

マガキ卵巣肥大症対策を目指した感染媒介生物の特定

東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻 平山健太

背景と目的

通常、マガキの卵巣は排卵期以降消失することが知られているが、マガキの卵巣肥大症とは正常な生殖サイクルと異なり、排卵期以降も卵母細胞形成が継続する疾病である。罹病個体における卵母形成は、原因寄生虫である *Marteilioides chungmuensis* の感染した濾胞でのみ起こるため、発症マガキの軟体部には膨隆状の卵巣がまばらに形成されることとなり（図）、その外観の悪さから罹患個体は商品価値を失うためカキ養殖における問題と認められている（伊藤、2018）。

原因寄生虫のマガキ体内における発育については知見が得られているが、それ以外の生活史については不明であり、マガキへの感染経路やマガキ体外における挙動もよくわかっていない。しかし、近年、本寄生虫の近縁種である *Marteilia refringens* は、ヨーロッパヒラガキの消化管から放出された後にカイアシ類へ寄生すること、しかし、カイアシ類からヨーロッパヒラガキへの感染は成立しないことが明らかにされ（Audemard et al., 2002）、また、Adlard and Nolan (2015) は近縁種 *Marteilia sydneyi* が環形動物多毛類の一種から高率で検出されることを報告している。これら近縁種における情報より、卵巣肥大症原因寄生虫もマガキ以外の生物を感染媒介宿主としている可能性が考えられた。

そこで本研究では卵巣肥大症の感染海域から浮遊生物と底生生物を採取、これらの生物から qPCR によって *M. chungmuensis* 遺伝子の検出を試み、卵巣肥大症原因寄生虫の感染を媒介する生物特定を目指した。



図 卵巣肥大症発症マガキ

材料と方法

・ *M. chungmuensis* 検出用 qPCR の開発

qPCR に用いる PCR プライマーと検出用の TaqMan プローブは、*M. chungmuensis* の 18S rRNA 塩基配列 (Genbank AB110795) を対象とし、Primer 3 を用いて検索した。使用したプローブの配列および反応条件に関しては、関連データを含めた投稿論文を現在作成中であり公開を差し控える。

・ プランクトンサンプルからの *M. chungmuensis* 遺伝子検出の試み

卵巣肥大症の発生が知られる三重県内のマガキ養殖海域において、2015年8月から2017年10月まで毎月一回、目合い100 µm のプランクトンネットを用いてプランクトンを採取した。採集は昼間、2016年2月までは5 m の鉛直曳き1回、2016年2月からは2回、2017年4月からは3回にて行い、鉛直曳きが困難な干潟域では30 m の水平曳きにて実施した。採取したプランクトンは直ちに70%エタノールで固定し、DNA は QIAamp DNA Mini Kit を用いて25 mg の固定試料より抽出した。

抽出した DNA は上述の qPCR 法に供し、*M. chungmuensis* の検出を試みた。その結果、多くの寄生虫遺伝子量が検出されたサンプルがみられたため、由来を同じくする70%エタノール固定標本の中からカイアシ類を個別にソーティングし、個体別に DNA 抽出を行い、再度 qPCR に供した。なお、寄生原虫が検出された際に寄生虫を保有していたカイアシ類の形態学的種同定を行うため、DNA 抽出過程の proteinase K 処理時に残存したカイアシ類の外骨格を回収し、Buffer ATL 50 µL 内で保存した (Cornils, 2015)。

・ 多毛類からの *M. chungmuensis* 遺伝子検出の試み

底生生物に関しては、2017年7月に三重県内のマガキ養殖海域近辺の干潟でスコップをもちいて底土を採取し、目合い1 mm のふるい上に残った大型の環形動物をピンセットで採集し70%エタノールに保存した。その後、多毛類87個体について胴部を2~4等分し、それぞれの25 mg 程度を DNA 抽出に用いた。DNA 抽出はフェノールクロロホルム法によって行なった。なお頭部は、寄生原虫が検出された際に形態観察に供するため、70%エタノール中に引き続き保存した。

