

クロマグロに寄生する *Cardicola* 属住血吸虫 2 種の
養殖場における感染動態に関する研究

2016 年 12 月

長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科

杉原 志貴

目次

第一章 緒論	1
第一節 クロマグロ養殖の現状	1
第二節 養殖クロマグロの斃死要因	3
第三節 クロマグロ住血吸虫	4
第四節 本研究の目的	6
第二章 中間宿主の解明	19
第三章 養殖場における中間宿主 <i>Terebella</i> sp. と <i>C. opisthorchis</i> 幼生の出現状況	32
第一節 養殖生簀ろ布付着物内における中間宿主 <i>Terebella</i> sp. および <i>C. opisthorchis</i> 幼生の周年の出現状況	32
第二節 高水温期の養殖生簀ろ網底付着物内における中間宿主 <i>Terebella</i> sp. および <i>C. opisthorchis</i> 幼生の検出	38
第四章 中間宿主 <i>Terebella</i> sp. 体内における <i>C. opisthorchis</i> 幼生の増殖動態	41
第一節 スポロシストを産生するスポロシスト	41
第二節 中間宿主 <i>Terebella</i> sp. に移植した <i>C. opisthorchis</i> スポロシスト の増殖動態	51
第五章 クロマグロ養殖場への侵入経路の解明	61
第六章 長崎県の養殖場におけるクロマグロ住血吸虫 2 種の出現状況および 寄生動態	68
第七章 総合考察	83
謝辞	91
引用文献	92

第一章 緒論

第一節 クロマグロ養殖の現状

日本人にとってマグロは最高級食材であり、水産資源上最も重要な魚類の一つである。マグロ類の中でもクロマグロは最も大型で、味が良いことから最高級魚に位置づけられており、商品価値が極めて高い。家計調査年報(2011～2015年平均)によると、1世帯当たりの年間のマグロ購入額は4,315円で、生鮮魚介類への支出の約12%を占め、魚種別では2位のサケ(3,325円)、3位のブリ(2,623円)を抑えて第1位である。日本人のマグロ食の歴史は古く、縄文時代前期の福井県鳥浜貝塚や青森県三内丸山遺跡からマグロの骨が出土しており、少なくとも5,000年以上の歴史があると考えられる(浜口, 2011)。一方、クロマグロ養殖の歴史は47年程と浅く、その技術は発展途上にある。

日本におけるクロマグロ養殖の取り組みは、1970年の水産庁による「有用魚類大規模養殖実験事業」のプロジェクト研究「マグロ類養殖技術開発試験」によって始まった。このプロジェクトには近畿大学、東海大学、静岡県水産試験場、三重県水産試験場、長崎県水産試験場、高知県水産試験場(1971年から)および鹿児島県水産試験場(1974年から)が参画し、天然種苗(ヨコワ)からの養殖技術の開発と、人工孵化および飼育技術の開発研究が行われた。近畿大学はプロジェクト終了後も研究を続け、1979年に育成親魚の自然産卵から孵化した仔魚を47日目まで飼育することに成功し(宮下, 2002)、2002年には卵から育成した親魚からの採卵、いわゆる「完全養殖」に成功するに至った(Sawada et al., 2005)。

長崎県におけるクロマグロ養殖は、水産庁による前述プロジェクトより1年前の1969年に長崎県水産試験場が対馬で太平洋クロマグロ(*Thunnus*

orientalis)の幼魚(ヨコワ)を採捕して試験的に飼育したことから始まった。その後、1992年に県によって「クロマグロ養殖技術開発検討会」が設置され、1994年から2000年にかけて対馬と五島海域でヨコワ採捕・運搬・養殖の技術開発試験が実施された。それらの試験結果が「マグロ養殖マニュアル」として2000年にまとめられたことにより本格的な養殖が開始された。マニュアルが作成されて3年後の2003年には19経営体がクロマグロ養殖に従事し、生産量260トン、生産額6億円となった(藤井, 2015)(Fig. 1-1)。現在は62漁場で43業者がクロマグロ養殖を営んでおり、生産量は4,000トン以上、生産額は120億円前後となり、2014年に鹿児島県を抜いて全国1位のクロマグロ養殖生産県となった(Fig. 1-1, 1-2)。

クロマグロ養殖の主要な産地は、先述した長崎県をはじめ、鹿児島県、高知県、三重県、和歌山県など比較的温暖な地域である。2010年以前の全国的なクロマグロ養殖生産量は公表されていないが、水産庁が公表を開始した2011年以降の全国生産量は、1万~1.5万トン弱を推移しており(Fig. 1-2)、2014年の生産額は420億円で、海面魚類養殖ではブリ類(1,193億円)、マダイ(439億円)に次いで第3位の主要な養殖魚種となっている。

現在のクロマグロ養殖は、一般に夏から秋頃にかけて海面養殖生簀に種苗を導入するところから始まる。養殖種苗には天然種苗と人工種苗がある。天然種苗としては、曳縄により採捕された100g~1kg程度の当歳魚(ヨコワ)と巻網により採捕された2~5kg程の1歳魚が主に使用される。一方、人工種苗の場合は、クロマグロ養殖生簀内において自然産卵された受精卵を回収し、陸上施設で孵化後、約1ヶ月間飼育管理し、5~7cm程度に成長した種苗を海面の養殖生簀に沖出しして養殖を開始する。クロマグロ養殖が始まってから現在に至るまで養殖用種苗には専ら天然種苗が使用されてきた。しかしながら、近年、人工種苗生産技術の向上によりその活け込み尾数は統計上

天然種苗と同程度にまで増加している (Fig. 1-3)。ただ、人工種苗は海面生簀に活け込み後、天然種苗と同程度のヨコワサイズに成長するまでの間に大量に減耗する。その生残率は 0~40%程度と言われており、出荷魚の中で人工種苗から育てられたものの占める割合も 1 割未満 (Fig. 1-4) であることから、人工種苗がクロマグロ養殖の主流になるにはまだ課題が多い。餌料は、サバ、アジ、イカナゴ等の生餌が主体であるが、近年は配合飼料も開発されている。種苗を導入して 2 年半~5 年程で 30~70 kg に成長し、出荷サイズとなる。クロマグロは、他の主要養殖魚種であるブリやマダイ等と比べても成長が速く、単価が高いことから、重要な養殖魚種として今後も発展が期待されている。

第二節 養殖クロマグロの斃死要因

種苗生産施設におけるクロマグロ人工種苗では、仔魚期の浮上死や沈降死、共食いによる減耗のほか、沖出し間近の体長 5~6 cm になる稚魚の水槽壁面への衝突死がしばしば発生する。海面生簀への沖出し後には、輸送ストレスによる減耗や異物誤飲のほか、光や音に驚いたり、生簀内に侵入した小魚を追いかけて生簀網に衝突して死亡することが多い。沖出ししてしばらく経つと住血吸虫が生息している養殖場ではクロマグロ住血吸虫症が発生し出す。養殖期には、他に、レンサ球菌症、ノカルジア症、パスツレラ症、マダイイリドウイルス病等に罹病することがある。大型になると疾病による斃死は激減するが、赤潮には弱く、斃死が発生する有害プランクトンの量はブリ等の 1/10 程度と言われている (山砥・石田, 2016)。その他、斃死に直接関わるかはまだ不明な点が多いが、養殖クロマグロからは多種の寄生虫 *Didymocystis wedli*, *D. semiglobularis*, *D. soleiformis*, *Kollikeria reniformis*, *Coeliotrema thynni*, *Wedlia orientalis* (桃山・小林, 2004), *Caligus*

macarovi (Nagasawa, 2011) , *Brachiella thynni* (Nagasawa, 2015) , *Kudoa hexapunctata* (Yokoyama et al., 2014) , *K. prunusi* (Meng et al., 2011) , *K. yasunagai*, *K. shiomitsui*, *Microsporidium* sp. PBT (Zhang et al., 2010) , *Hirudinella* sp. (長澤, 2015) が確認されている。

