

ニホンウナギ由来の鰻線虫, *Anguillicola crassus*の抗原性 に関する研究

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	乾, 享哉 野上, 貞雄 廣瀬, 一美
巻/号	46巻1号
掲載ページ	p. 151-155
発行年月	1998年3月

ニホンウナギ由来の鰻線虫, *Anguillicola crassus* の 抗原性に関する研究

乾 享哉・野上貞雄・廣瀬一美

(1997年12月25日受理)

Antigenicity of Swimbladders Nematoda, *Anguillicola crassus* in Japanese Eel, *Anguilla japonica*

Takaya INUI*¹, Sadao NOGAMI*¹, and Hitomi HIROSE*¹

Abstract: Antigenicity of swimbladders nematoda, *Anguillicola crassus*, to Japanese eel, *Anguilla japonica* was examined by Ouchterlony's immunodiffusion in an agar gel. When the eel were immunized with an extract prepared from adult worms of nematoda as antigen, the eel sera reacted with the extracts prepared from the whole adult worms of nematoda and showed precipitation lines in the agar gel, indicating the presence of the anti-swimbladders nematoda antibody in the eel sera. Of 24 eels infected with the nematoda, two sera reacted with the extracts prepared from the whole adult worms and various parts of the worm. The results indicate the presence of common antigen among various tissues of the worm and antigenicity of cuticle was dominant in the immunological responses. The sera collected from the eels of no nematoda infection did not react with the extract prepared the worms.

Key words: *Anguillicola crassus*; *Anguilla japonica*; Antigenicity; Immunodiffusion

ウナギ鰻線虫は, Yamaguchi¹⁾によって天然のニホンウナギ *Anguilla japonica* で最初に発見され, *Anguillicola globiceps* として命名された。その後 Kuwahara *et al.*²⁾により, *A. globiceps* とは種を異にする *A. crassa* として報告し, Tarashewski *et al.*³⁾により *A. crassus* と改称された。*A. crassus* は, 主に東アジアやヨーロッパ各国の養殖または天然ニホンウナギとヨーロッパウナギ *Anguilla anguilla* の鰻に見られる吸血線虫である。近年, 本虫感染による被害がヨーロッパウナギで甚大であり⁴⁾, 感染率, 寄生数ともに高く, 鰻の肥厚や大量寄生による内臓諸器官の圧迫および炎症を引き起こし^{5,6)}, 重篤な場合には大量斃死するなどの報告がある⁷⁾。また最近では, 台湾産養殖アメリカウナギ *Anguilla rostrata* で *A. crassus* 感染による大量斃死が報告されている⁸⁾。しかしニホンウナギでは, 本虫感染による大量斃死の報告はない⁹⁾。

これらの報告から, *A. crassus* 感染に対するウナギの感受性が種によって異なると考えられるが, その詳

細は不明な点が多い。また *A. crassus* は内部寄生虫のため, 感染個体を外観から判断することは困難であり, 感染防御や駆虫プログラムを検討するには, 実用的で効率の良い血清学的な診断が不可欠である。

そこで本研究では, 手法が簡便で特殊な器具や試薬を使用しない寒天ゲル内沈降法を用いて, ニホンウナギ由来の *A. crassus* の抗原性状を解析し, 自然感染ニホンウナギ血清からの沈降抗体の検出を試み, その診断法の有効性を検討したので報告する。

材料および方法

A. crassus 抗原の作製 *A. crassus* 抽出抗原は, Höglund and Pilström¹⁰⁾の方法を改変して作製した。

静岡県下の鮮魚店で入手した台湾産養殖ニホンウナギの鰻腔内から *A. crassus* 成虫を摘出した。成虫 (Adult : AD) は, 滅菌生理食塩水で数回洗浄したのち, 雌雄 (♂, ♀) に分別した。また, 虫体は表皮 (Cuticle : CU), 生殖腺 (Gonad : GO), 消化管 (Intestine : IN)

*¹ 日本大学生物資源科学部 (Department of Bioresource Sciences, Nihon University, Kameino 1866, Fujisawa 252-8510, Japan).

