

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660159

研究課題名(和文)天然水産資源の減少への感染症の影響評価

研究課題名(英文)Evaluation of impact of infectious disease to natural fisheries resources

研究代表者

良永 知義 (Yoshinaga, Tomoyoshi)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：20345185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年資源量の減少が著しい海域のシャコの真菌・卵菌症について、検鏡、病理観察、分離培養法、分子生物学的手法によって調査したところ、東京湾、伊勢湾、瀬戸内海水島灘のシャコ真菌 *Plectosphaerella oratosquillae*、瀬戸内海播磨灘のシャコには卵菌 *Haliotricida noduliformans* が高率に感染していた。これらの感染は鰓に明確な病理的障害を引き起こしており、*P. oratosquillae* については飼育試験でその病害性が確認された。また、東京湾のシャコでは個体密度が激減する時期に病態を示す個体頻度が高く、感染症が資源量減少の一因になっていることが強く疑われた。

研究成果の概要(英文)：We examined the fungaland oomycete infections in Mantis shrimp(*Oratosquilla oratoria*) in some areas showing the depletion of Mantis shrimp populations, with microscopic observation, histopathology, culture and isolation, and molecular examinations. Mantis shrimp in Tokyo Bay, Ise Bay and Mizushima-nada (Seto Inland Sea) were infected with the fungus *Plectosphaerella oratosquillae* and those in Harimanaga (Seto Inland Sea) were infected with the oomycetes *Haliotricida noduliformans* with high prevalences. Both the pathogens considerably damaged the gill of affected Mantis shrimp. The pathogenicity of *P. oratosquillae* was confirmed in a rearing test. Furthermore, the percentages of affected Mantis shrimp were high in high-temperature seasons in Tokyo Bay, probably leading to the loss of Mantis shrimps older than one year. The fungal infection is suspected as one of major factors causing the population depletion in Mantis shrimp in Tokyo Bay.

研究分野：魚病学

キーワード：シャコ 感染症 真菌 卵菌

1. 研究開始当初の背景

近年、天然水産生物の中に、各地で同時期に資源が減少し、漁獲制限や放流などの回復策が講じられたのにも関わらず資源の低位状態が継続する種が目立つ。これらの資源減少している種の中には新たな感染症が発見されているものも多い。海外では感染症が資源減少をもたらしたことが明らかになっている例も少なからずあるものの、国内では感染症の資源減少への影響評価はほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

1990年代以降全国で資源量が減少しているシャコについて感染症の影響を調査するとともに、1990年代ウイルス(WSSV)が侵入して以降主要産地で資源量が減少しているクルマエビについてWSSVの感染状況を調査し、これにより感染症の資源減少の影響を評価する。

3. 研究の方法

(1) 各海域のシャコの病態調査・病理検査
各海域におけるシャコの病態を調査するために、東京湾で2014年6月および2015年5月・6月、伊勢湾で2014年6月・8月および2015年2月・10月、石狩湾で2016年6月、瀬戸内海・播磨灘および水島灘で2016年7月にそれぞれ漁獲された活シャコ個体、冷蔵もしくは冷凍個体および固定標本の各腹肢および鰓を実体顕微鏡下で観察した。加えて、得られた標本の一部をパラフィン切片とし、PAS染色とグロコットH&E染色を施した。

(2) 病シャコからの分離培養法ならびに分子生物学的手法による病原体の特定の試み
東京湾、伊勢湾、瀬戸内海の活きた個体から病変が認められる鰓を切り出し、PYGS寒天培地を用いた培養法によって真菌・卵菌の単離を試みた。単離された真菌・卵菌はPCRによって増幅したITS領域の塩基配列に基づいて種を同定した。加えて、シャコに病原性を有していると疑われている真菌 *Plectosphaerella oratosquillae* 及び卵菌 *Halioticida noduliformans* のPCR検査法を開発し、各地の病シャコにおけるこれらの真菌・卵菌感染状況を調べた。

(3) シャコの昇温飼育試験ならびに感染実験による *P. oratosquillae* の病原性の検証
P. oratosquillae に高率で感染している東京湾産個体(32個体)および水島灘産個体(32個体)を水槽内に収容、飼育水温を徐々に20から28まで上げ、前者は53日間、後者は38日間飼育した。飼育期間中に死亡した個体から鰓を採取して病理検査に供した。
加えて、真菌および卵菌の感染が認められていない石狩湾産シャコ5個体の腹前部に *P. oratosquillae* の分生子(5×10^6 個/ml)を注射し22で飼育した。

(4) シャコ個体群密度と病態変化の季節的動態の把握

シャコ個体群密度と病態の季節性を調べるため、神奈川県水産技術センターによって2006年4月~2016年12月、国立環境研究所によって2016年3月~12月に東京湾で試験採捕された活きた個体および固定標本の病態を同様に観察した。シャコを個体サイズに基づいて年級群を推定した上、病態ならびにその季節性を各推定年級群別に検討した。

