

Amyloodinium ocellatum の感染方法及び寄生状況の 評価について

横山 文彦, 高見 生雄

Evaluation of parasite intensity and infection method
with *Amyloodinium ocellatum*.

Fumihiko Yokoyama, Ikuo Takami

Amyloodinium ocellatum is a harmful parasite of aquarium and land-based aquaculture. Mass mortality of cultured marine fishes caused by *A. ocellatum* in land-based aquaculture has often occurred in Nagasaki prefecture. It is required to develop the technique of prevention and control of *A. ocellatum*. Thus, we aimed to establish the appropriate method of experimental infection, cyst collection and counting of the parasite on the gills.

Infection of *A. ocellatum* was easily achieved either by cohabitation with a diseased fish or by exposure to dinospores. Partly purified cysts were collected by hanging the infected gill in 1/3 seawater for 10 min. Number of trophonts on the gills was determined by the following method; fix the infected gills in 10 % formalin dissolved in 1/3 seawater, stir the gills for 5 min with a magnetic stirrer at 1,000 rpm, pass the parasite suspension through plankton net with openings of 335 μ m, centrifuge the filtrate at 1,500 rpm for 5 min, resuspend the pellet in 10 ml of the fixative, stain with Lugol's solution, and count the number of trophonts under the stereoscopic microscope.

Key words : *Amyloodinium ocellatum*, infection, collection, count

アミルウージニウム症は、渦鞭毛藻類の *Amyloodinium ocellatum* が、海産魚の陸上養殖場などにおいて、魚のエラや体表に寄生することで貧血や摂餌不良等を引き起し、養殖魚の大量死を起こす寄生虫症である¹⁾。本県では、2005年7月にトラフグ陸上養殖場において本症による大量死が発生し、その後も複数の海産魚類の陸上養殖場において発生し続けていることから、陸上養殖推進のためには本症への対策が必要となっている。

本症の防除技術を開発するためには、本寄生虫の継続的な維持、有効な攻撃手法、及び寄生状況の評価法の確立が必要である。

そこで、本研究では本寄生虫の感染方法、魚体からのシスト及び栄養体の採取方法、寄生状況の定量的な評価方法の検討を行った。

材料と方法

実験1 感染方法

使用したアミルウージニウムは、2005年7月に水産試験場に持ち込まれた病魚(トラフグ 2年魚)に寄生していたものを用いた。供試魚はマダイ(尾叉長約10cm)とトラフグ(尾叉長約12cm)各1尾ずつを用いた。

シストは、病魚のエラを取り出した後、エラをピンセットで摘み、砂濾過海水(以下、海水)を入れたシャーレ中で振揺し、エラから振り落として採取した。採取したシストは海水200mlを入れた300mlビーカーで20℃でインキュベーションして仔虫を孵化させた²⁾。2005年7月25日に仔虫を10個体/mlとなるように調整した海水を20ℓ入れた30ℓ型円形ポリ

カーボネイト水槽に未感染の供試魚2尾（マダイ）を入れ、1時間浸漬した後、海水を20ℓ入れた別の30ℓ水槽へ移し、止水で2日間飼育し、感染の有無を確認した。（水温26～27℃）

また、2005年8月1日～6日に感染魚1尾（トラフグ）と未感染魚1尾（マダイ）を同居飼育した後、感染の有無を確認した。（水温26～27℃ 1/2換水/日）

なお感染は、供試魚のエラを取り出し、ルゴール染色した後、顕微鏡でシスト及び栄養体の有無を確認して判定した。

実験2 シスト及び栄養体の採取

本寄生虫は体表及びエラに寄生するが、体表の虫体は取り上げの際に網等との接触により脱落することから、エラからのシスト及び栄養体の採取方法を検討した。供試魚は同居法により実験的に感染させたマハタ（全長約12cm）を用いた。なお、供試魚から取り出したエラは生のまま用いた。

感染魚からのシスト及び栄養体の採取は、1/3海水を500ml入れた500mlビーカーにエラを糸で結んで10分間吊すことで自然に脱落させる方法（以下、自然脱落法）、エラをピンセットでつまんで1/3海水中で激しく振揺し振り落とす方法（以下、振揺法）、1/3海水30mlの入ったスチロールT型瓶（容量140ml、内径50mm、全高96mm）中でマグネットスターラー（回転子の全長30mm、径8mm）を用い1分、3分、5分、10分間攪拌（1,000 rpm）する方法（以下、攪拌法）で行った。脱落状況の評価はエラを直接検鏡し、寄生数を計数することで行った。なお、採取方法により混入する夾雑物の量が異なるため、夾雑物の混入量を実体顕微鏡（40倍）で検鏡した際に、1視野当たりで1mmメッシュの50%以上を夾雑物が占めている割合で評価した。

攪拌法については1分、3分、5分、10分間攪拌毎の、シスト及び栄養体の脱落状況を調べた。

併せて、攪拌法によるシスト及び栄養体の破壊の有無を調べた。破壊の有無は、本寄生虫が寄生したエラを5分間攪拌し、海水中にシスト及び栄養体が懸濁した状態で1ml中の数を検鏡して計数し、計数

した海水をもとのビンに戻した後、さらに5分間（合計10分間）攪拌し、脱落したシスト及び栄養体の数を5分間攪拌した際と同様の方法で計数し、その数の増減で評価した。

実験3 寄生状況の評価

寄生状況の評価は、魚体から採取したエラをルゴール染色し、寄生したシスト及び栄養体を直接検鏡して計数する方法と、エラを攪拌法で処理することで脱落させたシスト及び栄養体を計数する方法で行った。なお攪拌法は、取り出したエラを1/3海水で10%に希釈したホルマリンで固定して行った。供試魚は同居により感染させたマハタ（全長約12cm）を用いた。