に区分した。区分した各部位は、等量の滅菌生理食塩水とともに、10分間ホモジナイズし、さらに超音波破砕機 (VP-30, タイテック) により300 W で2分間破砕した。虫体懸濁液は、1晩4℃下で攪拌抽出後、20,000×g, 60分間遠心分離、その上清を0.45 μm および0.20 μm メンブレンフィルター (DISMIC-25, Advantec) で濾過滅菌して *A. crassus* 成虫抽出抗原とした。各抗原は、DC-プロテインアッセイキット (BIO-RAD) によりタンパク質濃度を測定後、使用時まで-80℃に保存した。

A. crassus 抗原免疫ウナギ血清の作製 成虫 (AD) 抗原を Freund 完全アジュバント (ヤトロン) と等量混合してエマルジョン化し、免疫抗原 (タンパク質濃度 0.2mg/ml) とした。*A. crassus* 非感染ウナギを MS 222 (0.2g/l: 三共) により10分間麻酔し、抗原を 0.3ml/100g 魚体重となるように腹腔内注射した。さらに初回免疫2週間後に同抗原で追加免疫を施した。採血は免疫前、免疫1週間後および2週間後に尾柄部血管より0.5ml, また初回免疫4週間後には動脈球より全採血を行った。採血した血液は、室温で2時間、さらに4℃で1晩静置後、4℃で1,500rpm, 10分間遠心して血清を分離し、これらを *A. crassus* 抗原免疫ウナギ血清 (Immunized eel serum: IMES) とした。

自然感染および非感染ウナギ血清の作製 無作為に選別したニホンウナギ (体重140~298g, 体長44~55cm) を麻酔後、動脈球より全採血し、前述と同様に血清を得た。採血後、ウナギを解剖し、感染の有無を調べ、自然感染ウナギ血清 (Infected eel serum: IES) と非感染ウナギ血清 (Non-infected eel serum: NES) を得た。検体は各24尾とし、感染個体については *A. crassus* の感染状況 (雌雄別寄生数) を調べた。なお、各ウナギ血清は使用時まで-80℃で保存した。

寒天ゲル内沈降法 微量 Ouchterlony 法¹¹⁾ により行った。すなわち滅菌生理食塩水に1.0% Bacto-agar (Difco) と0.1% アジ化ナトリウムを加えて加熱溶解した液化寒天3.0ml をスライドグラスに載せ、寒天ゲル板を作製した。次にゲル板上に直径4mm の孔を作製し、各孔に被検ウナギ血清と *A. crassus* 抗原 (タンパク質濃度5.0mg/ml) を各25 μl 注入した。ゲル板を湿潤箱にいれ、室温下で48時間反応させたのち、0.1% アジ化ナトリウム生理食塩水に浸漬して未反応のタンパク質を洗浄除去した。ゲル板は乾燥させ、0.5% アミドブラック10B で染色し、脱色後、形成された沈降線を観察した。

結 果

免疫血清に対する *A. crassus* の抗原性 作製した *A. crassus* 成虫抗原の抗原性を確認した結果、免疫後

の各ウナギ血清と成虫 (AD) 抗原とのゲル内沈降反応は、免疫2週間後に1本の沈降線、免疫4週間後の血清では3本の沈降線が確認された (Fig. 1)。

自然感染血清からの沈降抗体の検出 感染ウナギ血清 (IES Nos. 1-24) と非感染ウナギ血清 (NES Nos. 1-24) 計48検体からの沈降抗体の検出を行った結果、IES 24検体のうち、No.11とNo.19の2検体で、1本の明瞭な沈降線が確認され (Fig. 2), 陽性検出率は8.3%であった。一方、NES ではすべてが陰性であった。自然感染ウナギの *A. crassus* 感染状況は、雄の単感染と少数感染例が多く、陽性反応を示した自然感染ウナギでは、No.11で雄の単感染、No.19では雌雄複数感染の計4虫体の寄生であった (Table 1)。

陽性ウナギ血清と各種分別抗原の反応性 *A. crassus* 成虫抗原と陽性反応を示した IMES および IES の No.11, No.19 と *A. crassus* 分別抗原 (成虫: AD, 雌: ♀, 雄: ♂, 表皮: CU, 生殖腺: GO, 消化管: IN) とのゲル沈降反応結果は、IMES では、虫体雌雄と消化管抗原間で複数の沈降線が確認されたが、表皮および生殖腺抗原における反応性は低かった (Fig. 3)。

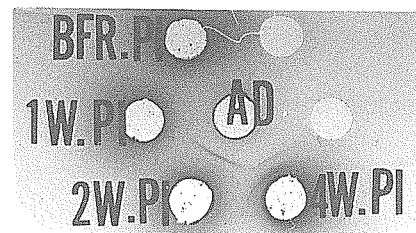


Fig. 1. Precipitation lines formed between *Anguillicola crassus* adult antigen (AD) and various postimmunized (PI) sera of eels with same antigen (BFR PI: Before immunization; 1W PI: 1 week postimmunization; 2W PI: 2 weeks PI; 4W PI: 4 weeks PI).

