

石垣島の養殖ヤイトハタに寄生するハダムシの 寄生状況と虫卵発生の季節性 (県産魚介類の安定供給に向けた生産性高度化事業)

山内 岬^{*1}, 白樫 正^{*2}

Seasonal changes in infection level and egg occurrence of the monogenean skin fluke of Malabar grouper, *Epinephelus malabaricus*, cultured in Ishigaki island

Misaki YAMAUCHI^{*1} and Sho SHIRAKASHI ^{*2}

石垣島の養殖ヤイトハタに寄生するハダムシの種を判別するため、遺伝子解析を行った結果、シンハダムシ *Neobenedeniagirellae* (扁形動物門単生虫綱) であることが明らかとなった。また、平均全長 185mm (日齢 242) のヤイトハタ種苗を用いた寄生状況調査とトラップを用いた虫卵分布調査により、石垣島では冬季低水温期においても *N. girellae* の寄生が繰り返し成立すること、養殖場内に出現する虫卵は水温 28℃以上の夏季 (6~9 月) に少なく、22~24℃にあたる春季 (3~4 月) と秋季 (11~12 月) に多くなること、水深 1~3m における虫卵分布はほぼ均一であることが確認された。石垣島では本種の寄生が周年を通して発生し、定期的な淡水浴による駆虫作業を冬季低水温期にも実施する必要がある。

ヤイトハタに生じる外部寄生虫症の原因として、体表寄生性の単生虫であるハダムシ類の 1 種が知られている (多和田 2000; 山内ほか, 2013)。ハダムシ類とは、扁形動物門単生虫綱に属する単後吸盤類を示し、日本の養殖対象魚に寄生する種としては、主にハダムシ属 *Benedenia* とシンハダムシ属 *Neobenedenia* が知られる (横山・長澤, 2014)。ハダムシ類の虫卵は、浮遊性で四面体状の卵殻の先端に長い付属糸を有し、生簀網等に付着しやすい性質を有する。また、中間宿主を持たない単純な生活史を有することから、養殖場内で感染環が成立しやすく、国内で養殖される多くの海産魚で問題となっている (小川, 2004)。ふ化幼生の体縁辺には複数の繊毛帯が備わっており、遊泳しながら宿主体表面に着定し固着盤を開いて寄生生活へと移行する。寄生後は上皮組織を摂食して成長するため、宿主体表に糜爛が生じる。寄生の刺激を受けた感染魚は、生簀網などに体側面をこすりつける特徴的な行動を繰り返すため、寄生部位の損傷が悪化しやすく傷痕から細菌の二次的感染も生じやすい。

国内の海産養魚における症例として、ブリ養殖におけるブリハダムシ *Benedenia seriolae* やハタ類・ヒラメに寄生するマハタハダムシ *B. epinepheli* および宿主特異性が低く数多くの魚種に寄生することが報告されるシンハダムシ *Neobenedenia girellae* がよく知られている (横山・長澤 2014)。ヤイトハタから採取されたハダムシ類は、形態学的な観察によって過去に *N. girellae* と同定されているもの (Ogawa et al., 1995)、養殖ヤイトハタの主要な産地であ

る石垣島で発生するハダムシの種類はこれまで明らかにされていない。*N. girellae* はふ化可能最低水温が 15℃であることから、低緯度海域に適応進化した種と考えられ (Bondad-Reantaso et al., 1995)、西日本では夏季に被害が大きい。温暖な石垣島では周年にわたって寄生が起きている可能性があるものの、本地域における寄生状況の季節的变化については報告が少ない。特に、水温低下によって虫体の再生産能力が低下すると考えられる冬季低水温期の寄生状況や寄生盛期に関する調査はこれまで実施されていない。

そこで、石垣島の登野城魚類養殖場内で養成中のヤイトハタより採取した虫体について、遺伝子解析による種判別を行うとともに、冬季低水温期に沖出ししたヤイトハタの寄生状況調査および養殖場内に出現する虫卵の周年採集結果に基づく寄生盛期の推定を行った。また、近年、ハダムシ類を原因とするカンパチの外部寄生虫症対策として沈下式生簀網を用いた防除技術が開発されていることから (Shirakashi et al., 2013) ヤイトハタ養殖におけるハダムシ症対策としての実施可能性について検討するため、養殖場内に出現する虫卵の水深別分布調査を合わせて実施した。