(5)クルマエビのWSSV感染状況調査

浜名湖で漁獲されたクルマエビにおけるWSSVの感染状況を、2015年と2016年にそれぞれ1回ずつPCRならびにnested PCRによって調査した

4. 研究成果

(1) 各海域のシャコの病態調査・病理

各海域で採捕されたシャコの鰓、腹肢の病変を状態ごとにグレード化し、これを基にして病変出現状況の詳細把握を試みた。その結果石狩湾を除く全ての海域において白濁、褐色化(図1)及び欠損(図2)が確認され、中でも2014年6月には伊勢湾で採捕された全個体で、東京湾でも97%の個体で病変が確認されるなど、高率で病変個体が認められた。また、腹肢や鰓の欠損に関わらず、鰓の変色が確認された個体はどの海域においても6月から10月の高水温期にかけて多く認められたが、高水温期以外に変色が見られた個体は少なかった。変色した鰓糸を顕鏡したところ、真菌あるいは卵菌と思われる糸状の微生物が観察されることもあり、播磨灘および水島灘で採捕した個体では、それぞれ89%、50%と高率であった。なお、糸状微生物の径は播磨灘では約10 μ m、それ以外の海域では約2 μ mと海域によって違いが認められた。その他、水島灘で採捕した個体では鰓糸内部に分生子様構造物が観察されることもあった。

病理検査では、鰓および鰓基部には播磨灘産個体では径10 μ mの菌糸が、その他の海域の個体では径2 μ mの菌糸が観察され、PAS反応およびグロコットH&E染色より、これらの菌糸は真菌あるいは卵菌類のものであることが確認された。(図。過去の知見と比較すると、径10 μ mの菌糸は東京湾産シャコより報告されている卵菌 *Halioticida noduliformans*(図3)と、径2 μ mの菌糸は愛知および山口で報告されている真菌 *Plectosphaerella oratosquillae*(図4)のものそれぞれ形態学的特徴が一致した

また、菌糸の種類に関わらず炎症反応性細胞の浸潤と肉芽腫形成が観察された(図5)

(2) 病シャコからの分離培養法ならびに分子生物学的手法による病原体の特定の試み

2015年6月に分離を試みた東京湾産の21検体中5検体および2016年7月の瀬戸内海・

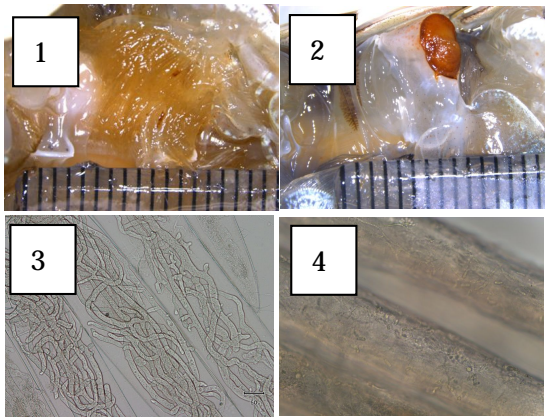


図 1-4 シャコの鰓の病変ならびに感染して卵菌・真菌

1. 褐色化した鰓、2. 欠損した鰓
3. *H. noduliformans*、4. *P. oratosquillae*

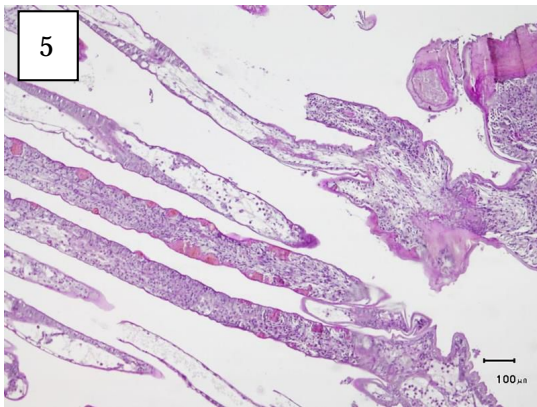


図 5 *P. oratosquillae* が感染したシャコの鰓糸

水島灘産 15 検体中 5 検体から真菌 *P. oratosquillae*、2014 年 6 月の東京湾産 24 検体中 6 検体および伊勢湾産 31 検体中 1 検体、2016 年 7 月の瀬戸内海・播磨灘産 22 検体中 12 検体から卵菌 *H. noduliformans* が単離された。以上の結果より、*P. oratosquillae* と *H. noduliformans* が病原体と仮定された。それ以外では *Aspergillus* 属および *Cladosporium* 属、*Penicillium* 属の真菌が多く単離されたが、これらの菌類は、病変組織中に観察された菌糸と形状が異なることから、日和見的に感染したものあるいは常在する真菌類のコンタミネーションであると考えられた。

さらに、2015 年 6 月の東京湾産および 2016 年 7 月の瀬戸内海・水島灘産のシャコの一部の病変組織から DNA を抽出し、真菌・卵菌の ITS 領域を PCR によって増幅し、一部はクローニングした上で塩基配列を決定した。その結果、東京湾産の 5 検体中 3 検体および水島灘産の 15 検体中 2 検体から *P. oratosquillae* が検出され、本真菌が病原体となっている可能性が高まった。

