# 高知県浦ノ内湾における海産白点虫 *Cryptocaryon irritans* の分布動態について

今城雅之[1]・梅﨑拓也[1]・門野真弥[1]・小島伸介[2]
([1]高知大学教育研究部自然科学系農学部門・[2]有限会社小島水産)

Distribution Dynamics of *Cryptocaryon irritans* in Uranouchi Bay, Kochi, Japan

Masayuki Imajoh[1], Takuya Umezaki[1], Shinya Monno[1] and Sinsuke Kojima[2]
[1]*Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University;*
[2]*Kojima Suisan Co., Ltd.*

**Abstract:** Uranouchi Bay is an enclosed bay with an area of 12.37 km$^2$ and a maximum depth of 20 m. It is a main location for red seabream (*Pagrus major*) farming in Kochi Prefecture, which is on Shikoku Island, Japan. *Cryptocaryon irritans*, a ciliated, protozoan parasite, causes cryptocaryoniasis ("white spot disease") in cultured marine fishes in western Japan. In this study, we used TaqMan real-time PCR assays to detect and quantify this parasite in benthic mud and seawater samples collected from two stations in Uranouchi Bay: one in front of the Kojima Suisan building (St. A), and the other near the red seabream-farming net cages (St. B). Cryptocaryoniasis was not observed in any cultured red seabream throughout the sampling period in 2015. The 5.8S rRNA gene of *C. irritans* was detected at an average of $8.0 \times 10^3$ copies/L in seawater collected on 19 October at a depth of 1 m at St. A, and at $7.9 \times 10^4$ and $2.6 \times 10^4$ copies/L, respectively, in seawater collected at depths of 1 m and 10 m at St. B. Thus, the numbers of *C. irritans* did not reach the lethal level. Thereafter, that gene was not detected in seawater at either sampling station. Averages of $1.1 \times 10^4$ and $5.5 \times 10^3$ copies/g, respectively, were detected in benthic mud collected at St. A on 22 July and 8 December, indicating the probable presence of cysts. Seawater on the ground around St. A is pumped up into the concrete tank in the Kojima Suisan building. This suggests the possibility that cysts, which are dormant in benthic mud, are introduced into the tank by this pumping, and the release of theronts is triggered under the increased dissolved-oxygen concentration. This would then cause an outbreak of cryptocaryoniasis in the fish before they are shipped.

キーワード：白点病，クリプトカリオン・イリタンス，マダイ，浦ノ内湾，TaqMan リアルタイム PCR 法.
Keyword: White spot disease, *Cryptocaryon irritans*, Red sea bream, Uranouchi Bay, TaqMan real-time PCR assay.

## はじめに

高知県浦ノ内湾は土佐湾中央部に位置し，湾口幅 1.24 km で湾口最大水深 9 m と入り口が狭く，面積 12.37 $km^2$，奥行き 8.8 km，湾内最大水深 20 m の閉鎖的な湾であり（環境省閉鎖性海域ネット[1)]），その入り組んだ地形を活用してマダイ *Pagrus major* 養殖が盛んに行われ，「乙女鯛」や「海援鯛」などのブランド魚が生産されている（高知県庁ホームページ[2)]）．過去に本湾では，繊毛虫の一種 *Cryptocaryon irritans* を原因とする海産白点病の被害に悩まされた時期があったものの，近年その発生は見られなくなっている．しかし一方で，浦ノ内湾の灰方崎の岬のすぐ傍の有限会社小島水産において，秋期になると施設内のコンクリート水槽で本病を罹患した出荷前のマダイがしばしば確認され，出荷時の大きな問題になることがある．そこで本研究では，我々の開発した TaqMan リアルタイム PCR 法（今城ほか[3)]）を用いて，浦ノ内湾における *C. irritans* の分布動態を明らかにすることを目的とした．

## 材料と方法

### 調査地点と調査期間

調査地点の詳細をFig. 1に示した．小島水産前の地下海水汲み上げ場所付近にSt. A，マダイ生簀の多い湾中央にSt. Bを設け，調査はSt. Aで7月22日，St. Bで6月18日から開始し，両定点ともに12月8日に終了した．

