

養殖クロマグロの疾病防除に関する研究

石丸克也、白樫 正

(養殖グループ)

近畿大学水産研究所

緒言

近畿大学が確立したクロマグロ人工種苗生産技術により、クロマグロ種苗の生産量は年々増加している。生産技術の改善によって生残率は向上しているが、それに伴い近年では仔稚魚期の疾病問題が顕在化しつつある。中でも大きな被害をもたらしているのがイリドウイルス病といくつかの寄生虫症である。これらに対する実用的な防除法の確立は、将来に亘る安定的なクロマグロ種苗の供給のためには不可欠である。

寄生虫症

背景 これまでにクロマグロでは寄生虫による疾病がいくつか報告されており、種苗生産に重大な被害をもたらしている。特に問題となっているのが、住血吸虫症と脳粘液胞子虫症である。前者は魚類の血管や心臓中に寄生する Schistosomatid 科の吸虫が産んだ虫卵が鰓弁に滞留し、血液循環とガス交換を妨げ、宿主を斃死させると考えられている。後者に関しては、これまでズキ、ブリ、イシダイ、ヒラメ等、様々な魚種の脳で寄生が報告されている粘液胞子虫 *Kudoa yasunagai* が最近クロマグロ稚魚でも発見され、長崎県等から報告されている。この粘液胞子虫は脳にシストを形成し、罹病したブリやイシダイでは異常遊泳や体躯の湾曲が見られる。しかしクロマグロ

での病害性については分かっておらず、クロマグロ稚魚特有の衝突死の一因ではないかとする説もあるが詳細は定かではない。これらクロマグロの寄生虫については基礎的知見が極めて少なく、その生物学、実質的な影響、防除法等に関しては殆ど分かっていない。本研究では、近畿大学で生産されたクロマグロ稚魚における寄生虫症について検討し、種苗生産期の寄生虫防除法確立を目指している。

住血吸虫の *in vitro* 培養 現在クロマグロの住血吸虫に対して認可されている薬剤は無く、住血吸虫症を防除する手段は無い。本疾病の防除には薬剤選定、効果試験等が不可欠であるが、飼育、ハンドリングが難しいクロマグロでは、従来の薬剤試験は困難が伴うと考えられる。その際、有効となるのが *in vitro* 培養系を用いた試験である。また、住血吸虫の生活環を実験的に証明するには、*in vitro* 培養で得たふ化幼生を用いた実験感染系の確立が必要である。本研究ではクロマグロ住血吸虫の *in vitro* 培養系の確立を目指して、本研究所大島実験場で得られた住血吸虫の培養を試みた。

培養試験には 2009 年 11 月 11 日に体長 17.8-20.7 cm、体重 125-171 g のクロマグロ稚魚 4 尾の鰓弓内動脈から得た、住血吸虫成体 5 個体を用いた。試験的なプラジクアンテル投与 4 時間後の魚体からサンプリングしたために、採取時の

虫体は著しい衰弱が見られたが、クロマグロ血清培地内で25℃、24時間静置後、活発な活動を見せ始めた。これらの虫体をカナマイシン100mg力価/mLを添加したクロマグロ血清を用い、12穴マイクロプレート内で培養した。培養中は25℃インキュベーター内で保存し、毎日、倒立顕微鏡下での観察を行った。

培養開始直後から、虫体は活発な屈伸運動と口部の小刻みな振動運動をはじめた。培養2日後に2虫体から63個の虫卵が得られたが、その後の産卵数は激減し、3日以降は全く見られなくなった。培養3日以降、虫体は徐々に運動活性が低下し、培養6日後に全個体が死亡した。死亡は培地を交換した翌日に起こったため、作業上の問題・影響があったと考えられた。