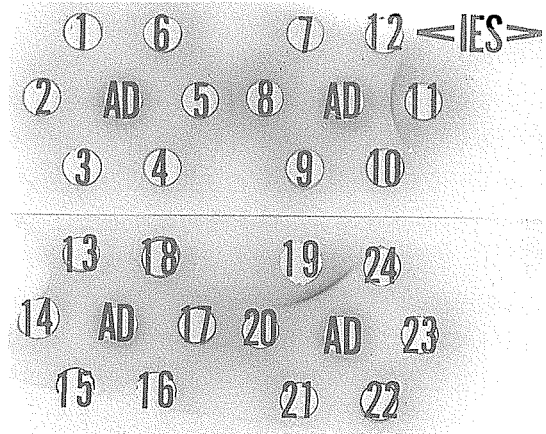


Fig. 2. Precipitation lines between adult antigen (AD) and infected eel sera (IES: well Nos. 1-24) or non-infected eel sera (NES: well Nos. 1-24).

Table 1. Number of the female and male worms of *Anguillicola crassus* in the examined specimens of Japanese eels

Eel No.	Female worm	Male worm	Total worm
1	0	2	2
2	0	2	2
3	0	2	2
4	0	1	1
5	0	1	1
6	1	2	2
7	0	3	3
8	0	1	1
9	0	1	1
10	0	1	1
11	0	1	1
12	1	1	2
13	0	1	1
14	0	1	1
15	0	1	1
16	1	2	3
17	0	1	1
18	1	0	1
19	2	2	4
20	0	1	1
21	0	1	1
22	0	1	1
23	0	2	2
24	0	1	1

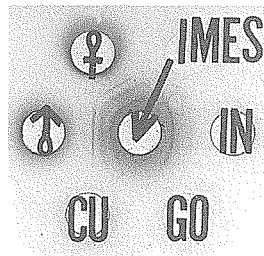


Fig. 3. Precipitation lines formed immunized eel serum (IMES) and various somatic antigens (AD: adult antigen; ♀: whole adult female worm; ♂: whole adult male worm; CU: Cuticle; GO: Gonad; IN: Intestine).

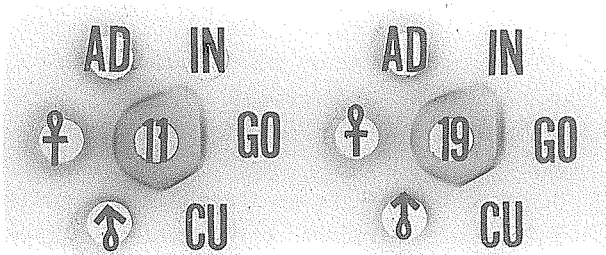


Fig. 4. Precipitation lines formed positive eel sera with *A. crassus* (wells 11 and 19) and various somatic antigens (AD: adult antigen; ♀: whole adult female worm; ♂: whole adult male worm; CU: Cuticle; GO: Gonad; IN: Intestine).

これに対して IES の 2 検体は、成虫雌雄、表皮および生殖腺抗原間で 1 本の沈降線が確認され、それぞれの沈降線は融合しており、その反応性は表皮抗原に強く認められた。しかし、IMES と異なり消化管抗原に対する反応性は非常に弱かった (Fig. 4)。

考 察

本実験では、手法が簡便な寒天ゲル内沈降法を用いて、まだ報告のないニホンウナギに対する鰻線虫の抗原性や血清診断法について検討した。まず作製した成虫抗原と抗体保有状態が明瞭な免疫血清を用いて、ゲル内沈降反応における陽性反応を確認した。

成虫抗原と自然感染ウナギ血清の反応の結果、自然感染個体にはゲル内沈降反応で検出可能な抗体が産生されていることが確認された。また、非感染ニホンウナギではすべて陰性であったことから、抗体特異性が高いことが示唆された。しかし、自然感染ニホンウナギからの沈降抗体の検出では、検出率が 8.4% と低い。ため、鰻線虫症の血清診断法としては検出感度面で問題があり、より感度の高い診断法を行う必要性があると思われた。

