総説

粘液胞子虫性やせ病

柳田哲矢*

(2017年4月28日受付)

Myxosporean Emaciation Disease

Tetsuya Yanagida*

Laboratory of Veterinary Parasitology, Joint Faculty of Veterinary Medicine,
Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan

(Received April 28, 2017)

ABSTRACT—Myxosporean emaciation disease is caused by the enteric myxosporeans *Enteromyxum leei* and *Sphaerospora fugu* (syn. *Leptotheca fugu*). It emerged in the aquaculture of tiger puffer since mid-1990s in Japan. Thus far, more than 50 marine fishes have been reported as susceptible to *E. leei* in Europe and East Asia. As it has a wide host range and is feasible to transmit directly from fish to fish, *E. leei* is considered to be one of the most devastating parasites in warm water seawater aquacultures. Regardless of its economic impact, neither effective treatment nor preventive measure for the disease has been established until now. To control this disease, further studies are needed for better understanding of the biology of the parasites and of the host-parasite interaction.

歴 史

1996年から、九州の養殖トラフグに著しいやせ症状を特徴とする疾病の発生が確認されるようになった。病魚は、頭骨が張り出して目が落ちくぼむほどのやせ症状を呈し、最終的に死亡した (Fig. 1A)。病魚の腸管上皮組織内から新種の粘液胞子虫 *Leptotheca fugu* と未同定種の *Myxidium* sp. が発見され、病理組織学的観察から本疾病の原因とされた (Tin Tun et al., 2002)。粘液胞子虫の種同定には胞子の形態観察が必要だが、*Myxidium* sp. はトラフグ内で胞子を形成しないために種同定がなされなかった。後に、実験的に *Myxidium* sp. を感染させたマダイから得られた胞子の形態観察と、18S リボソーム RNA 遺伝子を対象とした遺伝子解析の結果に基づき、本種は *Enteromyxum leei* に同定された (Yanagida et al., 2004)。また、後に *L. fugu* は *Sphaerospora* 属に転属された (Gunter and Adlard, 2010)。

E. leei によるやせ病については、1990年代初頭にキブ

ロス共和国の養殖ヨーロッパヘダイ *Sparus aurata* で発生したのが初報告である。その後、*E. leei* は養殖魚や水族館の飼育魚から続々と報告され、現在までに50種を超

Fig. 1. Severely emaciated tiger puffer (A) and spotted knife-jaw (B) infected with *Enteromyxum leei*.

山口大学共同獣医学部獣医寄生虫学教室

* Corresponding author

E-mail: yanagi-t@yamaguchi-u.ac.jp

える海産魚に感染することが知られている。地中海、カナリア諸島沿岸から紅海まで広く分布し、経済的に大きな被害をもたらしている (Sitjá-Bobadilla and Palenzuela, 2012)。近年では、韓国の養殖ヒラメとターボット (イシビラメ) *Scophthalmus maximus* から報告がある (Sekiya et al., 2016)。日本国内では、養殖ヒラメ、マダイ、イシガキダイおよびヤイトハタで *E. leei* によるやせ病が報告されている (Yasuda et al., 2005; Yanagida et al., 2008; 知名ら, 2013)。また、実験的にはクサフグ、クマノミ、カクレクマノミにも感染することが知られている (Yokoyama and Shirakashi, 2007; Yokoyama et al., 2009)。これまでに、沖縄県、九州各県、四国、和歌山県、福井県などで本疾病の発生が確認されている。根本的な対策は確立されておらず、現在でも各地の養殖場において発生し、被害をもたらしている。

病原体・生活環

国内で本疾病の原因となるのは、双殻目の粘液胞子虫 *E. leei* と *S. fugu* である。ヨーロッパでは、ターボットに同様の病気を引き起こす *Enteromyxum scophthalmi* も知られているが、日本国内での報告はない。*E. leei* の胞子は緩やかな三日月型で、長さ 13.9–19.1 μm 、幅 5.6–11.0 μm 、2 個の極嚢が八の字型に配列している。ただし、トラフグやヒラメではほとんど胞子がみられず、観察されるのは栄養体である (Fig. 2 A and B)。一方の *S. fugu* の胞子は丸みを帯びた台形で、長さが 8.3–9.5 μm 、