虫卵は長径約30 μ m、短径約25 μ mのほぼ楕円形で、クロマグロの鰓弁血管内で観察されたものと酷似していた。しかし、いびつな形状の虫卵も

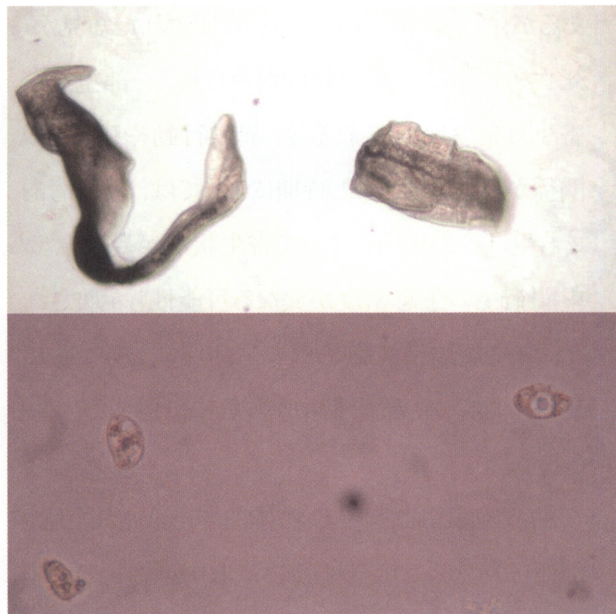


Fig. 1. 培養中の住血吸虫(上)と培養中に産出された虫卵(下)。

見られ、産卵数も少なかったことから、培地内では正常産卵が難しいと考えられた。虫卵は5日後まで順調な発生を見せたが、その後崩壊するものが

現れるようになり、13日後には全て見られなくなった。培地内で細菌の著しい増殖が見られたため、虫卵が死滅したものと考えられる。培養期間中にふ化幼生は見られなかった。

今回の実験では、自然状態に極めて近いクロマグロ血清を用いて培養を試みたが、長期の培養と正常産卵には至らなかった。今後は健全な虫体の確保も含め、培地や添加物、培養温度等、培養条件の検討が必要である。

クロマグロ脳粘液胞子虫に関する研究 本研究の調査中、大島実験場で飼育されている2009年産クロマグロ稚魚の脳から高い割合で *Kudoa* 属粘

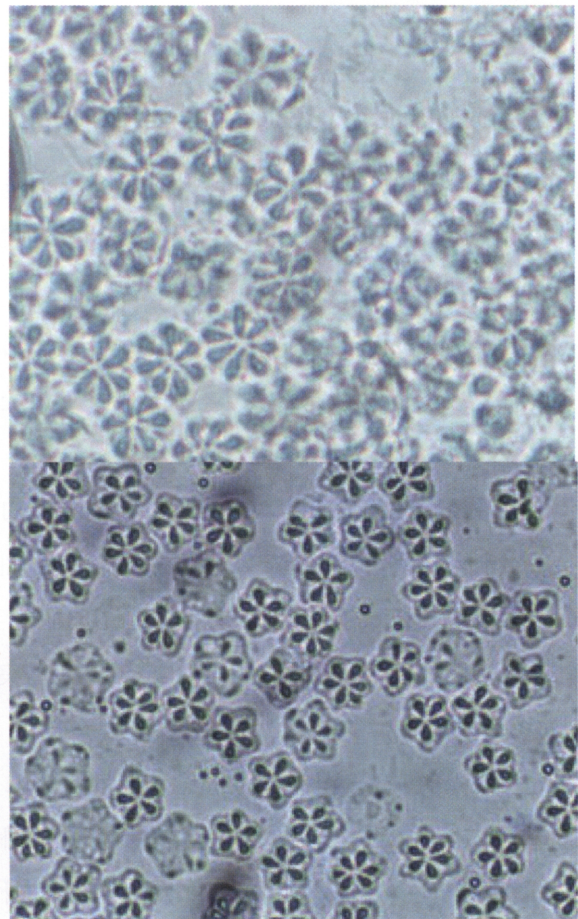


Fig. 2. 白浜実験場で飼育されていたクロマグロの脳から見つかった *Kudoa yasunagai* (上)と大島実験場のクロマグロから見つかった *Kudoa* の孢子(下)。大島マグロの寄生虫は極囊の数が少ない。