第三節 クロマグロ住血吸虫

住血吸虫は、扁形動物門の吸虫綱 (Trematoda)、二生亜綱 (Digenea)、有膜吸虫目 (Strigeidida) の住血吸虫上科 (Schistosomatoidea) に属す寄生虫で、寄生する宿主群の違いにより 3 科 (Schistosomatidae (哺乳類, 鳥類, ワニ類), Aporocotylidae (魚類), Spirorchidae (カメ類)) に分かれ、魚類に寄生する住血吸虫は淡水魚, 海水魚を問わず魚類住血吸虫科 (Aporocotylidae) に属す。

住血吸虫類の生活環では、終宿主である脊椎動物以外に無脊椎動物の中間宿主を利用することが知られている。宿主特異性が比較的高く、特定の宿主に寄生する。終宿主の体内で孵化したミラシジウム幼生は水中に遊出して中間宿主に侵入し、スポロシストまたはレジアと呼ばれる袋状の幼生となり、その内部に多数のセルカリア幼生を産出する。セルカリアは水中に遊出して終宿主に侵入し、その血管系で成熟し産卵する。多くの吸虫類が 2 段階の中間宿主を利用するのに対し、住血吸虫類は中間宿主が 1 段階しか存在しない (小川, 2005)。

魚類に寄生する住血吸虫は、日本の海産養殖魚から多くの種類が見つまっている。カンパチに寄生する *Paradeontacylix grandispinus* および *P. kampachi* (Ogawa & Egusa, 1986), ブリに寄生する *P. buri* (Ogawa et al., 2015), ヒラマサに寄生する *Paradeontacylix* sp. (Ogawa et al., 2015), トラフグに寄生する *Psettarium* sp. TPJ (Ogawa et al., 2007), クロマグロに

寄生する *Cardicola orientalis* (Ogawa et al., 2010) および *C. opisthorchis* (Ogawa et al., 2011) のほか、ヒラマサ、マダイ、サワラ、カワハギ等で未同定の住血吸虫が確認されている。1984年に海産養殖魚で初めてカンパチより *Paradeontacylix* が検出された際に、「カンパチの住血吸虫症」では人間に寄生する住血吸虫を連想し風評被害につながる懸念から「カンパチの血管内吸虫症」という病名がつけられた(小川, 2005)。「血管内吸虫症」という病名は、日本魚病学会が制定している「選定された魚病名」にも1996年版から記載されており、以降、魚類に寄生する住血吸虫による疾病は血管内吸虫症と呼ばれ、魚病関係者や養殖業者の間に広く浸透した。しかし近年、分類学上の位置付けを明確にするために呼称の改訂が行われ、2010年版「選定された魚病名」から「魚類住血吸虫症」という病名に変更され、今日に至る。

日本の養殖クロマグロでは、先述した *C. orientalis* と *C. opisthorchis* の2種が知られていたが、近年、オーストラリアのミナミマグロ等から見つかった *C. forsteri* が日本の養殖クロマグロに寄生している事例が新たに報告された(Shirakashi et al., 2016)。これらクロマグロに寄生する *Cardicola* 属の住血吸虫(以下クロマグロ住血吸虫)は日本以外のクロマグロ類においても寄生が確認されており、オーストラリアのミナミマグロ (*Thunnus maccoyii*) からは *C. forsteri* と *C. orientalis* の2種(Shirakashi et al., 2013)、地中海の大西洋クロマグロ (*Thunnus thynnus*) からは、前記3種の *Cardicola* に加え、新たな種 (*Cardicola* sp.) の虫卵が見つまっている(Palacios-Abella et al., 2015; Forte-Gil et al., 2016)。日本では *Cardicola* 属の住血吸虫はクロマグロからしか見つかっていないことから、横山・長澤(2014)により *C. orientalis* は「クロマグロジュウケツキュウチュウ」、*C. opisthorchis* は「ホソナガクロマグロジュウケツキュウチュウ」という標準和名が提案されている。一方、海外では *Cardicola* 属住血吸虫はクロマグロ

類以外の海産魚からも多数見つかっており、現在までに 28 種が報告されている (Table 1-1)。

魚類住血吸虫は、これまで養殖カンパチ、ブリ、ヒラマサ、トラフグ等でしばしば大量死を引き起こし、大きな被害をもたらしてきた。本章第二節で少し触れたように養殖クロマグロにおいても、住血吸虫が心臓や鰓血管に寄生し、産出された虫卵が鰓の血管を閉塞して血行障害を引き起こし、重篤な場合には死に至らしめる。*C. opisthorchis* は細長い形をした成虫がクロマグロの心臓に寄生し、産出された三日月型の虫卵が鰓の小入鰓動脈に詰まって血行障害を引き起こす (Fig. 1-5)。*C. orientalis* は笹の葉形の成虫が鰓の動脈や心臓に寄生し、産出された楕円形の虫卵が鰓の鰓薄板に詰まる (Fig. 1-6)。*C. opisthorchis* の虫卵が各鰓に万遍なく分布するのに対し、*C. orientalis* の虫卵は鰓弓の中央付近の鰓弁に多く分布する (Shirakashi et al., 2012a)。これら 2 種のクロマグロ住血吸虫は、しばしば同一個体に寄生する (Fig. 1-7)。プラジクアンテルに駆虫効果があることが知られており (Shirakashi et al., 2012b ; Ishimaru et al., 2013)、2015 年 11 月に「クロマグロを含むスズキ目魚類の住血吸虫 (*C. opisthorchis*) の駆除」を効能とする駆虫剤が水産用医薬品として承認された。

第四節 本研究の目的

長崎県のクロマグロ養殖場では、2002 年 3 月に *C. orientalis* によるクロマグロ住血吸虫症が初めて確認され (杉原ら, 2002)、近年では長崎県内ほぼ全ての養殖場で 2 種の *Cardicola* によるクロマグロ住血吸虫症の発生が確認されており、本症はクロマグロ若令期で最も重要な疾病の一つとなっている。しかしながら、本症原因住血吸虫は 2010 年 (*C. orientalis*) と 2011 年 (*C. opisthorchis*) に記載されたばかりの種であるため、種類別の発生時期や寄生

動態等の基本的な知見が少ない。また、プラジクアンテル製剤が 2015 年 11 月に *C. opisthorchis* による魚類住血吸虫症の駆虫剤として承認されたが、効果的な投薬を行う上で必要な原因住血吸虫の生活環が全くわかっていなかった。さらに、原因住血吸虫がどういう経路で養殖場に侵入してくるか等についても解明する必要がある。あった。

