

養殖トラフグの粘液胞子虫性やせ病の病原生物学的研究

東京大学大学院農学生命科学研究科

水圏生物科学専攻

柳田哲矢

2005 年度

目次

第一章 緒論	1
第一節 日本におけるトラフグ養殖	1
第二節 養殖トラフグの寄生虫病	3
第三節 粘液胞子虫	6
第四節 粘液胞子虫性やせ病	8
第五節 本研究の目的	14
第二章 形態観察と遺伝子解析による粘液胞子虫性やせ病原因寄生虫の分類	16
第一節 <i>Myxidium fugu</i> と <i>Myxidium</i> sp. TP の分類の再検討	17
第二節 養殖マダイおよびイシガキダイの粘液胞子虫性やせ病原因寄生虫の同定	34
第三章 PCR 法を用いた腸管寄生粘液胞子虫検出法の開発	43
第四章 感染実験による腸管寄生粘液胞子虫の生物学的特性の検討	57
第一節 水温が <i>Enteromyxum leei</i> の発育に及ぼす影響	58
第二節 海水中における <i>Enteromyxum leei</i> の栄養体の感染力	76
第三節 トラフグからマダイへの <i>Enteromyxum leei</i> の感染実験	81
第四節 <i>Leptotheca fugu</i> の感染実験	84
第五章 腸管寄生粘液胞子虫の養殖場における寄生動態	88
第一節 腸管寄生粘液胞子虫の寄生率の季節変動	88
第二節 長崎県下での一斉調査	97
第六章 総合考察	106
謝辞	121
引用文献	122
論文の内容の要旨	132

第一章 緒論

第一節 日本におけるトラフグ養殖

日本人にとってトラフグ (*Takifugu rubripes*) は冬の味覚を代表する高級魚であり、水産資源上重要魚種の一つである。日本におけるフグ食の歴史は古く、中期縄文時代の貝塚から骨が出土していることから (直良 1998)、少なくとも約 3000 年から 4000 年の歴史があると考えられる。その中でトラフグ養殖の歴史はわずか 50 年程度であり、まだまだ技術的に完成したといえるレベルには達していない。

日本のトラフグ養殖は 1950 年代に瀬戸内地方を中心に蓄養から始まった。当時の種苗は、5 月から 6 月にかけて産卵のために沿岸に回遊してきた成魚を漁獲したものであり、湾口を金網で仕切った蓄養池や周囲を金網で囲った生け簀で飼育された。給餌は行われたものの、養成というよりはむしろ、魚価が上がる冬場まで魚体重を維持することが目的であった (安田 1960)。種苗を漁獲された天然魚のみに頼っていたため、当初の生産量は年間 100 t 程度であり、1970 年代には年間 10 t を割り込んだ (図 1-1)。その後、1980 年を境に生産量が飛躍的に増加しているが、その大きな要因として人工種苗生産技術の確立が考えられる。人工種苗の導入当初は完熟卵を持つ天然親魚を漁獲して成熟卵を搾出していたが、天然親魚の漁獲量減少により、現在では未完熟な天然親魚にホルモンを投与したものや、性成熟するまで人の手で飼育された養成親魚が多く用いられている。孵化仔魚は体長 4-6 cm になるまで陸上水槽で飼育された後、養殖場に導入される (全国漁連海面魚類養殖業対策協議会・全国漁業協同組合連合会 1998)。このように、安定した種苗生産が行われるようになったことで生産量は飛躍的に増加し、1997 年には年間約 6000 t とピークを迎えたが、その後若干低下し現在では年間 5000 t 前後で推移している。主要な生産地は長崎、熊本、愛媛など気候が温暖な地域であり、九州と四国で全体の 90% 以上を生産している (図 1-2)。

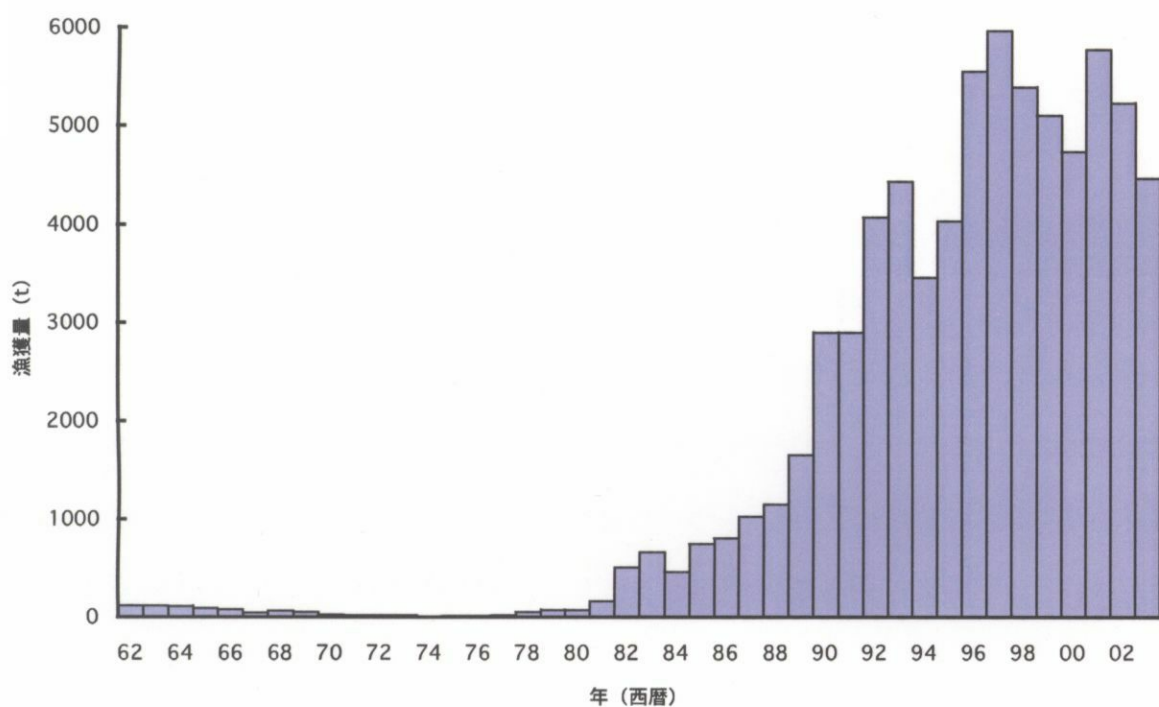


図 1-1 日本における養殖トラフグ生産量の年変動（農林水産省発表農林水産統計より抜粋）。

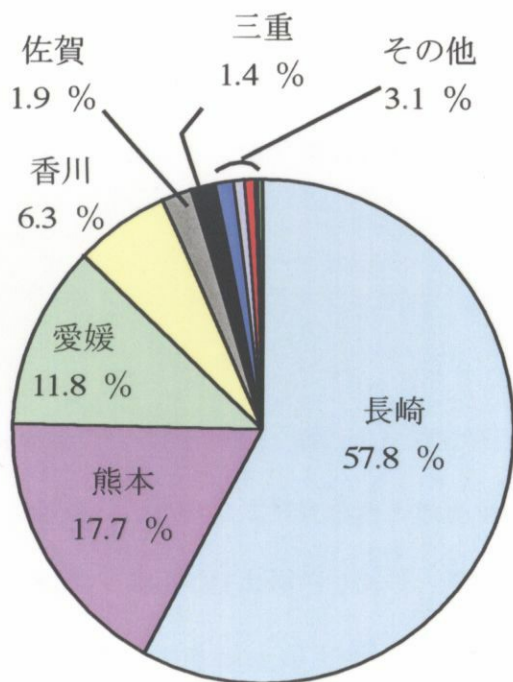


図 1-2 2002 年の主要県別養殖トラフグ生産量比（農林水産省発表農林水産統計より抜粋）。

現在のトラフグ養殖は、一般に春から初夏にかけて 4-6 cm の種苗を養殖場に導入するところから始まる。養殖施設としては海面での網生け簀がもっとも一般的であるが、コンクリート水槽を用いた陸上養殖も行われている。餌料は生餌、モイストペレット、ドライペレットなど様々な形態のものを魚のサイズや状態に合わせて使い分けている。種苗導入から 1 年半後には体重が約 1 kg にまで成長し、出荷サイズとなる。ブリやマダイなどの主要養殖魚種に比べて魚価の高いトラフグは、順調に出荷までいけば大きな収入源となりうる。しかしながら、実際には栄養性の疾病や感染症によって、成長率や歩留まりが低下するなどの問題があり、生産量はここ数年間頭打ちとなっている。このような魚病の発生は、成長を速めるために実際の食性に則していない餌を与えることや、高い放養密度で飼育することなどが原因の一端になっている。

第二節 養殖トラフグの寄生虫症

トラフグ養殖で問題となる感染症には寄生虫によるものが多い。Ogawa & Yokoyama (1998) は、養殖トラフグの寄生虫として 20 種を記載しているが、以下にその代表的なものを示す。

白点病

繊毛虫 *Cryptocaryon irritans* が、鰓、体表、鰭の上皮内に寄生することが原因。*C. irritans* は、魚体に寄生している虫体が白い点として見えるため白点虫とも呼ばれる。寄生部位の主な病理変化は罹患部の上皮組織や粘液細胞の増生であり、重篤寄生した場合には鰓の上皮が肥厚して糜爛（びらん）が起きる（Dickerson & Dawe 1995）。鰓の病害は感染魚の呼吸に深刻な影響を与えると考えられる。*C. irritans* の宿主範囲は非常に広く、病害性も強いいため、海産魚養殖全般でしばしば深刻な問題となる。その生活環は 4 つの発育期から成り立ち、魚体内に寄生しているトロホント（trophont）は、水温 25℃前後では魚体内に 3-7 日寄生した

のちに魚から離脱する (Colorni 1985; Yoshinaga 2001)。魚から離脱した虫体はトモント (tomont) と呼ばれ、水底に沈んでシスト (cyst) を形成する。シストからは魚へ感染力のあるセロント (theront) が多数遊出し、再び魚体に寄生してトロホントとなる。魚体感染ステージであるトロホントの早期発見が白点病対策で最も重要であるが、肉眼で確認出来るのは夕方から早朝までの時間帯に限られる (良永 1998) ため、注意が必要である。白点病に対して有効な薬剤は未だ開発されていないが、陸上養殖であれば、*C. irritans* が低塩分に弱い (Colorni 1985) 性質を利用して、3 時間の低塩水浴 (塩分 10‰) や汚染されていない水槽への移動を 3 日おきに 4 回行うことが有効とされている (Colorni 1987)。海上網生け簀養殖の場合では、潮通しの良い場所に生け簀を移動させることで再感染の危険性を減らすことが出来る。

ハダムシ症

単生類の *Neobenedeniagirellae* が、体表や鰭に寄生することが原因。*N. girellae* の宿主範囲は広く、日本ではこれまでに、ヒラメ、トラフグ、マダイを含む 5 科 15 種の養殖魚への寄生が確認されている (小川 2004)。近縁種に *Benedenia seriola* がいるが、こちらはブリ類以外からの報告はない。

感染魚は、*N. girellae* の固着盤と吸盤による吸着と、寄生部位の食害による被害を受ける。さらに、寄生刺激によって生け簀の網地などに体をこすりつける結果、寄生部位の損傷はさらに悪化する。寄生により生じた傷口は、細菌による二次感染の侵入門戸になるともいわれる (小川 2004)。

N. girellae の生活環は中間宿主を含まない。卵から孵化した孵化幼生は宿主となる魚に寄生し、成虫となって再び卵を産む。この虫卵はフィラメント状の付属物を持ち網生け簀養殖の網地に絡まるため、養殖場内での再感染が起りやすくなる。そのため、本疾病の防除対策としては定期的な網替えが行われている。魚体に寄生している本虫の駆虫法としては、5-10 分の淡水浴が効果的である。また現在では、過酸化水素を主成分とした薬浴剤が水産用

医薬品として認可されており、淡水が入手しにくい現場などで使用されている。

なお、*N. girellae* が日本で初めて確認されたのは 1991 年のことであり、それ以前には養殖トラフグにハダムシ寄生は知られていなかった。その後の調査により、本寄生虫が中国等から輸入されるカンパチ (*Seriola dumerili*) の種苗に高い寄生率で寄生していたことから、外国産種苗と共に日本に持ち込まれた寄生虫であるとされた (Ogawa *et al.* 1995)。

エラムシ症

単生類 *Heterobothrium okamotoi* が鰓および鰓腔壁に寄生することが原因。トラフグ以外からの報告はなく、宿主特異性が非常に強いと考えられる。*H. okamotoi* は吸血性の寄生虫であるため、大量寄生を受けたトラフグは貧血症状を呈する (Ogawa & Inouye 1997)。

前述した *N. girellae* と同様、*H. okamotoi* は中間宿主を持たない。卵から孵化した孵化幼生は、感染初期には鰓弁上で吸血しながら成長し、後に鰓腔壁に移行して成虫となる。成虫の生んだ虫卵はフィラメントによって互いに連結して糸状になっており、その長さは 2 m を超えることもある (Ogawa 1997) ため網地などに絡まりやすく、養殖場ではしばしば大量寄生が起こる。そのため、本疾病への対策としては定期的な網替えが行われている。また、過酸化水素を有効成分とする薬浴剤と、フェバンテルを有効成分とする経口駆虫剤が水産用医薬品として認可されており、網替えと組み合わせて用いることで防除効果が増大すると考えられる。なお、寄生を受けたトラフグは *H. okamotoi* に対して特異抗体を産生し、免疫を獲得することが報告されており (Nakane *et al.* 2005)、感染歴がある個体は再感染に対してある程度の耐性を持つと考えられる。

以上の疾病はトラフグ養殖で大きな問題とされてきた寄生虫病であるが、近年になって腸管寄生性粘液胞子虫が原因の粘液胞子虫性やせ病が新たに深刻な問題となっている。本疾病に対しては今のところ有効な予防・治療法が見つかっておらず、トラフグ養殖における最も深刻な疾病となりつつある。

第三節 粘液胞子虫

粘液胞子虫は、ミクソゾア門 (Phylum Myxozoa) に属する寄生性の生物群で、現在までに 1350 種以上が記載されており、そのほとんどが魚類を宿主とする寄生虫である。淡水魚寄生性と海水魚寄生性の両方が存在し、種々の組織や管腔内で増殖、発育して大きさ 10 μm 程度の胞子を形成する。粘液胞子虫の多くは宿主に無害とされるが、感染部位が呈する醜悪な外観のために商品価値が低下したり、重篤感染の場合には魚が致命的な影響を受けたりすることもあり、世界中で水産上重要な寄生虫として研究が行われている (Lom & Dyková 1992; Kent *et al.* 2001; Yokoyama 2003, 2004)。日本では、ブリやサバの脳に寄生して脊柱湾曲を引き起こす *Myxobolus acanthogobii* (= *Myxobolus buri*) (Egusa 1985; Yokoyama *et al.* 2004a; Yokoyama *et al.* 2005) や、ブリ・カンパチの体側筋肉内にシストを形成することで食品としての商品価値を無くしてしまう *Kudoa amamiensis* (Egusa & Nakajima 1980; Sugiyama *et al.* 1999) などが海産魚養殖で問題となっている。