材料と方法

遺伝子解析による種判別

2013 年 8 月に同養殖場内で養成中のヤイトハタ 0 歳魚より採取したハダムシ 2 個体について遺伝子解析を行った。ホモジナイズした虫体組織から DNA 抽出キット (QIAamp

*1 E-mail : ymuchimi@pref.okinawa.lg.jp , 石垣支所

*2 近畿大学水産研究所白浜実験場

DAN Mini Kit, Qiagen 社製)を用いて抽出したゲノム DNA を鋳型とし、リボゾーム DNA の ITS2 領域の配列を PCR 法により増幅した。プライマーセットは PD-ITS-450F と PD-ITS-R を用い (Yamamoto et al., 2011), 反応液は EmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ社製) 10 μ l プライマー各 0.8 μ l, H₂O 7.4 μ l の計 20 μ l で作成した。反応条件は、サーマルサイクラーを用いて 95°C で 2 分間の初期変性反応の後、95°C で 50 秒間の変性、55°C で 50 秒間の会合、72°C で 50 秒間の伸張を 30 回繰り返す、72°C で 4 分間の最終伸張を行った。得られた PCR 産物は、PCR 産物精製キット (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen 社製) で精製し、DNA シークエンサー (3730xl DNA analyzer Applied Biosystems 社製) による塩基配列の決定を行った。決定した塩基配列は、GenBank データベース上に登録されているマサバ *Scomber japonicus*, フウセイ *Pseudosciaena crocea* から得られた *N. girellae* の配列と比較した。また形態的に *N. girellae* と同定されたマアジ *Trachurus japonicus* およびカンパチ *Seriola dumerili* から採取された *N. girellae* の配列についても比較を行った。解析には遺伝情報処理ソフトウェア GENETYX を用いた。

寄生状況調査

2013 年 1 月 16 日から 3 月 13 日にかけて、同養殖場内に容量 27kL のポリエチレン網 (1 辺 3m × 丈 3m, 10mm 目合) を設置し、平均全長 185mm (日齢 242) のヤイトハタ種苗 534 尾を収容した。ハダムシ駆除のための淡水浴 (原田 1965) を 7 日毎に実施し、同日に網替えを行った。生簀網の上には鳥類による食害防止や環境ストレスの低減を目的として、天井網 (1 辺 3m, 30mm 目合) と遮光ネット (1 辺 5m, 遮光率 95%) を設置し、網内には垂下式シェルター (容積 0.5m³, トリカルネット製) を設置した。飼育期間中の給餌は、粒径約 6mm のマダイ育成用 EP 飼料 (マーキュリー, 日本配合飼料社製) を 1 日あたり 1 回の頻度で毎日飽食量を目安に手撒きで与えた。ハダムシの寄生数の経日変化および淡水浴後の寄生状況と駆虫効果をモニタリングするため、飼育開始 14 日後までは毎日、14~56 日後までは 7 日毎にそれぞれ無作為に 5 尾を採取した。採取した試験魚は淡水を満たした容量 500mL のポリプロピレン製容器 (PP パック, 瑞徳化成工業社製) に 1 尾ずつ収容した状態で研究