液胞子虫のシストが見つかった。これまでクロマグロの脳からは *Kudoa yasunagai* が報告されており、

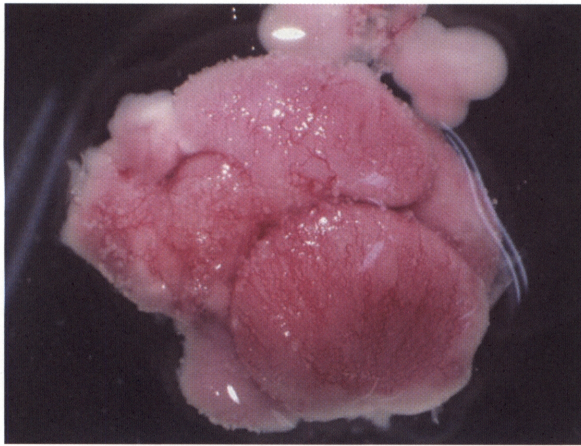


Fig. 3. 大島のクロマグロの脳にみられた粘液胞子虫のシスト。粟粒状の無数のシストが脳表面全体に観察される。

一部では衝突死等、異常遊泳の原因とも言われている。*Kudoa yasunagai* に関しては、白浜実験場で飼育されているカンパチ、ヒラメ、クエ、マハタでの寄生が確認されており、2009年には白浜実験場で飼育されたクロマグロで初めて寄生を確認した。当初、大島実験場で見つかった脳粘液胞子虫も *K. yasunagai* であると考えられたが、詳細な観察の結果、形状等が異なることが明らかになった。

Kudoa yasunagai は比較的大きい(>1mm)白色の円形シストを脳表面に数個形成し、その内部には無数の胞子が産生される。胞子は6~8個(通常7個)の極嚢を有する。しかし今回、大島実験場のクロマグロから見つかった粘液胞子虫は、小型で黄白色のシストを脳表面全体に散在的に形成していた。胞子を観察したところ、極嚢が5個と *K. yasunagai* に比べて少なかった(Fig. 2)。これまでに報告されている脳寄生粘液胞子虫のうち、極嚢数が5個であるのは、オーストラリアのイズミから発見された *Kudoa neurophila* のみであるが、文献を照合した結果、大島実験場のクロマグロから得られた粘液胞子虫とは、胞子の大きさが著し



Fig. 4. 大島実験場のクロマグロ生け簀に付着していた環形動物。フサゴカイ類が豊富。

く異なっていた。そのため今回発見された粘液胞子虫は、未知種である可能性が高い。粘液胞子虫は比較的遺伝情報が豊富なため、分子生物学的な比較を行うために、現在本虫の遺伝子解析を進めている。

この脳粘液胞子虫の病害性については不明であるが、今回の調査で得られた限られた知見から、死亡魚に寄生が多い傾向がみられ、一部重篤な寄生(Fig. 3)が見られる等、異常行動や死亡との関係が疑われる。また時期によっては、大島湾内でも生け簀の場所によって寄生状況が異なるため、中間宿主の生息密度が異なる可能性も示唆された。海産魚類粘液胞子虫の生活環についても知見は少ないが、環形動物から魚に伝播すると考えられる。

粘液胞子虫は脊椎動物体内で形成された胞子が何らかの形で無脊椎動物に取り込まれ、その体内で全く形態の異なる胞子となり、水中に放出される。これらが魚に寄生し生活環が完結するが、海産魚類の粘液胞子虫で生活環が解明されているものは極めて少ない。粘液胞子虫に対する有効な薬剤が無いことから、抜本的防除には生活環

を断ち切るのが唯一有効な方法である。そこで、本研究ではこの新しく見つかった粘液胞子虫の生活環を解明するため、大島実験場の生け簀周辺から中間宿主と考えられる無脊椎動物を採集した。2009年10月14日、寄生が見られた生け簀周辺の底泥、生け簀枠に付着している生物を採取し、環形動物を収集した (Fig. 4)。得られたサンプルは大まかに分類した後、エタノールで固定保存した。今後、本虫の塩基配列を特定後、特異的なPCR系を確立し、これらの無脊椎動物からの粘液胞子虫検出を試みて、中間宿主を特定する予定である。