幅 13.0–15.0 μm 、2 個の極嚢は球形である (Fig. 2C)。両種とも腸管上皮組織内に寄生して上皮の変性や剥離を引き起こすが、*S. fugu* の方が病変の程度は比較的軽度である。*E. leei* では、魚種によって胆嚢、胆管、脾臓、鰓からも虫体が見つかっている (Alvarez-Pellitero et al., 2008; 知名ら, 2013)。虫体は確認されていないものの、ヒラメとターボットでは肝臓、胆嚢、腎臓、膀胱から特異的 PCR 法で検出されたとの報告もある (Sekiya et al., 2016)。罹患魚が短期間でやせる機構は解明されていないが、腸管上皮組織が障害を受けることによる浸透圧調節障害や栄養障害、食欲不振、免疫応答による基礎代謝の増加、胆管閉塞による肝臓障害などが関わっていると考えられている (Ishimatsu et al., 2007; Sitjá-Bobadilla and Palenzuela, 2012; 知名ら, 2013)。

粘液胞子虫は魚類と環形動物を宿主とする二相性生活環を持つとされるが、*E. leei* と *S. fugu* の生活環は不明である。ただし、*E. leei* は感染魚腸管の経口投与、感染魚との同居、感染魚飼育排水での飼育によって魚から魚へ直接伝播することが実験的に証明されている (Yasuda et al., 2002, 2005; Yanagida et al., 2004)。そのため、養殖場内で急速に伝播する。なお、胞子を形成しないトラフグにおいても実験感染が成立することから、胞子形成前の栄養体が感染ステージになっていると考えられる。栄養体は、海水中で24時間は感染性を保つことが示されている (Yokoyama et al., 2009)。*E. leei* の宿主範囲は非常に広く、上述したように50種以上の海産魚から報告されている。また、実験的にはゼブラフィッシュなどの淡水魚にも感染する (Sitjá-Bobadilla and Palenzuela, 2012)。ただし、魚種によって感受性は異なり、ヨーロッパヘダイやヨーロッパシーバス *Dicentrarchus labrax* では比較的症状が軽いのにに対し、シャープスナウトシーブリーム *Diplodus puntazzo* では被害が大きいとされる (Sitjá-Bobadilla and Palenzuela, 2012)。トラフグやヒラメについては、本来の宿主ではないために *E. leei* が胞子形成に進むことができず、増員増殖を繰り返すことで寄生強度が高まるのかもしれない。なお、異なる魚種間でも実験感染が成立することから (Yanagida et al., 2004; Yasuda et al., 2005)、養殖場で魚種をまたいだ伝播が起こることも想定される。一方、*S. fugu* はトラフグからのみ報告されている。実験感染が成立しないことから、*S. fugu* の感染環には交互宿主が必要と推察されるが、詳細は不明である。

トラフグにおける *E. leei* のやせ病発生には季節性があり、一般的に高水温期に発生が多く、低水温期には収まる傾向がある。実験的には、*E. leei* の魚体内における発育・増殖は水温15°C以下で抑制されるものの、10°Cでも生存することが示されている (Yanagida et al., 2006)。そのため、潜伏感染している越冬魚が、翌年の種苗への

Fig. 2. Developmental stages of *Enteromyxum leei* and *Sphaerospora fugu* in the intestinal imprints stained with Diff-Quik. Bars = 10 μm . (A) and (B) Presporogonic trophozoites of *E. leei* from tiger puffer. (C) Spores of *Sphaerospora fugu* in the disporoblast. (D) Presporogonic trophozoites of *S. fugu* hyperinfected with microsporidian.

