

高知県野見湾の養殖カンパチにおけるカプサラ科単生類 2 種の 季節的寄生状況および遺伝的多様性について

今城雅之¹・合田暉¹・門野真弥¹・久保栄作²・森光一幸³
(¹高知大学教育研究部自然科学系農学部門・²久保水産・³カネイ水産)

Seasonal Prevalence and Genetic Diversity of Two Capsalid Monogenean Species in
Cultured Greater Amberjack (*Seriola dumerili*) in Nomi Bay, Kochi, Japan

Masayuki Imajoh¹, Hikaru Goda¹, Shinya Monno¹, Eisaku Kubo² and Kazuyuki Morimitu³

¹Agriculture Unit, Natural Sciences Cluster, Research and Education Faculty, Kochi University; ²Kubo Suisan; ³Kanei Suisan

Abstract: Nomi Bay, in Kochi Prefecture, Japan, is famous as the cradle of greater amberjack (*Seriola dumerili*) culture in Japan. Two species of capsalid monogeneans, *Benedenia seriolae* and *Neobenedeniagirellae*, which are causative agents of skin fluke disease, are a serious problem for fish culture in the bay. They affect the fishes' growth, contribute to secondary infections, and in some cases cause mortality. In this study, we examined seasonal prevalence and the genetic diversity of these two skin flukes on cultured greater amberjack in Nomi Bay. In 2015, the average number of flukes per fish from 6 July to 2 December was 0.7–25.5 for 0-year-old fish, and from 6 July to 29 December was 10.7–85.3 for 1-year-old fish. These skin flukes were almost all *B. seriolae*. In 2016, the average number of flukes per fish was 1–21.7 from 5 February to 26 December for 0-year-old fish, and 3–62.3 from 21 January to 26 December for 1-year-old fish. The flukes collected from 0-year-old fish between 30 September and 18 November and from 1-year-old fish between 13 September and 14 October were all *N. girellae*. This change in dominant parasite species was probably due to an increase in water temperature to over 30 °C in August. Ten haplotypes of *B. seriolae* were identified, based on mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene sequences from 25 randomly selected specimens from each sampling date. Two of the 10 were reported in our previous study. All 10 haplotypes were grouped with the Japanese clade of the COI gene sequence phylogenetic tree. Nine *N. girellae* specimens had 100% COI gene sequence similarity with specimens collected from greater amberjack juveniles cultured in Dadonghai, China, suggesting that *N. girellae* may be introduced in spring every year through the import of juveniles.

キーワード: ハダムシ症, 野見湾, カンパチ, ベネデニア・セリオレ, ネオベネデニア・ジレレ, COI 遺伝子.

Keyword: Skin fluke disease, Nomi Bay, Greater amberjack, *B. seriolae*, *N. girellae*, COI gene.

はじめに

ハダムシ症は、元々標準和名でブリハダムシと呼ばれる *Benedenia seriolae* を原因とし、ブリ *Seriola quinqueradiata*、カンパチ *Seriola dumerili*、ヒラマサ *Seriola lalandi* などで見られる病気であったが(横山と長澤¹⁾)、他のベネデニア属(Ogawaほか²⁾、小川³⁾、Ogawa⁴⁾ など) やネオベネデニア属(Ogawaほか⁵⁾) などの近縁種が出現するようになり、カプサラ科単生類の魚体への寄生をハダムシ症と称するようになった。ブリ属魚類のハダムシ寄生に対する感受性は、カンパチ、ヒラマサ、ブリの順に高く(長倉ほか⁶⁾、Ohnoほか⁷⁾ など)、西四国地区と南中九州地区のブリ属養殖に被害をもたらしている(平成27年度南中九州・西四国水族防疫会議資料)。ハダムシ症対策としては、淡水浴、過酸化水素製剤による薬浴、プラジカンテルの経口投与等があるが、その中でも、淡水浴と薬浴が最も一般的である(長倉ほか⁸⁾)。淡水浴は通常、魚を5分程度真水に漬ける作業であるが、カンパチの場合、年間を通じて繰り返し行う必要があり、また夏場の高水温時には魚が酸欠になるため3分程度しか行えず、*B. seriolae* に対して十分な駆虫効果が期待できない(平澤⁹⁾)。高知県須崎市野見湾はカンパチ養殖が盛んである一方で、淡水浴による頻繁な駆虫作業が養殖業者の大きな負担となっている現状から、現場では新しいハダムシ症対策が求められている。そこで本研究では、野見湾でのハダムシ症問題の実態を詳細に把握するため、同湾における原因単生虫2種 *B. seriolae* と *Neobenedenia girellae* の季節的变化および遺伝的多様性を調査した。

