

魚類養殖における新たな寄生虫防除技術の開発

増養殖環境課 齋田 尚希・谷口 越則

1 背景・目的

海面養殖では、寄生虫症による漁業被害が頻発しており、その中には魚体に対し致死性を有するもの（白点病、心臓ヘネガヤ症など）と、商品価値を低下させるもの（べこ病、ディディモシスチス症など）などがある。特に本県では、白点虫とべこ病による寄生虫症が大きな問題となっている。

白点病は、原因となる白点虫 *Cryptocaryon irritans* がその生活環の中で養殖魚等の体表や鰓に寄生することで引き起こされる病気であり、重度の寄生を受けた魚は、浸透圧調節障害や呼吸機能の低下により死亡する。高知県内では主に野見湾で問題となっており、過去には十数億円規模の被害も発生している。白点虫の生活環はシスト期、遊走体期、寄生期及び離脱期を繰り返すことで成立する（良永 1998）。また、その生活環の中で1つのシストから最大で1,000個体程度の寄生能力を持つ仔虫（遊走体）を放出する（Digglesi and Adlard 1997）。成育に適した条件下では、1週間前後で生活環が1周し、そのたびに海水中の白点虫密度が数百倍以上にもなるため、被害が急激に発生する要因となっている。また、海面養殖における白点病に対して有効な薬剤・ワクチン等は開発されていない。したがって、白点病被害を軽減するためには、早期に白点虫の出現を検知し、出現海域から養殖小割を移動させるなどの対策を講じる必要がある。

べこ病は、ブリ稚魚（以下「モジャコ」という）で以前から知られており、微孢子虫ミクロスポリジウム・セリオレ (*Microsporidium seriolae*) がモジャコの筋肉中でシストを形成する病気である。通常は成長とともに治癒するが、重篤な場合は死亡や筋肉中にシスト痕が残存することによる商品価値の低下を招く（横山 2017）。近年、西日本の各地で重篤なべこ病が頻発しており、その対策が求められている。しかしながら、べこ病病原体である微孢子虫の生活環には不明な部分が多く、感染経路も判明していないため、抜本的な対策は確立されていない。

近年べこ病に対して、フェバンテルを主成分とした水産用医薬品（以下「フェバンテル」という。）の投薬効果が確認された。しかし、フェバンテルはべこ病に対して未承認であるため、使用承認に向けて関係機関が研究を進めている。ただし、フェバンテルの投薬効果はシスト形成の阻害であり、べこ病そのものを治癒するものではない。そのため、効果的な投薬を実施するには、予防的投薬が認められていない水産用医薬品の制度上、モジャコがべこ病に感染してシストを形成するまでに、べこ病に感染していることを確認する必要がある。

そこで本研究では、昨年度までに確立したリアルタイム PCR による検出法を用いて、白点虫及びべこ病病原体の遺伝子量を調査し、感染動態の把握及び早期検知技術の開発を試みた。さらに、白点虫については、昨年度に引き続き、養殖魚の寄生数調査とリアルタイム PCR 解析に使用するスタンダード作製等に用いるための白点虫の長期継代を行った。

2 方法

(1) 白点虫

1) 白点虫の長期継代

白点虫の長期継代は2基の200L水槽を使用し、止水条件で行った。シストの付着基板にはガラスシャーレを用い（図1）、供試魚には人工種苗のモジャコと、白点虫の発生海域で感染が確認されている天然のカサゴを用いた（松岡 1995）。水槽内の供試魚が白点病で死亡するまで無給餌・無換水で維持し、死亡後に水槽内のガラスシャーレを取り出し、付着しているシストごと、もう一方の水槽に新たな供試魚とともに収容した。以降、魚が死亡するたびに同様の手順で継代を行った。水温が低下する冬季にはヒーターを使用し、水温が22℃以下にならないよう調整した。

2) 養殖魚の白点虫寄生数調査

令和元年10月から12月までの期間において、野見湾で養殖されているカンパチ及びマダイを対象として週に1回程度の頻度で白点虫の寄生数調査を実施した（検査個体数；カンパチ14尾、マダイ22尾、平均魚体重；カンパチ769.5g（350.5～1025.3g）、マダイ680.4g（157.3～1207.5g））。調査では、個体ごとに鰓を取り出し、ウェットマウントで生物顕微鏡を用いて100鰓弁あたりの寄生数を数えた。