そこで、本研究では、クロマグロ住血吸虫症対策の基盤となる原因住血吸虫の生活環を解明するために、まず、長崎県内の本症発生養殖場において中間宿主の探索を行った（第二章）。第三章では、クロマグロ養殖場において *C. opisthorchis* の幼生および中間宿主の周年の出現状況を調査し、第四章では、中間宿主体内における *C. opisthorchis* 幼生の増殖過程を明らかとするために、幼生を中間宿主に移植して観察を行った。さらに、第五章では、養殖場へのクロマグロ住血吸虫の侵入経路を解明するため、天然種苗が養殖場に住血吸虫を持ち込む可能性について検証した。第六章では、養殖現場における本症の発生状況把握と原因住血吸虫 2 種の寄生動態について調査を行った。以上の結果を踏まえ、第七章（総合考察）において、クロマグロ住血吸虫の生活環と、そこから導かれるクロマグロ住血吸虫症の効果的な防除法について考察した。

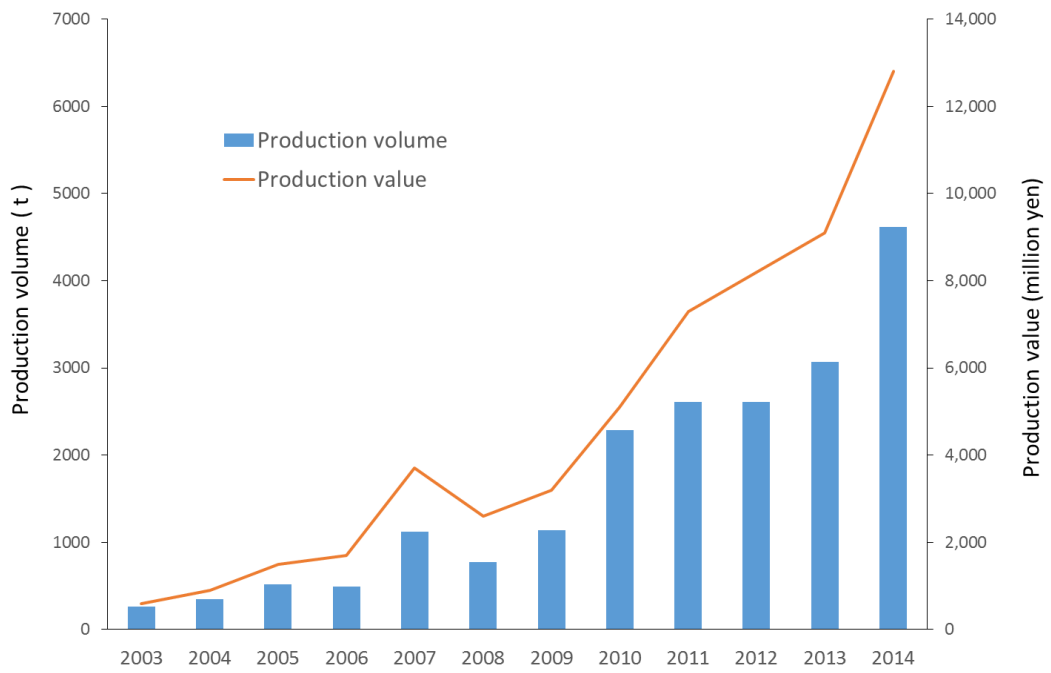


Fig. 1-1 Changes of bluefin tuna culture production volume and production value in Nagasaki (excerpted from Fujii, 2015; The Nagasaki tuna culture conference secretariat, 2016).

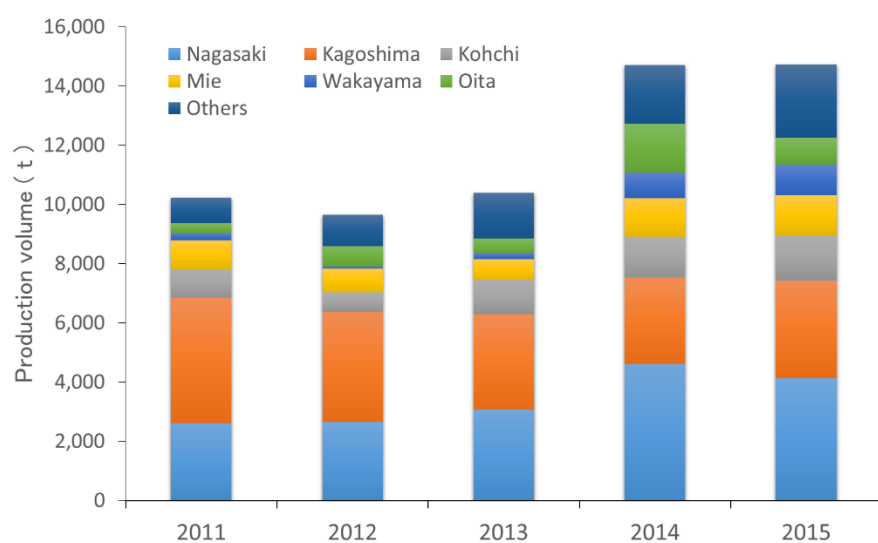


Fig. 1-2 Change of bluefin tuna culture production volume by main production centers (excerpted from Fisheries agency, 2016).

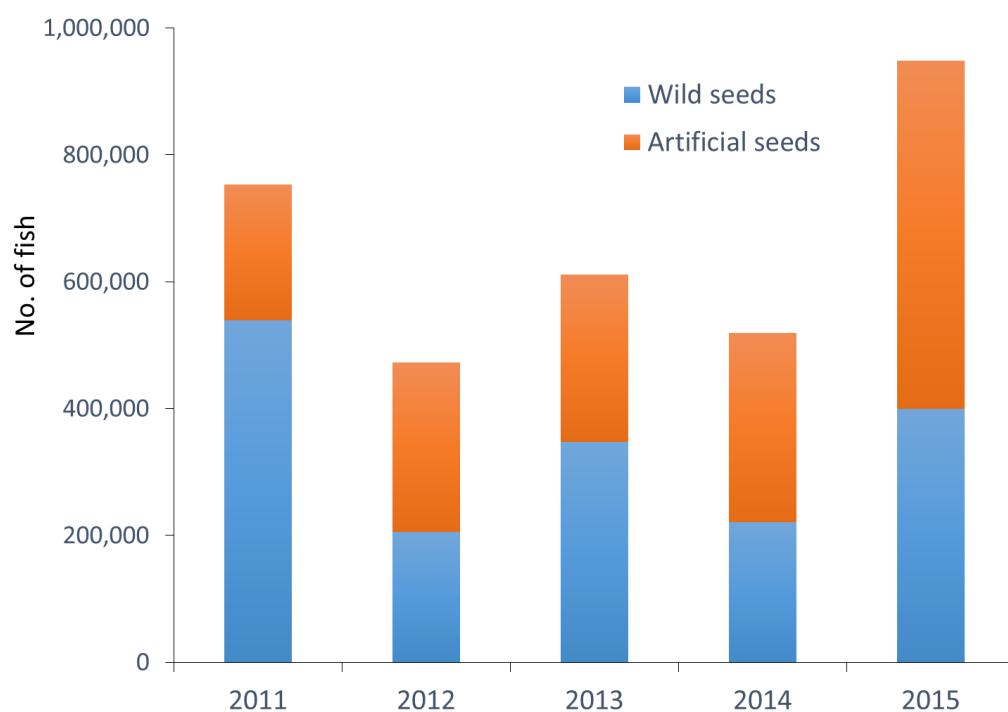


Fig. 1-3 Changes of artificial and wild seed stock for bluefin tuna culture in Japan (excerpted from Fisheries agency, 2016).

