

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 柳田 哲矢

1996 年以降、養殖トラフグに粘液胞子虫性やせ病が流行し、深刻な問題となっている。病魚の腸管から粘液胞子虫 *Leptotheca fugu* と *Myxidium fugu* および *Myxidium* sp. TP が発見された。そのうち *L. fugu* と *Myxidium* sp. TP が病原体とされたが、種の鑑別が困難であることが研究の進展を妨げてきた。そこで本研究では、対策を講ずるための基盤となる病原生物学的研究を行った。まず形態と遺伝子により病原体の分類学上の位置を確定した。次に、PCR を用いた感度の高い検出・診断法を開発した。さらに、病原体の伝播過程を解明するために、感染実験により水温の影響や感染力について検証した。最後に、新しく開発した診断法を用いて疫学調査を行い、発生状況の季節性や地域性に関する知見を得た。

1. 病原体の分類

Myxidium sp. TP の胞子の形態はヨーロッパで報告されている *Enteromyxum leei* と一致した。また、*M. fugu* の胞子は、*Enteromyxum* 属の形態学的特徴をよく満たした。次に、SSU rRNA 遺伝子解析を行った結果、*Myxidium* sp. TP の塩基配列は *E. leei* と 99.6% の相同性を示した。また、*M. fugu* は *Enteromyxum* 属粘液胞子虫と単系統のクラスターを組んだ。以上の結果から、*Myxidium* sp. TP を *E. leei* と同種とし、*M. fugu* を *Enteromyxum fugu* として分類を確定した。

さらに、鹿児島県の養殖マダイとイシガキダイに発生した類似の疾病の原因寄生虫を形態と遺伝子により *E. leei* と同定した。このことから、*E. leei* はトラフグ以外の魚種も関与する複雑な感染環を持つことが示唆された。

2. 検出法の開発

3 種の粘液胞子虫の SSU rRNA 遺伝子領域に対し、それぞれに特異的かつ感度が高い PCR 診断法を開発した。また、綿棒で肛門から採取した腸内容物を試料とすることで、魚を殺さずに検査する方法を開発した。これにより、本病の疫学調査を行うための技術的基盤を構築した。

3. 病原体の生物学的特性

無感染トラフグに *E. leei* を感染させ、異なる水温で 33 日飼育した。その結果、20 と 25 では寄生が認められたが、15 では認められなかった。次に、10 で長期飼育実験を行ったところ、12 週目に寄生が確認された。以上のことから、低水温下では *E. leei* は魚体内では増殖が抑制されるものの、越年魚（1 歳魚）のなかで生残し、翌年の感染源となることが示唆された。

次に、20 で 0-48 時間静置した *E. leei* の虫体懸濁液に無感染トラフグを浸漬した。その結果、*E. leei* の感染力は、海水中で 24 時間は維持されることが明らかになった。

マダイを感染トラフグと同居飼育および、感染トラフグの飼育排水中で飼育した結果、いずれの方法でもマダイへの感染が成立した。このことから、養殖場では異なる魚種間で本病が伝播する可能性が示された。

L. fugu 感染魚の腸管を無感染トラフグに経口投与しが、感染は成立しなかった。このことから、本虫は魚から魚へ直接伝播せず、交互宿主を介した感染環を持つと推察された。

4. 疫学調査

熊本、長崎、大分と福井のトラフグ養殖場で、種苗導入時から出荷まで *E. leei* と *L. fugu* の寄生を定期的に調査した。その結果、熊本、長崎、大分では *E. leei* の寄生率は高水温期を経て上昇し、低水温期に減少するという傾向を示した。福井では調査期間を通じて低い寄生率で推移した。

L. fugu は長崎と福井でのみ寄生が確認された。長崎では調査期間が短く、寄生の季節性は明らかに出来なかった。福井では種苗がすでに感染しており、病原体が種苗とともに人為的に移動することが明らかになった。その後寄生率は上昇せず、漁場に定着しなかった。

2004 年と 2005 年に長崎のトラフグ養殖場で大規模な寄生虫調査を行った。その結果、*leei*、*L. fugu* とともに感染域は調査年により異なった。すなわち、2 年連続で感染していた漁場や、逆に 2 年とも感染が見られなかった漁場が存在した一方、陽性から陰性になった漁場があり、寄生が必ずしも定着しない可能性が示された。養殖場で採集したトラフグ以外の天然魚 60 尾 (4 目 15 種) からはいずれの病原体も検出されなかったが、本病の伝播への天然魚の関与の有無については、更なる調査が必要であった。

以上、本研究によって、養殖トラフグの粘液胞子虫性やせ病の原因生物の分類や生物学的特性に関する基礎的知見が集積された。魚を殺さずに病原体を鋭敏に検出する方法の開発は、今後の本病の対策確立に有用な手段になることが期待される。これらの成果は、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。