3) 野見湾における海水中の白点虫遺伝子量調査

令和元年10月11日から12月19日までの期間において、野見湾の主要なカンパチ養殖漁場であるガラク及び主要なマダイ養殖漁場である馬の背（図2）の海水を1週間に1回の頻度でサンプリングし、海水中の遺伝子量調査を実施した。白点虫の寄生や魚体からの離脱は夜間から早朝にかけて活発になるため（堅田 2009）、サンプリングは午前5時に実施し、水深0-10m（柱状採水）からそれぞれ採水し、各1Lを遺伝子量調査のサンプルとした。採水した海水は今城ら（2016）を参考に、孔径0.45 μ mのメンブレンフィルターで濃縮濾過し、フィルターからDNA抽出キット（QIAGEN社製 DNA Mini Kit）でDNA抽出を行い、リアルタイムPCR装置（BioRad社製 CFX96Touch）を用いて白点虫遺伝子量（遊走体数換算）を解析した。解析結果は当日中に関係者に対してFAXで広報した。

(2) ベコ病

1) 入野漁港における海水中のベコ病病原体遺伝子量調査

平成31年3月28日から令和元年5月末までの期間で、もじゃこ漁で漁獲されたモジャコが入野漁港で蓄養されていたことから、同漁港での蓄養前と蓄養期間における海水を採取し、ベコ病病原体の遺伝子量の定量を行った。海水の採取は高知県漁協入野支所所属でモジャコの蓄養を行う漁業者に依頼した。蓄養場の表層水1Lをポリ瓶で採取し、高知県漁協入野支所で冷凍保管した。保管したサンプルは流水で解凍後、速やかに孔径1.0 μ mのメンブレンフィルターで濃縮濾過し、フィルターからDNA抽出キット（QIAGEN社製 DNA Mini Kit）でのDNA抽出を行い、リアルタイムPCR解析装置を用いてベコ病病原体遺伝子量（コピー数）を解析した。

2) ベコ病病原体遺伝子の抽出及び検出法の再検討

昨年度の調査では、魚体からはベコ病病原体の遺伝子を検出する手法が確立できたものの、ベコ病感染魚が存在する海域の海水からはベコ病病原体の遺伝子を検出することができなかった。検出法について再検討するため、本疾病について先進的に研究を行っている愛媛県水産研究センター魚病診断室の協力を受け、当該機関で海水からの遺伝子の抽出及び検出法について指導のもと、当方の海水サンプルを用いて遺伝子の検出について分析を行った。

3 結果

(1) 白点虫

1) 白点虫の長期継代

昨年度に引き続き白点虫の継代は成功しており、令和2年3月末時点で継続している。

2) 養殖魚の白点虫寄生数調査

調査期間中の最大寄生数はカンパチで60虫体/100鰓弁、マダイで7虫体/100鰓弁であった。調査期間を通した陽性率はカンパチで57%、マダイで45%であった（表1）

3) 野見湾における海水中の白点虫遺伝子量調査

10月11日から12月19日までの調査期間をとおして、海水から白点虫遺伝子を検出した。最大の遺伝子量は令和元年11月7日の馬の背0-10m層の海水から記録された204.32遊走体/Lであった（図3）。

(2) ベコ病

1) 入野漁港における海水中のベコ病病原体遺伝子量調査

モジャコの蓄養前から出荷までの期間をとおして、海水中からベコ病病原体の遺伝子は検出されなかった。

2) ベコ病病原体遺伝子の抽出及び検出法の再検討

愛媛県から指導を受けた採水法や検出法を用いて、ベコ病感染魚が確認された時期に採取した海水の DNA 抽出物を当场で分析したところ、リアルタイム PCR 検査においてベコ病病原体遺伝子は検出されなかった。同じ DNA 抽出物を愛媛県で分析したところ、同様に検出されなかった。