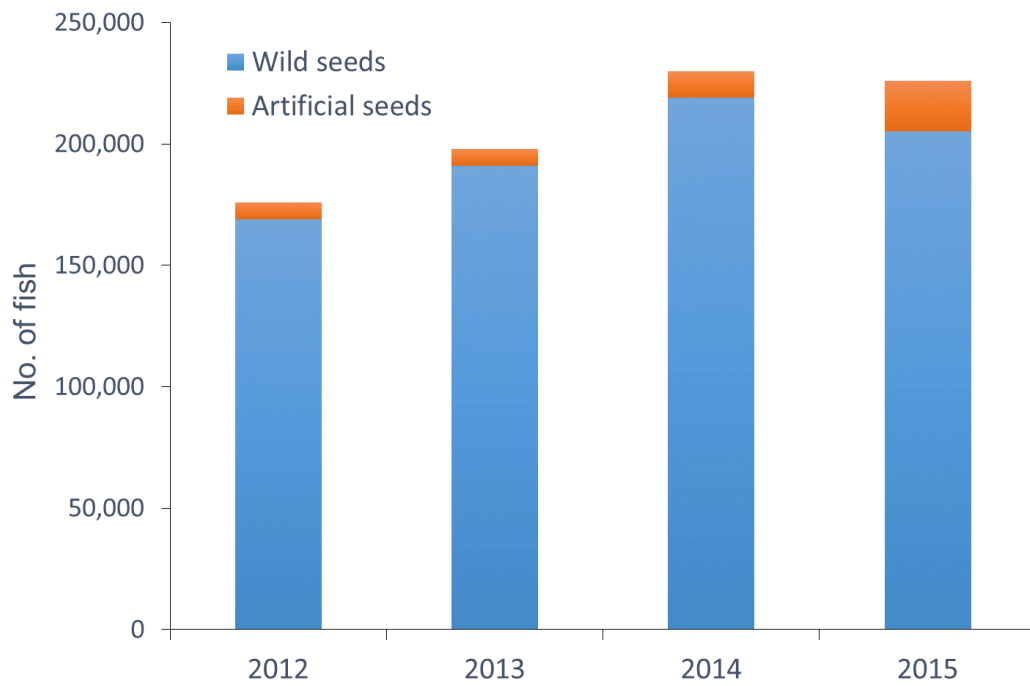


Fig. 1-4 Ratio of artificial and wild seed stock among shipment of cultured bluefin tuna (excerpted from Fisheries agency, 2016).

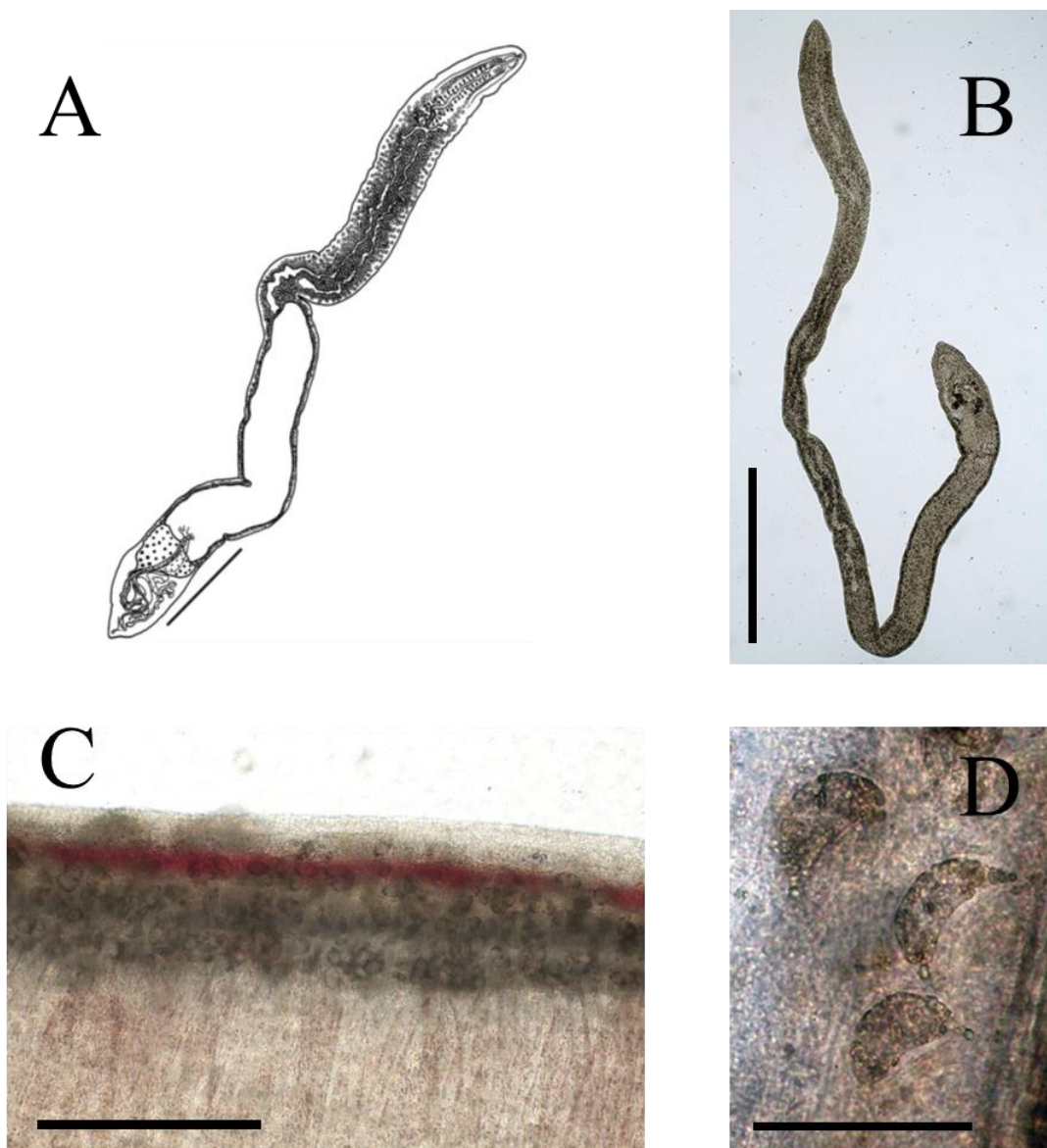


Fig. 1-5 *Cardicola opisthorchis*. (A) Whole worm of holotype (excerpted from Ogawa et al., 2011). (B) Adult worm. (C) Clogged eggs in the afferent filament artery. (D) Crescent shaped eggs. Scale bars (A and B) 1 mm; (C) 500 μm ; (D) 100 μm .