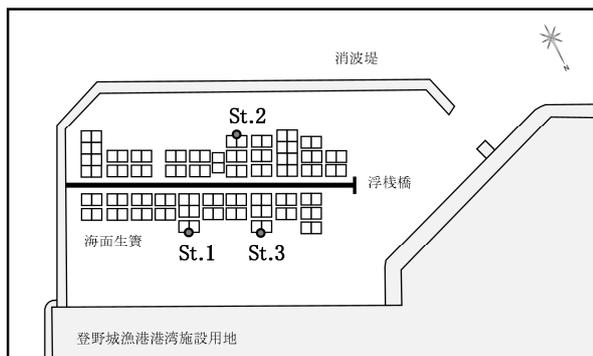


図 1 登野城魚類養殖場見取図 (石垣市登野城漁港東側地先) および場内に設置したハダムシ虫卵回収用トラップ定点の配置図。

室に持ち帰り、全長と体重を測定後、体表から脱落した虫体のうち、肉眼で識別可能な 0.2mm 以上の虫体をプラスチック製バット上で選別し、5%海水ホルマリン液で固定した。虫体数と虫体長の測定は、固定後の虫体を用いて行い、全て万能投影機 (V-12A, Nikon 社製) 下で行った。作業時のピペティングで生じる計数誤差を除外するため、試験魚各尾について 3 回ずつ計数作業を繰り返し、その平均値を寄生数として採用した。虫体長は口前吸盤の前端から固着盤の後端までとし、20 倍に拡大した投影像をデジタルノギス (CD-20C, ミツトヨ社製) を用いて測定した。

虫卵分布調査

網地に付着しやすいハダムシ類の虫卵特性を利用した虫卵回収用トラップ (以下、トラップ) を用いて、その出現状況に関する季節的消長や水深別の分布状況を調査した。2013 年 3 月から 2014 年 2 月にかけて同養殖場の 3 カ所に設定した定点の生簀枠から (図 1), 硬質塩化ビニール製の角型枠に 1 辺 4.2mm のナイロンモジ網片 (網面積 17.6cm², 5mm 目合) を接着加工したトラップを水面下に垂下し (図 2) 定量的な虫卵採集を試みた。設置したトラップは、網面が海面に対して直行した状態を保つようステンレス鋼材を沈子とした硬質塩化ビニール製の垂下枠に結束し、生簀枠直下へ垂下した。トラップの回収作業は 3 定点全て同日に行うこととし、各月 4~5 回 (4~10 日間隔) に分けて実施した (表 1)。回収したトラップは海水中で細かな砂やシルトを除去した後、付着物ごと 5%海水ホルマリン液で固定した。トラップ回収後は、新たなトラップを垂下枠に結束し、回収前と同様に再度水面下へ設置した。トラップに付着した虫卵は、実体顕微鏡 (Microscope model SS, ケニス社製) 下で全数計数を行い、設置日数および単位面積あたりの付着卵数 (個/日/cm²) を算出した。設置水深別のトラップ回収作業は 2013 年 3~6 月まで行い、水面下 1m に垂下されたトラップを便宜上トラップ I とし、以下水深が 1m 深くなるごとにトラップ II および III とした。各定点のトラップ I~III より得られた付着卵数を採集月別設置水深別に集計し、得られた値を Kruskal-Wallis 検定により比較した。また、同年 7 月以降はトラップ III のみを対象として回収作業を継続し、各定点の付着卵数を採集月別に集計して各月の平均出現卵数を求めた。

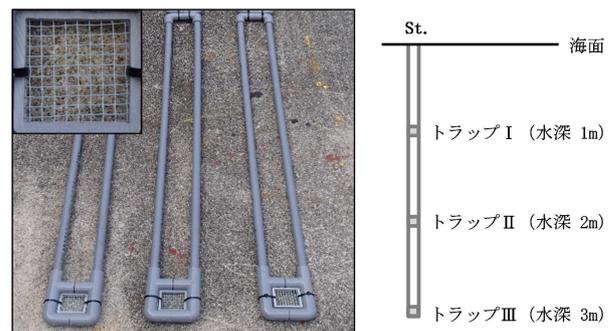


図 2 各定点に設置した虫卵回収用トラップの外観および設置状況の概略図。

調査期間中の水温は、水面下 5m に垂下したデータロガー (HOBO U22 water temp pro v2, Onset 社製) により 6 時間ごとに測定し、養殖場内の水温変化を周年にわたって記録した。

表 1 石垣市登野城魚類養殖場内に設置した虫卵回収用トラップの設置回数

調査月	St.1			St.2			St.3			トラップ設置回数
	1m	2m	3m	1m	2m	3m	1m	2m	3m	
2013年3月	4	4	4	4	4	4	4	4	4	36
2013年4月	4	4	4	4	4	4	4	4	4	36
2013年5月	5	5	5	5	5	5	5	5	5	45
2013年6月	4	4	4	4	4	4	4	4	4	36
2013年7月	-	-	5	-	-	5	-	-	5	15
2013年8月	-	-	4	-	-	4	-	-	4	12
2013年9月	-	-	4	-	-	4	-	-	4	12
2013年10月	-	-	5	-	-	5	-	-	5	15
2013年11月	-	-	4	-	-	4	-	-	4	12
2013年12月	-	-	4	-	-	4	-	-	4	12
2014年1月	-	-	5	-	-	5	-	-	5	15
2014年2月	-	-	4	-	-	4	-	-	4	12
合計	17	17	52	17	17	52	17	17	52	258

