



Title	鞭毛虫 <i>Amyloodinium ocellatum</i> の性状解析と薬剤処理による駆除方法の検討
Author(s)	菅, 向志郎; 藤崎, 優太; 峯, 裕也; 峯, 謙二; 高見, 生雄; 阪倉, 良孝; 萩原, 篤志
Citation	長崎大学水産学部研究報告, 91, pp.5-11; 2010
Issue Date	2010-03
URL	http://hdl.handle.net/10069/23781
Right	

This document is downloaded at: 2019-03-25T06:18:26Z

鞭毛虫 *Amyloodinium ocellatum* の性状解析と薬剤処理による駆除方法の検討菅 向志郎*¹, 藤崎 優太*¹, 峯 裕也*², 峯 謙二*², 高見 生雄*³, 阪倉 良孝*¹, 萩原 篤志*⁴Investigation on the biological characters of dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* and the parasiticidal treatment using drugs for *A. ocellatum* cystKoushirou SUGA*¹, Yuta FUJISAKI*¹, Yuya MINE*², Kenji MINE*², Ikuo TAKAMI*³, Yoshitaka SAKAKURA*¹ and Atsushi HAGIWARA*⁴

The dinoflagellate *Amyloodinium ocellatum* is a harmful parasite of cultured marine fishes, causing high mortalities at aquarium and aquaculture facilities. Until now, there is no method for expulsion of parasitic trophonts and effective parasiticidal drugs for *A. ocellatum*. In the present study, the biological characters of *A. ocellatum* cysts at low temperature treatment were investigated. In addition, several parasiticidal treatment using drugs and antibiotics against *A. ocellatum* cysts were tested. The excysting rate of non-division cyst was markedly decreased by preservation at 4°C for 2 weeks. The cell division of cyst was arrested by storage at 10 and 15°C, however, these preserved cysts began dividing when water temperature was elevated to 25°C, resulting in more than 80% of excystation. Both cell division of cysts and excystation of *A. ocellatum* were completely inhibited by lasalocid and alcian blue at final concentrations of 1 mg/L and 30 mg/L, respectively. To investigate parasiticidal effect of lasalocid against *A. ocellatum* that infected tiger puffer, drug bath treatment using lasalocid was tested. All fish in the control (non-treated) died after 7 days, while those treated for 8 h with lasalocid (3 mg/L) survived for 15 days, and no trophonts on the gills were detected.

Key Words : アミルウジニウム *Amyloodinium ocellatum*, 魚病 fish disease, ラサロシド lasalocid, 寄生虫駆除剤 parasiticide

アミルウジニウム症は, *Chromalveolata* 界, *Alveolata* 門, *Dinzoa* 類に分類される渦鞭毛藻類の *Amyloodinium ocellatum* が引き起こす。¹⁾ *A. ocellatum* が魚の皮膚や鱗に寄生する場合, 致命的障害を伴うことはないが, 鰓では寄生虫体数があまり多くないときには上皮細胞の過形成が起こり, 鰓薄板の肥厚, 癒着が各所に見られる。寄生虫体数が著しいときにはその上皮細胞は広範囲に崩壊し, 呼吸障害を起こし致命的となり,²⁾ 発見が遅れると水槽の魚が全滅することもある。³⁾ 本種によるアミルウジニウム症は, これまでに閉鎖循環式の水族館で

多く見られていたことから,⁴⁾ 今後, 循環式陸上養殖の現場でも蔓延する可能性があるため, 駆除や治療法の対策が重要となると考えられる。これまでに, 本種に対する有効な駆除法および治療法は確立されていないが, ポリエーテル系イオノフォアであるラサロシドのナトリウム塩を 3,N-methylglucamine 塩とした 3,N-methylglucamine ラサロシドは, 本種を駆除出来ることが報告されている。⁵⁾ しかし, 3,N-methylglucamine ラサロシドは市販されておらず入手困難であることから, 有効な駆除方法になるとは考えにくい。

*1 長崎大学水産学部

Faculty of Fisheries, Nagasaki University

*2 有限会社 峯養魚場

Mine Fish Farm Limited Company

*3 長崎県総合水産試験場 環境養殖技術開発センター 養殖技術科

Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries

*4 長崎大学大学院生産科学研究科

Graduate School of Science and Technology, Nagasaki University

そこで本研究では, 通年において本症の治療試験等を実施するために必要な *A. ocellatum* の保存法およびラサロシドを含む種々の薬剤に対する *A. ocellatum* の感受性試験を行い, さらに実際に *A. ocellatum* が感染しているトラフグを用いて駆除試験を行った。

