

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 李 宣 姪

---

養殖アユのグルゲア症は、微胞子虫 *Glugea plecoglossi* がアユの腹腔内および内臓に白色の“グルゲアシスト”(キセノマ)を形成する疾病である。病魚に致命的な影響を与えることはないが、醜悪な外観からアユは商品価値を失う。また、種苗生産過程のアユにもグルゲア症が発生し、新たな問題となっている。微胞子虫は胞子の内部にらせん状に巻かれた極管を弾出することで原形質を宿主体内に送り込む。*G. plecoglossi* は経口および経皮的に感染するが、魚体内に侵入する過程や感染に至るまでの詳細な知見はない。そこで本研究では、ニジマスを実験魚とした感染系を確立するとともに、蛍光色素 Uvitex 2B による胞子壁の染色法および *G. plecoglossi* を特異的に検出する *in situ* hybridization (ISH) 法を用いてニジマスへの感染様式について検討した。さらに、アユ種苗生産で問題となる卵および仔稚魚への感染経路の推定を行った。

第 1 章では序論として研究の背景と意義を概説した。第 2 章では実験室での飼育管理がアユよりも容易なニジマスを用いた感染実験系の開発を試みた。まず、ニジマスに胞子懸濁液に浸漬、腹腔内注射、経口投与する方法を用いて感染させ、アユと同等に感染が成立することを確認した。また、Uvitex 2B 染色と ISH 法を組み合わせることによって、感染直後も含め、体内の様々な発育段階を特異的に検出することができた。さらに、改良された ISH 法の導入により、従来法よりも迅速な検査が可能となった。

ニジマスを用いた実験系が確立したことを踏まえ、第 3 章では、異なる経路で胞子をニジマスに感染させて、感染初期からキセノマ形成までの過程を調べた。また、感染のきっかけとなる極管弾出の刺激因子について検討した。

経皮感染：胞子懸濁液による浸漬感染では、胞子はニジマス体表の微小な傷口および側線の外部開口部に付着したが、組織内にはほとんど侵入しなかった。一方、胞子原形質は浸漬 5 分後には表皮内で検出され、時間の経過とともに下層へと移動した。綿棒を用いて体表の限定された部位に胞子を塗布すると、14 日目に直下の表皮および真皮にメロゴニー期、21 日目には真皮と皮下組織にスポロゴニー期、30 日目には皮下組織に発達したキセノマが見られた。以上のことより、経皮感染では、体表に付着した胞子から極管を通して上皮内に注入された胞子原形質が、上皮や真皮で発育してから皮下組織に定着してキセノマを形成していくと想定された。

経口感染：経口投与された胞子はニジマス腸管上皮にはほとんど付着や侵入はしなかった。しかし、投与 5 分後には胞子原形質が腸管粘膜上皮で観察され、時間の経過とともに下部組織へと移動した。7 日目には腸の粘膜固有層にメロゴニー期、21 日目には粘膜固有層に若いキセノマ、30 日目には腹腔内に発達したキセノマが観察された。この結果より、

胞子は腸管腔内で極管を弾出して原形質のみが組織内に注入され、粘膜固有層や粘膜下組織で発育し、腹腔に出て定着後に成熟していくことが示された。

感染制御因子の解析：ニジマス体表と腸の粘液は極管弾出を誘導しなかった。一方、ペプシン液 (pH 1) およびトリプシン液 (pH 9) に対しては高い弾出率を示し、経口感染では消化液による極管弾出が感染の引き金となっていると思われた。経皮感染にレクチンが関与すると想定したが、調べた8種類のレクチン (ConA, WGA, PNA, SBA, UEA-1, PHA-E4, DBA, LCA) はいずれも極管弾出には影響しなかった。胞子に結合性を示した ConA と WGA、結合性を示さなかった DBA と LCA で処理した胞子を塗布したところ、WGA 処理胞子区の感染率は 8.3% で、未処理区の 90% と比べ著しく低かった。しかし、この感染率低下のメカニズムは解明できなかった。

2002 年、宮崎県内で発生した人工種苗アユのグルゲア症では孵化 15 日齢のほぼすべての仔魚の腹腔内にキセノマが形成された。仔稚魚における感染様式は成魚の場合とは異なると考えられたので、第 4 章では、ニジマスの卵および仔稚魚を用いて、侵入時の魚の発育段階と感染経路の特定を試みた。発眼卵および 1 日齢の仔魚では浸漬感染は成立しなかったが、14 日齢以上の仔稚魚では腹腔内にキセノマが形成された。一方、稚魚の体表に胞子を塗布したところ、キセノマはすべて皮下組織に形成された。孵化後 16 日目に餌を求め浮上した仔魚および同齢の未浮上仔魚を用いた浸漬実験ではいずれも同程度に感染したため、摂餌行動と感染との関連は否定された。そこで、仔魚を蛍光ビーズ懸濁液に浸漬した結果、孵化後 12 日目以降から胃内に蛍光ビーズが多数観察された。以上のことから、12 日齢以降の魚は胞子を含む水を飲み込むことで経口的に感染すると考えられた。

以上の結果より、*G. plecoglossi* は侵入部位により感染様式が異なることが示された。また、人工種苗で見られる腹腔内キセノマは、仔魚が胞子を含む水を飲み込むことによつて感染することが示唆された。ほとんどの微胞子虫では、感染様式が不明のままである。本研究は *G. plecoglossi* の感染様式を明らかにし、今後の微胞子虫症の対策への応用の可能性を示したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よつて審査員一同は本論文が博士 (農学) の学位論文として価値あるものと認めた。