結果

遺伝子解析による種判別

石垣島で養成中のヤイトハタより採取したハダムシ 2 個体について、リボゾーム DNA の ITS 領域を解析し、データベース上に登録されていたマサバ (Yamamoto et al., 2011) とフウセイ (Li et al., 2005) に寄生する *N. girellae* およびカンパチ (白樫, 未発表) とマアジ (白樫, 未発表) に寄生する個体の配列と比較した結果、いずれも 99% 以上の高い相同性を示した (表 2)。また、解析に供した 2 個体の塩基配列の相同性に違いは確認されなかった。

表 2 石垣島の養殖ヤイトハタ 0 歳魚から採取されたハダムシの相同性検索結果

種名 (寄生虫)	種名 (宿主)	宿主名	相同性	識別ID
<i>Neobenedenia girellae</i>	<i>Scomber japonicus</i>	マサバ	912/913 (99%)	JF934745
<i>Neobenedenia girellae</i>	<i>Trachurus japonicus</i>	マアジ	551/552 (99%)	-
<i>Neobenedenia girellae</i>	<i>Seriola dumerili</i>	カンパチ	502/502 (100%)	-
<i>Neobenedenia girellae</i>	<i>Pseudosciaena crocea</i>	フウセイ	317/317 (100%)	AY551326

寄生状況調査

冬季低水温期における寄生虫体の有無を確認した結果、飼育開始 5 日後にはすでに虫体長 0.34~0.87mm の虫体が確認された (図 3)。その後、飼育日数の経過にもなって虫体数と体サイズが増加し、飼育開始 7 日後には 0.63±0.12mm (平均値±SD) の虫体が 1 尾あたり 23.9±6.8 個体寄生していることが確認された (図 3, 4)。一方、飼育開始 7 日後に実施した淡水浴の直後にあたる 8~9 日後に採取した個体からは、いずれも虫体が確認されなかったことから淡水浴によってほぼ全ての虫体を体表から除去できることが確認された (図 3)。ただし、10 日後には再度 0.20mm と 0.36mm の虫体が確認され、14 日後には 0.65±0.12mm の虫体が 1 尾あたり 60.5±12.2 個体の確認された (図 3, 4)。その後、7 日毎に反復して実施した計 5 回の淡水浴でも虫体の再寄生を完全に防除することはできなかった (図 4)。2.0mm 以上の虫体は、2 月 27 日 (飼育開始 42 日後) に 2 個体のみ採取された (図 3)。飼育期間中の日間給餌率は 0.2~2.5% の範囲であり、表層水温は平均 22.3±1.2°C であった (図 5)。終了時における試験魚の平均全長は 191.1±25.4mm、平均体重は 119.6±49.0g および累積死亡率は 14.2% であった。

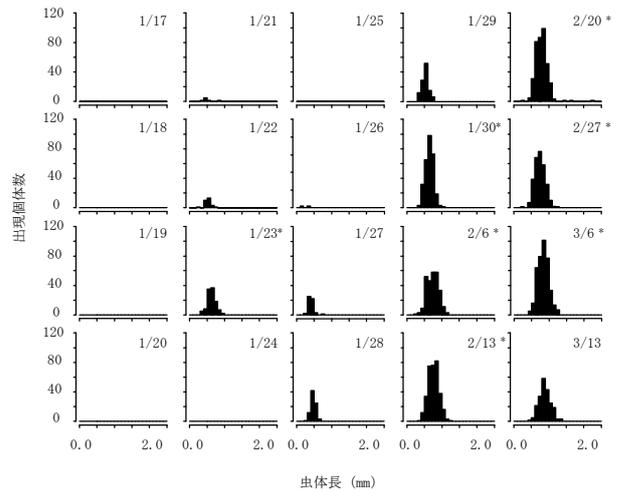


図 3 冬季低水温期に冲出したヤイトハタに寄生する *N. girellae* の虫体長組成。各日の出現個体数は、同日に採取した 5 尾の試験魚の体表から確認された虫体長 0.2mm 以上の虫体の合計値を示す。各採取日の*は淡水浴処理の実施日を示す。

