

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：72645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05735

研究課題名(和文)代理中間宿主を用いた海産魚寄生フィロメトラ科線虫の感染系の確立

研究課題名(英文) Establishment of Experimental Infection of Marine Philometrid Nematodes Using Surrogate Copepod Intermediate Host

研究代表者

小川 和夫 (Ogawa, Kazuo)

公益財団法人目黒寄生虫館・その他部局等・名誉館長

研究者番号：20092174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ブリ筋肉線虫 *Philometroides seriola* のふ化幼生を代理宿主のシオダマリミジンコ内でブリへの感染ステージである3期幼生に发育させる実験系を確立した。20、25 で28日後にはすべてのふ化幼生はミジンコ内で3期幼生に変態した。さらに3期幼生を含むミジンコをブリに投与して11か月後に体側筋から雌成虫を回収した。得られた成虫の子宮内の胚の发育状態から、本虫の生活環完結には1年以上を要すると推定された。多くのふ化幼生はすでに1期幼生の脱皮殻をもっていたことから、2期と判断するのが妥当と考えられた。天然ブリの体側筋から従来未記載であった本線虫の雄成虫も発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ブリ筋肉線虫は宿主のブリに対して強い害作用は示さず、人体寄生虫でもない。しかし体側筋に寄生している雌成虫は最大体長が50 cmにも達する大型寄生虫のため、目につきやすく、ブリの商品価値を落とす水産上重要な寄生虫である。一方、本線虫の生物学的知見はきわめて乏しく、生活環も解明されていない。本研究によってシオダマリミジンコを代理の中間宿主とすることで実験的にふ化幼生を成虫にまで发育させることに成功し、本線虫の生活環が回るのに少なくとも1年を要することが明らかになった。この実験系は本線虫のみならず、他のフィロメトラ科線虫の寄生生態解明の研究に有用な手段といえる

研究成果の概要(英文)：We used the copepod *Tigriopus japonicus* as a surrogate host to experimentally complete the life cycle of *Philometroides seriola*, a nematode infecting the skeletal muscle of Japanese amberjack *Seriola quinqueradiata*. *P. seriola* developed to the third stage larvae which are infective to the final host, within the copepod fed with freshly hatched larvae. Eleven months after given infected copepods, two out of seven amberjacks were found infected with a mature female nematode in the skeletal muscle. It would take more than a year for *P. seriola* females to produce and disseminate larvae, as those recovered from the experimental fish only contained developing eggs in the uterus. Most larvae retrieved from fully mature females had an exuvium, suggesting that they were already at the second stage. In addition, we found a hitherto undescribed male worm in the skeletal muscle of wild Japanese amberjack.

研究分野：魚病学

キーワード：ブリ筋肉線虫 代理宿主 シオダマリミジンコ 生活環 フィロメトラ類

1. 研究開始当初の背景

海産魚に寄生するフィロメトラ科線虫は宿主魚の商品価値を喪失させ、水産業上問題となる。特にブリ筋肉線虫 *Philometroides seriolae* は主として天然ブリの体側筋に寄生する、最大体長 50 cm にも達する大型線虫で、人体寄生虫ではないが、目につきやすく問題となる。本線虫を含むフィロメトラ科線虫には 10 種以上が知られているが、中間宿主が不明なため、生活環は解明されていない。そのため、本線虫を含む海産魚寄生フィロメトラ科に関する生物学的知見はきわめて限られている。

2. 研究の目的

海産魚寄生のフィロメトラ科線虫の生活環は解明されていない。カイアシ類が中間宿主になるとされるが、個々の線虫について、中間宿主となるカイアシ類の種は特定されていない。一方、ソコミジンコ科のシオダマリミジンコは本来の中間宿主ではないが、実験的に種々の線虫の中間宿主になることが報告されている。本研究では、シオダマリミジンコを代理中間宿主として用いて、フィロメトラ線虫のふ化幼生を終宿主に寄生可能な 3 期幼生まで人為的に変態させ、魚類終宿主に投与する。このようにして生活環を実験的に完結させることによって、魚類終宿主内における寄生虫の移動、成長、成熟、生殖など、発育過程の全容を明らかにする。魚体内の寄生動態に基づいてフィロメトラ類の感染周期や魚体内の発育期における虫体の検出法を開発し、感染時期の推定や早期診断など、対策研究に応用する。