材料と方法

サンプリング地点と対象魚種

野見湾湾口部のガラク漁場の区画で養殖されたカンパチ当歳魚および1歳魚をサンプリングの対象とし、それぞれの飼育生簀の位置をFig. 1に示した。

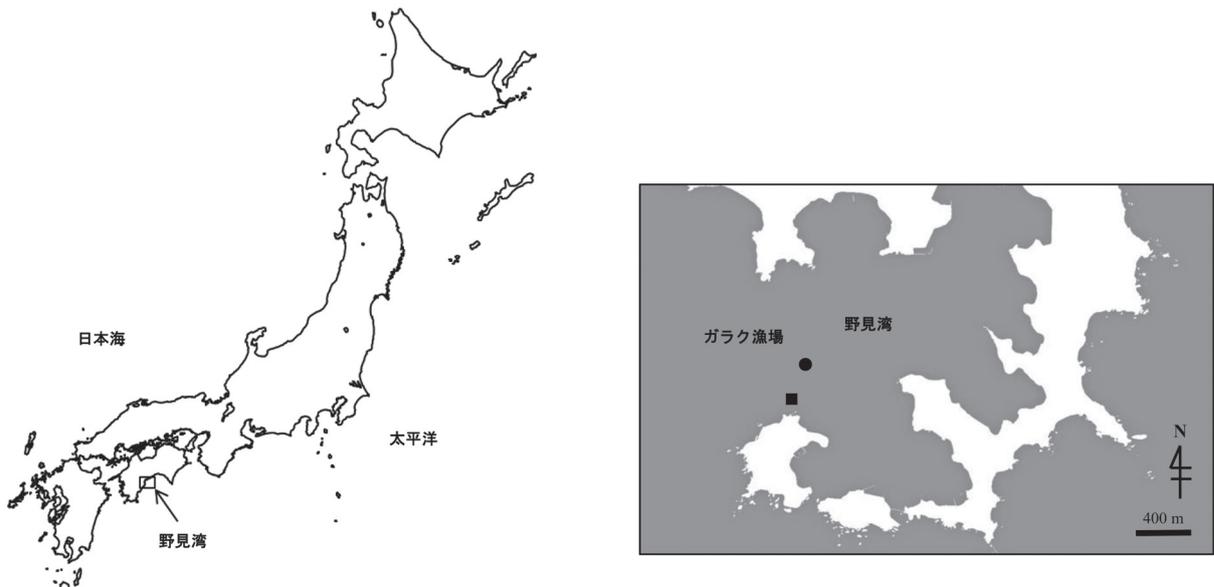


Fig. 1. 野見湾の位置(左図)とカンパチ当歳魚(●)および1歳魚(■)のサンプリング箇所(右図)。

サンプリング

調査期間とサンプリング頻度について、2015年は7月～12月の9月を除く各月で、2016年は1月～12月の3月、4月、8月を除く各月で1回もしくは2回とした。サンプリングは現場で淡水浴が行われる前に実施し、サンプリング毎に1尾～3尾を取

り上げ、1尾ずつ真水を入れた20 Lのクーラーボックスに入れ、約5分間程度の淡水浴を行った。その後、体表から剥がれ落ちた虫体をネットで回収し、70%エタノール溶液に入れて持ち帰った。また、2015年4月に中国海南省海南島大東海の畜養カンパチからも同様の手順で30虫体を採集した。

実体顕微鏡による観察

回収した虫体をスライドガラスの上に置き、実体顕微鏡 SMZ-10（ニコン社製）を用いて、Kinami ほか¹⁰⁾の報告に準じて、体前端部にある一対の吸盤間の凸形で *B. seriolae*、凹形で *N. girellae* と判別して、両種の寄生数を計数した。

DNA 抽出

サンプリング毎に *B. seriolae* と *N. girellae* を1虫体ずつ無作為に選別し、QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン社製）を用いてマニュアルに従い DNA 抽出した。得られた DNA の濃度と純度を Q5000 微量紫外可視分光光度計（トミー精工社製）で測定した。

