

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：42686

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06244

研究課題名（和文）ニホンウナギ人工レプトセファルスで認められた不明病の病原体特定および疫学調査

研究課題名（英文）Pathogen identification and epidemiological investigation of an unknown diseases in hatchery-reared leptocephalus of Japanese eel

研究代表者

難波 亜紀（NAMBA, Aki）

日本大学短期大学部・その他部局等・助教

研究者番号：20445737

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）：ニホンウナギレプトセファルスの人工種苗研究施設において発生したCaecitellus属原虫の28SrDNAの塩基配列を決定し、3種に分類されることを明らかにした。また、得られた塩基配列情報を基に、Caecitellus属原虫特異的PCR法および定量PCR(qPCR)法を確立した。確立した両手法を用いて疫学調査を行った結果、親魚水槽に本原虫が多く分布しており、かけ流しで集卵することによりその量を大幅に減らすことができることを示した。また、親魚水槽から分離されたVibrio属細菌を餌料細菌として使用することで、Caecitellus属原虫をin vitro培養することができることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ニホンウナギレプトセファルスの生産過程において甚大な被害をもたらすCaecitellus属原虫の診断・検出系を確立した。また、海面に接する種苗施設は本原虫病の感染リスクがあることも示すことができた。本原虫は、特定の餌料細菌を加えることでin vitro培養が可能であり、今後、有効な消毒法や治療法の確立に繋げていくことが期待される。ニホンウナギの完全養殖の実用化は、まだ道半ばであり、本研究の成果は、魚病の発生リスクに備えた人工レプトセファルスの飼育施設や飼育技術開発に寄与し、ニホンウナギの完全養殖に関する研究活動の安定化をもたらすものである。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we determined the nucleotide sequence of the 28S rRNA region of protozoan pathogen (Caecitellus spp.) in leptocephalus that occurred at the artificial seedling research facility of Japanese eel, and showed that the pathogen can be classified into three species. Based on the obtained sequence information, furthermore, specific PCR and quantitative PCR (qPCR) methods for Caecitellus spp. were established. Epidemiological surveys using both established methods showed that the protozoan pathogen was abundantly distributed in the parent fish tanks and that its abundance could be greatly reduced by free-flowing during collecting eggs. We also showed that in vitro culture of protozoan pathogen can be achieved by using Vibrio isolate from the parent fish tank.

研究分野：魚病学、水族微生物学

キーワード：ニホンウナギ レプトセファルス 人工種苗 原虫症 Caecitellus属 完全養殖

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ニホンウナギの完全養殖は、我が国では1960年から取り組みが開始され、ホルモン剤投与による親魚の成熟誘導やサメ卵を基にした初期飼料の開発により、2012年に達成された。現在、複数の企業や研究機関において、初期飼料や飼育施設の改善による低コストの大量生産技術の開発が進められているが、人為的飼育環境下にある人工種苗のレプトセファルス(以後、人工レプトセファルスと称す)の時期に発生する不明病が新たな障害となっている。

本研究は、2014年に初めて確認された不明病を対象とした。本病に罹患した人工レプトセファルスは体表が白濁し、発症が確認されてから1週間で全て死亡した。そこで、みかけ健康なレプトセファルスの水槽に死魚を移したところ、正常魚においても発症が確認されたことから、本病は感染症であることが明らかとなった。一方で、病魚を滅菌濾過した濾過物には感染性は認められず、ウイルス病ではないと判断された。また、病魚から細菌や真菌は分離されなかった。そこで病魚の病理組織観察を実施したところ、直径4~8 $\mu$ mの原虫類が人工レプトセファルスの組織内に侵襲している像が観察され、本病が原虫感染症であることが疑われた。形態像のみでは詳細な分類を進めることができなかったが、2017年に再び本病が認められ、発生施設ではほぼ全ての人工レプトセファルスが死亡する甚大な被害が生じた。その際に得られた病魚を用いて、核酸の比較検出法であるBroad-range PCR法による解析を行ったところ、病魚特異的に鞭毛虫の一種である*Caecitellus*属と高い相同性を示す塩基配列が検出された。得られた塩基配列情報を用いて合成プローブを構築し、*in situ* hybridization (ISH)法により病理組織観察を実施した結果、2014および2017年の病魚の組織内に認められた原虫類が陽性反応を示し、本病は海洋環境下に常在する*Caecitellus*属に起因する原虫症であると推定された。しかし、同虫に起因する魚病報告はなく、飼育環境下における動態に関する知見も皆無であった。

