

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20580194

研究課題名（和文） 脳寄生虫による宿主魚の行動操作メカニズム

研究課題名（英文） Mechanisms in manipulation of host fish behavior by brain parasites

研究代表者

横山 博（YOKOYAMA HIROSHI）

東京大学大学院・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70261956

研究成果の概要（和文）：海産魚の脳寄生虫病について、寄生虫による宿主の行動操作という観点で研究を行った。実態調査の結果、数種の *Kudoa* 属粘液胞子虫と吸虫性旋回病の原因となる *Galactosomum* sp. が検出された。脳内の特定部位への寄生により異常遊泳が起こることが病理組織検査と脳内へのビーズ移植実験により示唆された。また、早朝に旋回行動を誘発することにより終宿主である水鳥に捕食されやすくなることが推察された。

研究成果の概要（英文）：From the viewpoint of parasite manipulation of host fish behavior, brain parasitic diseases in marine fish were studied. Field surveys revealed that *Kudoa* spp. (Myxozoa) and *Galactosomum* sp. (Trematoda) were found in the brain of some wild and cultured fishes. Histopathological observation and experimental implantation of glass beads in fish brain suggested that parasite infection in the specific sites of the brain caused the abnormal behavior of the host fish. It was speculated that the characteristic whirling behavior manipulated by *Galactosomum* sp. in the early morning increased susceptibility to predation by bird final host.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：魚病学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：粘液胞子虫、吸虫、水産学、脳神経疾患、行動制御

## 1. 研究開始当初の背景

日本の海産魚養殖において、脳神経寄生虫による病害は古くから知られている。最も有名なものは、ブリの粘液胞子虫性側湾症（いわゆる骨曲がり）である。この病気については、粘液胞子虫の1種 *Myxobolus acanthogobii* (= *M. buri*) がブリ

の第四脳室にシストを形成すると、物理的に神経系が圧迫されて体側筋の活動異常を起こし、正常な遊泳ができなくなった結果、脊椎が湾曲すると考えられている。また、最近の研究によると、魚類の遊泳運動は中脳被蓋の内側縦束核で制御され、この部分を局所的に電気刺激

することで人為的に旋回運動が誘起されることが示された。

*M. acanthogobii*による側湾症とよく似た疾病として、*Galactosomum* sp. (メタセルカリア幼虫)の脳寄生による吸虫性旋回病と、各種海産魚の異常遊泳をもたらす脳粘液胞子虫 *Kudoa yasunagai* がある。吸虫性旋回病は、養殖のトラフグ、ハマチ、イシダイだけでなく、天然のカタクチイワシやキビナゴなども罹ることが知られている。寄生虫学的に興味深いのは、病魚が水面に浮上して狂奔・旋回遊泳することにより、終宿主である水鳥(ウミネコ)に捕食されやすくなる、つまり寄生虫が中間宿主の行動を制御しているように見えることである。*K. yasunagai* の場合は、生息域が底棲性環形動物の分布に規定されてしまうことを考えると、宿主魚が鳥に捕食されて他海域に運ばれれば、自らの地理的分布の拡大に役立つであろう。ある養殖場での吸虫性旋回病発症率は5~20%にも達すると報告されており、沿岸生態系の食物網にも少なからず影響を与えていそうである。しかし、実際のフィールドでどれくらいこのような現象が起きているのか、最近はほとんど調べられていない。

寄生虫が宿主の行動を操るという現象は古くから知られている。とくに比較的増殖力の低い寄生虫は、中間宿主の行動を操作することで生活環を効率よく回す方法を進化させたのではないかと考えられているが、そのメカニズムにまで踏み込んで研究された例は少ない。いままで想定されている仮説は、寄生虫シストによる神経系の物理的圧迫説と、寄生虫による脳内神経伝達物質かく乱説があるが、必ずしも証明されたとは言えないのが実情である。

