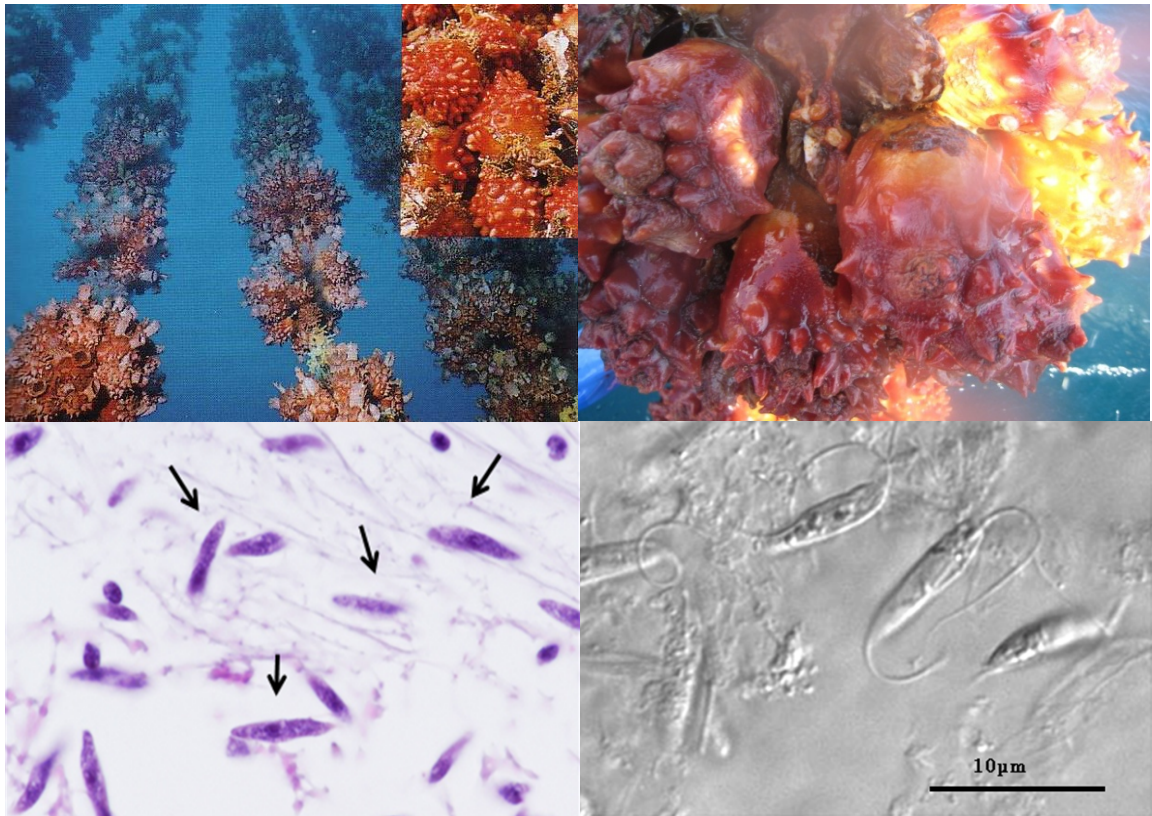


魚類防疫技術書

マボヤの被囊軟化症

(The soft tunic syndrome)

診断・防疫マニュアル



写真左上：マボヤ垂下養殖
右上：被囊軟化症発病個体
左下：被囊の病理組織像(矢印が病原体の鞭毛虫)
右下：海水中に遊出した鞭毛虫

平成 24 年 3 月

養殖衛生対策推進協議会

農林水産省委託事業

魚類防疫技術書

マボヤの被囊軟化症
(The soft tunic syndrome)
診断・防疫マニュアル

平成 24 年 3 月

養殖衛生対策推進協議会

はじめに

この度、農林水産省委託事業の養殖衛生対策推進事業において、防疫対策の推進および技術の普及・指導に役立てるための技術書として「マボヤの被囊軟化症(The soft tunic syndrome)診断・防疫マニュアル」を作成いたしました。

本病は韓国のマボヤ養殖場で発生していた病気で、我が国では平成19年に宮城県の韓国産種苗の導入歴がある養殖海域において発生し、甚大な被害を引き起こしましたが、宮城県水産技術総合センターを中心に5カ年にわたる調査と研究が行われ、不明であった本病の原因解明と、検査・診断手法の確立、また、被害低減につながる養殖技術の開発がなされました。

本書は、これらの成果を関係都道府県の魚病担当者や漁業協同組合等の皆様にご活用いただき、本病での被害を最小限に抑えるべく、マニュアルとしてまとめたものです。

本書をホヤ養殖の防疫指針として、養殖現場において御活用いただければ幸いです。

平成24年3月

養殖衛生対策推進協議会
会長 川本省自

第1章 マニュアル編

1. マボヤ被囊軟化症とは

(1) マボヤ被囊軟化症とは

被囊軟化症は、キネトプラスト綱ネオボド目の鞭毛虫がマボヤの被囊（外皮）内で増殖することによって発病する。発病個体の被囊は軟化して薄くなり、最終的には破けて死亡する（図1）。食用に供される内部器官に鞭毛虫が感染することはなく、異常も見られない。1995年に韓国，2007年に日本でそれぞれ確認され，両国では現在も大きな被害を受けている。

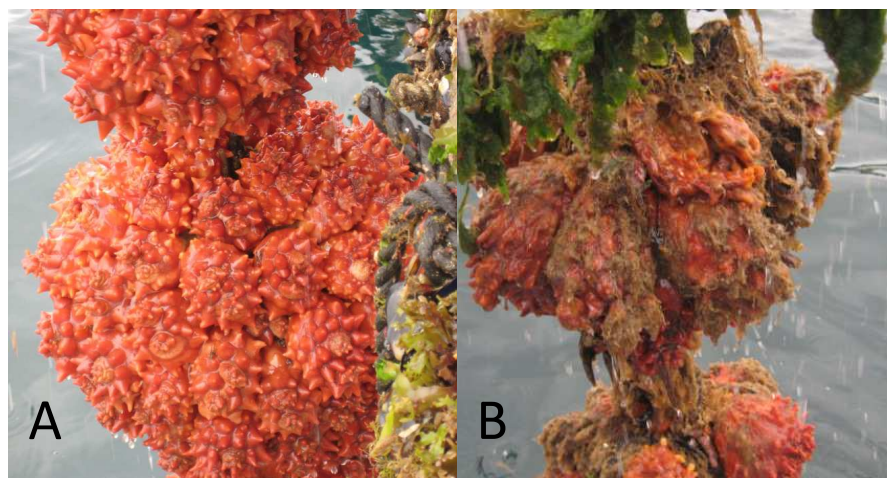


図1 健康なマボヤ (A) と発病したマボヤ (B)

健康なマボヤは30～50個体のかたまりであるが、発病すると多くが脱落する。

(2) 疫学

①国内での発生状況（解説編4，(1)，(4)参照）

2007年2月に宮城県北部海域で本病が初めて確認された。その後、発病海域は年々拡大し、2010年には宮城県内の主要な養殖場全域で本病の発生が確認された。また、2010、2011年には発病しているマボヤ養殖場の近傍に生息する天然マボヤやエボヤでの発病も確認された。

②発病時の水温（同4，(2)）

水温が12～13℃の12月以降に発生し、15℃前後の6～7月に病気が最も進行した後、20℃を超える8月に終息する。

③発病年齢（同4，(2)）

満1歳でも一部の個体は発病するが、2歳および3歳個体が主に発病する。0歳個体が発病することはない。

④死亡率（同4，(2)）

累積死亡率は20～100%で、同じ養殖海域内でも、養殖ロープによって被害量にバラ

ツキがみられる。病気は発病個体から隣の個体へと次々に伝播する。一旦発病した個体は回復することなく、死亡する。

(3) 類似の病気

これまでのところ同様な症状を示す病気は報告されていない。高水温や低塩分海水の流入によりマボヤが死亡する場合は、被囊が軟化することはない。

(4) 病原体 (同 2, (1), (2))

キネトプラスト綱ネオボド目に属する鞭毛虫が原因である。既知のネオボド目鞭毛虫とは形態学的・遺伝子学的に異なることから、ネオボド目に属する未記載属と考えられる。現在、*Azumiobodo hoyamushi* の種名が提唱されている。本種は紡錘形で体の前端と後端に付属する鞭毛を使って水中を活発に遊泳する。鞭毛を含まない体サイズは $10\text{-}14\ \mu\text{m} \times 2\text{-}3\ \mu\text{m}$ である(図 2)。