3. 研究の方法

1) 代理中間宿主の選定、および 3 期幼生を得るための実験系の確立

長崎県産の天然ブリからブリ筋肉線虫の雌成虫を採集し、その子宮内からふ化幼生を得た。和歌山県白浜町で甲殻類(カイアシ類 3 種、端脚類 2 種、十脚類 1 種)を採集した。これらの甲殻類を小型プラスチック容器内に収容し、ふ化幼生を暴露した。幼生を投与直後は実体顕微鏡下で観察して摂食の有無を確認した。その後 20 と 25 で維持して甲殻類体内に幼虫がいるかを解剖、もしくは麻酔をかけて顕微鏡下で確認し、代理宿主としての適性を調べた。

2) シオダマリミジンコに感染させたブリ筋肉線虫のブリへの感染実験

前項で確立した実験系を使って、ふ化幼生をシオダマリミジンコ(以下、ミジンコ)に高率に寄生させた。その 23~27 日後、感染ミジンコ各 5 個体を無感染 0 歳人工種苗ブリ 29 尾に強制投与した。投与翌日に 15 尾、11 か月後に 7 尾、16 か月後に 7 尾の供試魚を解剖し、寄生が成立したかを調査した。

3) その他のフィロメトラ科線虫への感染実験

養殖マダイ 5 歳魚の生殖腺からマダイ生殖腺線虫 *Philometra madai*、天然カサゴの生殖腺と鰓蓋からそれぞれカサゴ生殖腺線虫 *Philometra sebastisci* と *Clavinema* sp. の親虫からふ化幼生(1 期幼生)を採取し、ミジンコに曝露した。数日後にミジンコ体腔内の幼虫の有無から寄生率を求めた。寄生が確認されたミジンコは 2~4 週間飼育し、カサゴ人工種苗に投与し、2~4 週間後に魚を解剖して寄生が成立したかを調べた。

4) マダイ親魚における生殖腺線虫の寄生調査

マダイ 3~4 歳の雌雄親魚を対象に 14 ヶ月間、周年を通して生殖腺における線虫寄生を調査した。

5) ブリ筋肉線虫の雄虫の探索

本虫については従来、ブリから雌虫体しか見つかっていなかったため、長崎県産の大型天然ブリを 2021 年 4 月~9 月に計 30 尾を解剖し、雄虫体を探索した。雌成虫をブリ体側筋から取り出す際、寄生部位の洗浄液を検鏡した。

6) ブリの鰓から見出されたブリ筋肉線虫

香川県で養殖されていたブリ 1 歳魚の鰓から死んだ線虫が見いだされた。顕微鏡による形態観察と虫体断片の遺伝子解析で種同定を試みた。

4. 研究成果

1) 代理中間宿主の選定、および 3 期幼生を得るための実験系の確立

使用した甲殻類のうち、端脚類と十脚類（スジエビの仲間）は幼生を摂食したが、体腔内に虫体は確認できなかった。カイアシ類については、Miracidae と Tisbiidae カイアシ類は幼生摂食後、体内に幼虫を確認したが、長期間の維持ができなかった。一方、シオダマリミジンコは積極的にふ化幼生を摂食し、曝露 1 時間後には血体腔内に動く幼虫を確認し、ミジンコへの寄生が成立したと判断した。ミジンコ内に最多で 3 個体の幼虫が確認され、寄生率は最高 100% に達した。さらに感染ミジンコの一部を 1 ヶ月以上生存させることに成功した。ミジンコ内の幼生に脱皮殻を認めたことから、幼生は 2 期または 3 期に成長したことも確認された。以上のことから、シオダマリミジンコを代理中間宿主とする実験系がほぼ確立された。

2) シオダマリミジンコに感染させたブリ筋肉線虫のブリへの感染実験

ブリへの投与翌日の供試魚の体腔洗浄液より未熟虫 1 虫、11 か月後に 2 尾の体側筋より各 1 虫の本虫成虫を得た。16 か月後には虫体は回収できなかった。この結果、ミジンコ血体腔内の本虫は供試魚の消化管内でミジンコから脱出し、消化管から体腔内に移動することが示唆された。また、その後の経路は不明ながら、交尾後に体側筋に移動することが明らかになった。この結果は海産魚寄生のフィロメトラ科線虫の孵化幼生から成虫までを実験的に完結させた初報告である。得られた成虫の子宮内にはふ化幼生ではなく、発育途中の卵のみが見られたことから、本虫の生活環の完結には 1 年以上を要すると想定された。

3) その他のフィロメトラ科線虫への感染実験

マダイ生殖腺線虫のふ化幼生はミジンコへはほとんど寄生せず、代理宿主として不適であった。一方、カサゴ生殖腺線虫と鰓蓋寄生の *Clavinema* sp. ではミジンコにおける寄生率はそれぞれ 48% ~ 100%、42% ~ 79% と高く、ブリ筋肉線虫以外の線虫類にも代理中間宿主として適用できることが確認された。これら 3 種のふ化幼生の平均体長はそれぞれ 471、414、440 μm と大差なく、ミジンコの感受性は体長によらず、種で異なることが示唆された。カサゴ生殖腺線虫に感染させたミジンコをカサゴ人工種苗に投与し、腹腔内から幼虫 7 個体を回収した。うち 2 個体は未報告の雄虫であった。

