

原著論文

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

長倉義智*¹・良永知義*²・坂本 崇*³・服部圭太*⁴・岡本信明*³

Susceptibility of Four Families Derived from Two *Seriola* Species to the Monogenean Parasite (*Benedenia seriolae*) Using a New Challenge Method

Yoshitomo NAGAKURA, Tomoyoshi YOSHINAGA, Takashi SAKAMOTO,
Keita HATTORI and Nobuaki OKAMOTO

Four families of two *Seriola* species were experimentally challenged with oncomiracidia of *Benedenia seriolae*. One family was produced by crossing wild yellowtails (*S. quinqueradiata*), two families were crosses between yellowtails of the 4th or 5th generation passaged under laboratory conditions, and one hybrid family was a cross between a yellowtail and goldstriped amberjack (*S. lalandi*). Four hundred juveniles, 100 per each of the four groups and ranging 108–111 mm in mean total length, were exposed to about 40,000 oncomiracidia of *B. seriolae* within 30 min after hatching in a 1000ℓ tank in darkness for 4 hours. On day 10 post-challenge, the number and size of parasites were estimated on each fish. Infection intensities significantly differed in any combination of families. A significant difference was also detected in worm body length in a combination of two families. The results suggest that families of fish resistant to *B. seriolae* can be produced through breeding. The advantages of the method employed in this study for evaluating fish susceptibility against *B. seriolae* are also discussed.

2009年12月24日受付, 2010年7月13日受理

ブリ *Seriola quinqueradiata* は、北海道から台湾に至る日本列島沿岸および朝鮮半島東部に分布する重要な水産資源である。また、ブリ類の養殖生産量はわが国の海面養殖魚種の中で最も多く、平成18年の生産量は約16万トンで、総海面養殖魚生産量の60%を占めている¹⁾。

ブリ類の養殖場で最も一般的にみられる外部寄生虫 *Benedenia seriolae* は、ハダムシと称されている。本虫の寄生が原因となって、体表に糜爛や潰瘍が形成され、寄生を受けた宿主は多くの場合、摂餌量が低下し、重症の場合は死にいたることもある。本虫に関する研究は、海

上施設での小割式の養殖が広く行われ始めた1960年代に盛んに行われ、その駆除法についても多くの報告がある^{2,9)}。

現在は、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による治療が行われているが、その中でも、淡水浴と薬浴が最も一般的である。しかし、淡水浴、薬浴は頻繁に繰り返す必要があることから、要する労力、時間は多大となり、養殖業者にとって大きな負担となっている。一方、長倉ら¹⁰⁾ は、ブリ属のなかでも魚種により、また同一種内でも個体により本虫に対す

*1 独立行政法人水産総合研究センター 宮古栽培漁業センター
〒027-0097 岩手県宮古市崎山4-9-1

Miyako Station, National Center for Stock Enhancement, FRA 4-9-1 Sakiyama, Miyako, Iwate, 027-0097 Japan
ynaga@fra.affrc.go.jp

*2 東京大学大学院農学生命科学研究科

*3 東京海洋大学海洋科学部

*4 独立行政法人水産総合研究センター五島栽培漁業センター

る感受性が違うことを示した。この結果は、本虫に抵抗性のあるブリ家系を交雑や選抜によって構築できる可能性を示すもので、新たな本虫の防除技術として期待できる。そこで本研究では、この可能性をさらに探るため、ブリ家系およびブリとヒラマサの交雑家系を作出し、それらの本虫に対する感受性を感染試験によって調べたので報告する。

材料と方法

供試魚 2006年に独立行政法人水産総合研究センター五島栽培漁業センター（以下、五島センター）でブリ3家系とブリとヒラマサの1交雑家系を人工授精により作出した。すなわち、ブリについては、ブリ天然魚（雌1尾、雄数尾）から作出したブリを同家系内で4、5回継代した3歳魚（東京大学附属水産実験所より譲渡、以下、ブリ継代系）同士を交配させてブリ2家系（以下、ブリ継代系A、B）を作出した。また、天然モジャコから海上小割生け簀で養成したブリ3歳魚同士を交配させて1家系（以下、ブリ天然系）を作出した。ブリとヒラマサの交雑家系（以下、ブリヒラ継代系）は、天然由来のブリ（雌）とヒラマサ（雄）より得た雑種第2代3歳魚（雌）とブリ継代系（雄）を交配させて得た。なお、ブリヒラ継代系の雌親は海上小割生け簀での個体毎の *Benedenia seriola*（以下、ハダムシ）寄生数調査を行い、雑種第2

