

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 25 年度博士課程進学
氏 名 梅田 剛佑
指導教員名 良永 知義

論文題目 Studies on two *Perkinsus* species infecting the Manila clam
(アサリに寄生する *Perkinsus* 属原虫 2 種に関する研究)

国内のアサリには *Perkinsus* 属原虫が広く感染しており、アサリ *Ruditapes philippinarum* の資源量減耗の一因と考えられている。国内のアサリからは *P. olseni* と *P. honshuensis* の 2 種が報告されている。*P. olseni* は世界に広く分布し様々な貝類から報告されており、特にアサリ類と豪州産のアワビ類に病害性が強いことから、国際獣疫事務局 (OIE) により国際的な防疫対象に指定されている。一方、*P. honshuensis* は 2006 年に三重県のアサリから新種として記載されたが、その病害性等の詳細はほとんど明らかになっていない。

P. olseni は非常に広い宿主範囲を持つが、その宿主ごとの感受性の違いを調べた研究は少ない。本研究で用いたホンビノスガイ *Mercenaria mercenaria* は、北米原産の外来種だが、近年東京湾でも定着が確認されている。アサリと同じマルスダレガイ科に属し、干潟環境に生息する点も共通するが、これまでの調査では東京湾の個体に *Perkinsus* 属原虫の寄生はほとんど確認されていない。

近年の研究によって、*Perkinsus* 属原虫のアサリの資源量減耗への関与が明らかになってきた。しかし、宿主体内への侵入過程や、宿主の生体防御機構の回避機構といった点を含め、この寄生虫の生物学にはまだ不明な部分が多い。本研究では、フィールド調査、攻撃試験、*in vitro* 実験といった手法により、*P. olseni* と *P. honshuensis* の比較、アサリとホンビノスガイの比較から、アサリと *Perkinsus* 属原虫 2 種の宿主—病原体相互作用の解明を目指した。

【第 1 章】アサリに寄生する *Perkinsus* 属原虫 2 種の分布と環境要因の影響

Perkinsus 属原虫は国内のアサリに広く寄生していることが知られている。また過去の研究で *P.*

olseni の強度の寄生はアサリ、特に稚貝に致死性的であることが実験的に示されており、*Perkinsus* 属原虫の寄生がアサリの減耗要因となることを示唆している。しかし、これまでの調査では *P. olseni* と *P. honshuensis* の寄生は全く区別されてこなかった。このため、どちらがより減耗に関与しているのか不明で、研究に混乱をきたしていた。

一般に *Perkinsus* 属原虫の検出・定量には Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM) 培養法が用いられる。しかし、この方法は種レベルの識別ができない。そこで本章では、*P. olseni* と *P. honshuensis* を種特異的に定量する方法として、種特異的に設計したプライマーと、Chelex 樹脂による DNA 抽出法による Real-time PCR 検査法を開発した。なお、定量のための検量線は、既知量の各種培養栄養体を未感染アサリの鰓組織に添加したものを標準試料として作成した。

次に、Real-time PCR 法、RFTM 法、PCR-RFLP 法、Nested PCR 法の定量性と検出感度の比較を行い、加えて国内各地における *Perkinsus* 属原虫 2 種の分布を調査した。RFTM 法と Real-time PCR 法で測定された寄生強度は有意に相関し ($r^2=0.67$, $p<0.05$)、Real-time PCR 法の定量性が確認された。また、本研究で新たに発見された *P. olseni* の DNA 配列中の一塩基多型 (SNP) の存在のため、既報の PCR-RFLP 法は不正確であることが判明した。Real-time PCR 法と Nested PCR 法による調査の結果、天然のアサリにおいて *P. olseni* は寄生率・寄生強度ともに *P. honshuensis* よりも非常に高く、*P. honshuensis* はごく稀にしか検出されなかった。

このような *P. olseni* と *P. honshuensis* の寄生レベルの大きな違いは、アサリの生息する環境や、環境要因への反応の違いに起因するのではないかと考え、栄養体の増殖や、前遊走子嚢への変態、遊走子の発達に対する温度・塩分の影響を *in vitro* で比較した。温度適性には種間の違いは見られなかったが、塩分に関しては *P. olseni* の方が *P. honshuensis* よりもやや低塩分に適性を持つ傾向が見られた。しかし、両種ともアサリが生息する環境では十分に増殖・発達できる特性を持ち、2 種間の寄生率・寄生強度の大きな違いを説明できるほどの差は認められなかった。

【第 2 章】*Perkinsus* 属原虫 2 種とアサリの生体防御機構

第 1 章では、環境要因からは *P. olseni* と *P. honshuensis* の寄生率・寄生強度の違いを説明できなかった。このため、両種の寄生状況の違いにはアサリの生体防御機構への抵抗性が関係していると推測された。そこで第 2 章では、攻撃試験および *in vitro* 実験により、両種の宿主-病原体相互作用のメカニズムについて比較・解明を試みた。

まず、攻撃試験によって、栄養体のアサリ体内での増殖やアサリへの病害性、遊走子の感染性を比較した。未感染成貝の閉殻筋に栄養体を注射した場合、その後の寄生強度の上昇は両種ともわずかで、死亡した個体もほとんどいなかった。ただし、注射後初期の寄生強度は *P. olseni* の方が *P. honshuensis* よりも 10 倍程度高かった。次いで、遊走子を放出し始めた遊走子嚢の懸濁液に稚貝を浸漬し攻撃したが、寄生強度の上昇速度に 2 種間で差は見られなかった。また病害性に関しても、死亡個体の増加は平均寄生強度が軟体部湿重量 1 g あたり 10^6 細胞程度に達した時期からで、両種とも特に違いは見られなかった。ただし、稚貝を 1 個体ずつ同数の遊走子で攻撃したときには、初期の寄生強度は *P. olseni* の方が *P. honshuensis* よりも 10 倍程度高い値を示した。これらの結果から、両種の寄生強度の違いは宿主への侵入時あるいは侵入後かなり早い段階で生じていることが示唆された。