【材料と方法】

Amyloodinium ocellatum のシスト採取

(有)峯養魚場より移送した *A. ocellatum* に感染したトラフグ(体長 174mm)を MS-222 で深麻酔により安楽死させた後, 鰓を取り出した。この鰓をピンセットで摘み, 人工海水 (Marin Art Hi, 塩分 34, 富田製薬社製)を入れた直径 85mm 滅菌プラスチックシャーレ中で振揺し, シストを採取した。シストは, 新しい人工海水 (塩分 34) を入れた滅菌プラスチックシャーレに移し, 実験に用いるまで室温で保存した。

Amyloodinium ocellatum の脱シストに要する時間の測定

96 穴マルチウェルプレートの 54 ウェルに滅菌濾過海水(塩分 34)を 200 μ L ずつ入れ, これらにシストを 1 個ずつ収容した。倒立顕微鏡 (Axio Observer, Carl Zeiss 社製)に取り付けたデジタルカメラ (AxioCam, Carl Zeiss 社製)によりシストを検鏡し, 収容したシストの直径を測定した。シストの直径サイズより 30~39, 40~49, 50~59, 60~69, 70~79, 80~82 μ m に区分し, 各々について, 25°C で培養した際の脱シストに要する時間を計測した。シストの直径と脱シストに要する時間との関係を調べるため, 直線式を回帰させた。各区間の脱シスト時間の比較には, 分散分析 (ANOVA) を行い, 分散が等しくないと判定された場合 ($p < 0.05$) には多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行った。

Amyloodinium ocellatum シストの凍結保存の検討

1.5mL 容マイクロチューブに滅菌濾過海水 (塩分 34), DMSO (和光純薬工業社製)を終濃度 7% となるように調整した滅菌濾過海水, グリセリン (関東化学社製)を終濃度 20% となるように調整した滅菌濾過海水を各々 700 μ L 入れ, *A. ocellatum* シストをそれぞれ約 40 個収容した。これらを -80°C で 14 日間保存した後, 室温にて融解した。シストを滅菌濾過海水が入ったガラスシャーレに移し, ゆっくり振盪した。シャーレ内の滅菌濾過海水での振盪操作を 3 回繰り返してシストの洗浄を行った。滅菌濾過海水を 1 mL ずつ入れた 24 穴マルチウェルプレートに, 洗浄したシストを 1 個ずつ収容し, 25°C の恒温器に移した。収容後 7 日間, 脱シストによる仔虫の出現の有無を 1 日 1 回観察した。

Amyloodinium ocellatum シストの低温保存の検討

滅菌濾過海水 (塩分 34) を 1 mL ずつ入れた 48 穴マルチウェルプレートに未分裂のシストおよび 2, 4, 8 分裂したシストを 1 個ずつ入れたプレートをそれぞれ 3 枚作成した。これらシストの分裂状態が異なるプレートを 1 枚ずつ 4, 10, 15°C の恒温器 (全暗) に収容した。4 段階の分裂期と 3 段階

の温度処理の計 12 通りの組み合わせで調整したこれらのプレートを 14 日間静置した後, 25°C 全暗の恒温器で 5 日間培養し, 脱シストの有無を調べた。以上の操作を 3 回繰り返した。各実験区の脱シスト率の比較には, 分散分析 (ANOVA) を行い, 分散が等しくないと判定された場合 ($p < 0.05$) は多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行った。

4°C の保存期間が *Amyloodinium ocellatum* シストの脱シストに与える影響

滅菌濾過海水 (塩分 34) が入ったシャーレ 33 個に, シストを 10 個ずつ収容し, 4°C の冷蔵庫に静置した。次に, 2, 4, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15 日後にそれぞれ 25°C の恒温器に移した。その後, 1 日 1 回の観察を 5 日間行い, 脱シストの有無を調べた。以上の操作を 3 回繰り返した。各実験区の脱シスト率の比較には, 分散分析 (ANOVA) を行い, 分散が等しくないと判定された場合 ($p < 0.05$) は多重比較検定 (Tukey-Kramer test) を行った。

薬剤および抗生物質が *Amyloodinium ocellatum* の脱シストに与える影響

ポリエーテル系イオノフォアであるラサロシドを 15% 含有する家畜飼料添加物アバテック 150 (以下ラサロシドと略す, ラサロシドの終濃度 0.3, 0.5, 1, 2, 3mg/L, 科研製薬社製), フタロシアニン系色素であるアルシアンブルー (終濃度 0.03, 0.3, 3, 30mg/L) を濾過滅菌海水 (塩分 34) にて調整した。これらの溶液と対照区として濾過滅菌海水をそれぞれ 200 μ L ずつ 96 穴マルチウェルプレートの 10 ウェルに加えた。各ウェルにシストを 1 個ずつ収容し, 25°C で 3 日間培養した。

