

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：72645

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 年～2012 年

課題番号：22380105

研究課題名（和文）

クロマグロ住血吸虫症の対策に向けての基礎研究

研究課題名（英文）

Basic studies on the control of blood fluke infection of Pacific bluefin tuna

研究代表者

小川 和夫 (OGAWA KAZUO)

財団法人 目黒寄生虫館 館長

研究者番号：20092174

研究成果の概要（和文）：

第一に、太平洋クロマグロの住血吸虫は、従来、主に鰓血管に寄生する *Cardicola orientalis* 1 種と考えられていたが、第 2 種として主に心室に寄生する *Cardicola opisthorchis* を見出し、新種記載した。第二に、鰓に集積した虫卵がどちらの住血吸虫に由来するかを形態によって鑑別する方法を開発した。さらに、鰓組織を NaOH で融解したのちに、虫卵を計数する方法を開発した。第三に、沖出し後 45 日目に 2 種の寄生を確認し、その 1 週間後には成虫を、さらにその 1 週間後には鰓に虫卵を確認した。第四に、*C. opisthorchis* はプラジクアンテル (PZQ) 7.5 mg/kg 魚体重以上の用量の 3 日間連続投与で完全に駆虫されることを確認した。なお、投与 1 か月後には再寄生が認められた。魚体内の薬剤は投与 24 時間後に検出限界以下となった。第五に、PZQ の *in vitro* における効果を調べた。SEM 観察によって、2 種ともに外被の損傷が激しかった。すなわち、*C. opisthorchis* では体表の膨隆と収縮、および体表に皺形成が顕著となった。一方、*C. orientalis* では体表面に小穴の形成が特徴的であった。

研究成果の概要（英文）：

Firstly, a second blood fluke species from Pacific bluefin tuna was found from the heart ventricle and described as *Cardicola opisthorchis* n. sp. Secondly, new methods were developed to distinguish eggs of *C. orientalis* from those of *C. opisthorchis* morphologically, and to count the number of eggs in the gills. Thirdly, infection cycle was partly elucidated. Namely, both species of blood flukes were found in juvenile tuna 45 days after transfer to outside net cages; one week later, flukes were matured and laid eggs after one more week. Fourthly, *C. opisthorchis* was eradicated from tuna with oral administration of praziquantel (PZQ) at 7.5 mg/kg fish body weight or more for 3 consecutive days. Reinfection was confirmed 1 month after medication. PZQ concentration in tuna decreased to the undetectable level (0.02 µg/L) 24 h after administration. Lastly, SEM observation of the two species of blood flukes shows swelling and contraction of the tegument and formation of many minute furrowed ridges in *C. opisthorchis*, while in *C. orientalis*, many minute holes were characteristically formed on the tegument.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
平成 23 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
平成 24 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：住血吸虫，クロマグロ，*Cardicola*，プラジクアンテル，対策

1. 研究開始当初の背景

クロマグロ資源は減少が著しく、漁獲制限は厳しさを増している。今後の安定供給は養殖に頼らざるを得なくなることから、近年、各地でクロマグロ養殖が展開されるようになった。養殖クロマグロは他の海産魚に比べ病気に罹りにくいとされてきたが、最近、日本海側と太平洋側のいずれの養殖場でも住血吸虫（血管内吸虫）による被害が深刻になっている。申請者はこの住血吸虫が新種の寄生虫であり、予備調査でクロマグロに強い病害性を持つことを明らかにした。この寄生虫症（以下、本症）の対策は確立していない。一方で、一部に未承認薬が駆虫剤として用いられている実態があり、食の安全上の問題となっている。本症の強い害作用と広域での発生を考えると、今後のクロマグロ養殖の重大な障害になることが懸念されている。