4 考察

(1) 白点虫

1) 白点虫の長期継代

平成 30 年度に開発した長期継代の手法により、白点虫の密度を適度に管理し、供試魚の急激な死亡を抑制することができた。長期継代により、体表の症状や鰓から離脱する際の離脱痕（図 4）について知見を集積することができ、白点虫の存在しない体表や鰓組織からも寄生の履歴を確認できる可能性が示唆された。

2) 養殖魚の白点虫寄生数調査

白点虫寄生数調査の結果、マダイよりもカンパチへの陽性率がわずかに高かった（表 1）。令和元年度は野見湾の養殖業者の聞き取りから、白点虫の寄生や被害は小規模とのことであった。白点虫の発生には鉛直混合や潮流等の環境要因が影響を与えらる。今後も、寄生数の調査を継続するとともに、環境要因との関連について検討していく必要がある。

3) 野見湾における海水中の白点虫遺伝子量調査

令和元年度の白点虫遺伝子量調査の結果、養殖魚の白点虫寄生数調査において、鰓弁から白点虫が確認された後に海水中の遺伝子量が増加していた（図 3）。この結果は平成 30 年度と同様であり（齋田 2019）、海水中の遺伝子量をモニタリングすることで白点病の発生を予察できる可能性が示された。しかしながら、被害軽減に向けては、魚体への寄生よりも早い時期に海水中から白点虫の遺伝子を検出することが求められることから、調査時期について再検討する必要がある。

また、海水中の遺伝子量の検出結果を調査当日中に養殖業者等の関係者に広報したが、それに対する関係者の対応は様々であった。理由として、検出される遺伝子量について危険とされる一定の基準がないことが一因と考えられた。この基準を設けることで、分かりやすく速やかに対応を促す広報となるため、基準の整備が必要となるが、データの蓄積が必要であり、継続して取り組む必要がある。

(2) ベコ病

本県及び愛媛県で分析を行っても、入野漁港の海水中からベコ病病原体遺伝子は検出できなかった。この原因は、サンプリング時点の海水中にのべコ病の病原体遺伝子量が検出限界未満であったことや、採水の時間帯などの影響が考えられるが、詳細は不明である。

一方、昨年度の研究でべコ病のシスト形成前に魚体からべコ病病原体遺伝子が検出されている。今後はフェバンテル承認後の投薬基準と想定される魚体からのべコ病病原体遺伝子のスクリーニング検査に重点をおいていくことが望ましいと考えられた。

5 参考文献

B. K. Digglesi, R. D. Adlard (1997) Intraspecific variation in *Cryptocaryon irritans*. The journal of Eukaryotic Microbiology No. 44, 25-32

- 松岡 学 (1995) 愛媛県下の養殖海産魚における細菌性疾病以外の疾病の発生状況、水産増殖、43 巻 5 号、535-541
- 今城雅之、森光一幸、助田将樹、梅崎拓也、門野真弥、合田暉、久保栄作、大嶋俊一郎 (2016) 高知県野見湾における *Cryptocaryon irritans* の TaqMan リアルタイム検出と分子系統解析、魚病研究、51 巻 3 号、105-111
- 堅田昌英 (2009) 海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* の動態、和歌山県水産総合研究センター 報告書第 1 号、23-29
- 齋田尚希 (2019) 魚類養殖における新たな寄生虫防除技術の開発。平成 30 年度高知県水産試験場業務報告書 116、63-66
- 良永知義 (1998) 海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* の防疫と対策。月刊海洋号外 No. 14、73-76
- 横山博 (2017) 総説べこ病、魚病研究 No. 52 (4)、181-185