環形動物から抽出した DNA には、しばしば PCR 阻害物質が混入し PCR 増幅を妨げることが報告されている。そこで、抽出した DNA は真核生物の 18S rRNA にユニバーサルなプライマーを用いる PCR 法 (Prentiss et al., 2014) に供し、増幅の有無から PCR 阻害物質の混入を検討した。その後、PCR 阻害物質の混入がないと判断された DNA サンプルは上述の *M. chungmuensis* 遺伝子検出用 qPCR 反応に供した。

結果

・ *M. chungmuensis* 検出用 qPCR の開発

本研究で開発した qPCR 法は原因寄生虫の rRNA 遺伝子 100 コピーまで検出が可能であることが分かった。また、従来の *M. chungmuensis* 検出用 PCR 法は近縁種と考えられる生物と交差反応を示したが、本方法を用いたところ交差反応は認められず、従来法よりも高い特異性を示すことがわかった。

・ プランクトンサンプルからの *M. chungmuensis* 遺伝子検出

上述の qPCR 法を用いたところ、複数のプランクトンサンプルから *M. chungmuensis* 遺伝子が検出された。由来の同じ標本から個別に分離したカイアシ類 204 個体についても qPCR 法に供したところ、そのうち 18 個体が陽性を示し、特に 2 個体では定量限界である 100 コピー以上の *M. chungmuensis* 遺伝子が検出された。

この 2 個体と定量限界未満の値を示した 1 個体、あわせて 3 個体については外骨格の形態学的観察よりアカルチア科に含まれる種（現在論文作成中であるため本報告書では種 A と呼称）と同定され、また rRNA 遺伝子の ITS-28S 領域配列解析（Hirai et al., 2013）からもこの形態学的分類結果が裏付けられた。一方、定量限界未満ではあるものの *M. chungmuensis* の配列が検出された 12 個体について、形態学的観察よりアカルチア科の B 種であると推測されたが、得られた rRNA 遺伝子 ITS-28S 領域配列に一致する種はデータベース上に見当たらなかった。それ以外の 3 個体については外骨格の形態からも塩基配列からも種の同定には至らなかった。

・ 多毛類からの *M. chungmuensis* 遺伝子検出

環形動物 87 個体から抽出された 112 の DNA サンプルのうち、PCR 阻害物質の影響を受けず qPCR 解析が可能なサンプルは 87（77 個体分）であった。そこでこれらを *M. chungmuensis* 検出用の上記 qPCR に供したが、すべて陰性の結果を示した。

考察

本研究により、従来の nested-PCR による手法より高感度かつ特異性の高い *M. chungmuensis* 検出 qPCR 法の開発に成功した。本寄生虫のゲノム情報はまだ得られていないため 1 細胞あたりの 18S rRNA コピー数は不明であるが、100 コピーまで検出できる本手法は、今後の本寄生虫の媒介生物・中間宿主探しに極めて有効なツールになると考えられる。

感染海域で採取したプランクトンサンプルを用いた一連の実験により、今回、カイアシ類アカルチア科の一種 A が *M. chungmuensis* を保有する可能性が強く示唆された。先行研究では、同じくアカルチア科である *Paracartia grani* や *P. latisetosa* の体内

から近縁種 *M. refringens* が検出されており (Arzul et al., 2014)、本種を含むパラミクサ類の生活環にはアカルチア科が関与する可能性が高い。

本研究で *M. chungmuensis* が検出された A 種は暖水性種として知られており、卵巣肥大症は三重県以西の太平洋岸と新潟県以西の日本海岸といった暖水域の養殖場で発生していることと合わせると、媒介生物である A 種の分布が卵巣肥大症発生海域を制限していることも考えられる。ただし、遺伝子検出結果だけでは、カイアシ類の体表に偶然付着しただけの *M. chungmuensis* を検出した可能性も否定できないため、今後は *in situ* ハイブリダイゼーション法などにより、カイアシ類体内における本寄生原虫の存在を検証する必要がある。