代3歳魚263尾（寄生数 96 ± 37 個体（平均値 \pm 標準偏差））のうち、寄生数が少ない方から6番目（寄生数33個体）の個体である。ブリ継代系A、Bの親魚はすべて別個体で、ブリ継代系Aとブリヒラ継代系の雄親は同一個体である（表1）。

大きさによる選別を数回行って、大きさを揃えて（いずれの家系も平均全長約110mm）（表2）、感染試験に供した。また、家系を識別できるように、攻撃4日前にブリ継代系Aは右腹鰭、ブリ継代系Bは左腹鰭、ブリヒラ継代系は尾鰭下部、ブリ天然系は尾鰭上部をそれぞれカットした。

供試ハダムシ 攻撃試験へのハダムシ供試までのタイムスケジュールを図1に示した。攻撃開始14日前に、五島センターの海上小割生け簀で養成していたハダムシが寄生しているブリ4尾（全長40cmサイズ）を500ℓ黒色ポリエチレン水槽に収容し、砂濾過海水を掛け流し、配合飼料を給餌して飼育した。この水槽内に、ブリ収容日に垂下したモジ網（20cm × 20cm、目合3.0mm、以下、モジ網）を垂下3日後（攻撃開始11日前）に検鏡し、ハダムシの卵が付着していることを確認した。さらに、水槽内で別種の *Neobenedeniagirellae* の感染環ができていないことを確かめるため、Kinami *et al.*¹¹⁾ に基づいて、攻撃開始4日前に水槽内のブリ1尾を淡水浴して得られた虫体108個体を分類し、*N. girellae* が寄生していないことを確認した。これらにより、この水槽内に垂下したモジ網を回収することで、*N. girellae* の混入がないハダムシの卵を確保できるということを確認した。この水槽に、攻撃開始7日前に新たにモジ網4枚を垂下し、攻撃開始前日にこれらのモジ網にハダムシの卵が付着していることを確認した後、モジ網を新たに準備した遮光した100ℓ黒色ポリエチレン水槽中の海水に沈め、濾過海水を掛け流し、エアーストーンによる弱い通気を施した状態で静置した。攻撃直前にモジ網を100ℓ水槽から取り出し、海水を入れた1ℓ透明容器2個にこのモジ網を2枚ずつ入れ、蛍光灯で照明された室内に15分間静置して光をあて、ハダムシ幼生のふ化を促した。容器中にふ化したハダムシの幼生数は、採水した1ml中の幼生を実体顕微鏡下で5回計数し、その平均値を水量に合わせて倍数して求めた。なお、活力ができるだけ良好なふ化幼生を供するため、100ℓ水槽からモジ網を取り出し、攻撃に供するまでの時間を30分以内とし、ふ化した幼生は攻撃に供するまで容器を遮光して保持した。

攻撃試験 攻撃前日にブリ類4家系各100尾の合計400尾を、1kℓ黒色ポリエチレン水槽1面に収容した。収容時にハダムシの寄生は肉眼では認められなかったものの、肉眼では確認ができない寄生を想定し、収容時に本虫を駆除するため3分間の淡水浴を行った。この4家系を収容した水槽に約4万個体のハダムシふ化幼虫を添加

表1. 各家系の作出に使用した雌親と雄親

家系	雌親 (ピットタグ番号)	雄親 (ピットタグ番号)
ブリ継代系A	ブリ継代系 (4574025354)	ブリ継代系 (457463243F)
ブリ継代系B	ブリ継代系 (4574522169)	ブリ継代系 (45753B4B30)
ブリ天然系	天然魚由来	天然魚由来
ブリヒラ継代系	ブリヒラ [*]	ブリ継代系 (457463243F)