また, 抗生物質であるテトラサイクリン (終濃度 24mg/L, ナカライテスク社製), クロラムフェニコール (終濃度 20mg/L, ナカライテスク社製), ニフルスチレン酸 (終濃度 50mg/L, 上野製薬社製), ストレプトマイシン (終濃度 50mg/L, ナカライテスク社製), カナマイシン (終濃度 30mg/L, ナカライテスク社製), ナリジクス酸ナトリウム (60mg/L, シグマ-アルドリッチ社製) の計 6 種類の溶液を濾過滅菌海水にて調整した。これらも上記薬剤と同様にそれぞれ 200 μ L ずつ 96 穴マルチウェルプレートの 10 ウェルに加え, 各ウェルにシストを 1 個ずつ収容し, 25°C で 5 日間培養した。

薬剤および抗生物質の各実験区の培養終了時に検鏡し, 1 個体以上の仔虫が確認された場合, 脱シストと見なし, 脱シスト率を算出した。これらのすべての試験は 3 回繰り返した。対照区に対する各実験区の脱シスト率の比較には, 分散分析 (ANOVA) を行い, 分散が等しくないと判定された場合 ($p < 0.05$) には多重比較検定 (Dunnett test) を行った。

Amyloodinium ocellatum 感染トラフグのラサロシド薬浴効果の検討

供試魚として (有) 峯養魚場より移送した *A. ocellatum* に感染したトラフグ (体長 11.43 ± 0.86 cm) 20 尾を, ラサロシド

を終濃度 3 mg/L となるように添加した 200L の人工海水(塩分 34)を入れた 200L 容ポリカーボネート製水槽に収容した。収容後, 2, 4, 8, 12, 24 時間後に 4 尾(薬浴 8 時間後のみ 3 尾)ずつ取り出して, 各々を新鮮な 30L の人工海水(塩分 34)を入れた 30L 容ポリカーボネート製水槽に移槽した。対照として, *A. ocellatum* に感染したトラフグ 4 尾を新鮮な 30L の人工海水を入れた 30L 容ポリカーボネート製水槽に収容し, 未処理区とした。観察は 15 日間, 1 日 1 回行い, 魚の死亡の有無を観察した。飼育期間中は無換水, 無給餌とした。すべての水槽の水温は 25°C に調整して飼育した。15 日間の培養後, 生存したトラフグは MS-222 で深麻酔により安楽死させた後, 鰓を取り出して *A. ocellatum* シストの有無を検鏡した。対照区に対する各実験区について実験終了時の生残率の比較には, Fisher の直接確率法 (Fisher's exact probability test) を用いた。また, 飼育 6 日目から 1 日 1 回各実験区の海水を約 100mL 採水し, よく攪拌した後, ガラスシャーレに入れ海中の仔虫の数を計数した。ただし, 対照区では 7 日目に全個体死亡したため, 11 日目から計数を中止した。

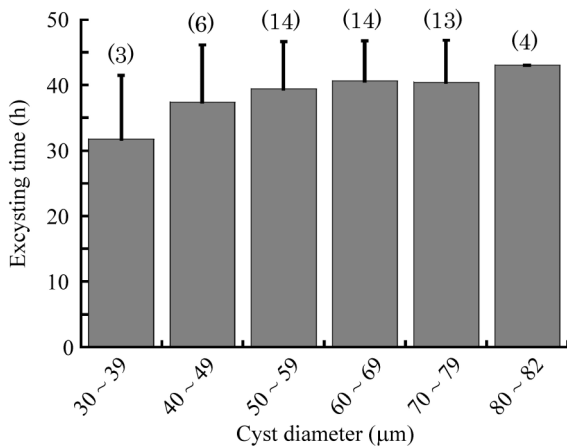


Fig. 1 Relationship between cyst size and excysting rate *A. ocellatum*. Bars indicate standard deviation. Each column and the numbers, shown on the column, indicate average of excysting rate and sample numbers, respectively.

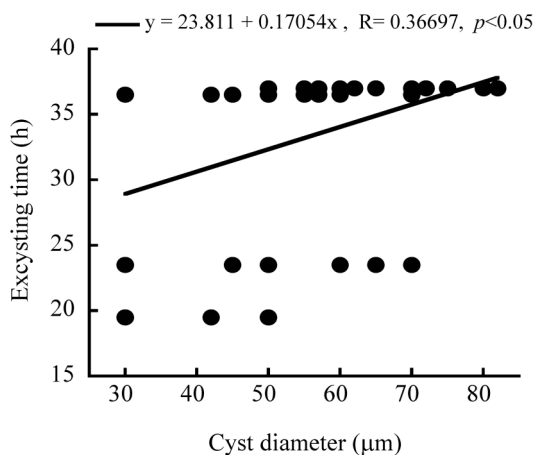


Fig. 2 Relationship between cyst size and excysting rate (n = 45).