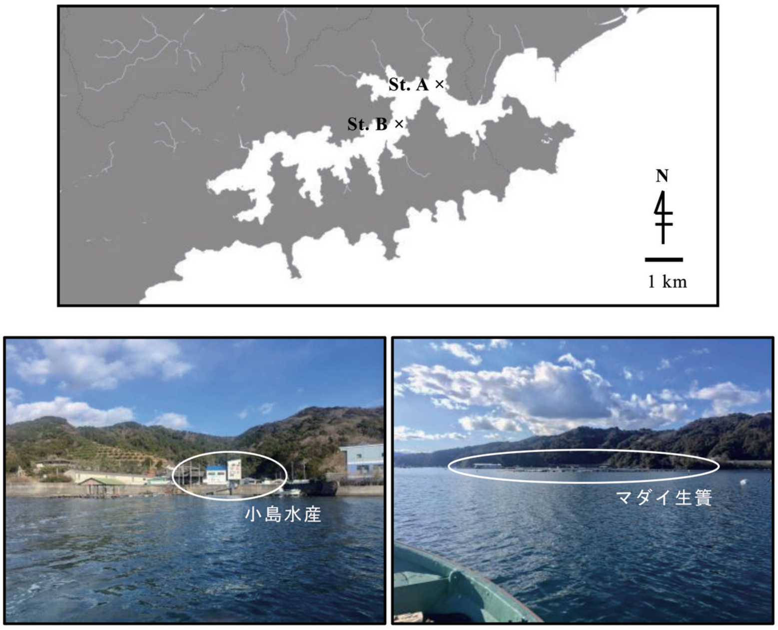


**Fig. 1.** 浦ノ内湾における採水・採泥箇所．左下写真はSt. A，右下写真はSt. Bから周辺を撮影したもの．

### 海水の採水と底泥の採泥

採水と採泥は各月に1～2回実施した．時間帯は当初日中としていたが，11月30日と12月8日は午前7:00に変更した．St. Aの水深1 mおよび5 mの海水，St. Bの水深1 m，5 mおよび10 mの海水を北原式B号採水器を用いて採水し，YSI55型DO（溶存酸素）メーター（ワイエスアイ・ナノテック社製）により各海水の水温とDO濃度を測定した．両定点の採泥はエクマンバージ型採泥器を用い，同様に各底泥の温度を測定して15 mL遠沈管に分取した．

### 海水および底泥からのDNA抽出

海水試料1 Lを孔径0.47 µmのセルロース混合エステルタイプメンブレンフィルター（アドバンテック社製）でろ過し，DNeasy Plant Mini Kit（キアゲン社製）によりフィルター上の集積物のDNA抽出を行った．底泥試料1 gを超低温フリーザー（サンヨー社製）に入れて，−80℃で凍結・融解を3回繰り返し，PowerSoil DNA Isolation Kit（MO BIO社製）によりDNA抽出を行った．DNAの純度と濃度はQ5000微量紫外可視分光光度計（トミー精工社製）により測定した．

### TaqManリアルタイムPCR法

リアルタイムPCR反応は今城ほか[3)]による報告に準じて行い，*C. irritans*の5.8S rRNA遺伝子量を海水試料は1 Lあたりのコピー数，底泥試料は湿重量1 gあたりのコピー数として算出した．

## 結果と考察

St. AおよびSt. Bの水温と底泥温の推移をFig. 2の実線で，DO濃度の推移を破線でそれぞれ示した．水温と底泥温については，両定点でサンプリング開始時から上昇して8月24日にピークに達し，St. Aで水深1 mの30.5°C，St. Bで水深1 mの30.4°Cが最も高い値となった. その後, 両定点ともに下降傾向を示し, 10月27日に23°C付近まで低下した．サンプリングの時間帯を変更した11月30日の水温と底泥温は両定点で20°C付近となり，12月に入ってからはさらにSt. Aで17.6～18.5°C，St. Bで15.8～19.3°Cと20°Cを下回るようになった．DO濃度については，水深1 mにおいて，St. Aで9月17日の4.4 mg/Lと10月27日の4.1 mg/Lを底とするダブルボトム，St. Bで9月17日の3.1 mg/Lを底とするシングルボトムの形が見られ，St. Aでは7月22日の9.1 mg/L，St. Bでは6月18日の9.3 mg/Lとともにサンプリング開始時が最も高い値を示した．一方，St. Aの水深5 mは3.7～5.1 mg/L間，St. Bの水深5 mおよび水深10 mは2.1～5.1 mg/L間で推移し，水深1 mよりも低酸素状態にあった．