P. oratosquillae および *H. noduliformans* に特異的な single PCR ならびに nested PCR

を開発し、これを用いた調査の結果、真菌 *P. oratosquillae* は 2014 年 6 月東京湾産の 18 検体中 15 検体、2015 年 6 月の東京湾産 5 検体中 4 検体、2016 年 3 月の東京湾産 1 検体中 1 検体、2016 年 6 月の東京湾産 2 検体中 1 検体、2016 年 10 月の東京湾産 2 検体中 2 検体、2014 年 6 月の伊勢湾産 29 検体中 27 検体、2016 年 7 月の瀬戸内海・播磨灘産 30 検体中 1 検体、水島灘産 15 検体中 10 検体から検出された。卵菌 *H. noduliformans* は 2014 年 6 月の東京湾産 18 検体中 1 検体、2016 年 11 月の東京湾産 4 検体中 4 検体、2016 年 7 月の播磨灘産 30 検体中 10 検体、水島灘産 15 検体中 1 検体から検出された。

(3) シャコの昇温飼育試験ならびに感染実験による *P. oratosquillae* の病原性の検証飼育期間中に死亡した個体から鰓を採取して病理検査に供した。その結果、飼育開始時には鰓は白濁程度の軽い病変しか示していなかったが、飼育期間中には褐色化した鰓をもつ個体や鰓自体を欠損する個体が増加し、飼育終了までには前者は 90%、後者は 71% の個体が死亡した。なお、病変が認められた全個体の鰓より *P. oratosquillae* の菌糸が確認されたため、水温上昇により本種による感染症が進行し、宿主の死亡をもたらしたと考えられた。

さらに、感染実験では、2 週間以内に全ての個体が死亡、また鰓には *P. oratosquillae* の感染が確認された。病理組織学的検査の結果、菌糸は鰓基部と鰓糸においてのみ観察され、その他の部位からは認められなかった。これらを含む病理学的所見も天然海域で採捕された罹病個体のものと一致したため、*P. oratosquillae* はシャコに対し強い病原性を示すことが明らかになった。

(4) シャコ個体群密度と病態変化の季節的動態の把握

シャコの個体群密度ならびに病態変化は異なる年級群でほぼ同様の傾向をみました。鰓の病態を示す個体は、発生直後から現れるものの、それぞれの発生翌年の 6 月から 10 月にかけて非常に多くなり、それ以降に個体密度が急速に減少し、1 歳の産卵個体群はほとんど現れなかった。すなわち、発生翌年の高水温期の病状の進行はシャコ個体群サイズを減少させ、これにより、春の産卵群が消失してしまっていることが示唆された。

(1)-(4) の結果から、これらの真菌・卵菌はシャコの減耗に大きな影響を与え、資源量減少の一因になっている可能性が高い。

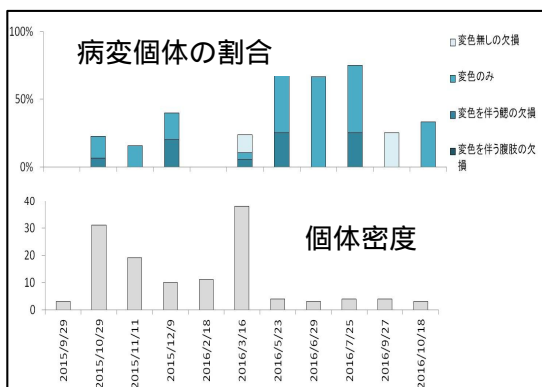


図5. 東京湾2015年級シャコにおける病態と個体密度の季節的変異

(5) クルマエビの WSSV 感染状況調査

調査フィールドとして予定していた浜名湖での調査において、WSSV の感染は認められなかったため、WSSV に関する調査は打ち切った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

窪山あずさ・飯田陽介・伊藤直樹・良永知義・倉田修・和田新平、天然シャコにおける真菌・卵菌類の感染状況把握の試み、平成 29 年度日本魚病学会春季大会、平成 29 年 3 月 12 日、日本大学生命資源科学部(神奈川県藤沢市)

窪山あずさ・飯田陽介・伊藤直樹・良永知義・倉田修・和田新平、天然シャコにみられる病態とその季節変化、平成 28 年度日本魚病学会春季大会、平成 28 年 3 月 12 日、東京海洋大学品川キャンパス

飯田陽介・窪山あずさ・伊藤直樹・良永知義・倉田修・和田新平、天然シャコからの真菌・卵菌の単利と遺伝子解析によるその同定、平成 28 年度日本魚病学会春季大会、平成 28 年 3 月 12 日、東京海洋大学品川キャンパス

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

良永 知義 (YOSHINAGA, tomoyoshi)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：20345185

(2) 研究分担者

和田 新平 (WADA, shinpei)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：90220954

倉田 修 (Kurata, osamu)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号：90277666

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()