

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名

堤 信幸

1995 年以降、日本海沿岸を中心に重度の貧血症状を呈するヒラメが漁獲されるようになった。これらのヒラメには従来未知の吸血性単生類の寄生が高率に見られた。後にこの寄生虫は新種 *Neoheterobothrium hirame* (以下、本種) として報告された。本種の寄生レベルの高い水域ではヒラメの漁獲が減少しているという報告もある。本種は 1990 年代に突然出現し、その後全国に急速に分布を拡大したため、海外から侵入した寄生虫であることが疑われた。そこでまず、本種の由来を明らかにするために、本種と最も類似している北米産 *Neoheterobothrium* sp. について形態および遺伝子を比較した。次に、伝播に影響する寄生虫側の要因として産卵量、孵化率、感染力、成長、成熟、寿命から本種の繁殖力を明らかにした。また、伝播に影響する宿主側の要因としてヒラメの生体防御能を調べた。

1. 本種の由来

本種の新種記載に用いられた標本など、計 16 個体を、形態的に最も類似したアメリカ産サザンフラウンダー (*Paralichthys lethostigma*) より得られた *N.* sp. 7 個体と比較した。咽頭の測定値のわずかな違い以外に差はみられず、形態的には *N.* sp. と本種は同種であることが示唆された。

3 県から本種の計 9 個体とサザンフラウンダー寄生の *N.* sp. 8 個体を用いて SSU rRNA 遺伝子を、3 県から本種の計 28 個体と *N.* sp. 8 個体を用いて ITS1~ITS2 領域、COI 部分領域を比較した。その結果、すべての領域に両種間で変異は見られなかった。これらの結果は、*N. hirame* と *N.* sp. が同種であり、したがって本種は北米から侵入したことが強く示唆された。

2. 本種の生物学的特徴

本種の日間産卵数は 20℃ で最も多く、平均 781 個にも達した。孵化幼生を用いた感染実験では、15、20、25℃ で、寄生後それぞれ 59、38、31 日目から産卵が始まり、寿命は 122、66、52 日と推定された。孵化幼生の感染能力を調べる実験では、単位面積あたりのヒラメの個体数を n とすると、単位面積あたりの虫卵数 (X) と寄生強度 (Y) は $Y = \frac{X}{n}(1 - 0.8252^n)$ また

は $Y = \frac{X}{n}(1 - 0.6365^n)$ で表された。鳥取県で行われた野外調査から計算されたヒラメ密度と寄生

強度、実験で得られた本種の日間産卵数と産卵期間から、0 歳ヒラメが激減した時期の寄生強度を試算した。すなわち、初めに寄生した群 (第 1 世代) は産卵を開始する 7 月下旬から 1 虫平均で 7000 虫卵を産出 (水温を 25℃ と想定) することによって、0 歳ヒラメの寄生

強度は1999年の8月中旬で3.6~8.4虫/尾、2000年の8月中旬では5.6~13.2虫/尾に達したと推定された。さらに、第2世代が産出した虫卵による感染によって、8月下旬以降にはヒラメを致死させるのに十分な数の虫体が寄生したと想定された。

3. 本種に対するヒラメの宿主反応

本種に既感染の魚群および未感染の対照魚群を同居させ、本種の孵化幼生を添加することによって攻撃実験を行った。その結果、同居3週後の既感染魚の寄生数は対照魚に比べて有意に少なかったことから、感染したヒラメは何らかの宿主反応により寄生虫を排除することが示唆された。次に、既感染魚の寄生虫を駆除して2週間または5週後に未感染魚群と同居させ、同様な攻撃実験を行った。その結果、2週後の駆虫魚では成虫の寄生数が対照魚群に比べて有意に少なかった。5週後の駆虫魚では、抗体価が対照魚に比べて有意に高かったが、寄生数に差は見られなかった。そのため、抗体は本種に対するヒラメの生体防御にほとんど関与せず、防御反応の持続期間も限定的であると考えられた。

次に、本種の成虫の超音波破砕、遠心上清を抗原液とし、 Freund 完全アジュバントとの等量混合液を0歳ヒラメの皮下および腹腔内に接種し、抗体産生を促した。対照として、PBSとアジュバントの等量混合液、またはPBSのみを皮下に接種した。2回目の接種後に攻撃実験を行った。腹腔内抗原接種区では他の区に比べて抗体価が有意に上昇し、白血球数も増加したが、寄生数に有意な差はなかった。以上のことから、本種の寄生の阻害や成虫の排除に抗 *N. hirame* 抗体や白血球が関与している可能性は低いことが示唆された。

以上、本研究によって、*N. hirame* はサザンフラウンダーとともに北米から日本に持ち込まれたことが示唆された。また、ヒラメ資源量の減少が本種の寄生によると推定できた。本種の繁殖力は強く、寄生に対して宿主反応が有効に働かないことが、本種が日本の水域に急速に分布を広げた原因と考えられた。これらの結果は水産動物の防疫体制を考えるうえで、重要な知見を提供するもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委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。