*ブリとヒラマサの雑種第2代で、ハダムシ感染調査でハダムシが付きにくいと判定された個体

表2. 試験開始時および終了時における各家系の全長

家系	試験開始時全長 (mm)	試験終了時全長 (mm)
ブリ継代系A	110.6 \pm 5.7 ^{*a}	122.6 \pm 4.7 ^{*b}
ブリ継代系B	110.4 \pm 5.4 ^{*a}	123.5 \pm 6.8 ^{*b}
ブリ天然系	110.6 \pm 5.7 ^{*a}	122.3 \pm 5.9 ^{*b}
ブリヒラ継代系	108.0 \pm 3.1 ^{*a}	119.0 \pm 5.0 ^{*c}

数値は、平均値 \pm 標準偏差（試験開始時全長：n=30、試験終了時全長：n=100）

同じ文字の値は、有意差無し（p>0.05）

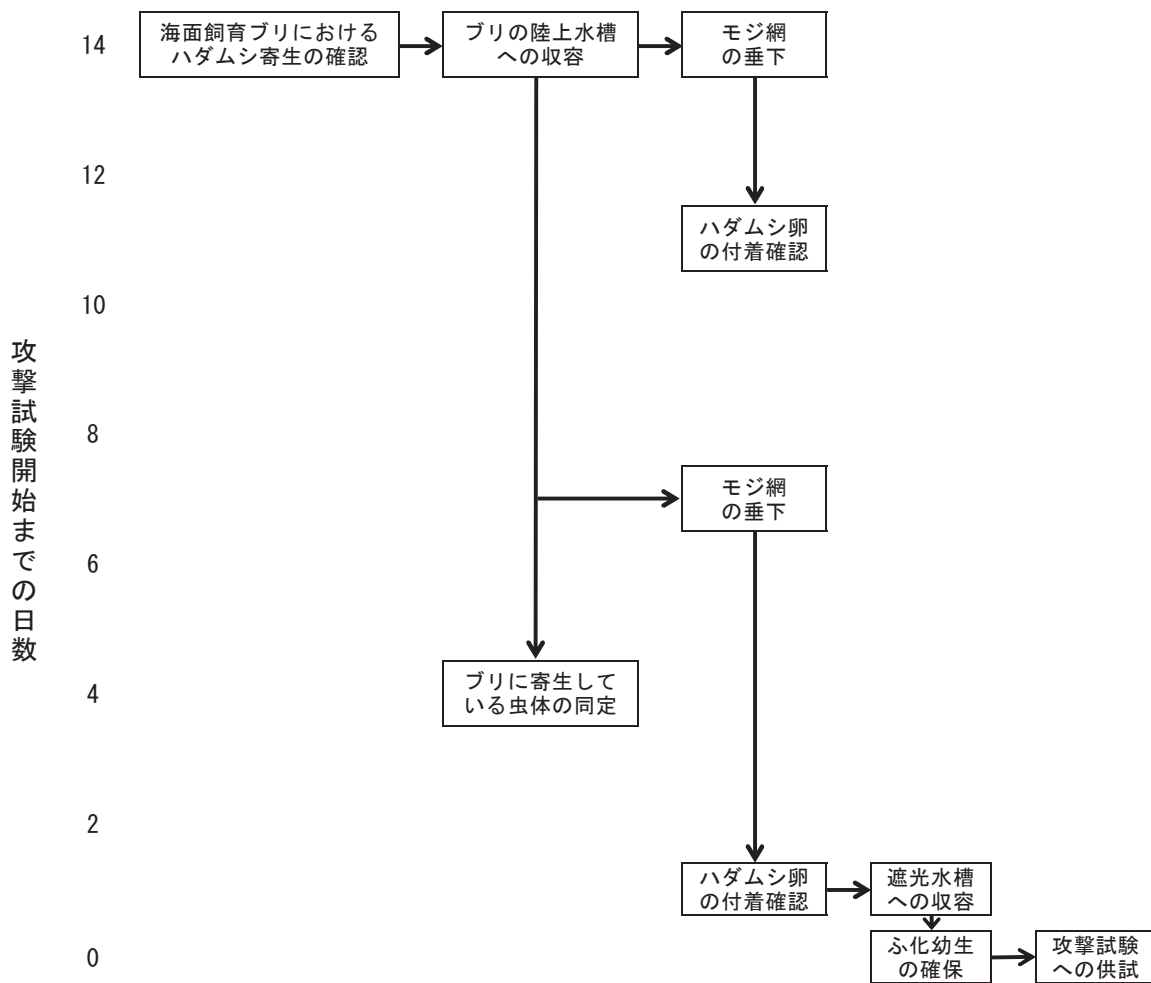


図1. 攻撃試験へのハダムシ供試までのタイムスケジュール

し、遮光した後、通気を施して4時間止水状態で攻撃した。止水状態における水温は25.3～25.6℃であった。その後、濾過海水を掛け流しにし、配合飼料を給餌して飼育した。飼育期間における水温は25.4～26.2℃であった。攻撃10日後に魚を取り上げ、以下の手順により個体毎に魚の大きさを測定し、寄生したハダムシを計数した。①供試魚の頭後部を切り即殺後、血液を除くため魚体を海水で洗った。②洗った魚体を、個体別に0.5ℓ容器内の淡水に10～15分間浸し、魚体から離れた虫体と、ピペティングにより魚体から離れた虫体を集め、5%ホルマリン中に保存した。③魚体の全長、体長および体重を測定後、鰭カット部位により家系を判別した。なお、取り上げ時には、鰭のカット部位が再生していたが、鰭条の乱れにより鰭カット部位を容易に特定できた。④保存した虫体の計数は、実体顕微鏡下で行った。また、虫体は固着盤の一部が変形した個体があったため、体長(体前端から固着盤基部までの長さ)を測定した。

