

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：72645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292120

研究課題名(和文)クロマグロ種苗生産過程で発生する寄生虫病の制御

研究課題名(英文)Control of parasitic diseases of artificially produced Pacific bluefin tuna seeds

研究代表者

小川 和夫 (Ogawa, Kazuo)

公益財団法人目黒寄生虫館・その他部局等・館長

研究者番号：20092174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：養殖クロマグロに3種の住血吸虫が寄生し、それぞれに固有のフサゴカイ種が中間宿主となっていた。生活環が養殖場内で完結していることが明らかになった。そのうちの1種ゴカイについては、水深0～4 mで生息密度および寄生率が高く、7月に寄生のピークを示した。ゴカイ1個体が放出する感染期の幼生は最大で100万個体と算出された。粘液胞子虫については、新種を含む2種のクドアの筋肉寄生を明らかにした。寄生はマグロを海面生簀に移動した直後から起きると考えられた。ヒラマサ幼魚に寄生するクドアを用いた試験では、陸上飼育用水の濾過では寄生を防げなかったが、紫外線処理で防除に成功した。

研究成果の概要(英文)：Three species of blood flukes of the genus *Cardicola* were identified from farmed Pacific bluefin tuna (PBT). Their intermediate hosts, in which the three blood flukes use different terebellid polychaetes, were determined and their developmental stages were described. All the life cycles of the blood flukes infecting PBT were determined, which are completed within PBT farms. *Nicolea gracilibranchis*, the intermediate host of *Cardicola orientalis*, was most abundant in water depth of 0-4 m, and showed highest prevalence of infection in July. It is estimated that an infected *N. gracilibranchis* can release up to 1 million cercariae. As for *Kudoa* infection, *K. neothunni* and a new species, *K. hexapunctata* were found in the skeletal muscle. Infection started soon after PBT seeds were transferred from indoor tanks to sea cages. In experiments using *Seriola lalandi* seeds and *Kudoa yasunagai*, infection occurred in fish using filtered water, but was prevented using UV radiated water at 15mJ/cm<sup>2</sup>.

研究分野：魚病学

キーワード：クロマグロ 種苗生産 寄生虫 住血吸虫 クドア *Cardicola* *Kudoa*

### 1. 研究開始当初の背景

これまで、クロマグロには病気は少ないと考えられてきた。しかしながら、養殖の普及に伴い、様々な病気、特に寄生虫病が顕在化するようになった。それらのうち、心臓や鰓に寄生する住血吸虫については、私たちは種苗生産段階のクロマグロに2種が寄生することを明らかにした。これらの住血吸虫は養殖クロマグロの主要な生産県で確認され、鰓への虫卵集積に伴う血管閉塞によって宿主を死亡させることが知られている。いったん本寄生虫病が発生した水域では寄生が常態化し、対策を講じなければ種苗生産やその後の養殖が成り立たない。そうした状況下で、私たちはプラジクアンテル(以下、PZQ)の経口投与が顕著な駆虫効果を示すことを明らかにした。現在は獣医師の処方箋をもとに未承認のPZQを現場で投与しているという異常事態にある。そのため申請者はクロマグロ住血吸虫に対してPZQが水産用医薬品として承認を得るためのデータ取りを始めている。一方で、懸念もある。すなわち、いったん承認されると、PZQが処方箋なしで使用できるため、濫用によって寄生虫が薬剤耐性を獲得する危険がある。したがって、住血吸虫の感染サイクルを把握して、過剰投与を避けた適切な投薬計画を立てることが課題として残されている。

クロマグロにはクドア属の粘液胞子虫4種も寄生する。心臓や脳に寄生するクドアは異常遊泳や直接の死因になる可能性があり、筋肉寄生のクドアは生食による食中毒の原因として疑われている。クドアを含む粘液胞子虫に対しては化学療法剤が開発されていないことから、対策はいかに感染を予防するかに重点が置かれる。しかしながら、これまでに対策の確立した粘液胞子虫病はほとんどなく、クロマグロのクドアについては研究に手が付けられていない。

### 2. 研究の目的

近年、クロマグロは西日本各地で広く養殖されている。養殖種苗の約9割は天然ヨコワに依存しているが、クロマグロは絶滅危惧種に指定され、天然種苗の採捕も不安定である。したがって、今後のクロマグロ養殖においては人工種苗の大量生産が喫緊の課題であるが、安定的な生産には至っていない。大きな原因の一つは、種苗生産期に発生する感染症、特に寄生虫による疾病の発生である。私たちはこれまでに住血吸虫、粘液胞子虫、微胞子虫など約10種の寄生虫を種苗生産過程のクロマグロに確認している。なかでも住血吸虫と粘液胞子虫の寄生は種苗の健苗性や生残の重大な障害になっている。本研究ではクロマグロの安定的種苗生産に資することを目的として、住血吸虫と粘液胞子虫病の検査技法を確立し、感染を制御するための基礎研究を行う。