一方、Adlard and Nolan (2015) が近縁種 *M. sydneyi* の DNA を環形動物から高率で検出した結果に基づき、本研究でも感染海域の環形動物より *M. chungmuensis* 遺伝子の検出を試みたが、残念ながら検出には至らなかった。ただし、上述の先行研究では 114 地点における 5 回の採集を通して合計 2752 個体の環形動物を捕獲、その内 1247 個体を PCR に供したところ、76 個体から陽性を得ている。このように環形動物内での陽性率の低さを考えると、本調査での採集活動は少なく、より多くのサンプリングが今後は必要と考えられた。

本研究より、カイアシ類アカルチア科の一種 A が卵巣肥大症の原因寄生虫 *M. chungmuensis* の媒介生物であることが強く示唆された。これは、発見以来、生活環が全く不明である本寄生虫についての初めての知見であり、感染防除対策や発生海域モニタリングに極めて有効な知見となりうる。今後は、本種が *M. chungmuensis* を保有することを感染実験等を通し、検証することが必要になる。さらに本種以外の生物が *M. chungmuensis* の生活環に関与する可能性もある。もっとも有力な候補である環形動物については引き続き同様の調査の実施が望まれる。

謝辞

本研究に必要なプランクトンサンプルは、水産研究教育機構増養殖研究所養殖システム研究センターの長谷川夏樹博士、三重県水産研究所沿岸資源増殖研究課課長兼主幹研究員土橋 靖史博士、同じく主幹研究員栗山功氏にご提供いただいた。また本研究で実施したカイアシ類の分類・同定は、東京大学大学院農学生命科学研究科・高橋一生准教授と東京大学大気海洋研究所・平井惇也助教のご助言を仰いだ。ここに厚く御礼申し上げます。

参考文献

Adlard, R. D., & Nolan, M. J. (2015). Elucidating the life cycle of *Marteilia sydneyi*, the aetiological agent of QX disease in the Sydney rock oyster

- (*Saccostrea glomerata*). *International Journal for Parasitology*, 45(6), 419-426.
- Arzul, I., Chollet, B., Boyer, S., Bonnet, D., Gaillard, J., Baldi, Y., Robert, M., Joly, J. P., Garcia, C., Bouchoucha, M. (2014). Contribution to the understanding of the cycle of the protozoan parasite *Marteilia refringens*. *Parasitology*, 141(2), 227-240.
- Audemard, C., Le Roux, F., Barnaud, A., Collins, C., Sautour, B., Sauriau, P. G., De Montaudouin, X., Coustau, C., Combes, C., Berthe, F. (2002). Needle in a haystack: Involvement of the copepod *Paracartia grani* in the life-cycle of the oyster pathogen *Marteilia refringens*. *Parasitology*, 124(3), 315-323.
- 千原光雄, 村野正昭(1997): 日本産海洋プランクトン検索図説.
- Cornils, A. (2015). Non-destructive DNA extraction for small pelagic copepods to perform integrative taxonomy. *Journal of Plankton Research*, 37(1), 6-10.
- Hirai, J., Shimode, S., & Tsuda, A. (2013). Evaluation of ITS2-28S as a molecular marker for identification of calanoid copepods in the subtropical western North Pacific. *Journal of Plankton Research*, 35(3), 644-656.
- 伊藤直樹 (2018) 魚種別にみる疾病発生動向と対策 マガキ 養殖ビジネス 2018 年臨時増刊号 73-76.
- Prentiss NK, Vasileiadou K, Faulwetter S, Arvanitidis C, H. H. (2014). A new genus and species of Serpulidae (Annelida, Polychaeta, Sabellida) from the Caribbean Sea. *Zootaxa*, 3900(2), 204-222.