陽性反応が得られた免疫血清および自然感染血清と各種分別抗原との反応性を検討したところ、免疫血清は複数の沈降線を形成したことにより、鰻線虫内に複数の抗原成分が存在することが明らかとなった。また自然感染血清では、強い 1 本の沈降線を形成したことにより、それらのうち 1 種の抗原成分を特異的に認識していることが示唆された。陽性反応を示した単性感染血清は、雌雄の両抗原と反応し、それぞれは融合していたことから、雌雄に共通抗原が存在していることが示唆された。また部分抗原との反応性は、免疫血清では消化管を強く認識し、表皮および生殖腺に対しては弱かった。これは、成虫免疫抗原作製の際に消化管の占める割合が多いことが原因であると考えられる。それに対して自然感染血清では、表皮および生殖腺が強く認識された。このことは、ウナギの鰻線虫感染時の認識抗原が、宿主と接触の多い虫体外層部に位置する表皮や生殖腺に存在し、虫体内部に位置する消化管は認識されにくいと考えられる。したがって、ニホンウナギ鰻線虫症の血清診断における好適抗原は、虫体から消化管を除去した表皮および生殖腺抗原であることが示唆された。

Buchmann *et al.*¹²⁾ は、抗ヨーロッパウナギ IgM 血清を二次抗体に用いるイムノプロット法により、ヨーロッパウナギに対する *A. crassus* の主要抗原を報告している。また Höglund and Pilström¹³⁾ は、間接酵素抗体法 (Indirect-ELISA) による *A. crassus* 成虫抽出抗原の精製と特異抗体の検出について報告している。し

かし、いずれの実験でも作製した抗原中に混入している宿主由来成分 (*A. crassus* 消化管内のウナギ IgM) と二次抗体が反応し、高いバックグラウンドを生じてしまうことから、実用には至っていない。藤田¹⁴⁾は、高感度測定法であるイムノプロット法や ELISA は、術式や反応条件によって必ずしも反応が一定にはならないことが多く、この方法だけでは、ルーティンな診断法にはならないと報告している。よって、本症においても先に ELISA のような感受性の高い診断法を行って抗体スクリーニングを行った後、感受性は低いが特異性に優れた寒天ゲル内沈降法を行い、特異性の確認を行うことが最も良い診断方法と考えられる。

ゲル内沈降法を用いた血清診断は、哺乳類の各種寄生虫の鑑別疾患で多く利用されており、特異性の高い反応が得ることができると報告されている^{15,16)}。またウナギの感染症に対する血清診断例としては、細菌症では、西淵と室賀¹⁷⁾が、養殖ウナギから分離された各種病原性 *Vibrio* 属の本法による血清診断を行っている。また Salati *et al.*^{18,19)} は、*Edwardsiella tarda* 抗原に対するウナギの免疫応答の確認に、本法を利用し好成績を得ている。また寄生虫症では、Mc Arthur²⁰⁾ が、消化管寄生線虫 *Telogaster opisthochis* に感染したニュージーランドウナギの血清診断に、Wang *et al.*²¹⁾ は、*Pleistophora anguillarum* に感染したベコウナギからの抗体の検出に本法を用いている。

今後は、ニホンウナギ鰻線虫症の ELISA などの検出感度の高い血清診断を行うために、高い抗原性を示した *A. crassus* 表皮抗原のさらなる解析が期待される。

要 約

ニホンウナギに対する鰻線虫症の血清学的研究や診断法に関する報告はない。ニホンウナギに対する鰻線虫 *Anguillicola crassus* の抗原性状を、寒天ゲル内沈降法を用いて、*A. crassus* 成虫抽出抗原と免疫ニホンウナギ血清との反応性を調べるとともに、自然感染ニホンウナギ血清からの沈降抗体の検出を試み、診断法としての有効性を検討した。その結果、ニホンウナギも、免疫または自然感染後にゲル内沈降反応で検出可能な特異抗体が産生されていることが確認できた。また各種部分抗原に対する反応性は、虫体表皮および生殖腺抗原を強く認識したことから、好適抗原は、宿主と接触の多い表皮や生殖腺に存在している可能性が示唆され、抗原作製過程において消化管を除去することが必要であると考えられた。しかし本症の寒天ゲル内沈降反応による血清学的診断は、自然感染ウナギからの抗体検出率は8.3%と低く、感度の面で問題があり、感度の良い血清診断法との組み合わせによる診断法が有

効な診断法であることが示唆された。

謝 辞

本研究の材料の提供に便宜を図っていただいた、(有)うなよし関野忠明氏に深謝する。なお、この研究は、日本大学学術研究助成金 (C-96) により実施した。ここに付記し、謝意を表する。