イリドウイルス病

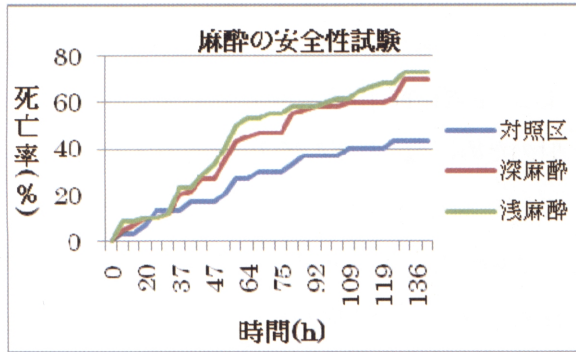
背景 マダイイリドウイルス病は当初西日本の養殖マダイで発生し、壊滅的な被害をもたらした。原因ウイルスは宿主特異性が低く、様々な海産養殖魚種に感染して問題となっている。対策としては、不活化ウイルスを用いた注射ワクチンの有効性が確認されており、既にマダイとブリ属に対しては認可・販売されている。

本疾病はクロマグロにも感染し、毎年少なからぬ被害をもたらしているため、クロマグロで使用できるワクチンが強く求められている。これまでに、クロマグロから分離したウイルス株は、遺伝学的にマダイ由来株とほぼ一致することなどを明らかにしており、マダイ用に認可された不活化ワクチンが、クロマグロにおいても有効であると考えられる。しかしワクチンの実用化には、クロマグロにおける安全性および有効性を確認すると共に、実用的な接種法を確立しなければならない。

注射方法に関する検討 クロマグロはハンドリングに対する耐性が極めて低いことが知られている。また、生簀に沖出した後に注射をする場合、注射のために取り上げるだけで多くのコストが必要であり、魚体も強いストレスを受けることとなる。そこで本研究では、沖出し前のクロマグロ稚魚への注射方法について検討した。

1. 麻酔の影響の検討 注射時のストレス軽減策の一つとして、麻酔の適用が考えられる。そこで魚類実験の麻酔として広く使われているフェノキシエタノールを用いて、麻酔深度と生残率の関係を予備的に検討した。供試魚として、ふ化後35日齢のクロマグロ稚魚(平均体重2.6g)を用いた。麻酔深度は2段階に設定し、60尾ずつPBSを0.1ml注射し、500l容のパンライトで30尾ずつ2水槽に分けて1週間飼育、観察した。麻酔は200l容のパンライトで200ppmのフェノキシエタノールに浸漬して行い、麻酔槽の底で一瞬でも横臥状態になった場合を浅麻酔、その後さらに5秒以上横臥状態になった場合を深麻酔とした。また、対照区としてハンドリングのみ行った稚魚を同様に30尾飼育した。死亡魚の回収と給餌は1日5回、8:00, 11:00, 15:00, 18:00 および22:00に行った。

結果はグラフに示した。深麻酔と浅麻酔のデータは、2水槽の平均で示した。対照区の死亡率は麻酔をかけた2区に比べて有意に低かったが、麻酔の深浅による死亡率の有意差は見られなかった。全体に死亡率が高い結果となったが、これは処理後の管理用水槽の大きさが充分でなかったためと考えられる。フェノキシエタノール麻酔では、ハンドリングによるクロマグロ稚魚の減耗低減はあまり期待できないが、注射作業と併せて実施した場合についても確認が必要である。