2. 研究の目的

クロマグロの安全かつ安定的な養殖生産に資することを目的として、本症を排除するための基礎研究を行う。具体的には、1) 申請後に初めて確認された寄生種を含む住血吸虫 2 種を同定し、それぞれの種の寄生部位の違いを明らかにする；2) 鰓に集積した住血吸虫 2 種の虫卵を PCR によって鑑別を行い、魚体への影響評価のために鰓の虫卵計数法を開発する；3) セルカリアの侵入時期を推定する；4) 野外飼育されたクロマグロを用いて、駆虫実験によってプラジクアンテル（PZQ）の有効性を確認し、最低有効濃度とクロマグロ体内における PZQ の動態を調べる；5) PZQ の有効性を虫体の *in vitro* 培養系を用いて明らかにする。

これらの基礎研究によって、クロマグロ養殖における住血吸虫の寄生の推移、魚体への影響、治療薬候補としての PZQ の有効性、安全性、用法についての知見を集積することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 寄生種 2 種の同定とそれぞれの種の寄生部位：あらたに心室から未知の住血吸虫を採集し、形態学的検討のための標本作製と分子生物学的検討のため抽出された虫体遺伝子を解析した。

2) 鰓に集積した虫卵の種鑑別と計数法の開発：2 種の住血吸虫を区別する PCR 系を開発した。鰓に集積した虫卵を形態と遺伝子によ

る鑑別を行った。鰓の虫卵数を求めるために、直接計数やアルカリ処理後の鰓から計数する方法を試みた。

3) セルカリアの侵入時期の推定：種苗生産されたクロマグロ幼魚を定期的にサンプリングし、前項によって開発した鑑別法を用いて、マグロへの侵入時期を推定した。

4) 野外駆虫実験：感染の確認されたクロマグロ幼魚 10・50 尾を小型の網イケスに収容し、PZQ の経口投与による薬剤有効性試験を行った。投与量は 150, 15, 1.5, 0 mg/kg 魚体重とし、3 日間連続投与した。この試験で 15 mg/kg 以上の区で有効であったため、最低有効量決定するために、再度 15, 7.5, 3.25, 0 mg 区を設定し、駆虫試験を実施した。体内動態試験では、7.5 mg/kg を投薬歴のないクロマグロに経口投与し、投薬前、投薬後 30 分、60 分、90 分、2 時間、3 時間、4 時間、6 時間、10 時間、24 時間、48 時間、72 時間に採材し、肝臓、腎臓、筋肉、血清中の PZQ 濃度を HPLC により測定した。

5) PZQ の *in vitro* における効果：*C. opisthorchis* を PZQ が 0.2 ppm と 1 ppm になるように調整した L-15 培地に収容して、倒立顕微鏡下で連続観察した。薬剤を含む培地中で 24・72 時間処理した虫体を薬剤無添加の培地に移して、回復状態も観察した。別の機会に、*C. opisthorchis* と *C. orientalis* を PZQ の 0.2 ppm, 1 ppm, 5 ppm 加 L-15 培地に収容し、6.5 時間、13 時間、24 時間後に SEM 用に固定し、PZQ の効果を検討した。

4. 研究成果

1) 寄生種 2 種の同定とそれぞれの種の寄生部位：これまでの検査で虫卵は鰓に、虫体は心臓と鰓血管のみにみられた。本研究申請時点では、住血吸虫は単一種と考えられていたが、形態と遺伝子解析の結果、主に鰓血管寄生の *Cardicola orientalis* とは別に、心室に新種 *Cardicola opisthorchis* が寄生することを明らかにし、記載報告した。

2) 鰓に集積した虫卵の種鑑別と計数法の開発：鰓薄板内には主に楕円形虫卵、小入鰓動脈内には三日月型虫卵が集積していた。これらの虫卵の遺伝子解析の結果、楕円形、三日月型虫卵はそれぞれ *C. orientalis*, *C. opisthorchis* のものであることが明らかとなった。これにより、鰓の虫卵観察によって 2 種の寄生の有無を簡易診断する方法を確立した。虫卵の直接計数は煩雑で精度にも問題