## 2. 研究の目的

粘液胞子虫や吸虫の脳寄生が、実際のフィールドでどのように、どの程度、宿主魚の行動を操作しているのか実態調査を行うとともに、宿主操作のメカニズムについて実験的に明らかにする。寄生虫シストによる神経系の物理的圧迫説と、寄生虫による脳内神経伝達物質かく乱説を検証する。以上より、脳寄生虫による宿主操作の実態とメカニズムの一端を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 脳寄生虫の実態調査

*Galactosomum* sp.と *K. yasunagai* の感染がみられる養魚場で、トラフグ、ブリ、スズキ等を定期的に採集して、各寄生虫

の寄生率、寄生強度(シスト数)、寄生部位、魚種間の感受性の違いを調査する。また、養殖魚と天然魚における寄生状況を調べ、宿主の行動操作の実態を明らかにする。*Galactosomum* sp.は、脳を摘出して2枚のスライドガラス間で圧平し、実体顕微鏡下でメタセルカリアの有無を観察することで寄生の有無を判定する。*Kudoa* spp.は、脳を採取してウェットマウントにより光学顕微鏡で胞子の有無を観察または18S rDNAに基づく種特異的プライマーを設計し寄生虫の遺伝子の有無を検出することで判定する。

### (2) 発病メカニズムの解析

脳寄生虫の寄生を受けた魚の脳を病理組織学的に観察し、脳内の寄生部位と発病との関係を調べる。実験魚としてキンギョを用い、寄生虫と同じサイズのガラスビーズを脳内に移植する脳外科手術を行った後、蘇生させて術後の遊泳行動の変化を観察することにより、異常遊泳が再現されるかどうか調べる。また、感染魚の脳内モノアミン類(ドーパミン、セロトニンおよびそれらの代謝産物)をHPLCにより測定し、モノアミンレベルの変動が発病に影響しているかどうかを調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 脳寄生虫の実態調査

長崎県内の海産魚(スズキ、マダイ、トラフグ)の種苗生産場において、PCR法と顕微鏡検査により *K. yasunagai* 寄生の有無を調べた結果、5月から10月の期間に魚に侵入することが示された。寄生率は3~27%であり魚種により異なったが、飼育期間や魚体サイズが異なるため魚種間の感受性の違いを証明するには至らなかった。また、長崎県と和歌山県内の養殖クロマグロ(0歳)においても *K. yasunagai* の寄生が初めて確認された。和歌山県の養殖クロマグロにおける脳 *Kudoa* 寄生は海域によって異なり、場所によっては極嚢が5個の *Kudoa* sp.が優占的に観察された(図1, 2)。

このクロマグロから新しく見つかった *Kudoa* sp.を形態学的に検査した結果、胞子は上面観において5放射相称の「桜の花びら状」で、胞子殻(および極嚢)の数は典型的には5個であったが、まれに6個有するものもみられた(それらの比率は80:20)。側面観は底面がやや丸い円錐形または巾着型で、附属する突起物はなかった。測定値は、胞子幅 9.6 (8.5-10.3)  $\mu\text{m}$ 、胞子長 7.5 (6.7-8.6)  $\mu\text{m}$ 、

極囊長 3.7 (2.8-4.1)  $\mu\text{m}$ 、極囊幅 2.0 (1.7-2.2)  $\mu\text{m}$  であった。極糸は極囊の縦軸にほぼ平行な角度で2回巻いていた。

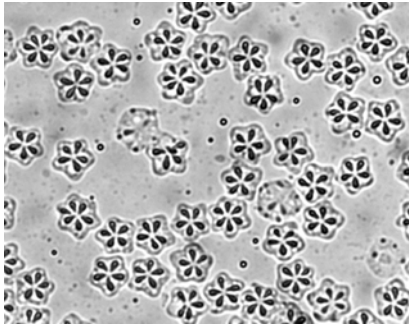


図1. クロマグロの脳内にみられた新種 *Kudoa prunusi* の孢子

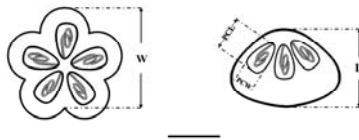


図2. *Kudoa prunusi* 孢子の模式図。左は上面観、右は側面観。W:幅、L:長さ、PCL:極囊長、PCW:極囊幅。バーは10  $\mu\text{m}$

