

論文の内容の要旨

水圏生物学専攻
平成10年度博士課程 進学

氏 名 Yasoja Sujeewanee Liyanage
(ヤソジャ スジェワニー リヤガ)
指導教官名 小川和夫

論文題目 Studies on hemorrhagic thelohanellosis of carp caused by a myxosporean parasite *Thelohanellus hovorkai*

(粘液胞子虫 *Thelohanellus hovorkai* によるコイの出血性テロハネルス症に関する研究)

魚類に寄生する粘液胞子虫は今まで 1250 種類以上が記載されており、それらの多くは宿主魚に対して無害であるが、重篤に寄生すると致命的影響をもたらして産業的に問題となる場合もある。1994 年、新潟県内のニシキゴイ養殖場で体表面に著しい出血を呈して 2～3 歳親魚が死亡する事例があり、粘液胞子虫 *Thelohanellus hovorkai* による「出血性テロハネルス症」と診断された。従来、コイの結合組織に寄生する *T. hovorkai* は魚に対する病害性がほとんどない寄生虫と考えられていたため、なぜ今回、ニシキゴイが死に至るほど異常に寄生したのか、発病原因に疑問が持たれた。最近の研究により、粘液胞子虫の生活環には交互宿主として貧毛類などの水生無脊椎動物が関与していること、およびその体内で放線胞子虫ステージに変態することが明らかにされているが、*T. hovorkai* についても、エラミミズ (*Branchiura sowerbyi*) の体内で変態したオーランチアクチノミクソン放線胞子虫がコイへの感染ステージとなることが証明されている。本研究では、コイの出血性テロハネルス症について病理学的・疫学的に調査するとともに、*T. hovorkai* の発育動態や発病メカニズムを実験的に解明し、実用的な感染防除対策を開発することを目的とした。

養鯉池における疫学的調査

新潟県内のニシキゴイ養殖場において 1996 年 6～7 月に粘液胞子虫未感染のニシキゴイ（1 歳、2 歳魚）を 7 週間飼育し、3, 5, 7 週目に採材して寄生虫検査と内臓諸器官（鰓、皮膚、筋肉、腎臓、脾臓、腸管、肝臓）の病理組織学的観察を行った。飼育開始 3 週目から発病がみられ、体表のウェットマウント観察により大量の *T. hovorkai* 胞子が検出された。さらに、5, 7 週目では明らかに出血性テロハネルス症による死亡が増加した。病魚は体表全体、特に頭部から腹部にかけて著しく発赤あるいは出血斑を呈するのが特徴的であった。病理組織により、皮膚出血患部に散在した多数の *T. hovorkai* 胞子と、皮膚上皮の剥離、広範囲にわたる細胞浸潤、充血、出血および水腫などの顕著な病変が確認された。患部組織を 2%トリプシン液を用いて 37℃で 2 時間酵素処理し胞子を精製・計数することにより寄生強度を定量的に調べた結果、腹側筋肉内の寄生強度が約 50,000 胞子/g を超えたときに典型的な病徴を呈した。養殖場の底生生物調査の結果、発病が起きた養魚池は底質が富栄養的な泥であり、貧毛類はエラミミズが優占的で、その生息密度は 1.9～3.4 個体/kg-泥、*T. hovorkai* 放線胞子虫の寄生率は最高で 80.8%（1996 年 6 月）に達した。一方、発病歴のない茨城県内のマゴイ養殖場で同様の調査を行ったところ、底質は砂地で、貧毛類相はユリミミズ (*Limnodrilus socialis*)とイトミミズ(*Tubifex* sp.)が優占し、放線胞子虫は全く検出されなかった。

出血性テロハネルス症の実験的再現

粘液胞子虫未感染のニシキゴイとマゴイの 1 歳魚を供試魚として、流水式水槽で以下の 5 つの試験区を設けた（各 30 尾）：発病のみられた養鯉池の底泥から採集されたエラミミズと、ニシキゴイ（実験区 1）またはマゴイ（実験区 2）を同居飼育する区、エラミミズ飼育槽からの排水でニシキゴイを飼育する区（実験区 3）、ミミズ飼育水と全く接触させないニシキゴイとマゴイの対照区。2, 4, 5 週間後に採材して、剖検、各臓器の病理組織および寄生強度の測定を行った結果、実験区 1 と 2 の同居飼育区で 4 週間後から発病が見られ、腹側筋肉内の寄生強度は 50,000 胞子/g を超えた。一方、実験区 3 の排水飼育では、軽度の感染は起きたものの病徴や死亡は見られなかった。また、寄生強度により胞子の体内分布を比較したところ、同居区の魚では腸管壁や腹側筋肉に胞子が多く分布していたのに対し、排水飼育区では鰓に最も多く分布した。なお、対照区では *T. hovorkai* の感染も死亡も全く見られなかった。実験終了後、実験区 1 と 2 の水槽

