

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：72645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03865

研究課題名(和文) 養殖クロマグロに寄生する住血吸虫の感染予防に向けての基礎研究

研究課題名(英文) Basic studies toward prevention of blood fluke infection of cultured bluefin tunainfection

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：2017年6月から毎月、クロマグロ養殖場の生け簀ローブなどに生息する中間宿主フサゴカイ類を調べた結果、寄生は夏に起こり、冬には新たな寄生は起こらないという季節性を確認した。生け簀構造物のフサゴカイ類を駆除したところ、その後は非感染個体のみが見いだされたことから、中間宿主駆除が新たな防除法として有望である可能性が示された。自然感染ゴカイから得たスポロシストを注射することによって、無感染ゴカイ体内でスポロシストを増殖させることに成功した。中間宿主ゴカイの *in vivo* 培養系の確立によって、実験感染系でスポロシスト期の維持や発育・増殖の観察が可能となり、本種の増殖について基礎的知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロマグロ養殖場で発生するカルジコラ属住血吸虫による寄生虫病は産業的被害が大きい。駆虫剤が水産用医薬品として承認されたが、根本的な対策となっていない。そこで、予防法の開発を目指した。中間宿主ゴカイにおける感染時期が明らかになり、養殖場から中間宿主を駆除することがクロマグロにおける寄生を予防することにきわめて有効であるという結果も得られた。一方、自然感染ゴカイから得た住血吸虫のスポロシスト期幼生を無感染ゴカイに接種する人為感染にも成功した。感染ゴカイを維持することによって、これまで知見の乏しかった中間宿主内の住血吸虫の発育や増殖が実験室内で観察することが可能になった。

研究成果の概要(英文)： Year-round monthly surveys of the intermediate host polychaetes proliferating on the net cages of tuna cages revealed that polychaetes became infected in summer, while in winter they grew in numbers but no infection occurred. Unexpectedly, removal of polychaetes on the net cages resulted in drastic decrease in the infection of the intermediate host. This suggests that eradication of polychaetes around the culture systems will be an effective control measure of the blood fluke infection of net cage cultured bluefin tuna.

We succeeded in *in vitro* maintenance of infected polychaetes by injecting sporocysts from naturally infected polychaetes into uninfected ones. This has enabled to maintain developmental stages of the blood fluke and to observe its development and proliferation in the intermediate host.

研究分野：魚病学

キーワード：住血吸虫 クロマグロ 生活環 中間宿主

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クロマグロ養殖は生産量 2 万トンに達するまでに成長した。一方で、様々な感染症も顕在化するようにになった。特に心臓や鰓に寄生する *Cardicola* 属住血吸虫による産業被害は深刻である。これまでに、私たちは養殖クロマグロに 3 種の住血吸虫 (*C. orientalis*, *C. opisthorchis*, *C. forsteri*) が心臓や鰓の血管に寄生しており、産み出された虫卵が鰓血管を閉塞することが死因になることを明らかにしてきた。さらに、治療薬の開発が求められるなかで、プラジクアンテルの経口投与が顕著な駆虫効果を示すことを実験的に明らかにして、水産用医薬品として承認されるのに必要な基礎データを提供した。クロマグロの住血吸虫の生活環では、Sugihara et al. (2014) がフサゴカイの一種、*Terebella* sp. が *C. opisthorchis* の中間宿主であることを明らかにしたことに続き、私たちも 2016 年に *C. orientalis* と *C. forsteri* の中間宿主が、それぞれフタエラフサゴカイとフサゴカイの一種、*Amphitrite* sp. であることを発見した。この発見によって、駆虫薬による治療法に加えて、中間宿主ゴカイの生物・生態学や中間宿主における住血吸虫の感染・発育に関する知見を応用して、寄生虫の生活環を遮断するという新たな予防法の開発への展望が開けた。

