

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 伊藤直樹

近年、日本のマガキ養殖において、卵細胞内に原虫が寄生することによって異様な外観を呈する、マガキの卵巣肥大症が大きな問題となっている。本疾病は1934年に報告されて以来、原因病原体の分類学的位置が確定していなかった。また、マガキの卵細胞内での発育は研究されているが、それ以外の生活環は不明であった。そこで、第1章でマガキ養殖における卵巣肥大症の問題点を整理したうえで、以下の研究を行った。

第2章では、本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、本虫は、宿主であるマガキの卵細胞内での発育様式及び微細構造より、韓国で報告されている Paramyxea 門の *Marteilioides chungmuensis* であると結論した。また、光学顕微鏡観察により、本虫の大きさと孢子形成段階は宿主細胞の発育と同調していることを明らかにした。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マガキ体外へ放出されるものと推定された。

これまで、本虫の卵細胞外における発育段階は全く研究がなされていなかった。第3章では、未知の発育段階を解明するために、遺伝子による検出法の確立を目指した。そこで、まず本虫を単離し、DNAを抽出後、18S rDNAの全塩基配列の解析を行った。この塩基配列をもとに本虫に特異的と考えられる3つのprobeを設計し、*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。

第4章では、前章で解析した塩基配列のうち、本虫に特異的な配列をもとに、PCR法及びISH法による検出系の開発を試みた。特異性を確認するために、本虫と同じ Paramyxea 門に属し、他のカキ類に寄生する原虫との交差反応の有無を調べた。その結果、開発された検出法は、従来の肉眼または組織切片による方法よりも感度が高く、近縁種との交差反応も無く特異性の高さが確認された。そのため、今回開発した方法は、本虫の未知の初期発育段階の検出に有用であることが示唆された。

第5章では、本虫の初期発育段階を明らかにするため、無感染マガキを感染海域に垂下飼育した後、前章で開発したPCR法及びISH法に供した。その結果、1週間後にはPCR法により本虫の感染が確認された。ISH法による観察では、まず、外套膜と鰓の上皮組織及び結合組織内に、次に唇弁及び軟体部の結合組織内に寄生が確認された。その後、卵細胞内で孢子形成が観察されたことから、本虫は外部環境に最初に接触する器官から宿主に侵入することが分かった。

また、ISH法で確認された未知の発育段階を透過型電子顕微鏡による観察に供した結果、鰓、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、細胞内に細胞を内包する発育段階が確認された。これらの結果より、本虫は、鰓、唇弁及び外套膜から侵入し、結合組織内で細胞内に細胞を形成しつつ分裂増殖を行い、その後、卵細胞内で孢子形成を行うことが明らかとなった。

*Marteilioides chungmuensis* の生活環に関しては、卵細胞外の存在については全く知見がなかった。本研究では、単離した寄生虫を用いて 18S rDNA 塩基配列を確定し、これを基にした鋭敏な検出法を開発した。さらに、初期感染のマガキにこの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を明らかにした。本寄生虫に近縁とされている *Marteilia sydneyi* 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、孢子形成前に行われる分裂期及び孢子形成期という 3 つの段階は Paramyxea 門原虫の発育に共通するものであると考えられた。また、本研究で用いられたのと同様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。

以上、本研究はマガキの卵巣肥大症において、原因寄生虫の同定をおこない、さらに分子生物学的手法を用いた検出法を開発、応用することで、従来得られていなかった生活環に関する知見を得たもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よっ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。