

魚類養殖における新たな寄生虫防除技術の開発

II ベコ病対策

増養殖環境課 齋田 尚希

1 背景・目的

ベコ病はブリ稚魚（以下「モジャコ」という。）で以前から知られており、微胞子虫ミクロスポリジウム・セリオレ (*Microsporidium seriolae*) がモジャコの筋肉中でシストを形成する病気である。通常は成長とともに治癒するが、重篤な場合は死亡や筋肉中にシストが残存することによる商品価値の低下を招く（横山 2017）。近年、西日本の各地で重篤なベコ病が頻発しており、その対策が求められている。しかしながら、ベコ病病原体である微胞子虫の生活環に不明な部分が多く、感染経路も判明していないため、抜本的な対策は確立されていない。

また、近年ベコ病に対して、フェバンテルを主成分とした水産用医薬品（以下「フェバンテル」という。）の投薬効果が確認された。しかし、フェバンテルはベコ病に対して未承認であるため、使用承認に向けて関係機関が研究を進めている。ただし、フェバンテルの投薬効果はシスト形成の阻害であり、ベコ病そのものを治癒するものではない。そのため、効果的な投薬を実施するには、予防的投薬が認められていない水産用医薬品の制度上、モジャコがベコ病に感染してシストを形成するまでに、ベコ病に感染していることを確認する必要がある。

そこで本研究では、高知県内の主要モジャコ蓄養場におけるベコ病感染動態の把握及びベコ病感染の早期検知技術の開発を目的とし、リアルタイム PCR によるベコ病検出法の開発を行った。

2 方法

(1) リアルタイム PCR による遺伝子検出技術の検討

リアルタイム PCR による遺伝子検出は、国立研究開発法人水産総合研究センター（現国立研究開発法人水産研究・教育機構）増養殖研究所 病害防除部の平成 27 年 7 月 6 日付け内部資料を参考に、リアルタイム PCR 解析装置（BioRad 社製 CFX96Touch）を用いて行った。検出には、ベコ病に感染したモジャコの筋肉中のシストと、シストを懸濁した滅菌海水をろ過したメンブレンフィルターからそれぞれ抽出した DNA 溶液を用いた。また、遺伝子量既知のベコ病病原体遺伝子サンプルの希釈系列を用いてリアルタイム PCR による定量解析技術の開発も行った。

(2) モジャコ蓄養場における海水中ベコ病病原体遺伝子量調査

平成 30 年 4 月 1 日から 5 月 3 日まで、モジャコ蓄養業者が当番制で毎日 1 回採水した海水 1 L 中のベコ病病原体遺伝子量調査を実施した。海水からの DNA 抽出については、I 白点病対策に記述したものと同様の方法で実施し、リアルタイム PCR 解析を行った。

(3) モジャコからのベコ病病原体遺伝子検出技術の開発

モジャコ蓄養業者が高知県沖で採捕したモジャコ計 20 個体の筋肉から、Qiagen DNA Mini Kit を用いて DNA 抽出し、リアルタイム PCR で遺伝子検出を行った。サンプルとして用いたモジャコは解剖し、筋肉中のシストの有無を目視で確認してリアルタイム PCR の検出結果と比較した。

3 結果

(1) リアルタイム PCR による遺伝子検出技術の検討

シスト及びフィルターから抽出した DNA をリアルタイム PCR で検出した結果、それぞれ陽性反応を示した。また、遺伝子量既知の希釈系列サンプルをリアルタイム PCR で検出した結果、増幅効率等に問題の無い検量線が得られた。

(2) モジャコ蓄養場における海水中ベコ病病原体遺伝子量調査

期間をとおして海水中からベコ病病原体遺伝子は検出されなかった。

(3) モジャコからのべこ病病原体遺伝子検出技術の開発

リアルタイム PCR での検出の結果、モジャコ計 20 個体のうち、筋肉中に目視でシストが確認できた 4 個体については全て陽性となり、目視でシストが確認できなかった 16 個体についても、9 個体で陽性となった（表 1）。

表 1 モジャコ筋肉中シストの有無とべこ病遺伝子の検出結果

サンプルNo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
シスト有無	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
べこ病遺伝子	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-

* 網掛けは筋肉中に目視でシストが確認されず、リアルタイム PCR でべこ病遺伝子が検出された個体を示す。

4 考察

(1) リアルタイム PCR による遺伝子検出技術の検討

シスト及びフィルターから抽出した DNA サンプルから陽性反応が得られたことから、一連のリアルタイム PCR 検出系に問題はないと考えられた。また、遺伝子量既知の希釈系列サンプルから検量線が得られたため、今後はこの希釈系列サンプルをスタンダードとして、べこ病病原体遺伝子量の定量を行えるようになった。

(2) モジャコ蓄養場における海水中べこ病病原体遺伝子量調査

今回調査対象としたモジャコ蓄養場の海水から、べこ病病原体遺伝子は検出されなかった。この原因として、サンプリングした時点の海水中にべこ病病原体が存在しなかったことや、あるいはリアルタイム PCR 検出技術に不備があった可能性が考えられる。後者については、前項でべこ病シストを懸濁した海水をろ過したフィルターからの抽出 DNA では、リアルタイム PCR で十分に検出されたこと、また、別の海域でサンプリングした海水では、べこ病病原体遺伝子が検出された例があることから、リアルタイム PCR 検出技術に大きな問題はないと考えられる。したがって、べこ病病原体遺伝子が検出されなかった要因は、サンプリング時点の海水中にべこ病の病原体が存在しなかった可能性が高い。ただし、採水の時間帯や量などの影響で検出されなかった可能性も考えられるため、採水の方法や量の再検討及び検出技術のさらなる改良によって、海水中からのべこ病病原体遺伝子検出技術の精度を高め、蓄養場でのべこ病感染動態を明らかにしていく必要がある。

一方で、調査期間中に現場のモジャコ蓄養業者から、採捕時に既にべこ病になっているモジャコがいたという情報もあったため、沖合での感染の可能性も視野に入れた調査を実施する必要がある。

(3) モジャコからのべこ病病原体遺伝子検出技術の開発

肉眼でべこ病のシストが観察できない個体からもべこ病病原体遺伝子が検出されたことから（表 1）、シスト形成前にべこ病の感染を診断することが可能となった。今後はこの技術を応用して、採捕直後から蓄養期間中を通じて定期的にモジャコをサンプリングし、リアルタイム PCR による解析を行うことで、沖合での感染も含めてどの段階でべこ病に感染し、シストが形成されるのかを明らかにする必要がある。

5 参考文献

横山博（2017）総説べこ病、魚病研究 No. 52（4）、181-185