### 3. 研究の方法

クロマグロの種苗生産は初期1ヶ月の陸

上施設とその後、1-2ヶ月間の海面生け簀での飼育から成る。それぞれの飼育環境が大きく異なることから、2つの時期で別個の対策を立てる必要がある。また、住血吸虫と粘液胞子虫では多くの点で特性が異なるため、対策も異なる。

#### 1) 住血吸虫

陸上飼育期には寄生の予防、海面生け簀飼育期には虫卵の鰓への集積前の駆虫を目指した。陸上飼育では、砂ろ過された飼育水を用いたことによって寄生は確認されなかったため、研究は海面生け簀飼育期における対策に特化して取り組んだ。本住血吸虫の生活環は未解明で、魚への感染ステージであるセルカリアも特定されていなかった。本研究申請中に、既知2種の住血吸虫のうち、*C. opisthorchis* について、Sugihara et al. (2014)によって、クロマグロ飼育生け簀のフロートやロープ、および底泥から採集したフサゴカイの一種 *Terebella* sp. であることが報告された。そのため、本研究においても、海面生け簀のフロート、ロープ、底枠等、生け簀周辺の底泥や底生生物等から中間宿主の探索を試みた。先行研究によって、クロマグロ住血吸虫の中間宿主はフサゴカイであることが推定されたため、ゴカイの分類の専門家の内田紘臣氏(串本海中公園名誉館長)に協力をお願いした。フサゴカイ類から得られた発育段階の住血吸虫は遺伝子により同定し、フサゴカイは内田氏によって形態的に同定した。

本研究期間中に、中間宿主が特定されたため、中間宿主における寄生状況を把握するために生け簀周辺でフサゴカイ類の定期調査を行った。また、和歌山県のクロマグロ養殖場にもっともふつうに存在したフタエラフサゴカイ(*C. orientalis*の中間宿主)については、生物学的調査の一環として、水深別の生息状況を把握するための実験を行った。

#### 2) クドア

養殖クロマグロに寄生する粘液胞子虫は、心臓寄生の *Kudoa shiomitsui*、脳寄生の *K. yasunagai* と *K. prunusi*、筋肉寄生の *Kudoa* sp. で、すべてクドア属である。種苗生産の早い段階ほど寄生の影響を強く受けるため陸上飼育中の寄生の防除が重要となる。海面生け簀に移動後すぐのクロマグロ種苗に *K. shiomitsui* の寄生が確認されていることから、陸上施設で飼育中に感染していると考えた。ところが、陸上施設のクロマグロはハンドリングに弱く、調査や実験がほとんど不可能である。一方、脳寄生の *K. yasunagai* はクロマグロだけでなく、ヒラマサにも高率で寄生し、かつ陸上飼育中に感染する。そこで、扱いが困難なクロマグロに代わって、ヒラマサ種苗 - *K. yasunagai* をクドアの感染モデルとして設定することを思い立った。この場合、飼育水中の *K. yasunagai* 遺伝子の定量PCRによる検出に成功しているため、この方法によって、放線胞子(粘液胞子虫)の魚への侵入

ステージ)の飼育水中からの検出や出現頻度、ヒラマサへの侵入時期が特定可能となった。

海面生け簀移動後のクロマグロについては、*K. shiomitsui*, *K. prunusi*, *Kudoa* sp. の遺伝子を検出する特異プライマーを設計して、生け簀周辺の海水中のクドア遺伝子を種ごとに検出する。それによって、種苗生産期間中のクドアの侵入時期の特定、マグロへの侵入から孢子形成に至る寄生動態を調べる。また、陸上飼育中は飼育水を処理することが可能なので、飼育水の濾過、UV照射、オゾン処理、電解水使用による感染防除効果を、ヒラマサを使った飼育実験によって推定する。沖出し後は生け簀の設置場所によって放線孢子の出現に違いがあるかも調べる。

