

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 キアゾン カール マルクス アンダヤ

多くの海産魚には線虫が寄生するが、これらの線虫に関する分類や生物学特性に関する情報は大きく不足しているのが現状である。そこで本研究では、海産魚の線虫のなかでも、宿主の生殖巣や筋肉組織に寄生して宿主の生殖能や商品価値に影響を与えているフィロメトラ科線虫ならびにヒトに健康被害を起こすことが知られているアニサキス科アニサキス属線虫を研究対象として、これらについて、分類ならびに生物学的知見の集積を目的に研究を進めた。

1. フィロメトラ科線虫に関する研究

(1) 分類学的研究

様々な海産魚の生殖巣から得た *Philometra* 属 6 種ならびにブリの筋肉から得た *Philometroids seriolae* について分類学的研究を行った。一般にフィロメトラ科線虫では形態学的に種間変異に富んでいる雄虫を分類に用いるべきであると考えられている。しかし、実際には雄虫は非常に小型で採集が困難なため、これまで多くの分類が種間変異の小さい雌虫を用いて行われている。本研究では、*Philometra* 属 6 種について雌虫に合わせて雄虫も得ることができたので、これらの虫体の光学顕微鏡観察と走査型電子顕微鏡観察によって形態学的分類を行った。特に、これまでに様々な海産魚類から報告され、種特異性が低いと考えられてきた *P. lateolabracis* の雄虫と雌虫を模式宿主であるスズキから初めて採集し、再記載した。この種と、従来 *P. lateolabracis* と同定されていたイサキ寄生種とマダイ寄生種の形態を比較し、この 2 種は本種とは異なる新種(*P. isaki* および *P. madae*)であることを明らかにした。併せて、サワラ寄生種についても新種(*P. sawara*)であることを明らかにした。また、シログチ寄生種 (*P. sciaenae*)ならびにイトヨリダイ寄生種(*P. nemipteri*) を再記載した。*Philometroides seriolae* の雄虫を得ることはできなかったが、雌虫について再記載を行った。以上のように、調べたフィロメトラ科線虫 7 種はすべて独立した種であり、その結果は ITS2 領域の塩基配列からも支持された。フィロメトラ科線虫は宿主特異性が高く、これまで複数の宿主種から報告されている種は、その分類について再検討が必要であることが示された。

(2) 生物学的特性に関する研究

前述の *Philometra* 属 6 種は、生虫あるいは死虫の両方が宿主の生殖巣に見出された。これらの生殖巣に寄生する種では、虫体の発達ならびに寄生率は宿主の産卵期と同調しており、この同調性により、成虫は産み出した 1 期幼虫を容易に宿主体外に放出できることが示唆された。一方、*P. seriolae* はそのほとんどが筋肉内に寄生しており、虫体の一部を宿主体外に突き出して 1 期幼虫の放出をしていると考えられている皮下に寄生する成熟雌虫は、成熟虫体の一部 (8.7%) にとどまった。組織学的には、*Philometra* 属の生虫には宿主白血

球の浸潤が観察され、死虫はその周囲に繊維細胞層の形成が認められた。*P. seriolae* の周囲の筋肉内には炎症組織の層が形成されていた。

2. アニサキス科線虫

(1) 分類学的研究

ヒトへの健康被害が問題となるアニサキス科線虫のうち、同胞種であり形態学的識別は困難とされていた *Anisakis simplex* (s.s.) と *A. pegreffii* に着目し、分類学的研究を行った。

日本近海の海産魚から得た *A. simplex* (s.s.) と *A. pegreffii* の 3 期幼虫の ITS 領域を PCR-RFLP 法で解析して分子生物学的に同定し、さらに、ITS 領域と mt *cox2* 遺伝子の塩基配列を決定することにより、行った同定の妥当性を確認した。そのうえで、これらの 3 期幼虫ならびに *in vitro* 培養法で得た成虫を光学顕微鏡観察と走査電子顕微鏡観察で形態学的に比較した。その結果、この 2 種は胃長(ventriculus length)で識別可能であること、雄成虫では尾乳頭の配列に違いがあることがわかった。

日本北部で漁獲されたスケトウダラからアニサキス属線虫を採集し、その ITS 領域の PCR-RFLP 解析、ITS 領域と mt *cox2* 遺伝子の塩基配列決定を行った。その結果、スケトウダラにはこれまで日本近海から報告されている *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii* 以外に、*A. paggiae* と *A. brevispiculata* が寄生していることが明らかになった。この 2 種が日本近海の魚類から見つかったのは初めてである。

模式産地である地中海の *A. pegreffii* からは、極東で採集された *A. pegreffii* の 5.8S rDNA の塩基配列と 2 塩基異なる配列が報告されていた。そこで、あらためて地中海産の *A. pegreffii* を採集し、その塩基配列を決定したところ、地中海産の *A. pegreffii* も極東の種と同じ配列をもち、形態学的にも識別できないことが明らかとなった。

本研究で採集し同定した結果ならびに既報のデータをもとに魚類に寄生するアニサキス属線虫の分布状況を調べたところ、日本近海では *A. simplex* (s.s.) と *A. pegreffii* が卓越しており、その地理的分布に違いがあり、前者は北海道北部海域と太平洋の魚類に、後者は日本海と東シナ海の魚類に高頻度に寄生していることが明らかになった。

(2) 実験感染による研究

A. simplex (s.s.) と *A. pegreffii* はどちらも海産魚類に寄生が認められるものの、魚体内での寄生部位の違いはわかっていない。そこで、この 2 種の寄生部位を明らかにするため感染実験を行った。具体的には、この 2 種をニジマスとヒラメの 2 種の魚類に別々に経口投与し、虫体の生残、魚体内分布を観察した。その結果、*A. simplex* (s.s.) はどちらの魚種でも筋肉内に移行したのに対し、*A. pegreffii* はどちらの魚種でも体腔内にとどまり、ニジマスでは最終的に魚体内から消失した。これらの結果から、この 2 種の生残と寄生部位は魚種によって異なることが示唆された。

以上、本研究により、水産学的に重要でありながら研究が進んでいなかった海産魚類に寄生する 2 つの分類群の線虫類について、分類から生態にわたる様々な新しい知見が集積された。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。