上記状況は、既知の情報のみでは本病に対して有効な魚病対策を講じることが難しいことを意味している。また、海洋水を利用する種苗施設であれば本病の発生リスクがあるといえる。よって、該当原虫の検出や定量系を確立し、その分布・動態を明らかにすることができれば、種苗施設毎の本病の発生リスクの確認や予防対策法の構築に繋げていくことが期待された。

### 2. 研究の目的

現在、人工シラスウナギの大量生産を目指し、成長が良く安価な初期飼料や管理負担の少ない飼育設備の開発が進められている。しかし、技術の向上に伴い飼育可能密度も増加するため、魚病の発生リスクも上昇する。仔稚魚の生産現場では、多くの魚種で魚病情報の蓄積が進み、様々な対策(病原体の侵入遮断、飼育施設の消毒管理等)がとられている。一方、人工レプトセファルスにおいて魚病に関する知見は殆ど無く、魚病対策を視野に入れた技術開発研究は行われていない。人工レプトセファルスの飼育期間は150~400日かかるため、本病が一度発生すると年単位で研究予定に狂いが生じる。よって、本研究により得られる成果は、魚病の発生リスクに備えた飼育施設や飼育技術開発に寄与するだけでなく、ニホンウナギの完全養殖に関する研究活動に安定化をもたらすことが期待される。

なお、本研究対象とした*Caecitellus*属原虫は、海洋生態系を支えるプランクトンの一種として、海洋環境に広く分布している鞭毛虫である(Hausmann *et al.*, 2006)。そこで本研究では、同属原虫に起因する病魚の診断法の構築や疫学調査を目的として、核酸増幅技術に基づく検出・定量法を確立した。また、確立した上記手法を用いて、治療や予防法についての効果検証を行った。更に詳細な感染生態を把握するため、本虫の培養法についても検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) *Caecitellus* 属原虫の検出および定量法の確立

自然発症魚からの抽出DNAを鋳型として、真核生物28S rRNA遺伝子領域に特異的なユニバーサルプライマーであるD3-For-nおよびD5-Rev-n(Wylezich *et al.*, 2010)を用いてPCR増幅を行い、D1-D5ドメインのインナープライマーを設定することで*Caecitellus*属原虫(*Caecitellus* sp.)の28S rRNA全領域を決定した。

次に、*Caecitellus*属原虫に対する特異的プライマーやプローブを構築することで、同属を対象とした特異的PCR法および定量PCR(qPCR)法を確立した。すなわち、*Caecitellus* sp.、既報種または近縁種である*Caecitellus pasudoparvulus* (accession number EF681902)、*C. paraparvulus* (EF681903)、*Cafeteria maldiviensis* (MN315609)、*Ca. chilensis* (MN315621)、*Ca. graefeeae* (MN315607)およびヨーロッパウナギ*Anguilla anguilla* (XR\_004766723)の28S rRNA遺伝子領域の多重整列を行い、*Caecitellus*属原虫特異的プライマーC sp.-211FおよびC sp. 568Rを設計し、特異的PCR法を確立した。また、*Caecitellus*属特異的に増幅が可能なqPCRプライマーセットC spp. F、C spp. R、および蛍光プローブC spp. Probeを設計し、*Caecitellus*属原虫を対象とした定量PCR(qPCR)法を確立した。

## (2)本病既発施設内における疫学調査

井戸（海水） 井戸（淡水） 原海水、原淡水、飽和濃度塩水、雄親魚飼育水（淡水） 雌親魚飼育水（淡水） 雄親魚飼育水（汽水～海水） 雌親魚飼育水（汽水～海水） 人工レプトセファルス水槽注水（海水） および人工レプトセファルス水槽排水（海水）の計 11 地点において、季節毎に採水を行い、(1)で確立した特異的 PCR 法により、疫学調査を実施した。

また、上記結果として親魚水槽水において *Caecitellus* 属原虫が高頻度で認められたため、産卵後の集卵過程における同属原虫動態について、(1)で確立した qPCR 法を用いて解析を行った。