感染源となりうる。一方、ヤイトハタでは水温が21°C–26°Cの時期に発生が多く、26°Cを越えると収束した(知名ら, 2013)。その後水温が低下しても再発しなかったことから、高温処理によって本疾病を治療できる可能性が示された。しかしながら、養殖トラフグにおいては水温が26°Cを越える高水温期にも本疾病が発生し、*E. leei*の感染も確認されている(堅田ら, 2015)。加温処理(30°C)による*E. leei*感染への影響をヤイトハタ、カクレクマノミ、トラフグで調べたところ、前2種では治療効果があったが、トラフグでは治療効果が見られず、未感染魚へ伝播した(横山, 私信)。以上の結果から、*E. leei*の感染に水温が与える影響には魚種ごとに違いがあることが示された。*S. fugu*については、明確な季節性があるという報告はない。実験感染が成立しないことから、感染・発育に水温が与える影響も明らかにされていない。

診 断 法

本疾病の外観症状は魚種によって多少異なるが、頭骨が浮き上がるほどの著しいやせ症状が1つの特徴である(Fig. 1 A and B)。解剖所見においては、腸管が薄くなる、腸内に水様性内容物(腸水)が貯留するなどの症状が見られる。トラフグやヤイトハタでは胆管閉塞や緑肝も観察される。ヒラメでは、腹部膨満や脱腸も見られる。*E. leei*と*S. fugu*の最も簡便な検出法は、腸粘膜のスタンプ標本を作成しDiff-Quik染色を施すことである。ただし、*E. leei*はトラフグやヒラメではほとんど胞子を形成しないため、スタンプ標本で観察されるのは径10–20 µmの多核の栄養体である(Fig. 2 A and B)。*S. fugu*では胞子も確認されるが、栄養体しか観察されないこともある(Fig. 2D)。トラフグにおいては腸管内に複数種の粘液胞子虫が混合感染するうえ、栄養体は発育ステージによって形態を変化させる。そのため、簡便で迅速な診断が可能ではあるものの、スタンプ法による種鑑別にはある程度の経験を要する。そのため、特にトラフグにおいては後述するPCR法の有用性が高い。組織学的には、*E. leei*と*S. fugu*ともに上皮組織内に多数の寄生体が観察される。組織切片上で2種を形態的に鑑別するのは困難だが、キチン質と結合する蛍光色素であるUvitex 2Bに対して*E. leei*のみが陽性を示すことで見分ける事ができる(Fig. 3)。Uvitex 2B染色は、通常のHE染色の前にUvitex 2Bを1%濃度でPBSに溶解した染色液により10分間行い、紫外光で観察する。

顕微鏡観察に代わる診断法としては、*E. leei*と*S. fugu*を特異的に検出するPCR法が確立されている(Yanagida et al., 2005)。本法はスタンプ法に比べて検出感度が高く、確実に種鑑別が可能である。PCR法では、綿棒を肛門に挿入して採集した腸内容物をDNA抽出の材料とすることで、魚を殺さずに検査することもできる(Fig. 4)。

Fig. 3. Histological section of the intestine of red sea bream stained with Uvitex 2B – H&E. Developmental stages of *Enteromyxum leei* are fluorescent in the epithelium of the intestine. Bar = 30 µm.

Fig. 4. Rectal examination of tiger puffer for the PCR detection using non-lethal sampling method.

さらに最近、より簡便で迅速な診断法として、LAMP法も開発されている(堅田・奥山, 2017)。本法は前述のPCR法よりも検出感度が高く、3時間程度で結果が判定できるため、今後、現場で応用されるかもしれない。

防 除・予 防

本疾病に対する治療法や防除法は確立されていない。ヨーロッパでは、*E. leei*に感染したシャープスナウトシーブリームに抗コキシジウム薬のアンプロリウムとサリノマイシンを併用したところ、虫体の変性が確認され、感染率、感染強度ならびに致死率が有意に低下したとの報告がある(Golomazou et al., 2006)ものの、未だ実用化には至っていない。他にも種々の薬剤や飼料添加物が試されているが、本疾病を根治するものは見つからない(Sitjá-Bobadilla and Palenzuela, 2012)。そのため、本疾病への対策は予防を中心としたものにならざるを得ない。

