総説

べこ病

横山 博*

(2017年11月2日受付)

Beko Disease of Cultured Fish in Japan

Hiroshi Yokoyama*

The University of Tokyo, Bunkyo, Yayoi 1-1-1, Tokyo 113-8657, Japan

(Received November 2, 2017)

ABSTRACT—Beko disease is derived from the concave body surface of fish infected with microsporidians in the myocytes. In this paper, several fish microsporidians including *Microsporidium seriolae* from *Seriola* spp. (*S. quinqueradiata*, *S. dumerili* and *S. lalandi*), *Microsporidium* spp. from three other cultured fish, and *Heterosporis anguillarum* from Japanese eel *Anguilla japonica* are reviewed. A shift of eel-farming method from open field ponds to house-type heating culture systems has emerged the beko disease in cultured Japanese eel. Considering the successful transmission of *H. anguillarum* to uninfected juveniles, frequent screening in eel size seems to reduce the incidence of the disease in eel farms. Previously, beko disease of yellowtail *S. quinqueradiata* was not been considered as a serious problem, because yellowtail juveniles infected with *M. seriolae* usually recover from the disease until the time of adult stage. However, serious condition of the disease in cultured yellowtail has recently received attention as a re-emerging disease. Unknown life-cycle of *M. seriolae* makes the control measures difficult. As diagnostic methods, microscopic examination with Uvitex 2B staining and molecular tools with PCR have been developed. Furthermore, other related microsporidians have been reported in cultured red sea bream *Pagrus major*, hatchery-bred spotted halibut *Verasper variegatus* and juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*.

魚類のべこ病は、各種微胞子虫類が魚類の体側筋肉に寄生して、体幹が肉眼的に凹凸を呈する（いわゆる「べこべこ」になる）疾病である（江草，1982）。主に淡水魚ではウナギのべこ病，海産魚ではブリ類のべこ病が有名である。とくに後者は近年，再興感染症として注目されており，寄生虫の種類は異なるものの，宿主範囲もブリ類以外の多様な魚種に広がってきている（Table 1）。クドア属粘液胞子虫類のように人間に害を及ぼす種類はないが，水産業上の被害は甚大である。

従来，微胞子虫類の生活環は，アユのグルゲア症原因種アユグルゲアビホウシチュウ *Glugea plecoglossii* のように，中間宿主をもたない，比較的，単純なサイクルだと考えられてきた。しかし，サケ科魚類の武田微胞子虫症や多くの海産微胞子虫症のように，中間宿主を有する

と考えられるものや，まったく不明のものも多く存在する。事実，海外ではタイセイヨウサケ *Salmo salar* に寄生する微胞子虫 *Paranucleospora theridion* のように，体表に寄生するサケジラミの体内で別の発育ステージを経てから魚に感染するとされているものや（Nylund *et al.*, 2010），昆虫類に寄生する微胞子虫ではミジンコ類を中間宿主にするものさえ知られている。以上のことを考慮すると，魚類に寄生する微胞子虫類の多くも生活環が未解明であるといつてよいかもしれない。

微胞子虫類は胞子の形態的特徴に乏しいため，属レベルの分類は胞子形成前までの形態学的な特徴に基づいてなされてきた。しかし，透過型電子顕微鏡による微細構造の観察は熟練を要するため，そこまで至らない種類は集合群として *Microsporidium* 属に一括され，暫定的に記載されている。ブリ類のべこ病原因微胞子虫 *Microsporidium seriolae* など，そのような段階であり，今後の研究次第では新たな属に命名される可能性がある

東京大学大学院農学生命科学研究科

* Corresponding author

E-mail: ayokoh@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

Table 1. A list of microsporidians causing the beko disease in Japanese cultured fish