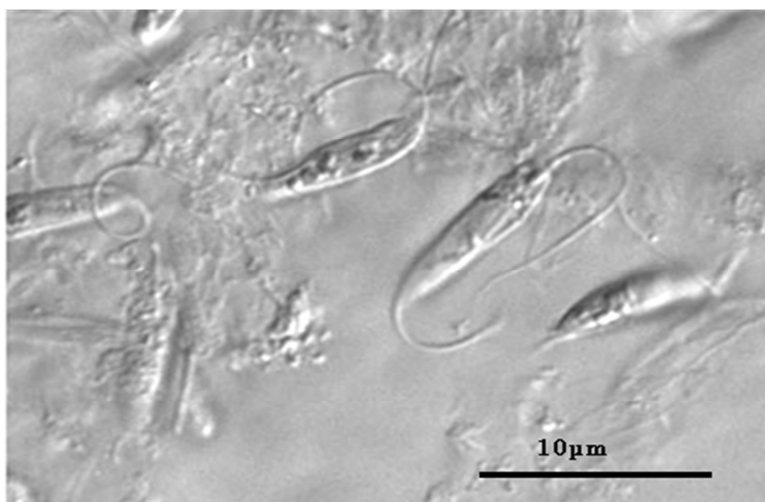
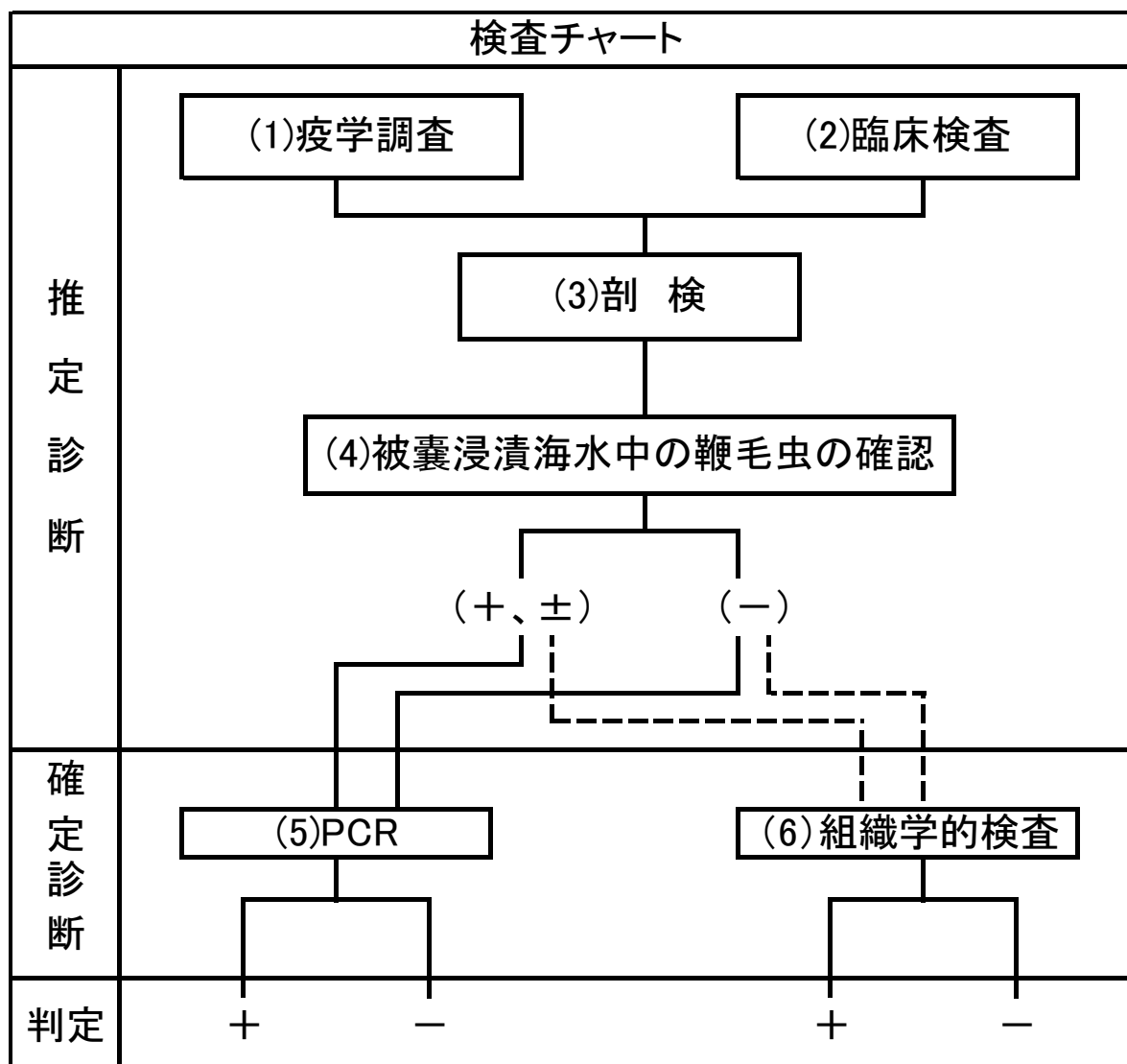


図 2 原因の鞭毛虫

紡錘形で体の前端と後端に鞭毛を持つ。サイズは $10\sim 14\ \mu\text{m}$ 。

2. 診断方法

検査チャート



(1) 疫学調査

- ①マボヤが感染する。
- ②満1歳以上の個体で発生する。
- ③冬から夏にかけての水温が20℃以下の時期に発生しやすい。

(2) 臨床検査

- ①外観所見および触診 (同3, (1))

健康なマボヤの被囊は大変硬く厚いが、発病個体のそれは軟化し、薄い。被囊の軟化は水管部から始まるため、発病初期の個体では体側部の被囊が正常でも、水管部のみ軟

化している（図3, A, B）。病気の進行に伴い，被囊の軟化は体側部に拡大し，手で押すと簡単にへこむようになり，重篤な個体では手で簡単に裂ける（図3, C）。



図3 軽症個体と重症個体

発病初期の個体では体側部の被囊が正常でも，水管部のみ軟化している（A, B）。重症の個体では被囊全体が軟化する（C）。

(3) 剖検

- ①被囊が薄く，ハサミやメスで簡単に切れる。重症個体の場合は，手で簡単に裂ける。
- ②軟体部には異常がみられない。

(4) 被囊浸漬海水中の鞭毛虫の確認（同5, (1)）

- ①個体毎に幅約1cm程度の短冊状に細切した被囊約10gを小型の容器に入れる。
- ②15℃で1晩海水に浸漬する（図4）。
- ③この海水100 μ Lをスライドグラスに載せ，鞭毛虫の有無を顕微鏡（ $\times 100$ ）で観察する（図5）。



図4 滅菌海水中に細切した被囊を1晩浸漬

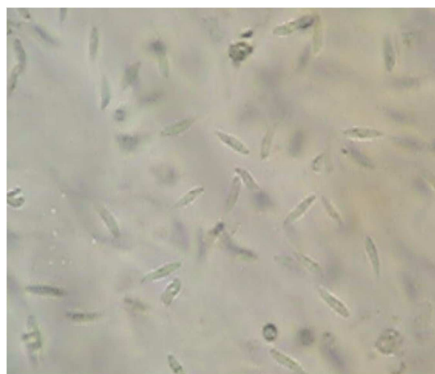


図5 海水中に遊出した鞭毛虫

(5) PCR (同 5, (3))

- ①軟化被嚢を 1 晩浸漬した海水(前項参照)1mL を 1.5mL チューブに入れ, 遠心分離 (10,000rpm, 15分)する。
- ②遠心分離後, 上清を捨て, チューブに残った沈渣を材料として, DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン)等の市販の DNA 抽出キットを使って, DNA を抽出する。抽出方法はキットのマニュアルに従う。
- ③18S rRNA のプライマーの PCR

・プライマーセット

ProtHoya145 : 5' AAGGGGTGCTCCGATCCGTGG 3'

ProtHoya679r : 5' AAGGATGGGACGGAACCGACTGC 3'

・PCR 反応組成液の例

5×buffer	2.0 μL
dNTP	0.8 μL
Forward Primer (10 μM)	0.1 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.1 μL
Phusion(酵素)	0.1 μL
滅菌 DW	5.9 μL
テンプレート DNA	1.0 μL

合計 10 μL

・PCR 反応条件 :

98°C 30 秒

↓

98°C 10 秒

72°C 29 秒

72°C 1 秒

} 40 サイクル

↓

72°C 5 分

- ・判定 : 増幅サイズ:535bp のバンドが確認されれば陽性

(6) 病理組織観察 (同 3, (2)および 5, (2))

- ①水管部の内側と外側および体側部の, 特に軟化している部位を選び, 数カ所から被嚢片を採取し, 1~2cm 角に細切した後, 10 倍量のダビッドソン固定液(95%エチルアルコール 330mL, 100%ホルマリン 220mL, 酢酸 115mL, 蒸留水 335mL 合計 1,000mL)で 12~24 時間固定し, その後 70%エチルアルコールに保存する。同一個体の被嚢でも, 鞭毛虫の感染密度は一様ではないため, 体側部からは数カ所を切り出し, 固定することが重要である。

②常法によりパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色等を施す。

③顕微鏡を用いて組織観察を行う。

④判定

- ・健全なマボヤの被囊は被囊繊維が緻密な層状構造をしているが、発病個体では繊維密度が疎になり、部分的に抜ける繊維状構造の崩壊等が特徴的である。
- ・被囊内にヘマトキシリンによく染まり、極性を持ち、一方の端が細長く伸張している鞭毛虫が観察されれば陽性である（図6）。
- ・被囊軟化症個体の病変は被囊にのみ見られ、内部器官には見られない。