### 2. 研究の目的

近年、養殖クロマグロ生産量は着実に増加しているが、養殖場ではカルジコラ属住血吸虫による寄生虫病が蔓延し、毎年クロマグロへの感染が繰り返されている。クロマグロ体内で住血吸虫が産卵すると、虫卵が鰓血管を閉塞して血流を阻害する。クロマグロの住血吸虫の幼生を宿す中間宿主は生け簀網表面などで繁殖しているフサゴカイ科多毛類である。住血吸虫の感染が養殖場内のクロマグロとゴカイの間で回っているため、予防が困難になっている。最近、ようやく駆虫剤が水産用医薬品として承認されたが、治療だけでは根本的な対策となっていない。そこで、対策のもう一つの柱である予防法の開発を目的として、中間宿主ゴカイについては、その分布特性や繁殖生態、また、住血吸虫については、ゴカイに寄生する幼生期に関して基礎データを集積する。

### 3. 研究の方法

#### 中間宿主ゴカイの調査

2017 年 6 月から原則毎月、これまでクロマグロ住血吸虫 3 種が確認されている和歌山県のマグロ養殖場の生簀構造物から中間宿主であるフサゴカイ類を採取し、その寄生状況をモニタリングした。フサゴカイの採取はこれまでの調査で最も生息密度が高かった生簀固定ロープを対象に実施した。ロープに付着しているホヤやコケムシ等の付着生物をダイバーによって採取し、フサゴカイ類を分離した。各フサゴカイはガラス板の間で圧平し、実体顕微鏡下で透過光を用いて観察して体腔内のスポロシスト幼虫の有無で寄生状況を調べた。得られたスポロシストの一部を光学顕微鏡で観察し、内部のセルカリア幼虫の形態から種を同定した。検査したフサゴカイ類総数中の感染個体率を算出し、中間宿主における寄生の季節変動を調べた。また、*C. orientalis* の中間宿主であるフタエラフサゴカイの生育と感染までの期間を把握するため、養殖生簀にロープを垂下し、441 日後にゴカイの付着状況と感染を調べた。

#### フサゴカイ類の飼育とスポロシスト接種培養実験

中間宿主内における住血吸虫の発育や増殖についての基礎的知見を得るため、実験室内で感染フサゴカイを維持する方法を確立するとともに、スポロシスト幼虫を人為的に非感染ゴカイに接種して、生体内培養を試みた。野外調査で得られた感染フサゴカイを丸底プラスチック容器内で微流水をかけ流しながら、飼育した。餌として粉末状にした海産魚用配合飼料を毎日与え、底に溜まった残餌や排泄物は毎日除去した。また、マグロを養殖していない海域から *C. orientalis* の中間宿主であるフタエラフサゴカイと、他のフサゴカイ科を含む多毛類を採取し、スポロシスト培養実験用に合わせて飼育した。野外調査で得られた *C. orientalis* のスポロシストを清浄な海水で洗浄し、非感染ゴカイの体腔内にシリンジを用いて接種した。接種ゴカイを上記の方法で飼育維持し、2 週間毎を目安に解剖し、体内のスポロシスト幼虫の保有状況及び、スポロシストの大きさ、発達段階を調べ、接種後に増殖が起きたかどうかを調べた。

### 4. 研究成果

#### 中間宿主ゴカイの調査

期間中計 22 回の調査を行い、約 4000 個体のフサゴカイを検査した。うち、住血吸虫の寄生を 180 個体で確認し、期間中を通した総寄生率は 4.5% であった。これまでの調査と同様、夏季に寄生が増加する傾向がみられた。調査地点であるマグロ稚魚育成用生簀では住血吸虫対策としてロープの清掃によるゴカイ駆除を実施した結果、ゴカイの生息密度が激減し、その後も小型非感染ゴカイしか認められなかった。441 日間生簀に垂下したロープ上には最大 6 個体/30cm 程度のフサゴカイが生息しており、大型の個体も多かった。フタエラフサゴカイは特に水深 4m までに多く、感染ゴカイはみつからなかった。このことから、フタエラフサゴカイは 1 年で成熟すること、1 年では感染に至る個体の割合は少ないこと、がわかった。すなわち、養殖生簀構造物上のフタエラフサゴカイを年 1 度駆除すれば、寄生が大幅に軽減できる可能性が高いと思われた。