統計処理 魚の体表面積は体長の2乗に比例すると仮定し、

$$\text{体表面積指数} = \text{試験終了時体長 (mm)}^2 / 10,000$$

を求め、各家系間の攻撃時と試験終了時の全長、ハダムシの寄生数、ハダムシの寄生数指数(寄生数(個体)/体表面積指数)および寄生したハダムシの体長の差をKruskal-Wallis検定で比較し、有意差が認められた場合はScheffe's F検定による多重比較を行った。また、ハダムシの寄生数指数と寄生ハダムシの平均体長の相関関係を、Spearmanの順位相関係数を用いて検定した。いずれの検定においても、有意水準は5%とした。

結 果

攻撃時における供試魚の平均全長は、すべての家系において108.0～110.6mmであり、家系間に有意な差は認められなかった(表2)。また、試験終了時の平均全長は、ブリヒラ継代系では119.0mmと、他の家系(122.3～123.5mm)と比較し小さく、有意差が認められた(表2)。

ハダムシの平均寄生数は、いずれの家系間でも有意差が認められ、ブリ継代系B>ブリ天然系>ブリ継代系A>ブリヒラ継代系の順で多かった(図2)。標準偏差は、ブリ継代系Aおよびブリ継代系Bがブリヒラ継代系およびブリ天然系よりも小さかった。ハダムシ寄生数

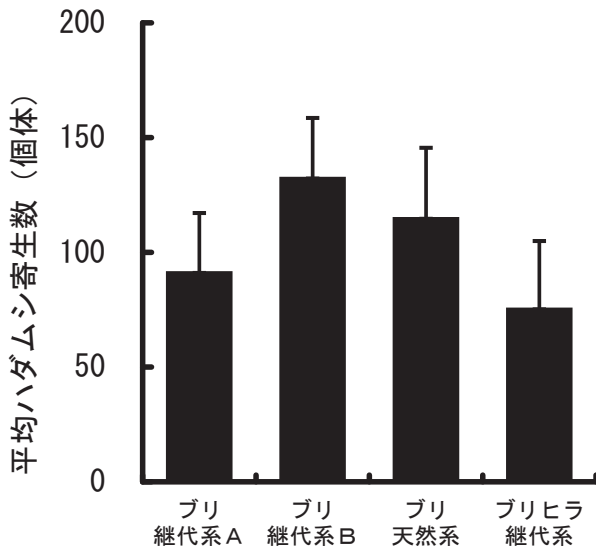


図2. ハダムシ (*Benedenia seriola*) の各家系における平均寄生数
データは、平均値±標準偏差 (n=100)
いずれの家系間でも有意差有り ($p < 0.05$)