があったため、アルカリ処理後の鰓を材料として計数することとした。鰓弁内の虫卵の分布は不均一であったため、片側4枚の鰓組織をNaOHで融解して、一定量の液中の虫卵を計数し、換算して鰓全体の虫卵数を表現することとした。その結果、沖出し10週後で131万個もの虫卵が集積したクロマグロもみられた。

3) セルカリアの侵入時期の推定: PCR検査によって、沖出し後45日目に鰓と心臓で2種の寄生を確認した。その1週間後には心臓に成虫を確認し、さらにその1週間後には鰓に虫卵を確認した。これにより、セルカリアは沖出し直後からマグロに侵入し、2ヶ月後には成熟、産卵することが示された。

4) 駆虫実験: 心室に寄生する *C. opisthorchis* はPZQの15 mg/kg魚体重以上の用量の3日間連続投与で完全に駆虫されることを確認した。なお、投与1か月後には再寄生が認められた。最低有効量決定試験においては、7.5 mg/kg以上の用量での3日間連続投与で完全駆虫が確認された。体内動態試験では、血清中で90分後に最大値の2.0 µg/Lとなった。いずれの臓器においても投与10時間後にほぼ消失し、24時間後には検出限界(0.02 µg/L)以下となった。

5) PZQのin vitroにおける効果: *C. opisthorchis* では0.2 ppm・24時間処理で明瞭な影響が観察された。薬剤を含む培地中で24~72時間処理した虫体を薬剤無添加の培地に移したところ、0.5 ppm・72時間処理で、薬剤の影響から回復できなくなった。SEM観察では、24時間までにはPZQ無添加の対照区では病的変化はなく、虫体外被は規則正しく微細な畝状構造が配列し、体表面には乳頭状の突起が観察された。一方、*C. opisthorchis* 0.2 ppmの6.5時間処理では著変はみとめられなかったが、13時間後では体表の膨隆と収縮、および体表に皺形成が顕著となった。こうした病変は1 ppmでは6.5時間後にすでに明瞭であった。*C. orientalis*の0.2 ppmの6.5時間処理では体表の膨隆と収縮および皺形成はさほど顕著ではなかったが、体表面に小穴の形成が特徴的であった。1 ppmの6.5時間では、体表面の小穴以外に体表に皺の形成が認められ、16.5時間後にはさらに体表の膨隆と収縮も確認され、時間経過とともに病変はより顕著に表れる傾向があった。また、低濃度区での小穴の形成は軽微な個体が多かった。このように、SEM観察では *C. opisthorchis* と *C. orientalis* にみられた病変は異なった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

- ① Ishimaru, K., R. Mine, S. Shirakashi, E. Kaneko, K. Kubono, T. Okada, Y. Sawada and K. Ogawa: Praziquantel treatment against *Cardicola* blood flukes: determination of the minimal effective dose and pharmacokinetics in juvenile Pacific bluefin tuna. *Aquaculture*, 査読あり, 402-403, 2013, 24-27.
DOI:org/10.1016/j.aquaculture.2013.03.013
- ② Shirakashi, S., K. Tsunemoto, C. Webber, K. Rough, D. Ellis and K. Ogawa: Two species of *Cardicola* (Trematoda: Aporocotylidae) found in southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*, ranched in South Australia. *Fish Pathology*, 査読あり, 48 (1), 2013, 1-4.
DOI: 10.3147/j.sfp.48.1
- ③ Shirakashi, S., M. Andrews, Y. Kishimoto, K. Ishimaru, Y. Sawada, O. Murata and K. Ogawa: Oral treatment of praziquantel as an effective control measure against blood fluke infection in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture*, 査読あり, 326-329, 2012, 15-19.
DOI:10.1016/j.aquaculture.2011.10.035
- ④ Shirakashi, S., Y. Kishimoto, R. Kinami, K. Katano, K. Ishimaru, O. Murata and K. Ogawa: Morphology and distribution of blood fluke eggs and associated pathology in the gills of cultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Parasitology International*, 査読あり, 61 (2), 2012, 242-249.
DOI: 10.1016/j.parint.2011.10.002
- ⑤ Ogawa, K., K. Ishimaru, S. Shirakashi, I. Takami and D. Grabner: *Cardicola opisthorchis* n. sp. (Trematoda: Aporocolidae) from Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844) cultured in Japan. *Parasitology International*, 査読あり, 60 (3), 2011, 307-312.
DOI: 10.1016/j.parint.2011.05.002

