

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05733

研究課題名（和文）琵琶湖産マス類に寄生する微胞子虫の病害性

研究課題名（英文）Pathogenicity of microsporidian infecting masu salmon from Lake Biwa

研究代表者

横山 博（Yokoyama, Hiroshi）

岡山理科大学・獣医学部・教授

研究者番号：70261956

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：琵琶湖産マス類の筋肉および心臓に寄生する新しい微胞子虫症に関して、分子生物学的および超微細形態学的に病原虫を解析し、*Inodosporus fujiokai*と命名した。琵琶湖産スジエビ体内の発育ステージを用いた魚への人為感染法を標準化し、様々な魚種に感染させた結果、*I. fujiokai*はマス類の間でも感受性に差があり、コイ科魚類にも感染することが示された。さらに、本虫のリアルタイムPCR法を開発し、人為感染アマゴの魚体内動態を明らかにするとともに、ブラックバスなどサンフィッシュ科への軽度感染も実証された。病理組織学的解析より、感染ニジマスの死因は心臓寄生による心筋炎であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、魚類寄生性微胞子虫類で魚類以外の宿主が介在する例は皆無であったが、他の動物群に寄生する微胞子虫では、蚊と水生ミジンコ類を交互に寄生する種類が記載されている。魚類寄生種でも魚類だけでの人為感染が成功しない例が数多くあるのみならず、エビ類寄生種と魚類寄生種のリボソームDNAの塩基配列が同一である種類も報告されている。本研究により、魚類と甲殻類を交互に宿主とする微胞子虫の生活環が解明されれば、他の魚類寄生種についても同様の生活環をもつことが示唆され、寄生虫学的な意義があるのみならず、感染メカニズムが解明され感染防除法が確立されることで、魚病学的さらに社会的な意義があることは明白である。

研究成果の概要（英文）：In this study, the microsporidian which causes the newly found microsporidiosis in salmonids from Lake Biwa was described as *Inodosporus fujiokai* n. sp., based on the molecular and ultrastructural analyses. The genetic and ultrastructural data of the developmental stages in common prawn from Lake Biwa were also characterized. The artificial transmissions of *I. fujiokai* from common prawn to fishes were established, showing that there was a significant difference in susceptibility among salmonid fishes. Also, it demonstrated that *I. fujiokai* could infect to the other taxonomically different fishes such as cyprinids. Further, real-time PCR technique (q-PCR) for *I. fujiokai* was developed, clarifying the intra-piscine time-course development and some light infections in Centrarchidae such as largemouth bass. Histopathological study suggested that rainbow trout died of myocarditis, however, the possible cause of death in the other fishes remained to be clarified.

研究分野：魚病学

キーワード：寄生虫 微胞子虫 サケマス類 病害性 生活環

## 1. 研究開始当初の背景

微胞子虫類は大きさ 3~10 μm の微小な胞子を形成し、単細胞でミトコンドリアを持たない原始的な寄生虫である。一般に、胞子は宿主に経口的に取り込まれ、消化管内で極管が弾出すると、胞子原形質が宿主細胞内に注入されて感染が成立する。胞子は形態的特徴が乏しいため、その発育過程の様々な微細構造や分子系統解析によって属レベルの分類がなされる。

日本国内にはいくつかの魚類寄生微胞子虫が知られているが、生活環は実はよくわかっていない。魚体内の胞子を未感染魚に人為的に接種して感染することから、魚から魚へ水平感染する(中間宿主をもたない)ことが示されている種類が多いが、どのような方法で接種しても(胞子の筋肉・腹腔内注射、胞子懸濁液に浸漬など)まったく感染しない種類もある。それどころか、河川水を胞子が十分通過できる目合いのプランクトンネットですり過することにより感染防除できる種類も報告されている。これは魚体内の胞子がすぐに別の魚へ感染するのではなく、プランクトンなどの浮遊生物が中間宿主または媒介者として介在する可能性を示している。

微胞子虫類は原虫から哺乳類まで多様な生物群を宿主とする寄生虫であるが、蚊に寄生する *Ambryospora* 属微胞子虫では、水生ミジンコ類に感染し形態変異して初めて蚊に寄生する。すなわち、蚊の幼虫に水系感染し、その卵巣内で胞子形成後、子孫に垂直伝播(経卵感染)して次世代で別形態の胞子を形成、ミジンコ類に水系感染するという。これらの研究は魚類以外の動物種も含む多宿主性生活環を示唆する。