かつてミクソゾア門は、粘液胞子虫綱 (Class Myxosporea) と放線胞子虫綱 (Class Actinosporea) から構成されていた。いずれもその生活環は長い間謎に包まれていたが、Wolf & Markiw (1984) は、サケ科魚類の旋回病の原因となる粘液胞子虫 *Myxobolus cerebralis* が、貧毛類 *Tubifex tubifex* の消化管内で放線胞子虫に変態し、これが水中に放出されて魚に感染して生活環が完結することを実験的に明らかにした。つまり、元来別の生物群であると考えられていた粘液胞子虫と放線胞子虫が、実は二相性の生活環における相対するステージに過ぎなかったということである (図 1-3)。そこで、Kent *et al.* (1994) は、ミクソゾア門から放線胞子虫綱を削除し、さらに従来の放線胞子虫の学名を全て集合群として取り扱い、新たに放線胞子虫が発見されたとしても、その対応する粘液胞子虫ステージが明らかになるまでは新種として学名を付けないことを提案した。しかしながら、この提案に対して Lester *et al.* (1998; 1999) は異論を唱えた。曰く、「たった十数種の淡水性粘液胞子虫において粘液胞子虫世代と放線胞子虫世代が交番する生活環が証明されたという事実をもって、それが全て

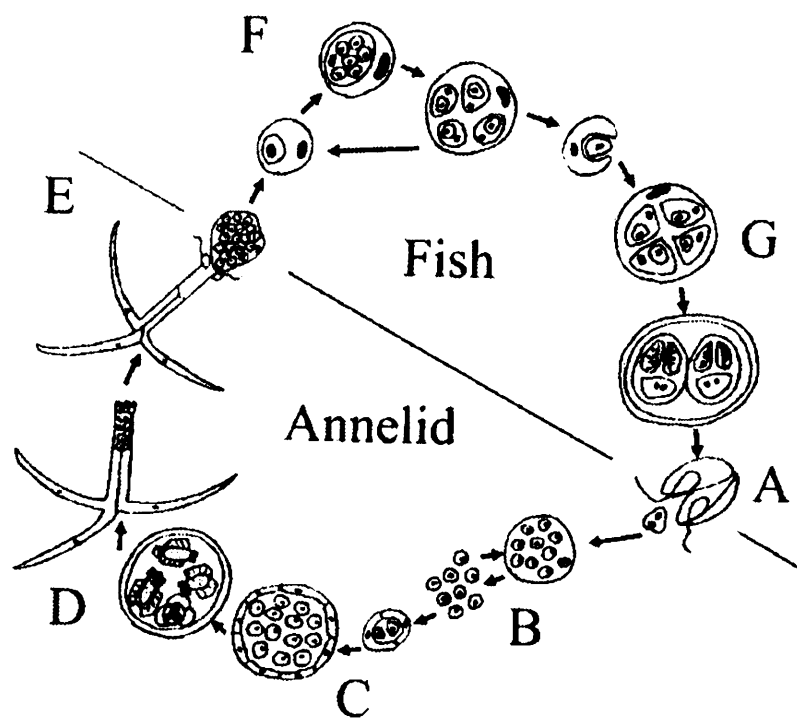


図 1-3 魚類と環形動物を交互に宿主とする粘液胞子虫の生活環。A：粘液胞子が極糸を弾出して環形動物の上皮組織内に侵入。B：シゾゴニー (schizogony)。C：ガメトゴニー (gametogony)。D：スポロゴニー (sporogony)。E：放線胞子が極糸を弾出して魚体内に侵入。F：多核体を形成して分裂・増殖。G：スポロゴニー。(Yokoyama 2004 を改変)

の種に適用されるとするのは時期尚早である。海産無脊椎動物に寄生する放線胞子虫も知られており、粘液胞子虫ステージを経ずに放線胞子虫ステージだけで生活環を完結する種が存在する可能性も否定できない。当面は従来通り放線胞子虫の種名を残し、今後新たに発見された放線胞子虫については新種として学名を与え、将来もし対応する粘液胞子虫ステージが発見されればその時に学名変更をすればよい。」今に至っても、二相性の生活環が証明されたのは 20 数種に過ぎないが、その中にはハゼ科の *Pomatoschistus microps* に寄生する海産粘液胞子虫 *Ellipsomyxa gobii* が多毛類を放線胞子虫ステージの宿主とするという近年の発見も含まれており、海産種でも二相性の生活環の存在が証明された (Køie *et al.* 2004)。

本研究において著者は、Kent *et al.* (1994, 2001) の提案を支持し、ミクソゾア門は粘液胞子虫綱と、最近になって Canning *et al.* (2000) により新設された軟胞子虫綱 (Class Malacosporea) との 2 綱からなるものとして話を進める。なお、粘液胞子虫世代と放線胞子虫世代のどちらで有性生殖が行われているかについては未だ定説が無く、従って中間宿主、終宿主という用語は用いられていない。代わって、魚類も貧毛類 (環形動物) も同等に交互宿主 (alternate host) と呼ばれている。

第四節 粘液胞子虫性やせ病

1996 年以降、トラフグ養殖場で「やせ病」と呼ばれる疾病の発生がみられるようになった。本疾病の典型的症状としては、摂餌しているにもかかわらず短期間のうちに頭骨が張り出して目が落ちくぼむほどの著しいやせ症状が知られており (図 1-4)、病魚は最終的には死に至る。剖検的には、腸管が薄くなり腸内に水が貯留する。当時の流行は、1 歳魚で 5 月から 6 月にかけて始まり 8 月から 9 月にかけて最盛を極めた。罹患率は、20%以下から 60%以上と養殖場によって異なった (Tin Tun *et al.* 2000)。病魚の消化管からは、2 種の新種の粘液胞子虫 *Myxidium fugu* (図 1-5) と *Leptotheca fugu* (図 1-6)、および未同定種の *Myxidium* sp. (図 1-7)、さらに前 2 種の栄養体に超寄生する微胞子虫が発見された (Tin Tun



図 1-4 粘液胞子虫性やせ病の重篤罹病魚。本疾病の典型的なやせ症状である頭骨の張り出し、頬のこけ、目の落ちくぼみが観察される。(A) 罹病魚を上から見た図。(B) 罹病魚の頭部の拡大図。

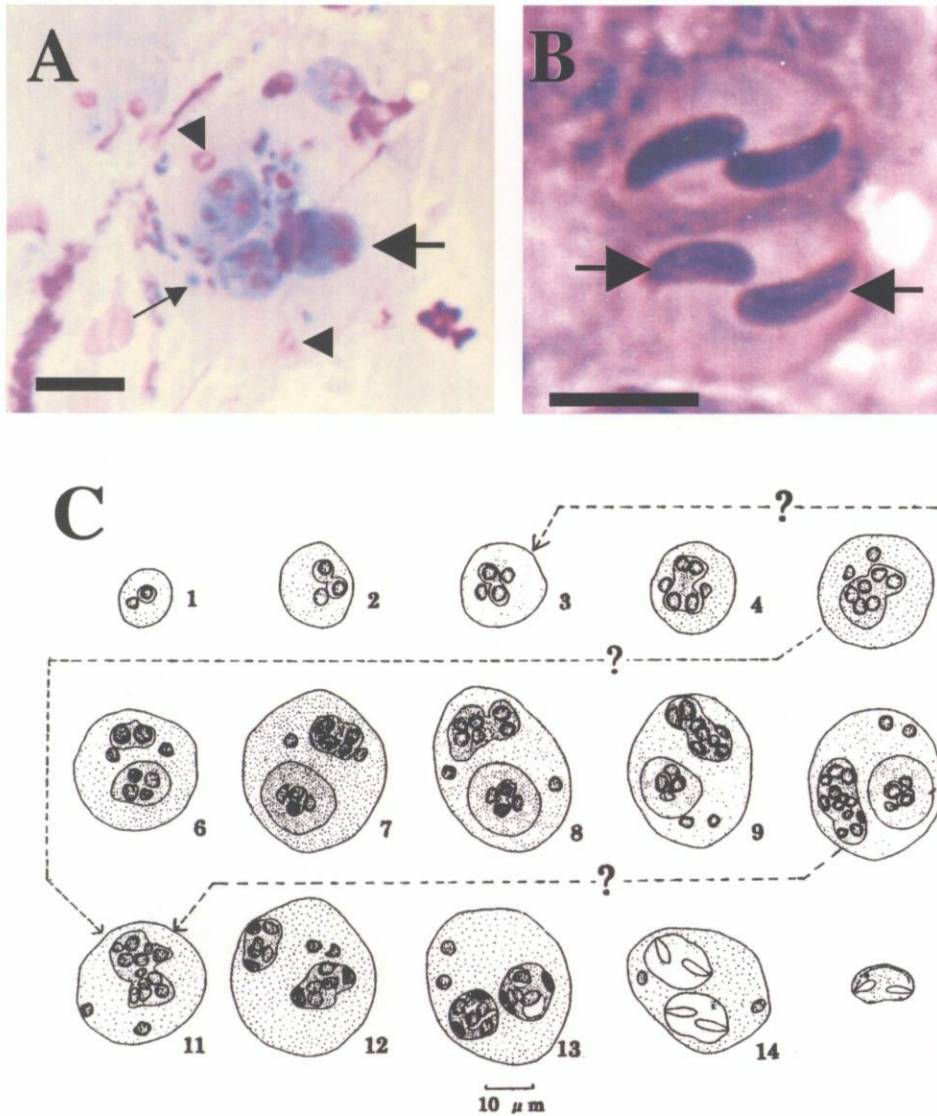


図 1-5 *Myxidiumfugu* のトラフグ消化管内発育ステージ。(A) 未同定の微胞子虫 (小矢印) に超寄生されている栄養体。一次細胞の栄養核 (矢頭) がピンク色に染まる。大矢印は二次細胞。腸管内壁のスタンプ標本を Diff-Quik 染色したもの。スケールバーは 10 μm。(B) 2 個の成熟した孢子。極囊 (大矢印) が濃い紫色に染色されている。腸管内壁のスタンプ標本を Diff-Quik 染色したもの。スケールバーは 10 μm。(C) 推定される発育段階の変遷 (Tin Tun *et al.* 2000 より引用)。1~14 : 栄養体 (11~14 はスポロゴニー)。15 : 成熟した孢子。

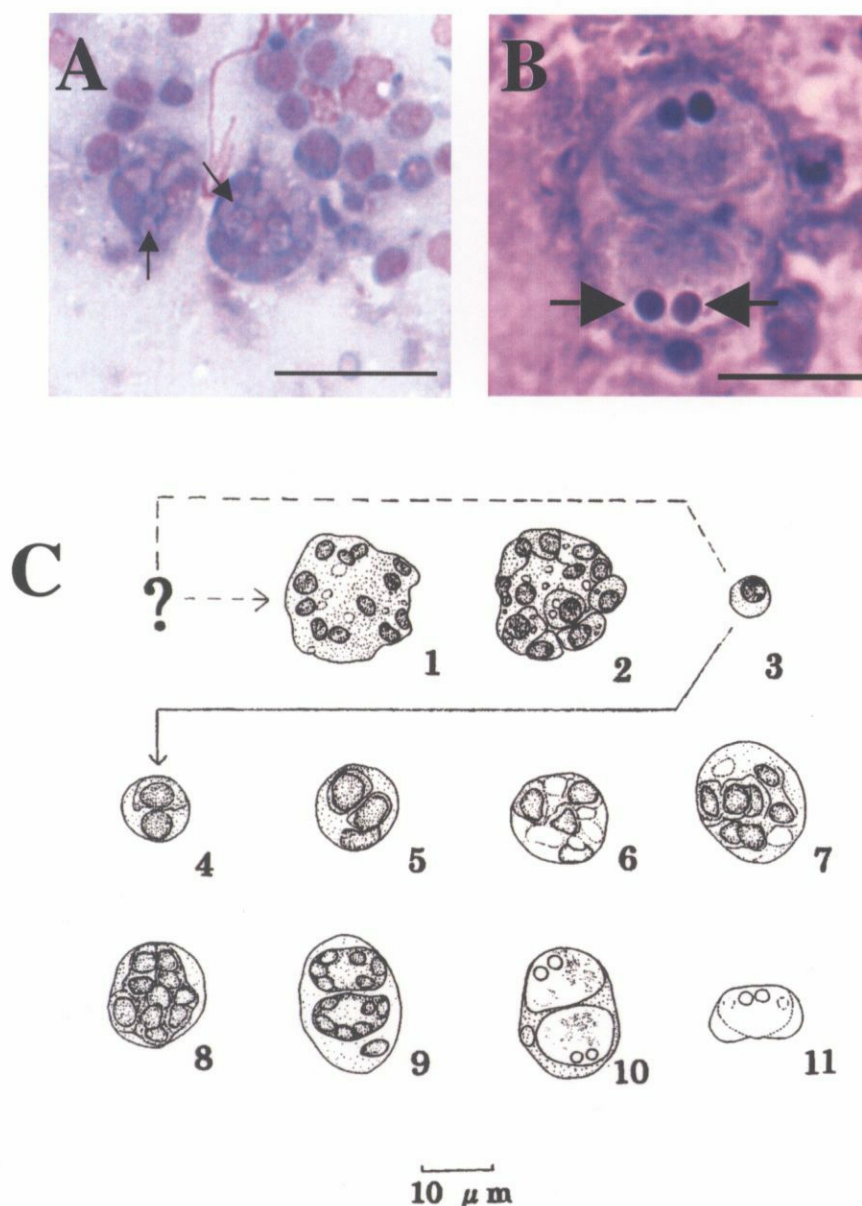


図 1-6 *Leptothecafugu* のトラフグ消化管内発育ステージ。(A) 未同定の微胞子虫 (小矢印) に超寄生されている栄養体。腸管内壁のスタンプ標本を Diff-Quik 染色したもの。スケールバーは 20 μm。(B) 2 個の成熟した孢子。極囊 (大矢印) が濃い紫色に染色されている。腸管内壁のスタンプ標本を Diff-Quik 染色したもの。スケールバーは 10 μm。(C) 推定される発育段階の変遷 (Tin Tun *et al.* 2000 より引用)。1~10 : 栄養体 (9~10 はスポロゴニー)。11 : 成熟した孢子。

