

令和 6 年 4 月 23 日現在

機関番号：80122

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05736

研究課題名（和文）海中のシロザケ稚魚に寄生する原虫類鞭毛虫の病原性解明と防除技術の開発

研究課題名（英文）Studies on pathogenicity and control method in flagellates infecting juvenile chum salmon in seawater

研究代表者

水野 伸也（Mizuno, Shinya）

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・水産研究本部 さけます・内水面水産試験場・センター長

研究者番号：70442655

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）：淡水中の鞭毛虫寄生稚魚を海水へ移すと、既に移行前海水適応能の低下していた一部の稚魚が死亡したため、淡水中の鞭毛虫寄生は、降海後サケの初期減耗要因となることが示唆された。海水中稚魚の鞭毛虫総合的防除技術として、特許飼料2%添加飼料の給餌及びオキシリン酸20mg/kg・日5日間の投与が有効と判断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

・鞭毛虫が検出された孵化場に対し、淡水中稚魚への本虫の寄生が降海後サケの初期減耗要因となる可能性を説明し、注意喚起を促すことにより、現場で本虫の防疫について意識を高めることができた。

・開発した総合的防除技術は、サケ海中飼育事業で鞭毛虫の有効な対策として活用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Present study examined pathogenicity and control method in two flagellates, *Ichthyobodo salmonis* and *Spironucleus salmonis*, infecting juvenile chum salmon in seawater. Some freshwater-adapting juvenile chum salmon infected with either *I. salmonis* or *S. salmonis* showed mortality after transferring to seawater, which suggested that infection of either *I. salmonis* or *S. salmonis* in freshwater caused early mortality after migration to sea in juvenile chum salmon. In addition, infection of both *I. salmonis* and *S. salmonis* are probably controlled by feeding commercial trout diet supplemented with proprietary food and administration of oxolinic acid in seawater-adapting juvenile chum salmon.

研究分野：魚類生理学

キーワード：サケ稚魚 イクチオボド スピロヌクレウス 海水適応能 オキシリン酸

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- ・道内の孵化場では、淡水飼育中のサケ稚魚に原虫類鞭毛虫が寄生し、死亡被害を及ぼす症例が発生している。
- ・降河中の稚魚、海中飼育放流用の稚魚及び沿岸で漁獲された親魚から、鞭毛虫の寄生が検出されている。
- ・道内の秋サケ資源が近年減少する中、鞭毛虫の寄生が降海後稚魚の初期減耗要因となる可能性について、これまで検証された例はない。
- ・海中飼育放流用稚魚について、鞭毛虫の防除技術はこれまで開発されていない。

2. 研究の目的

- ・鞭毛虫の寄生が、降海後サケ稚魚の初期減耗要因となる可能性について実験的に検証するため、感染試験と疫学調査を通して、海水中の稚魚に寄生する鞭毛虫の病原性・感染性とその寄生実態を明らかにする。
- ・海中飼育放流用稚魚への鞭毛虫の寄生を抑制するため、海水中の本虫について、特許飼料と水産用医薬品を用いた防除技術を開発する。

3. 研究の方法

1) 鞭毛虫の寄生が海水中のサケ稚魚に及ぼす病原性の解明 (R3~R4年度)

- ・ねらい：
イクチオボド (ICT) 及びスピロヌクレウス (SPR) が海水中で水平感染するのか明らかにする。
淡水中で各鞭毛虫の寄生を受けた稚魚が、海水移行後に本症を発症して死亡するのかを調べる。各虫がどの程度寄生すると鞭毛虫症を発症させ、稚魚に海水適応能低下や死亡を引き起こすのかを明らかにする。
過去に採集した沿岸域または海中飼育の稚魚サンプルを用いて、両鞭毛虫の寄生実態を調べ、その稚魚に両鞭毛虫症が発症していたのか明らかにする。
- ・試験項目等：
海水中の稚魚を用いた各鞭毛虫の感染試験、寄生強度及び血漿 Na⁺濃度解析 (R3年度)
淡水中で各鞭毛虫の寄生を受けた稚魚の海水移行試験、寄生強度及び血漿 Na⁺濃度解析 (R4年度)
疫学調査：寄生強度解析 (R3年度)