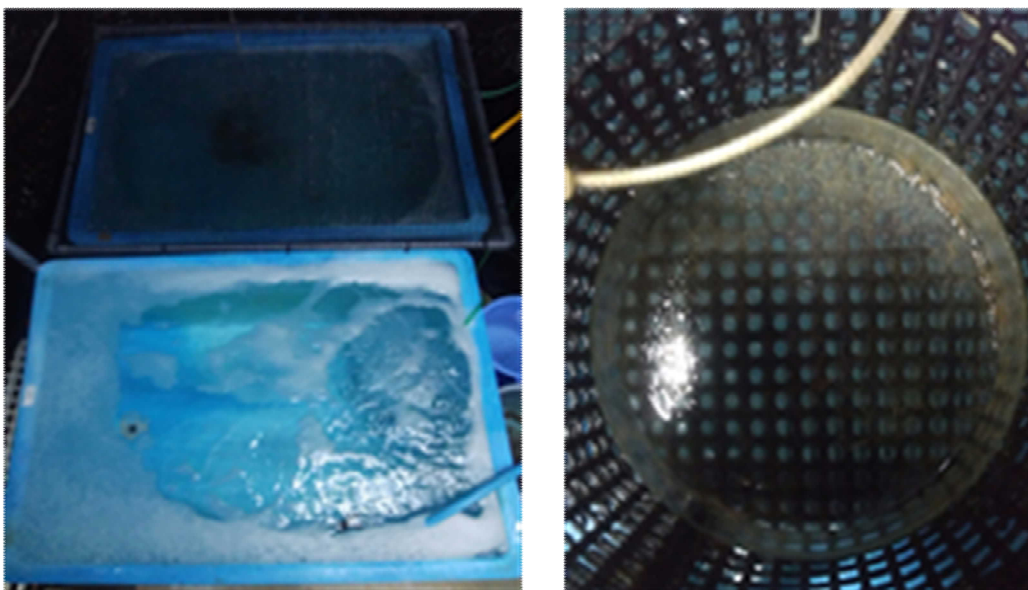


図 1 白点虫継代用の水槽及びシストを付着させるためのガラスシャーレ

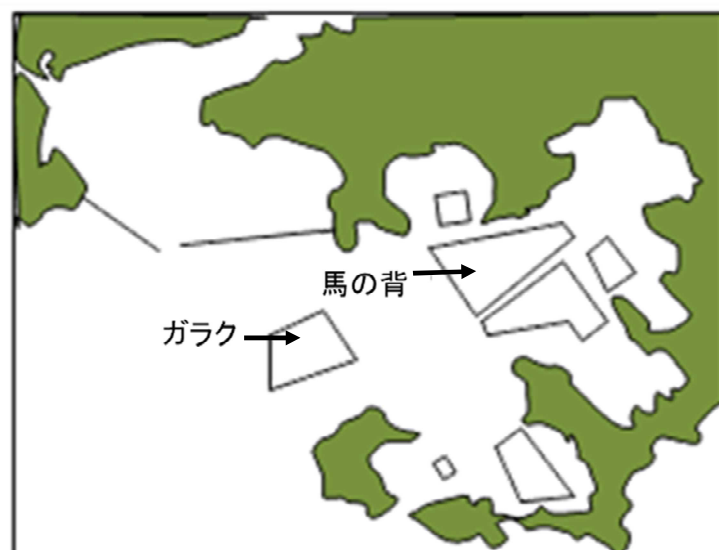


図 2 調査地点

表1 令和元年度における養殖魚の白点虫寄生数調査結果

魚種	検査結果	R1			計
		10月	11月	12月	
カンパチ	白点病(+)	7	1	0	8
	白点病(-)	3	1	2	6
	カンパチ 計	10	2	2	14
	陽性率(%)	70	50	0	57
マダイ	白点病(+)	4	6	0	10
	白点病(-)	3	4	5	12
	マダイ 計	7	10	5	22
	陽性率(%)	57	60	0	45