## 2. 研究の目的

琵琶湖に生息するマス類寄生性微胞子虫類の生物学は不明であったが、試験的に飼育していたニジマスに琵琶湖産スジエビを経口投与したところ、同種と思われる微胞子虫の感染が再現された。これは本微胞子虫がスジエビとマス類を交互に宿主とする二宿主性生活環をもつことを示唆する(図1)。そこで本研究では、微細構造観察と遺伝子解析により分類学上の位置を決定して学名(新種名)を与え、スジエビからマス類、マス類からスジエビといった双方向の感染実験を通して二宿主性の生活環を明らかにし、スジエビを様々な魚種に経口投与して魚種間における病害性の違いを明確にすることで、琵琶湖内でこの微胞子虫がどのように生活環を維持し、在来魚や有害外来魚の個体群に影響を与える可能性があるのかを考察する。

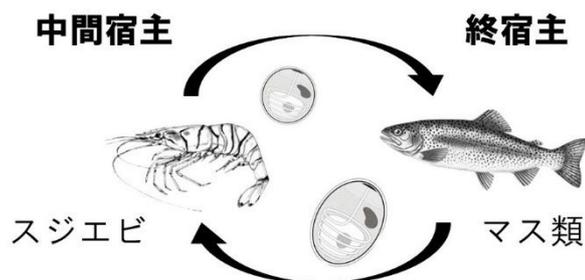


図1. スジエビとマス類を宿主とする微胞子虫の二宿主性生活環

## 3. 研究の方法

本研究では、琵琶湖産マス類に寄生する微胞子虫の分類学的位置を確定後、生活環を解明して琵琶湖内での感染動態を明らかにし、様々な魚種の個体群に与える影響を推定することを目的とする。以上の研究目的を達成するため、次のようにアプローチする。

### (1) 本微胞子虫の分類学的位置付けを確定する。

方法は電子顕微鏡による微細構造観察と遺伝子解析により、分類学的な同定を行う。

### (2) 本微胞子虫の実験感染条件を定量的に明らかにする。

スジエビからマス類、マス類からスジエビといった双方向の感染実験を行うなかで、とくに魚への感染実験の標準的な条件(投与量、方法および期間など)を確立する。

### (3) 本微胞子虫の魚種間の病害性の違いを明確にする。

上記(2)の実験感染条件を基準に、在来魚種(各種マス類など)および有害外来魚種(ブラックバスなど)に対して人為的に攻撃試験を行い、魚種間の死亡率や病理学的反応の違いを比べ、各魚種の個体群に対する影響を推定すると同時に、有害外来魚の新しい生物学的駆除法になり得るかどうかが考察する。

### (4) 本微胞子虫の魚種間の感受性の違いを天然魚において明らかにする。

琵琶湖内で漁獲された天然魚を採集し、本微胞子虫の寄生量を顕微鏡的またはリアルタイムPCR法を用いて定量的に測定し、魚種間で比較する。

4. 研究成果

(1) 分類学的位置付けの確定：透過電顕観察による発育ステージの微細構造や孢子後部の尾部突起（図2）および成熟孢子壁面の特徴的構造（図3）などの形態学的特徴、およびスジエビとマス類から抽出された微胞子虫の rDNA 配列が完全に一致したこと（図4）から、スジエビ体内の微胞子虫はエビ類に寄生する *Inodosporus* 属、ニジマス体内の微胞子虫は *Kabatana* 属に近縁であることが示された。しかし、両属の原記載年次が *Inodosporus* 属の方が古かったため、動物命名規約に基づき、*Inodosporus* 属として記載することとし、第一発見者に因んで、新種 *Inodosporus fujiokai* と命名した。

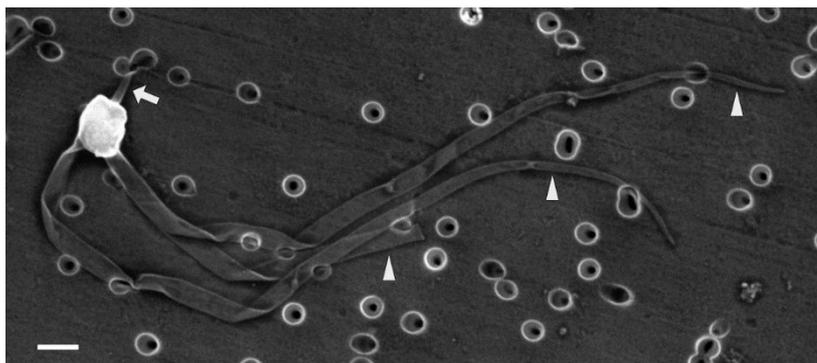


図2. スジエビ体内で形成された *Inodosporus fujiokai* 孢子の SEM 像。頭部に存在する1本の突起（矢印）と尾端部の3本の突起（矢頭）が顕著。