Species name	Mean or range of spores (μm)	NCBI Acc. No.	Host fishes in Japan
<i>Heterosporis anguillarum</i>	Macrospore: 6.7–9.0 $\times$ 3.3–5.3 Microspore: 2.8–5.0 $\times$ 2.0–2.9	AF387331	<i>Anguilla japonica</i>
<i>Microsporidium seriolae</i>	3.34 (2.9–3.7) $\times$ 2.22 (1.9–2.4)	AJ295322	<i>Seriola quinqueradiata</i> , <i>S. dumerili</i> , <i>S. lalandi</i>
<i>Microsporidium</i> sp. RSB	3.47 (2.9–3.9) $\times$ 2.29 (1.9–2.6)	AJ295323	<i>Pagrus major</i>
<i>Microsporidium</i> sp. SH	3.07 (2.8–3.8) $\times$ 2.13 (1.8–2.3)	EU871680	<i>Verasper variegatus</i>
<i>Microsporidium</i> sp. PBT	2.73 (2.4–2.9) $\times$ 1.52 (1.2–1.7)	GU124636	<i>Thunnus orientalis</i>

ことを理解していただきたい。

以上の理由から、魚類寄生微胞子虫類には分類未確定とされ、ミクロスポリジウム属として一時的に名付けられている種類が多い。そこで、微胞子虫胞子の内壁がキチン質で構成されていることを利用して、キチン質に特異的に結合するユビテックス 2B (Uvitex 2B) という蛍光色素により染色し、蛍光顕微鏡の UV 励起光により蛍光を発するかどうか確認することで、微胞子虫であることは確認できる (Yokoyama *et al.*, 1996)。

本総説では、いわゆる「べこ病」として有名な、ウナギのべこ病とブリ類のべこ病を中心に、過去から現在までの知見を総括する目的で執筆した。また、近年、日本産養殖魚介類の寄生虫の標準和名目録が作成されたので (横山・長澤, 2014), 本総説ではなるべく寄生虫の和名を用いて記述することにした。

ウナギのべこ病

歴史

ウナギ養殖業は黎明期の露地池養殖から現在のハウス式加温養殖まで、養殖方法に大きな変遷があり、それに伴って発生する疾病も変わってきた。すなわち、露地池養殖で主流であった「パラコロ病」がハウス式養鰻になってすっかり影を潜め、代わってべこ病が台頭してきた。飼育水温が30°C以上となり「パラコロ病」原因菌の発育限界を超えたことと、高密度飼育により微胞子虫の伝播が容易になったことがその要因であろう。

歴史的には、静岡県等のウナギ養殖場において本病が大発生し、原因体が新種の微胞子虫であると報告されたことで問題となった。しかし近年、本病は日本ですっかり終息し、少なくとも産業的被害はもたらしていない。その原因は必ずしも明らかではないが、台湾や中国産の養殖ウナギの輸入増加に伴って、国産の養殖ウナギの生産量が減ってきたこともその一因と考えられる。90年代までは原因微胞子虫のインビトロ培養など本病の研究も盛んであったが (Kou *et al.*, 1995), 近年では発表される論文数も減少の一途を辿っている。

病原体

病原体はウナギイケイビハウシチュウ (*Heterosporis anguillarum*) である。当初、学名は *Pleistophora*

Fig. 1. Beko disease of Japanese eel *Anguilla japonica*. External sign (A), fresh spores of *Heterosporis anguillarum* (B) and pansporoblasts in the myocytes (C). Note the macrospores (large arrows) and microspores (small arrows). Photographs by H. Oka.

anguillarum と命名されたが、その後、分類の改正により、*Heterosporis* 属に転属された。なお、*Heterosporis* 属 (イケイビハウシチュウ [異形微胞子虫] 属) とは、パンスポロプラスト内に見られる寄生体の発育ステージが同調していないことに起因する。

形態学的に、胞子は大小2型あるのが特徴で、大胞子は楕円形で 6.7–9.0 $\times$ 3.3–5.3 μm , 小胞子は米粒型で 2.8–5.0 $\times$ 2.0–2.9 μm である (Fig. 1)。胞子に大小2