2) 海水中のサケ稚魚の鞭毛虫防除技術の開発 (R4~R5年度)

- ・ねらい：
各鞭毛虫の予防に有効な特許飼料(混合植物性油脂)の市販飼料添加濃度を明らかにする。
SPRの駆虫に有効なオキシリン酸(OA)の飼料添加濃度を明らかにする。
特許飼料給餌とOA投与を組み合わせた両鞭毛虫防除技術を開発する。
- ・試験項目等：
特許飼料を予防給餌した稚魚の各鞭毛虫感染試験、寄生強度解析 (R4年度)
SPRの寄生を受けた稚魚へのOA添加飼料給餌試験、寄生強度解析 (R5年度)
と の技術を組み合わせた両鞭毛虫防除効果の検証試験、寄生強度解析 (R5年度)

4. 研究成果

- ・鞭毛虫感染魚の全ての海水飼育試験には、8 調温海水かけ流し 60L 水槽を用いた。
- ・本成果に記述した全ての鞭毛虫寄生強度には、ICT 感染魚では尾鰭を、SPR 感染魚では腸を検体として絶対定量した鞭毛虫 DNA を基に、そのコピー数と鞭毛虫個体数の相関回帰式から求めた推定個体数を用いた。

【1)- 】 ICT 及び SPR は、海水中で寄生経験のない稚魚に新たに水平感染するものの、海水適応能低下を伴う鞭毛虫症を発症させるまでの増殖を行わなかったため、両鞭毛虫の海水中における病原性は低いと考えられる。

【1)- 】 ICT、SPR それぞれについて、淡水感染魚 50 尾 (平均寄生強度 ICT:563 ± 732 個体/尾鰭、SPR:106 ± 148 個体/腸) の 28 日間海水移行飼育 (感染魚・海水) を行い、この対照として淡水感染魚の淡水継続飼育 (感染魚・淡水)、淡水非感染魚の海水移行飼育 (非感染魚・海水) 及び淡水継続飼育 (非感染魚・淡水) をそれぞれ 50 尾ずつ別の水槽で実施した。28 日目 ICT 感染魚の累積死亡率は感染魚・海水で 12%、感染魚・淡水で 38% であり (図 1A)、28 日目 SPR 感染魚の累積死亡率は感染魚・海水で 6%、感染魚・淡水で 12% だった (図 1B)。両鞭毛虫の 28 日目非感染魚の累積死亡率は、非感染魚・海水、非感染魚・淡水ともに 0% だった。この結果から、海水よりも淡水で両鞭毛虫の病原性は強く、淡水感染魚が降海した場合、既に淡水中で海水適応能の低下した一部の感染魚が海で死亡することが示唆された。海水移行後の各鞭毛虫感染魚について、血漿 Na⁺濃度と寄生強度の相関を調べた結果、各感染魚共に有意な正の相関がみられた (図 2A、B)。次に、正常な海水適応能を示すサケ稚魚の血漿 Na⁺濃度 (170mM 以下) と寄