現状では、海面養殖において本疾病の感染を確実に防ぐ方法はない。本疾病に限ったことではないが、種苗や中間魚の導入時にPCR法による検査を行うなど、まず

は感染魚を漁場に入れないことが重要である。実際に、以前筆者が行った調査では、感染したトラフグ種苗が漁場に導入された例を確認している。*E. leei* は魚から魚へ直接伝播するため、養殖場内で速やかに感染が拡がりうる。そのため、定期的な検査により感染魚を早期に発見することも重要である。病魚や死魚を積極的に取り上げて廃棄することで流行の抑制に繋がったと考えられる例も報告されている（堅田ら, 2015; Sitjà-Bobadilla and Palenzuela, 2012）。トラフグ養殖においては、種苗を1歳魚と離して導入することも感染予防になるかもしれない。ただし、*E. leei* は海水中で24時間は感染性を保つため、伝播を防ぐためにどの程度の距離が必要かは今後明らかにする必要がある。

陸上養殖であれば、飼育水を管理することで粘液胞子虫の侵入を防ぐことが重要である。複数種のクドア属粘液胞子虫において、飼育水の紫外線処理による防除効果が示されており（Shirakashi *et al.*, 2014）、本疾病に対しても効果が期待できる。また、*E. leei* の栄養体を1/4海水で1時間処理することで感染性が減少したとの報告もある（Yokoyama and Shirakashi, 2007）。魚体内の虫体への効果はないと思われるが、一定期間の低塩分濃度飼育によって再感染や他個体への伝播を抑制すれば、*E. leei* による本疾病の発生を抑えることができるかもしれない。飼育水を取水する海域を汚染しないためには、飼育排水の処理も重要である。紫外線やオゾンで処理することが考えられるが、効果的な照射量や濃度については検討が必要である。

最近の研究動向・残された課題

本疾病への対策を確立するうえで残された課題は多い。まず、本疾病の防除を効果的に実施するためにも、交互宿主や天然魚の関与も含めた感染環の解明が望まれる。これについては、種特異的なPCR法を用いるなどして地道な調査を続けるしかない。治療法については、実験的に本疾病による死亡率を下げる効果が見られる薬剤も報告されている（Sitjà-Bobadilla and Palenzuela, 2012）。今後は、魚への副作用やコスト面も勘案しつつ、実用化へ向けた検討を進めることが必要であろう。近年、ヨーロッパでは*E. leei* や*E. scophthalmi* の感染に対する宿主の免疫応答に関する研究が進められている。再感染に対する抵抗性を獲得したと考えられる現象や、*E. leei* に感染したヨーロッパヘダイでは虫体に特異的な抗体が産生されたとの報告もあり（Sitjà-Bobadilla and Palenzuela, 2012）。将来的にはワクチンの開発が期待される。また、本疾病の原因粘液胞子虫と宿主の相互関係を分子レベルで理解することは、耐病性種苗の作出や、効果的な餌料添加物の発見にも繋がると思われる。既にトラフグやヒラメのゲノム情報は利用可能だが、今後*E. leei* を含む粘

