TUMSAT-OACIS Repository - Tokyo

University of Marine Science and Technology

(東京海洋大学)

アミメノコギリガザミ幼生期に発生する壊死症状を伴う細菌性疾病の防除に関する研究

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2023-07-10
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 翠川, 優希
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://oacis.repo.nii.ac.jp/records/1909

博士学位論文の要約

博士論文題目：アミメノコギリガザミ幼生期に発生する壊死症状を伴う細菌性疾病の防除に関する研究

卒業年度：2019 年度 (2020 年 3 月)

所属：東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科応用生命科学専攻

学籍番号：1761012

氏名：翠川　優希

ノコギリガザミは *Scylla serrata*、*S. paramamosain*、*S. olivacea*、*S. tranquebarica* の合計 4 種類が知られている。現在多くの国でノコギリガザミ類の種苗を供給するために種苗の大量生産が試みられている。しかし、種苗生産施設では細菌や卵菌類による幼生の大量斃死が頻発しており、感染症がノコギリガザミエ種苗生産の最も大きな障害の一つとされている。2000 年に、グラム陰性長桿菌が疾病に罹患したアミメノコギリガザミ幼生から分離された。疾病に罹患した幼生は背棘部に壊死症状を伴うメラニン色素性結節形成が生ずる。しかしながら、この原因細菌の正確な分類や診断方法、薬剤を用いない防除方法は開発されていない。そこで本研究では、上記の壊死症状を伴うアミメノコギリガザミ幼生の大量死について、生化学性状試験、ゲノム解析、他の甲殻類への病原性を検討し原因細菌の同定と性状に関する知

見を得ること (第 2 章) 、原因細菌の診断を行うための検出ツールの開発 (第 3 章) 、薬剤を用いずに原因細菌の防除をする方法の開発 (第 4 章) を行うこととした。

第 2 章では、2000 年に分離されたアミメノコギリガザミ壊死症病原細菌 NY1 株の性状解析を行った。16S rRNA を使った分子系統解析により、アミメノコギリガザミ幼生の壊死症原因細菌 NY1 株は *Aquimarina hainanensis* と同定された。*A. hainanensis* は中国の海南省のエビ養殖場において疾病に感染したバナメイエビ *Litopenaeus vannamei* 幼生から分離され 2016 年に新種登録されている。*Aquimarina* 属細菌の多くは海洋環境から分離がされており、一般にゼラチン、カゼイン、キチン、アガロースなどを分解するものが多く、G+C 含量は 31 から 38%と低いことが知られている。これは本研究で得られた結果と矛盾せず、分子系統解析の結果を強く支持する。ゲノム解析により得られた合計 3.56 Mbp の DNA 塩基配列データについて、RAST によるアノテーションの結果、16 個のキチナーゼ関連遺伝子が得られた。BLAST を用いてアミノ酸の相同性検索を行ったところ、キチナーゼ関連遺伝子は *Aquimarina* 属または *Tenacibaculum* 属の Type IX Secretion System (T9SS) と相同性があった。T9SS は細菌の滑走運動やキチンの利用に必要な分泌装置であり、*Flavobacterium pychrophilum* においては病原性に関わることが報告されている。4 種類の甲殻類幼生を用いた感染実験の結果より、*A. hainanensis* NY1 株はアミメノコギリガザミ、アルテミア、ガザミ、ヤマトヌマエビに病原性を示したことから、分類階級の鋼をまたいで感染することが示唆された。また、*A. hainanensis* が疾病に感

染したバナメイエビ幼生から分離されていることから考えても、本菌が甲殻類の幼生に対して広範な病原性を持つことが示唆された。メイグリュンワルド-ギムザ染色、蛍光免疫染色ともに *A. hainanensis* NY1 株が幼生の付属肢の内部に菌塊を形成している様子が確認でき、メイグリュンワルド-ギムザ染色において菌塊周辺の細胞の退行性病変がみられた。以上より、*A. hainanensis* は付属肢付近に付着し、外殻であるキチンを分解することで幼生内部に侵入し疾病を引き起こすものと考えられる。

第 3 章では、アミメノコギリガザミ壊死症原因細菌検出法の開発を行った。NY1 株のキチナーゼ遺伝子をターゲットとして PCR 用のプライマーを作製した。石垣島の種苗生産施設で分離された 3 株およびリファレンスとなる *A. hainanensis* 1 株、*Aquimarina* 属細菌 12 種、フラボバクテリア科の細菌 3 種を対象に PCR を行い、*A. hainanensis* を特異的に検出できることが判明した。本検出法で、第 2 章で行った感染実験における経時サンプリングした個体から接種した NY1 株を検出できた。もう一つの検出法として NY1 株に対するウサギ抗血清を得た。原因細菌 NY1 のホルマリン不活化菌体をウサギに免疫し、抗血清を作製した。*Aquimarina* 属細菌は自家凝集性があり、凝集反応による検出は困難であったため、間接蛍光抗体による検出法を検討したところ *A. hainanensis* のみを特異的に検出できた。また、NY1 株が血清学的にも *A. hainanensis* に同定されることを示している。