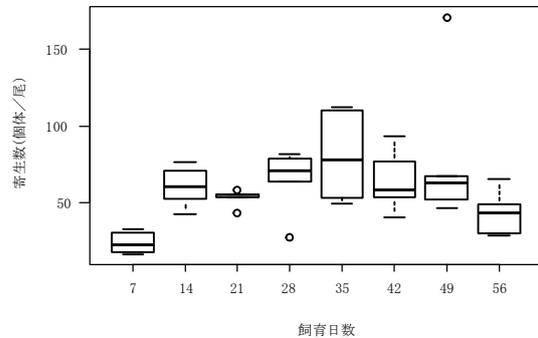


図 4 寄生状況調査期間中の *N. girellae* 寄生数の変化 (n=40)。箱ひし図は、7 日毎に実施した淡水浴処理直前に採取したヤイトハタ 1 尾あたりに寄生する虫体数の分布を表し、中央値と四分位数、四分位点範囲 (極値) における最大値と最小値および外れ値を示す。

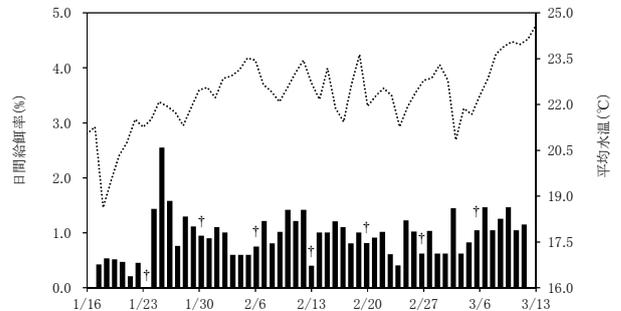


図 5 寄生状況調査期間中の日間給餌率と表層水温の経日変化。破線で示した平均水温は、同養殖場の水深 5m に設置したデータロガーにより、6 時間毎の測定によって得られた測定結果を表す。棒グラフ上の † は、淡水浴の実施日を示す。

虫卵分布調査

2013 年 3~6 月に実施した水深別の虫卵分布調査の結果、水深 1~3m 間では各月の出現卵数に有意な差は確認されなかった (図 6; Kruskal-Wallis 検定, p>0.05)。2014 年 2 月まで継続的に採集した水面下 3m のトラップ III における各月の出現卵数は、平均 0.2~3.9 個/日/cm² の範囲で周年にわたって確認された (図 7)。出現卵数が最も多かったのは水温約 22~24°C にあたる 3~4 月と 11~12 月 (平均 2.2~3.9 個/日/cm²) であり、最も少なかったのは、水温 28°C 以上の高水温期にあたる 6~9 月 (平均 0.2~1.3 個/日/cm²) であった (図 7)。

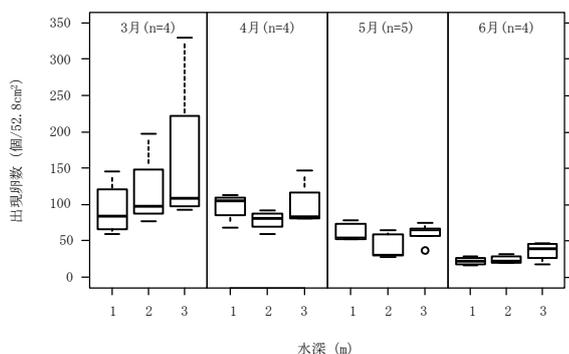


図6 虫卵分布調査によって得られた水深別の出現卵数。箱ひげは、トラップ回収月別深度別に集計した3地点合計の出現卵数を示し、中央値と四分位数、四分位点範囲(極値)における最大値と最小値および外れ値を示す。