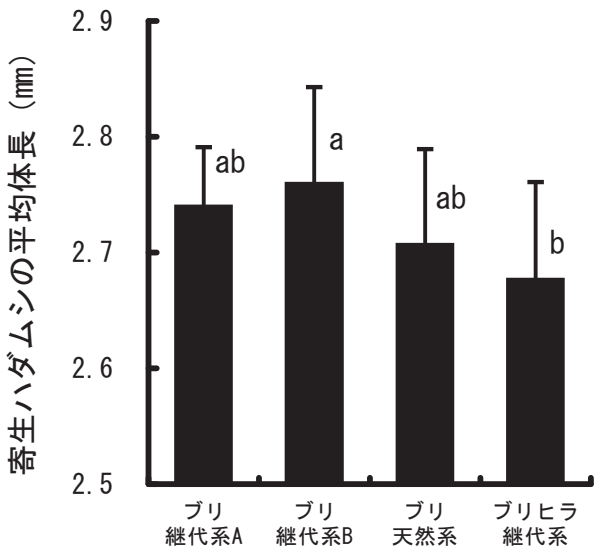


図3. 各家系における寄生ハダムシの平均体長
データは、平均値±標準偏差 (n=20)
同じ文字の値は、有意差無し ($p > 0.05$)

の4家系の合計は4.1万個体であり、攻撃時に使用したハダムシふ化幼生数は約4万個体であったことから、本試験では、攻撃に使用したハダムシ幼生のほぼ全てが試験終了まで寄生していたことになる。また、ハダムシの寄生数を体表面積で補正した寄生数指数は、ブリ継代系Aで 84.9 ± 24.1 (平均値±標準偏差, 以下同様) ($n=100$)、ブリ継代系Bで 119.7 ± 20.7 ($n=100$)、ブリ天然系で 107.0 ± 29.1 ($n=100$)、ブリヒラ継代系で 74.4 ± 28.3 ($n=100$) であり、寄生数と同様に、ブリ継代系B > ブリ天然系 > ブリ継代系A > ブリヒラ継代系 の順で多く、いずれの家系間でも有意な差があった。標準偏差はブリ継代系Aおよびブリ継代系Bがブリヒラ継代系およびブリ天然系よりも小さかった。

宿主の個体毎に寄生したハダムシの平均体長の平均 ($n=20$) は、ブリ継代系B > ブリ継代系A > ブリ天然系 > ブリヒラ継代系 の順に大きく (図3)、ブリ継代系Bとブリヒラ継代系間に有意な差があったが、他の家系の組み合わせでは家系間に有意な差はなかった。また、ハダムシの寄生数指数と寄生ハダムシの平均体長には、各家系とも有意な相関はなかった ($p > 0.05$, $n=20$)。

各家系において、魚体の表面積指数と寄生数の相関は、ブリ天然系では有意な相関はなかったが (Pearsonの相関係数の検定, $p > 0.05$)、ブリ継代系A、ブリ継代系Bおよびブリヒラ継代系では有意な相関があった (Pearsonの相関係数の検定, $p < 0.05$) (図4)。