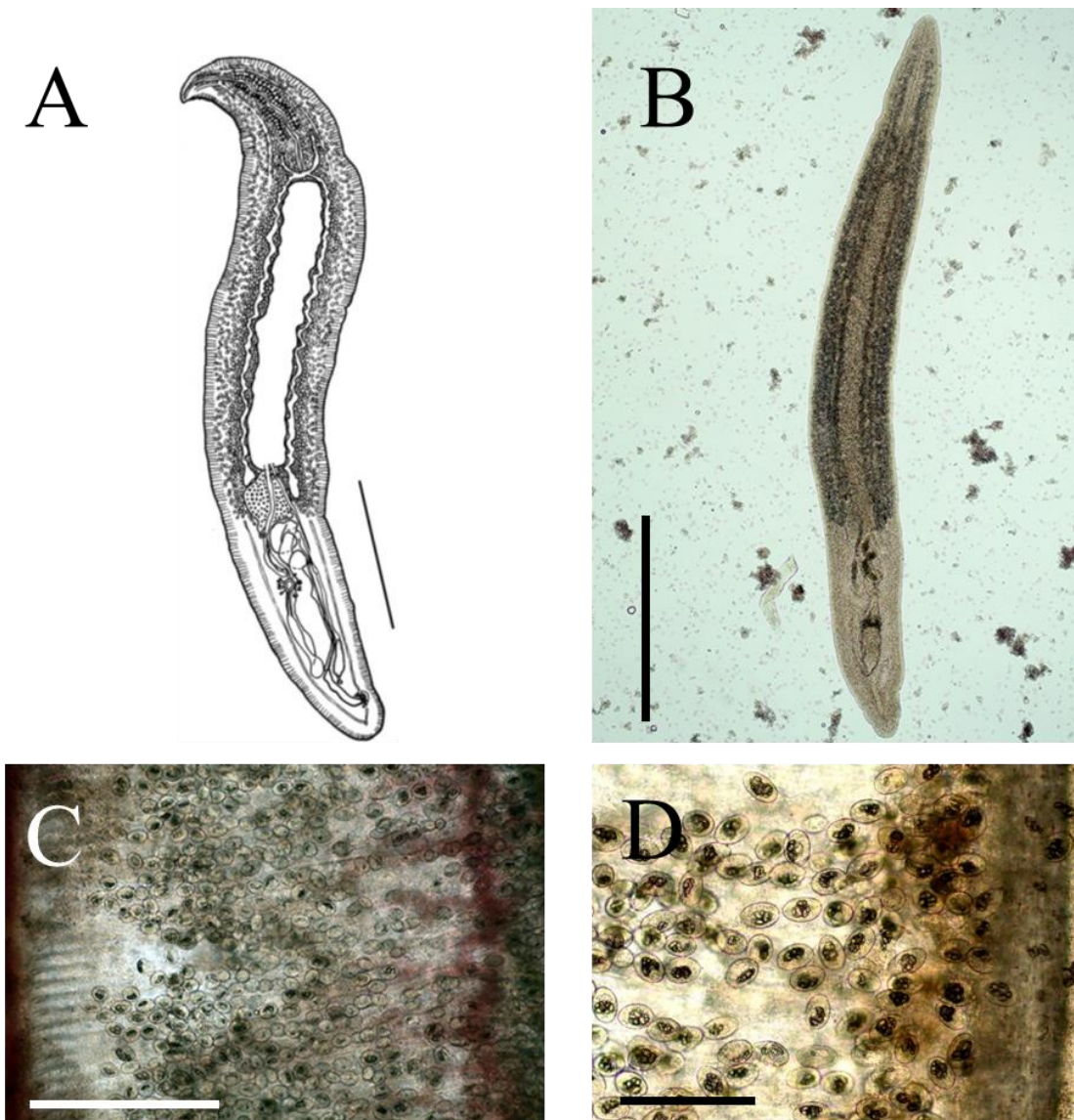


Fig. 1-6 *Cardicola orientalis*. (A) Whole worm of holotype (excerpted from Ogawa et al., 2010). (B) Adult worm. (C) Clogged eggs in the gill lamellae. (D) Oval shaped eggs. Scale bars (A and C) 500 μ m; (B) 1 mm; (D) 200 μ m.

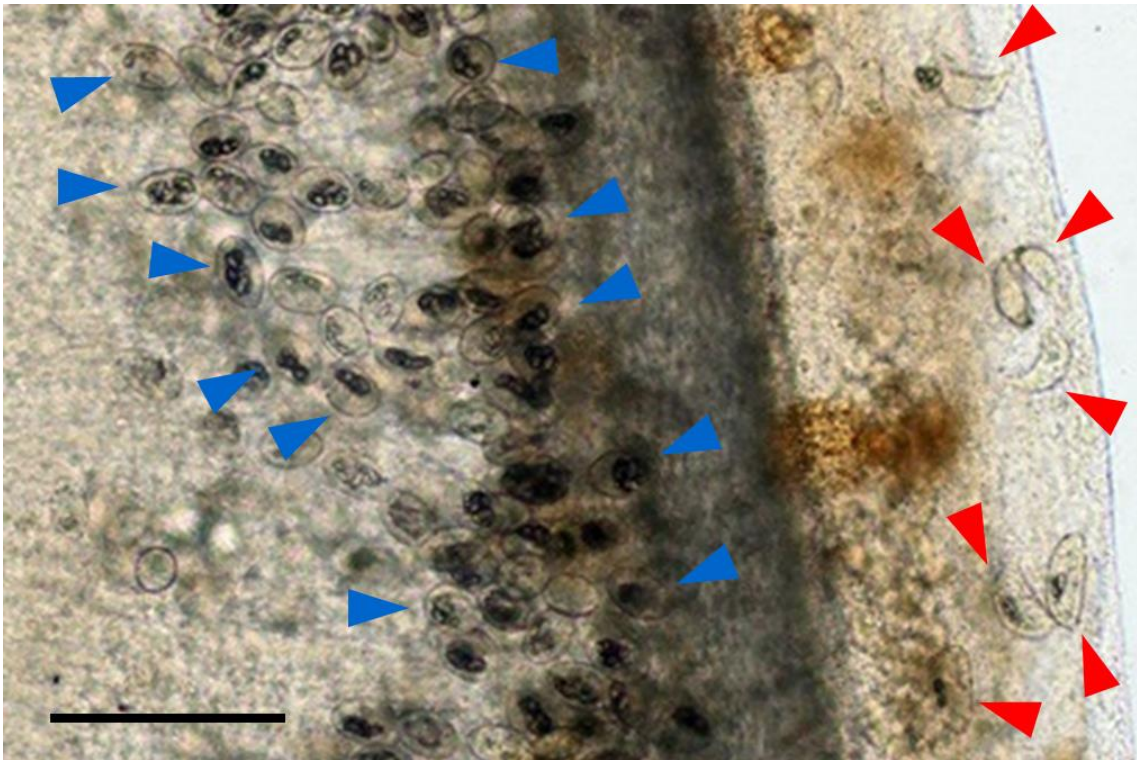


Fig. 1-7 Gill filament of cultured bluefin tuna that was co-infected with *Cardicola opisthorchis* and *C. orientalis*. Crescent *C. opisthorchis* eggs (red arrow heads) and oval *C. orientalis* eggs (blue arrow heads). Scale bar 200 μm .

Table 1-1 Species of blood flukes of genus *Cardicola*.

