

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03858

研究課題名(和文)原虫Perkinsus olseniがアサリに蔓延した生理生態学的要因の解明

研究課題名(英文)Characteristic physiology and ecology of a protozoan parasite Perkinsus olseni prevailing in wild stocks of Manila clam

研究代表者

伊藤 直樹 (Itoh, Naoki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授

研究者番号：30502736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,000,000円

研究成果の概要(和文)：日本国内のアサリには寄生原虫Perkinsus olseniが蔓延しており、資源量減少をもたらしていると考えられている。そこで、この蔓延する理由の解明は本虫による感染症対策の一助に繋がる。本研究では、本虫が保有するアサリへの感染を効率的に達成するメカニズムやアサリ体内での生存戦略の一端を明らかにするなど、本虫がアサリへ蔓延する理由と考えられる生理学的知見を得た。さらに、本虫の伝搬にはアサリの死亡が必要となるが、死亡が起こりやすい高水温時は感染源が増えるという感染拡大に有利な生態を備えることも明らかになった。また、今後の比較研究に有用なアサリに蔓延しない近縁種も国内で初めて発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Perkinsus属原虫は重要水産生物である二枚貝生産を脅かす寄生生物であり、本研究対象であるP. olseniは国際獣疫事務局による指定を受けた重要病原体である。本研究では本種が国内アサリ資源への蔓延に至った生理・生態学的特徴の一端を解明することに成功、加えて研究ツールの開発や新たな生活サイクルの提唱にも至った。これらの成果は本種による疾病を克服し安定的な二枚貝生産へ貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A protozoan parasite Perkinsus olseni is prevailing in wild stocks of Manila clam in Japan, and this research project aimed at understanding physiological and ecological adaptation of P. olseni to the host species. In this study, P. olseni were characterized physiologically and ecologically, and we clarified that the proliferation of P. olseni was not inhibited by host bivalves, and that production of the major infective stage increased in warmer season when mass mortality of Manila clams often occurs. These characters are considered to be parts of advantages for P. olseni to prevail in Manila clam stocks in Japan. We also examined host specificity and geographical distribution, and established an in vitro isolate of the related comparative species, P. beihaiensis, in Japan. In future, these information and research materials would be useful to reveal further physiological and ecological adaptation of P. olseni to the host species.

研究分野：魚病学

キーワード：原虫 二枚貝類 生体防御 宿主特異性 培養 栄養要求性 宿主寄生虫間相互関係 Perkinsus olseni

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

*Perkinsus* 属原虫には北米原産バージニアガキの生産量を激減させた *P. marinus*、カナダ西岸の養殖ホタテガイに9割超の死亡を引き起こした *P. qugwadi*、ヨーロッパおよびアジアに生息するアサリ類とオーストラリア産アワビ類の生産に深刻な死亡を引き起こす *P. olseni* など、貝類生産にとって重要な病原体を含む。日本国内では *P. olseni* と *P. honshuensis*、*P. beihaiensis* の3種が報告されており、中でも *P. olseni* はアサリに致死的であり、また日本沿岸域のアサリに蔓延状態に至っていることから、アサリ資源量減少に関与すると考えられている。一方、*P. olseni* と同様の生活史を有することが知られる他の2種、*P. honshuensis*、*P. beihaiensis* はアサリへの蔓延に至っておらず、*P. olseni* は他の2種とは異なり、アサリへの寄生と伝播に適応した特異的な生理生態を備えていると考えられていた。

しかし、*Perkinsus* 属原虫の生理や生態に関しては、バージニアガキに寄生する *P. marinus* を材料に研究が進められているが、なぜ自然界で特定の宿主個体群に蔓延にいたるのかを説明できる知見は得られておらず、*P. olseni* に関しても全く不明であった。

### 2. 研究の目的

*P. olseni* がアサリ個体群へ蔓延するには、宿主への侵入と宿主内での生残と増殖、さらにアサリ間での伝播を効率化させる必要があると考えられる。そこで、これらを効率化させる生理生態学的特性を理解することは、これらのサイクルを阻害する能力を有する耐病性アサリ品種の開発や、本虫の伝播が起りにくい生産方式の開発に大きく貢献できると考えられる。