【結果】

Amyloodinium ocellatum の脱シストに要する時間

各区間の脱シストまでの時間は 30~39 μm で 31.7±9.8 時間 (n=3), 40~49 μm で 37.3±8.8 時間 (n=6), 50~59 μm で 39.6±7.2 時間 (n=14), 60~69 μm で 40.6±6.2 時間 (n=14), 70~79 μm で 40.4±6.4 時間 (n=13), 80~82 μm で 43 時間 (n=4) となった (Fig.1)。各区間で脱シストまでの時間に差は見られなかったが, シストの直径と脱シストまでの時間との間には, 低いながらも正の相関が見られた (Fig.2; n=54, r=0.367, p<0.05)。

Amyloodinium ocellatum シストの凍結保存

凍結補助剤として用いられる DMSO およびグリセリンで処理しても, -80°C で凍結融解後, シストの分裂および脱シストは確認できなかった。

Amyloodinium ocellatum シストの低温保存

シストの分裂期毎に, 低温処理が与える影響を検討した結果, 未分裂時の低温処理については 10°C (63.3±30.5%) と 15°C (80%) より 4°C (16.7±5.8%) が有意に低かった (ANOVA, df=2, F=10.034, p=0.012; Tukey-Kramer test, p<0.05)。2 分裂時でも 10°C (100%) と 15°C (100%) より 4°C 処理 (63.3±20.8%) が有意に低かった (ANOVA, df=2, F=9.308, p=0.015; Tukey-Kramer test, p<0.05)。さらに, 4 分裂時でも, 10°C (96.7±5.8%) と 15°C (90%) より 4°C 処

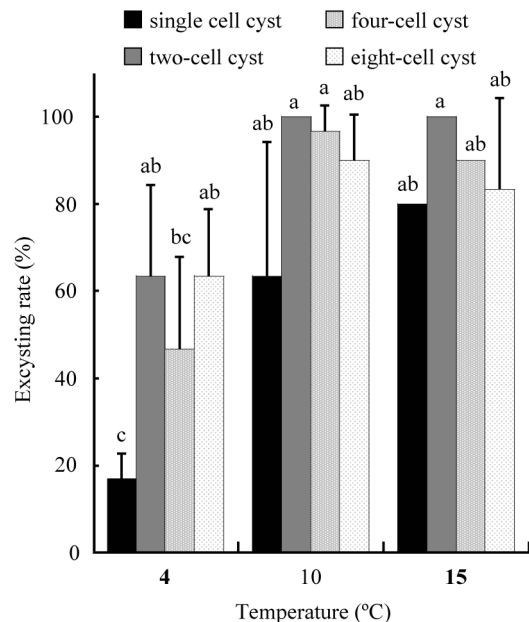


Fig. 3 Number of cell division and excysting rate of *A. ocellatum* at different temperature. Each column and bar indicates average and standard deviation, respectively. Different alphabet letters, show the upper column, indicate significant differences among conditions (a>b>c, Tukey-Kramer test, p<0.05, n=3).

理 ($46.7 \pm 20.8\%$) が有意に低かった (ANOVA, $df=2$, $F=14.214$, $p<0.01$; Tukey-Kramer test, $p<0.05$)。しかし, 8 分裂状態では温度処理が脱シスト率に与える影響は検出されなかった (Fig.3)。処理温度別に比較した場合, 4°C 処理では未分裂のシスト ($16.6 \pm 5.7\%$) が 2 分裂 ($63.3 \pm 20.8\%$) と 8 分裂 ($63.3 \pm 15.3\%$) のシストより脱シスト率が有意に低くなることが分かった (ANOVA, $df=3$, $F=5.127$, $p<0.01$; Tukey-Kramer test, $p<0.05$)。しかし, 10, 15°C 処理の脱シスト率については各分裂期の間で差は見られなかった (Fig.3)。

4°C の保存期間が *Amyloodinium ocellatum* シストの脱シストに与える影響

低温 (4°C) 処理後 2 日目の脱シスト率 ($80 \pm 17.3\%$) に比べて処理後 10 日目以降の脱シスト率 ($3.3 \pm 5.8 \sim 23.3 \pm 5.8\%$) は有意に低くなった (ANOVA, $df=10$, $F=8.308$, $p<0.0001$; Tukey-Kramer test, $p<0.05$)。脱シスト率は, 15 日目で最も低い値 ($3.3 \pm 5.8\%$) となった (Fig.4)。