#### 4. 研究成果

##### 1) 住血吸虫

養殖クロマグロに寄生する住血吸虫については、これまでに2種の住血吸虫を記載していたが、本研究で、新たに第3種として、これまでオーストラリアのミナミマグロに寄生することが知られていた *Cardicola forsteri* が日本のクロマグロにも寄生することを明らかにした。これら3種の住血吸虫の中間宿主探索に関しては、さらに、*C. orientalis*と*C. forsteri*の中間宿主が、それぞれフタエラフサゴカイ *Nicolea gracilibranchis* と *Neoamphitrite vigintipes*であることを明らかにした。これによって日本の養殖クロマグロに寄生する3種の住血吸虫の生活環がすべて解明された。中間宿主はすべて養殖場内で採集されていることから、住血吸虫の生活環はクロマグロ養殖場内で完結していることが明らかになった。それぞれの中間宿主から採集された住血吸虫の発育ステージ(スポロシストとセルカリア)を記載した。マグロへの感染ステージであるセルカリアについては、*C. orientalis*は尾が短く楕円形であることで、他2種と容易に鑑別できたが、*C. opisthorchis*と*C. forsteri*はともにやや長くまっすぐな尾を持ち、他の構造もきわめて似ていて、形態によって区別するのは困難であった。

中間宿主における寄生の季節変動を知るために、2015年1月から12月まで、毎月養殖場の生け簀周辺で調査を行った。*C. orientalis*の中間宿主であるフタエラフサゴカイについては、合計で9,000個体以上を生け簀のフロート、ロープ、底枠等から採集した。そのうち、ロープから採集したゴカイの寄生率が高かった。月ごとの寄生率については、1月は0.96%と低かったが、その後増加し、4月には16.16%と高く、7月には18.75%に達した。その後、8月には3.59%に低下し、11月、12月は寄生が確認できなかった。*C. forsteri*の中間宿主である *Neoamphitrite vigintipes*では7個体に寄生が確認されたのみであったが、ほとんどが生け簀の底網から採集されたことから、フタエ

ラフサゴカイとは生息環境が異なることが示唆された。また、ロープを垂下して水深別に付着したゴカイの寄生状況を調べたところ、水深0~4mでは、それ以深と比べ、フタエラフサゴカイの生息数は多く、寄生率も高かった。フタエラフサゴカイ体内の *C. orientalis* スポロシストを計数したところ、ばらつきが大きかったが、平均で1個体あたり3,270、最大で9,500個体のスポロシストが寄生していた。スポロシスト1個体が内包するセルカリア数は1個体あたり59-193、平均で106.6であった。中間宿主内の高い寄生率と感染中間宿主1個体が産出可能なセルカリア数の多さに鑑みて、感染予防手段として、養殖場内の中間宿主の現存量をいかに低減していくかが課題として残された。

##### 2) クドア

養殖クロマグロの筋肉から確認したクドア属粘液孢子虫の形態と遺伝子情報を解析し、これまでに報告があったキハダの筋肉寄生クドアと比較したところ、クロマグロの筋肉には既知種の *Kudoa neothunni* と未知種の *Kudoa* 2種が寄生していることが判明した。後者を詳細に調べ、新種 *Kudoa hexapunctata* として記載した。

養殖クロマグロ種苗のクドア寄生を同一海域の2地点で経時的に調べたところ、陸上飼育中の寄生は見られず、寄生はマグロを海面生簀に移動した直後から起きると考えられた。また、800m程度の距離であるにも関わらず、海面生簀の設置場所によってクドアの寄生率には違いが見られた。筋肉寄生の *K. hexapunctata* は他のクドア種より寄生が確認されるのが遅く、海面生簀に移動4ヶ月頃から検鏡で孢子が確認され、その後1ヶ月で寄生が急増して、寄生率は100%に達した。しかし、1歳魚以降では寄生が減少することから、マグロの成長に伴って自然治癒すると考えられた。

ヒラマサ人工種苗を用いた試験では、陸上飼育中の飼育用水を紫外線(UV)処理することで *K. yasunagai* の寄生を防除することに成功した。一方、砂濾過や高速繊維濾過、ドラム式フィルター等の物理的濾過では寄生を完全に防ぐことはできなかった。防除に有効なUV照射量を検討した結果、5mJ/cm<sup>2</sup>でも寄生が大幅に軽減できたが、完全防除には至らず、15mJ/cm<sup>2</sup>で防除に成功した。このことから必要最低照射量は5~15mJ/cm<sup>2</sup>だと判明した。他のクドア種でも用水のUV照射による防除効果が認められていることから、マグロの陸上飼育中はUV処理により防除し、寄生が少ない地点の生簀で養成することで、クドア寄生を軽減できると考えられた。

#### 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)

Shirakashi, S., K. Tani, K. Ishimaru, S.-P. Shin, T. Honryo, H. Uchida and K. Ogawa (2016): Discovery of intermediate hosts for two species of blood flukes *Cardicola orientalis* and *Cardicola forsteri* (Trematoda: Aporocotylidae) infecting Pacific bluefin tuna in Japan. *Parasitology International*, 65 (2), 128-136.