#### フサゴカイ類の飼育とスポロシスト接種培養実験

室内飼育設備において、最長1年間以上フタエラフサゴカイを飼育できることがわかった。しかし、飼育個体は徐々に矮小化し、産卵や増殖はみられなかった。今回初めて住血吸虫中間宿主の長期飼育維持に成功したが、健全な状態での飼育と室内環境での繁殖には飼育条件や飼料の改良が必要と考えられた。*C. orientalis* スポロシストを接種移植したフタエラフサゴカイでは移植後2週間で小型のスポロシストが多数確認され、本種の移植に初めて成功した。スポロシストの成長と発育を調べた結果、増殖サイクルは約4週間であることが示された。接種したスポロシストは魚への感染体であるセルカリア幼虫を有していたが、移植後にはセルカリア生産の前段階であるスポロシスト増殖ステージに移行していた。これは、*C. orientalis* スポロシストの発育過程は一方向ではなく、条件によってスポロシスト増殖とセルカリア生産に変化することを示している。また、実験では、移植・増殖したスポロシストを更に別のゴカイに移植することにも成功し、連続生体培養系が可能であることもわかった。加えて、フタエラフサゴカイとは別種のフサゴカイ類への移植にも成功したが、別種ゴカイ内でのスポロシストの増殖は少ない傾向にあった。計195個体を実施した接種移植試験の成功率は16.4%と低く、移植後のゴカイの生残率向上や、移植に適したスポロシストの状態の検討など、実験の精度を高める工夫が必要なことが明らかとなり、安定的な人為培養系の確立には課題も残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shirakashi, S., K. Tani, K. Ishimaru, T. Honryo, S. P. Shin, H. Uchida and K. Ogawa	4. 巻 103
2. 論文標題 Spatial and temporal changes in the distribution of blood fluke infection in <i>Nicolea gracilibranchis</i> (Polychaeta: Terebellidae), the intermediate host for <i>Cardicola orientalis</i> (Digenea: Aporocotylidae), at a tuna farming site in Japan.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Parasitology	6. 最初と最後の頁 541-546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1645/17-70">https://doi.org/10.1645/17-70</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ogawa, K. and Shengfa Liu	4. 巻 52
2. 論文標題 Identification of blood flukes infecting tiger puffer <i>Takifugu rubripes</i> .	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 131-140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3147/jsfp.52.131">https://doi.org/10.3147/jsfp.52.131</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuda, Y., K. Miyamura, E. Hitaka, K. Kimoto, Y. Sanada, T. Asai and K. Ogawa	4. 巻 52
2. 論文標題 Blood fluke infection of Japanese amberjack <i>Seriola quinqueradiata</i> in fish farms along the western coastal area of Bungo Channel, Japan,	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 191-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.3147/jsfp.52.191">https://doi.org/10.3147/jsfp.52.191</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ogawa, K., S. Shirakashi, T. Honryo and H. Uchida
2. 発表標題 <i>Cardicola orientalis</i> , the blood fluke of Pacific bluefin tuna, in the polychaete intermediate host.
3. 学会等名 14th International Congress of Parasitology, Daegu, Republic of Korea (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shirakashi, S., Honryo, T., Kawahara, M., Ogawa, K.
2. 発表標題 Possibility for non-drug control of blood fluke infections in farmed bluefin tuna.
3. 学会等名 AQUA 2018, Le Corum, Montpellier. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小川 和夫, 杉原 志貴, 秋山 孝介, 福田 穰, D. Grabner
2. 発表標題 ヒラマサに寄生する住血吸虫
3. 学会等名 第88回日本寄生虫学会大会, 長崎県長崎市 (長崎大学)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	脇 司 (WAKI TSUKASA)  (50775963)	東邦大学・理学部・講師  (32661)	
研究分担者	白樫 正 (SHIRAKASHI SHO)  (70565936)	近畿大学・水産研究所・准教授  (34419)	