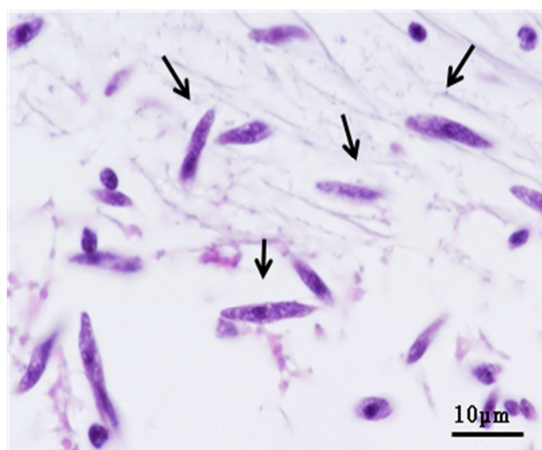


図6 発病個体の被囊の病理組織像
多くの鞭毛虫(矢印)が観察される

3. 対策

(1) 非発生海域における防疫方法

①湾単位での防疫対策の取り組み

水を介して伝播する本病の病原体は海水中で長期間生存することから、広範囲への感染が懸念される。このため、防疫対策は湾単位で取り組む。

②病気の定期調査

主なマボヤ養殖漁場において定期的な調査を毎年2回、流行初期の低水温期(2~3月)と被害が拡大する水温上昇期(6~7月)に行い、本病の発生の有無をできるだけ早期に把握する。1地点当たり満2, 3歳のマボヤの養殖筏を任意に抽出して、本病の発生の有無を調査し、必要に応じて検査用個体をサンプリングする。

③既発生海域からの種苗導入の自粛

非発生漁場では、病原体を持ち込まないために、既発生漁場で生産された種苗を導入しないこととし、非発生漁場で生産された種苗のみを使用する。

④病原体フリーの種苗の生産

病原体フリーの人工種苗を生産するために、病原体フリーの親から採苗した後、病原体のいない海域で育成する。

(2) 既発生海域における被害の軽減方法

①低密度養殖の励行

マボヤの垂下ロープ間隔および株間隔を広げ、漁場内での養殖密度を低下させる。

②若齢マボヤの隔離飼育

養殖漁場内において満0, 1歳個体と満3, 4歳個体を混養すると、後者から前者に本病が伝染する危険性が高まることから、可能な限り若齢マボヤを隔離して飼育する。また、1歳マボヤは高齢マボヤを全数出荷し、筏が空になった後に、本養成用の筏に移動する。

③発病個体の除去と陸上処分（同6, (2)）

発病個体の被囊が破れると、大量の病原体が養殖漁場に排出され、新たな感染源になることから、発病個体は速やかに取り上げる。なお、発病個体を除去する際には、被囊を破らずに、根元の部分から全体を取り除く。

また、病原体は死亡した被囊内で長期間生存し、感染源になることから、除去した発病個体は海中に投棄することなく、陸上で適正に処分する。

④株養殖の励行（同6, (3)）

採苗器(カキ殻)を養殖ロープに30~40cm間隔で挟み込んで株状に育成する日本式の養殖は、採苗器(シュロ縄)を養殖ロープに螺旋状に巻き込んでロープ全体で育成する韓国式に比べて被害量が少ない傾向にある。日本式の株養殖を行う(図7)。

⑤深吊りの励行（同6, (4)）

これまでのモニタリングでは8m以深で養殖した場合に、被害量が少ない傾向がみられる。可能な限り8m以深で養殖する。

⑥満2歳マボヤでの全数出荷

本病の被害が拡大傾向にある漁場では、生残した満2歳個体を漁場に残すことは翌年の発病の要因となることから、満2歳で全数出荷することに努める。なお、マボヤの天然採苗を実施している漁場においては、関係する湾内の漁協や漁業者間で適切な再生産手法について協議し、湾内で天然採苗が継続して実施できる体制を構築する。

⑦カキやホタテガイとの複合養殖

カキやホタテガイは海水中のプランクトンを餌として取り込むので、本病の病原体もこれらに捕食されると考えられる。マボヤの養殖施設の間にカキやホタテガイの養殖施設を設けることにより、漁場内の病原体数を低減させる可能性がある。

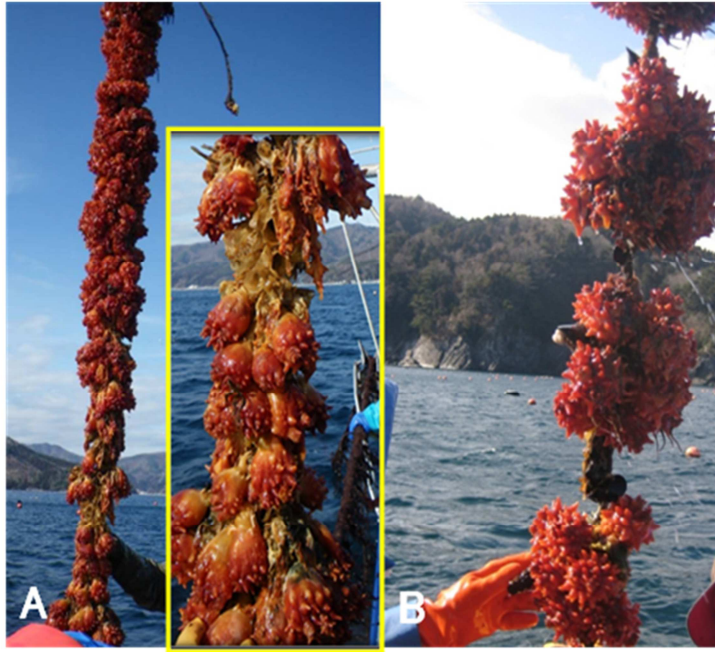


図7 養殖方法の違いによる被囊軟化症の発生状況

A; シュロ縄養殖。ほぼ全体が発病。B; 株養殖。発病していない。AとBは同じ筏で同時期に養殖を開始した。

第2章 解説編

1. 国内におけるマボヤ養殖と本病の発生

マボヤ *Halocynthia roretzi* は尾索動物亜門海鞘綱に属する固着性動物で、被囊と呼ばれるセルロースを含む堅牢な組織に覆われている。内側の可食部には独特の風味があり、酒の肴として人気がある。東北地方の特産養殖種であり、年間 10,000 トン前後が宮城県、岩手県、青森県で養殖され、その中でも宮城県のマボヤ養殖生産量は全体の 80%前後を占めている。同県のマボヤ養殖場は岩手県境から牡鹿半島北側にかけての三陸沿岸のほぼ全域に及んでいる。

養殖用種苗には天然種苗が用いられ、そのほとんどは宮城県内で最も養殖が盛んな鮫ノ浦湾で生産される。12～1 月に種苗生産業者はカキ殻を湾内に垂下し、養殖マボヤが自然産卵した幼生を採苗した後、湾内で半年から 10 ヶ月間育成する。その後、7～11 月頃に数ミリ～1cm 程度まで成長した種苗を各浜に出荷する。養殖業者はこのカキ殻を養殖ロープに挟み込み、2～3 年間漁場に垂下し、育成する。マボヤは天然のプランクトンを食べながら成長し、200～300g サイズで水揚げされる (図 8)。

韓国でもマボヤ養殖が盛んで、1994 年には 42,000 トンを生産した。その後、1995 年から被囊軟化症が発生したため、生産量が激減し、現在は 4,000 トン程度しか生産できない状態が続いている。このため 2002 年以降韓国では日本からマボヤを輸入するようになり、輸入量は 2004 年には 7,000 トンを超えるまでになった。この急激な対韓輸出の増加は、天然採苗海域内の親マボヤの不足をもたらし、採苗にも支障が出るようになった。さらに、この輸出ブームでマボヤの価格が上昇し、生産規模を拡大する養殖業者や新規にマボヤ養殖を始める漁業者も出始めたため、種苗不足にますます拍車がかかった。そうした中、輸出業者を通じて韓国産の種苗を輸入する動きが養殖業者に見られたため、宮城県は防疫的見地から輸入を自粛するよう指導した。しかしながら、2007 年 2 月に宮城県内のマボヤ養殖場で被囊軟化を特徴とする大量への死が発生し、聞き取り調査の結果、その漁場では過去に韓国産種苗を導入していたことが判明した。



図 8 マボヤの養殖施設

2. 原因

(1) 形態的特徴

キネトプラスト綱ネオボド目に属する鞭毛虫が原因である。本種は紡錘形 (鞭毛を含まない体サイズ : 10-14 μm \times 2-3 μm) で、極性を有し、先行鞭毛と後曳鞭毛の 2 本の鞭毛

を使って水中を活発に遊泳する。先行鞭毛が特徴的な嘴状の突起に付着していることや細胞質に認められたキネトプラストなどのネオボド目の特徴を示しているものの、横縞の球状体など、これまでに報告されているネオボド目に属する鞭毛虫 (*Cruzella* 属, *Dimastigella* 属, *Rhynchobodo* 属など) とは異なる形態が観察される (図9, A-C)。

(2) 遺伝子学的特徴

本鞭毛虫の 18S rRNA 遺伝子の全長は 2,101 塩基である。本種は形態学的観察の結果と同様に、遺伝子学的系統解析でもネオボド目に含まれると考えられる。しかしながら、本遺伝子の相同性検索を行ったところ、相同性が高いものでも、ネオボド目の uncultured bodonid clone AT5-48 および *Cruzella marina* の 18SrRNA 遺伝子に対して、それぞれ 91% および 90% であった。

以上のように、本虫は既知のネオボド目の鞭毛虫とは形態学的・遺伝子学的に異なることから、ネオボド目に属する未記載属の鞭毛虫と考えられ、*Azumiobodo hoyamushi* の種名が提唱されている (図9, D)。