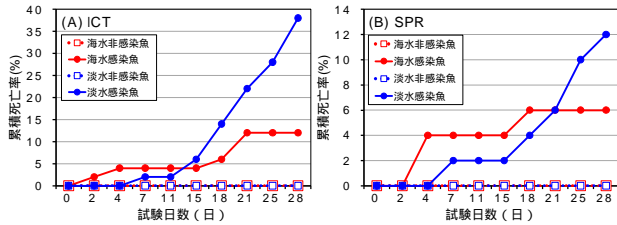


図 1. 淡水中で鞭毛虫の感染を受けた稚魚の海水移行に伴う累積死亡率の変化
左図(A)は ICT を、右図(B)は SPR を示す。

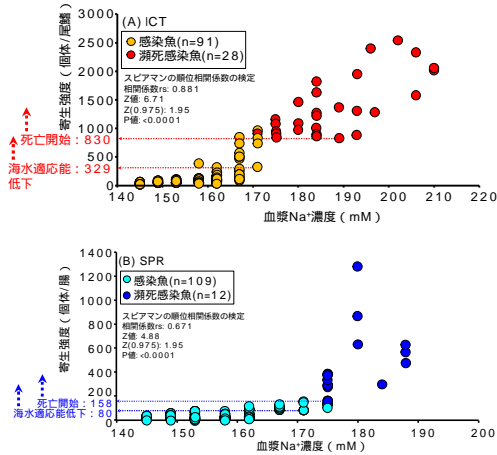


図 2. 海水移行後の鞭毛虫感染稚魚における血漿 Na⁺濃度と寄生強度の相関
上図(A)は ICT を、下図(B)は SPR を示す。

表 1. 海水中の稚魚の鞭毛虫防除技術開発のために設定した試験群

試験群	添加物	鞭毛虫	被感染魚(尾)	感染魚(尾)
1. 対照(ICT感染)	特許飼料0%	ICT	50	10
2. 特許1%	特許飼料1%	ICT	50	10
3. 特許2%	特許飼料2%	ICT	50	10
4. 特許3%	特許飼料3%	ICT	50	10
5. 特許5%	特許飼料5%	ICT	50	10
6. 対照(SPR感染)	特許飼料0%	SPR	50	10
7. 特許1%	特許飼料1%	SPR	50	10
8. 特許2%	特許飼料2%	SPR	50	10
9. 特許3%	特許飼料3%	SPR	50	10
10. 特許5%	特許飼料5%	SPR	50	10
11. 対照(OA 0mg)	OA0mg/kg・日	SPR	0	50
12. OA 10mg-5日	OA10mg/kg・日 5日間	SPR	0	50
13. OA 10mg-7日	OA10mg/kg・日 7日間	SPR	0	50
14. OA 20mg-3日	OA20mg/kg・日 3日間	SPR	0	50
15. OA 20mg-5日	OA20mg/kg・日 5日間	SPR	0	50
16. 対照(混合感染)	特許飼料0%+OA0mg/kg・日	ICT+SPR	50	10(CT), 10(SPR)
17. 特許(混合感染)	特許飼料2%+OA0mg/kg・日	ICT+SPR	50	10(CT), 10(SPR)
18. 特許+OA(混合感染)	特許飼料2%+OA20mg/kg・日 5日間	ICT+SPR	50	10(CT), 10(SPR)

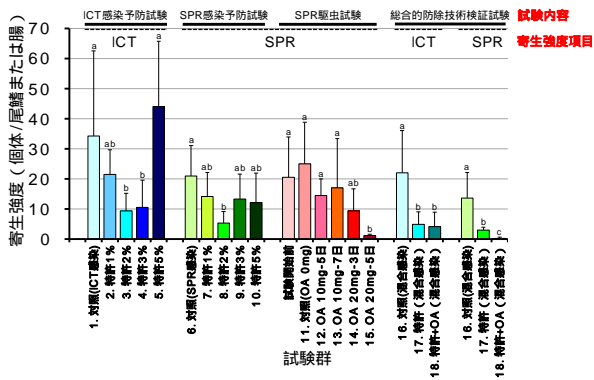


図 3. 試験開始 35 日目の各試験群の鞭毛虫寄生強度
各試験群寄生強度は平均値±標準偏差 (n=10)を示す。統計検定は、ICT 感染予防試験、SPR 感染予防試験、SPR 駆虫試験、総合的防除技術検証試験ごとに実施し、異なるアルファベット文字の付いたカラム間に有意差があることを示す (P<0.05: Kruskal-Wallis 検定後、post-hoc test として Steel-Dwass test を実施)。感染源となる両鞭毛虫混合感染魚の平均寄生強度は、ICT(CT): 20.4 個体/尾、SPR(SPR): 10.0 個体/尾であった。