Parasite	Host		Locality	Reference(s)
	Family	Species		
<i>Cardicola ambrosioi</i>	Percophidae (ホカケトラギス科)	<i>Percophis brasiliensis</i>	Southwestern Atlantic Ocean, off Mar del Plata, Argentina	Braicovich et al., 2006
<i>Cardicola aurata</i>	Sparidae (タイ科)	<i>Sparus aurata</i> (ヨーロッパヘダイ)	Mediterranean Sea, off Valencia, Spain	Holzer et al., 2008
<i>Cardicola bartolii</i>	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus lineatus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006
	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus corallinus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006
<i>Cardicola beveridgei</i>	Lutjanidae (フエダイ科)	<i>Lutjanus argentimaculatus</i> (ゴマフエダイ)	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island, Australia	Nolan et al., 2014
<i>Cardicola brasiliensis</i>	Mugilidae (ボラ科)	<i>Mugil platanus</i>	Southwestern Atlantic Ocean, off Rio de Janeiro, Brazil	Knoff & Amato, 1992
<i>Cardicola bullardi</i>	Scombridae (サバ科)	<i>Scomberomorus munroi</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island, Australia	Nolan et al., 2014
<i>Cardicola cardiocolum</i>	Sparidae (タイ科)	<i>Calamus bajonado</i>	Gulf of Mexico, off Tortugas, Florida, USA	Manter, 1947
<i>Cardicola chaetodontis</i> (チヨウチヨウウオ科)	Chaetodontidae	<i>Chaetodon miliaris</i>	Central Pacific Ocean, off Hawaii, USA	Yamaguti, 1970
		<i>Chaetodon aureofasciatus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006; Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon citrinellus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Moorea, French Polynesia; off Lizard Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006; Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon flavirostris</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006; Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon lineolatus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off New Caledonia; off Lizard Island and Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006; Yong et al., 2013

Table 1-1 continued.

Parasite	Host		Locality	Reference(s)
	Family	Species		
		<i>Chaetodon reticulatus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Moorea, French Polynasia	Nolan & Cribb, 2006
		<i>Chaetodon ulietensis</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006; Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon unimaculatus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Palau; off Lizard Island and Heron Island,	Nolan & Cribb, 2006; Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon kleini</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon baronessa</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon lunulatus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon ornatissimus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon plebeius</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon rainfordi</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon speculum</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon trifascialis</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon auriga</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon ephippium</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island, Australia	Yong et al., 2013

Table 1-1 continued.

Parasite	Host		Locality	Reference(s)
	Family	Species		
		<i>Chaetodon lunula</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island and Heron Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon rafflesi</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island, Australia	Yong et al., 2013
		<i>Chaetodon vagabundus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island, Australia	Yong et al., 2013
<i>Cardicola coeptus</i>	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus punctatus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006
	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus vulpinus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006
<i>Cardicola coridodacis</i>	Odacidae (オダクス科)	<i>Odax fullus</i>	Southwest Pacific Ocean, off Wellington, New Zealand	Manter, 1954
<i>Cardicola covacinae</i>	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus punctatus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Heron Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006
<i>Cardicola currani</i>	Sciaenidae (ニベ科)	<i>Sciaenops ocellatus</i> (レッドドラム)	Northern Gulf of Mexico, off Mississippi Sound, USA	Bullard & Overstreet, 2004
	Sciaenidae (ニベ科)	<i>Sciaenops ocellatus</i> (レッドドラム)	Gulf of Mexco, off Davis Bayou, USA	Orélis-Ribeiro et al., 2014
<i>Cardicola forsteri</i>	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus maccoyii</i> (ミナミマグロ)	Southwestern Pacific Ocean, off Rabbit Island; Louth Island and Port Lincoln,	Cribb et al., 2000; Aiken et al., 2007; Shirakashi et al., 2013
	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus thynnus</i> (大西洋クロマグロ)	Northwestern Atlantic Ocean, off Cape Lookout, North Carolina, USA;	Aiken et al., 2007; Palacios-Abella et al., 2015
	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus orientalis</i> (太平洋クロマグロ)	Western Pacific Ocean, off Japan	Shirakashi et al., 2016
<i>Cardicola lafii</i>	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus fuscescens</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006

Table 1-1 continued.

Parasite	Host		Locality	Reference(s)
	Family	Species		
<i>Cardicola langeli</i>	Sparidae (タイ科)	<i>Archosargus probatocephalus</i>	Northwestern Gulf of Mexico, off Horn Island, USA	Bullard, 2013
<i>Cardicola laruei</i>	Sciaenidae (ニベ科)	<i>Cynscion arenarius</i>	Northern Gulf of Mexico, off Franklin and Wakulla Counties, Florida, USA	Short, 1953
	Sciaenidae (ニベ科)	<i>Cynscion nebulosus</i>	Northern Gulf of Mexico, off Franklin and Wakulla Counties, Florida, USA	Short, 1953
<i>Cardicola milleri</i>	Lutjanidae (フエダイ科)	<i>Lutjanus bohar</i> (バラフエダイ)	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006
<i>Cardicola mugilis</i>	Mugilidae (ボラ科)	<i>Mugil cephalus</i>	Central Pacific Ocean, off Hawaii, USA	Yamaguti, 1970
<i>Cardicola nonamo</i>	Embiotocidae (ウミタナゴ科)	<i>Phameredon furcatus</i> (ホワイトシーパーチ)	Eastern Pacific Ocean, Monterey Bay, California, USA	Bullard, 2010
	Embiotocidae (ウミタナゴ科)	<i>Rhacochilus toxotes</i>	Eastern Pacific Ocean, Naples Reef, California, USA	Bullard, 2010
<i>Cardicola opisthorchis</i>	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus orientalis</i> (太平洋クロマグロ)	Western Pacific Ocean, off Japan	Ogawa et al., 2011
	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus thynnus</i> (大西洋クロマグロ)	Mediterranean Sea, off Puerto de Mazarron, Spain; off Sardinia, Italy	Aiken et al., 2007; Palacios-Abella et al., 2015
<i>Cardicola orientalis</i>	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus orientalis</i> (太平洋クロマグロ)	Eastern Pacific Ocean, off Islas Coronados, Mexico; Western Pacific	Aiken et al., 2007; Ogawa et al., 2010
	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus maccoyii</i> (ミナミマグロ)	Southwestern Pacific Ocean, off Port Lincoln, Australia	Shirakashi et al., 2013
	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus thynnus</i> (大西洋クロマグロ)	Mediterranean Sea, off Sardinia, Italy	Palacios-Abella et al., 2015
<i>Cardicola palmeri</i>	Sciaenidae (ニベ科)	<i>Pogonias cromis</i> (ブラックドラム)	Northern Gulf of Mexico, off Mississippi Sound, USA	Bullard & Overstreet, 2004

Table 1-1 continued.