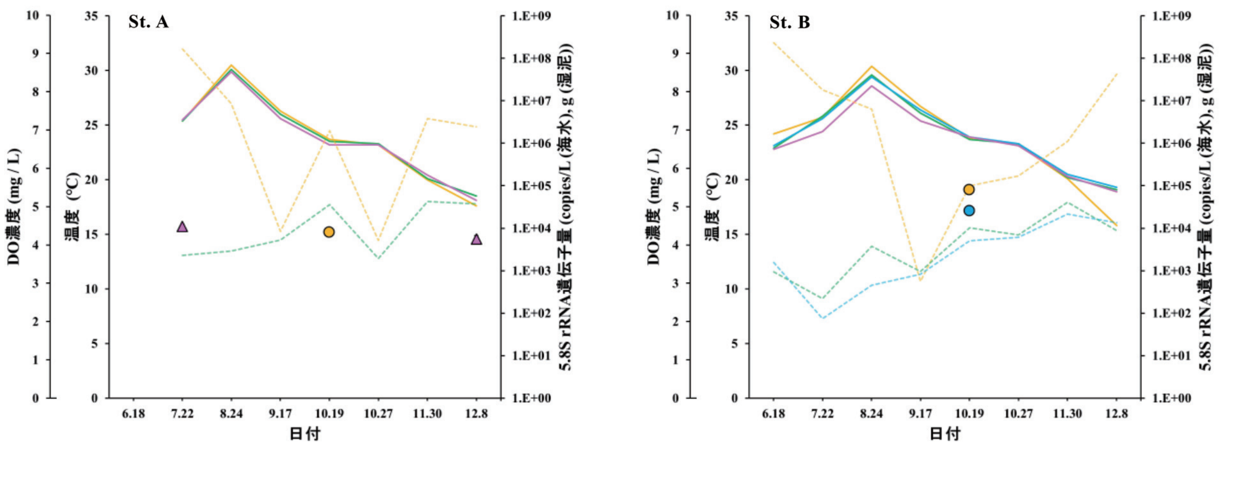


**Fig. 2.** St. A と St. B の海水と底泥における *C. irritans* 5.8S rRNA 遺伝子量（右縦軸），温度および DO 濃度（左縦軸）の推移．シンボルは 5.8S rRNA 遺伝子量（黄色は水深 1 m，青色は水深 10 m，ピンク色は底泥），実線（黄色は水深 1 m，緑色は水深 5 m，青色は水深 10 m，ピンク色は底泥）は水温もしくは底泥温，破線（黄色は水深 1 m，緑色は水深 5 m，青色は水深 10 m，ピンク色は底泥）は DO 濃度をそれぞれ示す．

TaqManリアルタイムPCR法による海水と底泥での5.8S rRNA遺伝子の検出・定量の結果をFig. 2のシンボルで示した．海水中の5.8S rRNA遺伝子はSt. AとSt. Bともに10月19日にのみ検出され，平均コピー数はSt. Aの水深1 mで$8.0\times10^3$ copies/L，St. Bの水深1 mと水深10 mで$7.9\times10^4$ copies/Lと$2.6\times10^4$ copies/Lであった．これらは，海底から遊泳

してきた感染幼虫のセロント，もしくは魚体から離脱したプロトモントのいずれかを検出したと考えられた．その一方で，同日に採取した底泥から5.8S rRNA遺伝子は検出されず，シストの存在を確認することができなかった．このことは，底泥を崩れた状態から無作為に採取したため，シストがあると思われる底泥上，またはその周辺を含まない部分をDNA抽出に用いた可能性が示唆され，適正な検出ではなかったと疑われた．