攪拌法による計数は実験2と同じ瓶と回転子を用い、5分間攪拌（1,000rpm）、開口335 μ mのプランクトンネットでろ過して大きい夾雑物を除去し、ろ液を遠心分離（1,500rpm、5min）、沈殿部分を10mlの1/3海水希釈10%ホルマリンに再懸濁し、ルゴール染色した後¹⁾、実体顕微鏡で10ml中のシスト及び栄養体の数を計数した。

結 果

実験1 感染方法

仔虫を添加した海水中へ未感染魚を1時間浸漬する方法で感染が成立した。また、病魚との同居による方法においても感染が成立した(Fig. 1)。

実験2 シスト及び栄養体の採取

攪拌法によるシスト及び栄養体の脱落は、5分間で97.6%、10分間で96.7%と5分間の攪拌ではほぼ全てのシスト及び栄養体が脱落していることと、5分間攪拌以降の脱落が無いことから、攪拌時間は5分で十分であることが判った (Table 1)。また、攪拌によるシスト及び栄養体の破壊は、攪拌5分後（平均148.6個）、10分後（平均155.1個）と減少していないことから、ほとんど無いと思われる (Table 2)。

シストの脱落率は、自然脱落法で平均25.9%、振



Fig. 1. Infection with *A. ocellatum* on the gill of experimentally infected red sea bream (stain with Lugol's solution)

Table 1. Collection of cysts and trophonts by the stirring method

	0min	1min	3min	5min	10min
Number of parasites (number/gill)	57	25	6	2	1
Average	70.3	16.0	5.0	1.7	2.3
Recovery rate		77.3%	92.9%	97.6%	96.7%

Table 2. Destruction of parasites using magnetic stirrer

	5min	10min
Number of parasites (pieces/mL)	227.3	239.0
average	148.6	155.1

揺法で平均62.1%， 攪拌法で平均97.5%であった (Table 3)。自然脱落法と振揺法ではエラごとに脱落率が大きく異なったが，攪拌法ではほぼ全てのシスト及び栄養体が脱落したことから，寄生状況の定量的な評価には攪拌法が適していた。

夾雑物の混入量は，自然脱落法0.0%，振揺法5.4%，攪拌法10.9%となり，自然脱落法を用いることで夾雑物が少ないシスト及び栄養体を採取することができた (Table 3)。

Table 3. Comparison of recovery rates of cyst and trophont by 3 methods

	Recovery rate of cyst (%)	Number of parasite (number/gill)		The rate of contamination (%)
		Before	After	
Naturally detached	14.0	57	49	0.0
	22.7	66	51	
	41.0	39	23	
Average	25.9	54.0	41.0	
Removed by swinging	44.4	45	25	5.4
	57.9	57	24	
	83.9	31	5	
Average	62.1	44.3	18.0	
Removed by rotatory motion with stirrer	96.5	57	2	10.9
	97.0	67	2	
	98.9	87	1	
Average	97.5	70.3	1.7	

The rate of contamination is defined as percentage of 1m²-mesh having more than 50% contamination in a visual field at a magnification of 400×

実験3 寄生状況の評価

エラを直接検鏡して寄生数を計数する方法は，エラの片面しか計数出来ない点とエラ毎に寄生数に大きな差が見られたことから正確な計数は不可能であったが，処理が簡便で迅速に計数出来ることから，魚病診断や寄生数の目安としては有効であった。

攪拌法により計数する方法は，個体全てのエラを用いることで1尾当りの正確な寄生数が計数可能であり，また，ホルマリンで固定することにより，計数用検体の保存が可能となり，いつでも計数が可能となった。なお，プランクトンネットを通過する夾雑物は多く存在するものの，ルゴール染色を施すことで，栄養体及びシストと夾雑物は容易に識別可能であった。

考 察

効率的に治療試験等を実施するためには病原体の確保が重要である。仔虫の添加，及び病魚との同居による感染はいずれも成立したものの，寄生虫の持続的な維持については簡便性から，同居による方法を用いている。しかし，同居感染では他の病原生物が混入する可能性があることや，攻撃強度に定量性がないことから，再現性のある実験系を確立するためには，仔虫を添加する感染方法をさらに改良する必要がある。今後，自然脱落法により採取した，夾雑物が少ないシストを用いた長期保存方法についても検討したい。

仔虫の感染は1時間で成立しているが、仔虫が存在する海水中に30分間魚を浸漬することで感染が成立したとの報告³⁾もあることから、寄生はさらに短時間に成立する可能性が高いと思われる。そのため、寄生に要する時間も検証する必要がある。

仔虫を用いた際の攻撃強度は、仔虫の数に比例して増加すると思われるため、今後の攻撃試験は仔虫の濃度を調整して実施していくことで再現性を高めたい。また、治療方法等の検討に際しては、攪拌法を用いた寄生数の計数により、定量的な評価を行っていきたい。

謝 辞

本稿をとりまとめるにあたり御校閲を賜りました

東京大学大学院農学生命科学研究科専攻助手 横山博氏に心から感謝いたします。

また、本実験を実施するにあたり供試魚を提供頂いた株式会社 長崎県漁業公社及び感染魚を提供頂いた養殖業者の皆様には厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) 小川和夫 :原虫病. 「魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編)」 恒星社厚生閣. 東京. 292-293. (2004)
- 2) Paperna I: Ann Parasitol Hum Comp. 1984; 59(1): 7-30
- 3) Bowew CE, Turner DT, Biever RC: J Parasitol. 1987; 73(1): 85-8