そこで本研究課題では、*P. olseni* のアサリに対する侵入メカニズム、アサリ体内での生残機構および増殖機構、伝播に重要となる感染体(遊走子)形成機構について研究を実施した。さらに、*P. olseni* の比較対象として有用と考えられる近縁種 *P. beihaiensis* の株化と性質評価を行なった。

### 3. 研究の方法

#### (1) アサリに対する侵入メカニズムについて

*P. olseni* の感染体である遊走子を作成し、アサリに攻撃試験を行った。その後、アサリの各組織を経時的にサンプリングして *P. olseni* の虫体数を計数し、侵入部位と各組織への移行の様子を検討した。次に、宿主侵入時に遊走子は宿主因子と接触することで栄養体へ発達すると考えられたため、遊走子を侵入部位の組織抽出液内で培養、栄養体への発達効果を検討した。さらに、*P. olseni* が感染しない軟体動物からも組織抽出液を作成し、発達効果を調べることで、宿主特異性との関連を調べた。

#### (2) アサリ体内での生残機構および増殖機構について

アサリへ侵入した *P. olseni* は、宿主免疫細胞による貪食に曝されても生残する能力を有すると考えられる。そこで、*P. olseni* を貪食した免疫細胞の活性酸素系の活性化とリソソーム酵素による消化機構について検討を行った。また、*P. olseni* の宿主特異性に及ぼす影響として、栄養体は好適宿主であるアサリ体内で分裂増殖を活発に行うが、感染しない貝類体内では増殖が抑えられている可能性も考えられた。そこで、好適宿主、非好適宿主の成分が *P. olseni* 栄養体の増殖に及ぼす影響も検討した。

#### (3) 感染体である遊走子形成機構の効率化について

宿主死亡後、*P. olseni* は寄生ステージである栄養体から前遊走子嚢、遊走子嚢と発達し、感染体である遊走子を放出する。アサリ個体群間で伝播を広めるためには、感染力の強い遊走子を大量に作出することが重要となるため、この発育メカニズムの解明は重要である。そこで、栄養体から前遊走子嚢への発達に及ぼす環境要因の影響、必要となる成分の同定と最小培地の開発、さらに感染力の強い遊走子を大量に作出するために必要な要件を解析した。

#### (4) 近縁種 *P. beihaiensis* の株化と *P. olseni* との性質比較

*P. olseni* の近縁種である *P. beihaiensis* が国内に分布することは知られていたが、その分布やアサリへの感染性等の情報は不足している。そこで、国内における *P. beihaiensis* の分布を調べた上で、研究用の培養株を作成し、さらにこの培養株を用いてアサリを含む貝類に対する感染実験を行うことで、*P. olseni* との性質比較を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) アサリに対する侵入メカニズムについて

感染実験後の体表各組織における *P. olseni* の分布より、遊走子は唇弁や鰓、外套膜といったアサリの体表から侵入し、やがて体液を介して体各所に移行していく傾向が明らかになった(図1)。

この結果と、感染体である遊走子は宿主侵入後には寄生ステージである栄養体に発達することを考えると、宿主表面組織には、栄養体への発達を促進する因子の存在が示唆された。そこで、遊走子にアサリ各組織の抽出液を添加、栄養体への発達効率を比較したところ、体表組織からの抽出液が栄養体への発達効率を高めることが示された(図2)。

そこで、この栄養体への発達効率を高める働きが宿主特異性へ関与することが想定されたため、*P. olseni* への感受性が異なる他の貝類の体表組織抽出液を作成、栄養体への発達効率を比較した。しかし、比較した4種間で発達効率に違いは認められず(図3)、遊走子から栄養体へ発達する機構には宿主特異性は関係しないと考えられた。また、アサリに感染するものの蔓延に至っていない *P. honshuensis* でも同様の結果であり、*P. olseni* はアサリに対して侵入しやすいような機構を備えているとは考えられなかった。その後の実験でも、貝類に共通する成分が遊走子から栄養体への発達を促進させることが示唆され、上述の仮説を裏付けている。