*C. irritans*の発育至適水温は31°Cとされるが，海面生簀養殖において海産白点病による大量死は盛夏よりも秋に発生することがほとんどである（良永[4]）．養殖マダイでの甚大な被害事例として，浦ノ内湾の西隣に位置する野見湾で，1997年にマダイ全養殖尾数の30%に相当する約110万匹で550トンの被害量と5億5千万円の被害金額となり，その主な被害は26°Cから24°Cまで水温の低下した10月前半であった（安藤ほか[5]，Yoshinaga[6] など）．また，和歌山県串本町大島では2003年10月から11月にかけて約62万匹が被害を受け，被害金額は2億3千万円に上ったとされた（堅田ほか[7]）．10月19日も同様に水温の低下時期であったにもかかわらず，上記の5.8S rRNA遺伝子量から海水1 Lあたりのセロント虫体数を以前の我々の報告（今城ほか[3]）に基づいて推定すると，St. Aの水深1 mで0.8虫体，St. Bの水深1 mで8.2虫体および水深10 mで2.7虫体となり，日中のサンプリングは適さないとする我々の報告（今城ほか[3]）から過小評価かもしれないが，1魚体あたりの致死的寄生強度12,000虫体（Danほか[8]）には及ばない数であった．25°Cの条件下では，感染幼虫のセロントは宿主に侵入して離脱するまでに3〜4日かかり，離脱虫体は海底でシストとなり，宿主離脱4日から2週間後に同シストから200〜300虫体のセロントが水中へと放出される（堅田ほか[7]，ColorniとBurgess[9] など）．よって，10月19日に推定された虫体数と生活環の一巡に要する日数を考慮すると，海産白点病の流行期間中に虫体数が致死量に達する状況になるとは考えにくく，実際に10月27日以降は再度検出されなくなり，流行期の終わりの目安とされる20°C付近に水温低下した11月30日まで，一度も罹病したマダイが見られることはなかった．

安藤ほかの報告[10]によると，浦ノ内湾の底泥から回収したシストを水槽に収容し，同環境下でマダイ，ブリ*Seriola quinqueradiata*，カンパチ*Seriola dumerili*をそれぞれ飼育すると，ブリとカンパチの鰓への寄生は少なく，マダイの鰓に多数の寄生が見られたことから，浦ノ内湾株はマダイに特異性を持つとされた．また，田辺湾のマダイで海産白点病が発生した時には同海域のカンパチでは発症しなかったことが確認されている（石谷ほか[11]）．野見湾でも元々，海産白点病の被害はマダイで見られていたが，カンパチでの被害が圧倒的に多くなり，2015年の調査事例から，カンパチ生簀のある漁場で10月上旬と11月下旬を主として海産白点病による死亡事例が発生し，この間，海水中で致死量に近い虫体数の増加が推定されたのに対し，マダイ生簀のある漁場では流行期間中にわずかな虫体数の存在が示されたに過ぎず，高知県水産試験場の検査報告でも，マダイ鰓への*C. irritans*の寄生は確認されなかった（今城ほか[3]）．この理由として，*C. irritans*のrRNA遺伝子18S-ITS1領域の塩基配列に基づく分子系統学的解析から，我々は中国産カンパチ種苗の輸入が野見湾における例年の海産白点病発生の原因になると考えており，仮に同種苗に寄生している状態から毎年生活環が始まるとすれば，湾内に定着しているものよりも圧倒的に多い数のシストが短期間で形成されると想定できる．以前は浦ノ内湾や野見湾のマダイ養殖もカンパチ同様に輸入種苗に依存していたことから，当時も持ち込みによりマダイで被害が発生していたのかもしれない．同時に，現在は国内人工種苗が用いられることから同リスクはなくなり，浦ノ内湾内に定着したシストのみで虫体数が増加するため，流行時期でも顕著な増加に繋がらないと考えられた．