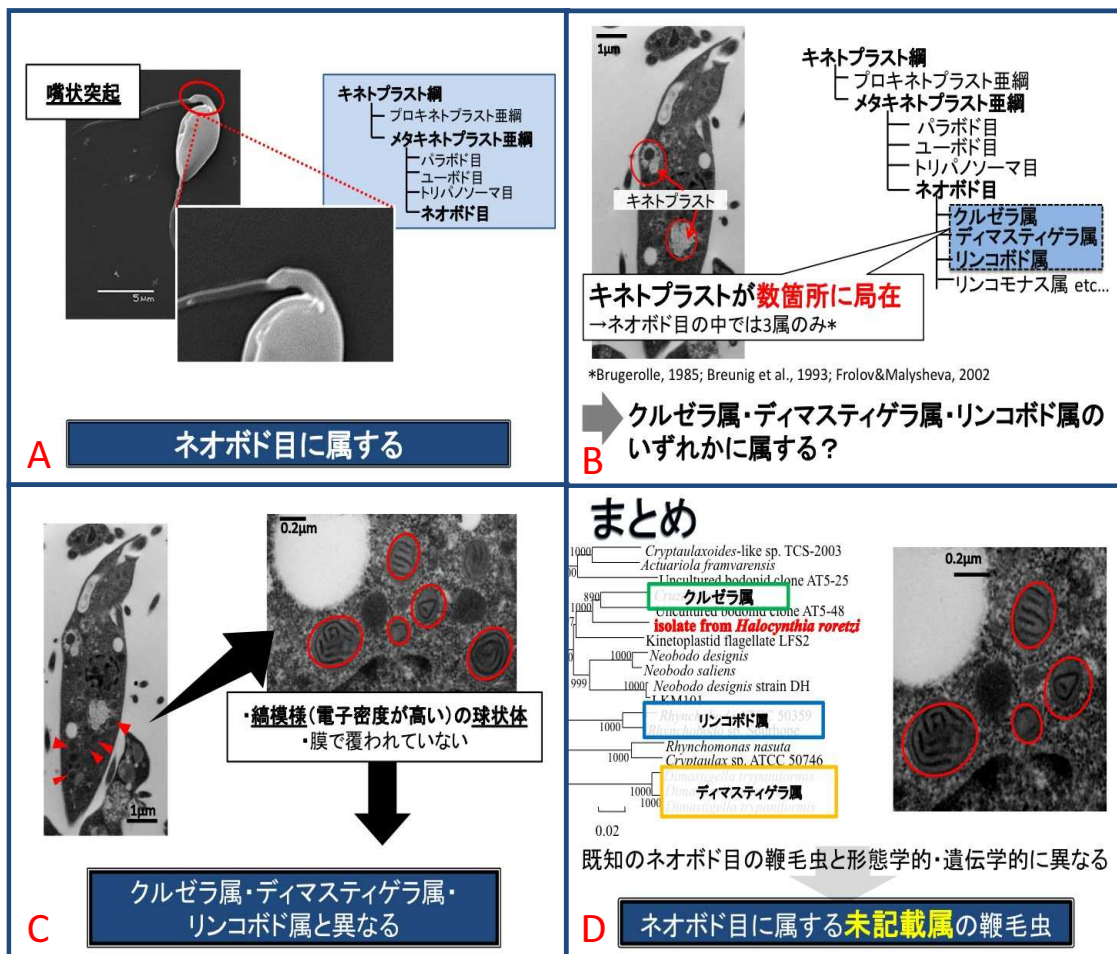


図9 鞭毛虫の形態学的および遺伝子学的特徴

(3) 鞭毛虫の培養

自然発病個体の軟化した被囊細片を、バンコマイシン 0.3mg/mL を含む MEM 培地（イーグル最少必須培地）で洗浄した後、MEM 培地（バンコマイシン 0.1mg/mL 含）20mL に 12 時間浸漬し、鞭毛虫を遊出させる。次に、この MEM 培地を遠心分離（100×g, 3 分）し、この上清を MEM-2.5 培地（10%MEM に牛胎児血清（FBS）を 2.5%添加）に接種し、15°C で培養することにより、純培養が可能である。

MEM-2.5 培地組成：	
イーグル MEM	0.47g
FBS	12.5mL
ペニシリン(10000U/mL)・ストレプトマイシン(10000μg/mL)	5mL
HEPES 0.5M(pH7.2)	5mL
L-グルタミン(200mM)	5mL
重炭酸ナトリウム(200mM)	5mL
海水	467.5mL
合計	500mL

鞭毛虫を上記の培地に接種し温度別に培養すると、10°C で約 30 日、15°C で約 15 日、20°C では約 10 日後に 10^6 虫体/mL のオーダーまで増殖する。一方、5°C と 25°C では増殖せずに、それぞれ約 30 日後と 5 日後に完全に死滅する。また、30°C では 30 分後に 90%以上が、60 分後には完全に死滅する。（図 10）。

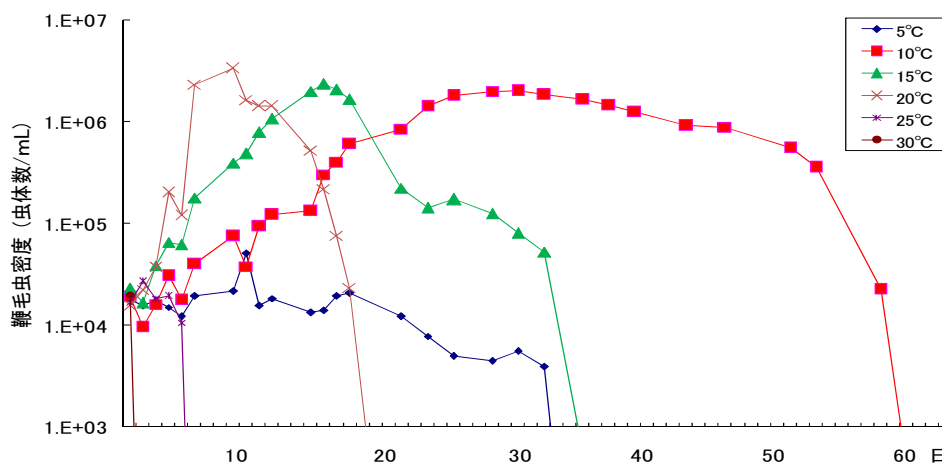


図 10 培養温度別の鞭毛虫密度の経時変化

3. 症状・病理

(1) 症状

健康なマボヤの被囊は通常大変硬く、ハサミで切ることは困難であるが、発病個体のそれは軟化し、重篤な場合は手で簡単に裂ける。また、健常個体に比べ著しく薄い。被囊の引っ張り強度と厚さをそれぞれレオメーターとノギスを用いて測定した結果、発病個体(n=31)の引っ張り強度は 0.08~1.8kg(平均 0.7kg)であったのに対し、健常個体(n=10)はいずれも測定限界(2.5kg)以上であった。また、被囊の厚さは、発病個体が 0.9~3.4mm(同 1.7mm)、健常個体が 2.5~3.5mm(同 3.0mm)であった（図 11）。

可食部である内部器官は、重症個体で萎縮しているものの、大きな異常は見られない。

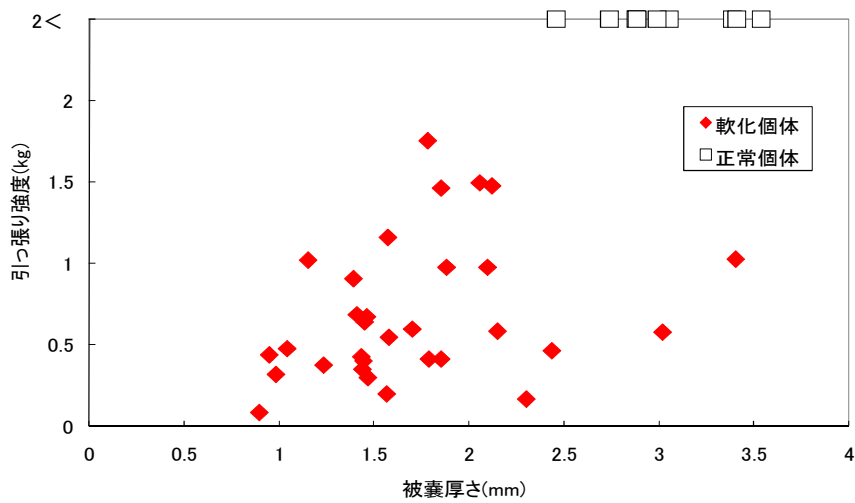


図 11 被囊軟化症個体の被囊の厚さと引っ張り強度

(2) 病理組織

健常個体の被囊は、被囊繊維が高密度に層状に規則正しく配列し、被囊細胞は少ない（図 12, A）。一方、発病個体では、多くの被囊細胞が浸潤し、繊維密度が疎になり、部分的に抜ける等の繊維状構造の崩壊が特徴的である（図 12, B）。また、発病個体の被囊繊維内には紡錘形をした鞭毛虫の細胞が多数認められる。本細胞は HE 染色ではヘマトキシリンに比較的よく染まり、極性を持ち、一方の端が細長く伸張している（図 12, C, D）。