## (3) *Caecitellus* 属原虫の培養

*Caecitellus* 属原虫の培養は、抗生物質混合液を含む滅菌原海水に、病魚または(2)で同原虫陽性を示した飼育水を濾過したフィルター、および餌料用細菌を加え、23℃ で培養を行った。2 日～1 週間培養後、(2)で確立した菌数計算版や特異的 PCR 法により虫体の増殖を確認した。

## 4. 研究成果

### (1) *Caecitellus* 属原虫の検出および定量法の確立

*Caecitellus* 属原虫の 28S rRNA 遺伝子領域を決定して BLAST 解析を行ったところ、*C. pseudoparvulus*、*C. paraparvulus*、および既知種に該当しない *Caecitellus* sp. の 3 種に分類された。なお、本研究で確立した特異的 PCR および qPCR は *Caecitellus* 属特異的であり、種の特定には PCR 産物のシーケンス解析が必要であった。

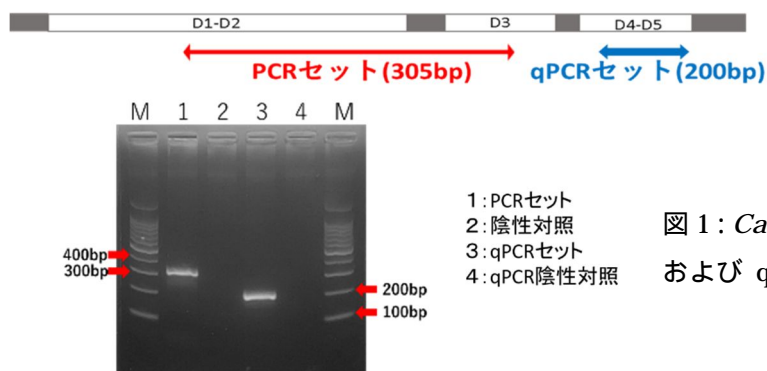


図 1: *Caecitellus* 属原虫特異的 PCR および qPCR 産物の電気泳動像。

## (2)本病既発施設内における疫学調査

既発施設内で採水を行い、濾過物から抽出した DNA を鋳型として *Caecitellus* 属原虫特異的 PCR を実施した結果、飽和濃度塩水、雄や雌親魚飼育水（淡水～海水） およびレプトセファルス水槽排水（海水）において、季節を通じて高頻度で陽性反応が認められた。これらの結果は、本原虫が親魚の飼育環境由来であることを示唆している。

また、かけ流しに伴う集卵排水を経時的に採取して qPCR を行った結果、1.5 時間でコピー数は 10 分の 1 以下に減少したことから、かけ流しで集卵することで、本原虫に起因する感染リスクを下げるができるものと考えられた。

## (3) *Caecitellus* 属原虫の培養

培養試験を実施した結果、親魚飼育水（海水）から分離された *Vibrio* 属細菌株を餌料細菌として使用することで、*Caecitellus* 属原虫の増殖が確認された。現在までに 20ml の培養系で  $10^4$  cells/ml まで増殖させることに成功しており、得られた培養原虫液を用いて、人為感染実験による病原性レベルの検証や消毒・治療法について検討することで、本原虫病の対策法を確立する必要がある。

### <引用文献>

Hausmann, K., Selchow, P., Scheckenbach, F., Weitere, M., & Arndt, H. Cryptic species in a morphospecies complex of heterotrophic flagellates: the case study of *Caecitellus* spp. Acta protozoologica, 45(4), 2006.

Wylezich, C., Nies, G., Mylnikov, A. P., Tautz, D., & Arndt, H. An evaluation of the use of the LSU rRNA D1-D5 domain for DNA-based taxonomy of eukaryotic protists. Protist, 161(3), 2010, 342-352.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伴野允勇 柳澤寛明 柴崎康宏 間野伸宏 難波亜紀 塚本勝巳
2. 発表標題 ニホンウナギ人工種苗レプトセファルスに病原性を示すCaecitellus 属原虫の疫学調査
3. 学会等名 東アジア鰻学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鎌倉市立山崎小学校 特別授業「ウナギのなぞを追って」（2021年2月） 横浜国立大学教育学部付属鎌倉小学校 特別授業「ウナギのなぞを追って」（2023年3月）
--

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	間野 伸宏  (Mano Nobuhiro)  (10339286)	日本大学・生物資源科学部・准教授    (32665)	

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