し、一部を切り出してスライドグラスに押しつけ、被囊内部から漏出した体液を顕微鏡で観察した(スタンプ法)。また、切り出した被囊を人工海水中で一晩静置し、遊出てくる鞭毛虫を確認した(遊出法)。さらに、ホヤの被囊からDNAを抽出し、ホヤムシの18S rDNAを標的とした特異的PCRを行った。

(2) ホヤムシ以外の鞭毛虫の検出と遺伝子解析

顕微鏡観察によってホヤムシとは形態が異なる鞭毛虫が見つかった場合は、ホヤムシを含むネオボド目鞭毛虫の18S rDNAを標的としたユニバーサルプライマーを用いたPCRによる増幅を試みた。PCRで増幅産物が得られた場合にはその塩基配列を決定し、国際塩基配列データベース(INSDC)に登録されている鞭毛虫のものと比較した。また、一部の鞭毛虫については、ホヤムシの培養に用いられる液体培地を用いて分離・培養を試みた。

(3) マボヤ血リンパによるホヤムシの培養

宮城県で養殖されたマボヤ3個体から注射器で採取した血リンパとホヤムシの懸濁液を混合し、ホヤムシの虫体数がどのように変化するかを確認した。その際に、採取したままの血リンパと混合する実験と、遠心分離により血球を取り除いた血漿と混合する実験を行った。ホヤムシの懸濁液は、研究室で液体培地により継代培養しているホヤムシを用いた。陰性コントロールとして、血リンパとも血漿とも混合しないホヤムシ懸濁液も同様に観察した。

4. 研究成果

(1) 国内でのホヤ類のサンプリングとホヤムシの検出

山口県、広島県、愛媛県、和歌山県沿岸の計15ヶ所から、ホヤムシの宿主として知られるマボヤ28個体とエボヤ19個体を含むホヤ類を約500個体検査したが、ホヤムシは検出されなかった。顕微鏡観察では、ホヤムシとは形態が異なる鞭毛虫がしばしば観察されたが、ホヤムシ特異的PCRでは全て陰性となった。この結果から、本研究で調査した海域にはホヤムシは分布していないことが示唆された。ただし、マボヤとエボヤの検査個体数が多くなかったため、検出されなかった可能性も否定はできない。そのため、特にマボヤについては今後も継続して調査を行う必要があると考えられる。

本研究で検査したホヤ類のうち、マボヤならびにエボヤ以外については形態からシロボヤ *Styela plicata*、ベニボヤ *Herdmania momus*、カラスボヤ *Pyura vittata*、ミハエルボヤ *Pyura sacciformis* 等と同定された。ただし、形態観察では種の同定に至らなかった個体も多かった。18S rDNAの塩基配列からは、形態では種同定できなかった個体の一部がイガボヤ *Halocynthia igaboja* ないしはフタスジボヤ *Styela canopus* と同定できた。しかしながら、データベースに登録されている配列と一致しない個体も多く、種の同定ができなかった。そのため、シロボヤ科の不明種が2種(*Styelidae* sp.1,2)、ハルトボヤ属の不明種が1種(*Microcosmus* sp.)、ベニボヤ属の不明種が1種(*Herdmania* sp.)、マメイタボヤ属の不明種が1種(*Polyandrocarpa* sp.) となった。形態からカラスボヤないしはミハエルボヤと同定した個体は、遺伝子解析では4種に分かれると考えられた。しかしながら、データベースに登録されているカラスボヤの配列と一致するものではなく、ミハエルボヤについてはデータベースに配列が登録されていなかった。これら4種のうち、最も多く採集された1種(*Pyura* sp.1)はカラスボヤ属の *Pyura haustor* として登録されている配列と99.8%一致したが、本種は太平洋東岸に分布するとされており、日本で一般的に見られるものではないと考えられる。残りの3種については、同種と考えられる種の配列はデータベースに登録されていなかった。このように、国内の沿岸域で普通に見られるカラスボ

ヤ属のホヤ類について、分類の再検討を行うとともに、生物の種の分類に一般的に用いられる rDNA の塩基配列情報を整備していく必要性が明らかになった。

(2) ホヤムシ以外の鞭毛虫の検出と遺伝子解析

ホヤムシが含まれるネオボド目鞭毛虫の rDNA をターゲットとした PCR にて得られた増幅産物 (約 400 bp) の塩基配列を決定してデータベースに登録されている配列と比較した結果、ネオボド目鞭毛虫と高い相同性を示す 17 個の配列を得た。これらのうち、マボヤ、エボヤ、シロボヤ、ベニボヤから得られた配列は、ホヤムシの配列と 99.7%一致した。これらのホヤサンプルは、ホヤムシ特異的 PCR では陰性となった。そのため、ホヤムシと近縁な別種の鞭毛虫と考えられた。この鞭毛虫が被囊内部に寄生していたかどうかは不明だが、この結果は、ホヤムシ以外にもホヤに寄生する鞭毛虫が存在する可能性を示している。残りの 16 配列のうち、データベースに登録されている鞭毛虫と同種と考えられたものは 3 個のみであり、それぞれ *Parabodo caudatus*、*Neobodo designis*、種不明鞭毛虫と高い相同性 (>99.9%) を示した。*Parabodo caudatus* と *Neobodo designis* は、いずれも環境中に常在する自由生活性の鞭毛虫であり、採集したホヤの表面に付着していたものと考えられた。残る 13 配列については、データベース上で同一種と考えられるものが見つからなかった。これらの配列が得られた鞭毛虫がホヤの被囊内に寄生していたのか、それともホヤの表面に付着していたのかは明らかではないが、多様な未知のネオボド目鞭毛虫がホヤの周辺に存在することが示された。

遊出法で観察された鞭毛虫の一部については、ホヤムシの培養に用いられる液体培地に種々の抗菌・抗真菌薬を添加したもので分離・培養を試みた。しかしながら、鞭毛虫の増殖が認められたサンプルはなかった。

(3) マボヤ血リンパによるホヤムシの培養

マボヤの血リンパと混合したホヤムシは、虫体数が 10 分以内に減少し始め、1 時間後にはさらに減少した。血リンパから血球を除去した血漿と混合したホヤムシも、虫体数は 1 時間後に減少し、3 時間後にはさらに減少した。血リンパと血漿のいずれと混合した場合も、ホヤムシの形態は正常な紡錘形から球形化するなどの異常が見られた。また、複数の虫体が凝集する様子も観察された。このような異常は、血リンパと血漿のいずれとも混合していない懸濁液中のホヤムシでは観察されなかった。この結果から、マボヤの血リンパにはホヤムシを傷害し凝集させる作用があることが明らかとなった。すなわち、マボヤ血リンパが持つ生態防御能によって被囊以外の体組織では排除されることが、ホヤムシが被囊に限局して寄生している一因になっていると考えられた。一方で、別の要因としてホヤムシが栄養源とする物質が被囊にのみ存在する可能性も現時点では否定できない。ホヤムシが被囊で何を栄養源としているかは明らかになっていないが、この点についても今後の検証が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 柳田哲矢 |
| 2. 発表標題 マボヤ被囊軟化症の対策研究の現状と課題 |
| 3. 学会等名 令和元年度魚病症例検討会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 柳田哲矢 |
| 2. 発表標題 被囊軟化症はマボヤの生態防御能に影響を与えるか？ |
| 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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|