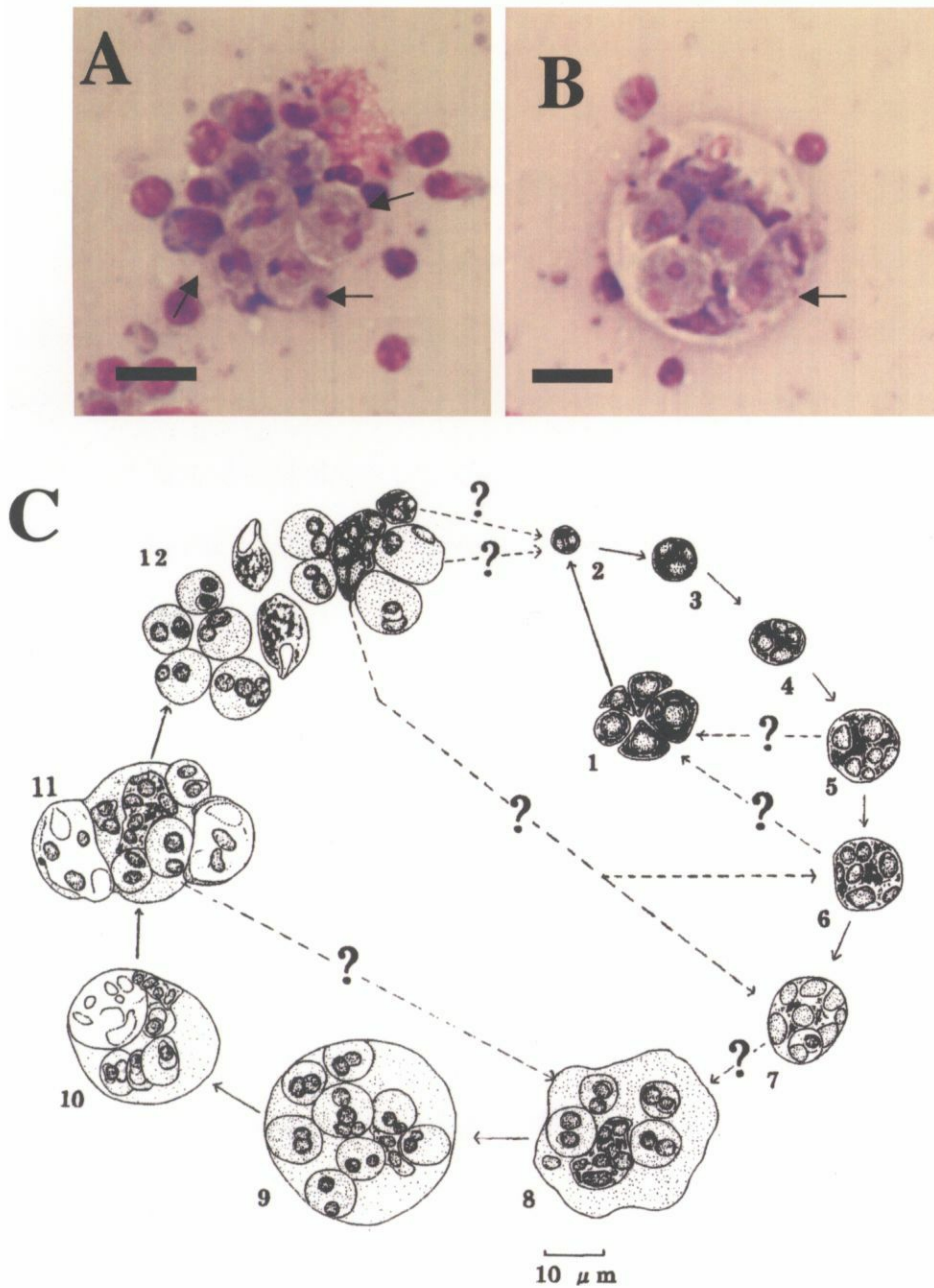


図 1-7 *Myxidium* sp. TP のトラフグ消化管内発育ステージ。(A) & (B) 腸管内壁のスタン
プ標本中に見られる栄養体 (矢印)。Diff-Quik 染色。スケールバーは 10 μm。(C) 推定され
る発育段階の変遷 (Tin Tun *et al.* 2000 を改変)。1~11 : 栄養体 (8~11 はスポロゴニー)。12 :
未成熟な孢子 (矢印)。

et al. 2000)。これら 3 種の粘液胞子虫は、しばしば腸管内に 2 種ないしは 3 種が混合寄生する。このうち *Myxidium* sp. は、他の未同定の *Myxidium* 属粘液胞子虫と区別するために暫定的に *Myxidium* sp. TP と呼称することが提案された (Yasuda *et al.* 2002)。病理組織学的には、*Myxidium* sp. TP と *L. fugu* は腸上皮組織内に寄生し、上皮の変性や剥離などを引き起こすため、本疾病の原因であるとされている (Ogawa & Yokoyama 2001; Tin Tun *et al.* 2002)。一方の *M. fugu* は、消化管の粘膜上皮の表面に付着して寄生し、寄生部位に目立った病理変化を起こさないため、病害性はないと考えられている。これらの結果に基づき、粘液胞子虫 *Myxidium* sp. TP と *L. fugu* の腸管寄生症として正式に「粘液胞子虫性やせ病」という病名が与えられた (日本魚病学会編集委員会 2004)。なお、*M. fugu* と *L. fugu* に超寄生する微胞子虫については、ほとんど研究が行われておらず、トラフグおよびそれぞれの粘液胞子虫に対する病害性は明らかになっていない。

海産粘液胞子虫の腸管寄生症としては、*Enteromyxum leei* と *Enteromyxum scophthalmi* によるものがヨーロッパで報告されている (Diamant *et al.* 1994; Palenzuela *et al.* 2002)。いずれも消化管上皮組織内寄生性であり、宿主に対して強い病害性を持つ。病魚が著しいやせ症状を示す (Diamant 1992; Branson *et al.* 1999) などトラフグの粘液胞子虫性やせ病との類似点も多い。さらに、寄生虫の伝播様式についても共通点が知られている。*E. leei* と *E. scophthalmi* は交互宿主を介さずとも魚から魚へ直接伝播することが報告されているが (Diamant 1997; Diamant *et al.* 1997; Redondo *et al.* 2002)、*M. fugu* と *Myxidium* sp. TP においても感染魚の腸管給餌、感染魚との同居、感染魚飼育排水での飼育によって伝播することが実験的に証明されている (Yasuda *et al.* 2002)。この場合、孢子形成前のステージである栄養体が体外に排泄されて周囲の魚に経口的に取り込まれることで伝播すると考えられており、従って交互宿主の存在が否定されたわけではない。これらの粘液胞子虫も、本来は交互宿主を介して放線胞子虫世代になる生活環を持つのかもしれないが、今のところ明らかにはなっていない。

ヨーロッパで発生している腸管粘液胞子虫症との類似点がある一方で、本疾病特有の特徴

もある。一つは、原因寄生虫が複数存在することであり、もう一つは原因寄生虫である *Myxidium* sp. TP が孢子を形成しないことである。外観症状が同じであるために、*Myxidium* sp. TP と *L. fugu* のいずれが原因の場合であっても同一の病名が用いられているが、当然のことながら、本疾病を研究する上では両種を分けて考えなければならない。しかし、混合寄生する3種の粘液孢子虫を単離することはできず、個別的な研究を行う上での障害となってきた。それどころか、現状ではそれぞれの粘液孢子虫を識別することも容易ではない。というのも、従来、本疾病の診断は顕微鏡による寄生虫の形態観察によって行われてきたが、*Myxidium* sp. TP は粘液孢子虫を同定する際のカギとなる孢子を形成せず、*M. fugu* と *L. fugu* も、多くの場合栄養体として観察されるからである。栄養体は発育ステージによって形態を変化させるので（図 1-5、1-6、1-7）、3 種を形態から識別するにはある程度の経験が必要である。このような特徴が、本疾病に対する調査・研究の進展を遅らせる原因となっている。

第五節 本研究の目的

粘液孢子虫性やせ病の発生が最初に九州の養殖場で確認されてから約 10 年が経過し、現在ではトラフグ養殖における最も重大な疾病の一つに挙げられる。養殖現場では何らかの対策が求められており、有効な薬剤や、被害を軽減できる飼育法の開発が急務となっている。それにもかかわらず、本疾病には原因寄生虫が複数種存在し、さらにそれらが通常は孢子を形成しないことが研究の進展を妨げてきたため、原因寄生虫の分類学的検討すら未だ不十分であり、駆虫法や治療薬を開発する上で重要な、病原体に関する生物学的知見も少ない。また、防疫体制の構築に不可欠な診断法も確立されておらず、それ故正確な被害状況の把握もされていない。そこで本研究では、本疾病への対策を講ずるための基盤となる病原生物学的研究を行った。まず、形態観察と遺伝子解析に基づいて原因寄生虫の分類学上の位置を確定した。次に、分子生物学的手法を用いた感度の高い検出・診断法を開発した。さらに、養殖場における病原体の伝播過程を解明するために、感染実験により水温の影響や感染力につい

て検証した。最後に、新しく開発した診断法を用いて疫学調査を行い、発生状況の季節性や地域性に関する知見を得た。以上の結果をふまえ、養殖場で取りうる対策について考察した。

第二章 形態観察と遺伝子解析による粘液胞子虫性やせ病原因寄生虫の分類

序

養殖トラフグの消化管からは、2種の粘液胞子虫 *Myxidium fugu*、*Leptotheca fugu* と未同定の *Myxidium* sp. TP が記載されており、このうち上皮組織に寄生する *L. fugu* と *Myxidium* sp. TP が粘液胞子虫性やせ病の原因寄生虫とされている (Tin Tun *et al.* 2000; Ogawa & Yokoyama 2001; Tin Tun *et al.* 2002)。

Myxidium sp. TP は、トラフグ腸管で見つかった未成熟な胞子の形態から *Myxidium* 属の粘液胞子虫として記載されたが (Tin Tun *et al.* 2000)、成熟した胞子が見つかっていないため種レベルの同定には至っていない。なぜ *Myxidium* sp. TP がトラフグを宿主としたときに胞子形成を完遂できないかは明らかになっていないが、この寄生虫にとってトラフグが「本来の宿主」ではないからかもしれない。*Myxidium* sp. TP は、海産魚の腸管組織内に寄生し魚から魚へ直接伝播するが、これは最近になって新設された *Enteromyxum* 属の特徴でもあり、その類似性は注目すべきである。また、*M. fugu* も腸管寄生性で魚から魚へ直接伝播し、さらにその胞子の形態も *Enteromyxum* 属のものとよく似ている。*Enteromyxum leei* は、ヨーロッパヘダイ (*Sparus aurata*) やマダイ (*Pagrus major*) を含むタイ科魚類を主な宿主とする腸管組織内寄生性の粘液胞子虫で、病害性が強く、多数の胞子を形成する (Diamant 1997)。*E. leei* は、当初 *Myxidium leei* として記載されたが (Diamant *et al.* 1994)、Palenzuela *et al.* (2002) による形態学および分子生物学的分析により *Myxidium* 属から *Enteromyxum* 属に転属された。その際、*Myxidium* sp. TP についても *Enteromyxum* 属である可能性が指摘されている (Palenzuela *et al.* 2002)。

感染症の制御には病原体を良く理解することが必要であり、そのためには病原体の同定が必須であるが、上記のように *Myxidium* sp. TP と *M. fugu* の分類学上の位置には再考の余地がある。そこで本章の第一節では、*Myxidium* sp. TP および *M. fugu* の分類学上の位置を確定す

ることを目的として、まずそれぞれの胞子の形態を詳細に観察した。その際、*Myxidium* sp. TP については、胞子形成を促すために、近縁種であると推察される *E. leei* に感受性を持つことが既にヨーロッパで報告されているマダイへの感染実験を行った。さらに、近年粘液胞子虫の分類に利用されることの多い small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) 遺伝子の解析を行なった。

また、近年、養殖マダイとイシガキダイ (*Oplegnathus punctatus*) において著しいやせ症状を特徴とする疾病が発生し、病魚の腸管から *Myxidium* sp. TP に酷似した粘液胞子虫が検出された。本章の第二節では、これらの粘液胞子虫の同定を目的として、第一節と同様に胞子の形態観察と SSU rRNA 遺伝子解析を行った。

第一節 *Myxidium fugu* と *Myxidium* sp. TP の分類の再検討

材料と方法

マダイを用いた感染実験

供試魚

熊本県水産研究センター内の陸上水槽で維持されていた、*M. fugu* と *Myxidium* sp. TP に混合感染したトラフグを感染源として用いた。感染魚の維持は、感染魚と無感染魚を同居飼育することで行った。感染実験に用いたマダイの供試魚は、熊本県の種苗業者から購入した粘液胞子虫無感染のマダイ稚魚 (0 歳) を用いた。試験開始まで、砂濾過海水を用いて熊本県水産研究センター内の陸上水槽で飼育した。

経口感染実験

21 尾のマダイ (平均体重 140 g) を供試魚とし、500 L の円形水槽を用いて感染実験を行った。試験期間中は濾過海水をかけ流しにし、水温は 25℃に設定した。感染方法としては、

感染源の魚を 10 尾取り上げ、解剖後速やかに腸管を約 1 cm 角の小片に切り刻んだものを供試魚に投与する経口投与法を用いた。経口投与後 3 週、6 週、9 週目にそれぞれ 7 尾ずつサンプリングし、後述する方法で寄生虫の検査を行った。なお、陰性対照区として、腸管を投与しない 21 尾のマダイを実験区と同様の状況下で飼育し、サンプリングを行った。

寄生虫検査

取り上げた実験魚は、尾叉長と体重を測定した後、解剖して腸管を取り出した。腸管内容物を海水で洗浄した後、腸管内壁をスライドグラスに押しつけてスタンプ標本を作製した。スタンプ標本は風乾してから Diff-Quik（国際試薬株式会社）染色を施し、光学顕微鏡で観察した。腸管の一部を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、常法に従って組織切片を作製した。組織切片標本は、キチン質と結合する蛍光色素 Uvitex 2B [4,4-BIS (2-di(2-hydroxyethyl)-amino-4-(3-sulfophenylamino)-1,3,5-triazine-6-ylamino)-stilbene-2,2-disulfonic acid, sodium salt]

(Ciba Geigy) -H & E の三重染色を施して、光学顕微鏡および蛍光顕微鏡（UV 励起）で観察した（Yokoyama *et al.* 1996）。Uvitex 2B 染色性を有することは *Myxidium* sp. TP の特徴の一つであり、*M. fugu* と *L. fugu* は染色性を持たない（Tin Tun 2000）。そこで、本研究では *Myxidium* sp. TP 検出のためと、近縁種と推測される *E. leei* および *E. scopthalmi* と比較するために Uvitex 2B 染色性も調べた。*E. leei* と *E. scopthalmi* については、Dr. Oswaldo Palenzuela（Instituto de Acuicultura de Torre la Sal）から譲渡された *E. leei* に感染したシャープスナウトシーブリーム（*Diplodus puntazzo*）と *E. scopthalmi* に感染したターボット（*Scophthalmus maximus*）の腸管組織切片を Uvitex 2B-H&E 染色し、寄生虫の Uvitex 2B 染色性を確かめた。

胞子の形態観察には、冷凍保存したマダイの腸管を用いた。解凍した腸管の内壁をメスで擦り取り、リン酸緩衝液（PBS）に懸濁したものをスライドグラスに垂らし、ウェットマウントで位相差顕微鏡を用いて観察した。胞子の計測値は、20 個の胞子の平均と標準偏差、および最大値と最小値で表した。胞子の測定項目としては、Lom & Arthur（1989）に従い、胞子および極嚢それぞれの長さ（図 2-1）と幅を用いた（図 2-1）。