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅およびPCR産物のゲル精製

PCR反応は今城ほか¹¹⁾の報告に準じて行い、ミトコンドリアDNAのシトクロームc酸化酵素サブユニット1（COI）遺伝子領域をターゲットにした。得られたPCR産物は1.2%のアガロースゲルの電気泳動に供し、エチジウムブロマイドで15分間染色した。その後、LEDトランスイルミネーター（和光純薬工業）のLED照射下で目的のバンドを切り出し、High Pure PCR Product Purification Kit（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）に供し、マニュアルに従いゲル精製を行った。

塩基配列解析

ゲル精製したPCR産物をテンプレートとし、既報のプライマー（今城ほか¹¹⁾）とBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequence Kit（ライフテクノロジーズ社製）を用いてサイクルシーケンス反応を行った。反応液はエタノール沈殿を行い、風乾後、Hi-Diホルムアミドに再度溶解し、ABI Prism3100-Avant Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズ社製）に供して塩基配列を決定した。

塩基配列データ解析および分子系統樹の作成

得られた COI 遺伝子の塩基配列をもとに DNA 多型の検出、ハプロタイプの決定および分子系統解析を行った。分子系統解析には、データベース上に登録されている既存の *B. seriolae* の COI 遺伝子配列（チリのヒラマサ由来のアセッション番号 KC633872~KC633878, 和歌山県のブリ由来のアセッション番号 KC633879~KC633881, オーストラリアのサムソンフィッシュ由来のアセッション番号 NC014291, HM22526)を合わせて MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 7により最尤法で系統樹を作成した。その際、分岐の信頼性を1000回のブートストラップ法により推定し、Sepúlveda と González¹²⁾の報告に準じて、同属の近縁種である *Neobenedenia* sp. (アセッション番号 JQ782846) をアウトグループとした。

結果と考察

野見湾の湾口部に位置するガラク漁場にはカンパチ生簀が配置されており、同漁場のカンパチ当歳魚と1歳魚における *B. seriolae* と *N. girellae* の総寄生数と1尾あたりの平均寄生数を Table 1 に示した。*B. seriolae* の平均寄生数は、2015年には当歳魚で7月6日に0.7虫体、7月24日に13.3虫体、8月8日に1.3虫体、12月2日に25.5虫体、1歳魚で7月6日に18.3虫体、7月24日に18.7虫体、8月8日に19.7虫体、10月29日に81.7虫体、11月24日に15.7虫体、12月12日に

10.7 虫体, 12 月 29 日に 34.5 虫体となり, 2016 年には当歳魚で 2 月 5 日に 21.7 虫体, 2 月 26 日に 13.5 虫体, 5 月 30 日に 1 虫体, 6 月 20 日に 2.3 虫体, 7 月 26 日に 12 虫体, 12 月 26 日に 3 虫体, 1 歳魚で 1 月 21 日に 62.3 虫体, 2 月 8 日に 14 虫体, 5 月 9 日に 6.7 虫体, 5 月 30 日に 13 虫体, 6 月 20 日に 21 虫体, 7 月 12 日に 14.7 虫体, 7 月 26 日に 34.3 虫体, 12 月 26 日に 3 虫体となった. よって, *B. seriolae* の寄生強度は当歳魚よりも 1 歳魚の方が高く, かつ周年で寄生する傾向にあり, 野見湾のハダムシ症の主な原因は *B. seriolae* であることが示された. 本虫の虫卵が孵化するのにかかる日数は 12.5°C で 52.1 日, 21.3°C で 6.5 日, 23.9°C で 5.2 日とされ, また, 虫卵の孵化率は 12.5°C~26.9°C で 50%以上となるが, 26.9°C 以上では著しく低下し, 29.7°C で 3%, 9.4°C で 0%となる (保科と松里¹³⁾). 今回の調査期間中の水温は, 2015 年 7 月 6 日~12 月 29 日まで 18.2°C~29°C, 2016 年 1 月 21 日~12 月 26 日まで 16.5°C~28°C で推移し, 1 年の多くは *B. seriolae* の卵発

Table 1. カンパチ当歳魚および 1 歳魚におけるハダムシの寄生数.