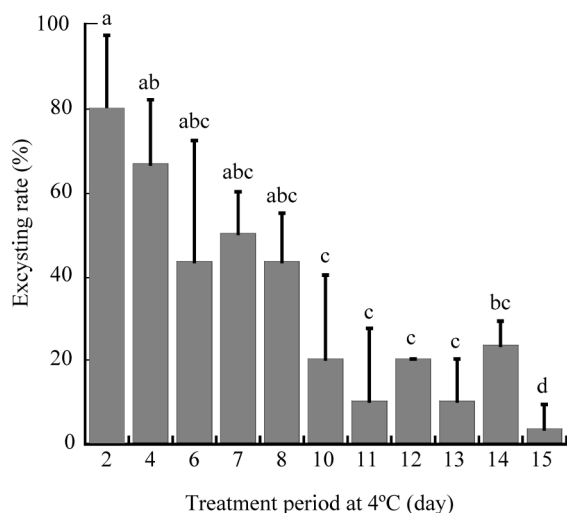


Fig. 4 Excysting rate of *A. ocellatum* at 4°C . Each column and bar indicates average and standard deviation, respectively. Different alphabet letters, show the upper column, indicate significant differences among conditions ($a>b>c>d$, Tukey-Kramer test, $p<0.05$, $n=3$)

薬剤および抗生物質が *Amyloodinium ocellatum* の脱シストに与える影響

ラサロシド 0.5mg/L 区の脱シスト率は $73.3 \pm 25.1\%$ となり, 対照区に対して有意に低かった (ANOVA, $df=6$, $F=73.895$, $p<0.0001$; Dunnett test, $p<0.05$)。ラサロシド 1, 2, 3mg/L 区はシストの分裂は確認できたが, 培養 3 日間で脱シスト率は 0.0% であった。アルシアンブルーの処理では, 30mg/L 区でシストの分裂は確認できたが, 培養 3 日間で脱シスト率は 0.0% であった。他のアルシアンブルー 3 区 ($0.03, 0.3, 3\text{mg/L}$) の脱シスト率は 100.0% であった (Fig.5)。また, 抗生物質を用いた全実験区で脱シストが見られたが, ナリジクス酸ナト

リウム区では 5 日目の脱シスト率が $96.6 \pm 5.7\%$ となり, ニフルスチレン酸区では 5 日目の脱シスト率が 90.0% となった (Fig.5)。対照区と比較すると, ニフルスチレン酸区の脱シスト率は有意に低かった (Fig.6; ANOVA, $df=6$, $F=9.000$, $p=0.0004$; Dunnett test, $p<0.05$)。

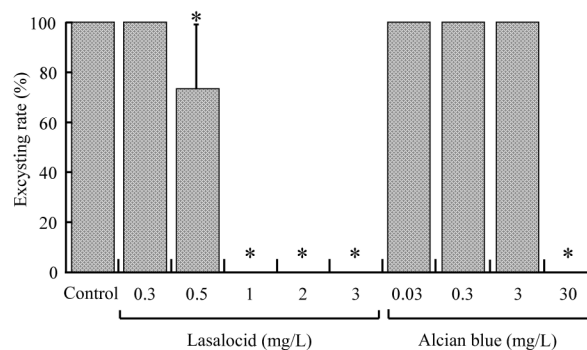


Fig. 5 Excysting rate of *A. ocellatum* cyst treated with different concentration of lasalocid and alcian blue. Each column and bar indicates average and standard deviation, respectively. Asterisks indicate statistically significant differences from control (Dunnett test, $p<0.05$, $n=3$).

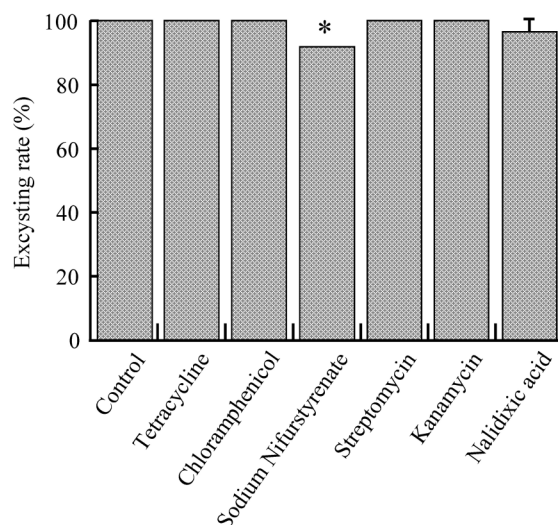


Fig. 6 Excysting rate of *A. ocellatum* cyst treated with different antibiotics. Each column and bar indicates average and standard deviation, respectively. Asterisk indicates statistically significant differences from control (Dunnett test, $p<0.05$, $n=3$).