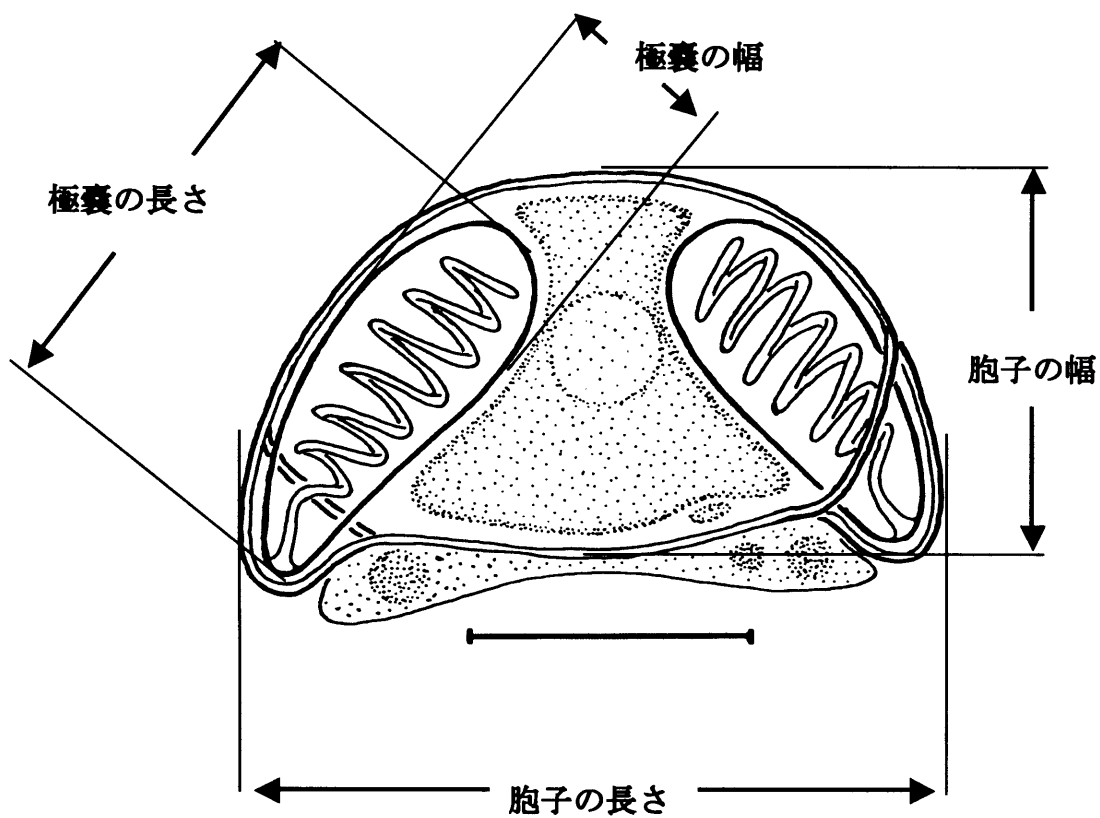


図 2-1 正面から見た *Enteromyxum leei* 胞子の線描画。本研究で用いた胞子の測定項目を記す。スケールバーは 5 μm 。(Diamant *et al.* 1994 を改変)

Myxidium fugu の胞子の形態観察

M. fugu の胞子の形態観察には、*M. fugu* に単独感染していたトラフグの冷凍保存した腸管を用いた。解凍した腸管の内壁をメスで擦り取り、PBS に懸濁したものをスライドグラスに垂らし、ウェットマウントで位相差顕微鏡を用いて観察した。胞子の計測値は、20 個の胞子の平均と標準偏差、および最大値と最小値で表した。胞子の測定項目としては、*Myxidium* sp. TP と同様、胞子および極嚢それぞれの長さや幅を用いた。

遺伝子解析

寄生虫

M. fugu と *Myxidium* sp. TP の DNA 抽出源としては、それぞれ熊本県と大分県の海面生け簀養殖場から得られた感染トラフグの腸管を 80%エタノールで固定したものを用いた。腸管上皮組織のスタンプ標本と組織切片観察により、熊本県由来の感染魚は *M. fugu* 単独感染であり、大分県由来の感染魚は *M. fugu* と *Myxidium* sp. TP との混合感染であることが確かめられた。

DNA 抽出と PCR

寄生虫の DNA は、エタノール固定された感染魚の腸管内壁をメスで擦り取ったものから QIAamp DNA mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。抽出法は付属のマニュアルに従った。次に、抽出した DNA 溶液をテンプレートとして PCR を行い、寄生虫の SSU rRNA 領域を増幅した。PCR 反応の際には、Palenzuela *et al.* (2002) が *E. leei* を含む海産の腸管寄生性粘液胞子虫の SSU rRNA 遺伝子を増幅する際に用いたプライマー、MM18Sf (5'-ctggttgattctgccagtggc-3') と MM18Sr (5'-cggtactagcgacgggcg-3') を使用した。PCR の反応溶液の組成は、TaKaRa Ex TaqTM Hot Start Version (5 U/μL) 0.1 μL、10×Ex TaqTM Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5%Tween20、0.5% Nonidet P-40、50% Glycerol) 2.0 μL、dNTP Mixture (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5 mM) 1.6 μL、MM18Sf、

MM18Sr (いずれも 25 pmol/ μ L) 各 0.6 μ L、テンプレート 1.1 μ L、滅菌超純水 15.0 μ L の計 20 μ L とした。PCR 反応条件は first denaturation 94°C、3 分の後、denaturation 94°C、1 分、annealing 60°C、30 秒、extension 72°C、1 分 45 秒を 35 サイクル、last extension 72°C、2 分とした。泳動槽には Mupid ミニゲル泳動槽 (Advance) を使用し、PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動により目的 DNA 断片の有無を確認した。

DNA クローニングとシーケンス

MM18Sf、MM18Sr を用いた PCR 反応で得られた産物を、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製した後、DNA クローニングに用いた。*M. fugu* 単独感染魚から得られたサンプルについては Ligation high (TOYOBO) を用いて pT7Blue T-Vector (Novagen) に挿入し、*E. coli* JM109 (TaKaRa) を形質転換した。ライゲーション反応から形質転換までの手順は以下の通りである。PCR 産物の精製物 4.0 μ L、pT7Blue T-Vector 1.0 μ L、Ligation high 3.0 μ L を氷上で混合して 16°C で 30 分静置した後、*E. coli* JM109 30.0 μ L を加え 42°C で 1 時間熱処理を加えた後、2 分間氷冷した。その後 *E. coli* JM109 に付属する SOC 培地を 300 μ L 加え 37°C で 1 時間振盪培養した。一方、*M. fugu* と *Myxidium* sp. TP の混合感染魚から得られたサンプルについては、PCR Cloning⁺ Kit (Qiagen) を用いて、付属のマニュアルに従ってライゲーション反応から形質転換までを行った。これらの培養液を、X-Gal (20 mg/ μ L DMSO) 40 μ L、IPTG (200 μ g/mL) 4 μ L、アンピシリン (100 μ g/ μ L) 10 μ L を塗布した LB 寒天培地に播き 37°C で一晩培養した。翌日寒天培地上に形成されたコロニーの内、白色のものを釣菌し、上記と同様に X-Gal、IPTG、アンピシリンを塗布した LB 培地に継代し 37°C で一晩培養したものを Master plate とし、4°C で保存した。

Master plate 上のコロニーからプラスミドを抽出するために、アンピシリン (100 μ g/ μ L) 5 μ L を加えた LB 培地 5 mL に目的株を接種して、37°C で一晩振盪培養した。プラスミド抽出は QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を用いて、付属のマニュアルの手順に従って行った。得られたプラスミドからインサート部分を増幅するためには、本研究で用いたプラスミ

ドのクローニングサイトを増幅することの出来るプライマー M13 Primer M4 (5'-gtttcccgagtcacgac-3') と M13 Primer RV (5'-caggaacagctatgac-3') を用いて PCR 反応を行った。このプライマーのセットによって増幅される領域は、クローニングサイトの上流と下流域を合わせて 177 塩基対である。PCR 反応液の組成は、Master mixture 3.7 μ L、M13 Primer M4、M13 Primer RV (いずれも 25 pmol/ μ L) 各 0.6 μ L、抽出したプラスミド溶液 1.1 μ L、滅菌超純水 15.0 μ L の計 20 μ L とした。反応条件は first denaturation 94°C、3 分の後、denaturation 94°C、3 分、annealing 52°C、30 秒、extension 72°C、1 分 45 秒を 35 サイクル、last extension 72°C、1 分とした。1.5% アガロースゲルで泳動して、1600 bp 程度の大きさの DNA がインサートされているプラスミドをシーケンス反応に用いた。*M. fugu* と *Myxidium* sp. TP のいずれも 3 つのクローンについてシーケンスを行った。

シーケンスは、ABI PRISM 310 (Applied Biosystems) を用いて、サイクルシーケンス法で行った。サイクルシーケンス反応は、BigDye Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて、付属のマニュアルに従って行った。得られた結果の解析のデータは、読み込みのミスを修正し、塩基配列エディタ Genetyx Mac 10.0 と Genetyx Mac ATSQ 3.0 (SOFTWARE DEVELOPMENT) により編集を行い、配列を完成させた。得られた塩基配列は、BLAST によって GenBank データベースに登録されている既知の塩基配列と相同性検索を行った。

系統解析

塩基配列のアラインメントは、Genetyx Mac 10.0 および、ClustalX1.8 (Thompson *et al.* 1997) を用いて行った。外群として、軟胞子虫綱に属するミクソゾアである PKX organism (GenBank Acc. No. U70623) を用いた。さらに、粘液胞子虫綱の *Ceratomyxa labracis* (AF411472)、*Ceratomyxa shasta* (AF001579)、*Ceratomyxa sparusaurati* (AF411471)、*Enteromyxum leei* (AF411334)、*Enteromyxum scopthalmi* (AF411335)、*Zschokkella mugilis* (AF411336) *Kudoa amamiensis* (AF034638)、*Kudoa miniauriculata* (AF034639)、*Kudoa paniformis* (AF034640)、

Kudoa thyrsites (AF031413)、*Myxidium lieberkuehni* (X76639)、*Myxidium* sp. (U13829)、*Myxidium truttae* (AF201374)、*Myxobolus brahamae* (AF507968)、*Myxobolus cerebrales* (U96493)、*Myxobolus insidiosus* (U96494) の SSU rRNA 遺伝子の配列情報を用いた。

系統解析は、系統解析プログラム PAUP version 4.0b4 (Swofford 1999) を用いて、近隣結合法で行った。アラインメントデータを基に、Kimura's 2-parameter 法 (Kimura 1980) により距離行列を作製し、解析を行った。アラインメント後に、塩基配列の欠失、挿入によるギャップが見られた部位については、missing data として扱った。ブートストラップ解析は 100 回行った。

結果

マダイを用いた感染実験

対照区では試験期間を通じて粘液胞子虫の寄生は確認されなかったが、試験区では経口投与後 6 週目から *M. fugu* と *Myxidium* sp. TP の寄生が確認されるようになった (表 2-1)。*M. fugu* の寄生率は経口投与後 6 週目に 100% (7 尾中 7 尾) に達したが、一方の *Myxidium* sp. TP の寄生率は 6 週目で 57% (7 尾中 4 尾)、9 週目で 50% (4 尾中 2 尾) であった。9 週目には、腸管内に *Myxidium* sp. TP の胞子が観察された。なお、試験期間を通じて対照区、試験区共に粘液胞子虫性やせ病の発症は見られなかった。組織学的には、腸管上皮組織内に *Myxidium* sp. TP の寄生が確認され、寄生部位には絨毛組織の乱れが見られた (図 2-2)。*Myxidium* sp. TP の栄養体は、トラフグにおいて報告されている (Tin Tun *et al.* 2000) のと同様に、Uvitex 2B に強い染色性を示した (図 2-2)。シャープスナウトシーブリームの腸管上皮組織内に観察された *E. leei* の栄養体が Uvitex 2B 染色に陽性だったのに対し、*E. scopthalmi* は陰性であった (図 2-3)。

マダイの腸管に観察された *Myxidium* sp. TP 胞子の形態は、*E. leei* のものと一致した。胞子は緩やかな三日月型で、極嚢は大きく伸張して末端が細くなり、胞子の両端に向かって開

表 2-1 *Myxidium* sp. TP と *Myxidium fugu* 感染魚の腸管の経口投与によるトラフグからマダイへの感染実験。

経口投与後 経過週	対照区			実験区		
	平均体重 (g)	<i>M. fugu</i>	<i>Myxidium</i> sp. TP	平均体重 (g)	<i>M. fugu</i>	<i>Myxidium</i> sp. TP
3	157	0/7*	0/7	144	0/7	0/7
6	167	0/7	0/7	200	7/7	4/7
9	174	0/7	0/7	131	4/4	2/4

* 陽性個体数/試験個体数

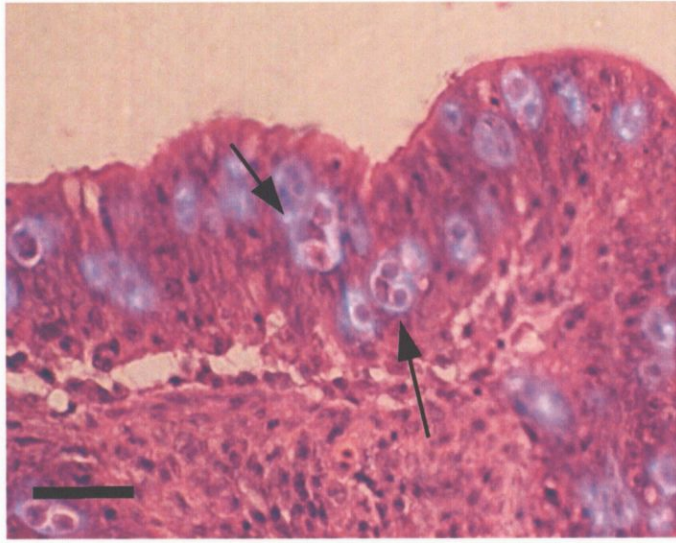


図 2-2 感染実験により *Myxidium* sp. TP (矢印) に感染したマダイの腸管上皮。Uvitex 2B-H&E 三重染色を施し、紫外光と普通光の二重露出で撮影。スケールバーは 30 μm 。

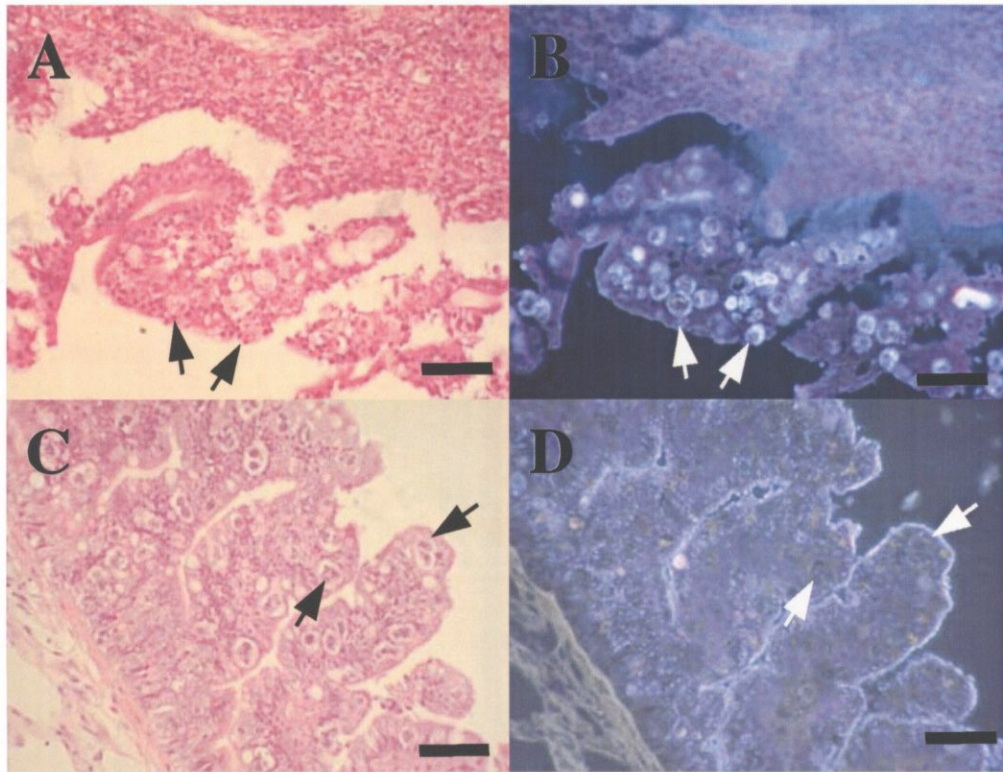


図 2-3 (A) (B) *Enteromyxum leei* (黒および白矢印) に感染したシャープスノートシーブリームの腸管上皮。Uvitex 2B-H&E 染色。スケールバーは 50 μm 。(A) 普通光で撮影。(B) 紫外光で撮影。栄養体が Uvitex 2B 染色性を示す。(C) (D) *Enteromyxum scopthalmi* (黒および白矢印) に感染したターボットの腸管上皮。Uvitex 2B-H&E 染色。スケールバーは 50 μm 。(C) 普通光で撮影。(D) 紫外光で撮影。栄養体は Uvitex 2B 染色性を示さない。