日付	尾数	水温 (°C)	総寄生数 (平均寄生数/尾)		
			<i>B. seriolae</i>	<i>N. girellae</i>	合計
2015 年					
0 歳魚					
7 月 6 日	3	23	2 (0.7)	0	2 (0.7)
7 月 24 日	3	26.2	40 (13.3)	0	40 (13.3)
8 月 8 日	3	29	4 (1.3)	0	4 (1.3)
12 月 2 日	2	21.7	51 (25.5)	0	51 (25.5)
1 歳魚					
7 月 6 日	3	23	55 (18.3)	0	55 (18.3)
7 月 24 日	3	26.2	56 (18.7)	2 (0.7)	58 (19.3)
8 月 8 日	3	29	59 (19.7)	0	59 (19.7)
10 月 29 日	3	24	245 (81.7)	11 (3.7)	245 (85.3)
11 月 24 日	3	22	47 (15.7)	0	47 (15.7)
12 月 12 日	3	18.2	32 (10.7)	0	32 (10.7)
12 月 29 日	2	19	69 (34.5)	0	69 (34.5)
2016 年					
0 歳魚					
2 月 5 日	3	17	65 (21.7)	0	65 (21.7)
2 月 26 日	2	16.5	27 (13.5)	0	27 (13.5)
5 月 30 日	2	22	2 (1)	0	2 (1)
6 月 20 日	3	25	7 (2.3)	0	7 (2.3)
7 月 26 日	3	26	36 (12)	0	36 (12)
9 月 30 日	3	27.1	0	41 (13.7)	41 (13.7)
10 月 14 日	2	26	0	17 (8.5)	17 (8.5)
11 月 18 日	2	21.7	0	2 (1)	2 (1)
12 月 26 日	2	19	6 (3)	0	6 (3)
1 歳魚					
1 月 21 日	3	19	187 (62.3)	0	187 (62.3)
2 月 8 日	3	17	42 (14)	0	42 (14)
5 月 9 日	3	20.2	20 (6.7)	0	20 (6.7)
5 月 30 日	1	22	13 (13)	2 (2)	15 (15)
6 月 20 日	3	25	63 (21)	0	63 (21)
7 月 12 日	3	26	44 (14.7)	0	44 (14.7)
7 月 26 日	3	26	103 (34.3)	0	103 (34.3)
9 月 13 日	3	28	0	56 (18.7)	56 (18.7)
9 月 30 日	3	27.1	0	81 (27)	81 (27)
10 月 14 日	3	26	0	36 (12)	36 (12)
12 月 26 日	2	19	6 (3)	0	6 (3)

生の適水温の範囲内にあったことから, 野見湾は *B. seriolae* が常在するのに適した環境であると思われた.

N. girellae の平均寄生数は, 2015 年には 1 歳魚で 7 月 24 日に 0.7 虫体, 10 月 29 日に 3.7 虫体となり, 当歳魚での寄生は全く見られず, 2016 年には当歳魚で 9 月 30 日に 13.7 虫体, 10 月 14 日に 8.5 虫体, 11 月 18 日に 1 虫体, 1 歳魚で 5 月 30 日に 2 虫体, 9 月 13 日に 18.7 虫体, 9 月 30 日に 27 虫体, 10 月 14 日に 12 虫体となった. そのうち, 2016 年の 9 月以降は当歳魚と 1 歳魚ともに *N. girellae* のみが寄生するようになった. その前兆として, 2016 年 8 月は例年になく水温が 30°C を上回り, 同期間中にこれまでの *B. seriolae* 寄生が全く見られなくなる現象が起こり (data not shown), 本虫が 30°C 以上で孵化できない特性によるもの (Ernst ほか¹⁴⁾) と考えられた. 鹿児島県の養殖カンパチでは, 春先から水温が 28°C 以下の 7 月頃までは *B. seriolae*, 水温が 28°C 以上となる高水温期の 8 月から水温が低下し始める 11 月頃までは *N. girellae* が優先して寄生する傾向が報告されている (柳ほか¹⁵⁾). 本研究から, 野見湾のカンパチでも似た寄生傾向が認められ, さらに水温が 30°C を超えてから低下すると *N. girellae* の優位性が極めて高くなることを初めて明らかにした.