4) マダイ親魚における生殖腺線虫の寄生調査

マダイ 3 ~ 4 歳親魚において、周年を通して雌雄を問わず生殖腺内に虫体の死骸がみられ、その平均保有率は 86.4% であった。死骸は卵巣腔や輸精管を含む生殖腺全体に充満し、総排泄腔付近まで及ぶため、排卵排精を妨げる可能性が考えられた。一方、虫体重量と魚体重、GSI、肥満度に相関関係は認められず、生殖腺の発達にも顕著な影響はみられなかった。他方で、生存虫体はマダイ産卵期のみに出現した。

5) ブリ筋肉線虫の雄虫の探索

天然ブリ 30 尾を解剖し、雌成虫 140 虫を採集した。雌成虫の寄生部位から 2 虫の雄成虫を初めて回収することができた。完全虫体は 1 個体（体長 10.7 mm）だけであったが、本種はフィロメトロイデス属の模式種であり、また海産魚寄生の同属線虫からは初報告であった。

6) ブリの鰓から見出されたブリ筋肉線虫

この虫体は体長約 25 cm あり、顕微鏡観察でブリ筋肉線虫の雌成虫であることが示唆され、遺伝子解析によって顕微鏡観察の結果が再確認された。本事例はブリ筋肉線虫が体側筋以外で確認された初めての例である。本線虫は成熟するのに約 1 年を要すること、宿主ブリの養殖期間が約 5 か月であったことから、当該ブリ個体は養殖場に導入前にすでに感染していたと考えられた。鰓寄生が迷入なのか、体側筋に移行する過程なのか、特定できなかった

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Ogawa Kazuo, Sata Naoya, Sugihara Yukitaka, Miyazaki Haruki, Ueno Mutsuki, Kuramochi Sora, Shirakashi Sho	4. 巻 58
2. 論文標題 Establishment of the Life Cycle of <i>Philometroides seriolae</i> (Nematoda: Philometridae) Using Surrogate Copepod Intermediate Host	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 15～21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3147/jsfp.58.15	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 Ogawa Kazuo, Abe Masaaki, Hara Satoko, Ueno Mutsuki, Shirakashi Sho	4. 巻 58
2. 論文標題 <i>Philometroides seriolae</i> Recovered from the Swimbladder of Japanese Amberjack <i>Seriola quinqueradiata</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 71～73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3147/jsfp.58.71	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 Ogawa Kazuo	4. 巻 58
2. 論文標題 Parasites in the Skeletal Muscle of Amberjacks <i>Seriola</i> spp. in Japan: A Review	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 127～145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3147/jsfp.58.127	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 Yuki Tomita, Keitaro Kato, Youhei Washio, Sho Shirakashi	4. 巻 59
2. 論文標題 Infections of <i>Philometra madai</i> (Nematoda: Philometridae) in the gonads of a high-growth broodstock population of red seabream <i>Pagrus major</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 in press
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 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 Yanagi Soetsu, Imaoka Yoshiaki, Ogawa Kazuo	4. 巻 58
2. 論文標題 Microsporidium seriolae and Probable Philometroides seriolae Infection in Yellowtail Amberjack Seriola aureovittata	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 180 ~ 183
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3147/jsfp.58.180	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4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小川和夫・佐田直也・杉原志貴・宮崎悠暉・白樫 正・上野睦生・倉持奏良・山本 剛
2. 発表標題 ブリ筋肉線虫の生活環に関する研究：ブリへの感染実験の成立
3. 学会等名 令和 4 年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川和夫・佐田直也・杉原志貴・白樫 正・上野睦生・倉持奏良
2. 発表標題 ブリ筋肉線虫の生活環に関する研究：雄成虫発見と代理宿主内の発育
3. 学会等名 令和 4 年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野睦生・白樫 正・佐田直也・小川和夫
2. 発表標題 シオダマリミジンコを代理宿主とした海産フィロメトラ科線虫 3 種の実験感染
3. 学会等名 令和 5年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 富田雄貴・白樫正・家戸敬太郎・鷺尾洋平
2. 発表標題 マダイ親魚における生殖腺線虫の寄生実態
3. 学会等名 令和 5年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2023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	白樫 正 (Shirakashi Sho) (70565936)	近畿大学・水産研究所・准教授 (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------