口していた（図 2-4）。胞子の測定値は表 2-2 のようであった。

Myxidium fugu の胞子の形態観察

一方、トラフグの腸管に観察された *M. fugu* 胞子の形態は、Palenzuela *et al.* (2002) によって記載された *Enteromyxum* 属の特徴を満たした。すなわち、胞子は緩やかな三日月型で、極嚢は大きく伸張して末端が細くなり、胞子の両端に向かって、胞子を上面あるいは下面から見て胞子を縦に割った面に対して反対側に開口していた（図 2-5 A）。さらに、1 個の栄養体から 2 個の胞子が形成される二胞子形成性であった（図 2-5 C）。

SSU rRNA 遺伝子解析

SSU rRNA 遺伝子の塩基配列として、*M. fugu* から 1590 bp、*Myxidium* sp. TP から 1588 bp が得られた。*Myxidium* sp. TP の塩基配列は、シャープスナウトシーブリーム由来の *E. leei* のものと 99.6% の相同性を示した。また、*M. fugu* の塩基配列はターボット由来の *E. scopthalmi* のものと最も相同性が高く、一致度は 90.0% であった。NJ 法を用いて推定された他の粘液胞子虫との系統類縁関係は図 2-6 のようになり、*Myxidium* sp. TP と *M. fugu* が、*E. leei* および *E. scopthalmi* と単系統であることが 100% のブートストラップ確率で支持された。また、この群は、現在 GenBank に登録されている全ての *Myxidium* 属の粘液胞子虫を含む群から大きく離れていた（図 2-6）。なお、本研究で得られた塩基配列を以下のように GenBank に登録した。*Enteromyxum fugu*、Accession number = AY520573。*Enteromyxum leei*、AY520574。

考察

本研究では、マダイを用いた感染実験によって *Myxidium* sp. TP の胞子を得ることに初めて成功した。マダイから得られた胞子と、すでにヨーロッパで報告されている *E. leei* の胞子の形態を比較した結果、*Myxidium* sp. TP と *E. leei* の形態はよく一致した。また、*M. fugu* の胞子は、*Enteromyxum* 属の形態学的特徴を満たした。*E. leei* の胞子の測定値に関しては、

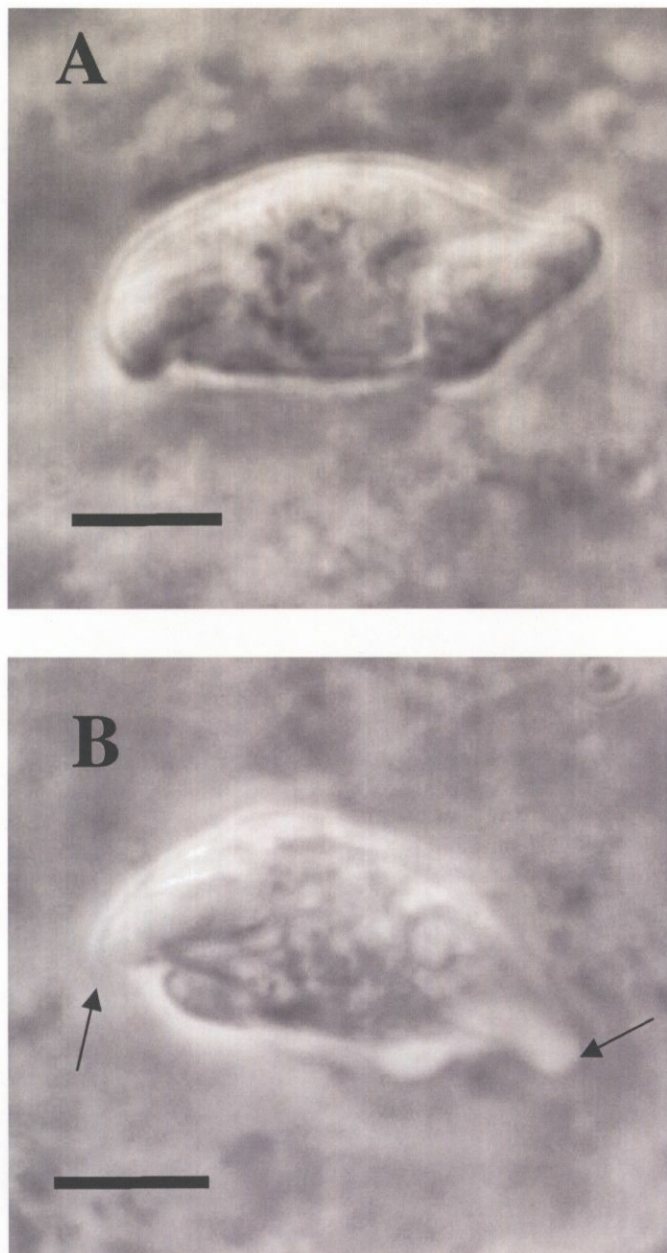


図 2-4 マダイ腸管のウエットマウント標本中に見つかった *Myxidium* sp. TP の孢子。極囊は大きく伸張して末端が細くなり、孢子の両端に向かって開口している（矢印）。スケールバーは 5 μm 。(A) 上面観。(B) 正面観。

表 2-2 *Enteromyxum leei* と *Myxidium* sp. TP の胞子の計測値（平均±標準偏差）の比較

粘液胞子虫	胞子 (μ m)		極嚢 (μ m)		引用文献
	長さ	幅	長さ	幅	
<i>Enteromyxum leei</i>					
ヨーロッパヘダイ	14.7 (13.2 - 15.2)	6.9 (5.6 - 7.8)	7.4 (6.2 - 8.8)	3.2 (2.8 - 3.8)	Diamant <i>et al.</i> (1994)*
ヨーロッパヘダイ	15 - 18	7 - 8	7	3	Diamant (1992)*
ヨーロッパヘダイ	16.7 ± 1 (15 - 18)	9.7 ± 1 (8 - 11)	8.5 ± 1.3 (8 - 9)	2.7 ± 0.7 (2.5 - 4)	Sakiti <i>et al.</i> (1996)
ヨーロッパヘダイ	17.7 ± 0.6 (16.7 - 18.4)	8.2 ± 0.4 (7.5 - 8.1)	7.7 ± 0.3 (7.5 - 8.1)	2.9 ± 0.4 (2.3 - 3.5)	Padros <i>et al.</i> (2001)**
ヨーロッパヘダイ	16.2 (15.2 - 17.7)	7.8 (7.5 - 8.6)	8.2 (6.9 - 9.8)	3.6 (3.1 - 4.3)	Diamant (1998)
シャープスナウト シーブリームとマダイ	15 - 19	5 - 7	6.5 - 9	2.5 - 4	Le Breton & Marques (1995)
イシガキダイ	14.9 ± 0.7 (13.9 - 15.8)	9.2 ± 1.0 (7.3 - 10.4)	6.9 ± 0.6 (6.1 - 7.8)	2.8 ± 0.3 (2.4 - 3.4)	本研究 (第二節)
<i>Myxidium</i> sp. TP					
マダイ	17.5 ± 0.9 (15.9 - 19.1)	9.2 ± 2.4 (7.9 - 11.0)	6.4 ± 0.4 (6.1 - 7.2)	3.0 ± 0.6 (2.1 - 3.6)	本研究 (第一節)

* ホルマリン固定標本を測定

** エタノール固定標本から測定

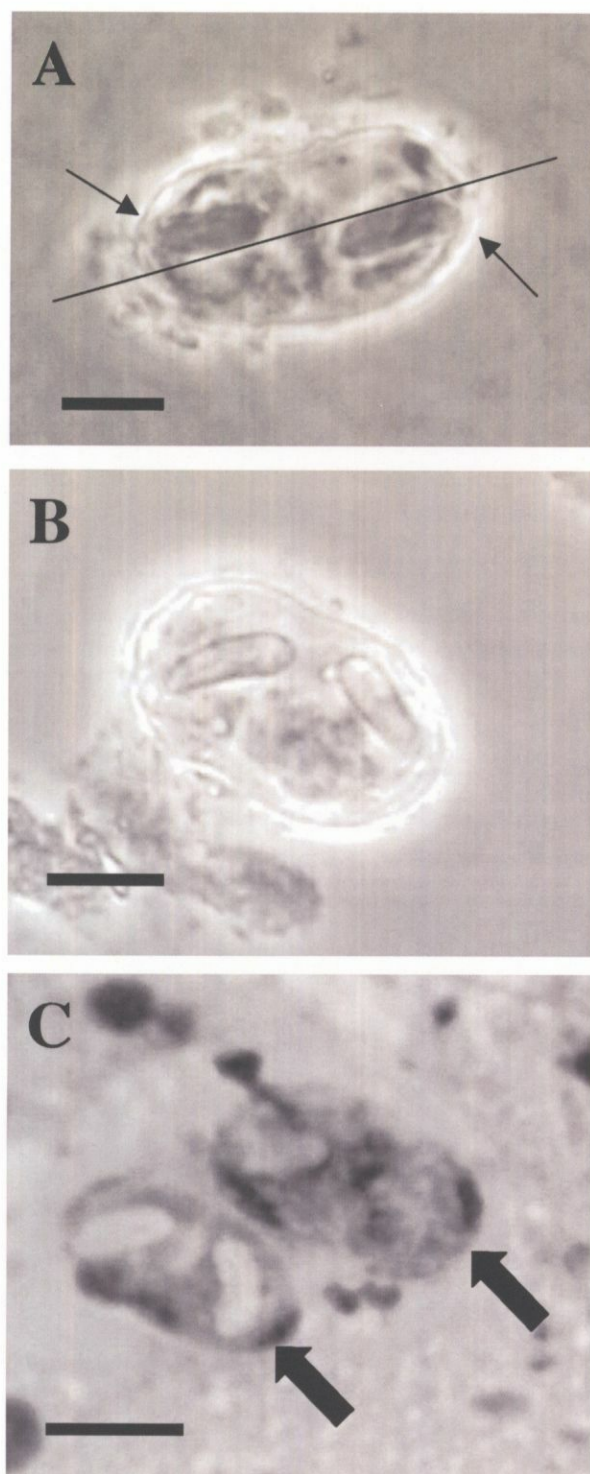


図 2-5 トラフグ腸管に観察された *Myxidium fugu*。(A) (B) ウエットマウント標本中に見つかった孢子。スケールバーは 5 μm 。(A) 上面観。極嚢は大きく伸張して末端が細くなり、孢子の両端に向かって、孢子を上あるいは下から見て孢子を縦に割った面に対して反対側に開口している（矢印）。(B) 正面観。(C) 2 個の未成熟な孢子（大矢印）を内含するスポロプラスト。スタンプ標本の Diff-Quik 染色。スケールバーは 10 μm 。

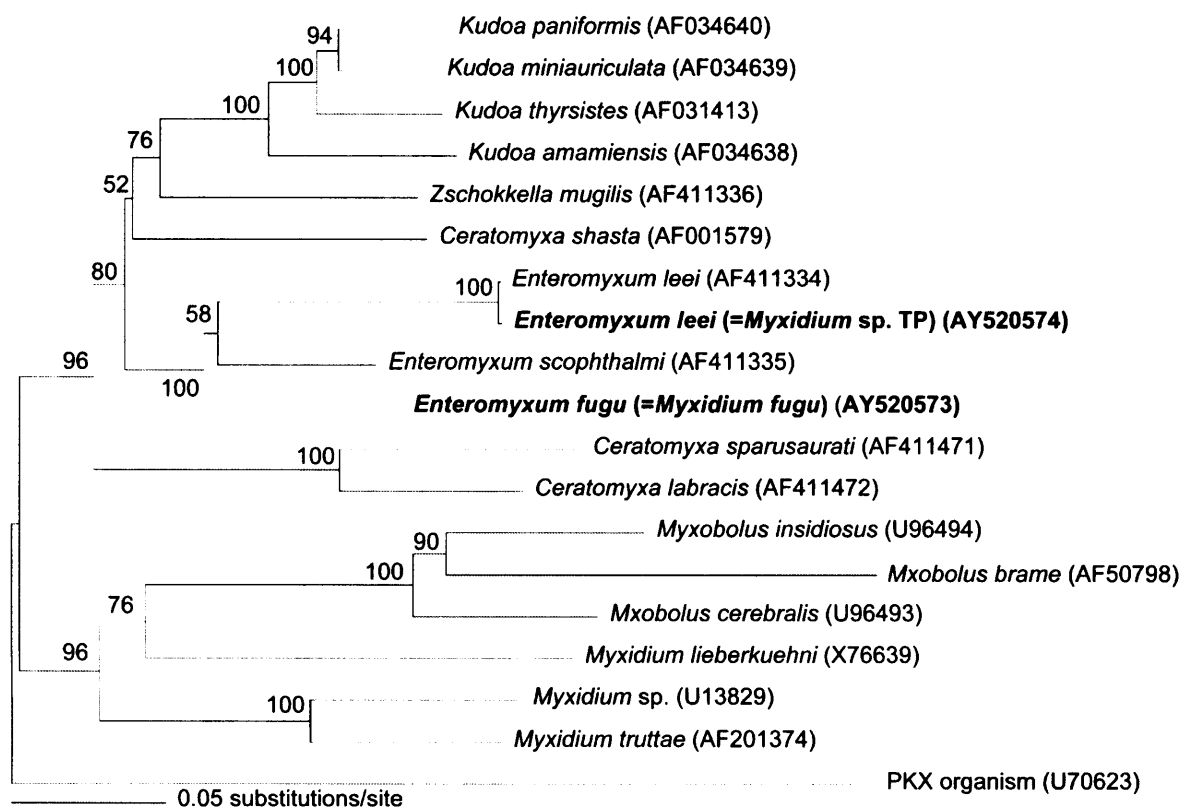


図 2-6 粘液胞子虫の SSU rRNA 遺伝子を用いて近隣結合法により得られた系統樹。各枝上の数字はブートストラップ確率 (%) を示す。太字は本研究で遺伝子解析を行った 2 種を示す。