感染魚に、特許飼料添加配合飼料を 7 日間予防給餌した後に、被感染魚、ICT 感染魚と SPR 感染魚の 28 日間の同居感染試験を行ない、合計 35 日間の飼育を行った。飼育 22 日目(感染試験 15 日目: 1)- の成果で感染魚との同居水平感染は 15 日間で完了していたため)から前述の処方 OA を投薬した。飼育終了時、総合的防除技術試験群 (No. 18) は対照群 (No. 16) と比べ有意に高い両鞭毛虫の防除効果を、特許飼料給餌のみの群 (No. 17) と比べ ICT では同等の防除効果を、SPR では有意に高い防除効果を示した。以上の結果から、総合的防除技術は有効と判断され、海水中的のサケ稚魚の鞭毛虫総合対策に活用できることが示唆された。

生強度の最も小さな瀕死感染魚を指標として、稚魚に海水適応能低下と死亡を引き起こす寄生強度の目安値を検討した。ICT では海水適応能低下が 329 個体/尾、死亡が 830 個体/尾 (図 2A) SPR では前者が 80 個体/尾、後者が 158 個体/尾と推察された (図 2B)。

【1)- 】採集した稚魚について、ICT 感染率は沿岸 (12/12 箇所) 海中飼育 (5/5 箇所) とともに 100%、SPR 感染率は沿岸で 83% (10/12) 海中飼育で 40% (2/5) であった。両鞭毛虫は沿岸に生息する稚魚及び海中飼育稚魚に広く寄生すると結論した。この稚魚の寄生強度最大値 (ICT: 38 個体/尾、SPR: 49 個体/尾) は、1)- の被害性を示す目安値より低く、採集した全ての稚魚に鞭毛虫症が発症していた可能性は低いと考えられる。

【2)- 】ICT、SPR それぞれについて 5 つの試験群を設け (表 1: No. 1~10) 鞭毛虫の寄生を受けていない被感染魚に、0、1、2、3、5%いずれかの濃度の特許飼料を外割で添加した配合飼料を毎日各群に等量与えた。7 日間(淡水中で予防効果が発揮される必要最低給餌日数)の予防給餌後に、被感染魚と各鞭毛虫感染魚の 28 日間の同居感染試験を行なった。各群には感染試験中も予防用飼料と同様の飼料を与えた。22、35 日目に寄生強度を調べた結果、両日とも対照群と比べ有意に低い値を示した群は、ICT では 2%及び 3%添加群の 2 群、SPR では 2%添加群のみであり、2%及び 3%添加群の ICT 寄生強度の値の間には有意差がなかった (図 3)。以上の結果から、両鞭毛虫を共通で予防するために有効な特許飼料の配合飼料添加濃度は 2%と結論した。

【2)- 】5 つの試験群を設け (表 1: No. 11~15) 各群の SPR 感染魚に 0mg/kg・日、10mg/kg・日 5 日間、10mg/kg・日 7 日間、20mg/kg・日 3 日間、20mg/kg・日 5 日間いずれかの処方投薬を行った。海水サケへの OA 投薬には用法、用量、使用禁止期間が薬機法で定められているため、その処方に従い試験群を設定した。投薬終了後の感染魚には、OA を含まない配合飼料を毎日各群に等量与えた。15 日目及び使用禁止期間明けの 35 日目に感染魚の寄生強度を調べた結果、対照群の寄生強度に比べ有意に低い値を示したのは、20mg/kg・日 5 日間投与群のみであった (図 3)。この結果から、20mg/kg・日 5 日間 OA 投与が SPR 駆虫への最も有効な処方と結論した。

【2)- 】2)- 及び 2)- の結果に基づき 3 つの試験群を設け (表 1: No. 16~18) 特許飼料 2%添加飼料給餌及び OA20mg/kg・日 5 日間投与の鞭毛虫総合的防除技術の検証を行った。鞭毛虫の寄生を受けていない被感染

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Mizuno S., Miyamoto M., Hatakeyama M., Katsumata Y., Nishikawa S., Urawa S.	4. 巻 27
2. 論文標題 PCR-based discrimination and scanning electron microscopy of genotypically differentiated ectoparasitic flagellates <i>Ichthyobodo</i> spp. infecting salmonid species cultured in freshwater in Hokkaido, Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 83-94
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Mizuno S., Urawa S.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Nova Science Publishers	5. 総ページ数 18
3. 書名 Advances in Medicine and Biology	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------