病原体の感染防除に際し、その侵入過程も重要な要素だが、*Perkinsus* 属原虫のアサリへの侵入過程はこれまでほとんど知られていない。本研究では蛍光色素で生体染色した遊走子を用いて感染実験を行い、鰓、唇弁、外套膜からの侵入を確認することができた。そこで、アサリから切り出した唇弁組織に遊走子を曝露する *ex vivo* 試験を行い、栄養体の数の経時的变化を *P. olseni* と *P. honshuensis* の間で比較した。この実験から、遊走子に曝露されたアサリ体内で、遊走子は曝露後 30 分という短時間で栄養体への変態を開始することが明らかになった。また、検出された栄養体数は *P. olseni* では 30 分後から 16 時間後までおおよそ一定であったが、*P. honshuensis* では時間とともに減少する傾向が見られ、侵入後の定着能力が種間で異なる可能性が示された。

二枚貝類では主に血リンパが生体防御機構を担っている。そこで、アサリ血リンパの液性成分（血リンパ漿）および細胞性成分（血球）が栄養体の生残・増殖に及ぼす影響を *P. olseni* と *P. honshuensis* で比較した。まず、血リンパ漿を混合した培地で栄養体を培養したが、両種ともに血リンパ漿による増殖阻害は観察されなかった。次いで、血球を栄養体とともに培養し、貪食した血球の割合を比較したところ、種間に有意差は見られなかった。しかし、血リンパ漿中、一定量の血球の存在下で栄養体を 7 日間培養し、その間の栄養体の生残・増殖を比較したところ、*P. olseni* では血球未添加の場合と同様、あるいはそれ以上に増殖したのに対し、*P. honshuensis* の増殖は血球添加区で有意に低く、血球による貪食が *P. honshuensis* の増殖を抑制することが示唆された。

通常、血球に貪食された異物は加水分解酵素により分解されるが、この酵素が効果的に働くには貪食胞内の酸性化が重要である。そこで、生細胞の酸性分画を染色する蛍光色素 LysoTracker Green DND-26 を用い、貪食胞内の酸性化率を指標に栄養体に対する細胞内消化を比較した。その結果、*P. olseni* と *P. honshuensis* の間で貪食胞の酸性化率に有意差は見られないことが明らかになった。しかし、対照に用いた酵母およびホルマリン固定栄養体に対しては貪食胞の酸性化が明確に観察されたのに対し、*P. olseni* と *P. honshuensis* の生きた栄養体に対してはほとんど酸性化が見られず、この 2 種はともに血球の細胞内消化を阻害することが示唆された。

【第 3 章】*P. olseni* とアサリおよびホンビノスガイの生体防御機構

先に述べたように *P. olseni* の宿主範囲は非常に広い。そこで本章では、アサリとホンビノスガイの比較から、*P. olseni* の病害性・宿主特異性のメカニズムの解明を目指した。

第 2 章と同様、成貝への栄養体注射、稚貝の遊走子曝露による攻撃試験から、両宿主種間の感受性の比較を行った。栄養体注射後、寄生強度はアサリでは増加したのに対し、ホンビノスガイでは速やかに減少した。稚貝の遊走子への曝露でも、曝露終了時点での寄生強度はアサリではホンビノスガイよりも 30~1000 倍程度高く、その後もアサリでは速やかに寄生強度が上昇したのに対し、ホンビノスガイでは上昇傾向は不明瞭であった。両種の稚貝を個体ごとに同数の遊走子で攻撃した場合も初期寄生強度はアサリの方が 10 倍程度高かった。これらの結果からホンビノスガイはアサリよりも *P. olseni* への感受性が低いことが示され、この違いは栄養体の宿主体内での増殖、および遊走子の侵入・定着過程の違いに起因することが示唆された。

より詳細にメカニズムを比較するため、栄養体に対する血リンパ液性成分・細胞性成分の影響についても第 2 章と同様の試験を行い、アサリとホンビノスガイ間で比較した。その結果、2 種の貝の血リンパ漿に栄養体の増殖を阻害する効果は認められなかった。栄養体を貪食した血球の

割合はアサリの方がホンビノスガイよりも有意に高かったが、貪食されたあとの栄養体の生残・増殖はアサリの方が高い傾向が見られ、アサリの血球は栄養体を貪食しても効率的に排除できないことが示唆された。また、アサリの方がホンビノスガイよりも貪食胞の酸性化率が低い傾向にあり、このことからアサリの血球は貪食後に栄養体を消化する能力が低いことが示唆された。

【総合考察】

本研究により、野外のアサリ個体群において *P. olseni* が *P. honshuensis* より大きく優占していることが初めて示され、*P. honshuensis* の寄生はアサリの減耗要因としては無視できることが示唆された。一方、このような寄生レベルの違いは、*P. olseni* の方が感染初期段階においてアサリの生体防御機構への抵抗性が高いためであることが示された。これは血球に貪食された後の栄養体の生残・増殖効率と関係している可能性がある。また、*P. olseni*・*P. honshuensis* とも血球に貪食された際に貪食胞内の酸性化阻害により細胞内消化を逃れていることが示唆され、貪食を受動的に利用し、アサリ体内での拡散・増殖を有利にしている可能性が示された。また、ホンビノスガイと比較して、アサリの方が *P. olseni* への感受性が高く、細胞レベルでも原虫の排除能力が低い傾向が示された。以上のように、アサリと *Perkinsus* 属原虫 2 種との宿主-病原体相互作用の一端を解明することができた。