

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18380112

研究課題名 (和文) 人工培養法を用いた海産白点虫の宿主 寄生体関係および防除に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on host-parasite relationship and control of *Cryptocaryon irritans* using artificial culture technique

研究代表者

良永 知義 (YOSHINAGA TOMOYOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：20345185

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：海産白点虫; *Cryptocaryon irritans*; in vitro 培養; 化学療法; ワクチン

1. 研究計画の概要

開発した人工培養法を利用することにより、海産白点虫病に関する基礎研究から防除のための応用研究までの広い範囲の研究を大幅に進展させようとするものである。具体的には、(1)人工培養法では本虫が細胞を摂食し成長する様子を直接観察できるという利点を利用して、宿主と本虫の宿主 寄生体関係の解明のための研究を、特に宿主細胞のアポトーシス(細胞の自殺)と本虫の摂餌機構に注目して行う。(2)また、薬剤開発の一環として、人工培養法を用いた薬剤のスクリーニング法の開発を行うとともに、実際に薬剤の有効性のスクリーニングを行う。(3)さらに、ワクチン開発に資することを目的に、人工培養法を用いて増やした虫体による魚類の免疫法の検討を行う。

2. 研究の進捗状況

(1)宿主と本虫の宿主 寄生体関係については、人工培養系内での宿主細胞が断片化するとともに断片化した核を有すること、DNAの電気泳動像は約180bpのはしご状構造になること、アポトーシス検出のためのTUNNEL法に陽性をしめすことを見出し、本虫が宿主細胞のアポトーシスを誘導し、その結果形成されたアポトーシス小体を餌として取り込んでいることを証明された。また、あわせて共焦点レーザー顕微鏡により虫体内での宿主細胞の消長ならびに虫体の核の発達の観察できることが明らかとなった。(2)人工培養用培地中に薬剤を添加し、その中における海産白点虫の生残と成長を観察するという薬剤のスクリーニング法を開発した。この方法を用い、動物の原虫症の治療にもちいら

れる様々な薬剤をスクリーニングした。その結果、0.1mM以下の極めて低い濃度で殺虫効果をもつ薬剤を複数みだすことができた。これらの薬剤について、その魚毒性をヒラメを用いて検討し、魚毒性は経口治療薬として使用できる程度に低いことが明らかとなった。(3)ワクチン開発を目的に、in vitro培養系をもちいた虫体の大量培養法の開発を試みた。市販の遠心式限外ろ過装置のろ過膜をナイロンメッシュに取り替えるたものを用いることで、効率的かつ虫体へのダメージの低い感染幼虫濃縮法を開発することができた。一方、培養系からの虫体の効率的な取り出し方法を見出すことができず、in vitro培養による虫体の大量培養法の確立にはいたっていない。

3. 現在までの達成度

おおむね順調に進んでいる。

宿主 寄生体関係については計画通りの成果が得られている。薬剤のスクリーニング法の開発については、所期の目的を果たし、実際に有効な薬剤の候補を得ることができた。加えて、候補となる薬剤のin vivoでの効果の検定にまで研究を進展することができ、期待以上に進捗している。免疫法の開発について、技術的な進展が隘路となり、この点については進捗が遅れている。これらを総合的に判断し、おおむね順調に進んでいると評価する。

4. 今後の研究の推進方策

残された研究機関が1年であることを鑑みて、薬剤のin vivoでの薬剤の有効性の検討を中心に研究を進める。大量培養法の開発につい

ても、さらに取り組むが、免疫法の開発については、大量培養法を確立することができたのちに行うこととする。

〔その他〕

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Yoshinaga T., Akiyama, K., Nishida, S. Nakane, M., Ogawa, K., Hirose, H., In vitro culture technique for *Cryptocaryon irritans*, a parasitic ciliate of marine teleosts, Diseases of Aquatic Organisms, 査読有り, 78巻, 2007年, 155-160

〔学会発表〕(計3件)

Yoshinaga, T., Nishida, S., M., Nakane, M, Ogawa, K. and Hirose, H. Involvement of host apoptosis in the feeding of *Cryptocaryon irritans*, the ciliate causing the white spot disease of marine fish; *in vitro* and *in vivo* studies. 7th International Symposium on Fish Parasites, 2007年9月26日, Viterbo, Italy

Yoshinaga T. Development and utilization of an in vitro culture technique for studies on *Cryptocaryon irritans*, the causative agent of white spot disease of marine fishes7th Symposium on Diseases on Asian Aquaculture2008年6月25日台北(台湾)

Takagishi, N., Yoshinaga, T., Ogawa, K Effective challenge method for *Miamiensis avidus* causing scuticociliatosis in olive flounder *Paralichthys olivaceus*,第5回日本魚病学会国際シンポジウム2008年10月18日東京

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

取得状況(計 件)