型ある理由は不明であるが、極管が長短2タイプあることから、感染様式に関係しているのかもしれない。自家感染も起こると言われているが、そのメカニズムは不明である。

ウナギイケビホウシチュウは、胞子を経口的または経皮的に接種することで人為感染が成立することから、単純な生活環を有するとされている。発育は水温に依存し、15°Cではほとんど発育せず、25°C前後では30日後に可視大となり、30°C近くまでは高温ほど早く進む。ウナギの体側筋肉の細胞内に定着後、自ら膜を形成してパンスポロプラストを作り、その内部で胞子形成を行う。剖検では筋肉患部が白濁して見えることが多く、パンスポロプラストの崩壊に伴って寄生虫由来のタンパク分解酵素によって宿主の組織が融解することで体表が凹凸を呈すると考えられている。

診断法

外観的に体表の凹凸を肉眼観察した後、剖検により体側筋肉の白濁を確認する (Fig. 1)。患部から少量の組織を取り、ウェットマウント標本により胞子の存在を検査する。その後、塗抹標本を作製して、ユビテックス2B染色し、蛍光顕微鏡 (UV 励起) により胞子の輪郭が蛍光を発するかどうかを確認する。

防除・予防

魚から魚へ水平伝播することから、病魚を見つけたら早めに排除して感染源を除去する。また共食いによる感染も起こるので、頻繁に選別を行って魚のサイズを揃えることも対策の一つである。実験的には、抗生物質フマギリンの経口投与も有効であると報告されているが (加納ら, 1982)、予防的に投与せざるを得ないことと、副作用があることから、現実的ではない。

ブリ類のべこ病

歴史

ブリ養殖の黎明期から知られていたブリ稚魚の疾病である。病気として報告されたのは、江草 (1982) による論文が最初である。当時はモジャコ期にのみ見られる疾病で、成長に伴って治るために大きな産業的被害は与えなかった。しかし、90年代ごろから出荷サイズの成魚にもシストが残存していることがあり、クレームが目立つようになった。さらに近年では養殖場でも大量死の原因と認識されるほど深刻な状態になっており、再興感染症として注目を集めている。

病原体

病原体はブリキンニクビホウシチュウ *Microsporidium seriolae* である。胞子は米粒型で、長さ 2.9~3.7 μm 、幅

1.9~2.4 μm である (Fig. 2)。近年、*Kabatana* 属に分類するという論文も出ているが、本種について胞子形成前の発育ステージを透過型電子顕微鏡により詳細に観察した報告はない。なお、魚体から分離した胞子を未感染魚に経口的または経皮的に接種しても人為感染が成立しないことから、生活環は不明とされ、中間宿主の介在が推測されている。

本種の発育は水温に依存し、20°Cでは3週間で胞子およびシストを形成する。その後、シストが崩壊し、マクロファージ等に貪食されて体内の各所に運ばれたり、シスト形成局所では宿主の線維組織に包囲化されたりする。さらにメラニン沈着を起こして黒化し、萎縮していき、最終的には肉眼的に識別できないほど矮小化して治癒する。

魚を感染場所に曝露する実験により、魚への感染期は5~7月、とくに6月にピークがあり、8月になると終息すると考えられてきた (Sano et al., 1998)。しかし、近年では秋季にも感染することが分かってきている。最

Fig. 2. Beko disease of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. External appearance (A), internal sign (B), fresh spores (C) and Uvitex 2B-stained spores (D) of *Microsporidium seriolae*.