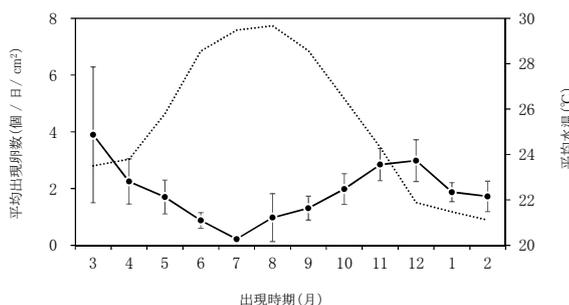


図7 水深3mに設置した虫卵回収用トラップに付着するハダムシ類の平均出現卵数と平均水温の経月変化。破線で示した平均水温は、同養殖場の水深5mに設置したデータロガーにより、6時間毎の測定によって得られた測定結果を表す。誤差範囲は標準偏差を示す。

考察

本研究において採取したヤイトハタに寄生するハダムシの塩基配列が、種判別の比較対象とした4魚種から得られた *N. girellae* といずれも 99%以上の高い相同性を示した(表2)、比較したマサバ、カンパチ、マアジの *N. girellae* については、過去に形態学的な識別によって本種と同定されたものであることから(白樫・小川, 未発表)、石垣島のヤイトハタに寄生するハダムシが *N. girellae* であることが明らかとなった。また、寄生状況調査と虫卵分布調査の結果から、石垣島では冬季低水温期においても繰り返し寄生が成立することが確認され(図3, 4)、虫卵の出現盛期が3~4月と11~12月であることが明らかとなった(図7)。以上の結果は、本地域における *N. girellae* の定着と周年を通じた感染環の成立を強く示唆するものであり、その寄生盛期が春季と秋季であること、周年にわたる定期的な淡水浴の必要性を示すものである。

一方、水深別の虫卵分布調査により、水深1~3mに出現する虫卵の分布状況に違いがみられなかったことから(図6)ヤイトハタを対象とした場合、沈下式生簀網を用いたカンパチ方式の改善策では十分な防除効果が得られない可能性が示された。本研究で対象としたヤイトハタは、岩礁域に生息する底魚であり、網内の底部やシェルターに定位滞留しやすく、給餌作業時以外に活発な遊泳行動は観察されない魚種である。体表の虫体から産出された虫卵は、宿主近辺にある網地やシェルターに比較的短時間に付着すると推測されることから、活発な遊泳活動により生簀網の上部に多くの虫卵が

蓄積するカンパチ(Shirakashi and Hirano, 2015)とはその分布特性が異なる可能性が示唆される。いずれにせよ飼育管理方法の改善による防除策を検討する場合は、虫卵の供給源となる宿主が網内のどの層に長く滞留するかによってその分布に偏りが生じる可能性があることに注意し、たとえ駆虫対象種が同じであっても宿主となる飼育対象種の特성에応じた方法をそれぞれ選択することが重要であろう。

また、虫卵分布調査において夏季高水温期に出現卵数が減少したことは(図7)、高水温環境で産卵数が増大するという *N. girellae* の産卵特性(Hirazawa et al., 2010)と大きく異なる結果であり、実際のフィールドにおける虫卵の出現状況に水温変動以外の要因も関与する可能性が示唆された。例えば、石垣島地方気象台で観測された1日あたりの日照時間(直達日射量0.12kW/m²以上の時間)は、虫卵が頻出した2013年3~4月で平均4.29~2.46時間、11~12月で平均3.71~1.97時間であったのに対し、虫卵の出現数が少なかった6~9月は平均6.95~9.15時間であった*。平野ほか(2015)によれば、同様の方法で採集した虫卵を同量に分けてふ化実験を行った場合、自然光のあたる屋外で採集したふ化幼生と屋内実験環境下で採集したそれでは、屋外の自然光下の方が顕著に多くなるため、ふ化の成功率に与える光刺激の影響が指摘されている。また、眼点を有する他の単生虫と同じく *N. girellae* のふ化幼生は正の走光性を有しており(小川2004)、その特性を利用した防除法も検討されている(Yamamoto et al., 2014)。一方、これらの光刺激に対する感受性が成虫の卵産出能力に与える影響については情報が不足しており、今後さらに詳細な検討が必要である。さらにハダムシによる寄生刺激や環境水温の低下が宿主となるヤイトハタの免疫機能にどのような影響を与えるかについてはこれまで調査されておらず、温暖な環境を好む熱帯性ハタ類のハダムシに対する抵抗性が冬季低水温期に低下する可能性は否定できない。加えて、本養殖場ではエラムシ類の1種を原因とする他の単生虫寄生も報告されていることから(山内ほか, 2013)、これらの混合感染が宿主の自己防御能に与える影響についても考慮した上で虫卵の出現状況に季節性が生じる原因を考察する必要がある。