Parasite	Host		Locality	Reference(s)
	Family	Species		
	Sciaenidae (ニベ科)	<i>Pogonias cromis</i> (ブラックドラム)	Gulf of Mexico, off Back Bay, USA	Orélis-Ribeiro et al., 2014
<i>Cardicola parilus</i>	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus fuscescens</i>	Indian Ocean, Ningaloo Reef off Western Australia	Nolan & Cribb, 2006
<i>Cardicola parvus</i>	Sciaenidae (ニベ科)	<i>Micropogonias undulatus</i>	Northwestern Atlantic Ocean, South Atlantis Bight	Bullard et al., 2012
<i>Cardicola tantabiddii</i>	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus fuscescens</i>	Indian Ocean, Ningaloo Reef off Western Australia	Nolan & Cribb, 2006
<i>Cardicola watsonensis</i>	Siganidae (アイゴ科)	<i>Siganus corallinus</i>	Southwestern Pacific Ocean, off Lizard Island, Australia	Nolan & Cribb, 2006
<i>Cardicola whitteni</i>	Cheilodactylidae (タカノハダイ科)	<i>Nemadactylus macropterus</i>	Southwest Pacific Ocean, off Wellington, New Zealand	Manter, 1954
<i>Cardicola</i> sp.	Scombridae (サバ科)	<i>Thunnus thynnus</i> (大西洋クロマグロ)	Western Mediterranean Sea, off the Spanish Mediterranean coast, Spain	Palacios-Abella et al., 2015; Forte-Gill et al., 2016

第二章 中間宿主の解明

寄生虫症の根本的な対策には、その生活環を解明することが非常に重要である。生活環を遮断することができれば、その疾病を防除することが可能となり、また、薬剤による駆虫を行う場合においても生活環を踏まえて、効果的に投薬する必要がある。

前章第三節で述べたように、クロマグロ住血吸虫が属する魚類住血吸虫科の住血吸虫は、その生活環の中で2種類の宿主（有性生殖期には魚類、無性生殖期には無脊椎動物）に寄生することが知られている。オーストラリアのミナミマグロ蓄養場では、住血吸虫 *Cardicola forsteri* の幼生（スポロシストおよびセルカリア）がフサゴカイ科の一種 *Longicarpus modestus* 1 個体から見つかったという報告がある（Cribb et al., 2011）。しかしながら、日本の養殖クロマグロで問題となっている住血吸虫 *C. opisthorchis* および *C. orientalis* については、その中間宿主および幼生に関する情報は全くなかった。そこで、本章では、クロマグロ住血吸虫の中間宿主を解明することを目的として、住血吸虫症が発生しているクロマグロ養殖場において、底泥や生簀の付着物から無脊椎動物を採集し、その中からクロマグロ住血吸虫の幼生を探索した。寄生虫種の同定は ITS2 および 28S rDNA 遺伝子の解析により行い、幼生の特徴の記載と、中間宿主の記載および生活環についての考察を行った。

材料および方法

検体の採集

クロマグロ住血吸虫症の発生が確認されている長崎県対馬市のクロマグロ

養殖場において、2012年6月から2013年4月までに9回サンプリングを実施した。前述のように、オーストラリアで見つかったミナミマグロの住血吸虫 *C. forsteri* の中間宿主はフサゴカイ科多毛類の *L. modestus* であった (Cribb et al., 2011) ことから、中間宿主の探索は無脊椎動物、とりわけ多毛類をターゲットとして行った。サンプルは、養殖生簀海底の基質や、養殖生簀に付随するロープやフロートから採取した。海底の砂や泥はエクマンバージ採泥器を使って採集し、1 mmメッシュのふるいで濾して無脊椎動物を選り分けた。養殖生簀に付随するロープやフロートに生息するフジツボやムラサキイガイ、チゴケムシ、サンゴ等の付着生物は引き剥がして、そこに棲息する多毛類やイソギンチャク、クモヒトデ等を採集した。採集したサンプルは生きたまま長崎県総合水産試験場に持ち帰り、飼育ケースに収容して紫外線殺菌海水の流水で維持した。

住血吸虫幼生の探索は、採集した無脊椎動物サンプルをスライドグラスとカバーグラスで軽く圧平し、顕微鏡下で体内を観察する方法で行った。観察を終えた無脊椎動物は、種同定用として 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、一部は DNA 解析用として -80°C で冷凍保存した。無脊椎動物から検出した住血吸虫の幼生については、DNA 解析用として個体毎に 80%エタノールで固定し、その後の形態学的研究用として 10%中性緩衝ホルマリンでの固定標本も作製した。それに加えて、AFA 固定液 (70%エタノール : ホルマリン : 酢酸 = 20 : 1 : 1) で固定した圧平標本も作製し、アラムカーミン染色後、エタノール系列で脱水してマウントクイック (大同産業株式会社) で封入した。

DNA 解析

検出した住血吸虫幼生は種同定のために DNA 解析を行った。ゲノム DNA の抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。抽出法は

付属のマニュアルに従った。これにより得られた DNA を鋳型にし、rDNA の ITS2 領域と 28S 領域の一部を PCR によって増幅した。増幅には、Ogawa et al. (2011) および Holzer et al. (2008) の方法に従い、ITS2 領域は、3S（上流プライマー：5'-GGT ACC GGT GGA TCA CGT GGC TAG TG -3'）と ITS2.2（下流プライマー：5'-CCT GGT TAG TTT CTT TTC CTC CGC -3'）のプライマー、28S 領域は、U178（上流プライマー：5'-GCA CCC GCT AAY TTA AG -3'）と L1642（下流プライマー：5'-CCA GCG CCA TCC ATT TTC A -3'）のプライマーを用いた。PCR の反応溶液の組成は、TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version（5U/μL）0.1 μL、10×Ex Taq™ Buffer（20 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5% Tween20, 0.5% Nonidet P-40, 50% Glycerol）2.0 μL、dNTP Mixture（dATP, dCTP, dGTP, dTTP 各 2.5 mM）1.6 μL、プライマーセット（50 pmol/μL）各 0.3 μL、テンプレート 1.0 μL、超純水 14.7 μL の計 20 μL とした。PCR 反応には 2720 サーマルサイクラー（Applied Biosystems Japan）を用い、PCR 反応条件は、95°C 2 分の熱変性後、95°C 50 秒、56°C 50 秒、72°C 2 分を 30 サイクル行い、72°C 4 分の伸長反応を行った。PCR 産物は、QIAquick Gel Extraction Kit（QIAGEN）により精製し、塩基配列は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems Japan）と、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer（Applied Biosystems Japan）を用いた反応産物の分析結果より決定した。なお、シーケンスプライマーは、PCR で用いたものと同じプライマー（3S, ITS2.2, U178, L1642）を使用した。得られた塩基配列は、BLAST（NCBI）と Clustal W（DDBJ）を用いて、GenBank に登録されている *Cardicola* 属住血吸虫の ITS2 と 28S rDNA の塩基配列と比較した。

結 果

採集物検査結果

本研究では、採集した 744 個体の無脊椎動物について、住血吸虫の幼生の寄生を調査した (Table 2-1)。その結果、1, 3, 4 月に採集したフサゴカイ科多毛類 5 個体から住血吸虫類の幼生 (スポロシストおよびセルカリア) が検出された (Table 2-2)。その感染フサゴカイの内、1 月の 2 個体と、3 月の 1 個体は約 45 m の海底から採集され、4 月の 2 個体は養殖生簀のロープ (水面下約 2 m) から採集された。そして、全てのフサゴカイは死んだフジツボの中に潜んでいた。

感染フサゴカイ 5 個体は、その形態的特徴から *Terebella* 属と特定された (Fig. 2-1)。さらに、この 5 個体のフサゴカイには共通した特徴があった。すなわち、背剛毛は第 1~14 剛毛節まで (胸部)、以後は腹剛毛のみである (腹部)。胸部の節数が本邦既報告種より少ない。腹剛毛は第 2 剛毛節から始まり第 7 剛毛節まで 1 列、第 8 剛毛節以降は 2 列に並ぶ。これらの特徴は、Imajima & Hartman (1964) によって報告されている *Terebella* 属フサゴカイの本邦既報告種 2 種 (*T. ehrenbergi*, *T. punctata*) とは明らかに異なっていた。