## (2) アサリ体内での生残機構および増殖機構について

pHrodo で標識した *P. olseni* の栄養体をアサリ血球に食させ、形成された食胞内の pH を測定したところ、*P. olseni* を含む食胞の pH は zymosan に比して高く、*P. olseni* を含む食胞内ではリソソーム酵素活性の上昇しないことが示唆され、生残への適応戦略であると考えられた(図4)。しかし、*P. olseni* に感受性がないマガキ血球を使った試験でも同様の結果が得られたため、この機構が宿主特異性に寄与するとは言えない。

一方、*P. olseni* の増殖に及ぼす宿主因子の影響について評価したところ、好適宿主であるアサリ抽出液を添加した場合、*P. olseni* 栄養体の増殖は促進された。また、自然海域での感染が認められるムラサキガイの抽出液も同様に促進効果が認められた。一方、実験感染は成立するが自然海域での感染は認められないホンビノスガイ抽出液では増殖は抑制され、感受性が認められていないマガキ抽出液では強く増殖が抑制された(図5)。この結果から、*P. olseni* がアサリに寄生し蔓延に至る理由の一つとして、アサリ体内での増殖が抑制されないことが考えられた。一方、ムラサキガイの体内でも増殖抑制はかからないが、蔓延は報告されておらず、この原因は別にあると考えられた。

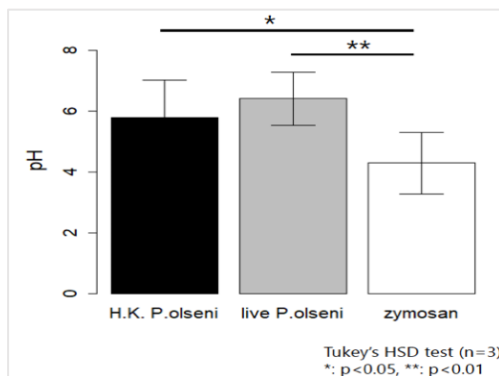


図4 異物を食して形成されたアサリ血球内の食胞 pH。HK *P. olseni*: 加熱死させた *P. olseni* の栄養体、live *P. olseni*: 生きている *P. olseni* 栄養体、zymosan: ザイモサン(対照区)

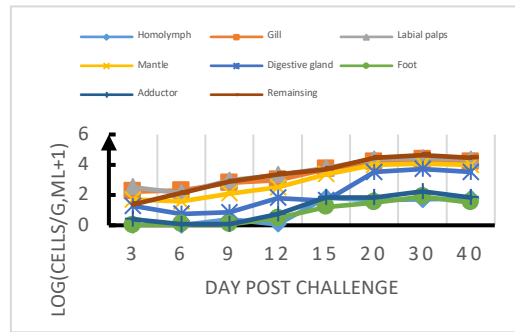


図1 遊走子による感染実験後の *P. olseni* 組織内分布の時間的変化。虫体数は RFTM 法で計数。N=5

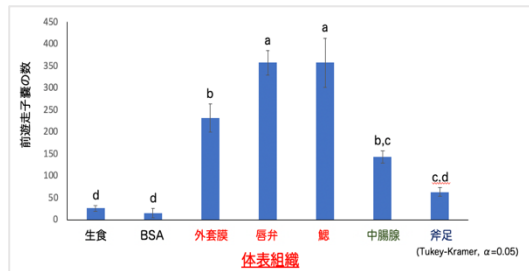


図2 アサリ各組織の抽出液を添加した遊走子の栄養体への発達効率の比較 (Tukey-Kramer,  $\alpha=0.05$ )

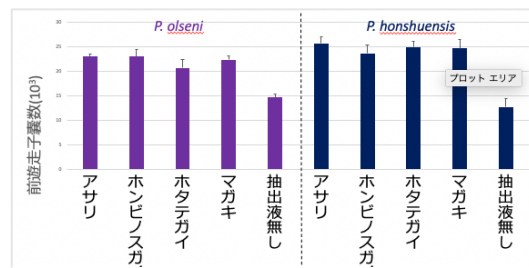


図3 感受性が異なる二枚貝の抽出液を添加した遊走子の栄養体発達効率の比較。*P. olseni*, *P. honshuensis* はアサリ・ホンビノスガイに感染性を有する。ホタテガイ・マガキからの報告はなく、感受性がないと考えられる。