Amyloodinium ocellatum 感染トラフグのラサロシド薬浴効果

対照区では 7 日目で全個体が死亡し, 2 時間薬浴では 13 日目, 4 時間薬浴では 15 日目に全個体が死亡した。8 時間薬浴では, 実験最終日の生残率が 100% となり, 対照区に比べて有意に高かった ($n=1$, Fisher's exact probability test, $p<0.05$)。12 時間薬浴では薬浴終了の時点で 4 尾とも弱っており, 移槽後 24 時間以内に 75% が死亡したが, 残りの 1 尾

は最終日まで生き残った。24 時間薬浴を行うと移槽前に全個体が死亡した (Fig.7)。8 および 12 時間薬浴にて最後まで生存した個体のトラフグの鰓を検鏡した結果、シストは全く検出されなかった。

海水中の仔虫の数は未処理、2 時間薬浴と 4 時間薬浴で増加傾向にあったが、8 時間薬浴と 12 時間薬浴では他に実験区に比べて増加することはなかった (Fig.8)。

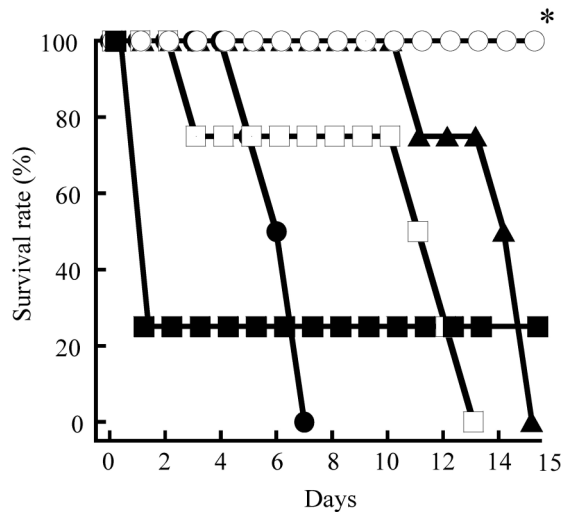


Fig. 7 Survival rate of infected tiger puffer after lasalocid treatment. Black circle, non-treated (control). White square, black triangle, white circle and black square indicate 2, 4, 8 and 12 h drug baths treatment period, respectively. Asterisk indicates statistically significant differences from control (Fisher's exact probability test, $p < 0.05$).

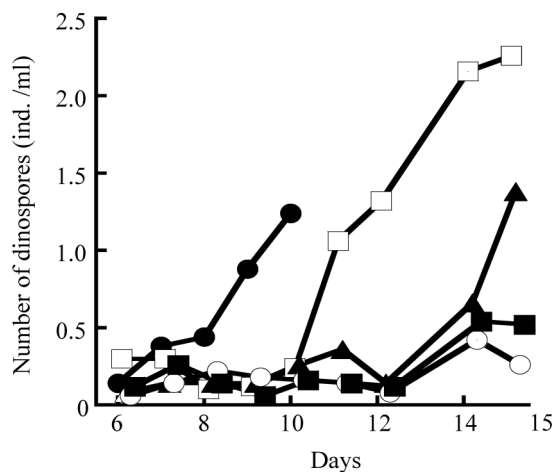


Fig. 8 Number of dinospores during culture period. Black circle, the number of Dinospores (ind./ml) on non-treatment culture tank (control). White square, black triangle, white circle and black square indicate the number of dinospores (ind./ml) on culture tanks of 2, 4, 8 and 12 h drug baths treated tiger puffer, respectively.

【考 察】

アミルウージニウムによる魚病は水族館飼育の海水魚の寄生虫病として古くから知られている。⁴⁾アミルウージニウムの生活史は、魚に寄生する栄養体、魚から離れて分裂増殖するシスト、シストから遊出した魚への寄生期である仔虫の3つからなる。^{2, 6, 7)}栄養体は寄生により十分に成長した後、宿主から離脱してシストとなる。また、魚体より取り出した鰓を海水中で振揺することで、栄養体は容易に離脱することから、栄養体が十分に成長する前にも物理的な刺激により離脱してシストになることも報告されている。⁸⁾さらに、様々な大きさの栄養体からシストが生じること、1つのシストより最大で256個の仔虫が産生されるなど、²⁾シストの形成に関して多くの知見がある。しかし、大きさの異なるシストの脱シストが何によって誘導されているか明らかにされていない。そこで、トラフグの鰓に感染しているシストを物理的に振り落とし、離脱したシストの大きさと脱シストまでの時間の関係を調べた。その結果、シストの直径、シストの分裂回数、仔虫が出現するまでの時間は正比例することが明らかになった。このことより、脱シストの引き金は、栄養体が宿主から離脱した後、シストがある一定の大きさまで分裂することが要因となり、脱シストが誘導されることを示唆している。