18S と 28S rDNA の遺伝子解析を行った結果、前者は 1679 bp、後者は 664 bp の配列が得られた。18S rDNA に基づく解析結果から、今回の *Kudoa* は海産魚の脳内に寄生する *Kudoa* spp. とクラスターを組み (図3)、最も近縁なのは日本のヒラメ由来 *K. yasunagai*、次いでオーストラリア産海産魚から記載された *K. chaetodoni*, *K. lethrini*, *K. neurophila* で、遺伝的距離はそれぞれ 0.30%、0.38%、1.15%、1.55% であった。28S rDNA の解析結果においても、オーストラリアで記載された *K. yasunagai*, *K. chaetodoni*, *K. lethrini*, *K. neurophila* と近縁であることが示された (図4)。それらとの遺伝的距離は、それぞれ 1.57%、1.57%、4.24%、4.75% であった。

今回見つかった *Kudoa* sp. は、形態学的にはオーストラリアのキス科魚類の脳に寄生する *K. yasunagai* と最も近いと思われたが、側面観における底面の形状、および上面観における極囊の占める割合において識別できた。また、18S と 28S rDNA の塩基配列においても明確に異なるため、別種であると判断できた。よって、新種 *Kudoa*

*prunusi* と命名して記載することにした。

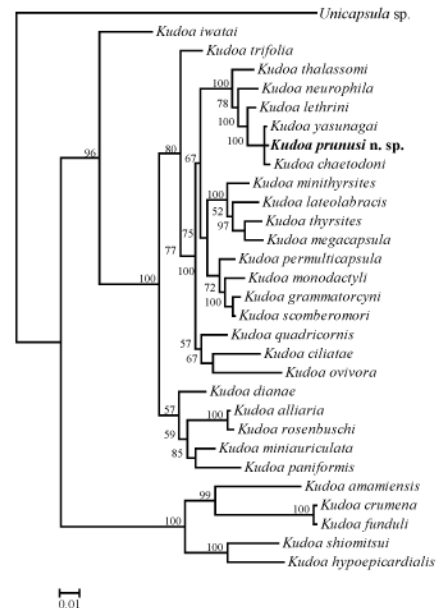


図3. 18S rDNA に基づく多棘目粘液胞子虫の系統樹 (ブイズ解析)。

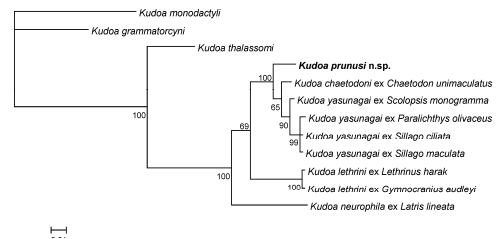


図4. 28S rDNA に基づく多棘目粘液胞子虫の系統樹 (ブイズ解析)。

長崎県内のトラフグ種苗生産場で *Galactosomum* sp. の寄生を調べた結果、7月から8月上旬に感染して、8月中旬から下旬には吸虫性旋回病を発症することがわかった。2009年8月の調査では、寄生率は6.2%であった。

2009年9月には香川県内の海域でカタクチイワシに吸虫性旋回病が確認された。罹病カタクチイワシの旋回遊泳は夜明け直後の午前5:40~6:20に集中的にみられ、発病の始まる時間帯が限定されていることが示唆された。この時間は終宿主である水鳥の捕食時間と一致していることから、早朝に旋回行動を誘発することで水鳥に捕食されやすくなると推察された。罹病したすべてのカタクチイワシの脳から吸虫

