

論文の内容の要旨

農学生命科学研究科水圏生物科学専攻

平成 13 年度博士課程進学

氏名 伊藤 直樹

指導教官名 小川 和夫

論文題目

Studies on the identification and development of a parasite causing abnormal enlargement of the ovary in the Pacific oyster,

Crassostrea gigas.

(マガキの卵巣肥大症原因寄生虫の同定と発育に関する研究)

1. 序論

近年、カキ類の養殖技術は発達し、養殖対象種も増え、また養殖海域も拡大している。そのため、生産量は世界的に増加傾向にあり、水産増養殖における重要性は増してきている。一方で過密養殖や種苗の移動も頻繁に行われるようになって、いったん感染性の疾病が発生すると被害が急速に拡大し問題となっている。特に原虫性の疾病による被害は深刻であり、未発生国に新たな発生があった場合 OIE (国際獣疫事務局) に報告義務を伴う疾病として 5 種の原虫病が指定を受けているほどである。

日本国内のマガキ養殖においては、卵巣肥大症が大きな問題となっている。発症したマガキは収穫期に異様な外観を呈するため商品価値を失う。岡山県における被害額は、総生産量 37 億円 (2001 年度) に対し年間 1 億円以上と見積もられており、被害は深刻である。本疾病が 1934 年に初めて報告された当初はマガキの生理異常が原因と考えられた。しかし、その後の研究から本疾病は卵細胞内に寄生する原虫によって引き起こされる感染症であることが明らかにされた。1979 年に韓国においても同様の原虫がマガキに寄生することが報告され、後に新種として *Marteilioides chungmuensis* と命名されていたが、日本のマガキにみられる疾病との異同は確認されていなかった。また、マガキ体内では卵巣以外の器官、組織における原因寄生虫の観察の記録はなく、マガキ体外における存在も知られていないことから生活環は全く不明であった。

そこで、本研究では最初に、原因寄生虫の同定をおこなった。さらに、分子生物学的手法を用いた感度の高い検出法を開発し、実際にこれを用いることにより、これまでに得られていなかった生活環に関する知見を得ることができた。

2. 卵巣肥大症原因寄生虫の同定及び卵細胞内での発育

マガキの卵巣肥大症原因寄生虫を同定するために、電子顕微鏡による観察を行った。その結果、本寄生虫は、宿主であるマガキの卵細胞の中で、細胞内細胞（外側から一次細胞、二次細胞・・・と称する）を形成しながら孢子形成を行うことから、Paramyxia 門に属することが分かった。二次細胞である sporont 内に孢子が形成されること、孢子は三次細胞、四次細胞から構成されること、及び haplosporosome と呼ばれる細胞内小器官を有することを明らかにした。これらの特徴は、韓国で報告されている *M. chungmuensis* と一致しており、その結果、日本の種は韓国のもと同種であると結論した。

光学顕微鏡観察により、寄生虫の大きさや孢子形成段階は宿主細胞の発育と同調していることが判明し、このことから、本虫はまずマガキの濾胞周縁部の未熟卵細胞に侵入し、卵細胞の発育と同調しながら細胞内細胞の形成を繰り返すことが明らかになった。また、寄生を受けた卵細胞は正常の卵細胞と同様に、生殖細管を経てマガキ体外へ放出されることが推定された。

3. *M. chungmuensis* の 18S ribosomal DNA(18S rDNA)塩基配列の確定

これまで、*M. chungmuensis* は卵細胞内に寄生する虫体の記載はあるが、卵細胞外における発生段階等は全く研究がなされていなかった。近年、遺伝子を指標とした検出法が寄生原虫の未知の発生段階を解明するために有用であることが実証されている。そこで、本章では、遺伝子による検出法を確立するために、以下の方法で寄生虫の単離、寄生虫の遺伝子抽出ならびに塩基配列の解析を行った。

すなわち、感染したマガキの卵細胞を凍結・融解処理によって破碎した後、ショ糖とパーコールによる濃度勾配を利用して寄生虫の二次細胞を単離した。単離した虫体は DAPI によって DNA を含むことが分かった。そこで、単離した虫体から DNA を抽出し、真核生物の 18S rDNA に共通の universal primer を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をクローニングし、18S rDNA の全塩基配列（1744 bp）を得た。この塩基配列を元に寄生虫に特異的であると考えられる 3 つの probe を作製し、*in situ* hybridization (ISH)を行った結果、寄生虫のみに反応したため、得られた遺伝子は寄生虫由来であることが確認された。