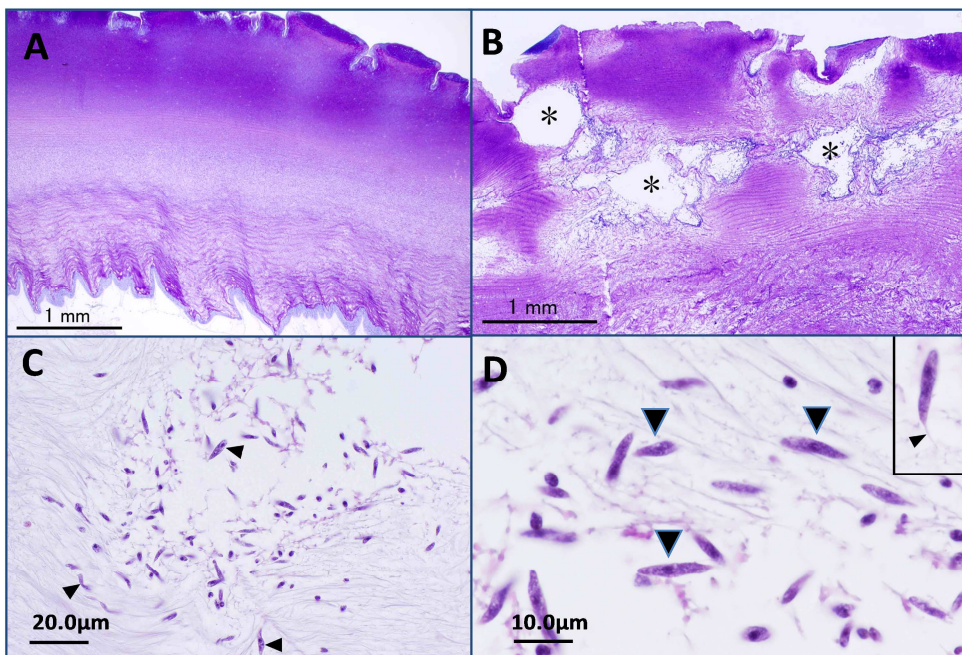


図 12 マボヤ被囊の病理組織像

A; 健常個体の被囊（写真上側が個体の外側）。B; 発病個体の被囊。繊維密度が疎になり、部分的に抜けている箇所（*）が散見。C, D; 発病個体の被囊。鞭毛虫（アローヘッド）が多数認められる。

海水中に遊出した鞭毛虫の β チューブリンと 18S rRNA を標的としたプローブを用いた in situ hybridization (ISH) において、被囊繊維内の鞭毛虫に強いシグナルが見られたことから (図 13)、組織学的に観察される鞭毛虫が遺伝子学的に同定されたネオボド目鞭毛虫であることがわかる。

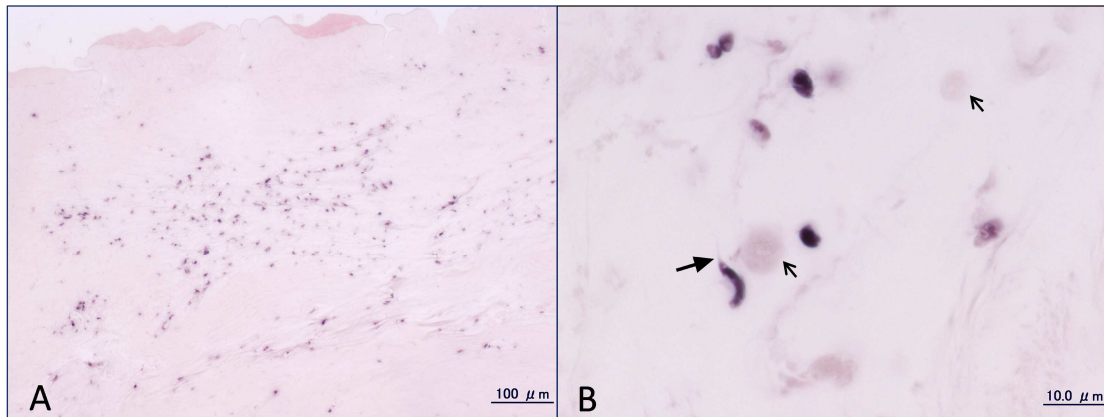


図 13 マボヤ被囊の ISH 像

A: 発病個体の被囊 (低倍率)。被囊繊維内に散在する鞭毛虫に強いシグナルが見られる。
 B: 発病個体の被囊 (高倍率)。鞭毛虫に強いシグナルが見られるが (大矢印)、マボヤの細胞にはシグナルが見られない (小矢印)。

4. 疫学

(1) 宮城県内における発生状況

主にマボヤが養殖されている 20 海域のうち、2007、2008、2009、2010 年にはそれぞれ 3、6、14、15 海域で本病の発生が確認されている。2008 年までの発生海域は韓国種苗を導入した地点周辺に限られていたが、翌年以降はその他の地点にも拡大した。一度発生した漁場では、翌年以降も継続している (図 14)。

(2) 累積死亡率

同じ海域でも養殖ロープによって被害量にバラツキがみられる。2008～2009 年のモニタリング施設 (満 1、2 歳の養殖ロープ 6 本を 10～16 ヶ月観察) の累積死亡率は 17～96%であった。一旦発病した個体は回復することなく、死亡する。また、病気は発病個体から隣の個体に伝播する傾向が見られる。満 1 歳個体でも一部発病するが、2 歳および 3 歳個体が主に発病する。0 歳個体が発病することはない。

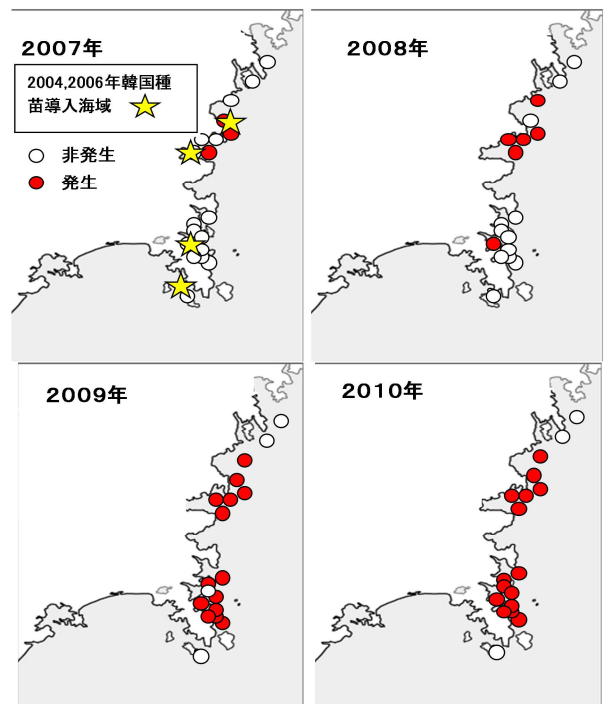


図 14 マボヤ被囊軟化症の発生海域

発病は水温に密接に関連している。水温が12℃～13℃の12月以降に発病することが多く、15℃～20℃の5～7月に病勢が拡大した後、20℃を超える8月に一旦終息する。その後、20℃以下に低下して2～3ヶ月経過した11～12月頃に、再発がみられる。鞭毛虫が25℃では増殖できないことが本病の消長に関与していると考えられる。また、20℃を上回る8月中旬から9月下旬頃までマボヤは2本の水管をほとんど閉じて餌を全く取らない夏眠状態になる。自然発病や実験感染の個体において被囊の軟化は水管部から始まることから、水管を通る水流を介して病原体がはじめに水管部周辺に感染する可能性が考えられている。夏眠している時期に水管部の水流の動きが止まることで病気の終息に関与している可能性も考えられる。

(3) 病原性

自然発病個体の軟化した被囊細片を網袋に入れ、健常なマボヤを収容した水槽に垂下しながら流水飼育すると、2～3週間で感染が成立し、被囊軟化が確認される。一度発病した個体は回復せずに、3～10日後に死亡する。さらに、この感染実験で得られた軟化被囊を感染源とした同様の実験でも、再感染が成立する。これらの結果は、本病が被囊中で増殖する病原体によって引き起こされ、その病原体が発病個体の被囊から遊出し、水を介し、他の個体に感染することを示している（図15、16）。

凍結保存やホモジナイズした被囊を垂下しても、実験感染は成立せず、これらの処理により病原体の感染性が喪失することがわかる。また、軟化した被囊を1晩浸漬した海水を5μmフィルターで濾過した濾液には感染性が残存するが、0.45μmフィルターでの濾液には感染性が残存しない。



図15 発病個体の被囊を浸漬する感染実験

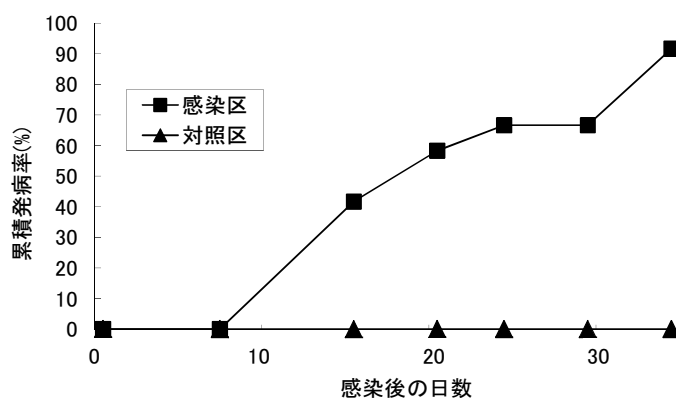


図16 被囊の浸漬感染実験の累積発病率の推移

培養した鞭毛虫を用いた鞭毛虫密度別の浸漬感染実験では、10虫体/mL以上の密度で感染が成立し、累積死亡率は鞭毛虫の密度に依存する（表1）。また、これらの発病個体の被囊にはいずれも鞭毛虫が観察される。すなわち、コッホの原則を満たしたことから、本鞭毛虫が被囊軟化症の原因であることが確定される。