液胞子虫についても飛躍的にゲノム情報の解明が進むと考えられる。膨大なデータを有効に活用することで、近い将来本疾病への対策が確立されることを期待したい。

文 献

- Alvarez-Pellitero, P., O. Palenzuela and A. Sitjà-Bobadilla (2008): Histopathology and cellular response in *Enteromyxum leei* (Myxozoa) infections of *Diplodus puntazzo* (Teleostei). *Parasitol. Int.*, **57**, 110–120.
- 知名真智子・中村博幸・濱川 薫・玉城英信・三輪 理・孟飛・横山 博 (2013): 養殖ヤイトハタに発生した粘液胞子虫性やせ病. 魚病研究, **48**, 88–96.
- Golomazou, E., F. Athanassopoulou, E. Karagouni, S. Vagianou, H. Tsantilis and D. Karamanis (2006): Efficacy and toxicity of oral administrated anti-coccidial drug treatment on *Enteromyxum leei* infections in sharpnose seabream (*Diplodus puntazzo* C.). *Isr. J. Aquacult.-Bamid.*, **58**, 157–169.
- Gunter, N. and R. Adlard (2010): The demise of *Leptotheca* Thélohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Koie, 2003 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Sphaerosporidae). *Syst. Parasitol.*, **75**, 81–104.
- Ishimatsu, A., M. Hayashi, M. Nakane and M. Sameshima (2007): Pathophysiology of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* suffering from the myxosporean emaciation disease. *Fish Pathol.*, **42**, 211–217.
- 堅田昌英・奥山芳生・小久保友義・中西 一 (2015): 養殖トラフグとマダイにおける粘液胞子虫性やせ病原因虫の検出状況. 魚病研究, **50**, 127–129.
- 堅田昌英・奥山芳生 (2017): 粘液胞子虫性やせ病原因虫の検出に用いる LAMP 法の開発. 魚病研究, **52**, 104–107.
- Sekiya, M., A. Setsuda, H. Sato, K. Song, J. K. Han, G. J. Kim and I. K. Yeo (2016): *Enteromyxum leei* (Myxosporea: Bivalvulida) as the cause of myxosporean emaciation disease of farmed olive flounders (*Paralichthys olivaceus*) and a turbot (*Scophthalmus maximus*) on Jeju Island, Korea. *Parasitol. Res.*, **115**, 4229–4237.
- Shirakashi, S., T. Nishimura, N. Kameshima, H. Yamashita, H. Ishitani, K. Ishimaru and H. Yokoyama (2014): Effectiveness of ultraviolet irradiation of seawater for the prevention of *Kudoa yasunagai* and *Kudoa amamiensis* (Myxozoa: Multivalvulida) infections in *Seriola* fish. *Fish Pathol.*, **49**, 141–144.
- Sitjà-Bobadilla, A. and O. Palenzuela (2012): *Enteromyxum* species. In “Fish parasites: pathobiology and protection” (ed. by P. T. K. Woo and K. Buchman). CAB International, Oxfordshire, UK, pp. 163–176.
- Tin Tun, K. Ogawa and H. Wakabayashi (2002): Pathological changes induced by three myxosporeans in the intestine of cultured tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck and Schlegel). *J. Fish Dis.*, **25**, 63–72.
- Yanagida, T., Y. Nomura, T. Kimura, Y. Fukuda, H. Yokoyama and K. Ogawa (2004): Molecular and morphological redescription of enteric myxozoans, *Enteromyxum leei* (formerly *Myxidium* sp. TP) and *Enteromyxum fugu* comb. n. (syn. *Myxidium fugu*) from cultured tiger puffer. *Fish Pathol.*,

- 39, 137–143.
- Yanagida, T., M. A. Freeman, Y. Nomura, I. Takami, Y. Sugihara, H. Yokoyama and K. Ogawa (2005): Development of a PCR-based method for the detection of enteric myxozoans causing the emaciation disease of cultured tiger puffer. *Fish Pathol.*, **40**, 23–28.
- Yanagida, T., M. Sameshima, H. Nasu, H. Yokoyama and K. Ogawa (2006): Temperature effects on the development of *Enteromyxum* spp. (Myxozoa) in experimentally infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.*, **29**, 561–567.
- Yanagida, T., O. Palenzuela, T. Hirae, S. Tanaka, H. Yokoyama and K. Ogawa (2008): Myxosporean emaciation disease of cultured red sea bream *Pagrus major* and spotted knife-jaw *Oplegnathus punctatus*. *Fish Pathol.*, **43**, 45–48.
- Yasuda, H., T. Ooyama, K. Iwata, Tin Tun, H. Yokoyama and K. Ogawa (2002): Fish-to-fish transmission of *Myxidium* spp. (Myxozoa) in cultured tiger puffer suffering from emaciation disease. *Fish Pathol.*, **37**, 29–33.
- Yasuda, H., T. Ooyama, A. Nakamura, K. Iwata, O. Palenzuela and H. Yokoyama (2005): Occurrence of the myxosporean emaciation disease caused by *Enteromyxum leei* in cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol.*, **40**, 175–180.
- Yokoyama, H. and S. Shikarashi (2007): Evaluation of hyposalinity treatment on infection with *Enteromyxum leei* (Myxozoa) using anemonefish *Amphiprion* spp. as experimental host. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **27**, 74–78.
- Yokoyama, H., M. Kageyama, T. Yanagida and K. Ogawa (2009): Seawater survival of *Enteromyxum leei* (Myxozoa) evaluated by *in vitro* viability and *in vivo* infectivity assays. *Fish Pathol.*, **44**, 172–177.