の中からエラミミズが回収されなかったことから、今回の実験で発病したコイは放線胞子虫に寄生したエラミミズを大量に摂食したと考えられる。また、胞子の体内分布の結果から、同居区の病魚は実際の養殖場で見られた病態をよく再現していると思われた。

実験感染系における貧毛類および魚体内での発育動態

エラミミズをウエルプレート内で個体飼育する方法により採集した放線胞子を用いてコイに対する感染実験を行い、*T. hovorkai* の発育過程を追跡した。この実験感染系において、放線胞子との接触密度、飼育水温、品種（ニシキゴイまたはマゴイ）、感染経路（浸漬または経口）などの違いが寄生強度に与える影響について調べた。侵入経路を調べるため、予め蛍光色素 5(6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl-ester (CFSE) で標識した放線胞子を用いて感染実験を行ったところ、浸漬 30 分以内に CFSE 標識された胞子原形質が鰓弁から侵入するのが蛍光顕微鏡下で観察された。さらに、浸漬 1 週間後には眼球周辺や頭部の皮下組織などに多核の発育ステージがみられ、3 週間後には成熟胞子が形成されシスト崩壊に伴い周辺組織に散逸した。放線胞子の経口投与においても同様の発育過程が観察されたが、主な寄生部位は肝臓と腸管の結合組織であった。発病は全ての経口投与区および高濃度浸漬区(4.5×10^6 胞子/尾)において再現された。水温による違いについては、20℃よりも 25℃の方が寄生強度が高まったが、顕著な差ではなかった。また、コイの品種の違いによる感受性の差は全く見られなかった。*T. hovorkai* 粘液胞子虫を放線胞子虫未感染のエラミミズに投与し、一定水温（15, 20, 25℃）で飼育して水中に放出された放線胞子を測定した結果、20℃および 25℃飼育 43 日目から放線胞子が放出され、70~90 日目でピークに達し（25℃で 10^5 胞子/日/個体、20℃で 10^4 胞子/日/個体）、以降、減少した。15℃では 94 日目に初めて胞子が検出されたが、量は少なかった（ 10^2 胞子/日/個体）。以上より、水温 20-25℃の飼育条件では、魚体内で粘液胞子虫ステージが約 1 ヶ月弱、貧毛類内で放線胞子虫ステージが約 2 ヶ月強、合計 3 ヶ月間で生活環が回る発育動態が明らかになった。また、コイの品種や感染経路にかかわらず *T. hovorkai* 放線胞子虫を大量に取り込むことで出血性テロハネルス症が起ることが証明されたが、実際には経口的に摂取することで発病しやすいと思われる。

貧毛類相の操作による生態学的・生物学的制御法

貧毛類の基質選択性を実験的に調べた結果、エラミミズは泥質を好み砂質からは逃避

する行動が観察されたばかりでなく、砂質内では生残率が低下した。一方、他の貧毛類（ユリミミズやイトミミズ）では目立った基質嗜好性は認められなかった。貧毛類の体表を組織学的に調べた結果、皮膚上皮が固いクチクラ層で覆われているユリミミズ等と異なり、エラミミズの皮膚は脆弱であるため、鋭い突起状の砂粒により物理的傷害を受けやすいと考えられた。エラミミズと他の貧毛類を混合飼育して *T. hovorkai* の感染実験を試みたところ、エラミミズ単一種飼育の場合と比べて放線胞子放出量および寄生率が減少したことから、非感受性の貧毛類が *T. hovorkai* を取り込んで不活化した可能性が示された。これらの結果より、養魚場の底質を泥から砂に替えることで貧毛類相が変移し、*T. hovorkai* 密度を低下させることができると考えられる。次に、底生貧毛類の密度自体を減少させるために、ベントス食性魚が生物学的制御法として使えるかどうか検討した。まず、ドジョウ、キンギョおよびコイにエラミミズを給餌したところ、3魚種とも同程度に摂食することがわかった。そこで、ドジョウとキンギョに対して *T. hovorkai* の放線胞子を用いた感染実験を試みたところ、いずれの魚も感染に抵抗力を有し *T. hovorkai* のキャリアにはならないことが確認された。この結果から、上記のような非感受性魚種を養魚場に放養して底泥の貧毛類を捕食させれば、有効に *T. hovorkai* 密度を減少させられる可能性がある。

以上のように、コイの出血性テロハネルス症は *T. hovorkai* 放線胞子虫をコイが大量に取り込むことにより（主には放線胞子虫に感染したエラミミズを摂食することにより）寄生強度が異常に高まり、50,000 胞子/g を超えると外観的にも出血を呈し発病に到ると考えられた。発病要因としてニシキゴイとマゴイの遺伝的・生理的な違いや養殖方法の違いなども推測されたが、根本的には、養殖場の富栄養化が進行しエラミミズが優占的に繁殖した結果、*T. hovorkai* の量が異常に増加したことが主因と思われる。対策としては、養殖場の土壌改良やベントス食性魚を混養することによりエラミミズの生息密度を低下させることができれば、出血性テロハネルス症を抑制できると考えられる。