

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06203

研究課題名(和文) 2019年夏季に発生したアコヤガイ大量死は滑走細菌症か？-原因究明と診断法開発-

研究課題名(英文) Is the mass mortality of pearl oyster in the summer of 2019 a Tenacibaculosis ?

研究代表者

酒徳 昭宏 (SAKATOKU, Akihiro)

富山大学・学術研究部理学系・講師

研究者番号：20713142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、アコヤガイの大量死を引き起こす軟体部萎縮症の原因究明と、殻黒変病の原因細菌*Tenacibaculum* sp. Pbs-1株の特異検出法の開発である。以下の成果が得られた。

1. 軟体部萎縮症個体から*Vibrio* sp. MA3株を単離し、人為的に感染させて軟体部萎縮症を再現した。2. MA3株から溶血タンパク質Vhe1を精製し、特性解析した。3. MA3株の感染で心筋のびまん的な変性・壊死が起こり、心臓の機能不全と、それに伴う出入鰓血管を介した循環障害が起っていた。4. 殻黒変病の原因細菌*Tenacibaculum* sp. Pbs-1株のLAMP法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本の養殖アコヤ真珠は、世界的に非常に評価が高く、日本の水産物年間輸出額の11% (約330億円) を超える重要な輸出産業となっている。しかし近年、母貝の殻内側が著しく黒変し、低品質の真珠形成や死亡を引き起こす「殻黒変病」と、外套膜が極端に萎縮し死亡する「軟体部萎縮症」が全国の真珠養殖場で大きな問題となっている。これらの疾病の全容解明は、緊急性を要し、日本が誇る真珠養殖産業の持続・発展に不可欠の課題である。本研究成果は、その解決に向けた第一歩であり、学術的・社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study that we describe the isolation and characterization of a pathogenic bacterium as a first step towards resolving the recent disease outbreaks in cultured pearl oysters, as characterized by extreme atrophy of their soft tissues. In addition, we develop a specific detection method for *Tenacibaculum* sp. Pbs-1 associated with black-spot shell disease in akoya pearl. We isolated a *Vibrio* sp. strain MA3 from the mantle and other soft tissues of diseased pearl oysters. Strain MA3 possessed a pathogenic factor, hemolysin (Vhe1), of vibriosis. Moreover, the results of the infection-challenge experiment in this study provide evidence that strain MA3 was one of the putative causal agents of mass mortalities of farmed pearl oysters in Japan in the summers of 2019 and 2020. We developed and evaluated a rapid, specific, and sensitive loop mediated isothermal amplification assay to detect *Tenacibaculum* sp. Pbs-1 associated with black spot shell disease.

研究分野：環境微生物学

キーワード：真珠 アコヤガイ 軟体部萎縮症 殻黒変病 *Vibrio* sp. MA3株 *Tenacibaculum* sp. Pbs-1株

1. 研究開始当初の背景

日本の真珠養殖は三重県、長崎県、愛媛県を合わせて生産量の約9割を占めている。それらの地域で生産されるアコヤ真珠は、世界的にも非常に評価が高い。その年間生産量と輸出額はそれぞれ20トンと300億円を超え、地域経済・産業の根幹を担っているとともに、輸出品としても重要な産業となっている。2019年夏季、三重県志摩市の英虞湾やその周辺の真珠養殖場で、アコヤガイの稚貝を中心に外套膜が委縮する大量死(軟体部萎縮症)が確認された(図1A)。本疾病により、春先に産まれたほぼ全ての稚貝や、挿核個体の3-4割の個体が死亡しているケースもあることから休業を余儀なくされた業者もある。さらに、本症例は三重県だけでなく、愛媛県と長崎県でも報告されつつある。しかしながら、その原因は未だ明らかになっていない。このように地域経済・産業の根幹を担い、輸出品としても重要なアコヤ真珠養殖産業の持続と発展のために、本疾病の原因を明らかにすることは緊急性を要する重要な問題である。

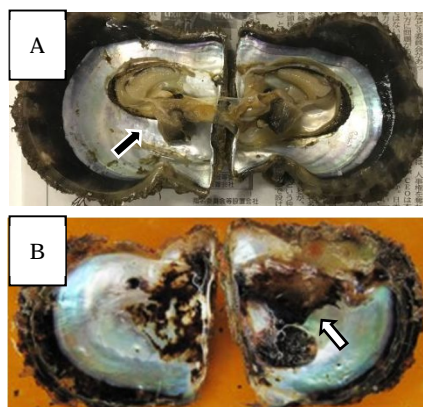


図1. アコヤガイの大量死を引き起こす2つの疾病。A: 軟体部萎縮症個体、B: 殻黒変病個体。軟体部萎縮症は外套膜が大きく委縮する(黒矢印)。一方で、殻黒変病は殻内側が強度に黒変化する(白矢印)。