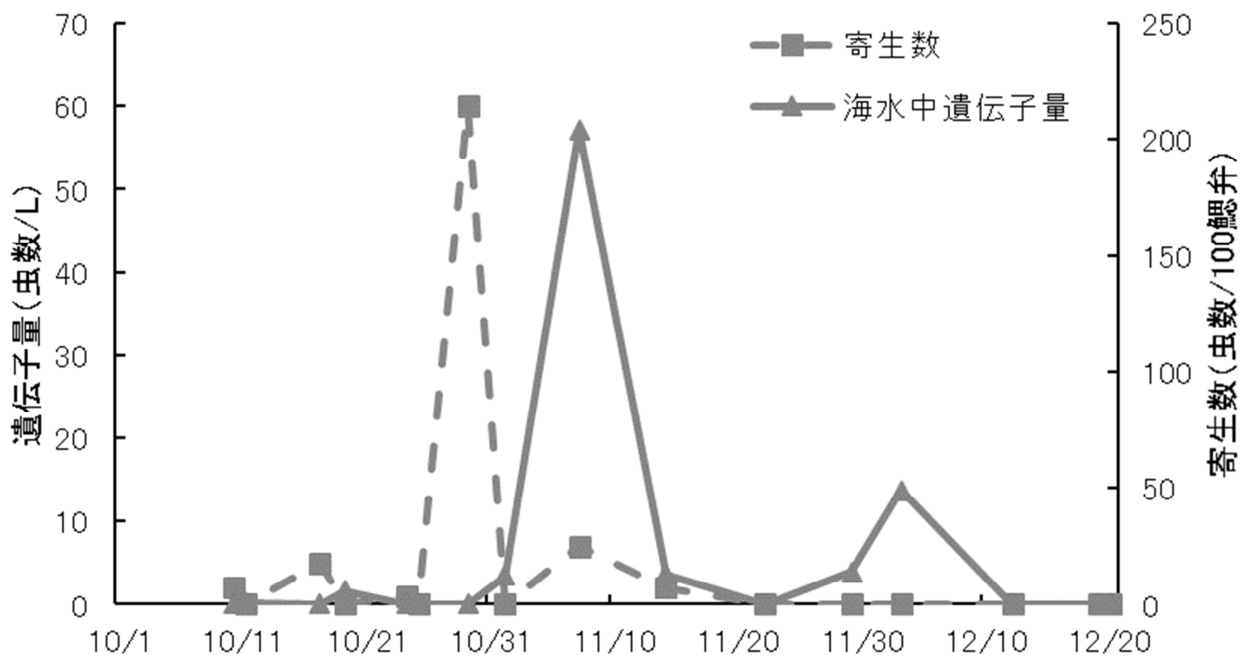


図3 カンパチへの寄生数及び海水中の遺伝子量の変化
* 寄生数及び海水中心遺伝子量は調査日における最大数

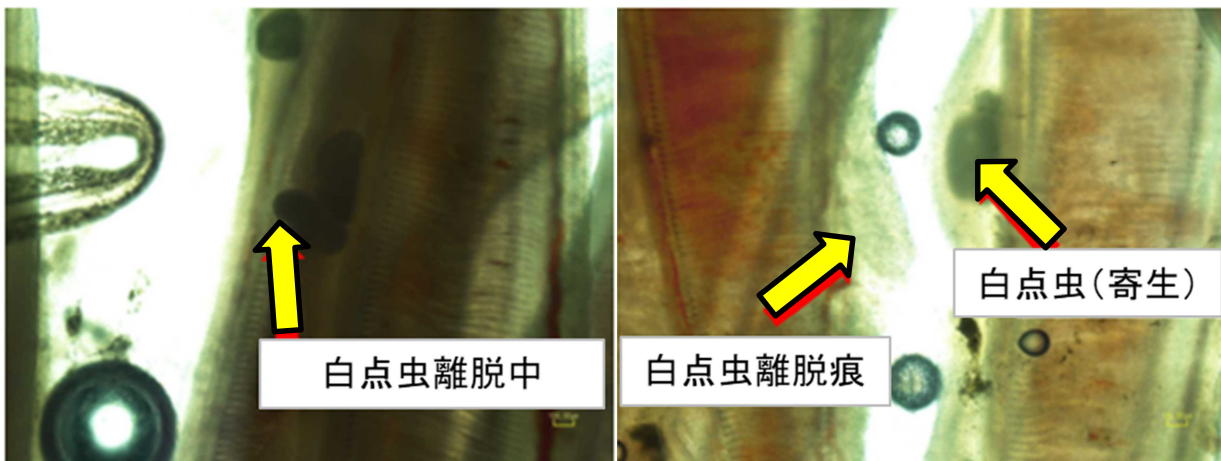


図4 白点虫の寄生と離脱後の鰓弁写真