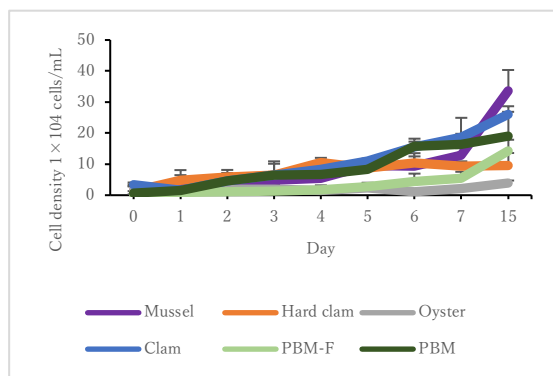


図5 二枚貝の組織抽出液を添加した *P. olseni* 栄養体の増殖の様子。

Mussel: ムラサキガイ、Hard clam: ホンビノスガイ、Oyster: マガキ、Clam: アサリ、PBM-F: 陰性対象、PBM: 栄養体用増殖地

### (3) 感染体である遊走子形成機構の効率化について

*P. olsenii* の寄生ステージである栄養体は、宿主死亡に伴う条件変化に応じて、遊走子形成の初期段階である前遊走子嚢に発達すると考えられていたが、感染組織と培養栄養体を用いた実験によりこの仮説を実証、この発達は比較的広い塩分範囲で起こることも明らかになった(図6)。さらにこの発達は水温に依存、高水温時に多くの前遊走子嚢が作られることを示した(図7)。以上より、*P. olsenii* はアサリが生息する塩分変化が激しい干潟域の環境に適応し、また、アサリの死亡率が高い高水温期に遊走子を多く作るというアサリへの感染に適した生態をもつことが考えられた。

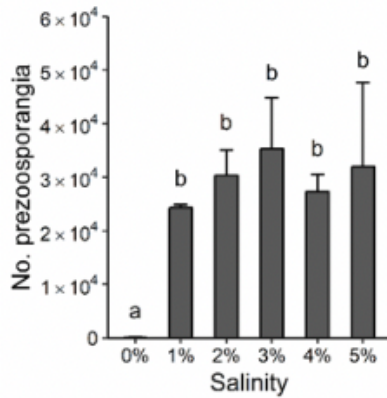


図6 アサリ組織と *P. olsenii* 栄養体を異なる塩分溶液に入れた際に形成された前遊走子嚢の数

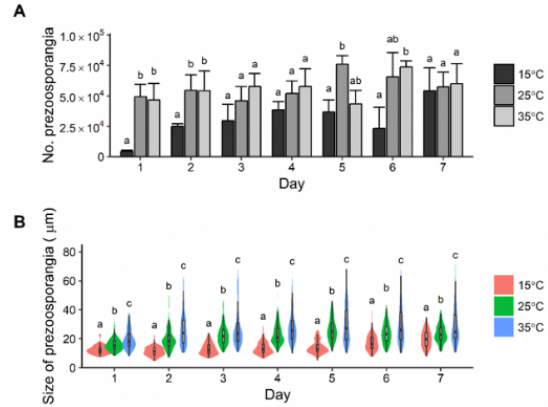


図7 アサリ組織と *P. olsenii* 栄養体を異なる温度の海水で培養した際の前遊走子嚢形成の様子。A: 前遊走子嚢の数、B: 形成された前遊走子嚢のサイズ。

なお、栄養体が前遊走子嚢に発達する際には脂質と酵母抽出物を要求することが分かった。アサリに特異的に存在する因子等を必要としないことから、この過程に宿主特異性は関与しないと考えられる。興味深いことに、遊走子形成は栄養成分を含む培地内で早く進むことから、この段階でも何らかの栄養を必要とすることが示唆された(図8)。このことは、腐敗した宿主組織より海水中へ放出されてから遊走子形成が起こるという従来の仮説と相入れない。そこで、前遊走子嚢が新たな個体の外套腔内に取り込まれ、そこで栄養を含む宿主体液等に触れながら感染体である遊走子が形成されるという新たな生活サイクルが想定され、この際の栄養成分と宿主特異性についても検討する必要があると考えられた。