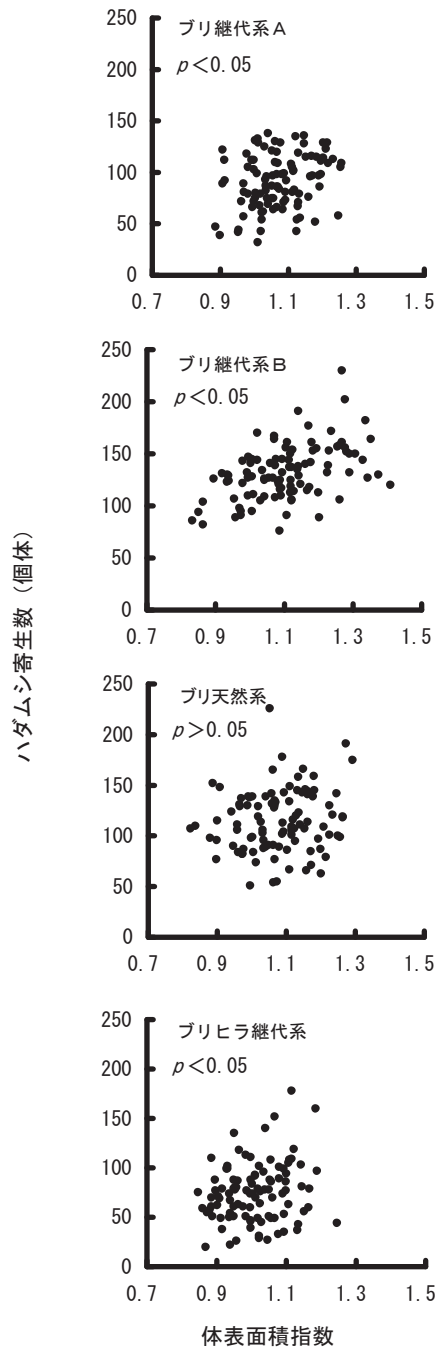


図4. 各家系における体表面積指数とハダムシ寄生数の関係

考 察

魚体の表面積指数と寄生数の間に、ブリ天然系では相関はみられなかったが、ブリ継代系 A、ブリ継代系 B およびブリヒラ継代系では相関が認められた。これは、天然では遺伝的要素の個体差が大きいことから、寄生数は遺伝的要素の違いの影響を受け、魚体の表面積指数と寄生数で相関がなかったのに対し、継代系では遺伝的要素の個体差が小さいことから、魚体の表面積指数と寄生数で相関があった可能性が考えられる。このことは、遺伝的要素を排除した場合、魚のサイズと寄生数の間に相関がある可能性を示唆している。本試験では、魚のサイズの違いが寄生数に及ぼす影響を小さくするため、家系内および家系間における供試魚のサイズを可能な限り揃えた。特にブリのように成長の早い魚種では供試直前に厳密に選別をしない場合には、家系間の魚のサイズに有意な差が生ずる可能性が高くなる。本試験では、攻撃開始までに大きさによる選別を数回行ったところ、攻撃時の各家系間における魚のサイズに有意な差はなく、サイズの揃った魚を供試したこと、攻撃試験における家系間での魚のサイズの違いによる寄生数への影響を排除できた。

これまで、五島センターでは、ブリのハダムシに対する感受性を調べるために、海上小割生け簀内で自然にハダムシが寄生する尾叉長 25～50 cm まで飼育した魚で調査していた¹⁰⁾。しかし、本研究の手法を用いることで、全長 11 cm 前後で調査できることから、供試魚の飼育期間がこれまでより著しく短縮でき、餌代・人件費等のコストが削減できる。また、交配によって家系を作出してから本虫に対する感受性の調査結果を得るまでに要する時間が短縮される。ただし、魚体サイズにより免疫機能が変化するなどの可能性があることから、魚体サイズにより本虫に対する感受性の発現様式が異なることも考えられ、本試験の手法で判定された抵抗性の度合いが、より大きいサイズでの抵抗性の度合いと一致するかは検討する必要がある。また、本試験では、攻撃時間（本虫のふ化幼生を水槽に入れた後の止水状態の時間）を 4 時間とし、攻撃時と飼育水温は自然水温と同じにしたが、攻撃時間、攻撃時の水温および飼育水温などが寄生数へ及ぼす影響は不明である。今後、これらの影響を検討し、感染試験方法の標準化を図る必要がある。さらに、夏季（水温 22～26℃）において本虫はふ化後 15 日で体長約 4.7 mm になり、体長 5 mm 以上で成虫となり産卵することから¹²⁾、試験期間中に、これらの仔虫が再び寄生することを防ぐため、攻撃後 15 日までに試験を終了する必要があると考えられた。また、ヒラメ、マダイにおける本虫の感染試験により攻撃時に寄生した虫体は数日の間に脱落する（良永ら、未発表）。本試験では、

虫体の魚体への着定が安定し、虫体が成虫になる前で、さらに肉眼で十分に虫体が確認できることから攻撃 10 日後に寄生数を計数した。しかし、攻撃後の試験期間を検討することで、より短い期間で寄生数の比較ができれば、試験に要する時間や供試魚を育成するコストをさらに下げることができる。

ブリヒラ継代系は、試験終了時の魚体サイズおよび寄生したハダムシの平均体長が 4 家系中で最小であり、ヒラマサの形質が発現したとも考えられるが、現時点では不明である。寄生していた虫体のサイズは、密度効果があったとすれば寄生数が多い個体は小さくなり、本虫に対する抵抗性が影響したとすると寄生数が多い個体は抵抗性が低いことから、大きくなる可能性が考えられる。ハダムシの寄生数指数と寄生したハダムシの平均体長には、各家系とも有意な相関はなかったことから、本試験では両者の影響は確認されなかった。