B. seriolae の COI 遺伝子領域の塩基配列を比較した結果, 507 番目の C→T, 514 番目の A→C, 653 番目の C→T, 735 番目の T→G, 889 番目の A→G と合計 5 箇所塩基置換が検出され, 多型箇所の組み合わせから 10 ハプロタイプが確認された (Table 2). さらに, この 10 ハプロタイプは, COI 遺伝子領域の塩基配列に基づいた最尤系統樹の日本クレード, オーストラリアクレードおよびチリクレードのうち, 日本クレードに位置した (Fig. 2). Sepúlveda と González¹²⁾ は, 同分子系統樹による分類に基づき, *B. seriolae* は複合種であることを示唆しており, お互いの分布域は地理的に制限されているとした. よって, この見解を支持するのであれば, 以前の我々の報告 (今城ほか¹¹⁾) と同様に, 今回の 10 ハプロタイプもすべて日

Table 2. *B. seriolae* 10 ハプロタイプの DNA 多型箇所.

ハプロタイプ	塩基置換部位				
	507	514	653	735	889
MSa	C	A	C	T	A
MSb	T	A	C	T	A
MSc	C	C	C	T	A
MSd	T	A	T	G	A
MSe	T	A	T	T	A
MSf	C	A	T	T	A
MSg	T	A	T	T	G
MSH	C	A	T	G	A
MSi	T	A	C	G	G
MSj	T	A	T	G	G

本特有の同種であると思なすことができる。また、COI 遺伝子は種内の多様性を判別できる分子マーカーでもある (Hebert ほか¹⁶⁾)。ハプロタイプ MSi と MSj は以前に報告した CSa と CSe (今城ほか¹¹⁾) と同じ塩基配列を示し、うち MSj はカンパチ由来のハプロタイプのみが属するクラスターに位置したことから、もしかしたら同遺伝子グループはカンパチに高い特異性を持つタイプなのかもしれない。

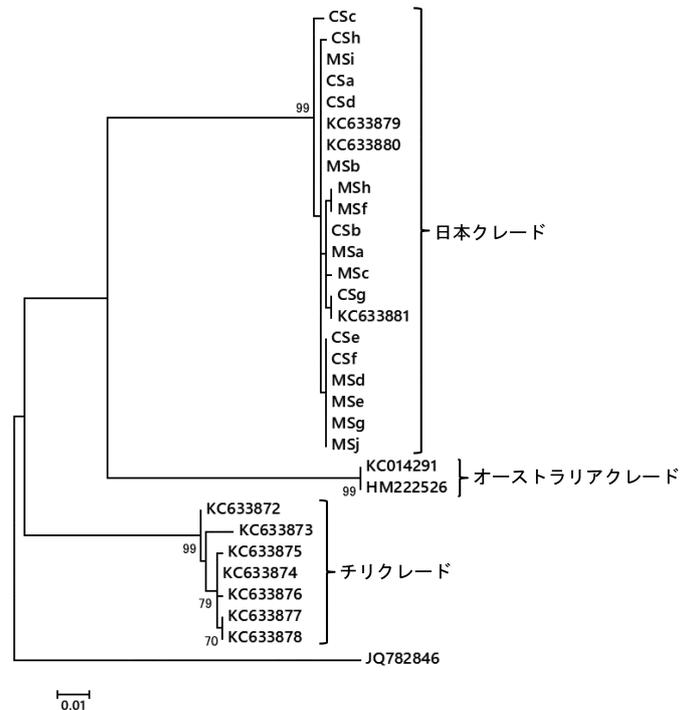


Fig. 2. *B. seriolae* 10 ハプロタイプのミトコンドリア DNA COI 遺伝子領域から構築された最尤系統樹。ブートストラップ値は 70%以上のものを示した。

B. seriolae の場合と違って、野見湾の養殖カンパチに寄生していた *N. girellae* の間で、COI 遺伝子領域に遺伝多型が見られなかった。加えて、興味深いことに、輸入元の中国海南省海南島大東海のカンパチ由来のものとも 100%の相同性が示され (data not shown)、同海域の *N. girellae* が持ち込まれた可能性が示唆された。しかし、その一方で、毎年輸入されるカンパチ種苗に *N. girellae* が寄生しているのかは不明であり、さらに、本虫は 15°C以下で孵化できないとされるが (Bondad-Reantaso ほか¹⁸⁾)、野見湾の水温は例年 1 月から 3 月にかけて 15°C~17°Cあたりを推移するため (林¹⁷⁾)、湾内定着も強く疑われることから、引き続き感染源の特定を行う必要がある。