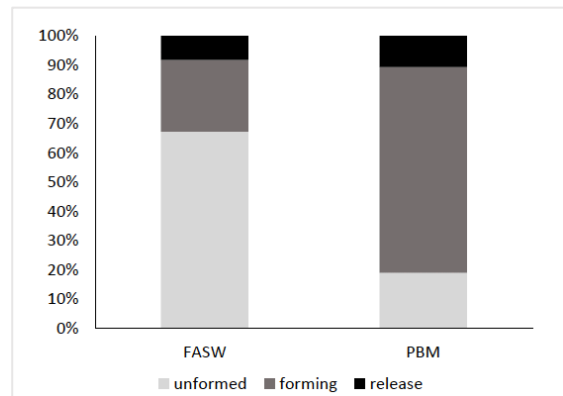


図8 濾過滅菌海水(FASW)と培地内(PBM)に静置した前遊走子嚢の発達段階の割合。unformed: 発達停止、forming: 遊走子形成途中、release: 遊走子放出終了

### (4) 比較対象である近縁種 *P. beihaiensis* の株化と *P. olsenii* との性質比較

*P. olsenii* の近縁種である *P. beihaiensis* は国内に生息するが、アサリにおける感染例は報告されていないため、*P. olsenii* とは宿主特異性が異なり比較対象として適すると考えられた。そこで本種の宿主範囲や分布を調べたところ、今のところ、東京湾内のムラサキガイのみ寄生し、予想通り国内アサリへの蔓延には至っていないと考えられた(図10)。

そこで、実験に使用する培養株を作出し、培養細胞を各種二枚貝に注射する感染実験を行ったところ、*P. beihaiensis* はムラサキガイの他、アサリやアコヤガイに感染するが、マガキに感染しないことが分かった(図11)。そのため、本種も *P. honshuensis* と同様、アサリへの感染性は有するものの蔓延には至っておら

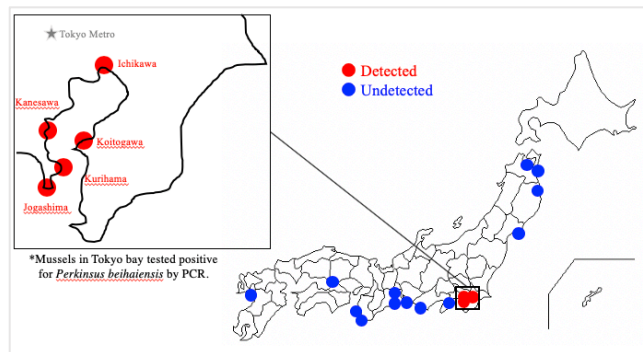


図10 ムラサキガイにおける *Perkinsus beihaiensis* の感染調査結果。赤: 感染した個体が見つかった海域、青: 感染した個体が見つからなかった海域

ず、*P. olseni*との生理・生態比較を行う上での重要な対象種となることがわかった。

(5) 研究のまとめ

以上の研究から、感染体である遊走子の宿主内侵入機構には、*P. olseni*がアサリへの蔓延に至る理由を見いだすことができなかった。また、宿主体内侵入後の生残においても特異的なメカニズムの存在は示唆されなかった。一方、*P. olseni*の栄養体はアサリ抽出液を添加すると増殖が活性化するが、感染が成立しないマガキ抽出液では増殖の活性化は認められなかった。後の実験で、加熱したマガキ抽出液を添加すると *P. olseni*の増殖は起こるため、マガキは *P. olseni*の増殖抑制因子を有し、一方のアサリはこれを有しないと考えられる。従って、*P. olseni*がアサリへの蔓延に至る理由の一つに、宿主であるアサリが有効な増殖抑制因子を有さないことが考えられた。また、*P. olseni*の感染体である遊走子形成は宿主の死亡が必須であるが、アサリの死亡が起こりやすい高水温期は *P. olseni*の遊走子形成にも適していることは、*P. olseni*がアサリへの蔓延に至る理由の一つと考えられた。さらに、本研究では従来と異なる伝播経路が想定され、その中で、今後検討すべき新たな host-parasite interaction も考えられた。

今回の研究により、*P. olseni*の生理・生態についての新たな知見や研究技法の開発に成功した。今後、アサリへ蔓延に至っていない *P. honshuensis* や *P. beihaiensis* についてもこれらの項目を検討することで、*P. olseni*がアサリへの蔓延に至った特的な理由の解明に繋がることが期待される。