第 4 章では、アミメノコギリガザミ壊死症防除法の検討を行った。食に供する生物の種苗生産において疾病制御に用いるツールとして薬剤を用いることができないため、自然由来の溶菌性バクテリオファージと拮抗細菌の使用を検討した。バクテリオファージと拮抗細菌はアミメノコギリガザミ飼育槽、沿岸海水、マングローブ、種苗生産施設排水、オニヒトデ・サンゴ水槽から分離した。分離されたバクテリオファージは形態の観察から 2 種類に分けられた（TJI1701P、TJI1707P）。*A. hainanensis* 由来のバクテリオファージがアミメノコギリガザミ親ガニ水槽や種苗生産施設の排水、同施設内のオニヒトデ飼育水槽、サンゴ飼育水槽、施設外のマングローブから分離されたことから *A. hainanensis* を親ガニが外部から持ち込んでいる場合や、種苗生産施設の給水や環境中で共生している甲殻類に感染している場合などが考えられた。拮抗細菌は 3 株 (TJI1713B、TJI1717B、TJI1752B) 分離され、16S rRNA の配列から *Pseudoalteromonas* 属、*Photobacterium* 属細菌であることが判明した。2 種類のバクテリオファージを用いて *in vitro* で *A. hainanensis* NY1 株に対する溶菌力を試験したところ、TJI1707P がより溶菌性が高いことが示唆された。そこで TJI1707P を用いてアルテミアを用いた感染防除試験を行ったところ、飼育水に対して 1.1×10^{2} PFU/mL のバクテリオファージを添加することで非感染区と同程度まで死亡を抑えることができた。また、拮抗細菌 3 種を用いて NY1 株の増殖抑制試験を行ったが、病原細菌の菌数は大きな差がみられなかった。バクテリオファージと同様にアルテミアを用いて感染防除試験を行ったところ、拮抗細菌を添加す

ることで死亡が抑えられる傾向にあったが TJI11717B および TJI1752B において長期間の拮抗細菌への暴露による影響が懸念された。過去に、Dan＆Hamasaki（2015）によってアミメノコギリガザミの種子生産における、拮抗細菌を用いた細菌性壊死症の制御法が検討された。プロバイオティクス細菌の投与は *A. hainanensis* を原因とする死亡を抑える効果があるものの、長期間拮抗細菌を飼育環境で維持することが困難である可能性が示されている。本研究の結果と合わせると、拮抗細菌を投与した場合 *A. hainanensis* による死亡を抑えつつ幼生が死亡しない濃度に拮抗細菌をコントロールすることは困難である。そのため、バクテリオファージ TJI1707P 株の添加は幼生へ直接影響を与えず、殺菌性も高いため疾病の防除に適していると考えている。

本研究では、*A. hainanensis* の性状解析および分類、検出法の開発、防除方法の検討が行われた。現在ノコギリガザミ *Scylla* spp.をはじめとした甲殻類の種苗生産は世界中で行われ、減少した甲殻類の野生資源量の回復や養殖に用いられている。種苗生産過程ではしばしば感染症が発生し甚大な被害を与えることが問題となる。現時点ではアミメノコギリガザミ以外では *A. hainanensis* を原因とした被害は確認されていないが、*A. hainanensis* は広範な宿主域が予測されることから今後、*A. hainanensis* を原因とする疾病が発生する可能性がある。日本のガザミ種苗生産施設における大量斃死時に、MA 上で *A. hainanensis* と似た黄色のコロニーが分離されており、この事例も *A. hainanensis* が原因である可能性が高いと考えている。現在

はアミメノコギリガザミのみで確認されている *A. hainanensis* による感染症が他の甲殻類種苗生産において発生した場合、本研究で作製した検出ツールが有効であると期待される。薬剤を使用しない疾病防除方法として、バクテリオファージと拮抗細菌の添加による方法を検討した。実際の種苗生産現場においては、外部から原因細菌の持ち込みを防ぐために、供給される海水の消毒 (紫外線殺菌等) と親ガニの搬入時のバクテリオファージによるトリートメントを行う。その後は産卵前の養成時、産卵後、幼生孵化直前に分けてバクテリオファージを飼育水に添加し、*A. hainanensis* を排除する。幼生孵化後はバクテリオファージの耐性菌出現を抑えるためにバクテリオファージの添加を控え、*A. hainanensis* の増殖が弱まる 60%程度に希釈した海水を用いて幼生飼育を行うことで *A. hainanensis* を原因とした疾病を抑えつつ種苗生産を行うことができると考えている。