のメタセルカリアが得られ、形態学的に *Galactosomum* sp. と一致した。天然魚の調査においては、2009 年はカタクチイワシ（正常魚）の 2.9%、マダイの 3.8% に寄生がみられ、その他の魚種（シログチ、マサバ、マアジなど）にはみられなかった。2010 年は発病が確認されなかったが、カタクチイワシ（正常魚）の 5%、マダイの 2.3%、ウマヅラハギの 4.3% に寄生がみられ、マイワシ、アイゴ、マアジなどにはみられなかった。なお、マダイとウマヅラハギには発病は認められず、それらの脳内から採集された吸虫は形態的にも 18S rDNA の塩基配列においてもカタクチイワシの *Galactosomum* sp. とは異なっていたため、別種であると考えられた。なお、本研究は瀬戸内海において吸虫性旋回病が確認された初報告である。

## (2) 発病メカニズムの解析

*K. yasunagai* の寄生により異常遊泳を呈したスズキと寄生しているのに発病していないスズキの脳を病理組織学的に調べた結果、シストの数と脳内分布に違いが見られたが、症例数が少なかったため有意な差は得られなかった。

クロマグロの *K. prunusi* は、脳表面に最大 0.5 mm の多数の小白点状シストとして観察された（図 5）。肉眼的には、脳が発赤しているような病変は認められず、クロマグロの異常遊泳や衝突死との因果関係も証明できなかった。

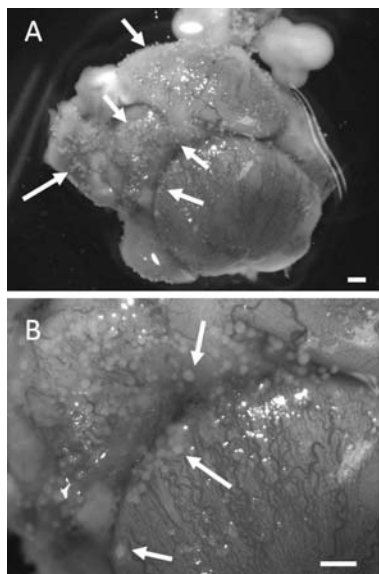


図 5. クロマグロの脳の表面にみられた *K. prunusi* のシスト (A, B; 矢印)。バーは 1 mm。

*K. prunusi* に感染したクロマグロの脳を病理組織学的に観察した結果、シストは脳の表面だけでなく、視蓋の内腔や小脳組織内にも寄生していることがわかった（図 6）。さらに、寄生虫に対する宿主反応やグリオーシスなどの炎症反応が観察され、局所的には病害性があることが示された。

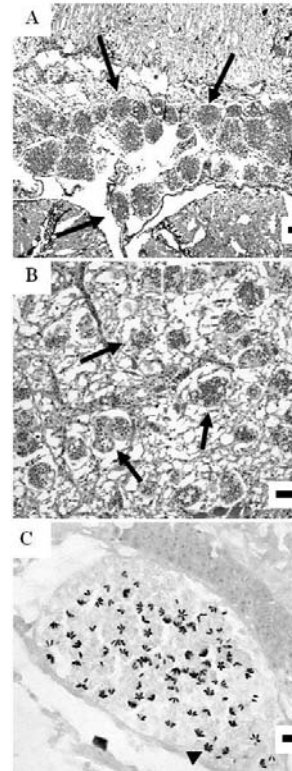


図 6. *K. prunusi* に感染したクロマグロの脳の病理組織。視蓋内腔(A)、小脳組織(B)内のプラスモジア（矢印）。プラスモディウム内にみられた 6 個の極嚢を有する孢子（矢印）。HE 染色。A と B は HE 染色、バーは 100  $\mu$ m。C はギムザ染色、バーは 20  $\mu$ m。

*Galactosomum* sp. の寄生を受けたトラフグおよびカタクチイワシの脳の病理組織学的観察の結果、メタセルカリア（径 0.7-1.0 mm）は例外なく間脳に寄生していたが、炎症反応などの宿主反応はみられなかった。