4. 分子生物学的手法を用いた *M. chungmuensis* 検出法の確立

前章で解析した塩基配列のうち、*M. chungmuensis* に特異的な塩基配列をもとに、本寄生虫を特異的に検出する PCR 法及び ISH 法の開発を試みた。特異性を確認するために、*M. chungmuensis* と同じ Paramyxea 門に属し、ヨーロッパヒラガキの消化管に寄生する *Marteilia refringens* 及びオーストラリアのカキの一種の消化管に寄生する *M. sydneyi* との交差反応の有無を調べた。その結果、開発された合成 oligonucleotide probe の検出法は、従来の肉眼または組織切片による方法よりも感度が良好であった。また、これらの probe は *M. refringens* や *M. sydneyi* の遺伝子を増幅せず、特異性の高さが確認された。本実験の結果、今回開発した方法は、今まで知見の得られていないマガキ卵細胞外の *M. chungmuensis* 発育段階の検出に有用であることが示唆された。

5. *M. chungmuensis* の初期発育様式の解明

これまでの研究で、8月にマガキ種苗を感染海域に垂下すると、曝露90日前後で卵細胞内に孢子形成が観察されることが分かっている。そこで本章では、未感染であることが予めわかっている宮城産のマガキ種苗を8月に感染海域に7週間垂下し、1週おきに20個体ずつ採取した。また、一部の個体から体の前部、後部を採取し、前章で開発したPCR法及びISH法に供し、卵細胞外の初期発育段階を明らかにすることを目的とした。

その結果、PCR法により曝露1週間から実験終了時の7週間まで *M. chungmuensis* が検出された。また、ISH法による観察では、曝露2週後の個体において、外套膜と鰓の上皮組織及び結合組織内に、また3週間には唇弁及び軟体部の結合組織内に *M. chungmuensis* の寄生が確認された。また、4週後に初めて卵細胞内で孢子形成が観察された。一方、消化管、消化盲嚢などの消化腺からはまったく検出されなかった。

また、ISH法で寄生虫の感染が確認された部位を透過型電子顕微鏡による観察に供した結果、鰓の上皮組織、外套膜及び唇弁において細胞内細胞を内包する発育段階が観察された。さらに、卵巣の上皮組織周辺においても、細胞内細胞を内包する発育段階が確認されたが、鰓で観察されたものとはその形態が異なっていた。内包される二次細胞の大きさや構造から、これが卵細胞への侵入体であると推測された。

以上の結果より、*M. chungmuensis* は消化系組織からではなく、外部環境に最初に接触する鰓、外套膜及び唇弁から宿主に侵入し、マガキの体内を移動しながら分裂増殖をおこなうと考

えられた。そして、宿主へ侵入後 4 週以内に卵巣内へ移行、卵細胞内に入り胞子形成を行うことが明らかとなった。

従来の知見では、*M. chungmuensis* は卵細胞内に寄生するため、雌個体のみが感染すると考えられていた。しかし、PCR 法及び ISH 法によって、雄においても寄生虫が唇弁や生殖巣の周囲にある結合組織内で検出された。一方、精巣内には寄生虫は観察されず、PCR 法による結合組織内での検出率も徐々に低下していった。これらのことから、本寄生虫は雄のマガキにも感染するが、精巣内では胞子形成を行うことができずに排除されていくことが示唆された。

6. 総合考察

M. chungmuensis の生活環に関しては、光学顕微鏡による観察を基として研究が行われてきた。そのため、卵細胞内における胞子形成段階が集中的に研究される一方、卵細胞外の動向については全く知見が得られていなかった。また、研究室内での感染実験系が確立されていないことも、生活環の解明を妨げている。本研究では、まず *M. chungmuensis* の 18S rDNA を得るため寄生虫の単離をおこなった。その後、塩基配列を確定し、これを用いた鋭敏な検出法を開発した。さらに、感染海域に垂下して感染させたマガキに新しく開発した方法を用いることで、マガキへの侵入経路、卵細胞外での発育及び卵細胞への侵入経路といった生活環の一部を明らかにした。卵細胞に侵入後は、細胞内細胞を形成しながら 3 細胞で構成される胞子を形成した。以上のことより、本寄生虫は宿主へ鰓、唇弁及び外套膜を経て侵入し、その後、分裂増殖によって個体数を増し、卵巣へ移行後は卵細胞への侵入体を形成し、卵細胞内へ移行後に胞子形成を行うという 3 つの段階をマガキ体内に有することが示唆された。また、本寄生虫は雄にも感染するが、一連の胞子形成は確認されないことから、本寄生虫の胞子形成には卵細胞内という環境が必須であることが考えられる。

M. chungmuensis に近縁とされている *Marteilia sydneyi* は本研究と同様の手法を用いて、カキ体内での生活環が解明されている。この寄生虫の生活環と、本研究で明らかにされた *M. chungmuensis* の生活環は類似した点が多いことから、分裂増殖期、胞子形成前に行われる分裂期及びその後の胞子形成期という 3 つの段階は Paramyxia 門原虫の発育に共通するものであると考えられた。一方、近縁種の *Marteilia refringens* では自由遊泳性カイアシ類が中間宿主の一つであることが明らかにされている。本研究においては、*M. chungmuensis* のマガキ体外での生活環に関しての知見を得ることはできなかった。今後、本研究で開発された特異性が高く高感度の検出法を用いることで、本寄生虫の全生活環を明らかにすることができる可能性が示された。