温度別の感染実験では、10、15、20℃で病原性を示し、15℃で最も発病率が高い。また、高水温ほど発病までの期間が短い。これらの結果は、鞭毛虫の培養温度別の増殖性や養殖漁場における本病の季節的な消長に一致している（表2）。満0、1、2、3歳（平均体重0.05、55、170、290g/個体）の年齢別のマボヤの感染実験では、1～3歳のマボヤは感染したが、0歳は感染しない。また、1歳は2、3歳より発病までの潜伏期間が短い（表3）。

表1 培養した鞭毛虫による実験感染

密度 (虫体/mL)	発病までの 日数	発病個体数/供試 個体数 (%)
1,000	17	11/12 (92)
100	17	10/12 (83)
10	23	1/12 (8)
1	—	0/12 (0)
0.1	—	0/12 (0)
0	—	0/12 (0)

表2 水温別の病原性

試験	試験区	発病までの 日数	発病個体数/供試 個体数 (%)
1回目	感染区 20℃	8	7/12 (58)
	" 15℃	13	11/12 (92)
	" 10℃	25	9/12 (75)
	対照区 20℃	—	0/12 (0)
	" 10℃	—	0/12 (0)
2回目	感染区 20℃	9	7/12 (58)
	" 15℃	15	9/12 (75)
	" 10℃	28	4/12 (33)
	対照区 20℃	—	0/12 (0)
	" 10℃	—	0/12 (0)

表3 マボヤ年齢別感受性

試験	試験区	発病までの 日数	発病個体数/供試 個体数 (%)
1回目	感染区 3歳	13	2/12 (17)
	" 2歳	13	6/12 (50)
	" 1歳	8	19/20 (95)
	" 0歳	—	0/73 (0)
	対照区 3歳	—	0/12 (0)
	" 2歳	—	0/12 (0)
	" 1歳	—	0/20 (0)
	" 0歳	—	0/52 (0)
2回目	感染区 3歳	10	12/12 (100)
	" 2歳	10	12/12 (100)
	" 1歳	6	20/20 (100)
	" 0歳	—	0/44 (0)
	対照区 3歳	—	0/12 (0)
	" 2歳	—	0/12 (0)
	" 1歳	—	0/20 (0)
	" 0歳	—	0/78 (0)

(4) 天然マボヤやエボヤの感染状況

2010, 2011年の夏にマボヤ養殖場の近傍の天然礁で、潜水調査により天然マボヤの本病感染状況を調査したところ、典型的な被囊軟化症状を示す個体は見つからなかったものの、全体の0.1~2%の割合でへい死個体が発見され、これらの一部が本病に感染していた。一方、同時期に調査した非発生海域の天然マボヤからは病原体は発見されていない(図17, A, B, 表4)。また、マボヤ養殖施設に生息するエボヤ(側性ホヤ目マボヤ科; *Styela clava*)も本病原体に感染していることが判明している(図17, C)。養殖漁場ではこれらも感染源になっている可能性が考えられる。

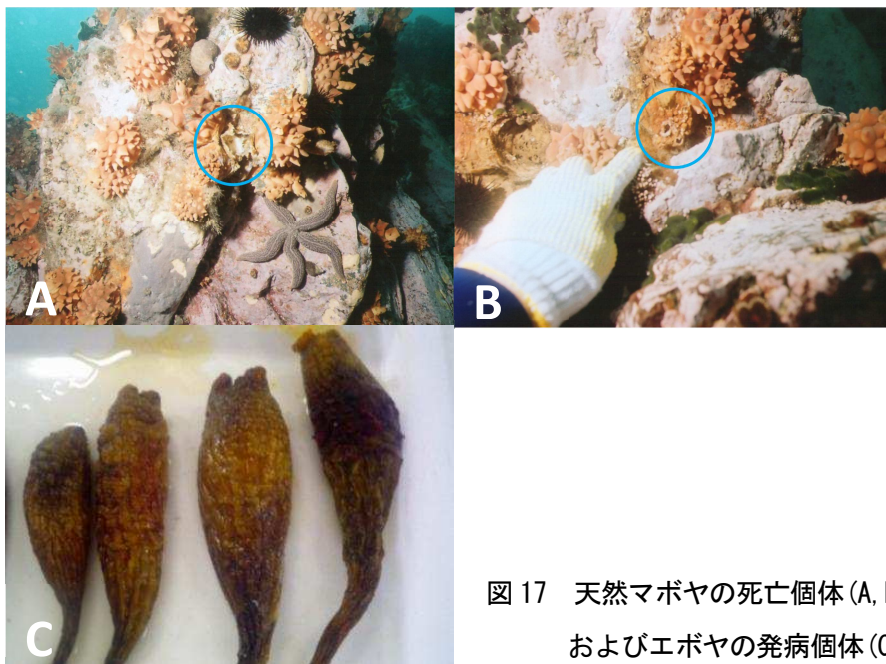


図17 天然マボヤの死亡個体(A, B)
およびエボヤの発病個体(C)

表4 天然マボヤの被囊軟化症の発生状況

2010年								
海域	調査地点*1	調査年月	養殖場からの距離(m)	水深(m)	潜水調査		異常個体検査*2	
					観察個体数	異常個体数	鞭毛虫陽性個体数/検体数	PCR陽性個体数/検体数
発病海域	St.1	2010年6月	400~500	10-12	1100	3	1/3	1/3
	St.2	7月	300	15	300	3	2/3	3/3
	St.3	8月	300	3-10	400	8	2/8	4/8
非発病海域	St.4	7月	500	5-7	300	4	0/4	0/4
2011年								
海域	調査地点	調査年月	養殖場からの距離(m)	水深(m)	潜水調査		異常個体検査	
					観察個体数	異常個体数	鞭毛虫陽性個体数/検体数	PCR陽性個体数/検体数
発病海域	St.2	2011年7月	300	15	500	5	0/5	1/5
	St.3	7月	300	3-10	500	6	1/6	1/6
	St.1	8月	400~500	10-12	700	1	0/1	0/1
	St.2	"	300	15	500	7	0/7	2/7
非発病海域	St.4	8月	500	5-7	500	8	0/8	0/8
	St.5	"	-	8	400	3	0/3	0/3

*1 2010年と2011年の調査地点(St.1~4)は同一地点

*2 潜水調査で採取した異常個体について、1個体ずつ鞭毛虫の有無を顕微鏡観察およびPCR検査

5. 診断

(1) 被囊浸漬海水中の鞭毛虫の確認

軟化した被囊片を数時間から一晚滅菌海水に浸漬し、海水への鞭毛虫の遊出を確認する方法により、本病の簡易診断が可能である。自然発病の 61 個体の被囊を海水に浸漬し、その海水を顕微鏡で観察した結果、顕著な軟化症状を示した 34 個体のうち 29 個体(85%)、軽症の 27 個体中 18 個体(66%)において、病理組織検査で見られたものと同じ形態の鞭毛虫が確認された(表 5)。軟化の程度が激しいほど遊出する鞭毛虫数が多くなる傾向が認められ、多い場合には 1mL 当たり 10^6 のオーダーに上る。海水中における鞭毛虫の動きは活発であり、しばしばアメーバ状に体形を変化させる、独特の動きをすることから、比較的容易に発見できる。本鞭毛虫は、健康個体や、異常ではあるが被囊が正常な個体では確認されない(表 5)。本法は、病理組織観察より多少検出感度が低下するものの、簡便であり、一次診断法として有効である。

表 5 自然発病個体の被囊浸漬海水観察および病理組織観察結果の比較

症 状	検査個体数	鞭毛虫陽性個体数(%)	
		被囊浸漬海水の観察法	病理組織観察法
軟化症	34	29 (85%)	34 (100%)
軟化症(軽症)	27	18 (72%)	25 (93%)
非軟化異常個体	36	0	NT
健 常	19	0	NT

(2) 病理組織

前述の被囊浸漬海水中の鞭毛虫の観察に使った個体の被囊の病理組織を観察した結果、顕著な軟化症状を示した 34 個体の全てと軽症の 27 個体中 25 個体(93%)において、鞭毛虫が観察された(表 5)。病理組織観察は、診断の精度が高いことから、確定診断法として有効である。なお、被囊内の鞭毛虫の感染密度が一様でないため、水管部の被囊と体側部の被囊の 3~4 カ所を観察する必要がある。

(3) PCR

原因鞭毛虫の 18S rRNA 遺伝子と β チューブリン遺伝子をターゲットにした 2 方法の PCR が開発されている(図 18)。18S rRNA の PCR の検出感度は β チューブリンのそれよりも 10 倍高く、診断には 18S rRNA の PCR を使うべきである(表 6, 7)。被囊自体とその浸漬海水を材料とした場合に、検出率に差がなく、水管の周辺のみならずかに症状が見られる発病初期の個体でも、水管周辺を試料とすることにより診断可能である(表 8)。PCR の検出感度は、被囊浸漬海水を検鏡して鞭毛虫を確認する方法よりも高く、病理組織検査法と同程度と考えられる(表 9)。