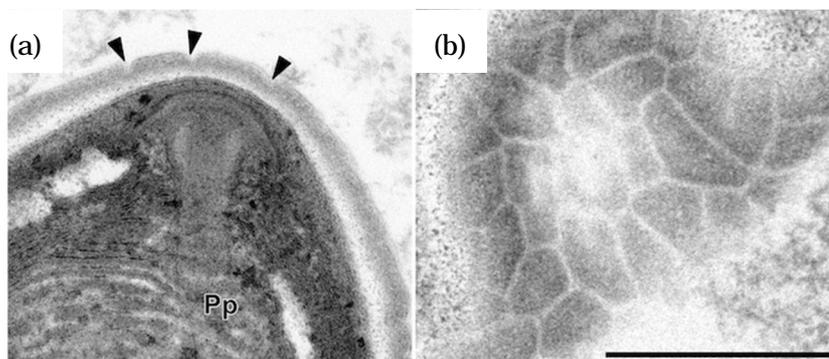


図3. ニジマス体内で形成された *Inodosporus fujiokai* 孢子の TEM 像。(a) 極帽にみられる層状構造 (Pp = ポラロプラスト) と外生孢子壁を分割する溝 (矢印)。(b) 孢子壁の表面にみられる特徴的模様。

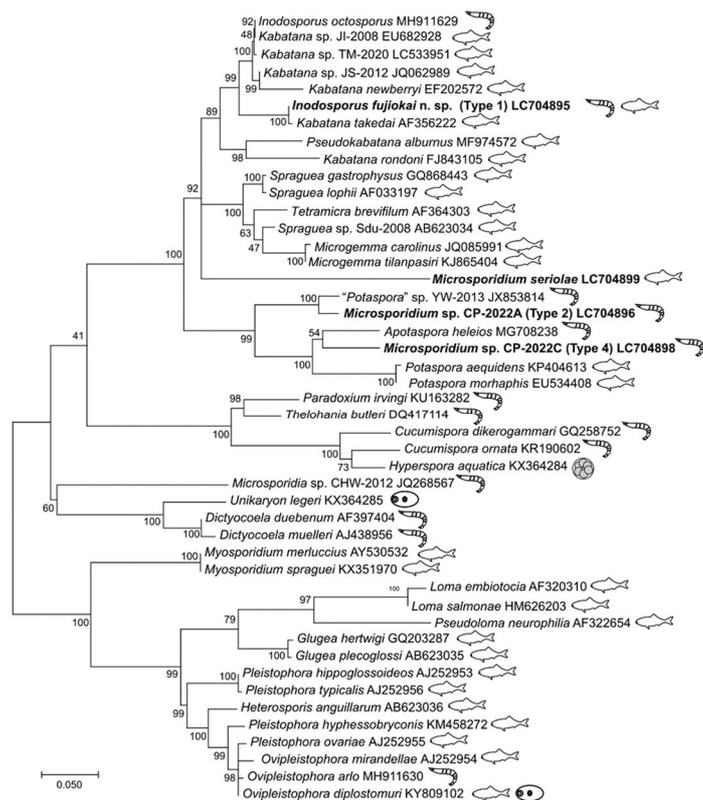


図4. SSU rDNA の塩基配列に基づき最尤法により推測された系統樹。太字は本研究で決定されたシーケンス、各微胞子虫種の宿主はシンボルで示す(魚類、甲殻類、吸虫類、アセトスポラ原虫類)。

(2) 感染実験条件の標準化：感染したスジエビは外観的に患部が白化して認知しやすかったことから、感染エビの筋肉から孢子懸濁液を作製し、未感染魚に接種する感染実験を試みた。その結果、経口、浸漬いずれの手法でも感染成立したため、投与量を制御して人為感染させる手法が標準化された。一方、人為感染した魚類から微孢子虫孢子を採取して、スジエビに人為感染させる試験はいずれも失敗した。すなわち、魚類からスジエビへの伝播様式については、別の動物種が介在するなど、さらに検討を要する。