その一方で、アコヤガイの殻内側が黒変化し、死亡や低品質真珠形成の要因となる殻黒変病(図1B)も知られている。

本疾病は、日本だけでなく、ベトナムや中国、タヒチなど様々な国の真珠養殖場で見られる未解決疾病で、1967年に初報告されて以来、その原因すら不明のままだった。そのような中、申請者らは、疾病個体の殻から滑走細菌 *Tenacibaculum* sp. Pbs-1 株を単離し、健全なアコヤガイに感染させることで殻黒変病を再現することに成功したことから、本菌株が殻黒変病の原因であることを明示した。

さらに、大変興味深いことに、申請者らが2019年に発生した疾病についても細菌学的に検査したところ、特徴的な症状を示した全ての病貝からも特徴的な細菌が単離された。このことから、2019年の大量死も細菌感染が原因で引き起こされている可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、軟体部萎縮症個体から分離した菌株を用いた感染実験を行い、コッホの四原則の成立を検証することにより、アコヤガイ大量死の原因を究明する。さらに、新たに分離された細菌の特徴や殻黒変病の原因細菌 *Tenacibaculum* sp. Pbs-1 株との異同を詳細に調べて、本菌の分類学的位置を明らかにするとともに、これらの細菌感染を迅速・簡便・特異的に診断できる方法も開発する。

3. 研究の方法

(1) 軟体部萎縮症個体から新たに単離された細菌の同定と細菌学的特徴の解析

本菌株の16S rDNAやDNA gyrase (*gyrB*) 遺伝子の塩基配列を決定し、NCBIのBLAST検索(<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)や系統樹を作成することで、菌種を推定する。次に、本菌株の生化学的性状をAPI 20NEやAPI Zymを用いて調べることで、相同性の高かった近縁種との比較を行い、菌種をより詳細に同定する。さらに、本菌株の生育可能な温度範囲、塩分濃度範囲を、位相差顕微鏡とバクテリア計算盤を用いて増殖曲線を作成して明らかにする。また、カナマイシンなどの抗生物質に対する感受性は、寒天培地と抗生物質を含んだ濾紙を用いて、形成された発育阻止円の大きさから薬剤に対する感受性を測定するディスク法で調べる。

(2) 軟体部萎縮症個体から新たに単離された細菌を用いた感染実験

供試貝には健全なアコヤガイ母貝を用いて、所定の菌濃度に調整した分離菌液を閉殻筋に注射することで感染させる。その後、自然発病時と同じ水温域(23~26℃)に調節し、無給餌で所定の期間飼育して死亡状況を観察する。そして、自然発病貝の病徴である外套膜の萎縮や軟体部の黒変化が再現されるか否か、接種菌が再分離できるか否か、および病変部において本菌が感染・増殖しているかを確かめる。さらに、瀕死あるいは衰弱した実験感染個体を採材し、ダビットソン液で固定後、常法に従って、パラフィン切片を作製し、HE染色、あるいはギムザ染色などを施して光学顕微鏡下で観察する。

(3) 軟体部萎縮症と殻黒変病の原因細菌の特異検出法の開発

16S rDNAと23S rDNAの間に存在するInternal Spacer Regionに特異的なプライマーを設計し、病原細菌特異的なりアルタイムPCR法やLAMP法を開発する。