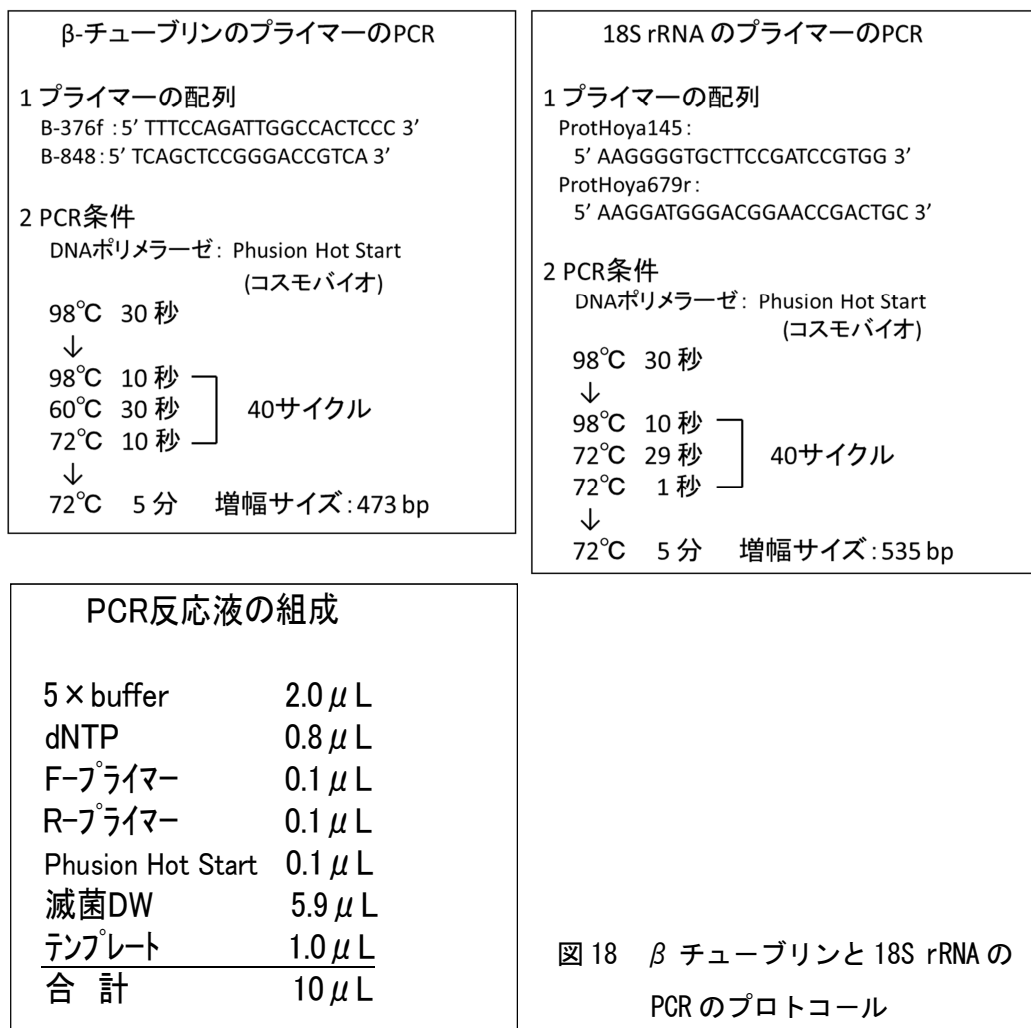


図 18 β チューブリンと 18S rRNA の PCR のプロトコール

表 6 β チューブリンおよび 18SrRNA の PCR の検出感度の比較

鞭毛虫密度 (虫体数/200 μL*)	β チューブリン		18S rRNA	
	1	2	1	2
6.7 × 10 ⁵	+	+	+	+
6.7 × 10 ⁴	+	+	+	+
6.7 × 10 ³	+	+	+	+
6.7 × 10 ²	+	+	+	+
6.7 × 10	+	+	+	+
6.7	-	-	+	+
0.67	-	-	+	-
0	-	-	-	-

*最終DNA抽出液200 μL

表 7 発病個体を試料としたβ チューブリンおよび 18SrRNA の PCR の検出率の比較

サンプル	供試個体数	PCR陽性個体数	
		β チューブリン	18S rRNA
自然発病群 A	5	3	5
自然発病群 B	11	11	11
自然発病群 C	15	11	13
実験感染	5	5	5
発病群合計	36	30 (83%)	34 (94%)
健常群	10	0	0

表 8 被囊浸漬海水および被囊を試料とした PCR の検出率の比較

被囊軟化の程度	供試個体数	18SrRNA PCR陽性個体数 (%)	
		被囊浸漬海水	被囊
N~S'	10	10 (100%)	10 (100%)
S'	32	32 (100%)	31 (97%)
S	25	25 (100%)	25 (100%)
発病群合計	67	67(100%)	66(99%)
N(健常個体)	10	0	0

N~S': 水管部のみ軟化

S': 被囊体側部がやや軟化

S: 被囊体側部が明瞭に軟化

表 9 被囊浸漬海水観察法と PCR との検出率の比較

被囊軟化の程度	供試個体数	鞭毛虫陽性個体数 (%)		
		被囊浸漬海水観察法	18SrRNA	PCR
N~S'	22	12 (54%)	20 (91%)	
S'	56	46 (82%)	53 (95%)	
S	58	56 (97%)	58 (100%)	
発病群合計	136	114(84%)	131(96%)	
N(健常個体)	28	0	0	

N~S': 水管部のみ軟化

S': 被囊体側部がやや軟化

S: 被囊体側部が明瞭に軟化

6. 対策

(1) 病原体フリーの維持

一度本病が発生した漁場では翌年以降も発生しており、本病原体の漁場への定着性は強いと考えられる。マボヤ養殖施設に生息するエボヤや天然礁に生息するマボヤにも本病原体が感染しており、既発生漁場から病原体を完全に駆除することは不可能である。また、水を介して伝播する本病の病原体は海水中で2週間以上生存することから、広範囲への感染が懸念される。このため、非発生漁場では、病原体フリーを維持するために、非発生漁場で生産された種苗のみを使用することが重要である。なお、0歳マボヤでは実験感染が成立せず、養殖漁場においても0歳での発病は見られていない。しかしながら、2007年以降に宮城県内で発生している被囊軟化症は韓国種苗(0歳)によって持ち込まれた可能性が高いことから、0歳種苗は発病しなくても、キャリアになる可能性は十分に考えられる。不顕性感染個体からの病原体の検出方法や消毒による感染種苗の病原体フリー化技術の開発が必要である。

(2) 発病個体の除去と陸上処分

重症マボヤの被囊片10g程度を1晩海水に浸漬すると、海水中の鞭毛虫の密度は 10^6 虫体/mL以上に達することから、発病した1個体からは1億虫体以上の病原体が養殖漁場に遊出すると考えられる。水温10°Cの条件下において、病原体は死亡個体の被囊内で10日間以上生存し、感染源になり得る(表10)。したがって、発病個体を漁場に放置することや、除去した発病個体を海中に投棄することは、漁場内に病原体を蔓延させる原因となる。発病個体を発見した時は早急に除去し、陸上で処分することが重要である(図19)。なお、発病個体を除

去する際には、被嚢を破らずに、根元の部分から全体を取り除く。鞭毛虫は有効塩素 1ppm と有効ヨウ素 5ppm の 1 分処理により活性を失うことから、発病個体の除去に使用した刃物等は、これらで消毒する（表 11）。



図 19 岸壁に設置したタンクに死んだマボヤを回収。満杯になると産廃業者に処理を依頼

表 10 死亡個体中における病原体の生存性

試験 1				試験 2			
試験区(斃死後の日数)*1		実験感染による病原性の確認		試験区(斃死後の日数)*2		実験感染による病原性の確認	
		感染源(被嚢)中の鞭毛虫の有無	発病個体数/供試個体数 (%)			感染源(被嚢)中の鞭毛虫の有無	発病個体数/供試個体数 (%)
1日後	No.1	++*3	12/12(100%)	6日後	No.1	++	3/12(25%)
	No.2	++	12/12(100%)		No.2	++	9/12(75%)
2日後	No.1	++	12/12(100%)	7日後	No.1	++	12/12(100%)
	No.2	++	12/12(100%)		No.2	++	9/12(75%)
3日後	No.1	++	12/12(100%)	8日後	No.1	++	7/12(58%)
	No.2	++	10/12(83%)				
4日後	No.1	++	12/12(100%)	10日後	No.1	++	9/12(75%)
	No.2	++	12/12(100%)		No.2	++	9/12(75%)
5日後	No.1	++	12/12(100%)				
	No.2	++	12/12(100%)				
Cont.		--	0/12(0%)	Cont.		--	0/12(0%)