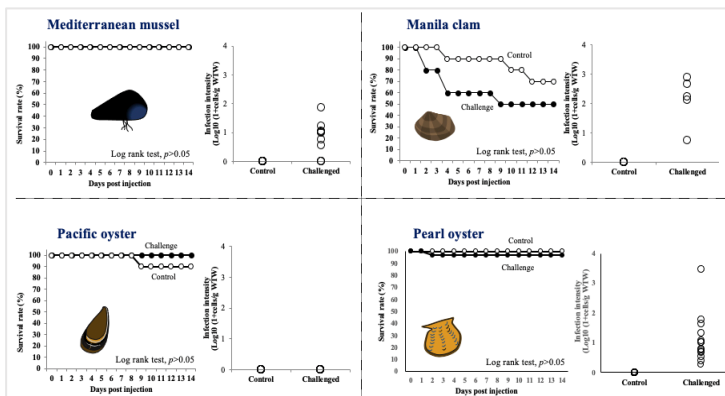


図 11 *P. beihaiensis* 培養株による各種二枚貝に対する攻撃試験の結果(左:死亡率,右:感染強度)。  
Mediterranean mussel: ムラサキイガイ, Manila clam: アサリ, Pacific oyster: マガキ, Pearl oyster: アコヤガイ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Wang Yu, Yoshinaga Tomoyoshi, Itoh Naoki	4. 巻 153
2. 論文標題 New insights into the entrance of <i>Perkinsus olseni</i> in the Manila clam, <i>Ruditapes philippinarum</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Invertebrate Pathology	6. 最初と最後の頁 117-121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jip.2018.03.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 伊藤直樹	4. 巻 83
2. 論文標題 二枚貝寄生原虫と宿主生理との関係	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本水産学会誌	6. 最初と最後の頁 833
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Itoh Naoki, Komatsu Yoshiki, Maeda Kazuki, Hirase Shotaro, Yoshinaga Tomoyoshi	4. 巻 166
2. 論文標題 First discovery of <i>Perkinsus beihaiensis</i> in Mediterranean mussels ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) in Tokyo Bay, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Invertebrate Pathology	6. 最初と最後の頁 107226 ~ 107226
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.jip.2019.107226	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Umeda Kousuke, Yang Xia, Waki Tsukasa, Yoshinaga Tomoyoshi, Itoh Naoki	4. 巻 209
2. 論文標題 The effects of environmental and nutritional conditions on the development of <i>Perkinsus olseni</i> prezoosporangia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Parasitology	6. 最初と最後の頁 107827 ~ 107827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -



〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Naoki Itoh
2. 発表標題 Studies for Infectious Diseases of Aquatic Organisms
3. 学会等名 E3-start 2018: International Academic R&D Festival (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Xia Yang, Kousuke Umeda, Tsukasa Waki, Tomoyoshi Yoshinaga, Naoki Itoh
2. 発表標題 NOVEL INSIGHTS IN DIFFERENTIATION OF <i>Perkinsus olseni</i> TROPHOZOITES INTO PREZOOSPORANGIA
3. 学会等名 Aquaculture 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshiki Komatsu, Tomoyoshi Yoshinaga, Naoki Itoh
2. 発表標題 ESTABLISHMENT OF <i>Perkinsus beihaiensis</i> ISOLATE FROM THE MEDITERRANEAN MUSSEL ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> ) IN JAPAN
3. 学会等名 10th Symposium on Diseases in Asian Aquaculture (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoshiki Komatsu, Tomoyoshi Yoshinaga, Naoki Itoh
2. 発表標題 EXPERIMENTAL INFECTION TO ASSESS PATHOGENICITY OF <i>PERKINSUS BEIHAIENSIS</i> AGAINST DOMESTIC BIVALVE SPECIES IN JAPAN
3. 学会等名 110th Annual meeting of National Shellfisheries Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田和輝・良永知義・伊藤直樹
2. 発表標題 宿主因子を含まない Perkins us olseni の前遊走子嚢 作出 培地の開発
3. 学会等名 令和元年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	良永 知義  (Yoshinaga Tomoyoshi)  (20345185)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授   (12601)	
研究分担者	高橋 計介  (Takahashi Keisuke)  (80240662)	東北大学・農学研究科・准教授   (11301)	