4. 研究成果

(1) 軟体部萎縮症個体から新たに単離された細菌の同定と細菌学的特徴の解析

2019年夏季に細菌検査した全ての病貝から単離されていた、白色コロニーを形成する細菌の特徴を詳細に解析した。本菌株 (MA3株) の16S rDNAと *gyrB* の塩基配列、生化学性状試験、抗生物質耐性試験、増殖可能温度や海水濃度の検証の結果、MA3株は、*Tenacibaculum* 属の細菌ではなく、*Vibrio* 属の新種である可能性が示唆された。さらに、病原因子の1つである溶血タンパク質ヘモリシン (*Vhe1*) を検出し、その遺伝子配列を明らかにした [文献1]。そして、発現用ベクター-pET47b、発現用大腸菌 BL21 を用いて、*Vhe1* の大量発現系を構築後、アフィニティークロマトグラフィーで精製した。この精製 *Vhe1* を用いて、血球細胞に対する溶血活性と *p*-nitrophenyl esters を用いたホスホリパーゼ活性の詳細な解析を行った。その結果、*Vhe1* はこれまで報告例が少ないレシチン依存性ヘモリシン (LDH) に属し、溶血活性の至適温度と至適 pH は、50 と pH8.5 だった。また、アコヤガイの血球細胞に対する溶血活性も確認された。ホスホリパーゼ活性の至適温度と至適 pH は、50 と pH8.0 だった。また NaCl の濃度依存的に活性が上昇し、高い NaCl 耐性を示した。さらに、中鎖脂肪酸 (C8~C12) に対して高い活性を示した。

(2) 軟体部萎縮症個体から新たに単離された細菌を用いた感染実験

健全なアコヤガイに MA3 株を感染させ、病気の再現を試みた。その結果、水温 28 で実験感染させた全ての死亡個体で、自然発病貝と同様の症状 (外套膜の萎縮、鰓の黒変) が確認された。また、実験感染個体の組織から MA3 株が再分離された [文献1]。これらの結果から、2019年に発生した外套膜が極端に萎縮する大量死の原因は、*Vibrio* sp. MA3 株の感染も1つの要因であることが強く示唆された。一方、瀕死個体で観察された特徴的な病理組織学的所見は、心筋のびまん的な変性・壊死であった。したがって、MA3 株に感染した病貝では心臓の機能不全と、それに伴う出入鰓血管を介した循環障害が起こっているものと推察された。

(3) 軟体部萎縮症と殻黒変病の原因細菌の特異検出法の開発

MA3 株の高感度、定量的、特異検出可能な qPCR 法の開発を行った。本研究で開発した qPCR は、近縁な他の *Vibrio* 属細菌は検出しない高い特異性を持ち、一般細菌が多数存在する海水中からも MA3 株 (検出限界は 10cells) を定量的に検出することもできた [特許1, 文献2]。

一方、殻黒変病の原因細菌 *Tenacibaculum* sp. Pbs-1 株の特異 PCR 法と特異 LAMP 法の開発を行った。その結果、これまでに報告されている他の病原細菌の PCR 法よりも反応時間が約 30 分短い (反応時間 55 分)、2STEP PCR を開発することに成功した [特許2]。さらに感度や反応性の向上、目視検出を目指して LAMP 法を開発した。本研究で開発した LAMP 法は、近縁な他の *Tenacibaculum* 属細菌は検出しない高い特異性を持ち、迅速 (反応時間 35 分)、高感度 (検出限界は 5 fg、不顕性感染個体からも細菌を検出可能)、そして、細菌の有無を目視で検出できるように工夫した [特許3]。本法は、全ての反応が等温で行われるため安価な恒温槽で反応が可能なことや、目視検出が可能なことから現場での細菌 (感染) の検出に有用であると考えられた [文献3]。

[文献]

- (1) Sakatoku A., Hatano K., Tanaka S., Isshiki T. (2021) Isolation and characterization of a *Vibrio* sp. strain MA3 associated with mass mortalities of the pearl oyster *Pinctada fucata*. *Archives of Microbiology*, **203**: 5267-5273.
- (2) Hatano K., Sakatoku A., Tanaka D., Tanaka S., Isshiki T., Suzuki N. (2022) Development of a method of sensitively and specifically detecting a *Vibrio* sp. strain MA3 associated with mass mortalities of the pearl oyster *Pinctada fucata* martensii using quantitative PCR. *International Aquatic Research*, **14**: 241-250.
- (3) Sakatoku A., Suzuki T., Tatamiya Y., Seki M., Tanaka D., Nakamura S., Isshiki T. (2022) Development and evaluation of a rapid, specific, and sensitive loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Tenacibaculum* sp. strain Pbs-1 associated with black-spot shell disease in akoya pearl oysters. *Archives of Microbiology*, **205**: 43.

[特許]

- (1) アコヤガイの大量斃死を引き起こした病原菌の高感度・高精度の検出法. 特願 2022-072792. 鈴木信雄, 端野開都, 酒徳昭宏, 一色正.
- (2) アコヤ貝殻黒変病原因細菌の特異的検出法及びそのためのキット. 特願 2021-021128. 酒徳昭宏, 一色正.
- (3) アコヤガイ殻黒変病原因細菌を検出するためのプライマーセット、方法、及びキット. 特願 2022-101950. 酒徳昭宏, 一色正.