*1 死亡後、13℃で所定の期間、水中に放置した病ホヤの被嚢を感染源として使用

*2 死亡後、8℃で所定の期間水中に放置した病ホヤの被嚢を感染源として使用

*3 感染源として2個体ずつプールして使用。2個体ともに鞭毛虫が観察された場合は++

表 11 鞭毛虫に対する塩素およびヨード剤の消毒効果

A 塩素						B ヨウ素					
濃度 (ppm)	処理時間(分)					濃度 (ppm)	処理時間(分)				
	0	1	5	10	15		0	1	5	10	15
0	++	++	++	++	++	0	++	++	++	++	++
0.25	++	++	++	++	++	0.25	NE	NE	NE	NE	NE
0.5	++	+	+	+	+	0.5	NE	NE	NE	NE	NE
1	++	-	-	-	-	1	++	++	++	++	++
2	++	-	-	-	-	2	++	++	++	++	++
3	++	-	-	-	-	3	++	++	++	++	++
4	++	-	-	-	-	4	++	+	±	±	-
5	++	-	-	-	-	5	++	-	-	-	-

++ ; 鞭毛虫生残(変化なし), + ; 一部生残, ± ; 瀕死, - 死亡
NE ; 未検討

(3) 株養殖の励行

養殖ロープに採苗器(カキ殻)を 30~40cm 間隔で挟み込んで株状に育成する日本式の株養殖は、採苗器(シュロ縄)を養殖ロープに螺旋状に巻き込んでロープ全体で育成する韓国式に比べて本病による被害量が少ない傾向にある。同期間に同じ筏で、両方式で育成した養殖ロープの 1 本当たりの水揚げ重量は、前者が 61kg、後者が 16kg であった (図 20)。この海域で本病が確認される以前のの水揚げ重量は、前者が平均 100kg/本、後者が 200kg/本である。発病群では隣接する個体に病原体が伝播する傾向が見られることから、ロープ全体でマボヤを育成する韓国式の養殖方法は、一旦発病するとロープ全体に被害が拡大する傾向にあり、日本式の株養殖を励行すべきである。

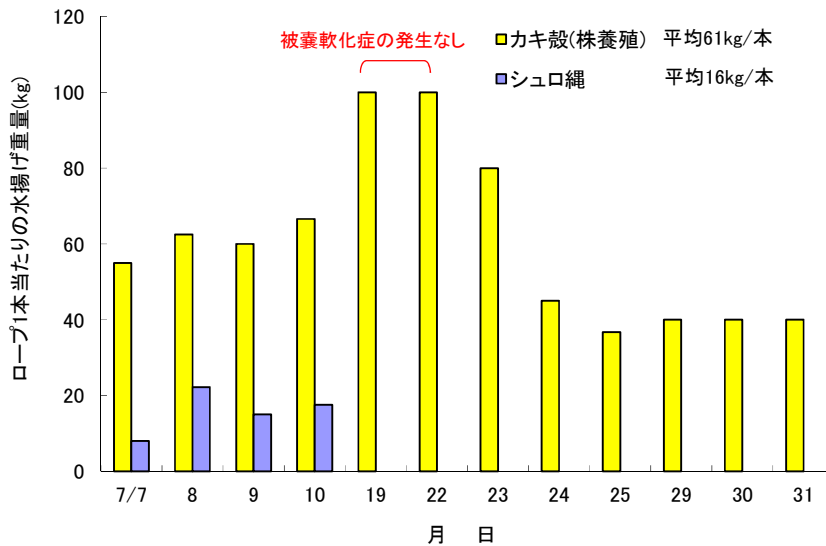


図 20 同じ筏における株養殖とシュロ縄養殖の水揚げ量

(4) 深吊りの励行

満 2~3 歳の夏までモニタリングした養殖ロープの水深別の生残個体数は、8m 以浅の上層 10 株が平均 3.1 個体 (0~8 個体) 生残したのに対し、8m 以深では深層の株ほど多くの個体が生残した。マボヤが養殖されている 5~20m 層の水温や塩分濃度には水深による大きな差が周年なく、この生残率の違いの要因は不明であるが、8m 以深で養殖することにより被害を低減できると考えられる (図 21)。

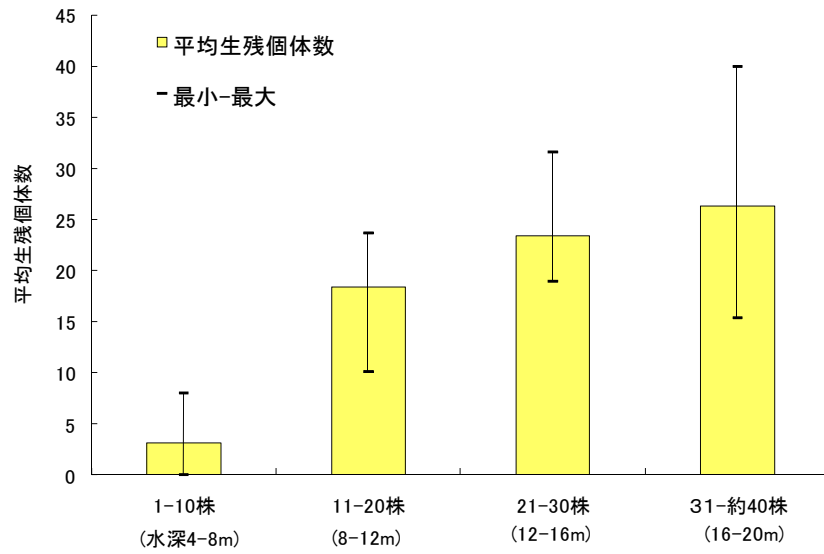


図 21 水深別の 1 株当たりの平均生残個体数

7. 参考資料

報告書

- 平成 19 年度養殖衛生管理技術開発研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 32-47.
- 平成 20 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 1-16.
- 平成 21 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 1-14.
- 平成 22 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 社団法人日本水産資源保護協会, 25-37.
- 平成 23 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書, 養殖衛生対策推進協議会, 95-101.

学術論文

- Kumagai A., Suto A., Ito H., Tanabe T., Takahashi K., Kamaishi T., Miwa S. (2010): Mass mortality of cultured ascidians *Halocynthia roretzi* associated with softening of the tunic and flagellate-like cells. *Dis Aquat Org*, 90, 223-234.
- 熊谷 明(2011): 国内の養殖マボヤに発生した被囊軟化症. 日水誌, 77, 290-295.
- Kumagai A., A. Suto, H. Ito, T. Tanabe, J. Y. Song, S. Kitamura, E. Hirose, T. Kamaishi, S. Miwa (2011): Soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi* is caused by a kinetoplastid protest. *Dis Aquat Org*, 95, 153-161.
- Hirose E., A. Nozawa, , A. Kumagai, S. Kitamura (2012): *Azumiobodo hoyamushi* gen. nov. et sp. nov. (Euglenozoa, Kinetoplastea, Neobodonida): the pathogenic kinetoplastid of the soft tunic syndrome in the ascidian aquaculture. *Dis Aquat Org*, 97, 227-235.

学会発表

- 熊谷 明, 須藤篤史, 田邊 徹, 高橋清孝, 三輪 理 (2009): 宮城県におけるマボヤ被囊軟化症の発生状況と病原体の感染性. 平成 21 年度日本水産学会春季大会要旨, p173
- 熊谷 明, 須藤篤史, 田邊 徹, 高橋清孝, 三輪 理 (2009): 感染実験によるマボヤ被囊軟化症病原体の性状の検討. 平成 21 年度日本水産学会春季大会要旨, p173
- 熊谷 明, 伊藤 博, 須藤篤史・田邊 徹, 釜石 隆, 三輪 理 (2009): マボヤ被囊軟化症個体に認められる鞭毛虫. 平成 21 年度日本魚病学会大会要旨, p20
- 釜石 隆, 三輪 理, 橋本哲男, 伊藤 博, 熊谷 明 (2010): 被囊軟化症マボヤに存在する鞭毛虫の分子系統学的解析. 平成 22 年度日本魚病学会大会要旨, p25

熊谷 明, 伊藤 博, 釜石 隆・三輪 理 (2010) : マボヤ被囊軟化症の PCR による診断. 平成 22 年度日本魚病学会大会要旨, p26

熊谷 明 (2010) : マボヤ被囊軟化症について. 平成 22 年度日本水産学会東北支部会要旨, p8-9

熊谷 明, 伊藤 博, 田邊 徹, 宋 準榮・北村真一, 広瀬裕一, 釜石 隆・三輪理 (2011) : マボヤ被囊軟化症の原因はキネトプラスト類の鞭毛虫である. 平成 23 年度日本魚病学会春季大会要旨, p18

野澤昭乃, 北村真一, 広瀬裕一, 熊谷 明 (2011) : 被囊軟化症マボヤから分離した病原鞭毛虫の形態的・分子系統学的解析. 平成 23 年度日本水産学会秋季大会要旨, p47

熊谷 明, 伊藤 博, 釜石 隆・三輪 理 (2011) : 天然マボヤとエボヤの被囊軟化症の感染状況. 平成 23 年度日本魚病学会秋季大会要旨, p18

その他

熊谷 明 (2011) : 魚病 NOW 「マボヤの被囊軟化症」. 養殖, 緑書房, 東京, p86

魚類防疫技術書

マボヤの被囊軟化症
(The soft tunic syndrome)
診断・防疫マニュアル

文責：熊谷 明（宮城県水産技術総合センター）

平成 24 年 3 月

養殖衛生対策推進協議会

〒104-0044 東京都中央区明石町 1-1

東和明石ビル 5F

Tel: 03-6680-4277 FAX: 03-6680-4277