[学会発表] (計8件)

- ① Ogawa, K. : Blood fluke infections of farmed Pacific bluefin tuna. ASP Parasitic Diseases in Fish Mariculture Workshop, 平成25年2月4日, Launceston, Tasmania, Australia

- ② 小川和夫・白樫 正・常本和伸・Claire Webber・Kirsten Rough：オーストラリアの蓄養ミナマガロにみられた住血吸虫の同定
日本魚病学会春季大会，平成 24 年 9 月 16 日，山口県下関
- ③ Shirakashi, S. 他 4 名：Parasitic diseases of cultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* and development of control measure.
World Aquaculture Society, 平成 24 年 3 月 2 日, Las Vegas, U.S.A.
- ④ 石丸克也, 峰 龍馬, 白樫 正, 小川和夫, 宮下 盛:クロマガロ住血吸虫に対するプラジクアンテルの最低有効量と体内動態.
日本魚病学会春季大会, 平成 24 年 3 月 17 日、東京
- ⑤ Shirakashi, S., K. Ishimaru, T. Okada and K. Ogawa : Control of blood fluke infections in cultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*.
Eighth International Symposium on Fish Parasites, 平成 23 年 9 月 27 日, Vina del Mar, Chile
- ⑥ 白樫 正・Melanie Andrews・石丸克也・岡田貴彦・村田 修・岸本喜樹・孫 暁楠・小川和夫：クロマガロ住血吸虫に対するプラジクアンテルの有効性について。
日本魚病学会春季大会, 平成 23 年 3 月, 東京
- ⑦ 岸本喜樹・小川和夫・白樫正：クロマガロ住血吸虫 2 種の虫卵観察。
日本魚病学会春季大会, 平成 23 年 3 月, 東京
- ⑧ 小川和夫・白樫 正・石丸克也・村田 修：養殖クロマガロには 2 種の住血吸虫が寄生する。
日本魚病学会秋季大会, 平成 22 年 9 月, 三重県津

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：魚類の住血吸虫の駆除剤および魚類の住血吸虫の駆除方法
発明者：小川和夫, 村田修, 澤田好史, 石丸克也, 白樫正, 高見生雄, 久保埜和成
権利者：国立大学法人東京大学, 学校法人近

畿大学, 長崎県, あすか製薬株式会社
種類：特許
番号：特許出願番号：特願 2012-009059,
特許出願公開番号：特開 2012-162524
(公開日：平成 24 年 8 月 30 日)
出願年月日：平成 24 年 1 月 19 日
国内外の別：日本のみ (国内優先権主張出願)

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小川 和夫 (OGAWA KAZUO)
財団法人 目黒寄生虫館・館長
研究者番号：20092174

(2)研究分担者

良永 知義 (YOSHINAGA TOMOYOSHI)
東京大学・農学生命科学研究科・教授
研究者番号：20345185

澤田 好史 (SAWADA YOSHIFUMI)
近畿大学・水産研究所・教授
研究者番号：80319764

(3)連携研究者

石丸 克也 (ISIMARU KATSUYA)
近畿大学・水産研究所・助教
研究者番号：00330241

白樫 正 (SHIRAKASHI SHO)
近畿大学・水産研究所・講師
研究者番号：70565936