Ogawa, K., K. Akiyama and D. Grabner (2015): *Paradeontacylix buri* n. sp. (Trematoda: Aporocotylidae) from *Seriola quinqueradiata* cultured in Japan with a description of unidentified *Paradeontacylix* sp. from *S. lalandi*. *Fish Pathology*, 50 (4), 183-191.

Sugihara, Y. T. Yamada, K. Ogawa, F. Yokoyama, K. Matsukura and K. Kanai (2015): Occurrence of the bluefin tuna blood fluke *Cardicola opisthorchis* in the intermediate host *Terebella* sp. *Fish Pathology*, 50 (3), 105-111.

Yokoyama, H., J. Suzuki and S. Shirakashi (2014): *Kudoa hexapunctata* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the somatic muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and re-definition of *K. neothunni* in yellowfin tuna *T. albacares*. *Parasitology International*, 63 (4), 571-579.

Shirakashi, S., T. Nishimura, N. Kameshima, H. Yamashita, H. Ishitani, K. Ishimaru and H. Yokoyama (2014): Effectiveness of ultraviolet irradiation of seawater for the prevention of *Kudoa yasunagai* and *Kudoa amamiensis* (Myxozoa: Multivalvulida) infections in *Seriola* fish. *Fish Pathology*, 49 (3), 141-144.

〔学会発表〕(計 9 件)

久保埜和成・石丸克也・白樫 正・小川和夫・小田憲司 クロマグロの住血吸虫 (*Cardicola opisthorchis*) に対するプラジクアンテルの臨床試験  
平成 28 年度日本魚病学会春季大会  
平成 28 年 3 月 12 日-13 日 日本獣医生命科学大学(武蔵野市境南町)

白樫 正・谷 和樹・石丸克也・本領智記・内田紘臣・小川和夫 養殖クロマグロで見られる住血吸虫とその生活環  
平成 27 年度日本魚病学会秋季大会  
平成 27 年 9 月 24 日-25 日 東京大学農学部 東京都文京区

Ogawa K., S. Shirakashi, S. Uchida, S. Shin and K. Tani: The life cycle of *Cardicola orientalis* (Digenea: Aporocotylidae), a blood fluke of

Pacific bluefin tuna.  
Ninth International Symposium on Fish Parasites. 平成 27 年 8 月 31 日-9 月 4 日  
バレンシア(スペイン)

小川和夫 日本の海水魚に寄生する住血吸虫  
第 84 回日本寄生虫学会大会  
平成 27 年 3 月 21 日-22 日 杏林大学(東京都三鷹市)

谷 和樹・白樫 正・石丸克也・本領智記・内田紘臣・小川和夫 クロマグロ養殖生簀周辺のフサゴカイに寄生していた住血吸虫(予報)  
平成 27 年日本魚病学会春季大会  
平成 27 年 3 月 7 日-8 日 東京海洋大学(東京都港区)

Polinski, M., S. Shirakashi, A. Bridle and B. Nowak: Transcriptional immune response of cage-cultured Pacific bluefin tuna during infection by two *Cardicola* blood fluke species.  
Seventh International Symposium on Aquatic Animal Health  
平成 26 年 8 月 31 日-9 月 5 日 Portland, Oregon, USA

Ogawa, K.: Monogenean and aporocotylid digenean infections of cultured marine fishes.  
13th International Congress of Parasitology  
平成 26 年 8 月 10-15 日 Mexico City

谷 和樹・石丸克也・白樫 正・小川和夫 クロマグロ住血吸虫に対する(特異)抗体価の測定 平成 26 年度日本魚病学会春季大会  
平成 26 年 3 月 30 日-31 日 函館国際ホテル(北海道函館市)

小川和夫 プリ属魚類に寄生する住血吸虫の分類学的検討 第 73 回日本寄生虫学会東日本支部大会 平成 25 年 10 月 12 日 国立科学博物館

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 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)  
公益財団法人 目黒寄生虫館・館長  
研究者番号：20092174

##### (2) 研究分担者

横山 博 (YOKOYAMA HIROSHI)  
東京大学大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：70261956

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

##### (3) 連携研究者

本領 智記 (HONRYO TOMOKI)  
近畿大学水産研究所・助教  
研究者番号：70644160