文献

1. 横山博・長澤和也, 養殖魚介類の寄生虫の標準和名目録. 生物圏科学, 53, 73-97. (2014)
2. Ogawa, K., Bondad-Reantaso, M. G., Wakabayashi, H., Redescription of *Benedenia epinepheli* (Yamaguti, 1937) Meserve, 1938 (Monogenea: Capsalidae) from cultured and aquarium marine fishes of Japan. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 52 (suppl. 1), 62-70. (1995)
3. 小川和夫, 魚類寄生虫学. 東京大学出版 東京, 104-107. (2005)
4. Ogawa, K., *Benedenia hoshinai* sp. nov., a monogenean parasite on the Japanese striped knifejaw, *Oplegnathus fasciatus*. Fish Pathology, 19, 97-99. (1984)

5. Ogawa, K., Bondad-Reantaso, M. G., Fukudome, M., Wakabayashi, H., *Neobenedenia girellae* (Hargis, 1955) Yamaguti, 1963 (Monogenea: Capsalidae) from cultured marine fishes of Japan. *The Journal of Parasitology*, 81, 223–227. (1995)
6. 長倉義智・中野昌次・虫明敬一・大原恵理子・岡本信明・小川和夫, ブリ, ヒラマサおよびそれらの交雑種の *Benedenia seriola* に対する感受性の違い. *水産増殖*, 54, 335–340. (2006)
7. Ohno, Y., Kawano, F., Hirazawa, N., Susceptibility by amberjack (*Seriola dumerili*), yellowtail (*S. quinqueradiata*) and Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) to *Neobenedenia girellae* (Monogenea) infection and their acquired protection. *Aquaculture*, 274, 30–35. (2008)
8. 長倉義智・良永知義・坂本 崇・服部圭太・岡本信明, ブリ類交雑家系におけるハダムシ感染試験方法の検討および家系間のハダムシ感受性比較. *水産技術*, 3, 21–26. (2010)
9. 平澤徳高, ブリ属魚類のハダムシ症. *獣医寄生虫学会誌*, 15, 100–110. (2016)
10. Kinami, R., Miyamoto, J., Yoshinaga, T., Ogawa K., Nagakura, Y., A practical method to distinguish between *Neobenedenia girellae* and *Benedenia seriola*. *Fish Pathology*, 40, 63–66. (2005)
11. 今城雅之・合田暉・門野真弥・久保栄作・森光一幸, 高知県野見湾の養殖カンパチに対するカプサラ科単生類 2 種の季節的変化および遺伝的多様性に関する研究. *高知大学学術研究報告*, 64, 207–215. (2014)
12. Sepúlveda, F. A., González, M. T., Molecular and morphological analyses reveal that the pathogen *Benedenia seriola* (Monogenea: Capsalidae) is a complex species: Implications for yellowtail *Seriola* spp. aquaculture. *Aquaculture*, 418–419, 94–100. (2014)
13. 保科利一・松里寿彦, ハマチの病害虫の一種 *Benedenia seriola* の卵の孵化と水温の関係. 昭和41年度魚病対策に関する研究報告, 静岡県水試, 69–71. (1967)
14. Ernst, I., Whittington, I. D., Corneillie, S., Talbot, C., Effects of temperature, salinity, desiccation and chemical treatments on egg embryonation and hatching success of *Benedenia seriola* (Monogenea: Capsalidae), a parasite of farmed *Seriola* spp. *Journal of Fish Diseases*, 28, 157–164. (2005)
15. 柳宗悦・平江多績・村瀬拓也・仁部玄通・加塩信広・竹丸巖, 鹿児島県のカンパチ養殖における魚病発生の変遷. 鹿児島県水産技術開発センター研究報告, 3, 45–55. (2012)
16. Hebert, P. D., Ratnasingham, S., deWaard, J. R., Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 270 (suppl. 1), S96–S99. (2003)
17. 林芳弘, 赤潮・貝毒調査事業. 平成 18 年度高知県水産試験場事業報告書, 104, 71–92. (2008)
18. Bondad-Reantaso, M. G., Ogawa, K., Fukudome, M., Wakabayashi, H., Reproduction and growth of *Neobenedenia girellae* (Monogenea: Capsalidae), a skin parasite of cultured marine fishes of Japan. *Fish Pathology*, 30, 227–231. (1995)

平成29年 (2017) 10月12日受理

平成29年 (2017) 12月31日発行