A. ocellatum 感染による魚病の発生は、初夏から秋の水温が高い時期だけであり、低水温時 (15~16°C) では終息することが報告されている。^{9, 10, 13)}よって、年間を通じて治療と駆除の試験研究を実施するために、*A. ocellatum* を確保することは困難である。横山と高見⁷⁾は、この問題を解決するために感染魚からの仔虫採取法、および病魚との同居による感染法を見出し、水温を維持して感染魚を持続的に維持する方法を確立している。しかし、この方法では他の病原生物が混入する可能性があることから、シストを長期間保存する技法の確立が重要である。シストの保存方法について検討した結果、通常用いられる凍結防御剤を用いて-80°Cで保存する方法では、シストは分裂能、脱シスト能ともに失うことが分かった。また、低温処理 (4, 10, 15°C) では未分裂シストより分裂したシストの方が脱シスト能を失わず、温度も4°Cより10, 15°Cで高い脱シスト能を維持することを見出した。また、4°Cで未分裂のシストを処理すると日毎に脱シスト能が低下した。このことより、本種のシストは少なくとも2分裂した状態で、分裂能が低下する低温 (15°C) で保持することで脱シスト能を失わない可能性がある。本実験に用いた *A. ocellatum* 株は、冬季の海水温が14~20°Cである¹¹⁾長崎沿岸海域 (諫早市飯盛町) で生息していると考えられる。冬季の海水温ではシストは分裂出来ないこと、毎年初夏から秋にかけて病魚が発生していることから、シストの状態脱シスト能を維持したまま底泥で休眠していることが示唆される。脱シスト能を維持出来る温度とこの天然海域の冬季の水温は一致していることから、本種シストは15°Cで保持することで脱シスト能を維持したまま長期間保存可能であると推察される。今後、この温度での長期保存試験を検討する必要がある。

本種は増殖するために宿主を必要とし、仔虫のままで増殖

することは出来ない。アミルウージニウム症の発生を抑えるには、寄生・栄養体の成長・シストの分裂・脱シストからなる *A. ocellatum* の生活史のうち少なくともどこか1カ所を阻害することが重要である。そこで、シストが分裂を繰り返したのち脱シストをすることに注目し、本種の駆除法を検討した。温度による処理では、4°C環境下で脱シスト率が3.3%まで下がることが分かったが、脱シスト率を下げるためには10日以上静置する必要がある (Fig.5)、低温処理は現実の駆除法として不適である。シストを薬剤処理した場合、ラサロシドとアルシアンブルーが脱シストを強く抑制することが分かった。さらに有効な処理濃度を詳細に検討した結果、ラサロシドでは1 mg/L以上、アルシアンブルーでは30mg/Lでそれぞれ脱シストを防除できることが分かった。しかし、高濃度のアルシアンブルー (30mg/L) では魚類への毒性も強いと推察されるため、養殖現場で使用することは困難である。本試験で用いたラサロシドナトリウム塩は難水溶性化合物であり、水生生物への使用には適していない。そこで、本化合物を3,N-methylglucamine 塩とすることで水溶性とし、*A. ocellatum* を駆除するのに有効な薬剤となることが報告されている。⁵⁾本実験に用いたラサロシドは難溶性のまま用いたが、水溶性の3,N-methylglucamine ラサロシドと同様の抗 *A. ocellatum* 作用を示したことから、特殊な塩化合物としなくても水生生物に使用できることが明らかになった。

抗生物質は原核生物である細菌類に対して殺菌および静菌的な作用を有しており、通常、細菌類に使用する。しかし、真核生物でも細胞内のミトコンドリアの代謝系は原核生物に近いので、抗生物質によりミトコンドリアの代謝系が阻害されることがある。¹²⁾そこで、タンパク質や核酸の合成を阻害する抗生物質がシストの分裂を阻害する可能性があるため、タンパク質合成阻害作用を有する抗生物質であるテトラサイクリン、クロラムフェニコール、ニフルスチレン酸、ストレプトマイシン、およびカナマイシン、¹³⁾核酸合成阻害作用を有するナリジクス酸ナトリウム¹³⁾の脱シスト作用について検討を行った。その結果、ニフルスチレン酸だけが弱いながらも脱シスト作用を有していたが、アミルウージニウム症の対策としては有効性に欠ける結果であった。