近、環境水中の微胞子虫類の遺伝子量をリアルタイムPCR法により定量化する試みもなされており、発育の季節的消長については、さらなる検討が必要である。

診断法

外観で凹凸を観察した後、解剖して白いシストを確認する (Fig. 2)。典型的には、シストは木屑状に見られる。シストの一部を少量の水分とともにスライドグラスに乗せ、カバーグラスをかけて光学顕微鏡により胞子の形態を調べる。その後、塗抹標本作製して、ユビテックス2B染色し、蛍光顕微鏡 (UV励起) により胞子が蛍光を発するかどうか確認する (Fig. 2)。遺伝子レベルで確認するPCR法も開発されている (Bell *et al.*, 1999)。

防除・予防法

陸上飼育期間中に用水を砂ろ過することで感染防除できる (Sano *et al.*, 1998)。砂ろ過の目合いはブリキンクビホウシチュウの胞子よりも粗いはずであるが、なぜ防除できるのかは明らかでない。中間宿主を摂食して感染するのであれば、それをトラップするのかもしれないし、砂ろ過槽に定着した様々な細菌叢が放出する化学物質により殺虫されるのかもしれない。

微胞子虫類の感染には場所と時期が限られているものが知られているので、疫学調査により感染しにくい場所および時期を特定して、そこを回避する (または陸上で飼育する) などの対策が考えられる。

魚体のサイズと寄生強度の関係については、100 g以上の稚魚には感染するものの寄生強度は低いことが報告されている (Yokoyama *et al.*, 2011)。大型のモジャコを導入することで完全に防除することはできないものの、1個体あたりのシスト数が5個以内であれば、出荷時にはほとんど治癒すると考えられる。

魚体内に侵入した発育ステージの駆虫薬として、アルベンダゾールの経口投与が有効である。最近、発症前の予防的な投与により (実際には、PCR法などにより魚体内への初期侵入を確認してから投与する) でほぼ完全に防除できることが特許出願として公開された (林兼産業株式会社・国立大学法人東京大学・マルハニチロ株式会社。魚介類の微胞子虫の防除用組成物及びそれを用いた魚介類の微胞子虫の防除方法。特願2017-047531)。今後、すべての養殖業者が使用できるように、水産用医薬品として承認する研究を進める必要がある。

その他の魚種のべこ病

背景・病原体

ここ数年、ブリ類以外の養殖魚でもべこ病が発生し、暫定的に新種として報告されている (江草ら, 1988; Yokoyama *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010)。発表年順に

は、マダイの *Microsporidium* sp. RSB, ホシガレイの *Microsporidium* sp. SH, クロマグロの *Microsporidium* sp. PBT がある (学名の後の RSB, SH, PBT は、各宿主魚の英名の略称)。いずれも木屑状のシストを作る点でブリキンクビホウシチュウと似ているが、形態学的、分子生物学的にはすべて別種と考えられている。それぞれ、マダイビホウシチュウ, ホシガレイビホウシチュウ, マグロビホウシチュウという和名が提唱された (横山・長澤, 2014)。

診断法

他のべこ病原因微胞子虫類と同様、剖検により木屑状のシストを確認した後、シストの一部のウェットマウント標本により胞子の形態を検査する (Fig. 3)。胞子の形

Fig. 3. Beko diseases of three other fish species. A: affected red sea bream *Pagrus major*. B: affected spotted halibut *Verasper variegatus* and fresh spores (inset). Arrow shows a cyst of *Microsporidium* sp. SH. Scale bar is 10 μ m. Images are cited from Yokoyama *et al.* (2008). C: affected Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and fresh spores (inset). Arrows show cysts of *Microsporidium* sp. PBT. Scale bar is 10 μ m.

態とサイズは、マダイビホウシチュウは茄子型で長さが2.9~3.9 μm 、幅が1.9~2.6 μm 、ホシガレイビホウシチュウは卵型で長さ2.8~3.8 μm 、幅1.8~2.3 μm 、マグロビホウシチュウは米粒型で長さ2.4~2.9 μm 、幅1.2~1.7 μm と、それぞれ微妙に異なっている (Table 1)。最終的に塗抹標本を作製して、ユビテックス 2B 染色を施し、蛍光顕微鏡 (UV 励起) により蛍光を発するかどうか確認する。

なお、各種を識別する PCR 法は開発されていないが、いずれも 16S rDNA の塩基配列が登録されているので、シーケンスすることにより遺伝的に同定することも可能である。