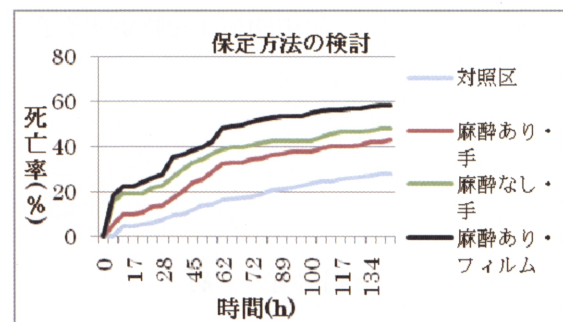


2. 保定方法の検討 注射をする際の保定方法と生残率の関係を調べた。35 日齢のクロマグロ稚魚(平均体重 2.6g)に、麻酔をかけて手で押さえる方法、麻酔をかけずに手で押さえる方法、および麻酔をかけて枠に展張したポリオレフィンフィルムで押さえる方法で、それぞれ 200 尾ずつ PBS を 0.1 ml 注射し、1 週間飼育、観察した。また、対照区としてハンドリングのみ行った稚魚を 404 尾飼育した。飼育には直径 8 m の円形水槽を使用した。注射台には、カネライトフォームに紙やすりで浅く溝を掘り、ポリオレフィンフィルムを被せたものを使用した。麻酔は 200 l 容のパンライトで 200 ppm のフェノキシエタノールに浸漬して行い、麻酔槽の底で横臥状態になった個体を順に取り上げて注射した。死亡魚の回収と給餌は 1 日 5 回、8:00、11:00、15:00、18:00、22:00 に行った。

結果はグラフで示した。直接手で押さえて注射した場合、麻酔の有無による死亡率の有意差は見られなかった。麻酔の安全性試験で無麻酔区の死亡率が低かったのとは異なる結果となった。その理由として、注射を組み合わせた場合は無麻酔で処理時に暴れることによるストレスと麻酔の副作用が相殺され、差が出なかったためと考えられる。また、麻酔をかけた状態では、手で押さえるより、フィルムで押さえたほうが有意に高い死亡率を示した。麻酔により沈静化した魚体に対しては、

単純な手技で速やかに処理した方が良いと考えられる。

今回検討した注射法では、ワクチンにより期待される生残率の向上を、接種自体による死亡率増加が上回っていた。ワクチンによるイリドウイルス病防除を実用化するためには、注射手技の改良を進めると共に、より負担の少ない麻酔法の開発や、ハンドリング耐性の強い種苗の生産法を検討していく必要がある。



野外交種試験

マダイ用市販不活化ワクチンの、クロマグロに対する安全性および有効性を確認するため、和歌山県白浜町の漁場に於いて野外試験を実施した。

平均体重約 4 g のクロマグロ稚魚を 2 群に分け、600 尾にはイリド不活化ワクチン「ビケン」を 0.1 ml 筋肉内投与し、残り 605 尾はハンドリングのみの対照区とした。水位を下げた飼育水槽から手網で 1、2 尾ずつポリ袋に掬い入れ、陸上の円形飼育水槽に移動・収容した。注射区には移動の途中でポリ袋越しに筋肉内注射した。接種 8 日後の生残率は、注射区 60.7%、対照区 58.3%で有意差は見られなかった。トータルハンドリングストレスが極めて大きいため、注射作業の影響がマスクされたためと考えられる。また、ワクチン投与による死亡の増加が見られなかったことから、クロマグロに

対するワクチンの安全性には問題ないものと判断される。

接種 8 日後の 2009 年 8 月 28 日、生存魚の中から注射区 264 尾、対照区 253 尾を、白浜漁場の地先に設置した 7 m 角(深さ 4 m)の生簀にそれぞれ移動・収容した。移動時の平均体重は約 5 g であった。以降、毎日死亡魚を回収し、蛍光抗体法による脾臓スタンプからのイリドウイルス抗原検出を試みた。飼育は 11 月 6 日まで 10 週間継続したが、水温低下によりイリドウイルス病の発生が望めなくなったため終了した。

終了時の生残率は、注射区 27.7%、対照区 20.2%であった。死因は生簀網との衝突やスレ、

海況の急変等によるショックなどであり、試験期間中にイリドウイルス病の流行は確認できなかった。回収した死亡魚のうち、検査可能な状態の個体についてイリドウイルス抗原の有無を確認したが、注射区では 140 尾中 0 尾(0.0%)、対照区では 145 尾中 4 尾(2.8%)が陽性であった。イリドウイルス病の罹病率が極めて低かったため、本試験の結果からワクチンの有効性についての判断はできなかった。しかし対照区にのみ感染魚が確認されたことから、本ワクチンがクロマグロでも有効である可能性は高いと考えられる。