本研究で用いた薬剤と抗生物質のなかで、ラサロシドのみが低濃度で脱シスト阻害作用を有していた。ラサロシドは脂肪障壁を介して陽イオンを輸送する性質を有するイオン透過担体抗生物質の一種で、生物の陽イオンの伝達を障害させることにより細胞を破壊する作用を有する。¹⁴⁾よって、本薬剤は全ての生物の細胞が標的となる。薬剤による駆除を行う場合、宿主と寄生生物の感受性を示す薬剤有効濃度差が大きいほど、使用が容易である。そこで病魚を用いた薬浴による駆除効果とトラフグへの影響を検討した。その結果、ラサロシド3mg/Lによる8時間の薬浴により、鰓からの栄養体の駆除が可能であり、さらにシストの脱シスト能を失わせ二次感染を防げることが分かった。しかし、8時間より短い時間では鰓からの駆除が不十分、もしくは水槽内の仔虫数が増加していることから、脱シスト阻害も十分でなく二次感染によりトラフグが死亡した。また8時間より長い薬浴では宿主に対

するラサロシドの毒性が強くなり、短時間でトラフグが死亡した。今後、宿主に対する毒性を低減させ、かつ、寄生している *A. ocellatum* の脱シスト能を失わせるラサロシドの濃度と薬浴時間を検討する必要がある。

本研究で、シストの脱シストまでの時間、通年の治療試験等を実施するためのシストの長期保存方法の基礎的知見が得られた。また、これまでアミルウージニウム症の治療法は全くなかったが、ラサロシドを用いた薬浴が非常に効果的であることを明らかにした。今後、さらにラサロシドの使用濃度や処理時間を検討することでアミルウージニウム症に対する治療法を確立できると思われる。

謝 辞

本研究で使用した、家畜飼料添加物アバテック 150 (ラサロシド15%含有製剤)を提供いただいた科研製薬株式会社に感謝を申し上げます。本研究の一部は、文部科学省科学技術振興調整費〈地域再生人材創出拠点の形成〉「海洋サイバネティクスと長崎県の水産再生」プログラムにより実施したものであり、記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 良永知義, 横山 博 (2008): 原虫病, 小川和夫, 室賀清邦編, 改訂・魚病学概論, 92-101 頁, 東京, 恒星社厚生閣.
- 2) 江草周三 (1988): 海産魚のウージニウム症, 江草周三編, 改訂増補 魚病学 感染症・寄生虫症篇, 223-225 頁, 東京, 恒星社厚生閣.
- 3) 小川和夫 (2004): その他の鞭毛虫病, 若林久嗣, 室賀清邦編, 魚介類の感染症・寄生虫病, 292-295 頁, 東京, 恒星社厚生閣.
- 4) 粟倉輝彦: 熱帯性海水魚の鰓病について, 動物園水族館雑誌, II. 3-5 (1960).
- 5) Oestmann, D.J & D. H. Lewis: Effects of 3,N-methylglucamine lasalocid on *Amyloodinium ocellatum*. *Dis. Aquat. Organ.*, 24. 179-184 (1996).
- 6) Noga, E.J. & M.G. Lev (1995): Dinoflagellida (Phylum Sarcocystidophora), P.T.K. Woo (ed), Fish diseases and disorders. Vol. 1. Protozoan and metazoan infections, 1-25, CAB International, Wallingford.
- 7) Bower, C.E., D.T. Turner & R.C. Biever: A standardized method of propagating the marine fish parasite, *Amyloodinium ocellatum*. *J. Parasit.*, 73, 85-88 (1987).
- 8) 横山文彦, 高見生雄: *Amyloodinium ocellatum* の感染方法及び寄生状況の評価について. 長崎県水産試験場研究報告, 32, 13-16 (2006).
- 9) 畑井喜司雄 (2006): アミルウージニウム症, 畑井喜司雄, 小川和夫編, 新魚病図鑑, 223 頁, 東京, 緑書房.
- 10) 志水建美, 伊勢田弘志: アユ仔魚の寄生したウージニウムとその駆除について. 熊本県水産試験場研究報告, 5,

- 19-23 (1988).
- 11) 長崎海洋気象台ホームページ：九州・沖縄海域月平均海面水温. 2009 ; http://www.data.kishou.go.jp/kaiyou/db/nagasaki/monthly/sst_n1.html
- 12) Attardi, G. & G. Schatz : BIOGENESIS OF MITOCHONDRIA. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4. 289-333 (1988).
- 13) Raleigh, E. A., K. Elbing & R. Brent (2002) : Selected topics from classical bacterial genetics. In Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Sediman, J. A. Smith & K. Struhl (eds), *Current Protocol In Molecular Biology*. Chapter 1, Unit 1.4, Wiley, New York, NY.
- 14) Entman, M.L., T.R. Snow, D. Freed, A. Schwartz : Analysis of calcium binding and release by canine cardiac relaxing system (sarcoplasmic reticulum). The use of specific inhibitors to construct a two component model for calcium binding and transport. *J. Biol. Chem.*, 248, 7762-7772 (1973).