防除対策

基本的には、ブリのべこ病と同様の対策が有効と思われる。養殖クロマグロでは、経時的にシスト数が減少する傾向も見られており、出荷時にはほぼ完全に消失すると考えられる。将来的には、アルベンダゾールなどの経口投与が現実的であろう。

文 献

- Bell, A. S., H. Yokoyama, T. Aoki, M. Takahashi and K. Maruyama (1999): Single and nested polymerase chain reaction assays for the detection of *Microsporidium seriolae* (Microspora), the causative agent of 'Beko' disease in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Dis. Aquat. Organ.*, **37**, 127–134.
- 江草周三 (1982): ブリ幼魚のべこ病の病原微胞子虫について。魚病研究, **16**, 187–192.
- 江草周三・畑井喜司雄・藤巻由紀夫 (1988): マダイ稚魚べこ病の病原微胞子虫 *Microsporidium* sp. について。魚病研究, **23**, 263–267.
- 加納照正・岡内哲夫・福井晴朗 (1982): ウナギのプリストホラ症に関する研究-II. フマジリンの投薬方法と効果について。魚病研究, **17**, 107–114.
- Kou, G.-H., C.-H. Wang, H.-W. Hung, Y.-S. Jang, C.-M. Chou and C.-F. Lo (1995): A cell line (EP-1 cell line) derived from "Beko disease" affected Japanese eel elver (*Anguilla japonica*) persistently infected with *Pleistophora anguillarum*. *Aquaculture*, **132**, 161–173.
- Nylund, S., A. Nylund, K. Watanabe, C. E. Arnesen and E. Karlsbakk (2010): *Paranucleospora theridion* n. gen., n. sp. (Microsporidia, Enterocytozoonidae) with a life cycle in the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*, Copepoda) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J. Eukaryot. Microbiol.*, **57**, 95–114.
- Sano, M., J. Sato and H. Yokoyama (1998): Occurrence of beko disease caused by *Microsporidium seriolae* (Microspora) in hatchery-reared juvenile yellowtail. *Fish Pathol.*, **33**, 11–16.
- Yokoyama, H., J.-H. Kim, J. Sato, M. Sano and K. Hirano (1996): Fluorochrome Uvitex 2B stain for detection of the microsporidian causing beko disease of yellowtail and gold-striped amberjack juveniles. *Fish Pathol.*, **31**, 99–104.
- Yokoyama, H., F. Yokoyama, J.-Y. Zhang, K. Tsuruoka and K. Ogawa (2008): Microsporidian infection in the trunk muscle of hatchery-bred juvenile spotted halibut *Verasper variegatus*. *Fish Pathol.*, **43**, 137–143.
- Yokoyama, H., D. Ayado, J. Miyahara, K. Matsukura, I. Takami, F. Yokoyama and K. Ogawa (2011): Infection dynamics of *Microsporidium seriolae* (Microspora) causing the beko disease of *Seriola* spp. *Fish Pathol.*, **46**, 51–58.
- 横山 博・長澤和也 (2014): 養殖魚介類の寄生虫の標準と名目録. 生物圏科学, **53**, 73–97.
- Zhang, J., F. Meng, H. Yokoyama, J. Miyahara, I. Takami and K. Ogawa (2010): Myxosporean and microsporidian infections in cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in Japan. *Fish. Sci.*, **76**, 981–990.

付 録

Uvitex 2B 染色のプロトコル

- 1) スタンプまたは塗抹標本をメタノール原液で固定する。
 - 2) リン酸緩衝液に1%の濃度で溶解した Uvitex2B 液を載せ、10分間、染色する。
 - 3) 蒸留水で軽く洗浄後、0.5%エバンスブルー液で30秒間、対照染色する。
 - 4) 洗浄、風乾後、蛍光顕微鏡 (UV 励起) で観察する。
- * 組織切片標本の場合は、通常の H & E 染色の直前に、上記2) の処理を入れる。