(3) 魚種間の病害性の違い：上記(2)で標準化された方法で各魚種（ニジマス、ビワマス、アマゴ、イワナ、アユ、ホンモロコ）に浸漬感染実験し、飼育期間中の死亡率や寄生の程度を比較した。その結果、感染 30 日後の累積死亡率は、イワナが 100%、アマゴが 93%、ビワマスが 86%、ニジマスが 80%とマス類が高かったのに対し、ホンモロコは 6%、アユは 0%と低かった（表 1）。感染率も同様で、イワナ、アマゴ、ニジマスは 100%、ビワマスは 93%であったのに対し、ホンモロコは 47%、アユでは 0%であった（表 1）。以上より、サケマス類の魚種間でも感受性が違ったのみならず、本研究で初めてコイ科魚類（ホンモロコ）でも感染が認められたのは注目すべきである。

さらに、病理組織学的解析により、ニジマスの心臓組織に心筋炎が観察された一方、他の魚種ではみられなかった。この結果は、ニジマスと他の魚種では死因が異なる可能性が示された。

(4) 天然魚における感受性の違い：本研究において、コイ科のマゴイおよびサンフィッシュ科のブラックバスの体側筋肉から qPCR 法により *I. fujiokai* に陽性反応がみられた。しかし、検鏡では孢子が確認できず、相当に軽度の感染であったと推測された。これらの結果は、琵琶湖内で *I. fujiokai* の生活環を支えている「本来の宿主」である可能性も考えられたが、検査個体数が非常に乏しいため、さらなる調査が必要である。また、特定外来生物であるブラックバスに対する感染実験は現実的に困難であるため、本微孢子虫により駆除できるかどうか推測するにはデータ不十分と言わざるを得ない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 1件）

1. 著者名 Michitaka Yamamoto, Kazuhiro Sugahara, Nanami Asai, Tetsuya Yanagida, Hiroshi Yokoyama, Sho Shirakashi	4. 巻 58
2. 論文標題 Pathology of a Microsporidian <i>Inodosporus fujiokai</i> in Two <i>Onchorynchus</i> spp.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 60-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3147/jsfp.58.60	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 Yanagida, T., Asai, N., Yamamoto, M., Sugahara, K., Fujiwara, T., Shirakashi, S., & Yokoyama, H.	4. 巻 150
2. 論文標題 Molecular and morphological description of a novel microsporidian <i>Inodosporus fujiokai</i> n. sp. infecting both salmonid fish and freshwater prawns	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Parasitology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S003118202200141X	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 M. Yamamoto, S. Shirakashi, N. Asai, T. Yanagida, K. Sugahara and H. Yokoyama	4. 巻 56
2. 論文標題 A new microsporidian disease of rainbow trout <i>Oncorhynchus mykiss</i> farmed in Shiga prefecture, Japan, and possible involvement of common prawn <i>Palaemon paucidens</i> for transmission of the pathogen	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 130-139
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3147/jsfp.56.130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 米加田 徹、秋元 勇毅、安東 秀容、横山 博、菅原和宏、山本充孝、木南竜平、白樫 正、柳田哲矢
2. 発表標題 アマゴ魚体内における微孢子虫 <i>Inodosporus fujiokai</i> の挙動について
3. 学会等名 令和6年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅原和宏・山本充孝・金理求・木南竜平・白樫正・柳田哲矢・米加田徹・横山 博
2. 発表標題 微胞子虫 <i>Inodosporus fujiokai</i> の魚種別感受性の比較による養殖魚のリスク評価
3. 学会等名 令和5年度日本魚病学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 柳田哲矢・山本充孝・浅井七望・白樫 正・菅原和宏・横山 博
2. 発表標題 養殖ニジマスと天然スジエビから得られた微胞子虫の分類学的検討と生活環の解明
3. 学会等名 第90回日本寄生虫学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅井七望・白樫 正・山本充孝・柳田哲矢・横山 博
2. 発表標題 ニジマスの筋肉微胞子虫症（感染源の特定と病害性）
3. 学会等名 令和3年度日本魚病学会秋季大会
4. 発表年 2021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	柳田 哲矢  (YANAGIDA Tetsuya)  (40431837)	山口大学・共同獣医学部・准教授    (15501)	

6. 研究組織（つづき）

	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