*出典: 気象庁ホームページ

http://www.data.jma.go.jp/obd/stats/etrn/index.php?prec_no=91&block_no=47918&year=2013&month=&day=&view=

文献

- Bondad-Reantaso M. G., Ogawa K., Fukudome M., Wakabayashi H. 1995. Reproduction and growth of *Neobenedenia girellae* (Monogenea: Capsalidae), a skin parasite of cultured marine fishes of Japan. *Fish Pathology* 30(3): 227-231.
- 原田輝雄 ブリの増殖に関する研究—特にいけす網養殖における餌料と成長との関係—。近畿大学農学部紀要 1965(3):1-275

- 平野千早, 石丸克也, 白樫 正 2015. ハダムシ *Neobenedenia girellae* の産卵とふ化の日周リズム. 魚病研究 50(1): 23–28.
- Hirazawa N., Takano R., Hagiwara H., Noguchi M., Narita M. 2010. The influence of different water temperatures on *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection, parasite growth, egg production and emerging second generation on amberjack *Seriola dumerili* (Carangidae) and the histopathological effect of this parasite on fish skin. Aquaculture 299(1-4): 2–7.
- Li A.-X., Wu X.-Y., Ding X.-J., Lin R.-Q., Xie M.-Q., Lun Z.-R., Zhu X.-Q. 2005. PCR-SSCP as a molecular tool for the identification of Benedeniinae (Monogenea: Capsalidae) from marine fish. Molecular and cellular probes 19: 35–39.
- Ogawa K., Bondad-Reantaso M. G., Fukudome M., Wakabayashi H. 1995. *Neobenedenia girellae* (Hargis, 1955) Yamaguti, 1963 (Monogenea: Capsalidae) from cultured marine fishes of Japan. Journal of Parasitology 81(2): 223–227.
- 小川和夫 2004. 第七章 単生虫病. 魚介類の感染症・寄生虫症. 若林久嗣 (編) and 室賀清邦. 東京, 恒星社厚生閣: 353–379.
- Shirakashi S., Hirano C., Ishitani H., Ishimaru K. 2013. Diurnal pattern of skin fluke infection in cultured amberjack, *Seriola dumerili*, at different water depths. Aquaculture 402-403: 19–23.
- Shirakashi S., Hirano C. 2015. Accumulation and distribution of skin fluke *Neobenedenia girellae* eggs on a culture cage. Aquaculture 443: 1–4.
- 多和田真周 2000. 平成 11 年度における各魚種養殖種苗歩留まり調査. 沖縄県水産業改良普及活動実績報告書 平成 11 年度: 19–23.
- Yamamoto S., Shirakashi S., Morimoto S., Ishimaru K., Murata O. 2011. Efficacy of oral praziquantel treatment against the skin fluke infection of cultured chub mackerel, *Scomber japonicus*. Aquaculture 319(1-2): 53–57.
- Yamamoto S., Fukushima A., Ishimaru K., Shirakashi S. 2014. Shading of net cage is an effective control measure against skin fluke *Neobenedenia girellae* infection in chub mackerel *Scomber Japonicus*. Fisheries Science 80(5): 1021–1026.
- 山内 岬, 木村基文, 岸本和雄, 知名真智子, 仲盛 淳 2013. 海面養殖開始初期のヤイトハタに寄生する単生類とその害作用について. 沖縄県水産海洋研究センター事業報告書 74: 83–91.
- 横山 博, 長澤和也 2014. 養殖魚介類の寄生虫の標準和名目録. 生物圏科学 53: 73–97.