本試験では、天然魚由来の家系よりハダムシに対する抵抗性が高い家系（継代系 A）と低い家系（継代系 B）を作出した。ただし、長倉ら¹⁰⁾は、ブリにおいて、個体により本虫に対する感受性が違うことを示しており、本試験で用いたブリ天然系の本虫に対する抵抗性が、天然魚の中でどのレベルにあるのかは、今後検討する必要がある。また、本試験では、本虫に対する抵抗性の情報があることからブリヒラ雑種第 2 代を用いたが、このブリヒラ雑種第 2 代の中で本虫に抵抗性が確認されている雌と継代系 A の雄親と同一個体を交配したところ、継代系 A よりも抵抗性の高い家系（ブリヒラ継代系）を得た。さらに、継代系 A および継代系 B が、他の家系より寄生数の最大寄生数と最小寄生数の差および標準偏差が小さかったことから、限られた親魚の中で継代を重ねることで寄生数の個体差を小さくできることが示された。一方、大原ら¹³⁾はブリ類における遺伝子連鎖地図を作製し、これを用いてハダムシに対するブリ類の宿主抵抗性に関する遺伝子座（QTL）を見いだしている*。これらのことより、家系選抜や交雑によって本虫に対して抵抗性をもつ家系を作出することの有効性が認められた。

謝 辞

継代系ブリを提供していただいた東京大学大学院古川清博士に深謝申し上げる。また、飼育、サンプルの処理にご助力いただいた宿輪 仁氏、久保藤子氏ならびに出口聡子氏に感謝する。

* 大原ら、平成 17 年度日本水産学会大会口頭発表

文 献

- 1) 農林水産省大臣官房統計部 (2008) 平成 18 年漁業・養殖業生産統計年報 (併載: 漁業生産額). 農林統計協会, 東京, 203-245 pp.
- 2) 原田輝雄 (1965) ブリの増殖に関する研究. 近畿大学農学部紀要, **3**, 230-245.
- 3) 高田継男・笠原正五郎 (1965) ハマチの外部寄生吸虫の駆除に関する研究. 水産増殖, **13**, 23-27.
- 4) 保科利一 (1966) *Benedenia seriola* に関する研究. 昭和 40 年度魚病対策に関する研究報告, 静岡県水試, 40-42.
- 5) 笠原正五郎 (1967) 過酸化ピロリン酸ナトリウムによるハマチ寄生吸虫の駆除について. 魚病研究, **1**, 48-53.
- 6) HOSHINA, T. (1968) On the monogenetic trematode, *Benedenia seriola*, parasitic on yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Off. Int. Epiz.*, **69**, 1179-1191.
- 7) 松里寿彦 (1968) 養殖ハマチの外部寄生吸虫 *Benedenia seriola* 駆除について. 魚病研究, **2**, 154-155.
- 8) 大岩靖之・南沢 篤 (1970) 過炭酸ソーダによるハマチの外部寄生虫 *Benedenia seriola* の駆除について - I. 魚病研究, **4**, 77-82.
- 9) 笠原正五郎 (1971) ハマチの外部寄生吸虫に対する過酸化燐酸二ナトリウム薬浴法の検討. 魚病研究, **5**, 143-146.
- 10) 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 (2006) 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.
- 11) KINAMI, R., J. MIYAMOTO, T. YOSHINAGA, K. OGAWA, and Y. NAGAKURA (2005) A practical method to distinguish between *Neobenedeniagirellae* and *Benedenia seriola*. *Fish Pathol.*, **40**, 63-66.
- 12) 笠原正五郎 (1967) ハマチの外部寄生吸虫 *Benedenia seriola* の生態に関する研究 - I. 夏季における成長, 産卵などについて. 広島大学水畜産学部紀要, **7**, 97-104.
- 13) OHARA, E., T. NISHIMURA, Y. NAGAKURA, T. SAKAMOTO, K. MUSHIAKE, and N. OKAMOTO (2005) Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture*, **244**, 41-48.