比較した値に若干の差異が見られた（表 2-2）が、これには 2 つの可能性が考えられる。一つは標本作製法の違いである。Diamant (1992) と Diamant *et al.* (1994) によって記載された *E. leei* の孢子が今回の計測値に比較して幾分小さいのは、彼らの報告した計測値は北マリン固定した孢子のものであり、固定により収縮したためかもしれない。一方で、本研究で用いた孢子は冷凍したサンプルを解凍したものである。もう一つは、宿主の違いが孢子の大きさに影響を及ぼす可能性である。Diamant (1998) によると、ヨーロッパヘダイとレッドドラム (*Sciaenops ocellatus*) を実験魚として *E. leei* の感染実験を行ったところ、宿主間で孢子の大きさが異なるとされる。いずれにしろ、本研究で得られた *Myxidium* sp. TP 孢子の測定値はこれまでに記載されている *E. leei* の測定値の範囲内であるといえる。

本研究における SSU rRNA 遺伝子解析の結果は、*Myxidium* sp. TP と *Enteromyxum leei* が同種であることを強く示唆した。粘液孢子虫の分類において、遺伝子解析の結果はそれ単独で種同定をすることは不適當であるとされる一方で、孢子の形態観察による結果を裏付けするものとされている。Yokoyama *et al.* (2004a) は、ブリの脳に寄生する粘液孢子虫 *Myxobolus buri* とマハゼの脳に寄生する *Myxobolus acanthogobii* の SSU rRNA 遺伝子の塩基配列が 100%一致することを証明し、孢子の形態観察と合わせて両種が同種であると結論づけた。一方で、Schlegel *et al.* (1996) は、*Myxidium lieberkuehni* の SSU rRNA 遺伝子を解析した結果、同種内であっても 2%の変異が見られたと報告している。さらに、筋肉寄生粘液孢子虫 *Kudoa thyrsites* においては、日本のヒラメ由来のものとカナダのタイセイヨウサケ (*Salmo salar*) 由来のものでは約 1%の変異があることが確かめられている (Yokoyama *et al.* 2004b)。こうしたことから、本研究で得られた 0.4%という比較的小さな差異は、種内変異の範囲内であると解釈してよさそうである。

本研究における孢子の形態観察と SSU rRNA 遺伝子の解析の結果は、*Myxidium* sp. TP が *E. leei* と同種であり、*M. fugu* が *Myxidium* 属よりも *Enteromyxum* 属の粘液孢子虫により近縁であることを示している。加えて、魚から魚へ直接伝播することは *E. leei* を含む *Enteromyxum* 属の特徴であるが (Diamant 1997; Redondo *et al.* 2002)、*Myxidium* sp. TP と *M. fugu* も同様の

感染様式を持ち (Yasuda *et al.* 2002)、両種を *Enteromyxum* 属に転属する根拠となりうる。

Palenzuela *et al.* (2002) は、海産魚の消化管上皮組織内寄生性であることも *Enteromyxum* 属の分類学的性質であるとしているが、*M. fugu* は消化管腔内寄生性でありこれを満たさない。

しかしながら、近年になって新設された本属には未だ *E. leei* と *E. scopthalmi* の 2 種しか記載されておらず、組織内寄生性を本属に必須の分類学的性質とするのは不適當であると考ええる。そこで、筆者は *Myxidium* sp. TP を *E. leei* と同種とし、*M. fugu* を *Enteromyxum fugu* comb. n. として分類学上の位置を確定するとともに、管腔内寄生種も *Enteromyxum* 属に含めることを提唱する。

トラフグの粘液胞子虫性やせ病原因寄生虫が *E. leei* であることは重要な意味を持つ。なぜなら、*E. leei* は宿主範囲が非常に広い粘液胞子虫であるために、トラフグ養殖における本疾病の伝播にトラフグ以外の魚種も関与していることが考えられるからである。スペインの水族館でスズキ目を含む 4 目 10 科 25 種の魚類が *E. leei* の感染により死亡した事例 (Padros *et al.* 2001) を含めて、ヨーロッパではこれまでに 28 種の海産魚が *E. leei* の宿主となることが報告されている。トラフグ養殖場周辺には様々な天然魚が生息しており、その中に *E. leei* の宿主となるものが存在するかどうかは調査する必要があるだろう。これについては第四章で検証する。また、ヨーロッパで *E. leei* に感染したと報告されている魚種の中にはマダイも含まれており、日本のマダイ養殖でも *E. leei* を原因とする粘液胞子虫性やせ病が発生する危険性を示している。現に、本研究によって感染トラフグの腸管を摂餌させることでマダイに *E. leei* が感染することが実験的に証明された。さらに、近年になって鹿児島県内の養殖マダイとイシガキダイが著しいやせ症状を呈して死亡する疾病が発生し、検査の結果、粘液胞子虫やせ病と診断された。そこで、本章の第二節では養殖マダイとイシガキダイに発生した粘液胞子虫性やせ病の原因寄生虫を同定した。

E. leei はもともと日本近海に生息していたのか、それともどこから侵入してきたのだろうか？ Diamant (1992) は、1991 年から 1992 年にかけて地中海のキプロスのヨーロッパへマダイ養殖で *E. leei* の感染による被害が出たことを報告している。一方、日本で初めて粘液

孢子虫性やせ病の発生が確認されたのは 1996 年である (Tin Tun 2000)。この時間差は、ヨーロッパから人為的になんらかの感染種苗が持ち込まれたことを示唆しているようでもあるが、このような事実は一切確認されておらず、確証は何もない。また、Kent (1999) はカリフォルニアの水族館で飼育されていたハマクマノミ (*Amphiprion frenatus*) の腸管組織切片から *E. leei* によく似た粘液孢子虫を発見している。この粘液孢子虫の同定はなされていないが、*E. leei* に感染した熱帯魚が観賞魚として持ち込まれた可能性も考えられる。しかしながら、ハマクマノミは奄美以南の日本近海にも生息しており、何らかの天然魚から養殖トラフグに伝染したとも考えられる。いずれにしろ、現時点ではどの仮説にも確証はなく、*E. leei* の由来を明らかにするには今後さらなる研究が必要である。

第二節 養殖マダイおよびイシガキダイの粘液孢子虫やせ病原因寄生虫の同定

材料と方法

魚および寄生虫検査

マダイ病魚は、鹿児島県奄美大島の海上網生け簀養殖場で飼育されていた 5 尾（平均体重 57.6 g、平均体長 13.0 cm）を 2003 年 2 月に採材して用いた。イシガキダイ病魚としては、鹿児島県の海上網生け簀養殖場で飼育されていた 5 尾（平均体重 35 g）を 2002 年 10 月に採材して用いた。マダイおよびイシガキダイはいずれも著しいやせ症状を呈していた（図 2-7, 8）。病魚の腸管は、一部を組織切片作製用に 10% 中性緩衝ホルマリンで固定し、一部は DNA 抽出用として 80% エタノール固定した。ホルマリン固定標本からは、定法に従って組織切片を作製し、Uvitex 2B-H&E 三重染色を施して光学顕微鏡と蛍光顕微鏡で観察した。また、腸管粘膜上皮のスタンプ標本も作製し Diff-Quik 染色を施して光学顕微鏡で観察した。イシガキダイについては、胆汁も採取してウェットマウントで光学顕微鏡を用いて観察した。ウェットマウントで孢子が確認された場合には、20 個の孢子について孢子および極嚢の長さ



図 2-7 粘液胞子虫性やせ病を呈した養殖マダイ。



図 2-8 粘液胞子虫性やせ病を呈した養殖イシガキダイ。

と幅を測定した。

DNA 抽出と PCR

寄生虫の DNA は、エタノール固定した感染魚の腸管内壁をメスで擦り取ったものから QIAamp DNA mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。抽出法は付属のマニュアルに従った。次に、抽出した DNA 溶液をテンプレートとして PCR を行い、寄生虫の SSU r RNA 領域を増幅した。PCR 反応には、MM18Sf (5'-ctggttgattctgccagtggc-3') と MM18Sr (5'-cggtagcgcgacggcg-3') を使用した。PCR の反応溶液の組成は、TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (5 U/μL) 0.1 μL、10×Ex Taq™ Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5% Tween20、0.5% Nonidet P-40、50% Glycerol) 2.0 μL、dNTP Mixture (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5 mM) 1.6 μL、MM18Sf、MM18Sr (いずれも 25 pmol/μL) 各 0.6 μL、テンプレート 1.1 μL、滅菌超純水 15.0 μL の計 20 μL とした。PCR 反応条件は denaturation 94℃、1 分、annealing 60℃、30 秒、extension 72℃、1 分 45 秒を 35 サイクル、さらに first denaturation 94℃、3 分、last extension 72℃、2 分とした。泳動槽には Mupid ミニゲル泳動槽 (Advance) を使用し、PCR 産物は 1.5% アガロースゲル電気泳動により目的 DNA 断片の有無を確認した。

DNA クローニングとシークエンス

MM18Sf、MM18Sr を用いた PCR 反応で得られた産物は、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製した後、DNA クローニングに用いられた。マダイ病魚から得られたサンプルについては、PCR Cloning⁺ Kit (Qiagen) を用いて、付属のマニュアルに従ってライゲーション反応から形質転換までを行った。イシガキダイ病魚から得られたサンプルについては、pGEM-T Easy Vector system II (Promega) を用いて、付属のマニュアルに従ってライゲーション反応から形質転換までを行った。これらの培養液を、X-Gal (20 mg/μL DMSO) 40 μL、IPTG (200 μg/mL) 4 μL、アンピシリン (100 μg/μL) 10 μL を塗布した

LB 寒天培地に播き 37℃で一晩培養した。翌日寒天培地上に形成されたコロニーの内、白色のものを釣菌し、1600 bp 程度の大きさの DNA がインサートされているプラスミドをシーケンス反応に用いた。マダイとイシガキダイのいずれから得られたサンプルについても 3 つのクローンについてシーケンスを行った。

結果

顕微鏡観察

マダイとイシガキダイの腸管スタンプ標本中にはトラフグの *E. leei* に酷似した栄養体が観察され、イシガキダイからは孢子も見つかった (図 2-9, 10)。組織切片観察においても、上皮組織内に多数の栄養体が観察され、Uvitex 2B 染色性を示した (図 2-11)。イシガキダイの胆嚢から見つかった孢子の形態は、*E. leei* のものと一致した。孢子は緩やかな三日月型で、極嚢は大きく伸張して末端が細くなり、孢子の両端に向かって開口していた (図 2-12)。孢子の測定値は表 2-2 のようであった。

SSU rRNA 遺伝子解析

SSU rRNA 遺伝子領域に対して、マダイからもイシガキダイからも 1588 bp の塩基配列が得られた。いずれの塩基配列も、トラフグ由来の *E. leei* のものと 100%一致した。日本産 *E. leei* (トラフグ、マダイ、イシガキダイ) とヨーロッパのシャープスナウトシーブリーム (*Diplodus puntazzo*) 由来の *E. leei* は 99.6%の一致度を示し、日本産のみ 1 箇所塩基の欠失が見られた (図 2-13)。なお、本研究で得られたマダイおよびイシガキダイ由来の *E. leei* の塩基配列それぞれを以下のように GenBank に登録した。*Enteromyxum leei*、Accession number = AB243447。 *Enteromyxum leei*、DQ139796。

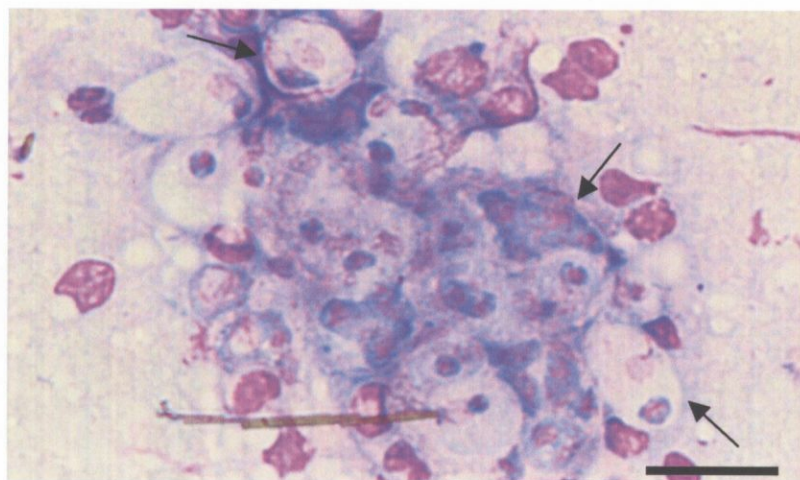


図 2-9 マダイ腸管スタンプ標本に見られた粘液胞子虫の栄養体（矢印）。Diff-Quik 染色。スケールバーは 10 μm 。

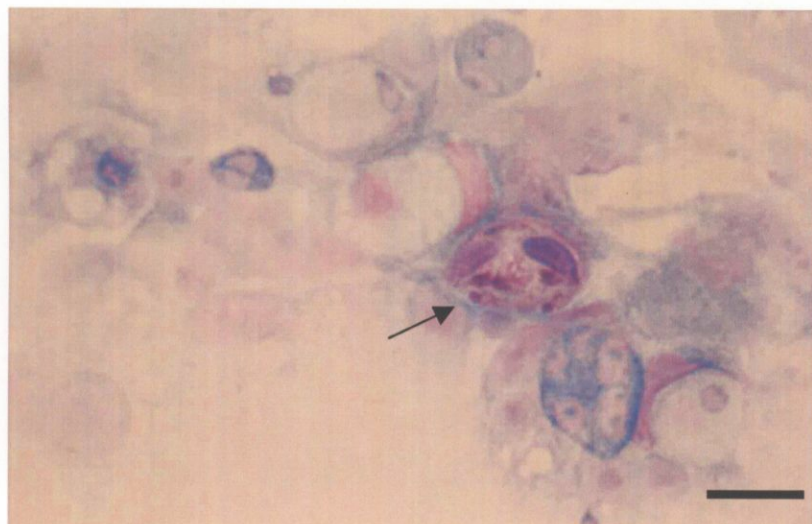


図 2-10 イシガキダイ腸管スタンプ標本に見られた粘液胞子虫の胞子（矢印）。Diff-Quik 染色。スケールバーは 10 μm 。

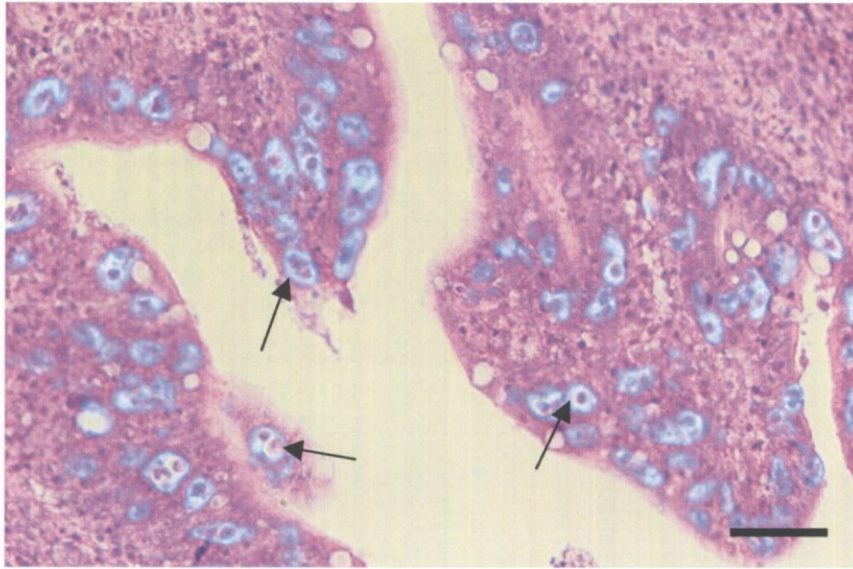


図 2-11 粘液胞子虫性やせ病感染マダイの腸管。上皮組織内に Uvitex 2B 染色性を有する多数の栄養体が観察される（矢印）。スケールバーは 50 μm 。



図 2-12 イシガキダイ胆汁から見つかった胞子。極嚢は大きく伸張して末端が細くなり、胞子の両端に向かって開口している（矢印）。スケールバーは 5 μm 。

<i>Diplodus puntazzo</i>	1	CTGGTTGATTCTGCCAGTGGTCATATGCTCGTCTCAAAGACTAAGCCATGCATGTCCAAG	60
<i>Takifugu rubripes</i>	1	60
<i>Pagrus major</i>	1	60
<i>Oplegnathus punctatus</i>	1	60

<i>Diplodus puntazzo</i>	61	TTCACATCAATTGATGAAACTGCGAAGCGCTCAGTAAATCAGTTATAGTCTATTCGATG	120
<i>Takifugu rubripes</i>	61	120
<i>Pagrus major</i>	61	120
<i>Oplegnathus punctatus</i>	61	120

<i>Diplodus puntazzo</i>	121	GTATACATAGTGGATAACTGTGGTAAATCTAGAGCTAATACGYGCTAAATATGCATTAC	180
<i>Takifugu rubripes</i>	121T.....-	179
<i>Pagrus major</i>	121T.....-	179
<i>Oplegnathus punctatus</i>	121T.....-	179
***** *****			
<i>Diplodus puntazzo</i>	181	TAGCTAGAAACCAACAAGTTGAATCTAGGTAAATCGCGAATCGTATGGCGCAAGCCGACG	240
<i>Takifugu rubripes</i>	180T.....	239
<i>Pagrus major</i>	180T.....	239
<i>Oplegnathus punctatus</i>	180T.....	239
***** *****			

図 2-13 異なる宿主に由来する *Enteromyxum leei* の SSU rRNA 遺伝子領域の一部塩基配列を比較。*は塩基置換が起きていないことを示す。

考察

本研究により、養殖マダイとイシガキダイに発生した粘液胞子虫性やせ病は *E. leei* が原因であることが明らかになった。マダイへの感染はヨーロッパではすでに記載がある (Le Breton & Marques 1995) ものの、日本のマダイ養殖における *E. leei* 感染症の記載はいままでになく、本研究が初報告である。また、イシガキダイについては日本のみならず世界的にも初めての報告である。農林水産省の平成 14 年度漁業・養殖業生産統計年報によると、マダイは年間 70000 t 以上収穫されており、ブリ類に次いで生産量第二位の主要養殖魚種である。*E. leei* の寄生による粘液胞子虫性やせ病の感染が拡大すれば、日本の海産養殖業界に深刻な被害を与えることになるであろう。さらに近年、養殖ヒラメでも *E. leei* の感染が報告されている (Yasuda *et al.* 2005)。今のところ養殖マダイに大きな被害が出たという報告はないが、今後は、トラフグ以外にも魚種を広げて本疾病の調査・研究をしていく必要があると考える。

マダイとイシガキダイの *E. leei* はどこから来たのだろうか？本研究で病魚を採材した養殖場周辺ではトラフグ養殖は行われておらず、そのため養殖トラフグから伝染したわけではない。もともとの由来は分からないが、トラフグとは独立した感染環が存在することは確かなようである。さらに、実験的に感染させたマダイおよびイシガキダイでは孢子形成されたということは、トラフグの場合と異なり、交互宿主を介した感染環が定着してしまう危険性があるということである。一方で、本章の第一節により、*E. leei* がトラフグからマダイへ直接伝播することが実験的に証明されており、養殖場においても、しばしば隣接した生け簀で飼育されるトラフグとマダイの間でこのような伝播が起こる可能性が示されている。しかしながら、ここでは感染魚の腸管を摂餌させるという感染方法を用いており、このような感染経路が養殖場に存在するとは考えにくい。Yasuda *et al.* (2002) は、感染魚との同居飼育および感染魚の飼育排水に曝露することによって *E. leei* がトラフグからトラフグへ直接伝播することを実験的に証明しており、この場合感染魚の体外に排出された栄養体が経口的に取り込まれることで感染が成立するとしている。トラフグからマダイへも同様の方法で伝播するかどうか実験的に確かめる必要があるだろう。これについては第三章の三節で検証する。

第二章のまとめ

第一節では、Tin Tun *et al.* (2000) によって記載されたトラフグの腸管寄生粘液胞子虫 *Myxidium fugu* と *Myxidium* sp. TP について、胞子の形態観察と SSU rRNA 遺伝子の解析によって両種の分類学的位置を再検討した。その結果、*M. fugu* を *Enteromyxum fugu* comb. n. として *Enteromyxum* 属に転属し、*Myxidium* sp. TP は *Enteromyxum leei* と同種とした。第二節では、養殖マダイとイシガキダイに発生した粘液胞子虫性やせ病の原因寄生虫が *E. leei* であることを明らかにした。これらの結果より、養殖トラフグの粘液胞子虫性やせ病が、トラフグ以外の魚種も含む伝播様式を持つことが示唆された。さらに、トラフグ以外の養殖魚種にも本疾病が発生したことからも、早急に養殖現場における疫学調査を行う必要があると考えられた。そこで第三章では、第一章で得られた寄生虫の SSU rRNA 遺伝子の塩基配列を基に、分子生物学的手法を用いた検出法の開発を行った。

第三章 PCR 法を用いた腸管寄生粘液胞子虫検出法の開発

序

ミクソゾアの同定は主に胞子の形態によって行われる。しかしながら、ミクソゾアによる感染症の中には、サケ科魚類の増殖性腎臓病 (proliferative kidney disease: PKD) やアメリカナマズ (*Ictalurus punctatus*) の proliferative gill disease (PGD) などのように、魚体内で胞子形成が行われないものもあり、そのような場合には免疫学的手法や分子生物学的手法が寄生虫の検出に用いられている (Saulnier & de Kinkelin 1997; Morris *et al.* 2000; 2002; Whitaker *et al.* 2001)。粘液胞子虫性やせ病に関しても、*Enteromyxum leei* はトラフグを宿主とするときに胞子形成を行わない。それにもかかわらず、養殖トラフグにおいて本病を診断する上で従来用いられてきた寄生虫検出法は、腸管の組織切片標本や腸管粘膜上皮のスタンプ標本を光学顕微鏡で観察する方法で、形態観察に依存していた。この従来法によっても粘液胞子虫性やせ病原因寄生虫の同定は可能であるが、組織切片標本作製には時間がかかる上に技術的にも簡単ではないため、速やかに検査結果を出すことが要求される魚病診断の場では実用的ではない。一方のスタンプ標本は迅速で簡便な検査法であるものの、しばしば混合感染する 3 種の粘液胞子虫の栄養体を形態学的に識別することは容易ではない。そのため、簡便でより信頼性が高い検出法の開発が必要とされていた。そこで本研究では、形態観察に頼らない PCR を利用した新しい診断法を開発することを目的として、前章で得られた SSU rRNA 遺伝子情報に基づいてプライマーを設計し、PCR 条件の検討を行った。得られた PCR 検出法は、従来法と比較することで実用性について検討した。さらに、検体を殺さずに検査するサンプリング方法についても検討した。

材料と方法

DNA 抽出とプライマー設計

PCR の条件検討に用いた寄生虫の DNA は、熊本県と長崎県の養殖場より得られた重篤感染魚から抽出した。しかしながら、*E. leei* と *Leptotheca fugu* 感染魚全てに *Enteromyxum fugu* が混合感染していたため、*E. leei* と *L. fugu* の DNA は *E. fugu* との混合感染魚から抽出したものをを用いた。寄生虫の DNA を含まないネガティブコントロールとしては、熊本県水産研究センターにおいて濾過海水で飼育された粘液胞子虫無感染のトラフグ腸管から抽出したものをを用いた。DNA は、80%エタノールで固定した腸管の内壁をメスで擦り取ったものから QIAamp DNA mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。抽出法は付属のマニュアルに従った。

PCR に用いた 3 組のプライマーは、*E. fugu* (accession number AY520573)、*E. leei* (AY520574)、*L. fugu* (AB195805) それぞれの SSU rRNA 遺伝子の塩基配列を、Genetyx Mac 10.0 (SOFTWARE DEVELOPMENT) と ClustalX1.8 (Thompson *et al.* 1997) を用いてアラインメントをかけ、変異の多い部分を用いて設計した。表 3-1 に示したように、*E. fugu* 特異的プライマーセット (EF プライマー)、*E. leei* 特異的プライマーセット (EL プライマー)、*L. fugu* 特異的プライマーセット (LF プライマー) によって増幅される領域のサイズはそれぞれ 873 bp、433 bp、631 bp であった。

PCR 反応条件

PCR の反応溶液の組成は、TaKaRa Ex TaqTM Hot Start Version (5 U/ μ L) 0.1 μ L、10 \times Ex TaqTM Buffer (20 mM Tris-HCl pH8.0、100 mM KCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5%Tween20、0.5% Nonidet P-40、50% Glycerol) 2.0 μ L、dNTP Mixture (dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2.5 mM) 1.6 μ L、プライマーセット (25 pmol/ μ L) 各 0.6 μ L、テンプレート 1.1 μ L、滅菌超純水 15.0 μ L の計 20 μ L とした。全ての PCR 反応において、サーマルサイクラーは iCycler (Bio-Rad) を使用した。PCR 反応条件は first denaturation 95 $^{\circ}$ C、10 分の後、denaturation 95 $^{\circ}$ C、30 秒、annealing 55 $^{\circ}$ C、30 秒、extension 74 $^{\circ}$ C、30 秒を 35 サイクル、last extension 74 $^{\circ}$ C、

表 3-1 トラフグ腸管寄生粘液胞子虫を検出するために設計されたPCR用プライマーセット。

標的寄生虫	プライマー名	塩基配列 (5' - 3')	増幅産物のサイズ (bp)
<i>Enteromyxum fugu</i>	EF-F	GGAGCAGTTCCAATGGGATT	873
	EF-R	AGAACCTACAATTGGTCTGT	
<i>Enteromyxum leei</i>	EL-F	GGATATTGTCAGAGTATGTT	433
	EL-R	AGAAGCCAACGTATATGATTTA	
<i>Leptotheca fugu</i>	LF-F	ATCTTGAATAAAAGCCACC	631
	LF-R	TGAACGAATCGATCTATGC	

7 分とした。PCR 産物は 1.5%アガロースゲル電気泳動により目的 DNA 断片の有無を確認した。

PCR の特異性と感度

設計したプライマーの特異性を検討するため、6 種の海産粘液胞子虫の DNA 溶液を調整し、PCR のテンプレートとして使用した。用いた粘液胞子虫とその宿主、寄生部位については表 3-2 に示した。

プライマーの検出感度は、重篤感染魚から抽出した DNA 溶液の 10 倍段階希釈溶液をテンプレートとして PCR を行うことで求めた。反応溶液中の DNA 量は、10 fg から 100 ng であった。なお、寄生虫を宿主組織から単離することが出来なかったため、反応液中の DNA は宿主の DNA も含んでいる。

従来の検出法との比較

本研究で開発した PCR 法と従来法の検出感度を比較するため、様々な発症段階のトラフグ 32 尾を長崎県、福井県および熊本県の養殖場から採材した(表 3-3)。サンプルの体重(BW)と標準体長 (BL) を測定し、 $BW/BL^3 \times 1000$ で肥満度を算出した。また、外観からやせ症状を四段階に区分けし、やせ度 0~3 で表した。それぞれのやせ度に対応する外観症状は以下の通りである。やせ度 0：外見上健康。やせ度 1：頭骨が張り出す。やせ度 2：頭骨の張り出しに加え、頬がこける。やせ度 3：上記 2 つの外観症状に加え、目が落ちくぼむ。

上述した 32 尾のトラフグについて、PCR 法と、スタンプ標本を光学顕微鏡で観察する方法により寄生虫検査を行った。PCR 法に関しては、DNA 抽出に際して 2 通りの採材法を用いた。一方は検体を殺さずに検査する方法 (Non-lethal PCR 検出法) で、滅菌済み綿棒 (面直径 3.0 mm、軸長 150 mm、P1503 日本綿棒株式会社) を肛門から挿入し (図 3-1)、腸内容物および腸管内壁を擦り取ったものから DNA を抽出した。DNA 抽出は QIAamp DNA mini Kit (Qiagen) によった。なお、綿棒を挿入することによる魚へのダメージは肉眼的には確認されなかった。もう一方は検体を殺して検査する方法 (Lethal PCR 検出法) で、腸管中



図 3-1 検体の肛門から綿棒を挿入しているところ。綿棒を挿入することによる魚へのダメージは肉眼的に確認されない。

表 3-2 プライマーの特異性を検討するために用いた海産粘液胞子虫。

粘液胞子虫	宿主	寄生部位
<i>Kudoa shiimitsui</i>	トラフグ <i>Takifugu rubripes</i>	囲心腔
<i>Kudoa amamiensis</i>	ブリ <i>Seriola quinqueradiata</i>	体側筋
<i>Kudoa lateolabracis</i>	タイリクスズキ <i>Lateolabrax</i> sp.	体側筋
<i>Henneguya lateolabracis</i>	タイリクスズキ <i>Lateolabrax</i> sp.	心臓
<i>Henneguya pagri</i>	マダイ <i>Pagrus major</i>	心臓
<i>Myxobolus acanthogobii</i>	マハゼ <i>Acanthogobius flavimanus</i>	脳

表 3-3 採材地ごとに見た、異なる検出法の間でのトラフグ腸管寄生粘液胞子虫検出率の比較。LM：光学顕微鏡によるスタンブ標本観察。
Lethal-PCR：検体を解剖する採材法を用いたPCR法。Non-lethal PCR：綿棒による採材法を用いたPCR法。

採材地	採材日	平均体長 (cm)	平均体重 (g)	やせ度	Enteromyxum fugu			Enteromyxum leei			Leptotheca fugu		
					LM	Lethal PCR	Non- lethal PCR	LM	Lethal PCR	Non-lethal PCR	LM	Lethal PCR	Non-lethal PCR
長崎	2004.3.25	20.2	210	0 - 3	19/20*	20/20	20/20	0/20	0/20	0/20	11/20*	20/20*	17/20 ^{bc}
福井	2004.6.10	23.8	329	0 - 1	8/9	9/9	9/9	3/9	4/9	4/9	0/9*	5/9*	5/9 ^{bc}
熊本	2004.8.10	22.3	240	2 - 3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3

*陽性個体数 / 試験個体数

**3 種類の検出法間で同じアルファベットが記されていない結果の間には、Fisher's exact test で比較して有意な差が見られた (P<0.05)。
アルファベットの記されていない結果の間では有意な差はなかった。

中央付近を切り取って 80%エタノールで固定したものから腸管内壁をメスで擦り取り、QIAamp DNA mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。スタンプ標本は、腸管中央部付近を 1 cm 程度の大きさに切り取り、縦に切り開いて内壁をスライドグラスに押しつけたものを風乾し、Diff-Quik (国際試薬株式会社) で染色を施した。それぞれの検出法の検出感度を比較するため、得られた結果は Fisher's exact test を用いて検定した。

結果

プライマーの特異性

本研究で設計した 3 組のプライマーセットを用いた PCR では、それぞれが標的とする寄生虫の DNA がテンプレートに含まれているときのみ増幅産物が得られ、その大きさは予測されたものであった (図 3-2)。3 種の粘液胞子虫の間で交差反応は見られなかった。さらに、トラフグ腸管寄生粘液胞子虫以外の 6 種の海産粘液胞子虫をテンプレートとした場合には、いずれのプライマーセットにおいても増幅産物は得られなかった。

PCR の感度

本研究で用いた PCR 反応条件におけるそれぞれのプライマーセットの検出限界は、EF プライマーセットで 10 pg、EL プライマーセットで 10 pg、LF プライマーセットで 1 pg であった (図 3-3)。しかしながら、テンプレートとして用いた DNA 溶液は宿主の DNA も含んでいたため、寄生虫の DNA 単独の検出限界は明らかに出来なかった。

従来の検出法との比較

E. fugu の寄生率はどの採材地においても 100%であったが、*E. leei* と *L. fugu* は、採材地によって寄生率に大きな違いが見られた (表 3-3)。Lethal-PCR 法を用いた場合には、長崎における *E. leei* と *L. fugu* の寄生率はそれぞれ 0%と 100%であったのに対し、熊本ではそれ

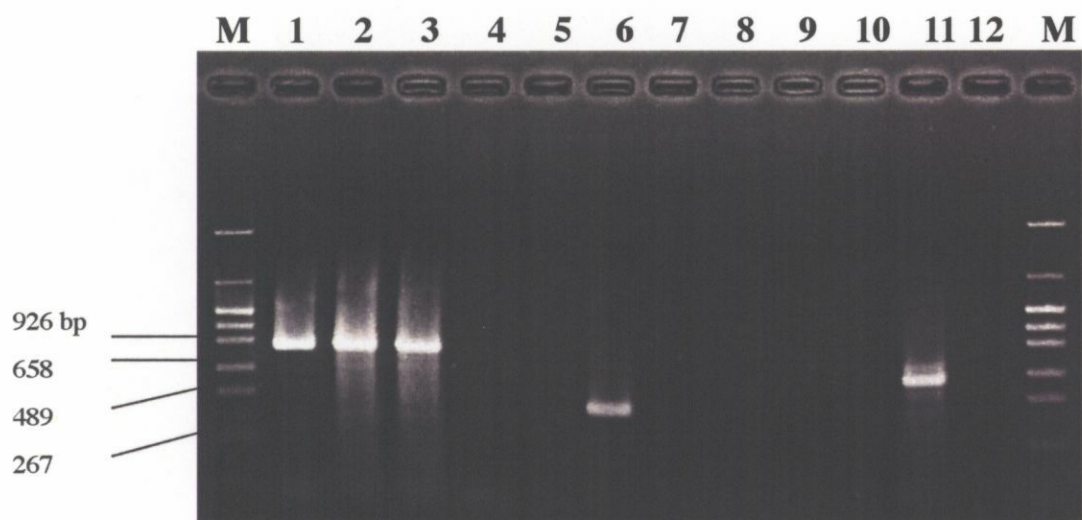


図 3-2 プライマーの特異性の検討。感染魚の腸管から抽出した DNA をテンプレートとして使用。(テンプレート) レーン 1、5、9 : *Enteromyxum fugu* 感染魚。レーン 2、6、10 : *E. fugu* と *Enteromyxum leei* の混合感染魚。レーン 3、7、11 : *E. fugu* と *Leptotheca fugu* の混合感染魚。レーン 4、8、12 : 無感染魚。レーン M : pHY マーカー。(プライマー) レーン 1-4 : EF プライマーセット。レーン 5-8 : EL プライマーセット。レーン 9-12 : LF プライマーセット。増幅産物の大きさは図の左に示す。

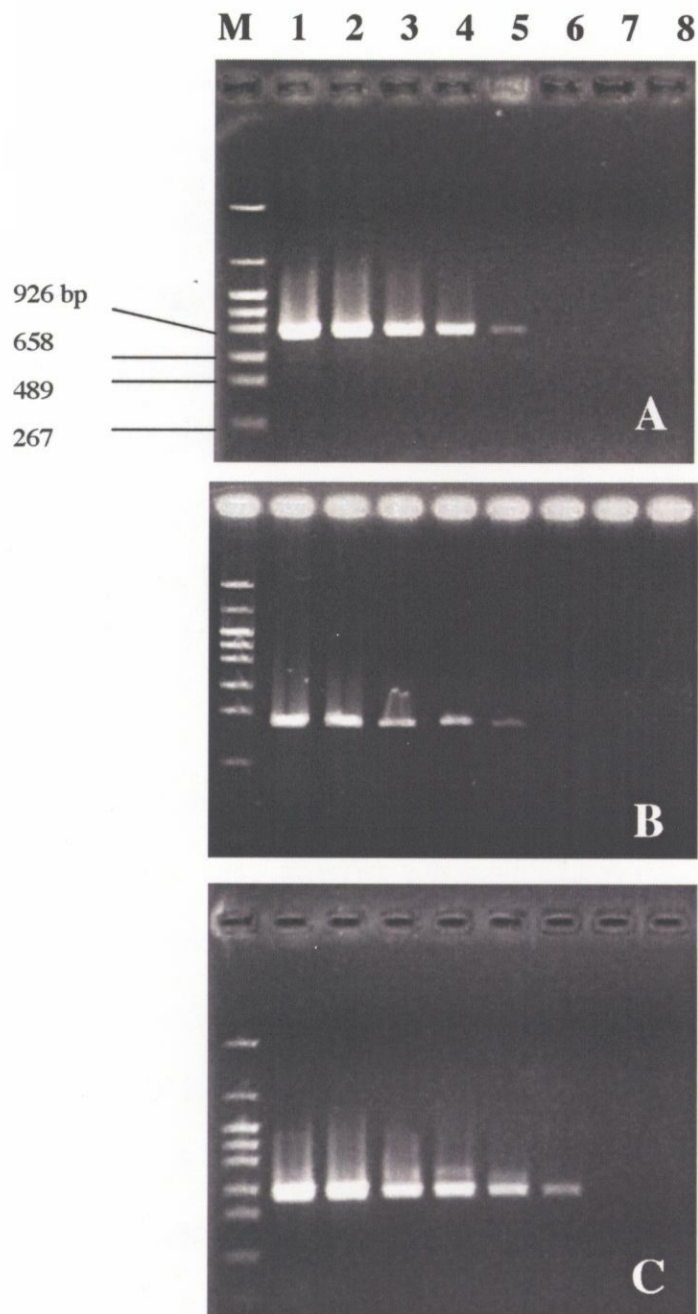


図3-3 PCRの検出感度。(A) *Enteromyxum fugu* 感染魚から抽出したDNAをテンプレートとしてEFプライマーセットで増幅。(B) *E. fugu* と *Enteromyxum leei* の混合感染魚から抽出したDNAをテンプレートとしてELプライマーセットで増幅。(C) *E. fugu* と *Leptotheca fugu* の混合感染魚から抽出したDNAをテンプレートとしてLFプライマーセットで増幅。レーン1: 100 ng。レーン2: 10 ng。レーン3: 1 ng。レーン4: 100 pg。レーン5: 10 pg。レーン6: 1 pg。レーン7: 100 fg。レーン8: 10 fg。レーンM: pHY マーカー。

ぞれ 100%と 0%であった。福井では *E. leei* と *L. fugu* 両方の感染が確認され、両種の混合感染魚も多く見られた。次に、3 種類の検出法（スタンプ標本観察法、Lethal PCR、Non-lethal PCR）それぞれの検出率を表 3-4 に示した。*L. fugu* の検出率は、スタンプ標本観察法、Lethal PCR、Non-lethal PCR のそれぞれで 34%、78%、69%であり、検体を殺す方法にしる、生かしたまま調べる方法にしる、PCR による検出法の方が顕微鏡観察による検出法に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。しかしながら、Lethal PCR 法で陽性であるのに Non-lethal PCR 法では陰性という個体もあった。*E. fugu* と *E. leei* については、スタンプ標本観察法で陰性かつ PCR 法で陽性という個体が若干ながら見られたが、その逆は無かった。やせ度別に見ると、*L. fugu* の検出率は、やせ度 0 の場合のみ PCR による検出法の方が顕微鏡観察による検出法に比べて有意に高かった ($P < 0.05$)。

考察

本章では、PCR によるトラフグ腸管寄生粘液胞子虫の検出法を開発した。PCR に用いられた全てのプライマーセットは、標的とする寄生虫に特異的であり、今回調べた 9 種の海産粘液胞子虫の間で交差反応は起きなかった。また、PCR による寄生虫の DNA の検出限界は、感染魚の腸管組織から抽出した総 DNA 量で 1 pg から 10 pg であった。この総 DNA 量中に占める寄生虫の DNA 量は明らかには出来なかったものの、当然ながら総 DNA 量よりは少ないはずである故、これまでに報告されている他の粘液胞子虫検出用 PCR と比肩する検出感度であるといえる (Saulnier & Kinkelin 1997; Yokoyama *et al.* 2000)。また、従来の診断法であるスタンプ標本観察法と比較しても、より検出感度が高かった。さらに、従来法の検出感度は観察者の熟練度合いによって変わることが考えられるが、その点 PCR 法であれば結果に個人差は生じない。これらの結果から、本研究で開発した PCR 法は、簡便で信頼性の高い方法として実際に粘液胞子虫性やせ病の診断に使用できると考える。今後は、複数のプライマーセットを一本のチューブ内で反応させる multiplex-PCR の技術 (Gonzalez *et al.* 2004; Russell *et al.* 2004) を応用することによって、より少ない手間とコストで診断が可能になる

表 3-4 やせ度ごとに見た、異なる検出法の間でのトラフグ腸管寄生粘液胞子虫検出率の比較。LM：光学顕微鏡によるスタンブ標本観察。
Lethal-PCR：検体を解剖する採材法を用いたPCR法。Non-lethal PCR：綿棒による採材法を用いたPCR法。

やせ度	平均肥満度	Enteromyxum fugu			Enteromyxum leei			Leptotheca fugu**		
		LM	Lethal PCR	Non-lethal PCR	LM	Lethal PCR	Non-lethal PCR	LM	Lethal PCR	Non-lethal PCR
0	27.7	9/10*	10/10	10/10	1/10	2/10	2/10	1/10*	6/10 ^b	5/10 ^{ab}
1	24.4	7/8	8/8	8/8	2/8	2/8	2/8	2/8	8/8	8/8
2	23.5	5/5	5/5	5/5	2/5	2/5	2/5	2/5	3/5	3/5
3	22.2	9/9	9/9	9/9	1/9	1/9	1/9	6/9	8/9	6/9
検出率 (%)		94	100	100	19	22	22	34 ^a	78 ^b	69 ^{bc}

*陽性個体数 / 試験個体数

**3 種類の検出法間で同じアルファベットが記されていない結果の間には、Fisher's exact test で比較して有意な差が見られた (P<0.05)。
アルファベットの記されていない結果の間では有意な差はなかった。

かもしれない。

PCR 法による *L. fugu* の検出率がスタンプ標本観察法に比べ有意に高かった一方で、*E. leei* の検出率はスタンプ標本観察法とほとんど変わらなかった。この違いは、検体のやせ度によるものかもしれない。やせ度の小さい感染魚では感染強度が低く、そのためスタンプ標本観察法と PCR 法との間の検出感度の差が出やすくなる一方で、やせ度の大きい感染魚では感染強度が高く、そのため検出感度の差が出にくくなると考えられる。実際に本実験において、やせ度 0 の場合には *L. fugu* の検出率に有意な差があり、*E. leei* の検出率もわずか 1 個体ながら PCR 法のみで検出された例があった（表 3-4）。つまり、やせ度の小さい検体が比較的多かった *L. fugu* 感染魚においては検出率の差が明確になったが、検体数の少なかった *E. leei* 感染魚ではその差が明らかにならなかったのではないだろうか。今後さらに検体数を増やせば *E. leei* についても検出率の差が明らかになるかもしれない。

E. leei と *E. fugu* は魚から魚へ直接伝播することが実験的に証明されており（Diamant 1997; Yasuda *et al.* 2002）、これは *Enteromyxum* 属の特徴とされている。この性質が海上網生け養殖での速やかな感染拡大を引き起こしている可能性は高く、それゆえ早期診断が重要であると考えられる。実際に養殖種苗を漁場間で人為的に移動させることによって感染症が伝播することは知られている（Wakabayashi 1996）。粘液胞子虫性やせ病の場合、顕微鏡観察によって無症状な初期感染魚から寄生虫の初期ステージを検出することは非常に困難であった。しかしながら、本章で開発した PCR 法は外観上健康な検体からも容易に寄生虫を検出することができる。今後は、粘液胞子虫性やせ病の汚染水域から種苗を導入する際に、本 PCR 法を用いて事前に感染の有無を確認することを推奨したい。また、そもそも現段階でこの水域が本疾病に汚染されているかを把握する際にも、本 PCR 法は大きな力を発揮するだろう。

本研究によって、ある程度以上の大きさ（体長約 10 cm 以上）の検体であれば綿棒を用いて殺すことなく粘液胞子虫性やせ病の検査をすることが可能になった。本研究以前にも、サケ科魚類の粘液胞子虫 *Ceratomyxa shasta* の綿棒を用いた PCR 診断法が報告されているが、

魚を殺した場合に比べて著しく検出感度が落ちたとしている (Fox *et al.* 2000)。本研究でも、統計的に有意ではなかったものの、*L. fugu* の場合において若干検出感度が低くなった。しかしながら、トラフグは養殖魚の中でも非常に高価な魚種であるため、魚を殺さずに検査できることの意義は大きい。これまでは、経済的な理由から大規模な疫学調査はほとんど行われてこず、それゆえ本疾病の季節性や地域性に関する知見は乏しかった。たとえば本章で調査した検体については、*E. fugu* の寄生率が全ての採材地において 100%であったのに対して、*E. leei* と *L. fugu* の寄生率には大きな地域差が見られた (表 3-3)。しかしながら、長崎県では 3 月、熊本県では 8 月にサンプリングを行っているため、季節の違いも考慮するべきかもしれない。現段階では、本疾病の原因寄生虫の寄生動態に地域性や季節性があるかどうかは明らかではないが、本章で開発された魚を殺さない PCR 法を用いれば広範囲な疫学調査を低コストで行うことができる。しかしながら、綿棒が挿入できない稚魚の診断には Lethal PCR 検出法を用いる必要がある。

PCR 法は、寄生虫の生活環や感染環を解明する上でも大きな手助けとなる。海産粘液胞子虫の生活環としては、感染実験と SSU rRNA 遺伝子解析によって、ハゼ科の *Pomatoschistus microps* に寄生する *Ellipsomyxa gobii* が多毛類の *Nereis* spp. を交互宿主とすることがただ一種証明されているだけである (Køie *et al.* 2004)。Enteromyxum 属と Leptotheca 属粘液胞子虫の交互宿主については今のところ一切知見はないが、トラフグ腸管寄生粘液胞子虫の感染水域に生息している様々な無脊椎動物を本研究で確立された PCR 法を用いてスクリーニングすることで、生活環解明の糸口が見つかるかもしれない。また、*E. leei* は魚から魚へ直接伝播するうえに複数の魚種を宿主とするため、粘液胞子虫性やせ病の防疫にはトラフグ以外の魚を介した感染環について調査することも必須であろう。ここでも、PCR 法が役に立つと考えられる。