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 Akihiro Sakatoku, Kaito Hatano, Shoki Tanaka, Tadashi Isshiki	4. 巻 203
2. 論文標題 Isolation and characterization of a <i>Vibrio</i> sp. strain MA3 associated with mass mortalities of the pearl oyster <i>Pinctada fucata</i> .	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 5267-5273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00203-021-02457-6	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 Hatano K., Sakatoku A., Tanaka D., Tanaka S., Isshiki T., Suzuki N.	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of a method of sensitively and specifically detecting a <i>Vibrio</i> sp. strain MA3 associated with mass mortalities of the pearl oyster <i>Pinctada fucata martensii</i> using quantitative PCR.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Aquatic Research	6. 最初と最後の頁 245-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22034/iar.2022.1958494.1275	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 Sakatoku A., Suzuki T., Tatamiya Y., Seki M., Tanaka D., Nakamura S., Isshiki T.	4. 巻 205
2. 論文標題 Development and evaluation of a rapid, specific, and sensitive loop-mediated isothermal amplification assay to detect <i>Tenacibaculum</i> sp. strain Pbs-1 associated with black-spot shell disease in akoya pearl oysters.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00203-022-03384-w	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 酒徳昭宏, 一色正
2. 発表標題 高水温期に発生するアコヤガイ大量死の原因は細菌感染によるものか？
3. 学会等名 アコヤガイのへい死に係る情報交換会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hatano, K., Sakatoku, A., Tanaka, S., Isshiki, T. and Suzuki, N.
2. 発表標題 Isolation, characterization, and detection of a <i>Vibrio</i> sp. strain associated with mass mortalities of the pearl oyster <i>Pinctada fucata</i> .
3. 学会等名 金沢大学環日本海域環境研究センター国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 端野開都, 一色 正, 田中翔稀, 酒徳昭宏, 鈴木信雄
2. 発表標題 アコヤガイの大量死に関連する <i>Vibrio</i> 属細菌の解析
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hatano K, Sakatoku A, Tanaka S, Isshiki T, Suzuki N
2. 発表標題 Investigation about the <i>Vibrio</i> sp. strain MA3 with mass mortality of pearl oyster occurred in the summer.
3. 学会等名 The 6th International Exchange Seminar of Zoology（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 端野開都, 一色 正, 田中翔稀, 酒徳昭宏, 鈴木信雄
2. 発表標題 新規に単離されたMA3 株によるアコヤガイ感染症に関する研究
3. 学会等名 日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hatano K, Sakatoku A, Tanaka S, Isshiki T, Suzuki N
2. 発表標題 Vibrio sp. strain MA3 involves for the mass mortality of the summer in the pearl oyster, Pinctada fucata.
3. 学会等名 Joint Usage/Joint Research on Transboundary Pollution and its Impact on Social Environment (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 端野開都, 酒徳昭宏, 田中大祐, 田中翔稀, 一色正, 鈴木信雄
2. 発表標題 大量死したアコヤガイから単離された細菌を特異的に検出する定量PCR法の開発
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木貴也, 豊谷優莉, 関 誠, 田中大祐, 中村省吾, 一色 正, 酒徳昭宏
2. 発表標題 アコヤガイに殻黒変病を引き起こすTenacibaculum sp. Pbs-1株を迅速・特異的・高感度に検出するLAMP法の開発
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会 春季大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 アコヤ貝殻黒変病原菌の特異的検出法及びそのためのキット	発明者 酒徳昭宏(富山大学)、一色正(三重大学)	権利者 国立大学法人富山大学、国立大学法人三重大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-021128	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アコヤガイの大量斃死を引き起こした病原菌の高感度・高精度の検出法.	発明者 鈴木信雄, 端野開都, 酒徳昭宏, 一色正	権利者 国立大学法人金沢大学、国立大学法人富山大
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-072792	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 アコヤガイ殻黒変病原菌を検出するためのプライマーセット、方法、及びキット	発明者 酒徳昭宏(富山大学)、一色正(三重大学)	権利者 国立大学法人富山大学、国立大学法人三重大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-101950	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	一色 正 (ISSHIKI Tadashi) (30378319)	三重大学・生物資源学研究所・教授 (14101)	

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