文 献

- 1) Yamaguchi, S. (1935): Studies on the helminth fauna of Japan. Pt. 9. Nematodes of fishes, I. *Jpn. J. Zool.*, **6**, 337-386.
- 2) Kuwahara, A., A. Niimi, and H. Itagaki (1974): Studies on a nematode parasitic in the air bladder of the eel. I. Description of *Anguillicola crassa* n. sp. (Philometridea, Anguillicolidae). *Jpn. J. Parasitol.*, **23**, 275-279.
- 3) Taraschewski, H., F. Moravec, T. Lamah, and K. Anders (1985): Distribution and morphology of two helminths recently introduced into European eel populations: *Anguillicola crassus* (Nematoda, Dracunculoidea) and *Paratenuisentis ambiguus* (Acanthocephala, Tenuisentidae). *Dis. Aquat. Org.*, **3**, 167-176.
- 4) De Charleroy, D., K. Tomas, and F. Ollevier (1990): The life cycle of *Anguillicola crassus*. *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 55-57.
- 5) 江草周三 (1988): 改訂増補魚病学 [感染症・寄生虫病篇]. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 330-332.
- 6) 畑井喜司雄・小川和夫・廣瀬一美 (1988): 魚病図鑑. 緑書房, 東京, pp. 134.
- 7) Molnár, K., C. Szekely, and F. Baska (1991): Mass mortality of eel in Lake Balaton due to *Anguillicola crassus* infection. *Bull. Eur. Assoc. Fish. Pathol.*, **11**, 211-212.
- 8) Ooi, H., -K. and W., -S. Wang (1996): An epizootic of anguillicolosis in cultured American eels in Taiwan. *J. Aquat. Anim. Health.*, **8**, 163-166.
- 9) Nagasawa, K., Y., -G. Kim, and H. Hirose (1994): *Anguillicola crassus* and *A. globiceps* (Nematoda: Dracunculoidea) parasitic in the swimbladder of eels (*Anguilla japonica* and *A. anguilla*) in East Asia: a review. *Folia Parasitol.*, **41**, 127-137.
- 10) Höglund, J. and L. Pilström (1995): Mechanical isolation and characterization of antigens from adult *Anguillicola crassus*. *Fish Shellfish Immunol.*, **5**, 51-60.
- 11) 松橋 直 (1961): 寒天内沈降反応. 臨床検査, **5**, 275-280.
- 12) Buchmann, K. L., O. Pedersen, and J. Glamann (1991): Humoral immune response of European eel *Anguilla anguilla* to major antigen in *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Dis. Aquat. Org.*, **12**, 55-57.
- 13) Höglund, J. and L. Pilström (1994): Precipitation of adult *Anguillicola crassus* whole-worm extract antigen for detection of specific antibodies in serum from the European eel (*Anguilla anguilla*) by ELISA. *Fish Shellfish Im-*

- munol.*, 4, 311-319.
- 14) 藤田紘一郎 (1989): 寄生虫感染の免疫および免疫診断, 最新医学, 44(4), 678-685.
 - 15) 荒木国興 (1983): ゲル内沈降反応による寄生虫症の診断. 病理と臨床, 1, 1383-1388.
 - 16) 荒木国興 (1986): 寄生虫疾患の診断. 日医新報, 3229, 133.
 - 17) 西淵光昭・室賀清邦 (1980): 養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio*-V. 血清学的検討. 魚病研究, 14(3), 117-124.
 - 18) Salati, F., K. Kawai, and R. Kusuda (1983): Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Pathol.*, 18(3), 135-141.
 - 19) Salati, F., K. Kawai and R. Kusuda (1984): Immuno response of eel against *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide. *Fish Pathol.*, 19(3), 187-192.
 - 20) Mc Arthur, C.-P. (1987): Humoral antibody production by New Zealand eels, against the intestinal trematode *Telogaster opisthorchis* Macfarlane, 1945. *J. Fish Dis.*, 1, 377-387.
 - 21) Wang, C.-H., Y.-S. Chang, C.-F. Lo and G.-H. Kou (1990): The studies of "Beko disease" in eel. Proc. ROC=Japan Symp. Fish Dis. (ed. by G.-H. Kou, H. Wakabayashi, I.-C. Liao, S.-N. Chen, and C.-F. Lo). *Natl. Sci. Council.*, Taipei, Taiwan, pp. 144-154.