キンギョの開頭手術をして間脳に径 1.0 mm のガラスビーズを埋め込み、蘇生させて術後の遊泳行動を観察した実験の結果、旋回遊泳と「きりきり舞い」のような異常行動が観察された。しかし、この行動は手術後、速やかに観察され、自然感染魚でみられたような発病の日周期性は認められなかった。

今回の研究において、脳内モノアミン

量の変動と発病との因果関係は特定できなかった。しかし、最近の神経生理学的研究によると、魚類の脳内ドーパミン分泌量には日周変動があることが分かっている。これを考慮すると、脳内へのビーズ移植実験で観察された異常遊泳は自然感染で起きている現象とは異なり、急性的な病理反応である可能性もあり得る。

本研究で実施した実態調査の結果、養殖および天然海域に、いままで記載されていなかった新種の脳寄生虫が存在すること、既知種においても宿主範囲や地理的分布が予想以上に拡大していることが示された。とくに近年、新しい養殖対象魚種として注目されているクロマグロに新種の *Kudoa prunusi* が発見され、また *K. yasunagai* が寄生することもわかったことから、今後、クロマグロ養殖の障害要因になることが危惧される。*Galactosomum* sp.の瀬戸内海への分布拡大については、天然魚の資源量への影響が懸念される。瀬戸内海において、カタクチイワシはイリコの原料として価値が高いため、産業的にも無視できない。今回見つかったマダイとウマヅラハギの吸虫は魚に対する影響が確認されていないが、今後、注意する必要がある。

宿主魚の行動操作という観点から研究を行った結果、*Kudoa* spp.と *Galactosomum* sp.では異常行動が起こるメカニズムが異なることが示唆された。*Kudoa* の場合は異常遊泳との因果関係が明確ではないものの、組織内に炎症反応が観察されたことから、寄生による「病理反応」または「副作用」である可能性が高い。一方、*Galactosomum* の場合は病理反応が観察されず、また寄生虫にとって有利な時間帯に行動が変化していることなどを考慮すると、直接的な行動操作と解釈してよいと考えられる。しかし、当初の目的とした、脳内寄生による物理的刺激なのか、脳内神経伝達物質が関与した化学的刺激なのかについては明らかにすることはできなかった。

寄生虫による宿主の行動操作に関する最近の研究論文では、ハリガネムシの寄生を受けたバツタの脳内プロテオミクス解析をした結果、神経伝達に関与する特異的なタンパク質が発現したとされている。今後は神経生理学的アプローチと並行してプロテオミクス解析も実施して行動制御のメカニズムを研究する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(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2件)

- ① Meng F., Yokoyama H., Shirakashi S., Grabner D., Ogawa K. (2011) *Kudoa prunusi* n.sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the brain of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844) cultured in Japan. *Parasitology International*, **60**, 90-96. (査読有り)
- ② Zhang J., Meng F., Yokoyama H., Miyahara J., Takami I., Ogawa K. (2010) Myxosporean and microsporidian infections in cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. *Fisheries Science*, **76**, 981-990. (査読有り)

[学会発表] (計3件)

- ① 横山 博・宮崎洋平・赤井紀子・安部昌明・小川和夫、瀬戸内海における吸虫性旋回病の発生について。平成23年度日本魚病学会、2011年3月27日、東京。
- ② Yokoyama, H., Zhang, J., Meng F., Ogawa K., Miyahara, J., Takami, I., Shirakashi S., Ishimaru K., Sawada Y., Murata O. Myxosporean and microsporidian infections in cultured Pacific bluefin tuna in Japan. International Conference of Parasitology XII, 2010年8月15-20日。メルボルン
- ③ 章 晋勇・孟 飛・横山 博・宮原治郎・高見生雄・小川和夫、養殖クロマグロの粘液胞子虫と微胞子虫寄生。平成21年度日本魚病学会大会、2009年9月29日、仙台。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横山 博 (YOKOYAMA HIROSHI)

東京大学大学院・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：70261956

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし