

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

序

寄生虫感染症の研究において、病原体の感染環を理解することは、単に基礎的な知見を得ることに留まらず、予防や治療などの実学への応用という点でも重要である。化学療法やワクチン療法が未だ実用化されていない粘液胞子虫の感染症においては、予防が主な対策となり、感染環を断ち切ることを第一に考える必要がある。これまでに、感染環に関する知見を基にして粘液胞子虫感染症の制御を試みた例としては、コイ (*Cyprinus carpio*) の出血性テロハネルス症を引き起こす粘液胞子虫 *Thelohanellus hovorkai* がある。*T. hovorkai* は貧毛類のエラミミズ (*Branchiura sowerbyi*) を交互宿主として生活環を完結することが感染実験と遺伝子解析で証明されている (Yokoyama 1997; Szekely *et al.* 1998; Anderson *et al.* 2000)。Liyanage *et al.* (2002) は、エラミミズが生息場として粒子の粗い砂よりも泥を好む性質を明らかにし、養殖池底の土壌を改良して貧毛類相を制御することで病気を予防できると報告した。このように、感染環を解明することは病気の対策にもつながる。

粘液胞子虫性やせ病については、*Enteromyxum leei* がトラフグからトラフグへ直接伝播することが実験的に証明され、そのことが養殖場で本疾病が速やかに拡散する原因になっている (Yasuda *et al.* 2002)。しかし、本疾病の伝播については未解明な点が多い。Yasuda *et al.* (2002) は、感染実験の結果から *E. leei* の発育が水温の影響を受けることを示唆したが、自然水温で行われた実験であったため、詳細は明らかにされなかった。また、*E. leei* の感染力が海中で維持される期間については知見が無く、本疾病が虫体の拡散によってどの程度遠くまで伝播するかは不明である。さらに、本研究の第一章では *E. leei* の伝播にトラフグ以外の養殖魚や天然魚が関与している可能性が示されたが、経水的な伝播は実験的に証明されていないため、養殖場でトラフグとその他の魚種との間で伝播しているという確証はない。もう1種の原因寄生虫である *Leptotheca fugu* については、人為感染の成功例は無く、感染環については未だ何も分かっていない。そこで本研究では、本疾病の伝播過程を解明するため

に、感染実験によって原因寄生虫の生物学的特性について検討した。まず、*E. leei* のトラフグ内での発育に水温が与える影響について実験的に明らかにした。次に、*E. leei* の海水中での感染力維持時間について検証した。さらに、*E. leei* が経水的にトラフグとマダイの間で伝播するかを確かめた。最後に、これまでに成功例がない *L. fugu* の感染実験を試みた。

第一節 水温が *Enteromyxum leei* の発育に及ぼす影響

材料と方法

実験 1 (15°C、20°C、25°Cの一定水温での飼育)

魚

E. leei の感染源としては、熊本県内のやせ病が発生している養殖生け簀から採材した養殖トラフグ 30 尾を用いた (平均体長 15.6 cm、平均体重 106.2 g)。実験直前に粘液胞子虫の寄生率を腸管上皮のスタンプ標本観察により調べたところ、*E. leei* が 90% (27/30) で、*E. fugu* が 93% (28/30) であった。粘液胞子虫無感染の供試魚としては、熊本県水産研究センター内で飼育したトラフグ 80 尾 (平均体長 14.3 cm、平均体重 119.7 g) を用いた。試験期間中は海からポンプで汲み上げた砂濾過海水を 100 μm、50 μm、10 μm の目合いのカートリッジフィルターで順次三段階に濾過して飼育水として用いた。また、試験期間中は毎日魚体重あたり約 0.5% の配合飼料を与えて飼育した。

感染法

感染魚の腸管を、縦に切り開いた後、濾過海水で軽く洗浄して約 1 cm 角の小片に刻んだ。これを感染源とし、供試魚 60 尾に経口投与した (経口投与法)。経口投与は 3 日間連続で行い、1 日あたりの投与量は感染魚 10 尾分であった。その後 1 日おいて、経口投与した実験魚 60 尾を 20 尾ずつの 3 群に分け、それぞれ 200 L の円形水槽に移した。また、供試魚のう

ち感染魚の腸管を摂餌させなかった 20 尾を、同様に 200 L の円形水槽に移し陰性対照区とした。経口投与時の水温は 20℃とし、それぞれの実験区の水温を徐々に変化させ、7 日間かけて 15℃、20℃、25℃に設定した。陰性対照区の水温は 20℃とした。

採材

全ての区の水温が設定温度に達した日（経口投与開始後、12 日目）に、第 1 回の採材（各区 5 尾）を行い、以降毎週 5 尾ずつ採材した。以降、述べる投与後日数は、経口投与初日からの経過日数を意味する。なお、25℃区において 1 尾が経口投与後 31 日目に水槽から飛び出して死亡したため、25℃区の 33 日目における採材尾数は 4 尾であった。体長と体重を測定した後、解剖して腸管を採取した。それぞれの腸管について腸管内壁の塗抹標本を作製するとともに、組織切片作製用に Bouin 液による固定標本を作製した。塗抹標本と組織切片作製の腸管は、腸前部（腸管前端～胆管開口部）、腸中部（胆管開口部と直腸前端との間の中間部分）、腸後部（直腸前端までの 5 cm 程）の 3 区域より採材した。塗抹標本は、各区域について Diff-Quik 染色して光学顕微鏡で観察した。固定標本は第 2 回の採材までは中腸部のみ、第 3 回目以降は 3 区域について作製した。組織切片は常法に従って作製し、Uvitex 2B-H&E 三重染色して光学顕微鏡と蛍光顕微鏡 (UV 励起) で観察した (Yokoyama *et al.* 1996)。寄生の有無は、腸管の前部、中部、後部のスタンプ標本および組織切片上で一カ所でも寄生体が観察された場合、陽性と判定し、寄生率 (%) を陽性個体数/試験個体数として定義した。

実験 2 (飼育途中で 15℃から 20℃へ昇温)

魚

E. lei の感染源としては、熊本県御所浦町で養殖されていたトラフグ 20 尾 (平均体長 25.5 cm、平均体重 424.3 g) と、同県龍ヶ岳町で養殖されていたトラフグ 50 尾 (平均体長 16.6 cm、

平均体重 115.1 g) を用いた。実験直前に腸管上皮のスタンプ標本観察により粘液胞子虫の寄生率を調べたところ、前群では *E. leei* が 5% (1/20)、*E. fugu* が 45% (9/20) で、後群では *E. leei* が 62% (31/50)、*E. fugu* が 84% (42/50) であった。粘液胞子虫無感染の供試魚としては、熊本県水産研究センター内で飼育したトラフグ 148 尾 (平均体長 19.1 cm で、平均体重 207.7) を用いた。全ての実験区における飼育条件は実験 1 と同様とした。

感染法

感染法としては、実験 1 と同様の経口投与方法を用いた。経口投与はまず前群 (20 尾分) の腸管を投与して、その後 1 日おいてから後群の腸管 (50 尾分) を投与した。経口投与時の水温は全て 20℃とした。その翌日、経口投与した実験魚 111 尾を 37 尾ずつの 3 群に分け、それぞれ 2 t の円形水槽に移した。それら 3 水槽の内 1 つは、試験終了時まで 20℃で飼育した (20℃区)。残りの 2 水槽は、翌日から 5 日間かけて水温を 15℃に徐々に調整した。15℃水槽の 1 つは、経口投与 3 週間後から 5 日間かけて徐々に 20℃に昇温した (途中昇温区, 図 4-1)。もう一方は試験終了まで 15℃で飼育した (15℃区)。また、供試魚のうち感染魚の腸管を摂餌させなかった 37 尾を、同様に 2 t の円形水槽に移し陰性対照区とした。なお陰性対照区の水温は 20℃とした。

採材

経口投与 21 日後、42 日後および 63 日後に採材を行い、体長と体重を測定してから解剖して腸管を採取した。それぞれの腸管について腸管内壁の塗抹標本を作製するとともに、組織切片作製用に Bouin 液による固定標本を作製した。なお、塗抹標本と組織切片作製の腸管は、腸前部、腸中部、腸後部の 3 区域より採材した。塗抹標本は各区域について Diff-Quik 染色を施して光学顕微鏡で観察した。組織切片は常法に従って作製し、Uvitex 2B-H&E 染色して光学顕微鏡及び蛍光顕微鏡で観察した (Yokoyama *et al.* 1996)。寄生率は、腸管の前部、中部、後部のスタンプ標本および組織切片上で一カ所でも寄生体が観察されたらその個体は

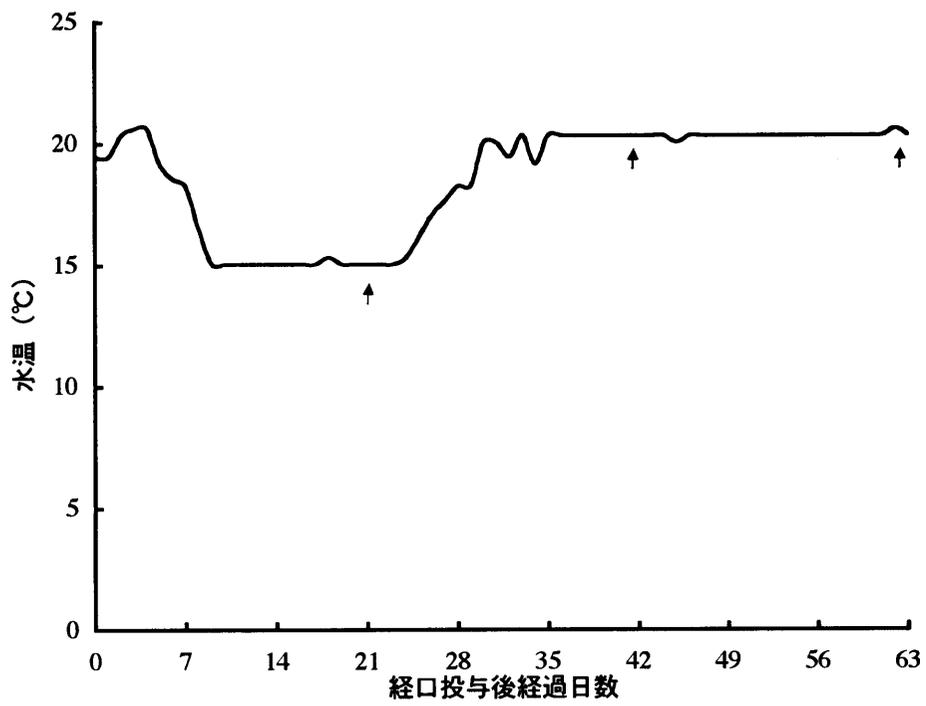


図 4-1 実験 2 の途中昇温区における水温の変動。矢印はサンプリングを行った日を表す。

陽性と判定して求めた。飼育期間中にやせ病の症状がみられた場合、発病した日付と個体数を記録し、個体については累積発症個体数として計数した。

実験3（飼育途中で10℃から20℃へ昇温）

魚

E. leei の感染源としては、熊本県水産研究センターの陸上水槽で *E. leei* の感染魚として維持されていたトラフグ 10 尾（平均体長 19.6 cm、平均体重 203.4 g）を用いた。実験直前に Lethal PCR 検出法により粘液胞子虫の寄生率を調べたところ、*E. leei* と *E. fugu* とともに 100% であった。粘液胞子虫無感染の供試魚としては、熊本県水産研究センター内で飼育したトラフグ 80 尾（平均体長 17.1 cm、平均体重 164.9）を用いた。全ての実験区における飼育条件は実験1と同様とした。

感染法

感染法としては、実験1と同様の経口投与法を用いた。経口投与は2日間連続で行い、1日あたりの投与量は感染魚5尾分、経口投与時の水温は全て20℃とした。その翌日、経口投与した実験魚60尾を20尾ずつの3群に分け、それぞれ1tの円形水槽に移した。実験区3水槽の内1つは、試験終了時まで20℃で飼育した（20℃区）。翌日から、残り2水槽の水温を10℃まで20日間かけて徐々に調整していった。さらに、経口投与45日後から、10℃水槽の1つを20日間かけて徐々に20℃に昇温した（途中昇温区、図4-2）。もう一方は試験終了まで10℃で飼育した（10℃区）。また、供試魚のうち感染魚の腸管を摂餌させなかった20尾を、同様に1tの円形水槽に移し陰性対照区とした。なお、陰性対照区の水温は20℃とした。

採材

経口投与42日後と84日後に採材を行い、体長と体重を測定してから解剖して腸管を採取し

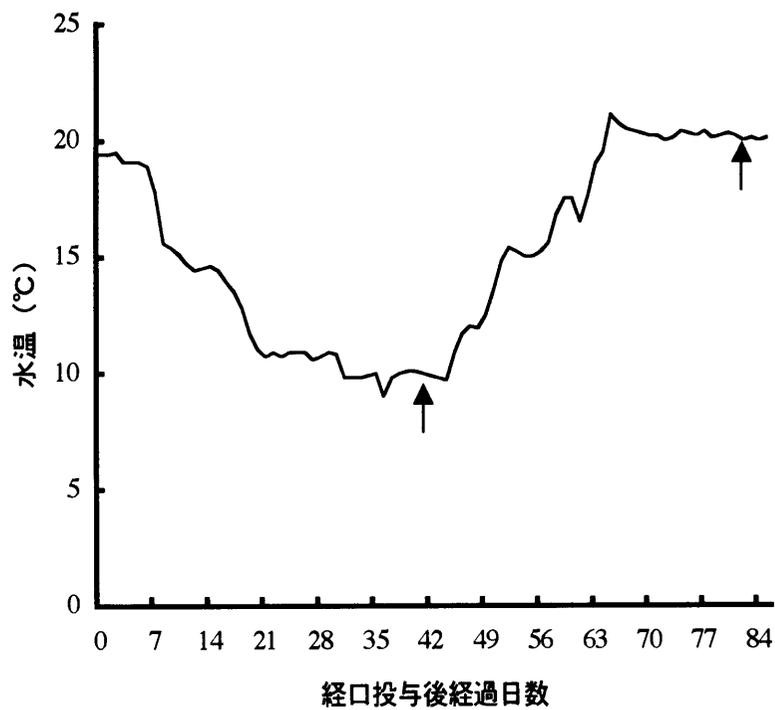


図 4-2 実験3の途中昇温区における水温の変動。矢印はサンプリングを行った日を表す。

た。それぞれの腸管の中央部付近から腸管内壁の塗抹標本、10%中性緩衝ホルマリン固定標本および80%エタノール固定標本を作製した。塗抹標本はDiff-Quik染色を施して光学顕微鏡で観察した。組織切片は常法に従って作製し、Uvitex 2B-H&E染色して光学顕微鏡と蛍光顕微鏡で観察した(Yokoyama *et al.* 1996)。80%エタノール標本からは、第二章で既述したLethal PCR法により寄生虫を検査した。寄生率は、スタンプ標本、組織切片、PCRのいずれかで陽性であればその個体は陽性と判定して求めた。

結果

実験1

E. leei は、25°C区では12日目に初めて寄生が確認され、その後寄生率は100%に達した。20°C区においては19日目以降に80%の寄生率を示した。しかしながら、15°C区と対照区においては試験期間を通じて*E. leei*の寄生は確認されなかった(図4-3)。*E. fugu*は12日目以降に対照区を除く全ての試験区で寄生が確認され、19日目に寄生率は100%に達した(図4-4)。腸管の部位別にみると、*E. leei*は20°C区において19日目で腸前部のみから、26日目で腸中部、33日目で初めて腸後部から検出された(図4-5)。25°C区においても同様に腸前部からまず検出され、その後に腸中部、腸後部に移行していった(図4-6)。また、20°C、25°C区共に時間経過に伴って腸前部の寄生率が減少した。一方の*E. fugu*は、20°C区において12日目以降に腸管の全ての部位から検出され、19日目以降に100%の寄生率に達した(図4-7)。25°C区では12日目以降に腸管の全ての部位から検出され、19日目に100%の寄生率に達したが、33日目には寄生率の減少が見られた(図4-8)。

実験期間中に本疾病を発症した個体は見られなかったが、25°C区では33日目に腸水が観察された個体があった。病理組織学的には、20°C区と25°C区で*E. leei*感染魚の腸管上皮組織が剥離する現象が観察された(図4-9)。一方の*E. fugu*の寄生部位における腸管上皮組織の病変は、非常に軽微なものであり、寄生部位において腸管上皮表面が若干陥没している程度であった(図4-10)。このような腸管上皮組織の剥離が見られた個体は、15°C区と対照区

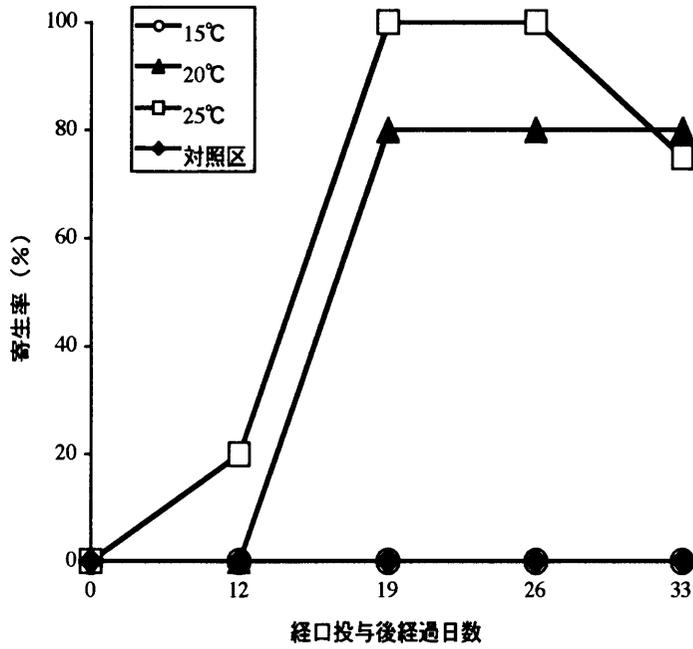


図 4-3 実験 1 における *Enteromyxum leei* の水温別寄生率。N= 5 (25°C区の 33 日目のみ 4)。

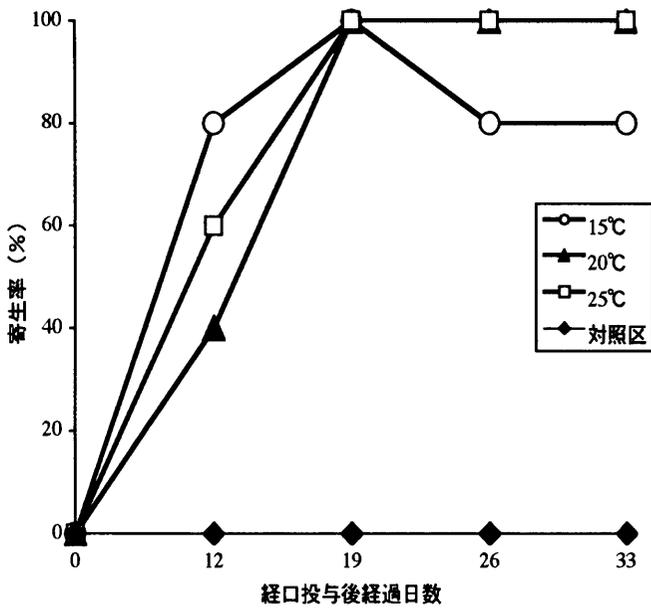


図 4-4 実験 1 における *Enteromyxum fugu* の水温別寄生率。N= 5 (25°C区の 33 日目のみ 4)。

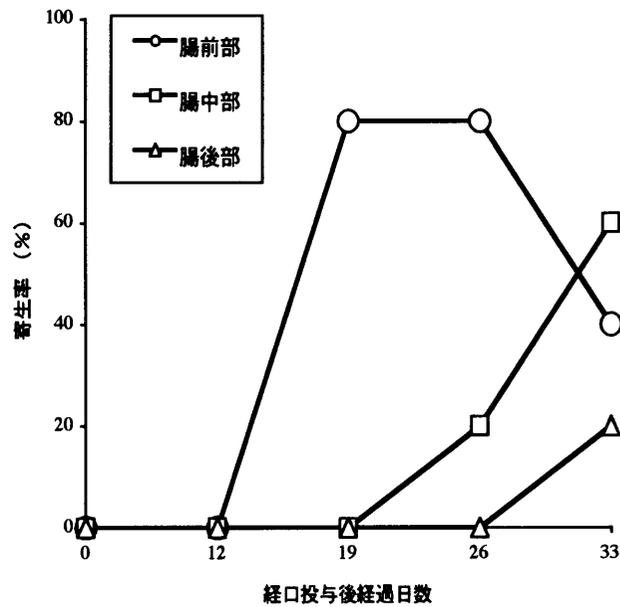


図 4-5 実験 1 の 20°C 区における *Enteromyxum leei* の腸管部位別寄生率。N= 5。

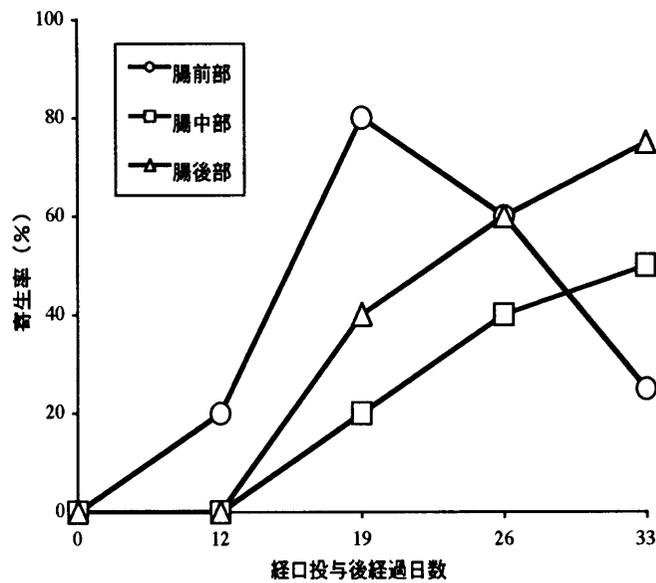


図 4-6 実験 1 の 25°C 区における *Enteromyxum leei* の腸管部位別寄生率。N= 5 (33 日目のみ 4)。

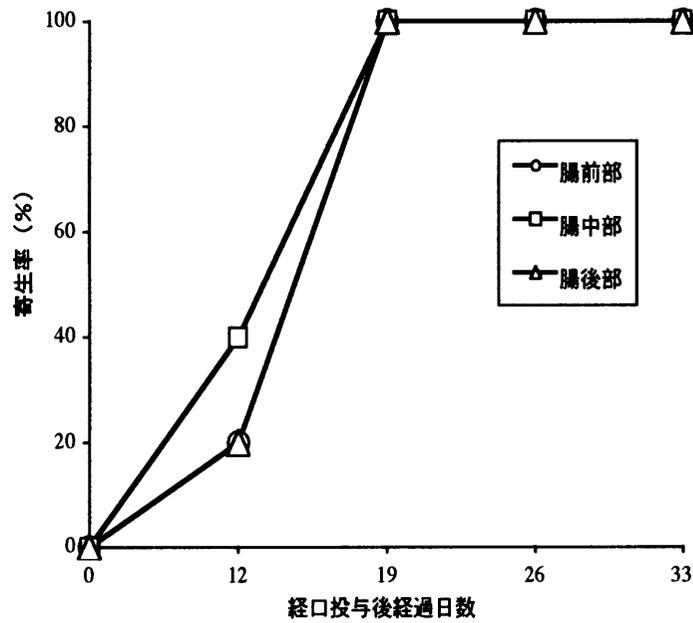


図 4-7 実験 1 の 20°C区における *Enteromyxum fugu* の腸管部位別寄生率。N=5。

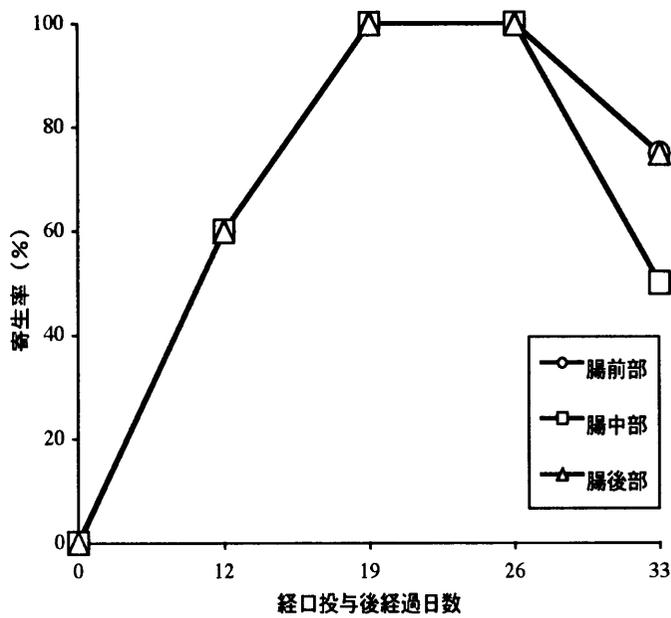


図 4-8 実験 1 の 25°C区における *Enteromyxum fugu* の腸管部位別寄生率。N=5 (33 日目のみ 4)。

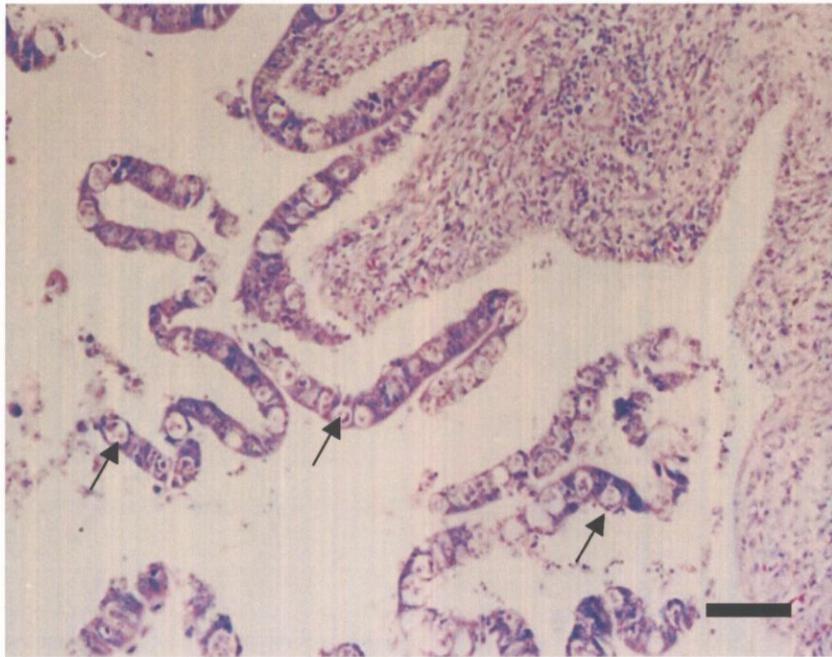


図 4-9 *Enteromyxum leei* 重篤感染トラフグの腸管組織。 *E. leei* (矢印) の寄生を受けた上皮組織が剥離して管腔内に落ち込んでいる。H-E 染色。スケールバーは 40 μm 。

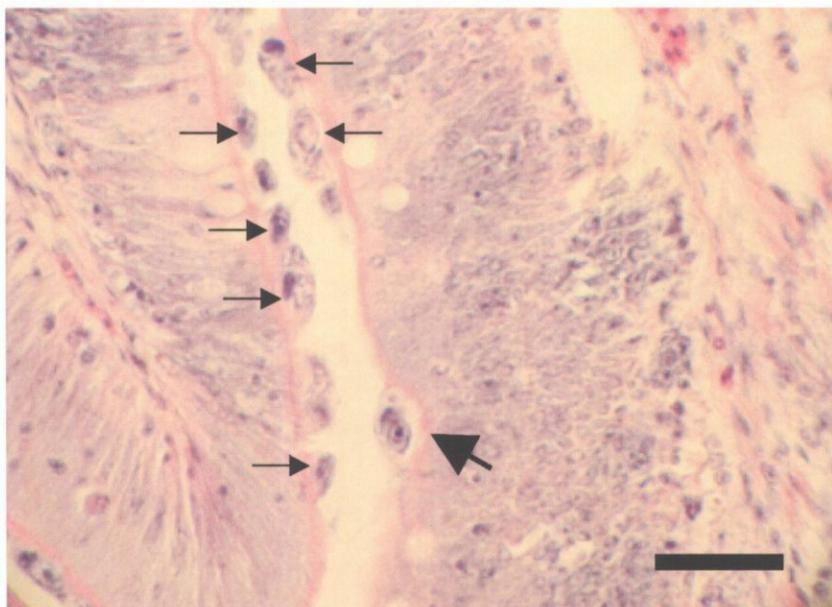


図 4-10 *Enteromyxum fugu* 感染トラフグの腸管組織。 *E. fugu* (小矢印) は腸管の上皮組織表面に付着して寄生している。寄生により引き起こされたと考えられる上皮のくぼみ (大矢印) 以外に病変は見られない。H-E 染色。スケールバーは 50 μm 。

では試験期間を通じてみられなかったが、20℃、25℃区共に26日目に最も多く見られた。

実験2

試験期間中に全ての水槽で、試験魚同士の噛み合いやスレによるものと考えられる死亡魚が見られた。しかし、それらの死亡魚は粘液胞子虫性やせ病の典型的な外観症状を呈していなかったため、やせ病による死亡魚とは見分けることが可能であった。各区の総死亡数は、対照区で10尾、15℃区で1尾、途中昇温区で4尾、20℃区で8尾であり、そのうち発症していた個体は対照区、15℃区で0尾、途中昇温区で3尾、20℃区で8尾であった。

途中昇温区における水温の推移は図4-1の通りである。*E. leei*の寄生は対照区と15℃区においては試験期間を通じて確認されなかった。途中昇温区では、経口投与21日後、すなわち水温を20℃に昇温する前に採材した時には*E. leei*の寄生が確認されなかったが、昇温後の42日目に1個体の腸前部で、63日目には3個体で寄生が確認された。20℃区では経口投与後6週目に寄生が確認されたが、死亡した個体が出たために9週目の採材時には1尾しか採材できず、その個体から*E. leei*は検出されなかった(表4-1)。一方の*E. fugu*は、経口投与後3週目以降に対照区を除く全ての試験区において検出された(表4-1)。

20℃区では、感染魚の腸管の経口投与後38日目に初めてやせ症状を呈して死亡した個体が観察され、それ以降試験終了時まで死亡が続き、累積発症個体数は8尾であった(図4-12)。また途中昇温区では、経口投与後59日目に初めてやせ症状を呈して死亡した個体が観察され、死亡は試験終了時まで続き、累積発症個体数は3尾であった(図4-12)。一方、15℃区と対照区においては、試験期間を通じてやせ症状を呈する個体は見られなかった。

実験3

途中昇温区における水温の推移は図4-2の通りである。*E. leei*の寄生は、対照区では試験期間を通じて確認されなかった。20℃区では経口投与後42日目と84日目ともに寄生が確認され、寄生率はそれぞれ80%(10尾中8尾)と78%(9尾中7尾)であった(表4-2)。さ

表 4-1 実験 2 における *Enteromyxum leei* と *Enteromyxum fugu* の寄生率の推移。

経口投与後 経過日数	対照区		15℃区		途中昇温区		20℃区	
	<i>E. fugu</i>	<i>E. leei</i>						
21	0/10*	0/10	7/10	0/10	8/10	0/10	8/10	0/10
42	0/10	0/10	9/10	0/10	8/10	1/10	9/10	1/10
63	0/9	0/10	6/10	0/10	9/9	3/9	1/1	0/1

*陽性個体数/試験個体数

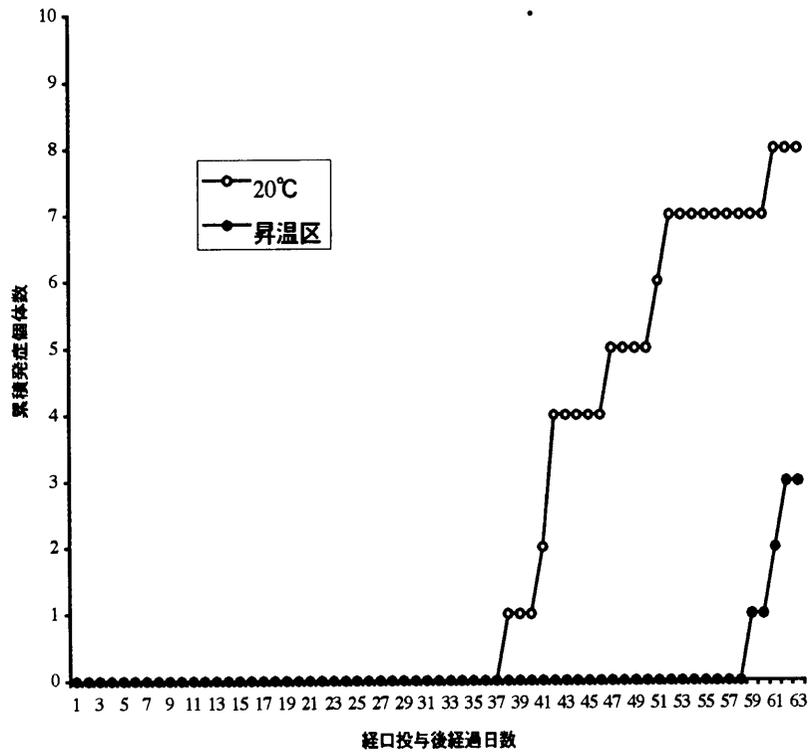


図 4-12 実験 2 の 20°C 区と昇温区における累積発症個体数。

表 4-2 実験 3 における *Enteromyxum leei* と *Enteromyxum fugu* の寄生率の推移。

経口投与 後経過日 数	対照区			20℃区			途中昇温区			10℃区		
	平均体重 (g)	<i>E. fugu</i>	<i>E. leei</i>									
42	208.5	0/10*	0/10	182.0	10/10	8/10	211.4	10/10	0/10	200.9	7/10	0/10
84	240	0/8	0/8	178.7	9/9	7/9	179.5	7/7	2/7	196.5	9/9	1/9

*陽性個体数/試験個体数

らに、経口投与後 59 日目に 1 個体が発症して死亡した。途中昇温区では、水温を 20℃に昇温する前の経口投与後 42 日目には検出されなかったが、昇温後の 84 日目には 29% (7 尾中 2 尾) で寄生が確認された。10℃区では、42 日目には検出されなかったが、84 日目に 9 尾中 1 個体で寄生が確認された (表 4-2)。途中昇温区、10℃区ともに発症個体はみられなかった。一方の *E. fugu* は、全ての実験区において高い寄生率 (70-100%) で検出された。

考察

実験 1 において、*E. fugu* がいずれの水温区でも高い寄生率で検出された一方で、*E. leei* は 15℃区では試験期間 (33 日) を通じて感染が確認されなかった。この結果は、二通りに解釈できる。一つは、*E. leei* が水温 15℃で死滅するという解釈であり、もう一方は、低水温によって発育・増殖が抑えられており、試験期間中に顕微鏡観察で検出できる程度の寄生強度に達しなかったという考え方である。*E. leei* が低水温で死滅するかどうかは、養殖現場における本寄生虫の伝播を考える上で大きな意味を持つ。もし *E. leei* が水温 15℃で生き延びることができないのであれば、冬の低水温期に 15℃を下回る漁場ではトラフグ間での感染環が途切れることになる。逆に、15℃でもトラフグ体内で生き残るのであれば、寄生虫を保持した越年魚 (1 歳魚) が漁場に残り、感染環は途絶えない。そこで実験 2 では、*E. leei* が 15℃で死滅するかどうかを検証するため、20℃で感染させてから一度 15℃まで水温を下げ、2 週間飼育し、再び 20℃に水温を上昇させる実験区を設けた。その結果、15℃の期間に行ったサンプリングでは *E. leei* は検出されなかったが、20℃に昇温すると寄生が確認されるようになり、発症して死亡する個体もみられた。これにより、*E. leei* は水温 15℃では発育・増殖が抑えられているだけで、死滅するわけではないことが示された。しかし、トラフグ養殖は福井県のように年間の最低水温が 10℃を下回る水域でも行われており、15℃より低い水温が与える影響を調べる必要があると考えられた。そこで実験 3 では、20℃で感染させた後に飼育水温を 10℃まで下げて 21 日間飼育し、再び 20℃に水温を上昇させる実験区を設けた。その結果、水温が 10℃の期間に行ったサンプリングでは *E. leei* は検出されなかつ

たが、20℃に昇温した後のサンプリングでは寄生が確認された。さらに、10℃区で74日目に9尾中1尾から *E. leei* が検出された。以上の結果から、*E. leei* のトラフグ体内での発育・増殖は低水温によって抑制されるものの、水温10℃であってもトラフグ体内で生き残ることが証明され、寄生虫を保持した越冬魚が翌年の感染源となることが示された。このことは、トラフグ養殖場における本疾病の伝播様式を推測する上で非常に重要である。なぜなら、一般にトラフグは春から初夏にかけて種苗を導入して翌年の冬に出荷する形態を取り、同一漁場内に1歳魚（越冬魚）と0歳魚が混在する時期が生じるが、ここで1歳魚から0歳魚への伝播が成立すれば、その漁場ではトラフグだけを介しても漁場に定着すると考えられるからである。本疾病への対策を講ずる上でも、このような伝播経路については十分に検討しなければならない。

本疾病の発症については、養殖場における発症が低水温期に小康状態になる（鮫島 1999）という観察結果があるが、本研究により、それは本疾病の原因である *E. leei* の発育が低水温で抑えられるためであると考えられた。実験2では、途中昇温区（15℃から20℃）で発症個体が観察され始めた時期（経口投与59日後）が、20℃区（経口投与38日後）より3週間遅く、低水温によって発症が抑えられることが実験的に証明された。同様の例は、ターゲットの腸管に寄生する粘液胞子虫 *Enteromyxum scophthalmi* においても報告されている（Redondo *et al.* 2002）。*E. scophthalmi* について同居感染実験を行ったところ、18℃で飼育した群では試験開始後42日目から死亡が観察されるようになり、66日目には累積死亡率が86.6%に達した。しかしながら、自然水温（12–14℃）で飼育したところ、*E. scophthalmi* の寄生は確認されたものの、試験期間を通じて死亡は起きなかった（Redondo *et al.* 2002）。また、Ferguson（1981）は、軟胞子虫綱に属するミクソゾア *Tetracapsuloides bryosalmonae* (=PKX) がニジマス（*Oncorhynchus mykiss*）に寄生することによって起こる増殖性腎臓病（PKD）について、水温が与える影響について報告している。PKDに罹患したニジマスを経験室から実験室に移して16℃で約3ヶ月飼育したところ、14尾中10尾にPKDの発症が見られたが、養殖場において自然水温（採材時は0–1℃）で維持した同群のニジマスは発症しなかった。

このように、低水温がミクソゾアの魚体内での発育・増殖を抑制することは知られているが、*E. leei* については本研究が初めての報告である。

本研究では、水温以外にも本疾病の発症に影響を与える要因があることが示唆された。実験 2 において、20℃区で発症個体がみられ始めたのは経口投与 38 日後であり、途中昇温区では 59 日後（昇温を始めてから 37 日目で、20℃に達してから 30 日目）であった。これらの結果から、本疾病が発症するまでには水温 20℃で感染後約 5-6 週間を要すると考えられた。しかし、実験 3 では 12 週間の試験期間を設定したにもかかわらず、20℃区で経口投与後 59 日目に 1 尾発症しただけであった。なお、実験 1 と実験 2 で用いた供試魚の平均体重に大きな差はなく（207.7g と 164.9 g）、また飼育密度もあまり変わらなかった（0.38 kg/m³ と 0.33 kg/m³）。このように発症時期が実験によって異なった原因は明らかではないが、実験 2 では実験魚同士の噛み合いが多く観察されたことから、こうしたストレスが発症の引き金となったのかもしれない。また、本研究で用いた感染法では定量的に病原体を投与することが出来ないため、実験によって異なる寄生強度が、結果に影響を及ぼした可能性も否定できない。いずれにせよ、ストレスを与えずに飼育したり、放養密度を下げることで漁場中の虫体の絶対数を減らしたりする等の工夫によって、発症を抑えたり遅らせたりすることが出来れば、被害の軽減につながるだろう。今後は、水温や飼育密度、他の疾病との複合感染などの要因が発症に及ぼす影響も含めて、本疾病の発症機構を研究する必要があると考える。

実験 1 において、*E. fugu* が比較的速やかに腸の全体に拡散したのに対して、*E. leei* は腸前部から腸後部へ段階的に移行していった。これは、両者の寄生部位の違いに起因すると考えられる。*E. fugu* は腸管上皮の表面に付着して発育するため、管腔内を移動して速やかに腸管後部にまで感染が広がりやすいと考えられる。一方の *E. leei* は、腸管上皮組織内に寄生するため、分裂増殖にともなって上皮組織内を徐々に移動するか、いったん管腔内に脱落してから再び侵入するという方法で感染域を広げていると思われる。消化管の前部から後部へ感染が広がる現象は、*E. scopthalmi* についても確認されており、組織学的観察により、寄生虫の伝播は管腔内への脱落後の再侵入と、上皮組織下の結合組織内にある血管を通して行

われるとされた (Redondo *et al.* 2004)。さらに、*E. scopthalmi* は、消化管以外にも心臓、造血器官、筋肉、鰓などから観察され、魚体内での寄生虫の伝播に血管系が大きな役割を果たすことが示唆されている (Redondo *et al.* 2004)。*E. leei* についてはこのような血液中ステージは見つかっていないが、重篤感染トラフグの消化管以外の組織 (心臓、脾臓、腎臓、肝臓、鰓) から PCR で陽性反応が出た例があることから (本研究、未発表データ)、トラフグ内での *E. leei* の伝播も *E. scopthalmi* と同様な過程を経るかもしれない。粘液胞子虫の中で最も詳細に生活環が研究されている *Myxobolus cerebralis* では、SSU rRNA 遺伝子情報に基づいた *in situ* hybridization (ISH) 法を用いた検出法が開発されており、宿主内での感染初期ステージの検出に成功している (Antonio *et al.* 1998; 1999)。*E. leei* についても、ISH 法を利用することで、消化管以外の組織での発育ステージや感染初期の虫体を検出できるようになるだろう。

もし、腸前部から腸後部への *E. leei* の移動が一方向的であるならば、新たな経口感染の起きない条件下では寄生虫が腸管を通りすぎて治癒する可能性も考えられる。実際に、実験 1 では、20℃区と 25℃区ともに、時間経過に伴って *E. leei* の腸前部における寄生率が減少した。この現象は、トラフグが *E. leei* に対して獲得免疫を有するかという問題とも関連して、非常に興味深い。Sitjà-Bobadilla *et al.* (2004) は、*E. scopthalmi* の流行を生き延びたターボットの血漿中から抗 *E. scopthalmi* 抗体を発見し、ターボットが *E. scopthalmi* に対して獲得免疫を持つことを示唆している。トラフグについても、*E. leei* ないしは *L. fugu* に対して獲得免疫を有するかどうか、研究を行う必要があると考える。

第二節 海水中における *Enteromyxum leei* の栄養体の感染力

材料と方法

供試魚は、熊本県水産研究センターで孵化した粘液胞子虫無感染のトラフグ 0 才魚 120 尾 (平均体重 30.2 g) を用い、試験開始まで 2 t の円形水槽で飼育した。感染方法としては、

虫体を水槽内に投与する浸漬法を用いた。まず、*E. fugu* と *E. leei* の感染魚として維持されていたトラフグ 8 尾（平均体重 201.3 g）を解剖し、腸管の上皮組織を滅菌済み剃刀でこそぎ取ったものを滅菌海水に懸濁した。1500 rpm、10 分の遠心分離による洗浄を二回繰り返し、最終的に 5 L の滅菌海水に再懸濁した。この懸濁液を 20℃で 0～48 時間静置してから浸漬実験に用いた。100 L の感染用水槽を設け、静置 0 時間（懸濁液調整直後）、6 時間、12 時間、24 時間、48 時間後に懸濁液 1 L を抜き取り、海水と混合して 100 L の浸漬液を作製した。浸漬液の水温は実験開始時の自然水温（27.2℃）とした。そこに 20 尾の供試魚を移し、エアレーションをしながら 6 時間浸漬した。浸漬後は各区 2 基の 500 L 水槽に 10 尾ずつ分槽した。また、供試魚のうち浸漬を行わなかった 20 尾を、1 t の円形水槽に移し陰性対照区とした。試験期間中は砂濾過海水を飼育水として用いた。また、試験期間中は毎日魚体重あたり約 0.5% の配合飼料を与えて飼育した。試験期間中の飼育水温は $26.8 \pm 4^\circ\text{C}$ であった。浸漬 3 週間後に全ての魚を採材し、体長と体重を測定してから解剖して腸管を採取した。それぞれの腸管からスタンプ標本と 80% エタノール固定標本を作製し、スタンプ標本の顕微鏡観察と Lethal PCR 検出法のいずれかで陽性であった個体を陽性として寄生率を求めた。試験区ごとに、2 基の水槽間で寄生率に差があるかどうかを Fisher's exact test により統計的に検定した。

結果

試験期間中に、48 時間区を除く全ての実験区で、試験魚同士の噛み合いやスレによるものと考えられる死亡魚がみられた。それらの死亡魚は粘液胞子虫性やせ病の典型的な外観症状を呈していなかった。全ての試験区において 2 基の水槽間で *E. leei*、*E. fugu* ともに寄生率に統計的な差がなかったため、水槽 2 基分を一つにまとめて表した。*E. leei* は、静置 0 時間、6 時間および 24 時間の区で感染が確認され、寄生率はそれぞれ 15.8% (3/19)、11.1% (2/18) および 23.5% (4/17) であったが、12 時間と 48 時間の区では感染は確認されなかった（表 4-3）。*E. fugu* は、静置 0 時間から 48 時間までの全ての実験区（0、6、12、24、48 時間）で

表 4-3 0~48 時間静置した *Enteromyxum leei* と *Enteromyxum fugu* の海水懸濁液を用いた浸漬実験。

放置時間 (時間)	<i>E. leei</i>	<i>E. fugu</i>
0	3/19*	1/19
6	2/18	1/18
12	0/17	1/17
24	4/17	1/17
48	0/20	1/20

*陽性個体数/試験個体数

検出されたが、寄生率は低く、いずれも 5%程度であった（表 43）。なお、陰性対照区では *E. leei*、*E. fugu* とともに感染は確認されなかった。

考察

魚体外における粘液胞子虫の寿命については、これまでに報告されたほとんどが胞子に関するものであった。例を挙げると、*Myxobolus cerebralis* 粘液胞子の寿命は 13°C で 5 ヶ月間 (El-Matbouli & Hoffmann 1991)、*Myxobolus artus* 粘液胞子は 25°C で 15 ヶ月間 (Yokoyama *et al.* 1997) だったのに対し、*M. cerebralis* の放線胞子は 12.5°C で 3-4 日間 (Markiw 1992)、*Myxobolus cultus* の放線胞子は 20°C で 7 日間しか生存 (Yokoyama *et al.* 1993) しなかったとされ、一般的に粘液胞子の方が寿命は長い。一方、栄養体に関しては、*E. scophthalmi* が海水中で 1 日は生存することが *in vitro* の培養実験で証明されているが、この栄養体が感染力を持っていたかは明らかにされていない (Redondo *et al.* 2003)。本研究では、*E. leei* の栄養体が海水中で 1 日は感染力を維持することが明らかになり、養殖場では虫体が感染力を残したまま広範囲に拡散していることが示唆された。栄養体は直径 10~20 μm 程の多細胞体であり、繊毛や鞭毛などの運動器官を持たないため、養殖場での拡散は海水の動きによる受動的なものと思われる。栄養体の海水中での沈降速度が不明であるため、1 日でどの程度拡散するかを積算することは出来ないが、潮通しの良さや潮流の向きによって大きく異なることは容易に想像が付き、魚類寄生虫が養殖場内でどのように拡散するかについては、ブリ類の体表に寄生する単生虫 *Benedenia seriolae* に関する研究がある (Chambers & Ernst 2005)。彼らは、*B. seriolae* 感染魚が飼育されている網生け簀から、漁場を流れている潮流に垂直な方向と平行な方向のそれぞれに一定距離 (250 m、500 m、1 km) 離れた 3 調査点を設定し、プランクトンネットによる虫卵の採集を行った。その結果、虫卵は潮流を横切って拡散することはなかった。さらに、同様の調査地点に無感染供試魚が入ったかごを垂下することにより、感染の拡散を調べた結果、虫卵の場合とは異なり、感潮流に垂直な方向に設置した調査地点でも感染は起こった。その原因は、虫卵から孵化した *B. seriolae* の幼生が遊泳能力を持つためと考えられ

た (Chambers & Ernst 2005)。 *E. leei* は、前述したように遊泳能力を持たないと思われるため、 *B. seriolae* の虫卵と同様に潮流に乗って漁場内を拡散していくと推察される。日本のトラフグ養殖は、潮の満ち引きによって潮流が複雑に変化する内海の入り江などで行われることが多いが、 *E. leei* による感染被害を軽減するためには、可能な限り潮流を考慮して養殖生け簀を設置することも重要である。

従来、 *E. leei* の感染実験に用いられてきた感染法は、経口投与方法、同居法および排水曝露法であるが、いずれの方法にしても虫体を定量的に扱うことができなかった。その点、寄生虫懸濁液を用いた浸漬法は、定量性が期待できる。しかし、本研究で用いた感染源には *E. leei* と *E. fugu* が混合感染しており、ウエットマウントでそれぞれの虫体を識別することは困難であるため、懸濁液中の虫体数は明らかにできなかった。それ故、静置 0 時間後の実験区で *E. leei* と *E. fugu* の寄生率が低かった (15.8%と 5.3%) 理由が、浸漬時間が短かった (6 時間) ためなのか、それとも曝露した虫体数が少なかったためなのかは不明である。今後、本疾病に対する予防試験や治療試験を行う上では、個体間での寄生強度のばらつきを減らし、高い寄生率で感染させることができる感染実験系が望まれる。本実験で用いた浸漬法を改良して、定量的な感染方法を確立させることが今後の課題として残された。

低い寄生率という本実験の結果に基づいて、養殖場での感染も起こりにくいと考えるのは早計である。なぜなら、本実験で供試魚を虫体懸濁液に浸漬したのは 6 時間のみであるのに対し、養殖場では感染魚から継続的に放出される新鮮な栄養体に曝露され続けていると考えられるからである。実際にどの程度の離れた場所まで *E. leei* が伝播するかを明らかにするには、前述した Chambers & Ernst (2005) が行ったような養殖場での感染実験が有効であろう。

第三節 トラフグからマダイへの *Enteromyxum leei* の感染実験

材料と方法

E. leei の感染源としては、熊本県水産研究センターの陸上水槽で感染魚として維持されていたトラフグ 15 尾（平均体重 240 g）を用いた。試験開始直前に、Non-lethal PCR 法を用いて粘液胞子虫の寄生率を調べたところ、*E. leei* が 60% (9/15) で、*E. fugu* が 67% (10/15) であった。供試魚として、熊本県内の種苗生産業者から購入した粘液胞子虫無感染のマダイ 45 尾（平均体重 120 g）を用いた。感染方法としては、感染トラフグとの同居飼育による同居法と感染トラフグの飼育排水中で飼育する排水曝露法を用いた。同居法では、感染トラフグ 15 尾が飼育されている 2.5 t の角形水槽に縦横 150 cm×深さ 80 cm の網かごを浮かべ、その中でマダイ 15 尾を飼育した。排水曝露法では、前述の飼育水槽からの排水を導入した 1.0 t の円形水槽でマダイ 15 尾を飼育した。また、陰性対照区として、供試魚のうち 15 尾を、1 t の円形水槽に移して濾過海水で飼育した。試験開始後 42 日目と 70 日目に採材し、体長と体重を測定してから解剖して腸管を採取した。飼育水温は 21℃に設定した。それぞれの腸管からスタンプ標本と 80%エタノール固定標本を作製し、スタンプ標本の顕微鏡観察と PCR 法のいずれかで陽性であった個体を陽性として寄生率を求めた。

結果

E. leei は、同居法と排水曝露法のいずれにおいてもマダイへの感染が成立し、その寄生率は試験開始後 70 日目でそれぞれ 43% (3/7) と 25% (2/8) であった (表 4.4)。一方の *E. fugu* は、試験開始 70 日後においても寄生が確認されなかった。なお、陰性対照区では *E. leei*、*E. fugu* ともに感染は確認されなかった。また、試験期間を通じて粘液胞子虫性やせ病の発症は確認されなかった。

表 4-4 トラフグからマダイへの経水感染実験における *Enteromyxum leei* と *Enteromyxum fugu* の寄生率の推移。

経口投与後 経過日数	対照区			同居区			排水曝露区		
	平均体重 (g)	<i>E. fugu</i>	<i>E. leei</i>	平均体重 (g)	<i>E. fugu</i>	<i>E. leei</i>	平均体重 (g)	<i>E. fugu</i>	<i>E. leei</i>
42	109.7	0/6*	0/6	134.9	0/6	0/6	140.3	0/6	0/6
70	116.1	0/8	0/8	136.1	0/7	3/7	137.9	0/8	2/8

*陽性個体数/試験個体数

考察

本実験では、*E. leei* がトラフグからマダイへ経水的に感染することが実験的に証明され、養殖場においてトラフグとマダイという異なる魚種間で本疾病が伝播する可能性が示された。マダイは、しばしばトラフグと隣接した生け簀で飼育されるため、実際にこのような伝播が起きていることは十分に考え得る。しかし、今のところマダイでの発生報告は少ない。この理由の一つとしては、マダイにも本疾病が発生するという認識がなく、また診断法も確立されていなかったため、単に見過ごされていたということが考えられる。現状を明らかにするためにも、今後はマダイを対象とした調査を進めていくことが必要である。マダイでの発生報告が少ないもう一つの理由としては、魚種間での感受性の違いが考えられる。なお、ここでの感受性の違いとは、感染しやすさ、魚体内での寄生虫の発育・増殖速度および発症しやすさの違い全てを含んだものである。Hedrick *et al.* (1999a) は、サケ科魚類の旋回病を引き起こす *Myxobolus cerebralis* について、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) に比べてブラントラウト (*Salmo trutta*) は感受性が低く、ニジマスと同程度の寄生率を示しながらも、発症率が低いことを感染実験で証明した。また、サケ科魚類の腸管寄生粘液胞子虫である *Ceratomyxa shasta* についても、異なる魚種間、あるいは同一種内の系統間で感受性が違うことが知られている (Bartholomew 1998)。*E. leei* については、このような感受性の違いは報告されていない。本研究では供試魚にマダイのみを用いたために、トラフグとの比較を行うことが出来なかったが、同時にトラフグも供試魚として用いていれば、感受性の違いについての知見が得られたかもしれない。

本実験で感染源として用いたトラフグには *E. fugu* も感染していたにもかかわらず、同居法と排水曝露法のいずれにおいてもマダイには感染しなかった。また、本研究の第一章第二節で検査した養殖マダイ (自然感染魚) から *E. fugu* は検出されなかった。これらの結果は、マダイは *E. fugu* に感染しないことを示唆する。しかし、第二章第一節では、感染トラフグの腸管を実験的に投与したマダイから *E. fugu* が検出されている。このような結果の食い違いが何に起因しているかは明らかではないが、感染トラフグの腸管をマダイが摂取する

という現象は自然環境ではほとんど起こりえないと考えられることから、マダイに *E. fugu* が感染した第二章第一節の結果は異常なものかもしれない。いずれにせよ、マダイを供試魚として用いた経水的感染実験で *E. leei* 単独感染魚を作製できれば、*E. leei* 単独の感染実験を行うことが可能になる。単独感染実験が可能になれば、前節（本章第二節）で述べたような定量的な浸漬感染法を実現できるかもしれない。

第四節 *Leptotheca fugu* の実験感染

材料と方法

魚

Leptotheca fugu の感染源としては、熊本県御所浦町で養殖されていたトラフグ 12 尾（平均体長 21.9 ± 2.7 cm、平均体重 265.7 ± 81.9 g）を用いた。実験直前に粘液胞子虫寄生率を腸管塗抹標本で調べたところ、*L. fugu* が 67% (8/12)、*Enteromyxum fugu* が 25% (3/12) であった。粘液胞子虫未感染の供試魚としては、熊本県水産研究センター内で飼育した群を用いた。実験に供試する前に 10 個体を抜き出して測定した平均体長は 14.2 ± 1.4 cm、平均体重は 59.1 ± 9.1 g であり、いずれの個体も粘液胞子虫に無感染であることが確認された。試験期間中は、砂濾過海水を、更に 100 μ m、50 μ m、10 μ m の目合いのカートリッジフィルターで順次三段階に濾過して飼育水として用いた。また試験期間中は毎日魚体重あたり約 0.5% の配合飼料を与えて飼育した。

感染法

感染魚の腸管を縦に切り開いた後、濾過海水で軽く洗浄して約 1 cm 角の小片に刻んだ。これを *Leptotheca fugu* の感染源とし、1 t の円形水槽に収容されている 20 尾の供試魚に投与した。経口投与は 3 日間連続で行い、1 日あたりの投与量は感染魚 4 尾分であった。また供

試魚のうち感染魚の腸管を摂餌させなかった 30 尾を同様に 1 t の円形水槽に移し陰性対照区とした。経口投与時を含めて、試験期間を通じて水温は 25°C に維持した。

採材

経口投与 7 日後、21 日後および 35 日後に採材を行った。なお、試験期間中に噛み合いによる死亡が起きたため 21 日目、35 日目のサンプル数はいずれも 7 尾とした。体長および体重を測定してから解剖して腸管を採取した。それぞれの腸管について腸管内壁の塗抹標本作製するとともに、組織切片作製用に Bouin 液による固定標本作製した。なお、塗抹標本と組織切片用の腸管は、腸前部（腸管前端～胆管開口部）、腸中部（胆管開口部と直腸前端との間の中間部分）、腸後部（直腸前端までの 5 cm 程）の 3 区域より採材した。塗抹標本は各区域について Diff-Quik 染色して光学顕微鏡で観察した。組織切片は常法に従って作製し、Uvitex 2B-H&E 染色して光学顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察した（Yokoyama *et al.* 1996）。寄生率は、腸管の前部、中部、後部のスタンプ標本および組織切片上で一カ所でも寄生体が観察されたらその個体は陽性と判定して求めた。

結果

試験区において、*Enteromyxum fugu* は経口投与後 7 日目以降に寄生が確認され 21 日目以降に寄生率が 100% に達したが、*Leptotheca fugu* の寄生は試験期間を通じて確認されなかった（表 4-5）。病理組織学的には *E. fugu* の寄生によるものと考えられる軽微な病変のみが確認され、試験期間を通じてやせ病を発症した個体は見られなかった。なお、対照区においては *E. fugu*、*L. fugu* 共に寄生は確認されなかった。

考察

本章では、*L. fugu* と *E. fugu* の混合感染魚の腸管を未感染魚に経口投与することで *L. fugu* の実験感染を試みた。しかしながら、試験期間を通じて *L. fugu* の感染は確認されなかった。

表 4-5 腸管経口投与実験における *Leptotheca fugu* と *Enteromyxum fugu* の寄生率の推移。

経口投与後経過週	対照区			実験区		
	平均体重 (g)	<i>E. fugu</i>	<i>L. fugu</i>	平均体重 (g)	<i>E. fugu</i>	<i>L. fugu</i>
1	70.8	0/10*	0/10	66.1	8/10	0/10
3	90.2	0/10	0/10	91.6	7/7	0/7
5	110.6	0/9	0/9	118.8	7/7	0/7

*陽性個体数/試験個体数

感染魚腸管には *L. fugu* だけでなく *E. fugu* も感染しており、その寄生率 (3/12) は *L. fugu* の寄生率 (8/12) より低かったが、*E. fugu* は未感染魚へ伝播した。本実験では飼育水温 25°C の試験区しか設けていないが、養殖現場では、夏場の高水温時にも *L. fugu* の寄生による粘液胞子虫性やせ病の発生は報告されている (熊本県 2001)。そのため、本実験における設定水温は、*L. fugu* の実験感染を行うに妥当なものであったと考える。さらに、同様の実験が宮崎県水産試験場 (2002) により行われており、感染魚の腸管を未感染魚に経口投与して自然水温 (18–25°C) で約 4 ヶ月飼育したが、やはり、*L. fugu* の感染は成立しなかった。これらの結果から、*L. fugu* は、*E. fugu* や *E. leei* とは異なり、魚から魚へ直接伝播せず交互宿主を介して放線胞子虫ステージに変態して初めて魚へ感染すると考えられた。

第四章のまとめ

本章では、粘液胞子虫性やせ病の原因寄生虫である *E. leei* と *L. fugu* の感染環および生物学的特性を検討するために、種々の感染実験を行った。第一節では、*E. leei* は、低水温によってその発育・増殖が抑制されるものの、10°C でもトラフグ体内で生き残ることが実験的に証明された。第二節では、*E. leei* の感染力が海水中で 24 時間は維持されることが明らかになったことで、養殖場では、虫体が感染力を残したまま広範囲に拡散していることが示唆された。第三節では、*E. leei* がトラフグからマダイへ経水的に伝播することが実験的に確かめられたことにより、養殖場においてトラフグとマダイという異なる魚種間で本疾病が伝播する可能性が示された。第四節では、*L. fugu* の感染実験を試みたが、人為感染が成立しなかったことから、*L. fugu* は魚から魚へ直接伝播せず、感染環を完結するためには交互宿主が必要であると推察された。このように本章では、感染実験の結果に基づいて、養殖場における本疾病の伝播経路の一端が推定された。そこで第四章では、養殖場で実際に起こっている現象をとらえるために、本研究で新しく開発した診断法を用いて疫学調査を行った。

第五章 養殖場における腸管寄生粘液胞子虫の寄生動態

序

感染症の制御には、病気の発生および病原体の分布調査を行うことが不可欠である。なぜなら、季節性や地域性の有無によって、その疾病への対策が大きく異なるからである。例えば、養殖トラフグにも被害を及ぼす単生類 *Neobenedenia girellae* は、虫卵が 15°C以下で孵化しないことから、高水温に適応した種と考えられており (Bonndad-Reantaso *et al.* 1995)、養殖場でも低水温期には寄生がみられなくなる (小川 2004)。すなわち、低水温期には本寄生虫症への対策を講じなくても良いということである。一方、トラフグの鰓および鰓腔壁に寄生する *Heterobothrium okamotoi* は周年寄生がみられるため、年間を通じて対策を行う必要がある。また、地域性については、多殻目粘液胞子虫 *Kudoa amamiensis* による奄美クドア症の発生域が限定的であることが、沖縄県で行われた疫学調査によって明らかにされている (Sugiyama *et al.* 1999)。それでは、粘液胞子虫性やせ病についてはどうだろうか。本疾病の発生が九州のトラフグ養殖場で発生し始めたのは 1996 年とされている (Tin Tun *et al.* 2000)。それから 10 年が経過し、現在では四国地方でも本疾病の発生の報告があり (黒原 2005)、感染域の地理的分布は広がっていると思われる。しかし、これまでは信頼性が高く簡便な診断法がなかったために、全国的な分布調査が行われておらず、それゆえ、本疾病の発生における季節性や地域性に関する知見は少ない。そこで本章では、本研究で開発した PCR 法を用いてトラフグ養殖場での疫学調査を行った。また、養殖場付近に生息する天然魚についても調査した。

第一節 腸管寄生粘液胞子虫の寄生率の季節変動

材料と方法

調査における諸条件を表 5-1 に示す。調査地点として、福井県、長崎県、熊本県および大

表 5-1 トラフグの腸管寄生粘液胞子虫の定期調査を行った調査対象群に関する情報。

調査地点	調査期間	調査日の間隔	検査尾数	検査法	検査対象魚
福井	2004.6 - 2005.8	隔月	20	Lethal-PCR	2004年度種苗（県外産）
長崎	2004.7 - 2005.2	毎月	20	Non-lethal PCR	中間種苗（中国由来）
熊本	2004.12 - 2005.11	毎月	20	Non-lethal PCR	2004年度種苗
大分	2004.12 - 2005.8	隔月	20	Non-lethal PCR	2004年度種苗（県外産）

分県のトラフグ養殖場から 1 生け簀ずつ選定した。なお、各県における調査地点の詳細は、経営体を含む各協力機関の意向により、公表することはできない。それぞれの調査点について、毎月（熊本と長崎）あるいは隔月（大分と福井）20 尾ずつを採材し、腸管寄生粘液胞子虫の寄生率を調査した。調査期間は以下の通りである。福井：2004 年 6 月の種苗導入時から 2005 年 8 月まで。長崎：2004 年 7 月の中間魚（中国産 1 才魚）導入時から 2005 年 2 月まで。熊本：2004 年 12 月から 2005 年 11 月まで。大分：2004 年 12 月から 2005 年 8 月まで。検査魚は、生け簀内の海面近くを遊泳している個体から無作為に採集したが、低水温期ならびに海面近くに魚が姿を見せないときには餌を播いて浮き上がってきたものの中から採材した。腸管寄生粘液胞子虫の検査は、長崎、熊本および大分については Non-lethal PCR 検出法によって行った。福井については、調査開始時の検体が 4.5 cm と小さかったため、Lethal PCR 検出法によって行った。寄生率（%）は、陽性個体数/試験個体数と定義して算出した。

結果

調査地点付近の水温の変動を図 5-1 に示す。なお、この水温は、本調査期間における実測値ではなく、日本海洋データセンターの統計データから引用した。福井と長崎における *Enteromyxum fugu* は、漁場にトラフグを導入した 2-3 ヶ月後に寄生が確認され始め、それ以降調査終了まで高い寄生率（80-100%）で推移した（図 5-2）。大分と熊本においては、調査期間を通じて高い寄生率（80-100%）で推移した（図 5-2）。*Enteromyxum leei* の寄生率は、長崎では 2004 年 11 月、大分では 2004 年 12 月、熊本では 2005 年 1 月にピーク（それぞれ 65%、100%、90%）を示し、この時期に調査地点では、本疾病の発症個体が多くみられた。その後、寄生率は低下し、熊本と大分では 2005 年 5 月から 6 月にかけて 0%になり、発症個体もみられなくなった。熊本と大分では、7 月以降に再び寄生率は上昇したが、熊本では 9 月に再び 0%になり、11 月も 10%と低かった（図 5-3）。福井では、種苗を導入した 2 ヶ月後の 2004 年 8 月に 15%の寄生率を示したが、10-12 月には 0%になり、2005 年 2 月以降も低い寄生率 5-30%）で推移した（図 5-3）。また、福井では、調査期間を通じて発症個体

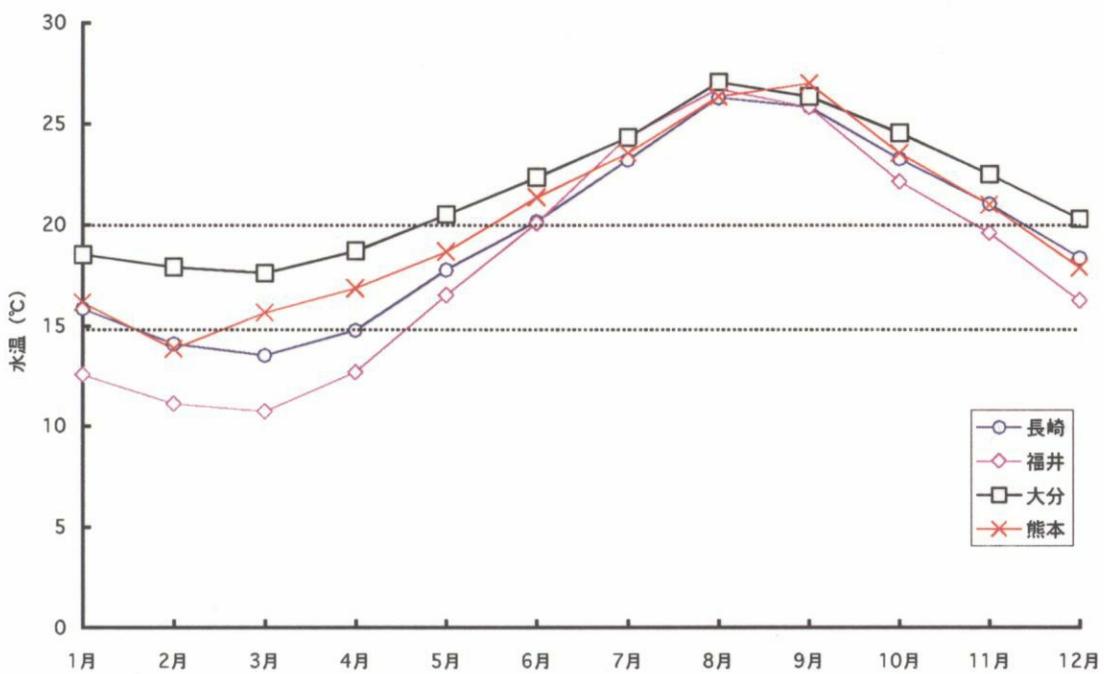


図 5-1 トラフグの腸管寄生粘液胞子虫の定期調査を行った調査地点付近の水温変動（海面下 0 m）。各月の平均水温をプロットした。元データは日本海洋データセンターの統計データ（1906 年から 2003 年までの統計値）による。

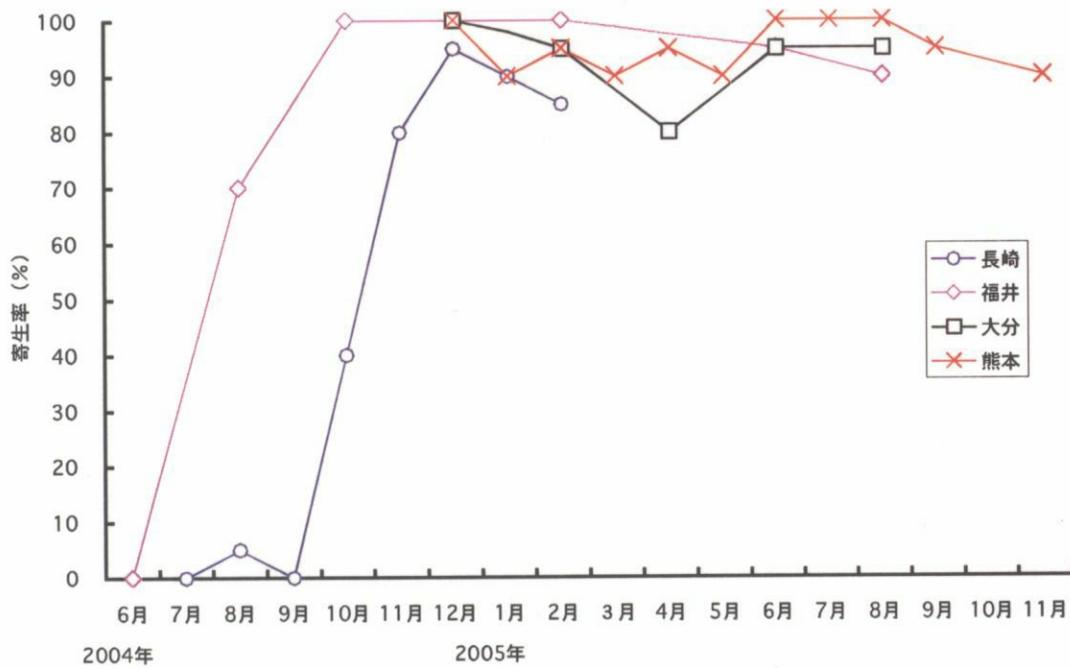


図 5-2 各調査地点における *Enteromyxum fugu* の寄生率の推移。

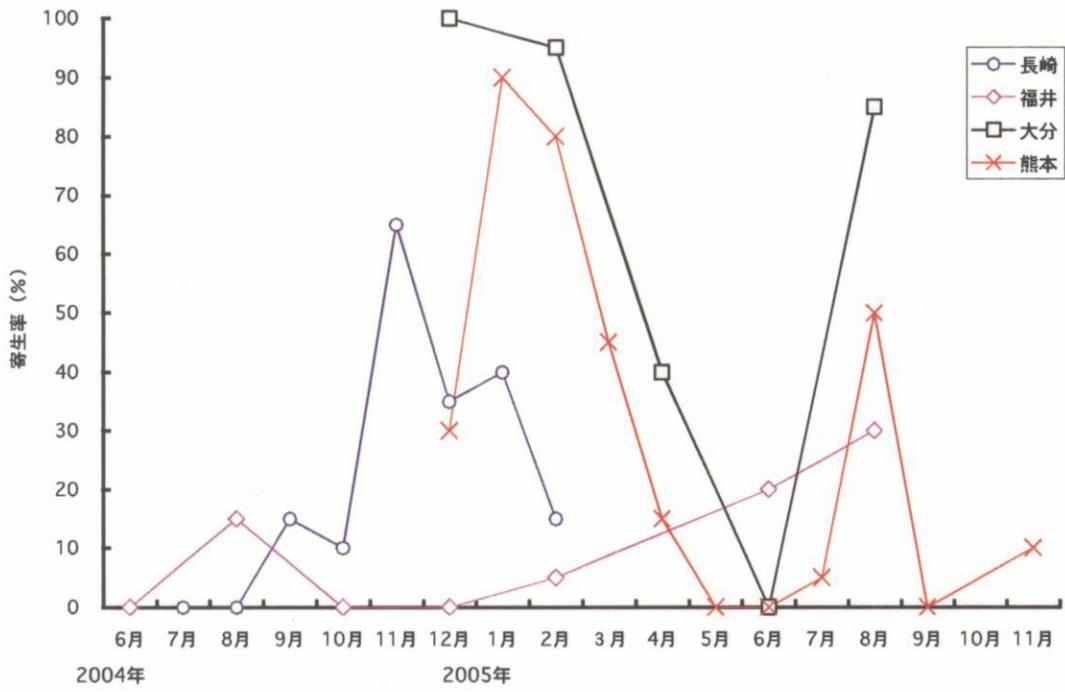


図 5-3 各調査地点における *Enteromyxum leei* の寄生率の推移。

はみられなかった。*Leptotheca fugu* は、長崎と福井でのみ寄生が確認された。長崎では、2004年12月から2005年2月にかけて高い寄生率（50-60%）を示した（図5-4）が、長崎の調査対象魚は2005年3月に全て出荷されてしまったため、ここで調査打ち切りとなった。一方、福井では種苗を導入した2004年6月に10%の寄生率を示した（図5-4）が、検査したトラフグは漁場に導入する前のものであった。すなわち、もともと種苗が *L. fugu* に感染していたということを意味する。その後、2004年10月に5%の寄生率を示したが、それ以降は調査期間を通じて検出されなかった（図5-4）。

考察

本研究では、新たに開発したPCR法を用いて、養殖場におけるトラフグ腸管寄生粘液胞子虫の寄生動態を調べた。調査対象としては、九州3県と、これまでに本疾病の報告例がない福井県を選定した。その結果、福井、長崎ともに導入1ヶ月後から *E. fugu* の寄生が確認され、その後全ての調査地点で通年高い寄生率を示した（図5-2）。これは、トラフグ体内での発育・増殖が水温に大きく影響されないという感染実験の結果とも良く一致する。なお、以上から、既に漁場で飼育されている他のトラフグ群から栄養体を介して感染した後に、一年を通じてトラフグ間での直接伝播が起こることにより、養殖場での *E. fugu* の寄生は、周年高率に維持されていると考えられる。ただし、交互宿主を介した感染環が存在する可能性は否定できず、放線胞子による感染も関与しているかもしれない。

E. leei の寄生率は、福井を除く九州3県では比較的似通った変動を示した（図5-3）。すなわち、12月から1月までは寄生率は上昇し、水温が20℃以下になり始めると、低下する。寄生率の低下は、水温が20℃以上になり始める5月から6月まで続く。その後の水温上昇とともに、再び寄生率は上昇するという傾向である。ただし、長崎は2月に調査打ち切りとなったために、3月以降の動向は分からない。同様の結果は、本研究以前の研究でも得られている。鮫島（2001）は、1999年度と2000年度の種苗（0才魚）について熊本県の御所浦地域で定期調査を行った結果、*E. leei* の寄生は、種苗導入した年の11月から翌1月にかけて

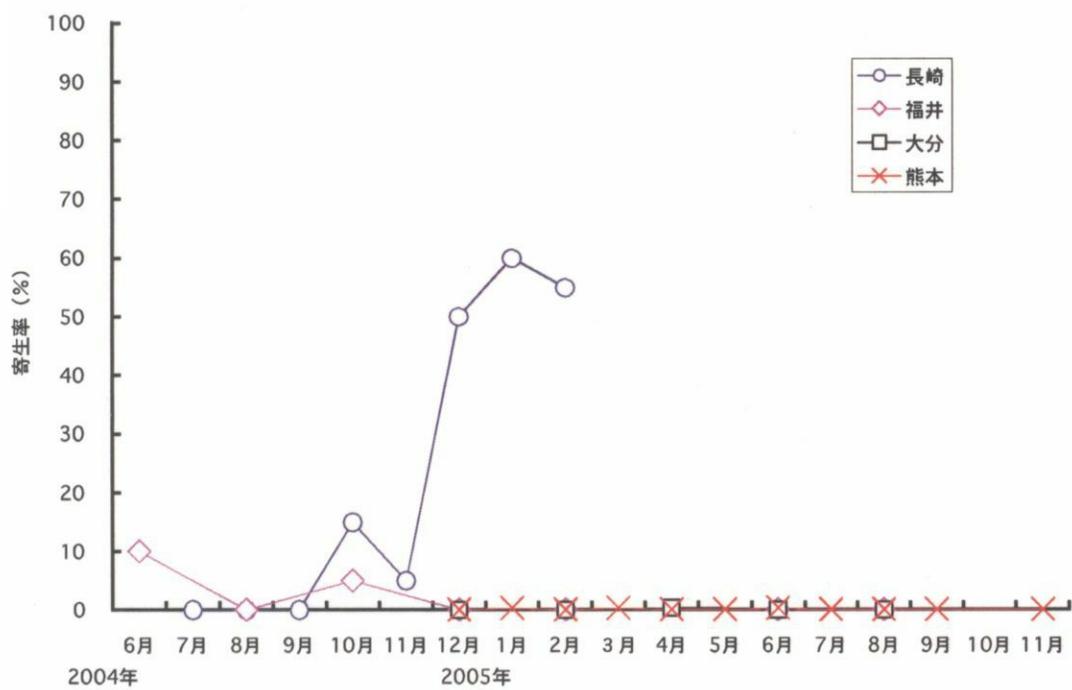


図 5-4 各調査地点における *Leptothecca fugu* の寄生率の推移。

て多く観察されるが、その後の3月から8月にかけてはほとんど確認されなかったとしている。また、Tin Tun (2000) は、1997年から1998年にかけて長崎県で調査を行っている。その結果、*E. leei* の寄生は10月から11月に始まり、12月から翌2月にかけて寄生率が最大(80-100%、N=10)になった。その後の3月に寄生率が0%になったものの、5月以降再び寄生が確認されるようになった。このような寄生率の変動は、*E. leei* の発育・増殖が低水温によって抑制されることが要因となっていると考えられる。以下に、仮説を述べる。水温が20℃を下回りだすと、トラフグ腸管内での*E. leei* の増殖が抑制されるようになる。同時に、腸管上皮の剥離等により*E. leei* は魚体外に排出されるので、結果として腸管内の寄生強度は減少する。また、それによって海水中の虫体数も減り、新たな感染は起こりにくくなる。このような一連の現象により、腸管内の*E. leei* の寄生強度は減少し続け、最終的に本研究で用いたPCR法の検出限界以下になると思われる。個体によっては、完全に寄生虫が一掃されてしまうケースもあるかもしれない。水温が20℃以上になると、*E. leei* は活発に増殖をするようになり、トラフグ間での直接伝播も起こるようになる。こうして再び寄生率は上昇すると考えられる。しかし、*E. fugu* と同様に、交互宿主を介した感染環の存在は否定できず、放線胞子による感染も関与しているかもしれない。それでは、福井県についてはどう解釈すれば良いだろうか。各県における水温の推移を見ると、福井の水温が20℃以下になり始めるのは、他の3県に比べて1ヶ月ほど早い。また、最低水温も約3-5℃低く、15℃以下の期間が4-5ヶ月ある(図5-1)。そのため、福井では、試験期間を通じて他の3県より寄生率が低く、本疾病の発症もみられなかったと考えられる。しかし、水温だけでは説明できない部分もある。例えば、大分と熊本で寄生率が0%になった5-6月に、福井の寄生率は20%であった。これは、用いた診断法の検出感度の違いによると推察される。第二章で前述したように、綿棒を用いるNon-lethal PCR法は、寄生強度が低いときにはLethal PCR法よりも検出感度が劣る。そのため、Non-lethal PCR法を用いた大分と熊本では検出できなくとも、Lethal PCR法を用いた福井では検出できた可能性がある。

本研究で調査を行った4県のうち、*L. fugu* の感染が確認されたのは長崎と福井だけであ

った。長崎では、種苗導入後3ヶ月たった2004年10月に初めて*L. fugu*が確認され、12月以降に50%以上の寄生率を示した。しかし、2005年3月に調査対象魚が全て出荷されてしまったため、調査は2月で打ちきりとなった。そのため、*L. fugu*の季節性については明らかにならなかった。一方の福井では、漁場導入前のトラフグから*L. fugu*が検出され、種苗が既に感染していたことが示された。調査開始時点の寄生率が10%であったにもかかわらず、2004年10月に5%（20尾中1尾）を示して以降は調査期間を通じて検出されなかった。*L. fugu*は魚から魚へ直接伝播せず、感染環が完結するには交互宿主が必要と考えられることから、福井の漁場には交互宿主となる生物が存在しないために、*L. fugu*が漁場に定着しなかったと考えられる。福井県外から導入されたこの種苗は、導入元で既に海面に出されていたため、その時に感染したものと思われる。感染魚の人為的な移動が確認されたのは本研究が初めてであり、粘液胞子虫性やせ病の伝播と本疾病への対策を考える上で非常に重要な報告例である。本疾病に対しては、これまで信頼性の高い診断法がなかった。そのため、種苗導入時に感染の有無を確認することができず、感染魚の移動を防ぐ手だてがなかった。本疾病の原因となる*E. leei*は魚から魚へ直接伝播するため、こうして全国に広がったと推察される。

第二節 長崎県下での一斉調査

材料と方法

2004年の9月から11月にかけてと、2005年の12月に、長崎県の養殖場で粘液胞子虫性やせ病の一斉調査を行った。2004年は37漁場63経営体、2005年は28漁場50経営体を対象とし、総検査尾数はそれぞれ1228尾と496尾であった。各経営体から1ないしは2生け簀を選定し、それぞれ10尾あるいは20尾を採材し、綿棒を用いたNon-lethal PCR検出法によって*E. leei*と*L. fugu*の寄生の有無を調べた。PCRは各個体について行わず、5尾ずつプールしたDNA溶液を用いた。さらに、経営者からの聞き取りにより、調査対象群の魚齢、

収容尾数、種苗の由来、種苗の導入時期を確認した。なお、同一経営体からサンプリングしていても、2004年と2005年では、調査地点は厳密には同じではない。なぜなら、トラフグ養殖では、飼育魚の成長に応じて群を分けたり、他の生け簀に移動させたりすることがあるからである。しかしながら、通常の経営体が占有する海面はそれ程大きなものではないため、漁場が同じであれば、同一調査地点とした。調査地点および調査群に関する情報は表 5-2 に示す。地区とは、長崎県南部や長崎県北部といった大まかな区分を表す。導入元は小文字のアルファベットで表した。同じアルファベットの場合は同じ種苗生産施設由来であることを意味するが、同一群であったかは不明である。なお、各漁場の位置と種苗の導入元については、経営体を含む各協力機関の意向により、公表することは出来ない。2005年の調査では、3 漁場（漁場「せ」「ら」「よ」）について養殖生け簀近傍の天然魚も調べた。天然魚の採集は、かご網によって行い、冷凍ないしは氷詰めにして研究室に持ち込んで、*E. leei* と *L. fugu* の感染の有無を確認した。寄生虫検査は、解剖して摘出した腸管から DNA を抽出する Lethal PCR 検出法によっておこなった。

結果

2004年の調査では、*E. leei* が陽性だったのが 21 地点（15 漁場）であったのに対し、*L. fugu* は 8 地点（7 漁場）で、*E. leei* より少なかった。また、そのうち 4 地点（4 漁場）では *E. leei* と *L. fugu* 両方が感染していた（表 5-2）。2005年は、*E. leei* が 10 地点（10 漁場）、*L. fugu* が 4 地点（3 漁場）で陽性であり、2004年に比べると、いずれも、数の上では感染水域が減少した。しかし、2004年と2005年とでは調査地点が異なる。そこで、2年とも調査を行った地点の結果のみを表 5-3 に示した。すると、*E. leei* については、2004年に陽性だった 12 地点のうち、8 地点が 2005年に陰性となった。一方、2004年に陰性であった 3 地点で、2005年には陽性であった（表 5-3）。*L. fugu* については、2004年に陽性だった 3 地点のうち 1 地点が 2005年には陰性となった一方で、新たに 1 地点（りー 1）が陽性となった（表 5-3）。このように、全体としてみると、*E. leei*、*L. fugu* ともに、感染域は 2004年と 2005年で

表 5-2 長崎県のトラフグ養殖場における一斉調査の各調査地点および調査対照群に関する情報と、*Enteromyxum leei* と *Leptotheca fugu* の寄生状況。

地区	漁協	漁場	経営体	年齢		調査個体数		導入元		<i>E. leei</i>		<i>L. fugu</i>	
				2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005
甲	A	あ	あ-1	1	ND*	20	ND	不明**	ND	-	ND	-	ND
			あ-2	1	0	20	10	a	a	-	+	-	-
			あ-3	1	ND	20	ND	不明	ND	-	ND	-	ND
			あ-4	ND	0	ND	10	ND	a	ND	-	ND	-
		い	い-1	1	ND	20	ND	a	ND	+	ND	-	ND
		う	う-1	1	0	20	10	不明	b	-	-	-	-
		う	う-2	ND	0	ND	10	ND	a	ND	-	ND	-
		え	え-1	1	ND	20	ND	c	ND	+	ND	-	ND
		え	え-2	1	ND	20	ND	a	ND	+	ND	-	ND
	お	お-1	1	ND	20	ND	d	ND	+	ND	-	ND	
		お-2	1	ND	20	ND	a	ND	+	ND	-	ND	
		お-3	0	ND	20	ND	e	ND	+	ND	-	ND	
	か	か-1	1	ND	20	ND	a	ND	-	ND	+	ND	
		か-2	1	ND	20	ND	f	ND	+	ND	+	ND	
	B	き	き-1	1	ND	20	ND	g	ND	-	ND	-	ND
			く	く-1	ND	0	ND	10	ND	q	ND	+	ND
	C	け	け-1	1	ND	20	ND	a	ND	-	ND	+	ND
			こ	こ-1	1	ND	20	ND	h	ND	-	ND	-
D	さ	さ-1	1	0	20	10	d	b	-	-	-	-	
		し	し-1	1	ND	20	ND	d	ND	-	ND	-	ND
	す	す-1	1	ND	20	ND	i	ND	-	ND	-	ND	
		す-2	1	0	20	10	a	不明	+	+	+	-	
	せ	せ-1	1	0	20	10	j	d	+	-	-	-	
そ	そ-1	ND	0	ND	10	ND	i	ND	-	ND	-		
E	た	た-1	0	0	20	10	e	e	-	-	-	-	
		ち	ち-1	0	0	20	10	i	e	-	-	-	-
			ち-2	0	0	20	10	i・e	e	-	-	-	-
			ち-3	0	0	20	10	e	e	-	-	-	-
			ち-4	0	0	20	10	i	a	-	-	-	-
			ち-5	0	0	20	10	e	a	-	-	-	-
			ち-6	1	0	20	10	e	c	-	-	-	-
	ち-7	ND	0	ND	10	ND	i	ND	-	ND	-		
	つ	つ-1	0	0	20	10	e	e	-	-	-	-	
		つ-2	1	0	20	10	e	q	-	-	-	-	
つ-3		1	0	20	10	d	e	-	-	-	-		
つ-4		0	0	20	10	不明	i	-	-	-	-		
F	て	て-1	1	ND	20	ND	i	ND	-	ND	-	ND	
		て-2	1	ND	10	ND	b	ND	-	ND	-	ND	
		て-3	1	ND	10	ND	i	ND	-	ND	-	ND	
	と	と-1	1	0	20	10	i	i	-	+	-	-	
	な	な-1	1	0	20	10	不明	i	-	-	-	-	
	に	に-1	ND	0	ND	10	ND	i	ND	+	ND	-	
		に-2	ND	0	ND	10	ND	b	ND	-	ND	-	
に-3		ND	0	ND	10	ND	b	ND	-	ND	-		

* 未調査

** 聞き取りできず不明

表 5-2 (続き) 長崎県のトラフグ養殖場における一斉調査の各調査地点および調査対照群に関する情報と、*Enteromyxum leei* と *Leptotheca fugu* の寄生状況。

地区	漁協	漁場	経営体	年齢		調査個体数		導入元		<i>E. leei</i>		<i>L. fugu</i>		
				2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	
甲	G	ぬ	ぬ-1	0	ND*	20	ND	i・k	ND	-	ND	-	ND	
			ね	ね-1	ND	0	ND	10	ND	i・k・g	ND	-	ND	-
			の	の-1	0	0	20	10	q	b・q	-	-	-	-
乙	H	は	は-1	1	ND	20	ND	b・h	ND	-	ND	-	ND	
			ひ	ひ-1	1	ND	20	ND	a	ND	-	ND	-	ND
			ふ	ふ-1	ND	0	ND	10	ND	k	ND	-	ND	-
I	へ	へ-1	1	ND	20	ND	i・e	ND	+	ND	+	ND		
		へ-2	ND	0	ND	10	ND	o	ND	+	ND	-	-	
J	ほ	ほ-1	1	ND	20	ND	l	ND	+	ND	+	ND		
		ま	ま-1	0	0	20	10	m	b	+	-	-	-	
		ま-2	0	0	20	10	m	r	+	-	-	-		
		ま-3	1	0	20	10	r	a	+	-	-	-		
		ま-4	1	0	20	10	不明**	a	-	-	-	-		
		み	み-1	1	0	20	10	m	k	-	-	-	-	
		み-2	1	0	20	10	n	s	+	-	-	-		
		み-3	1	ND	20	ND	g	ND	-	ND	-	ND		
		み-4	1	0	20	10	d	t	-	-	-	-		
		み-5	0	0	20	10	o	o	+	-	-	-		
		み-6	ND	0	ND	10	ND	r	r	ND	-	ND	-	
み-7	1	ND	20	ND	不明	ND	-	ND	-	ND	-			
み-8	1	0	20	10	不明	r	-	-	-	-	-			
丙	K	む	む-1	0	0	20	10	k	a	-	+	-	-	
丁	L	め	め-1	0	1	20	10	d	d	+	-	-	-	
			M	も	も-1	1	1	20	10	d	d	+	-	-
戊	N	や	や-1	0	0	20	10	d	d	+	+	-	-	
			ゆ	ゆ-1	1	0	20	10	i	i	-	-	-	-
己	P	よ	よ-1	2	0	10	10	f	u	-	-	+	+	
			ら	ら-1	1	1	20	10	f	f	-	-	+	+
			ら-2	ND	2	ND	10	ND	f	f	ND	-	ND	+
庚	R	り	り-1	1	1	20	10	不明	p	+	+	-	+	
			S	る	る-1	0	0	20	10	g	e	+	+	-

*未調査。

**聞き取りできず不明。

表 5-3 長崎県のトラフグ養殖場における一斉調査の各調査地点および調査対照群に関する情報と、*Enteromyxum leei* と *Leptotheca fugu* の寄生状況。2 年連続で調査した地点だけを抜粋。

地区	漁協	漁場	経営体	年齢		調査個体数		導入元		<i>E. leei</i>		<i>L. fugu</i>	
				2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005
甲	A	あ	あ-2	1	0	20	10	a	a	-	+	-	-
		う	う-1	1	0	20	10	不明*	b	-	-	-	-
	D	さ	さ-1	1	0	20	10	d	b	-	-	-	-
		す	す-2	1	0	20	10	a	不明	+	+	+	-
		せ	せ-1	1	0	20	10	j	d	+	-	-	-
	E	た	た-1	0	0	20	10	e	e	-	-	-	-
		ち	ち-1	0	0	20	10	i	e	-	-	-	-
			ち-2	0	0	20	10	i・e	e	-	-	-	-
			ち-3	0	0	20	10	e	e	-	-	-	-
			ち-4	0	0	20	10	i	a	-	-	-	-
			ち-5	0	0	20	10	e	a	-	-	-	-
		ち-6	1	0	20	10	e	c	-	-	-	-	
		つ	つ-1	0	0	20	10	e	e	-	-	-	-
			つ-2	1	0	20	10	e	q	-	-	-	-
			つ-3	1	0	20	10	d	e	-	-	-	-
	つ-4		0	0	20	10	不明	i	-	-	-	-	
	F	と	と-1	1	0	20	10	i	i	-	+	-	-
		な	な-1	1	0	20	10	不明	i	-	-	-	-
	G	の	の-1	0	0	20	10	q	b・q	-	-	-	-
乙	J	ま	ま-1	0	0	20	10	m	b	+	-	-	-
		ま-2	0	0	20	10	m	r	+	-	-	-	
		ま-3	1	0	20	10	r	a	+	-	-	-	
		ま-4	1	0	20	10	不明	a	-	-	-	-	
	み	み-1	1	0	20	10	m	k	-	-	-	-	
		み-2	1	0	20	10	n	s	+	-	-	-	
		み-4	1	0	20	10	d	t	-	-	-	-	
		み-5	0	0	20	10	o	o	+	-	-	-	
		み-8	1	0	20	10	不明	r	-	-	-	-	
丙	K	む	む-1	0	0	20	10	k	a	-	+	-	-
丁	L	め	め-1	0	1	20	10	d	d	+	-	-	-
	M	も	も-1	1	1	20	10	d	d	+	-	-	-
戊	N	や	や-1	0	0	20	10	d	d	+	+	-	-
	O	ゆ	ゆ-1	1	0	20	10	l	i	-	-	-	-
己	P	よ	よ-1	2	0	10	10	f	u	-	-	+	+
	Q	ら	ら-1	1	1	20	10	f	f	-	-	+	+
庚	R	り	り-1	1	1	20	10	不明	p	+	+	-	+
	S	る	る-1	0	0	20	10	g	e	+	+	-	-

* 聞き取りできず不明。

異なった。しかし、細かくみると、2年続けて感染していた漁場や、逆に2年とも感染が確認されなかった水域も存在した。特に、漁協「E」においては、調査対象漁協中2番目に調査地点が多かった(11地点)うえで、*E. leei* と *L. fugu* ともに2年連続で陰性であった(表5-2,3)。

魚の由来に着目すると、2004年の漁場「え」と「お」のように、種苗の由来にかかわらず *E. leei* が感染していた水域があった(表5-2)。一方で、導入元 e からは、ほぼ同時期に E 漁協の7地点にも種苗が導入されており、ここでは *E. leei* の感染は確認されなかった(表5-2)。*E. leei* ないしは *L. fugu* の感染が2年連続で確認された地点では、「や-1」と「ら-1」のように2年とも同じ導入元であったところと、「る-1」と「よ-1」のように2004年と2005年では導入元が異なる場所があった(表5-3)。

2005年に行った天然魚の調査では、3地点で計60尾(4目15種)を検査したが、*E. leei*、*L. fugu* ともに寄生は確認されなかった(表5-4)。調べた魚種の中には、コモンフグ (*Takifugu poecilonotus*)、カワハギ (*Stephanolepis cirrhifer*)、ウマヅラハギ (*Thamnaconus modestus*)、ヨソギ (*Paramonacanthus japonicus*) といった、フグ目の4種も含まれていた。

考察

この調査により、長崎県における *E. leei* と *L. fugu* の感染水域は、全体としては必ずしも確定していないことが示された。2年連続で感染が確認され、漁場に定着してしまっていると思われる漁場が存在する一方で、2004年に陽性であったのに2005年に陰性となった漁場があり、いったん養殖場が汚染されても必ずしも定着しないことが示唆された。なお、交互宿主を介した感染環だけではなく、トラフグやその他の養殖魚および天然魚も含む魚から魚の直接伝播によって漁場に新規導入された群に継続的に感染が成立する場合も含めて「定着」しているとした。

細かくみると、地区「己」では、2004年に2地点中2地点、2005年に3地点中3地点で *L. fugu* が検出され、漁場に定着していると思われた。*L. fugu* が感染環を完結するには交互

表 5-4 2005 年に調査した天然魚の情報および、*Enteromyxum leei* と *Leptotheca fugu* の寄生状況。

魚種	採材日	採材漁場	<i>E. leei</i>	<i>L. fugu</i>	最寄りの調査地点における		最寄りの調査地点における	
					<i>E. leei</i> 感染履歴		<i>L. fugu</i> 感染履歴	
					2004年	2005年	2004年	2005年
カワハギ			0/19	0/19				
ヨソギ			0/1	0/1				
カサゴ			0/2	0/2				
カゴカキダイ	2005.12.6	せ	0/2	0/2				
タカノハダイ			0/1	0/1	+	-	-	-
コモンフグ			0/3	0/3				
マアナゴ			0/1	0/1				
アイゴ			0/1	0/1				
スズメダイ			0/7	0/7				
ヨソギ			0/2	0/2				
クロホシイシモチ	2005.12.7	ら	0/2	0/2				
コスジイシモチ			0/5	0/5	-	-	+	+
ササノハベラ			0/5	0/5				
マアナゴ			0/1	0/1				
カサゴ			0/1	0/1				
ウマツラハギ	2009.12.7	よ	0/3	0/3				
イソフエフキ			0/2	0/2	-	-	+	+
クロメジナ			0/2	0/2				
4日15種			0/60	0/60				

* 陽性個体数/試験個体数

宿主が必要と考えられることから、この漁場には交互宿主となりうる生物が存在する可能性が示された。*L. fugu* の生活環を解明するためには、このような漁場が調査に適していると考えられる。一方で、調査地点「すー2」では、2004年には*L. fugu*が検出されたが、2005年には検出されなかった。2004年の「すー2」と同じ導入元に由来する種苗は、他の4地点でも用いられているが、そのいずれも*L. fugu*陰性であった。すなわち、2004年の「すー2」における*L. fugu*は種苗由来ではないと考えられる。だとすると、ここは*L. fugu*が定着している漁場なのではないだろうか。なぜ2005年には感染が確認されなかったのだろうか。原因は明らかではないが、ひとつの可能性としては、2004年よりも2005年の検査尾数が少なかったことが挙げられる。「すー2」における*L. fugu*の寄生率は25% (1/4)であるが、5尾分のDNAをプールしてPCRに用いていたために、実際の寄生率よりも多く見積もっている可能性が高い。この漁場が、何らかの原因で感染率が低い漁場であるとすれば、2005年に行った10尾の検査では検出できなかったのかもしれない。このことは、他の調査地点にも当てはまると考えられる。いずれにしろ、現時点では、漁場に*E. leei*ないしは*L. fugu*が定着するか否かを決定する要因は不明である。今後も継続して調査を行うことで、実像は明らかになると考える。

調査の結果、漁協「E」のように、2年連続で*E. leei*、*L. fugu*ともに感染が確認されなかった水域が存在した。このような漁場は、粘液孢子虫性やせ病の非汚染水域として今後も守り続けていかなければならない。それでは、どのようにすれば汚染を防ぐことが出来るだろうか。詳細は総合考察で述べるが、まず感染トラフグを漁場に導入しないことが重要なのは明らかである。本章の第一節では、*L. fugu*に感染した種苗が人為的に移動している例が確認されたが、*E. leei*についても、ある種苗生産場から出荷される前の種苗に感染していた例がみつかっており（高見氏私信）、現時点で、*E. leei*、*L. fugu*ともに感染魚の人為的な移動が起きているのは明らかである。トラフグを生かして移動する際には、寄生虫検査を徹底することが必要である。

3地点の養殖生け簀の近傍で採集した天然魚からは*E. leei*、*L. fugu*ともに検出されなかつ

た。調査対象魚の中には、これまでに *E. leei* あるいは *L. fugu* に感染することが明らかになっている魚種は含まれていなかった。ただし、フグ目の 4 種（コモンフグ、カワハギ、ウマヅラハギ、ヨソギ）が含まれていたことと、スズメダイ (*Chromis notata notata*) と同属のダムゼルフィッシュ (*Chromis chromis*) や、ササノハベラ (*Pseudolabrus japonicus*) が属するベラ科の 14 魚種が、*E. leei* に感染することが報告されている (Padros *et al.* 2001) ことから、調査対象魚として不相当であったとは思われない。しかしながら、以上の結果に基づいて、トラフグ養殖場における *E. leei* と *L. fugu* の伝播に天然魚が関与していないとは断言できない。なぜなら、ひとつには、検査個体数が少ないからである。さらには、今回調査した 3 漁場いずれの養殖トラフグからも、2005 年に *E. leei* が検出されていないからである。天然魚が本疾病の伝播に関与しているかどうかを明らかにするためには、実際に本疾病が発症し、寄生虫の感染が確認されている漁場で調査を行うことが不可欠である。

第五章のまとめ

本章では、粘液胞子虫性やせ病の原因である *E. leei* と *L. fugu* の養殖場における寄生動態を明らかにするために、トラフグ養殖場で疫学調査を行った。第一節では、*E. leei* の寄生率が季節変動を示し、水温の影響を受けていると考えられた。一方、*L. fugu* の季節性については明らかにできなかった。また、感染魚が人為的に移動されていることが確認され、本疾病が感染域を広げてきた原因が推察された。第二節では、2 年連続で感染が確認された漁場が存在した一方で、2004 年に感染していたのに 2005 年には感染が確認されなくなった漁場があり、いったん養殖場が汚染されても必ずしも定着しない可能性が示された。また、養殖場で採集したトラフグ以外の天然魚 60 尾 (4 目 15 種) からは *E. leei* も *L. fugu* も検出されなかったが、調査地点および個体数が少なかったため、天然魚が本疾病の伝播に関与していないと言い切るには不十分であると考えられた。このように、本章では、本疾病の養殖場における現在の感染状況の一端が明らかになった。次章では、本章で得られた知見と第四章までで得られた実験結果を基に、対策を中心にして本疾病について総合的に考察する。

第六章 総合考察

粘液胞子虫性やせ病の病原体の由来

従来、養殖トラフグの粘液胞子虫性やせ病原因寄生虫は *Myxidium* sp. TP と *Leptotheca fugu* の 2 種であるとされていたが、本研究（第二章）によって、*Myxidium* sp. TP は、ヨーロッパで海産養殖魚などに被害を及ぼしている *Enteromyxum leei* であることを明らかにした。ここで、両種の由来、すなわちどのような経緯で養殖トラフグに侵入するようになったのかについて考察する。*E. leei* は、宿主範囲が広い粘液胞子虫であり、これまでヨーロッパでは 30 種近い海産魚から感染例が報告されている。しかし、今までヨーロッパでは、トラフグのようにその魚体内で孢子形成が完結されない宿主は知られていない。それゆえ、トラフグは、*E. leei* にとって「本来の宿主」ではないと考えられる。そこで第一には、海外から人為的に導入された感染魚から伝染したという仮説が立てられる。日本には、国外から輸入される活魚に対する検疫を義務づける法律が無く、海外から感染魚が人為的に持ち込まれるのを防ぐことができないのが現状である。例えば、単生類の *Neobenedenia girellae* は、輸入カンパチ種苗に寄生して日本に持ち込まれたと考えられており (Ogawa *et al.* 1995)、現在ではブリ類だけでなくトラフグやヒラメなど他の海産養殖魚にも被害を及ぼしている。また、2004 年から 2005 年にかけて中国から輸入されたカンパチの大型種苗に、アニサキス I 型幼虫の大量寄生が見つかった例もある (注)。*E. leei* については、日本の養殖トラフグにおける被害の発生が 1996 年以降 (Tin Tun *et al.* 2000) であるのに対し、ヨーロッパでは 1991 年から (Diamant 1992) であり、この時間差は、*E. leei* 感染魚がヨーロッパから日本に持ち込まれた可能性を示している。また、*E. leei* の発育が 15℃以下で抑制されるという本研究（第四章）の結果は、*E. leei* の起源が熱帯あるいは亜熱帯地域であることを示唆している。現に、北米の水族館で飼育されていた熱帯性のハマクマノミから、*E. leei* によく似た粘液胞子虫が

(注) 良永 知義, 木南 竜平 & 小川 和夫. 2005. 平成 17 年度日本魚病学会大会

見つかっている (Kent 1999)。この寄生虫の種同定は行われていないが、*E. leei* のそもそもの宿主は熱帯魚であり、感染魚が観賞魚として日本とヨーロッパに持ち込まれたとも考えられる。しかし、いずれにせよ海外から感染魚が持ち込まれたという確証は得られていない。*E. leei* の由来に関する第二の仮説として、もともと日本海沿岸の天然魚を宿主として分布しており、そのような分布域で養殖されたトラフグに感染したということが考えられる。多殻目粘液胞子虫 *Kudoa thyrssites* は、世界中でこれまでに 35 種以上の海産魚から見つかっており、日本でも天然のカタクチイワシ (*Engraulis japonicus*)、トビウオ (*Cypselurus agoo*)、シイラ (*Coryphaena hippurus*) が宿主となることが報告されている (松本 1963; Langdon *et al.* 1992)。この場合、本寄生虫は、天然の感染魚が長い時間をかけて徐々に拡散することによって地理的分布を広げたと考えられている (Whipps *et al.* 2004)。ただし、養殖ヒラメで感染が確認された例では、種苗が韓国産であったため、感染魚が人為的に移動された可能性も指摘されている (Yokoyama *et al.* 2004b)。*E. leei* は、*K. thyrssites* 同様に宿主範囲が非常に広い。それ故、様々な天然魚を宿主としながら世界中に拡散し、トラフグ養殖が行われるようになる前から日本近海に分布していたのかもしれない。しかし、これまでに *E. leei* が天然魚から報告された例は少なく、日本では天然魚を対象とした調査自体が行われてこなかった。*E. leei* の由来について追求するのであれば、天然魚を対象とした調査を行っていく必要があるだろう。以上、*E. leei* の由来について二つの仮説を提唱したが、今のところいずれの仮説にも確証はない。ただし、本研究でおこなった SSU rRNA 遺伝子解析の結果、*E. leei* の由来に迫る一つの道筋が見つかった。これまでに調べられた日本由来 (トラフグ、マダイ、イシガキダイ) の *E. leei* の間では塩基配列が 100%一致したのに対して、ヨーロッパ由来 (シャープスナウトシーブリーム) のものとはわずか (0.4%) ながら差が見られ、いわば「日本株」と「ヨーロッパ株」が存在する可能性が示された。すなわち、第二の仮説を支持する結果である。しかし、ヨーロッパではたった 1 魚種、それも 1 地域から得られた *E. leei* について解析が行われただけである。そのため、ヨーロッパには複数の「株」が存在し、その中の一つが最近になって人為的に日本に導入された可能性も否定できない。この問題を解決

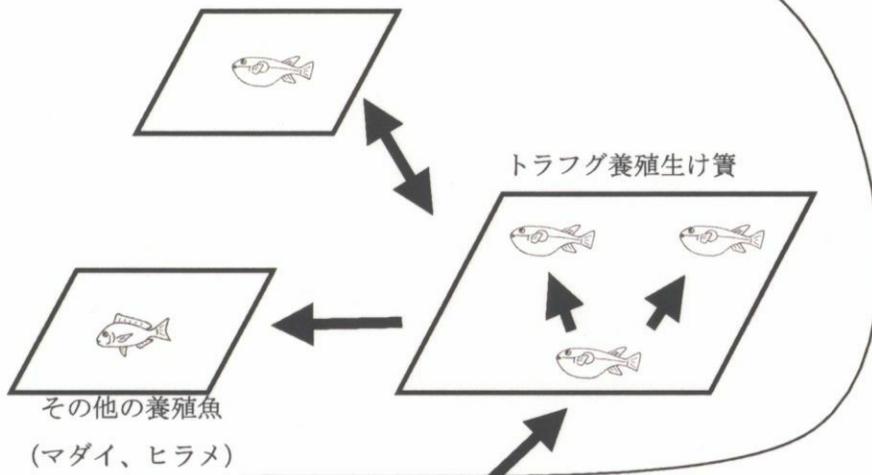
するには、ヨーロッパと日本で、様々な魚種を対象に遺伝子解析を行うことが必要である。その際、どのような遺伝子領域を解析の対象とするかについて考慮すべきである。SSU rRNA 遺伝子領域は、保存性が高いため、粘液胞子虫の種内変異をみるには適していない。その点、ribosomal RNA 遺伝子間に存在する internal transcribed spacer (ITS) 遺伝子は、翻訳されない領域であるために、分子進化速度が比較的速く、種内変異を調べるのに有用であるとされている (van Herwerden *et al.* 2000)。粘液胞子虫では、サケ科魚類の旋回病の原因粘液胞子虫 *Myxobolus cerebralis* の ITS 遺伝子領域に関する研究が行われており、北米大陸とヨーロッパ由来のもの間では、ほとんど変異がないという結果が得られている (Whipps *et al.* 2004)。これは、本病が人為的な感染魚の移動によってヨーロッパから北米に拡散したという仮説 (Wolf 1986) を支持しているとされる (Whipps *et al.* 2004)。*E. leei* の由来を検証するうえでも、ITS 遺伝子領域を解析の対象とするべきであろう。

次に、*L. fugu* の由来についてはどうか。*L. fugu* は、今のところトラフグ以外の宿主は見つかっていないため、宿主特異性は高いと考えられる。また、魚から魚への直接伝播もしないことから、感染環の完結には交互宿主が必要であると推察される。だとすると、*L. fugu* は、もともとトラフグを宿主として、日本近海に分布していたのではないだろうか。さらに推論を重ねると、*L. fugu* だけでは被害が少なかったために表面化していなかったが、*E. leei* の感染被害が広がるのに伴って、*L. fugu* についても顕在化したとは考えられないだろうか。現に、*E. leei* に比べて、*L. fugu* 感染群における死亡は少ないという、養殖場での観察例もある (鮫島、私信)。しかし、感染実験系が確立されていないため、*L. fugu* の病害性は、病理組織学的知見から推察するしかない。Ogawa & Yokoyama (2001) や Tin Tun *et al.* (2002) によると、寄生部位における病理変化は、*E. leei* と *L. fugu* で異なる。*E. leei* の感染部位では、多くの場合上皮組織の剥離がみられるが、一方の *L. fugu* の感染部位では、上皮の剥離はあまり観察されない。このような違いは、両種の間で死亡率や発症までの期間などが異なることを示唆しているが、詳細を明らかにするには本疾病の発症機構を解明することが必要である。

粘液胞子虫性やせ病の伝播

E. leei と *L. fugu* が養殖トラフグに寄生するようになった経緯は不明であるが、すでに本疾病が全国のトラフグ養殖産地に蔓延していることは確かである。そこで、本疾病がどのようにして日本国内で伝播したかを考察するため、本研究で得られた結果に基づき *E. leei* と *L. fugu* の伝播を個別に検証する。*E. leei* の伝播に関して実験的に明らかになっていることを以下に列挙する。*E. leei* はトラフグからトラフグへ、経水的に直接伝播する (Yasuda *et al.* 2002)。トラフグ間だけでなく、トラフグとマダイ、トラフグとヒラメの間でもこの伝播経路は成立する (本研究第四章; Yasuda *et al.* 2005)。経水的な直接伝播においては、栄養体が海水中に浮遊している間にも感染力を保持していると考えられるが、この感染力は 20℃の海水中で 24 時間維持される (本研究第四章)。また、*E. leei* は 10℃で 12 週間はトラフグ体内で生き続ける (本研究第四章)。以上から、トラフグ養殖における *E. leei* の伝播には、以下のような経路が存在すると推察される。まず、ある生け簀で飼育されている一群の中に感染トラフグがいるとする。この個体から、経水的に生け簀内で感染が広がる。次に、感染力を保持した虫体が海水の動きに伴って受動的に拡散することにより、近傍の生け簀で飼育されているトラフグに *E. leei* が伝播する。マダイやヒラメが近くで飼育されている場合には、それらも巻き込んで感染域は拡大する (図 6-1)。感染トラフグは、体内に *E. leei* を保持したまま越冬し、翌年の感染源となる。感染魚が飼育されている漁場に新規の種苗が導入されると、越冬した感染魚からの伝播が起こる。こうして、いったん漁場が *E. leei* に汚染されると、トラフグだけを介してでも、その漁場に *E. leei* が定着すると考えられる。この他に、交互宿主や漁場に生息している天然魚を介した感染環が存在する可能性もあるが、本研究ではそのような感染経路に関する知見は得られなかった。それでは、第五章の養殖場での疫学調査ではどのようなことが示されたのだろうか。長崎県下の一斉調査では、種苗の由来にかかわらず 2 年連続で *E. leei* の感染が確認され、漁場に定着していると考えられる漁場が存在した。その一方で、2004 年には陽性であったのに 2005 年には陰性となった漁場が多くみられたことから、*E. leei* の感染が必ずしも漁場に定着しないことが示された。*E. leei* の漁場への定着

漁場 B



人為的な移動
(種苗、中間魚)

漁場 A

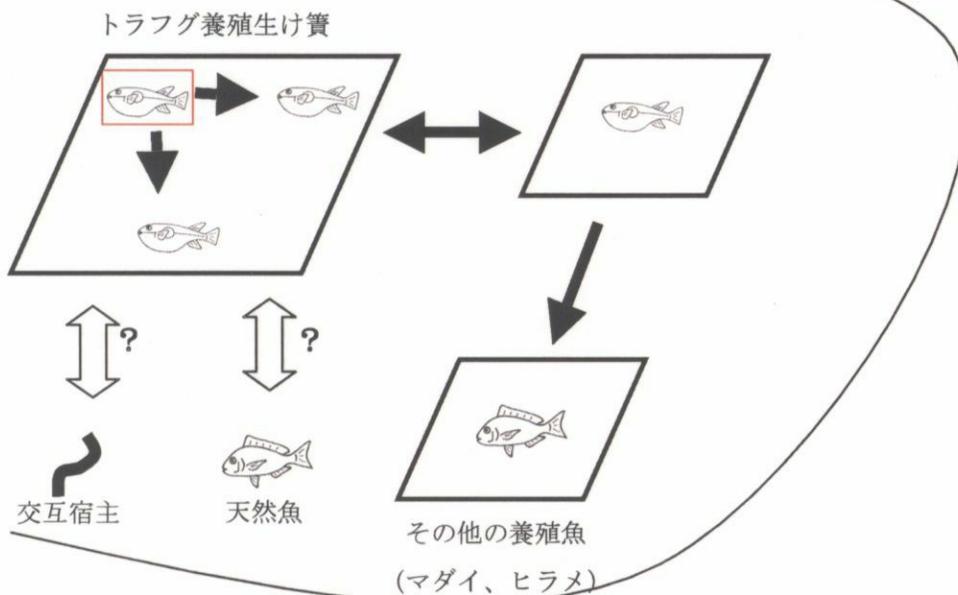
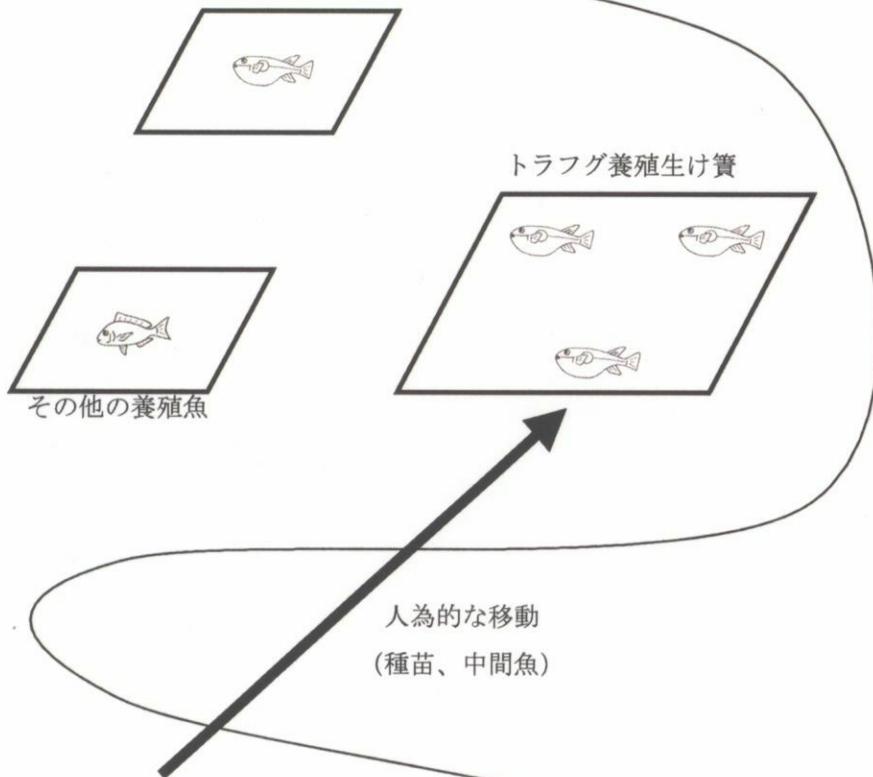


図 6-1 本研究により推察された、トラフグ養殖における *Enteromyxum leei* の伝播経路。赤で囲ったトラフグから伝播が始まる。黒矢印は、感染実験と野外調査の結果から明らかになった伝播経路。感染魚の人為的な移動により、地理的に隔離された漁場間でも伝播している。白矢印で示した経路が存在するかは、本研究では明らかにできなかった。

を防ぐことは、本疾病の対策においても大きな意味を持つ。しかし、残念ながら本研究では、*E. leei* が検出されなくなった漁場に共通する漁場環境ないしは飼育方法は見いだすことはできなかった。天然魚や交互宿主の関与も含めて、各漁場環境について個別かつ詳細な検討を行うことが今後必要である。ところで、本研究では、感染魚（トラフグ）が、種苗や中間魚として人為的に動かされることにより、海水中の拡散では伝播し得ないような地理的に離れた漁場にも *E. leei* が伝播していることが確認された（図 6-1）。現在のトラフグ養殖で用いられる種苗は全て人工生産されたものであり、活魚輸送技術の発達により、時に数百 km 離れた漁場にも導入される。また、他の漁場である程度の大きさ（数 100 g）まで育成したトラフグを中間魚として導入する養殖業者も多い。しかし、導入前の魚病診断は必ずしも行われておらず、特に本疾病に対してはこれまで信頼性の高い診断法がなかったため、感染魚の移動を防ぐことができなかった。*E. leei* は魚から魚へ直接伝播するため、導入先でさらに感染域を拡げることになる。こうして、*E. leei* が全国に拡がったと推察される。

次に、*L. fugu* の伝播について考察する。感染実験系が確立されていないため、実験的に明らかになっている情報はない。しかし、感染トラフグの腸管を経口投与しても人為感染が成立しないことから、魚から魚へ直接伝播することはなく、感染環の完結には交互宿主が必要と考えられる（図 6-2）。また、本研究で行った野外調査により、*E. leei* と同様に、感染魚が人為的に移動されていることが明らかになった（図 6-2）。しかし、上述したように、交互宿主を介した感染環しか存在しないのであれば、そのような生物が存在しない漁場には *L. fugu* は定着しないことになる。本研究の第五章で行った福井県における定期調査では、導入時（2004 年 6 月）に 10%（2/20）の寄生率を示したにもかかわらず、その後は 2004 年 10 月に 5%（1/20）を示して以降、調査終了（2005 年 8 月）まで *L. fugu* の寄生は確認されなかった。この結果は、福井県の調査地点周辺に *L. fugu* の交互宿主が存在しなかったことに起因するのかもしれない。しかし、*L. fugu* が、最低水温が 10°C 以下になる福井の漁場環境を生き延びることが出来なかった可能性も否定できない。いずれにせよ、*L. fugu* の伝播経路を解明するためには、交互宿主の調査が必須である。それでは、どのような生物を調査

漁場 B



漁場 A

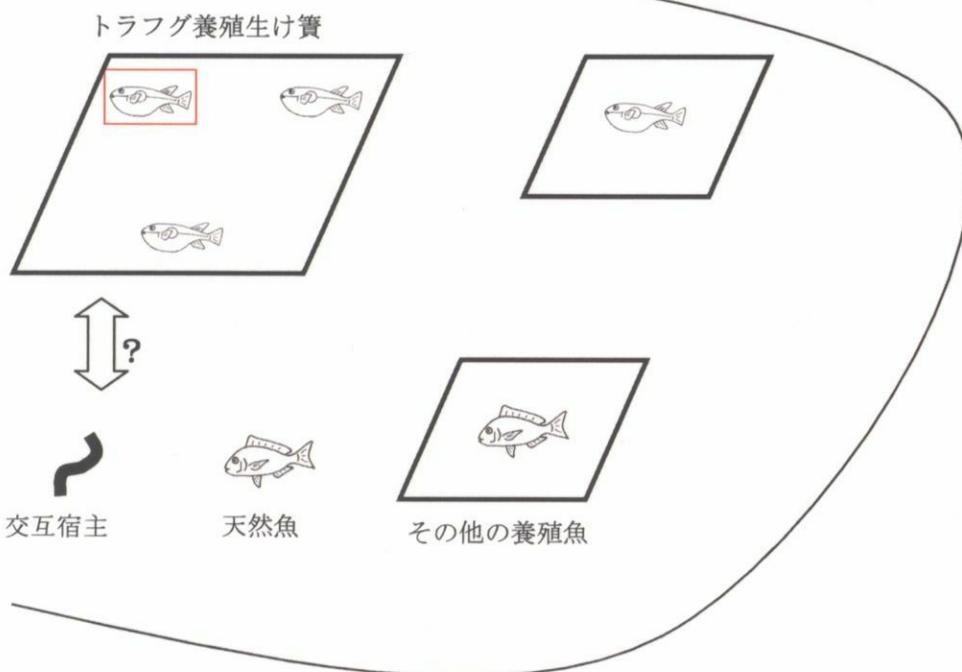


図 6-2 本研究により推察された、トラフグ養殖における *Leptotheca fugu* の伝播経路。赤で囲ったトラフグから伝播が始まる。黒矢印は、野外調査の結果から明らかになった経路。感染魚の人為的な移動により、地理的に隔離された漁場間にも伝播している。白矢印で示した経路は、感染実験の結果から存在が示唆されたものの、養殖場で確認するには至らなかった。

対象にすればよいだろうか？これまでに生活環が解明された唯一の海産粘液胞子虫 *Ellipsomyxa gobii* は、ゴカイ科 (family Nereidae) の多毛類 *Nereis diversicolor* と *Nereis succinea* を交互宿主とすることが報告されている (Køie *et al.* 2004)。また、粘液胞子虫ステージは明らかになっていないが、スピオ科 (family Spionidae) の海産多毛類や (Køie 2005)、イトミミズ科 (family Tubificidae) の海産貧毛類から放線胞子虫が発見されている (Hallett *et al.* 1999)。以上はいずれも環形動物である。それ故、*L. fugu* の交互宿主を探す際には、環形動物をまず調査対象とするべきであろう。さらに、調査を行う場所も検討する必要がある。本研究の疫学調査では、種苗の由来にかかわらず 2 年連続で *L. fugu* の感染が確認された漁場が見つかった。このような漁場では、*L. fugu* の感染環が成立し、定着している可能性が高いため、交互宿主の調査を行うのに適していると考えられる。

本研究によって、トラフグ養殖における本疾病の伝播には、広域には感染トラフグの人為的な移動が、局所的には *E. leei* のトラフグからトラフグへの経水的な直接伝播が大きな役割を果たしていることが示された。さらに、同一漁場内の養殖マダイも *E. leei* の伝播に関与する危険性が明らかになった。このような知見は、本疾病のこれ以上の拡散を防ぎ、予防対策を講じる上で重要な情報であると考えられる。しかし、*E. leei* と *L. fugu* の伝播に交互宿主と天然魚が関与しているのかどうかは不明のままであり、本疾病の伝播経路の全容解明には至らなかった。

粘液胞子虫性やせ病の発症機構

これまでに腸管に寄生する粘液胞子虫によって引き起こされる疾病の中で、その発症機構が解明されたものはない。あくまで、病理組織学的な見地から、発症のメカニズムを推論するに留まっている。例えば、本疾病と同様の症状を示すターボットの粘液胞子虫症については、*Enteromyxum scopthalmi* が重篤感染して消化管上皮組織を破壊することによる悪液質 (cachexia)、すなわち慢性的な栄養障害による全身衰弱が、やせる原因であるとされている (Palenzuela *et al.* 2002)。トラフグの粘液胞子虫性やせ病については、*E. leei* ないしは *L. fugu*

が消化管上皮組織を破壊することにより、栄養吸収不良や浸透圧調節障害が起こり、結果として罹病魚はやせ症状を呈するのではないかと示唆されている (Ogawa & Yokoyama 2001; Tin Tun *et al.* 2002)。また、*E. leei* については、感染したシャープスナウトシーブリームの肝臓に病変が見られたことから、肝機能障害がやせ症状の原因となっているという仮説もある (Le Breton & Marques 1995)。こうした中で、石松 (2002) は *E. leei* に自然感染したトラフグの生理学的特徴を調べることにより、本疾病の発症機構の解明を試みた。彼は、感染魚の血漿浸透圧や Cl⁻濃度が無感染魚に比べて有意に高く、また、感染魚の水分吸収が正常に機能していないという結果から、浸透圧調節障害が本疾病の発症に大きく関わっていることを示唆した。海産硬骨魚類の体液浸透圧は、海水の約 3 分の 1 であり、そのため常に体内から水分が失われると同時に体外から塩分が流入している。このような環境下で体液の恒常性を維持するために、海水魚は積極的に海水を飲み、腸から吸収することで水分補給に役立っている。この飲水量は、魚種によっても異なるが、40-200 mL/kg/day で、その 70%が腸管から吸収される (小栗 1991)。それ故、*E. leei* と *L. fugu* の寄生により引き起こされる腸管上皮組織の病理変化が腸全体におよんで腸管における水吸収が正常に行われなくなった結果、罹病魚は脱水症状をおこし、急激にやせるのではないだろうか。だとすると、上皮組織の剥離が最も顕著な病理変化としてみられる *E. leei* の方が、*L. fugu* よりも病害性が強いということも考えられる。しかし、両種の病害性について評価するには、やはり実験系での検証が必要である。*L. fugu* については実験感染系が確立されていないので、まずは *E. leei* を対象として、実験的に本疾病の発症機構を解明することが今後の課題である。その際には、宿主であるトラフグの生理学的な側面から研究することが有効であろう。

粘液胞子虫性やせ病への対策

本疾病は、2 種の腸管寄生粘液胞子虫を原因とする感染症であり、そのうち 1 種においては魚から魚への水平感染も起こりうる。トラフグ養殖における本疾病の被害は重大で、何らかの対策が求められている。感染症への対策は、治療と予防に大別される。そこで、治療と

予防の両面から、現在取りうる本疾病への対策を考察してみたい。

まずは、治療について検討する。化学療法については、これまでにミクソゾアの感染症に対して実用化された例はない。抗生物質の一種であるフマギリン (fumagillin) の経口投与に治療効果があることが数種のミクソゾアについて報告されているが、宿主である魚に対して毒性を持つこともあり、実用化には至っていない (Yokoyama 2003)。本疾病については、フマギリンを経口投与しても駆虫効果がなかったという実験結果がある (宮崎県水産試験場 2001)。毒性が低いフマギリン誘導体 TNP-470 の経口投与がサケ科魚類の増殖性腎臓病に対して治療効果があるという報告もあるが (Higgins & Kent 1998)、フマギリンと同じく実用化されていない。現状では化学療法の早期開発を期待することはできない。それでは、薬剤に頼らない治療法は考えられないだろうか。本研究 (第四章) では、飼育水温を低く (10~15°C) 保つことで本疾病の発症を抑えられることが示唆された。しかし、陸上養殖であれば水温をある程度コントロールすることは可能であるとはいえ、水温維持に要するコストを考えると、現状では現実的ではないかもしれない。

次に、予防について検討する。本研究で行った疫学調査の結果、本病に無感染と思われる漁場の存在が確認された。このような水域を守るためには、無感染種苗を供給することが最も重要である。前述したように、現在のトラフグ養殖で用いられている種苗はその全てが人工種苗である。通常、種苗生産場では、体長 4-6 cm になるまで陸上水槽で飼育する。その際に飼育水として用いている海水は、必ずしも濾過や滅菌消毒されていないのが現状である。本疾病の汚染海域から無処理のまま飼育水を導入すると、出荷前の種苗が感染してしまう可能性がある。現に、本研究では、導入前の種苗で感染が確認されている。こうしたことが起きるのを防ぐためにはどうすればいいだろうか。他の粘液胞子虫症では、紫外線照射によって *M. cerebralis* の放線胞子を不活化することより、旋回病を抑制できることが実験的に証明されている (Hedrick *et al.* 2000)。また、オゾンの有効性も *Ceratomyxa shasta* で報告されている (Tipping 1988)。本疾病に対する効果も期待できるかもしれないが、*E. leei* と *L. fugu* に効果的な紫外線やオゾンの強度および濃度については今後の研究によって明らかにする必

要がある。このように無感染種苗の作製に努力するとともに、魚を移動する際の寄生虫検査を徹底すべきである。これまでは、信頼性の高い診断法がなかったこともあり、種苗および中間魚の移動の際に、検査は必ずしも行われてこなかった。しかし、本研究で開発した PCR 法は、従来の診断法よりも簡便で精度・感度が高く、また魚を殺さずに検査することもできる。本法を活用することにより、生産者と魚病検査機関が一体となった防疫体制を構築していくことが、これ以上の人為的拡散を防ぐには重要である。

それでは、本疾病が発生してしまった場合にはどうすればよいだろうか。まず、群れの中にやせた個体が見られたら、最寄りの魚病検査機関に持ち込み、診断を依頼する必要がある。なぜなら、原因が *E. leei* と *L. fugu* のいずれかによって、取るべき対策が変わってくるからである。*E. leei* が検出された場合には、感染魚からの水平感染を防ぐために、なるべく早く発症個体を取り上げることが重要になる。また、環境水中に存在する栄養体の絶対数を少なくして再感染の機会を減らすために、飼育密度を低くすることも有効と考えられる。海面養殖では、周囲の生け簀への伝染もおこりうるため、感染群と無感染群をできるだけ離すことが望ましい。特に、*E. leei* は 10℃でもトラフグの体内で生残し、その感染力も海水中で 1 日維持されることから（本研究第四章）、感染歴のある越年魚（1 歳魚）の近くに新規の種苗（0 歳魚）を導入することは避けるべきである。しかし、実際にどれくらい距離を離せばトラフグ間での経水的な直接伝播が成立しないかは、現時点では明らかになっていない。それ故、可能であるならば、越年魚と 1 歳魚を違う漁場で飼育することも考慮すべきである。あるいは、漁場内にトラフグがいない期間を作ることで感染環を断ち切ることも有効かもしれない。現実には、各経営体が個別にこのような対策を取ることは困難であろう。近隣の経営体同士が協力して、本疾病への対策を講じていくことが望まれる。陸上養殖では、個々の水槽が独立しているため、汚染水槽専用の器具を設ける等の注意をし飼育水を他の水槽に混入させない限り、水槽間での伝播は起こらないだろう。しかし、忘れてはいけないのが飼育廃水の処理である。もし、それまで感染履歴のなかった飼育場に外部から感染魚を導入してしまった場合、無処理のまま飼育水を排出することは、寄生虫を非汚染海域に放出してしまう

ことになる。そこで寄生虫が定着してしまえば、その海域から導入している飼育水に寄生虫が混入することになり、飼育場内の全ての水槽が感染の危機にさらされることになる。また、その海域でトラフグやマダイを養殖している他の経営体にも損害を与えることになるかもしれない。新規に陸上養殖を始める際などには、このような事態が起きないように十分な注意が必要である。

以上は、*E. leei* の場合である。続いて、*L. fugu* が検出されたときの対策について考察する。*L. fugu* は、魚から魚へ直接伝播せず、交互宿主を介して感染環が完結すると考えられる。トラフグ間で伝播しないからといって、病魚を放置しても問題ないというわけではない。なぜなら、飼育場周辺の海域に交互宿主となりうる生物が生息していた場合、感染トラフグから排出された胞子によって、新たな感染環が成立してしまうからである。漁場に定着させないためにも、病魚を取り除いたり、場合によっては感染群を全て処分すると言った思い切った対策をとることも必要である。漁場に交互宿主が存在しなければ、*L. fugu* の感染環は定着しないことになるが、どのような生物が交互宿主になるか分からない現状では、このようなケースをあまり期待するべきではない。

以上、本疾病に関して現在取りうる予防対策を論じてきたが、要約すると次のようになる。第一に、無感染水域を汚染から守りこれ以上の被害拡大を防ぐため、無感染種苗の供給と、トラフグを移動する際の寄生虫検査を徹底する。第二に、発病が見られた場合には、寄生虫検査を行ったうえで、病魚を速やかに処分すること、および感染群と未感染群を隔離するなどの対策を取ることで被害を軽減する。このような防疫体制を講じる一方で、本疾病の伝播において未解明な部分についての調査・研究を継続して行っていくことが必要である。

今後の展望

現在のトラフグ養殖では、海外からの輸入トラフグの増加に伴う魚価の低迷が、生産者にとって大きな負担となっている。こうした現状では、生産コストを削減して利益率を高める

ことが重要であるが、そのためには魚病の発生による歩留まりの低下を抑えなければいけない。粘液胞子虫性やせ病は、トラフグ養殖における最も重大な疾病の一つであるにもかかわらず、これまでその研究はほとんど行われてこなかった。そのため、本疾病が発生したとき取るべき対策を講じるのに必要な知見が著しく不足していた。そこで、本研究では、病原体の同定、検出・診断法の開発、感染実験による病原体の生物学的特性の検討、野外調査の4部からなる病原生物学的研究を行った。その結果、現状で本疾病に取るべき対策を提案するに至った。しかし、未解明な部分は多く残されており、今後も調査研究が必要なのは言うまでもない。以下に、本疾病に関する研究における今後の展望を記す。

本疾病への防疫対策を完成させるには、伝播に関わる全ての要因を把握することが必須である。本研究では、本疾病の原因となる粘液胞子虫 *E. leei* と *L. fugu* の感染環の一端が明らかにされたが、全容の解明には至らなかった。特に、天然魚および交互宿主の関与については一切の確証が得られなかった。しかし、疫学調査の結果、本疾病の原因寄生虫が必ずしも定着しない漁場の存在が示された。寄生虫が定着しないような漁場環境があるならば、無感染種苗の導入を徹底することで、いったん漁場に成立した感染環を断ち切ることが可能になるかもしれない。天然魚や他の養殖魚および交互宿主の関与も含めて、各漁場環境について個別かつ詳細な検討を行うことが必要である。その際には、本研究で開発した PCR 法が有用であろう。感染環の全容が明らかになった暁には、トラフグ養殖に適した漁場の選定や、漁場環境の改良といった対策が現実的なものになるかもしれない。

本疾病への対策として、ワクチンなどの免疫療法を開発することは可能だろうか。Sitjà-Bobadilla et al. (2004) は、*E. leei* の近縁種である *E. scophthalmi* に感染したターボットが *E. scophthalmi* に対する特異抗体を産生することを実験的に証明し、さらに、*E. scophthalmi* の流行を生き延びたターボットが、再感染しても発症しなかったことから、獲得免疫の存在を示唆した。本疾病については、これまでに免疫学的研究は行われておらず、感染個体が免疫を獲得することを示すような現象も観察されていない。そのため、本疾病に対するワクチン療法を実現するには、まず、特異抗体の有無や再感染に対する防御能の有無

といった基礎的知見を集積することが必要である。その点、本研究(第四章)において、*E. leei* の寄生部位が腸前部から後部へと移行し、時間経過とともに腸前部における寄生率が減少するという現象が観察され、新規感染を防げば感染魚が自然治癒する可能性が示されたことは興味深い。自然治癒の有無について調べる際には、Non-lethal PCR 検出法が有用であろう。なぜなら、この方法を用いれば検体を殺さず検査できるため、同一個体の感染状況を経時的に調べることが可能だからである。本疾病に対するトラフグの生体防御能については、今後の研究の進展が望まれる。

宿主となる魚の系群によって粘液胞子虫症に対する感受性が異なることが *C. shasta* や *M. cerebralis* において報告されている (Bartholomew 1998; Hedrick et al. 1999b)。トラフグの系群による本疾病に対する感受性の違いに関する研究はないが、感受性の低い個体を親魚として用いることで選抜育種をし、耐性を持つ種苗を作製できれば、被害を軽減することができるようになるかもしれない。

免疫療法や、耐病性系群の育種を検討するためには、定量的で再現性のある感染実験系が必要となる。本研究で用いた、感染魚の腸管を経口投与する方法では、*E. leei* を定量化することができない。そのため、実験ごとに投与する虫体の数が異なるという問題があった。その点、寄生虫懸濁液を用いた浸漬法では、実験に供する虫体数を定量化することが出来る。本研究では、懸濁液を作製する際に用いた *E. leei* 感染トラフグに *Enteromyxum fugu* が混合感染していたため、*E. leei* を定量化するには至らなかった。しかし、本研究によって、マダイに経水感染させることで *E. fugu* を除去できる可能性が示されたことから、混合感染の問題は乗り越えられるかもしれない。近い将来、定量的な感染実験を確立することは十分可能であると考えられる。

本疾病が初めて報告されてから約 10 年が経過し、感染域は全国的な広がりを見せている。有効な治療法や駆虫法がない現状では、非汚染水域や無感染群を感染から守るという予防対策が本疾病への唯一の対応策である。しかし、海という開放的な環境下で養殖を行う以上、完全な予防は事実上不可能といっても過言ではない。そのため、トラフグの生体防御能を利

用した対策や、駆虫法などの一刻も早い開発が望まれる。今後は、病原体の生物学的特性だけでなく、宿主であるトラフグの生理学的な側面も含めて、多角的に調査研究を行っていくことが必要であると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、その端緒を与えてくださり、また終始御指導、御助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻魚病学研究室 小川和夫教授に深く感謝いたします。同研究室 良永知義助教授には、本研究内容について多くの御助言を賜りました。ここに感謝いたします。さらに、実験を行う上での必要な知識、技術などの具体的な御指導を頂きました同研究室 横山博助手に厚く御礼申し上げます。

本論文の御校閲を賜りました東京大学農学部附属水産実験所 鈴木讓教授、東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻応用免疫学研究室 松本芳嗣助教授、独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所病害防除部 飯田貴次部長に深く感謝いたします。

本研究の多くは熊本県水産研究センターにて行いました。熊本県水産研究センター養殖研究部 中野平二氏、野村昌功氏、斉藤剛氏、浜田峰雄氏、食品加工研究部 国武浩美氏、資源研究部 村上清典氏、浅海干潟研究部 那須博史氏、企画情報室 清田季義氏を始めとする職員の皆様方と臨時職員の皆様方、熊本県林務水産部 木村武志氏、鮫島守氏、中根基行氏には、研究面に留まらず様々な御助言、御援助を賜りました。厚く御礼申し上げます。藤田忠勝氏には、実験魚の飼育管理等に関して、長年の経験と豊富な知識に基づいた非常に貴重な御助言を頂きましたことを心より御礼申し上げます。

熊本県御所浦町水産農林課 岩崎雅彦氏、福部智一氏、大分県海洋水産研究センター水産試験場 福田穰氏、三吉泰之氏、大分県農林水産部 浅井隆元氏、長崎県総合水産試験場 高見生雄氏、横山文彦氏、長崎県対馬水産業普及指導センター 杉原志貴氏、福井県水産試験場 高垣守氏、鹿児島県水産時術開発センター 平江多績氏、鹿児島県林務水産部 竹丸巖氏、宮崎県農政水産部 安田広志氏、愛媛県農林水産部 板野公一氏、高知県海洋局 西山勝氏と各県の養殖業者の皆様方には、実験材料の採集等に際して惜しみないご協力を賜り、貴重なご意見を頂きましたことを深く感謝いたします。

社団法人日本水産資源保護協会 岩下誠氏、ルイジアナ州立大学 伊藤直樹氏、財団法人日本生物科学研究所 堤信幸氏、ブリストル大学 白樫正氏、スターリング大学 Mark Freeman 氏には、本研究を進める上で懇切丁寧な御指導と貴重な御助言を頂きました。ここに御礼申し上げます。

学魚病学研究室の皆様には、日頃から非常に有用な御助言を頂き、また快く相談相手になって頂きました。心から感謝いたします。

最後に、常に心の支えとなってくれた家族に最大の感謝を捧げます。

引用文献

- Anderson, C. L., Canning, E. U., Schafer, S. M., Yokoyama, H. & Okamura B. 2000. Molecular confirmation of *Thelohanellus hovorkai* Achmerov, 1960 (Myxozoa: Myxosporea). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.*, **20**: 111-115.
- Antonio, D. B., Andree, K. B., McDowell, T. S. & Hedrick, R. P. 1998. Detection of *Myxobolus cerebralis* in rainbow trout and oligochaete tissues by using a nonradioactive in situ hybridization (ISH) protocol. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**: 338-347.
- Antonio, D. B., El-Matbouli, M. & Andree, K. B. 1999. Detection of early developmental stages of *Myxobolus cerebralis* in fish and tubificid oligochaete hosts by in situ hybridization. *Parasitol. Res.*, **85**: 942-944.
- Bartholomew, J. L. 1998. Host resistance to infection by the myxosporean parasite *Ceratomyxa shasta*: a review. *J. Aquat. Anim. Health*, **10**: 112-120.
- Bonndad-Reantaso, M. G., Ogawa, K., Fukudome, M. & Wakabayashi, H. 1995. Reproduction and growth of *Neobenedenia girellae* (Monogenea: Capsalidae), a skin parasite of Japanese cultured marine fish. *Fish Pathol.*, **30**: 227-231.
- Branson, E., Riaza, A. & Alvarez-Pellitero, P. 1999. Myxosporean infection causing intestinal disease in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), (Teleostei: Scophthalmidae). *J. Fish Dis.*, **22**: 395-399.
- Canning, E. U., Curry, A., Feist, S. W., Longshaw, M. & Okamura, B. 2000. A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). *J. Eukaryot. Microbiol.*, **47**: 456-468.
- Chambers, C. B. & Ernst, I. 2005. Dispersal of the skin fluke *Benedenia seriolae* (Monogenea: Capsalidae) by tidal currents and implications for sea-cage farming of *Seriola* spp. *Aquaculture*, **250**: 60-69.
- Colomi, A. 1985. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans* and hyposalinity as a control measure in cultured gilt-head sea bream, *Sparus aurata*. *Dis. Aquat. Org.*, **1**: 19-22.
- Colomi, A. 1987. Biology of *Cryptocaryon irritans* and strategies for its control. *Aquaculture*, **67**: 236-237.

Diamant, A. 1992. A new pathogenic histozoic *Myxidium* (Myxosporea) in cultured gilt-head sea bream *Sparus aurata* L. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **12**: 64-66.

Diamant, A. 1997. Fish-to-fish transmission of a marine myxosporean. *Dis. Aquat. Org.*, **30**: 99-105.

Diamant, A. 1998. Red drum *Sciaenops ocellatus* (Sciaenidae), a recent introduction to Mediterranean mariculture, is susceptible to *Myxidium leei* (Myxosporea). *Aquaculture*, **162**: 33-39.

Diamant, A. & Wajsbrodt, N. 1997. Experimental transmission of *Myxidium leei* in gilt head sea bream *Sparus aurata*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **17**: 99-103.

Diamant, A., Lom, J. & Dykova, I. 1994. *Myxidium leei* n. sp., a pathogenic myxosporean of cultured sea bream *Sparus aurata*. *Dis. Aquat. Org.*, **20**: 137-141.

Dickerson, H. W. & Dawe, D. L. 1995. *Ichthyophthyrus multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). *Fish disease and disorders. Vol. 1. Protozoan and metazoan infections* (ed. by Woo, P. T. K.). CAB International, Wallingford: 181-227.

Egusa, S. 1985. *Myxobolus buri* sp. n. (Myxosporea: Bivalvulida) parasitic in the brain of *Seriola quinqueradiata* Temminck et Schlegel. *Fish Pathol.*, **19**: 239-244.

Egusa, S. & Nakajima, K., 1980. *Kudoa amamiensis* sp. n. (Myxosporea: Multivalvulida) found in cultured yellowtails and wild damselfishes from Amami-ohshima and Okinawa, Japan. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **46**: 1193-1198.

El-Matbouli, M. & Hoffmann, R. W. 1991. Effects of freezing, aging, and passage through the alimentary canal of predatory animals on the viability of *Myxobolus cerebralis* spores. *J. Aquat. Anim. Health*, **3**: 360-262.

Ferguson, H. W. 1981. The effect of water temperature on the development of proliferative kidney disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish Dis.*, **4**: 175-177.

Fox, M. D., Palenzuela, O. & Bartholomew, J. L. 2000. Strategies for diagnosis of *Ceratomyxa shasta* using PCR: comparison of lethal and non-lethal sampling with microscopic examination. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**: 100-106.

Gonzalez, S. F., Krug, M. J., Nielsen, M. E., Santos, Y. & Call, D. R. 2004. Simultaneous detection of

marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray. 2004. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 1414-1419.

Hallett, S. L., Erséus, C. & Lester, R. J. G. 1999. Actinosporeans (Myxozoa) from marine oligochaetes of the Great Barrier Reef. *Syst. Parasitol.*, **44**: 49-57.

Hedrick, R. P., McDowell, T. S., Gay, M., Marty, G. D., Georgiandis, M. P. & MacConnell, E. 1999a. Comparative susceptibility of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and brown trout *Salmo trutta* to *Myxobolus cerebralis*, the cause of salmonids whirling disease. *Dis. Aquat. Org.*, **37**: 173-183.

Hedrick, R. P., McDowell, T. S., Mukkarita, K., & Georgiandis, M. P. 1999b. Susceptibility of selected inland salmonids to experimentally induced infections with *Myxobolus cerebralis*, the causative agent of whirling disease. *J. Aquat. Anim. Health*, **11**: 330-339.

Hedrick, R. P., McDowell, T. S., Marty, G. D., Mukkatira, K., Antomio, D. B., Andree, K. B., Bukhari, Z. & Clancy, T. 2000. Ultraviolet irradiation inactivates the waterborne infective stages of *Myxobolus cerebralis*: a treatment for hatchery water supplies. *Dis. Aquat. Org.*, **42**: 53-59.

Higgins, M. J. & Kent, M. L. 1998. TNP-470, the analogue of fumagillin-DCH, controls PKX in naturally infected sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum), underyearlings. *J. Fish Dis.*, **21**: 455-457.

石松 惇 2002. 「やせ病」トラフグの生理学的特徴. 平成 12 年度～平成 13 年度科学研究費補助金研究成果報告書. 基盤研究 (B)(2): 55-70.

Kent, M. L. 1999. A myxozoan resembling *Myxidium leei* in the anemone fish *Amphiprion frenatus* from the Pacific Ocean. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **19**: 42-43.

Kent, M. L. & Lom, J. 1999. Can a new species of Myxozoa be described based solely on their actinosorean stage? *Parasitol. Today*, **15**: 472-473.

Kent, M. L., Margolis, L. & Corliss, J. O. 1994. The demise of a class of protists: taxonomic and nomenclatural revisions proposed for the protist phylum Myxozoa Grasse, 1970. *Can. J. Zool.*, **72**: 932-937.

Kent, M. L., Andree, K. B., Bartholomew, J. L., El-Matbouli, M., Desser, S. S., Devlin, R. H., Feist, S. W., Hedrick, R. P., Hoffmann, R. W., Khattra, J., Hallett, S. L., Lester, R. J. G., Longshaw, M.,

Palenzuela, O., Siddall, M. E. & Xiao, C. 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **48**: 395-413.

Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, **16**: 111-120.

Køie, M. 2005. The Spionidae (Polychaeta) act as invertebrate hosts for marine Myxozoa. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **25**: 179-181.

Køie, M., Whipps, M. & Kent, M. L. 2004. *Ellipsomyxa gobii* (Myxozoa: Ceratomyxidae) in the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei: Gobiidae) uses *Nereis* spp. (Annelida: Polychaeta) as invertebrate hosts. *Folia Parasitol.*, **51**: 14-18.

熊本県 2001. トラフグの病気とその対策. *トラフグ養殖マニュアル*. 67-99.

黒原 健郎 2005. 養殖衛生管理体制整備事業. 平成 15 年度高知県水産試験場事業報告書. 135-140.

Langdon, J. S., Throne, T. & Fletcher W. J. 1992. Reservoir hosts and new clupeoid host records for the myoliquefactive myxosporean parasite *Kudoa thyrsites*. *J. Fish Dis.*, **15**: 459-471.

Le Breton, A. & Marques, A. 1995. Occurrence of a histozoic *Myxidium* infection in two marine cultured species: *Puntazzo puntazzo* C. and *Pagrus major*. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **15**: 210-212.

Lester, R. J. G., Hallet, S. L., El-Matbouli, M. & Canning, E. U. 1998. The case for naming actinosporeans using the Zoological Code. *Parasitol. Today*, **14**: 476-477.

Lester, B., Hallet, S., El-Matbouli, M. & Canning, E. 1999. Can a new species of Myxozoa be described based solely on their actinosorean stage? Reply. *Parasitol. Today*, **15**: 508.

Liyanage, Y., Yokoyama, H. & Wakabayashi, H. 2002. Evaluation of a vector-control strategy of haemorrhagic *Thelohanellus hovorkai* (Myxozoa). *Dis. Aquat. Org.*, **55**: 31-35.

Lom, J. & Arthur, J. R. 1989. A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporidia. *J. Fish Dis.*, **12**: 151-156.

Lom, J. & Dyková, I. 1992. Protozoan Parasites of Fishes. Elsevier, New York. 315 pp.

Markiw, E. M. 1992. Experimentally induced whirling disease II. Determination of longevity of the infective triactinomyxon stage of *Myxobolus cerebralis* by vital staining. *J. Aquat. Anim. Health*, **4**: 44-47.

松本 浩一 1963. 魚肉のジェリーミートについて. *Jap. Food Sci.*, **2**: 67-73.

宮崎県水産試験場 2001. トラフグのやせ病の防除・治療法に関する研究. 平成 12 年度魚病対策技術開発研究成果報告書. (社)日本水産資源保護協会: 23-30.

宮崎県水産試験場 2002. トラフグのやせ病の防除・治療法に関する研究. 平成 13 年度魚病対策技術開発研究成果報告書. (社)日本水産資源保護協会: 17-24.

Morris, D. J., Adams, A., Feist, S. W., MacGeorge, J. & Richards R. H. 2000. Immunohistochemical and PCR studies of wild fish for *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX), the causative organism of proliferative kidney disease. *J. Fish Dis.*, **23**: 129-135.

Morris, D. C., Morris, D. J. & Adams, A. 2002. Development of improved PCR to prevent false negative in the detection of *Tetracapsula bryosalmonae*, the causative agent of proliferative kidney disease. *J. Fish Dis.*, **25**: 483-490.

Nakane, M., Ogawa, K., Fujita, T., Sameshima, M. & Wkabayashi, H. 2005. Acquired protection of tiger puffer *Takifugu rubripes* against infection with *Heterobothrium okamotoi* (Monogenea: Diclidophoridae). *Fish Pathol.* **40**: 95-101.

直良 信夫 1998. 青森県最花貝塚の脊椎動物遺体. *動物考古学*, **11**: 99 – 108.

日本魚病学会編集委員会. 2004. 選定された魚病名. *Fish Pathol.*, **39**: 223-233.

Ogawa, K. 1997. Copulation and egg production of the monogenean *Heterobothrium okamotoi*, a gill parasite of cultured tiger puffer (*Takifugu rubripes*). *Fish Pathol.*, **32**: 219-223.

小川 和夫 2004. 単生虫病. 魚介類の感染症・寄生虫病. (若林 久嗣・室賀 清邦編): 353-379.

Ogawa, K. & Inouye, K. 1997. *Heterobothrium* infection of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* – experimental infection. *Fish Pathol.*, **32**: 21-27.

Ogawa, K. & Yokoyama, H. 1998. Parasitic diseases of cultured marine fishes in Japan. *Fish Pathol.*, **33**: 303-309.

Ogawa, K. & Yokoyama, H. 2001. Emaciation disease of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., Suppl.*, **5**: 65-70.

Ogawa, K., Bondad-Reantaso, M. G., Fukudome, M. & Wakabayashi, H. 1995. *Neobenedenia girellae* (Hargis, 1955) Yamaguti, 1963 (Monogenea; Capsalidae) from cultured marine fishes in Japan. *J. Parasitol.*, **81**: 223-227.

小栗 幹郎 1991. 排出・浸透調節. 新版魚類生理学概論 (田村 保編) :104-127.

Padros, F., Palenzuela, O., Hispano, C., Tosas, O., Zaraza, S., Crespo, S. & Alvarez-Pellitero, P. 2001. *Myxidium leei* (Myxozoa) infections in aquarium-reared Mediterranean fish species. *Dis. Aquat. Org.*, **47**: 57-62.

Palenzuela, O., Redondo, M. J. & Alvarez-Pellitero, P. 2002. Description of *Enteromyxum scopthalmi* gen. nov., sp. nov. (Myxozoa), an intestinal parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) using morphological and ribosomal RNA sequence data. *Parasitology*, **124**:369-379.

Redondo, M. J., Palenzuela, O., Riaza, A., Macias, A. & Alvarez-Pellitero, P. 2002. Experimental transmission of *Enteromyxum scopthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *J. Parasitol.*, **88**: 482-488.

Redondo, M. J., Palenzuela O. & Alvarez-Pellitero, P. 2003. *In vitro* studies on viability and proliferation of *Enteromyxum scopthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Dis. Aquat. Org.*, **55**: 133-144.

Redondo, M. J., Palenzuela O. & Alvarez-Pellitero, P. 2004. Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scopthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitol.*, **51**: 188-198.

Russell, S., Fraska Jr. S., Sunila, I. & French, R. A. 2004. Application of a multiplex-PCR for the detection of protozoan pathogens of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in field samples. *Dis. Aquat. Org.*, **59**: 85-91.

Sakiti, N., Tarer, V., Jacquemin, D. & Marques, A. 1996. Presence en Mediterranee occidentale d'une

Mixosporidie histozoique pathogene dans les elevages du daurade *Spauis aurata*. *Ann. Sci. Nat. Zool., Paris*, **17**: 123-127.

鮫島 守 1999. トラフグのヤセ病について. *アクアネット*, **5**: 65-70.

Saulnier, D. & de Kinkelin, P. 1997. Polymerase chain reaction primers for investigations on the causative agent of proliferative kidney disease of salmonids. *J. Fish Dis.*, **20**: 467-470.

Schelegel, M., Lom, J., Stechmann, A., Bernhard, D., Lipe, D., Dykova, I. & Sogin, M. L. 1996. Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehni*: evidence that Myxozoa are Metazoa and related to the bilateria. *Arch. Protistenkd.*, **147**: 1-9.

Sitjà-Bobadilla, A., Redondo, M. J., Macias, M. A., Ferreiro, I., Riaza, A. & Alvarez-Pellitero, P. 2004. Development of immunohistochemistry and enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of circulating antibodies against *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish & Shellfish Immunol.*, **17**: 335-345.

Sugiyama, A., Yokoyama, H. & Ogawa, K. 1999. Epizootiological investigation on kudoosis amami caused by *Kudoa amamiensis* (Multivalvulida : Myxozoa) in Okinawa prefecture, Japan. *Fish Pathol.* **34**: 39-43.

Swofford, D. L. 1999. PAUP – phylogenetic analysis using parsimony, version 4.0. Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, MA.

Szekely, C. S., El-Mansy, A., Molnar, K. & Baska, F. 1998. Development of *Thelohanellus hovorkai* and *Thelohanellus nikolskii* (Myxosporia: Myxozoa) in oligochaete alternate hosts. *Fish Pathol.*, **33**: 107-114.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **25**: 4876-4882.

Tin Tun. 2000. Myxosporean and hyperparasitic microsporean infections in the intestine of cultured tiger puffer. PhD thesis, The University of Tokyo, Japan. 18 pp.

Tin Tun, Ogawa, K. & Wakabayashi, H. 2002. Pathological changes induced by three myxosporeans

in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *J. Fish Dis.*, **25**: 63-72.

Tin Tun, Yokoyama, H., Ogawa, K. & Wakabayashi, H. 2000. Myxosporeans and their hyperparasitic microsporeans in the intestine of emaciated tiger puffer. *Fish Pathol.*, **35**:145-156.

Tipping, J. M. 1988. Ozone control of ceratomyxosis: Survival and growth benefits to steelhead and cutthroat trout. *Prog. Fish-Cult.*, **50**: 202-210.

van Herwerden, L., Gasser, R. B. & Blair, D. 2000. ITS-1 ribosomal DNA sequence variants are maintained in different species and strains of *Echinococcus*. *Int. J. Parasitol.*, **30**: 157-169.

Wakabayashi, H. 1996. Importation of aquaculture seedlings to Japan. *Rev. Sci. Tech. OIE*, **15**: 409-422.

Whipps, C. M., El-Matbouli, M., Hedrick, R., Blazer, V. & Kent, M. L. 2004. *Myxobolus cerebralis* internal transcribed spacer 1 (ITS-1) sequences support recent spread of the parasite to North America and within Europe. *Dis. Aquat. Org.*, **60**: 105-108.

Whitaker, J. W., Pote, L. M., Khoo, L., Shivaji, R. & Hanson, L. A. 2001. The use of polymerase chain reaction assay to diagnose proliferative gill disease in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *J. Vet. Diagn. Invest.*, **13**: 394-398.

Wolf, K. 1986. Salmonid whirling disease: status in the United States, 1985. *J. Wildl. Dis.*, **22**: 295-299.

Wolf, K. & Markiw, M. E. 1984. Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: New discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science*, **225**:1449-1452.

安田 治三郎 1960. フグの畜養と養殖. 水産増殖, 7: 31 – 40.

Yasuda, H., Ooyama, T., Iwata, K., Tin Tun, Yokoyama, H. & Ogawa, K. 2002. Fish-to-fish transmission of *Myxidium* spp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. *Fish Pathol.*, **37**:29-33.

Yasuda, H., Ooyama, T., Nakamura, A., Iwata, K., Palenzuela O. & Yokoyama, H. 2005. Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder

Paralichthys olivaceus. *Fish Pathol.*, **40**: 175-180.

Yokoyama, H. 1997. Transmission of *Thelohanellus hovorkai* Achmerov, 1960 (Myxozoa: Myxosporea) to common carp *Cyprinus carpio* through the alternate oligochaete host. *Syst. Parasitol.*, **36**: 79-84.

Yokoyama, H. 2003. A review: gaps in our knowledge on myxozoan parasites of fishes. *Fish Pathol.*, **38**: 125-136.

Yokoyama, H. 2004. Life cycle and evolutionary origin of Myxozoan parasites of fishes. *Jpn. J. Protozool.*, **37**: 1-9.

Yokoyama, H., Ogawa, K. & Wakabayashi, H. 1993. Some biological characteristics of actinospores from the oligochaete *Branchiura sowerbyi*. *Dis. Aquat. Org.*, **17**: 223-228.

Yokoyama, H., Kim, J.-H., Sano, M. & Hirano, K. 1996. Fluorochrome Uvitex 2B stain for detection of the microsporidian causing beko disease of yellowtail and goldstriped amberjack juveniles. *Fish Pathol.*, **31**: 99-104.

Yokoyama, H., Ogawa, K. & Wakabayashi, H. 1997. A vital staining technique with fluorescein diacetate (FDA) and propidium iodide (PI) for the determination of viability of myxosporean and actinosporean spores. *J. Fish Dis.*, **20**: 281-286.

Yokoyama, H., Inoue, D., Sugiyama, A. & Wakabayashi, H. 2000. Polymerase chain reaction of *Kudoa amamiensis* (Multivalvulida: Myxozoa) in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathol.*, **35**: 157-162.

Yokoyama, H., Freeman, M. A., Yoshinaga, T. & Ogawa, K. 2004a. *Myxobolus buri*, the myxosporean parasite causing scoliosis of yellowtail, is synonymous with *Myxobolus acanthogobii* infecting the brain of the yellow goby. *Fish. Sci.*, **70**: 1036-1042.

Yokoyama, H., Whipps, C. M., Kent, M. L., Mizuno, K. & Kawakami, H. 2004b. *Kudoa thyrsites* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: causative myxozoans of post-mortem myoliquefaction. *Fish Pathol.*, **39**: 79-85.

Yokoyama, H., Freeman M. A., Itoh, N. & Fukuda, Y. 2005. Spinal curvature of cultured Japanese mackerel *Scomber japonicus* associated with a brain myxosporean, *Myxobolus acanthogobii*. *Dis.*

Aquat. Org., **66**: 1-7.

良永 知義 1998. 海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* の防疫と対策. 月刊海洋, 号外, **14**: 73-76.

Yoshinaga, T. 2001. Effects of high temperature and dissolved oxygen concentration on the development of *Cryptocaryon irritans* (Ciliophora) with a comment on the autumn outbreaks of cryptocaryoniasis. *Fish Patol.*, **36**: 231-235.

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. トラフグ養殖管理指針.

論文の内容の要旨

水圏生物科学専攻
平成 15 年度博士課程進学
柳田哲矢
指導教員 小川和夫

論文題目 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

1996 年以降、養殖トラフグの粘液胞子虫性やせ病が深刻な問題となっている。病魚は著しいやせ症状を呈し、死亡する。病魚の腸管には、粘液胞子虫 *Leptotheca fugu* と *Myxidium fugu*、および *Myxidium* sp. TP の寄生が見られるが、*L. fugu* と *Myxidium* sp. TP は腸管上皮組織に病理変化を引き起こし、本病の原因となっている。一方で *M. fugu* には病害性はないと考えられている。

本病の重要性にも関わらず、病原体の分類学的検討は不十分であり、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いない。なぜなら、本病には病原体が複数存在し、それらが通常は胞子を形成しないことが研究の進展を妨げてきたからである。そこで本研究では、本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。まず形態と遺伝子を用いて病原体の分類学上の位置を確定した。次に、PCR を用いた感度の高い検出・診断法を開発した。さらに、養殖場での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。

1. 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

粘液胞子虫の同定は主に胞子の形態によるが、*Myxidium* sp. TP は、トラフグ体内で胞子形成しないために種レベルで同定されていない。また *M. fugu* の分類も再検討が必要と考えられた。そこで、形態と遺伝子によって両種の分類を再検討した。また、近年発生した養殖マダイとイシガキダイの粘液胞子虫性やせ病の病原体を同定した。

1-1. *Myxidium fugu* と *Myxidium* sp. TP の分類の再検討

Myxidium sp. TP については、マダイに人為的に感染させることにより、胞子を得ることに成功した。その胞子の形態はヨーロッパで報告されている *Enteromyxum leei* と一致した。また、トラフグから得た *M. fugu* の胞子の形態は、*Enteromyxum* 属の形態学的特徴をよく満たした。次に、寄生虫の small subunit

ribosomal RNA (SSU rRNA) 遺伝子の解析を行った。その結果、*Myxidium* sp. TP の塩基配列は *E. leei* と 99.6% の一致度を示し、形態観察の結果を支持した。また、*M. fugu* は *Enteromyxum* 属粘液胞子虫と単系統のクラスターを組んだ。以上の結果から、*Myxidium* sp. TP を *E. leei* と同種とし、*M. fugu* を *Enteromyxum fugu* として分類を確定した。

1-2. 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

鹿児島県の養殖マダイとイシガキダイ病魚から得られた胞子の形態は、*E. leei* と一致した。また、寄生虫の SSU rRNA 遺伝子の解析でも、その塩基配列はトラフグの *E. leei* と 100% 一致した。以上の結果から、本病が *E. leei* を原因とする粘液胞子虫性やせ病であることを明らかにし、*E. leei* の宿主特異性が低いことを再確認した。すなわち、*E. leei* の養殖場での感染環に天然魚も含めて様々な魚種が関与している可能性が示された。

2. PCR 法を用いた腸管寄生粘液胞子虫検出法の開発

従来、本病は寄生虫の形態観察により診断されてきた。しかし、栄養体が多様な形態を持つうえに、しばしば 3 種が混合寄生するため、従来法での診断は容易ではなかった。そこで、PCR を利用した簡便かつ精度の高い診断法の開発を試みた。

3 種の粘液胞子虫の SSU rRNA 遺伝子領域に、それぞれに特異的な 3 組のプライマーセットを作製し、PCR 反応の条件検討を行った。その結果、各寄生虫に特異的かつ感度が高い PCR 診断法を開発した。また、綿棒で肛門から採取した腸内容物を検査試料とすることで、検体を殺さずに検査する方法を開発した。これにより、従来よりも信頼性が高く簡便な診断法が開発され、本病の疫学調査を行うための技術的基盤が構築された。

3. 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

寄生虫感染症の防除には、病原体の感染環と生物学的性質を理解することが重要である。そこでまず、*E. leei* について、発育に水温が与える影響、海水中での感染力維持時間、トラフグから他魚種への伝播の有無を検証した。さらに、これまでに人為感染の成功例がない *L. fugu* の感染実験を試みた。

3-1. 水温が *Enteromyxum leei* の発育に及ぼす影響

無感染トラフグに感染魚の腸管を経口投与し、水温 15°C、20°C、25°C で 33 日飼育した。その結果、20°C では 19 日、25°C では 12 日目以降に感染が認められたが、15°C では寄生が確認されなかった。次に、20°C で感染させた後に飼育水温を 10°C まで下げ、長期飼育実験を行った。その結果、試験開始後 12 週目に 9 尾中 1 個体で *E. leei* が検出された。以上の結果より、*E. leei* のトラフグ腸管内での発育・増殖は低水温によって抑制されるものの、10°C でも生き残ることが証明され、養殖場で越冬魚（1 才魚）が翌年の種苗への感染源となっていることが示唆された。

3-2. *Enteromyxum leei* 栄養体の海水中での感染力

感染魚の腸管内壁を擦り取り、滅菌海水に加えて 20°C で 0~48 時間静置した懸濁液に無感染トラ

フグを浸漬した。その結果、*E. leei* の感染力は、海水中で 24 時間は維持されることが明らかになり、養殖場で虫体が感染力を残したまま広範囲に拡散していることが示唆された。

3-3. トラフグからマダイへの *Enteromyxum leei* の感染実験

マダイを感染トラフグと同居飼育および、感染トラフグの飼育排水中で飼育した。その結果、同居でも排水中で飼育でもマダイへの感染が成立した。この結果から、養殖場でトラフグとマダイという異なる魚種間で本病が伝播する可能性が示された。

3-4. *Leptotheca fugu* の感染実験

感染魚の腸管を無感染トラフグに経口投与し、水温 25℃で 5 週間飼育した。その結果、試験期間を通じて試験魚に *L. fugu* の感染は確認されず、人為感染は成立しなかった。この結果、*L. fugu* は魚から魚へ直接伝播せず、感染環を完結するためには交互宿主が必要であると推察された。

4. 腸管寄生粘液胞子虫の養殖場における寄生動態

養殖場での本病の発生と感染拡大を制御するためには、現在の発生状況を把握する必要がある。しかし、これまでは診断法がなかったために全国的な分布調査は行われなかった。また、病原体の感染環を解明する上で、季節性や地域性を知ることは重要である。そこで、PCR 診断法を用いて養殖場での疫学調査を行った。

4-1. 養殖場での季節変動

熊本県、長崎県、大分県、福井県の養殖トラフグを、種苗導入時（6-7 月）から出荷（翌年 10-12 月）まで毎月あるいは隔月 20 尾ずつ採材し、*E. leei* と *L. fugu* の寄生率を調査した。その結果、*E. leei* は熊本、長崎、大分では 11 月から翌 2 月に高い寄生率を示し、本病の発症個体が多く見られ始める時期と一致した。その後寄生率は低下し、熊本と大分では翌 5-6 月に 0%になったが、7 月以降に再び上昇した。福井では調査期間を通じて比較的低い寄生率（0-30%）で推移し、発症個体は見られなかった。このように、福井県における *E. leei* の寄生状況は他県と異なった。これは低水温によって *E. leei* の発育・増殖が抑制されているからと考えられた。*L. fugu* は、長崎と福井でのみ寄生が確認された。長崎では 12 月から翌 2 月にかけて高い寄生率（50-60%）を示した。一方、福井では種苗導入時（6 月）にすでに感染しており、感染種苗が人為的に動かされていることが明らかになった。導入時の寄生率は 10%であったが、10 月に 5%を示して以降は検出されず、漁場に定着しなかったようである。なお、長崎県での調査期間が短かったため、*L. fugu* の季節性については明らかに出来なかった。

4-2. 長崎県下での一斉調査

2004 年（9-11 月）と 2005 年（12 月）に長崎のトラフグ養殖場で一斉調査を行った。調査尾数は、2004 年が 1228 尾（63 地点）、2005 年が 496 尾（50 地点）であった。その結果、全体としては *E. leei*、*L. fugu* ともに感染域は調査年により異なった。2 年連続で感染していた漁場や、逆に 2 年とも感染が見られなかった漁場が存在した一方、2004 年に陽性で翌年に陰性になった漁場があり、一度漁場が

汚染されても必ずしも定着しない可能性が示された。3 箇所の養殖生け簀の近傍で採集したトラフグ以外の天然魚 60 尾 (4 目 15 種) からは *E. leei* も *L. fugu* も検出されなかったが、調査地点および個体数が少なく、天然魚が本病の伝播に関与していないと断定するには不十分であると考えられた。

考察

現在のトラフグ養殖で用いられる種苗は全て人工生産されたものであり、活魚輸送技術の発達により、時に数百 km 離れた漁場に導入される。しかし、導入前の魚病診断は必ずしも行われておらず、特に本病にはこれまで信頼性の高い診断法がなかったため、感染魚の移動を防ぐ手だてがなかった。現に、本研究では感染種苗が養殖場に導入された例が見つかった。本病の原因となる *E. leei* は魚から魚へ直接伝播するため、こうして全国に広がったと推察される。

それでは、有効な薬剤や駆虫法がない現状で本病に取りうる対策はどのようなものがあるだろうか？まずは、当然のことながらこれ以上本病を拡散させないことである。野外調査の結果、本病に無感染の漁場が存在したが、このような水域を守るためには、無感染の種苗を供給することが最も重要である。次に、中間魚も含み、魚を移動する際には寄生虫検査を徹底すべきである。本研究の PCR 法は、従来法よりも簡便で精度・感度が高く、また、魚を殺さずに検査することも出来る。本法を活用することにより生産者と魚病検査機関が一体となった防疫体制を構築していくことが、これ以上の人為的拡散を防ぐには必要である。

感染実験からは、*E. leei* はトラフグだけを介しても漁場に定着しうると考えられた。*L. fugu* については交互宿主の感染環への関与が示唆され、一度感染環が成立すればそこに定着すると思われる。現に両種とも、2 年連続で陽性の漁場が存在し、定着している可能性が示された。しかし一方、2004 年に陽性で翌年に陰性となった漁場もあった。本病が定着しないような漁場環境があるならば、無感染種苗の導入を徹底することで感染環を断ち切ることが可能かもしれない。今後は、天然魚や他の養殖魚および交互宿主の関与も含めて、各漁場環境について個別のかつ詳細な検討を行うことが必要である。

本病への防疫対策を完成させるには、伝播に関わる全ての要因を把握することが必須である。本研究では、病原体の伝播について新たな知見を得たが、その全容は明らかに出来なかった。今後も本病の感染環を解明するべく調査研究を進めていくことが必要である。