St. Aの底泥において，5.8S rRNA遺伝子が7月24日に$1.1\times10^4$ copies/gおよび12月8日に$5.5\times10^3$ copies/gと検出され，おそらくシスト化した*C. irritans*の存在を確認することができた．低DOで培養したシストはDO飽和条件下に移すと，数日後にセロントを放出するシストの割合が急増すると報告されている（Yoshinaga[6]）．小島水産のコンクリート水槽の海水はSt. A付近の地下海水を汲み上げたものを使用しているため，同地点で休眠状態の底泥シストが海水とともにコンクリート水槽内に混入して，さらにDO濃度の高い水槽内でセロントが遊出の機会を与えられて出荷前の飼育マダイに感染するという仮説が成立する．また，水槽内で生活環が成立することで沈降したプロトモント，もしくはシストが排水とともに排水口から海域へと再び流出し，St. A周辺の底泥へ集積しているのかもしれない．よって，St. Aの底泥シストがコンクリート水槽の海産白点病の感染源となり，このサイクルがSt. Aでの*C. irritans*の常在

化を助長している疑いがあることから，この点を詳細に検証するため，底泥シストを回収して水槽実験でセロント放出の有無を明らかにする必要がある．

以上から，浦ノ内湾における*C. irritans*の分布動態を遺伝子レベルで初めて明らかにすることができた．同湾の海産白点病問題について，湾内では流行期間中でも養殖マダイの被害に繋がる虫体の増加が見られることはないと思われる．一方で，小島水産のコンクリート水槽で発生する海産白点病はSt. Aの底泥シストを感染源とする可能性があり，加えて，他湾の養殖漁場から仕入れたカンパチの中に本病の罹患魚が見られることがあるとの話から，新たな持ち込みの懸念も出てきており，今後も監視を続けていく必要がある．

## 謝辞

エクマンバージ型採泥器の貸与に協力をいただきました高知県水産試験場の方々に深く御礼申し上げます．

## 文献

1. 環境省閉鎖性海域ネット，https://www.env.go.jp/water/heisa/heisa_net/waters/uranoutiwan.html.
2. 高知県庁ホームページ，http://www.pref.kochi.lg.jp/soshiki/040601/2014121600191.html.
3. 今城雅之・森光一幸・助田将樹・梅﨑拓也・門野真弥・合田暉・久保栄作・大嶋俊一郎，高知県野見湾における *Cryptocaryon irritans* の TaqMan リアルタイム PCR 検出と分子系統解析．魚病研究，51，103－111.（2016）
4. 良永知義，海産白点虫*Cryptocaryon irritans*の防疫と対策．月刊海洋号外No.14，海洋出版株式会社，東京，pp. 73－76.（1998）
5. 安藤裕章・林芳弘・大河俊之，白点病発生予測のためのモニタリング及びシストの検出方法の確立．平成18年度高知県水産試験場事業報告書，104，125－130.（2008）
6. Yoshinaga, T., 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 Pathology, 36, 231－235. (2001)
7. 堅田昌英・木村創・竹内照文・良永知義，海産白点虫*Cryptocaryon irritans*の宿主離脱時間および感染時刻．水産増殖，54，537－541.（2006）
8. Dan, X.M., Li, A.X., Lin, X.T., Teng, N., Zhu, X.Q., A standardized method to propagate *Cryptocaryon irritans* on a susceptible host pompano *Trachinotus ovatus*. Aquaculture, 258, 127－133. (2006)
9. Colorni, A., Burgess, P., *Cryptocaryon irritans* Brown 1951, the cause of ‘white spot disease’ in marine fish: an update. Aquarium Sciences and Conservation, 1, 217－238. (1997)
10. 安藤裕章・林芳弘・大河俊之，白点病発生予測のためのモニタリング及びシストの検出方法の確立．平成19年度高知県水産試験場事業報告書，105，141－151.（2009）
11. 石谷大・村田修・那須敏朗・和泉健一・宮野茂一・熊井英水，海水養殖魚における白点病の発生状況．近畿大学水産研究所報告，5，131－137.（1996）

平成29年（2017）10月12日受理
平成29年（2017）12月31日発行