DNA 解析結果

前述の *Terebella* 属フサゴカイから検出されたスポロシストの DNA 解析の結果、524 bp の ITS2 領域の塩基配列 (GenBank accession no. AB830082) と 1,600 bp の 28S rDNA の一部の塩基配列 (AB829900) が得られた。得られた 5 個体の塩基配列は全て同じで、それらは GenBank に登録されている *C. opisthorchis* の ITS2 (HQ324228, 520 bp) と 28S rDNA (HQ324227,

1,594 bp) の塩基配列と 100%一致した。

***Cardicola opisthorchis* Ogawa, Ishimaru, Shirakashi, Takami et Grabner, 2011 の幼生の記載 (Fig. 2-2)**

中間宿主：*Terebella* sp. (科：Terebellidae)。標本は大阪市立自然史博物館にて保管 (OMNH-Iv 5359-5363)。

採集場所：長崎県対馬沖 (北緯 34°18'14", 東経 129°13'33")

スポロシスト：フサゴカイの体腔内でフリーな状態で寄生 (Fig. 2-2A)。

体形は滑らかな紡錘形 (Fig. 2-2B) で、生きている時は伸縮運動をする。長さ 347-829 μm (平均 583 μm)、幅 79-218 μm (平均 137 μm) (n=21)。様々な発達段階のセルカリアを多数含有している (Fig. 2-2C, D)。

セルカリア：体形は管状で、生きている時は伸縮運動をする。長さ 76.5-105.9 μm (平均 89.9 μm)、幅 13.2-16.2 μm (平均 15.1 μm) (n=7)。口吸盤はわずかにくびれによって区切られている。背鰭膜は見当たらない。尾は単一で二股に分かれておらず、体よりも明らかに短く、セルカリアが生きている時は時々泳ぐような動きをする。尾の長さ 25.7-51.5 μm (平均 35.3 μm)、幅 2.9-7.4 μm (平均 5.0 μm) (Fig. 2-2E, F)。

標本の保管：目黒寄生虫館 (MPM Coll. Nos. 20903-20904)。

特記事項：幼生ステージが検出された 5 個体のフサゴカイは、採集されてから検査されるまで 21~59 日間、小型ケース内で紫外線殺菌海水の流水で維持されていた。1 月と 4 月に採集された 4 個体のフサゴカイは、採集 21~25 日後の観察において、数十~数百個体のスポロシストを含有しているのが認められた。一方、

3月に採集された1個体のフサゴカイは、採集59日後の観察において、わずか1個体だけのスポロシストの含有が認められた。ほとんどのスポロシストは、未発達の細胞から十分に成熟したセルカリアまで、様々な発達段階のセルカリアを含有していた。1個体のフサゴカイの体腔内では、スポロシストから脱出し遊泳しているセルカリアが認められた。観察時にカバーガラスの圧によってスポロシストからセルカリアが放出されるのがしばしば観察された (Fig. 2-2G, H)。フサゴカイから取り出したスポロシストは活発に動くが、そのスポロシスト内のセルカリアの動きは弱々しかった。しかし、そのセルカリアもスポロシストから取り出すと活発に伸縮運動をし、時折、尾を激しく動かし、泳ぐようなしぐさをした。

考 察

Ogawa et al. (2011) は、*C. opisthorchis* と *C. forsteri* は、ITS2 と 28S rDNA の塩基配列がそれぞれ 19 塩基 (5.5%の相違) および 6~7 塩基 (1.11%の相違) 相違するものの、分子系統発生的に最も近縁のグループに属し、*C. orientalis* は、*C. opisthorchis* や *C. forsteri* のグループとは系統発生的に少し離れたグループに属すと報告している。この情報と、5 個体の *Terebella* sp. から得られた全てのスポロシストの ITS2 と 28S rDNA の塩基配列が *C. opisthorchis* のものと 100%一致したことから、これらの住血吸虫の幼生は *C. opisthorchis* であると判断した (Sugihara et al., 2014)。

フサゴカイからクロマグロへのセルカリアの感染実験は行っていないが、クロマグロ養殖生簀に生息していたフサゴカイの体内に *C. opisthorchis* の

成熟したセルカリアが確認されたことと、この養殖場で住血吸虫症が発生していることから、*C. opisthorchis* の生活環がこの養殖場内で成立していることが強く示唆された。

本研究においてフサゴカイから *C. opisthorchis* の幼生ステージを発見した。これは本種の間宿主に関する初めての報告である (Sugihara et al., 2014)。海産の魚類住血吸虫類でこれまでに生活環が判明している種は、*Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Køie, 1982) と *C. forsteri* (Cribb et al., 2011) であり、今回発見した *C. opisthorchis* が 3 種目である。本研究の後、Shirakashi et al. (2016) によって和歌山県のクロマグロ養殖場から *C. orientalis* および *C. forsteri* の中間宿主が発見されたが、以上 5 種の間宿主は、いずれも Terebellinae 亜科に属するフサゴカイ類である。Cribb et al. (2011) は、魚類住血吸虫類の主要な中間宿主のグループは Terebellinae 亜科である可能性を論じているが、我々の結果もそれを支持する形となった。

C. opisthorchis の幼生ステージ (スポロシストおよびセルカリア) の形態は、Cribb et al. (2011) が報告している *C. forsteri* とよく似ているが、セルカリアとスポロシストの平均サイズは、本研究の *C. opisthorchis* (セルカリア $89.9 \times 15.1 \mu\text{m}$, スポロシスト $583 \times 137 \mu\text{m}$) の方が *C. forsteri* (セルカリア $71 \times 16.4 \mu\text{m}$, スポロシスト $328 \times 74 \mu\text{m}$) よりも大きかった。魚類住血吸虫類のセルカリアの形態は、背鰭膜があり、尾が二又に分かれているものが一般的である (e.g. Meade & Pratt, 1965; Evans & Heckmann, 1973; Kirk & Lewis, 1993; Nolan & Cribb, 2004)。しかし、今回見つかった *C. opisthorchis* のセルカリアは、*C. forsteri* のセルカリアと同様に、背鰭膜はなく、尾も 1 本で枝分かれしていなかった (Fig. 2-2F)。Cribb et al. (2011) は、*C. forsteri* に関する彼らの報告の中で、成熟したセルカリアでも背鰭膜はないと考えるが、彼らは自由遊泳するセルカリアを見つけることができない

かったことから、セルカリアが未成熟であったことが背鰭膜が見られなかった要因である可能性を論じている。本研究においては、フサゴカイの体腔内で自由遊泳する成熟したセルカリアが観察され、それには背鰭膜が見られなかった。このことから、Cribb et al. (2011) が観察した *C. forsteri* のセルカリアも成熟していた可能性は十分にあり得る。これまでに報告されている魚類住血吸虫類のセルカリアの尾は長く二又に分かれているものがほとんどであり、体よりも短い単尾のセルカリアは 4 種しか報告されていなかった (Martin, 1944a ; Oglesby, 1961 ; Cribb et al., 2011)。そのため、今回観察された *C. opisthorchis* のセルカリアは短い単尾セルカリアの 5 種目となる。後に Shirakashi et al. (2016) によって報告された *C. orientalis* のセルカリアも短い単尾であったことから、上述した *C. opisthorchis* のセルカリアの形態は魚類住血吸虫類の中でも独特であり、特に尾が 1 本で短いという形状は *Cardicola* 属セルカリアの共通の特徴である可能性が高い。

本研究において、*C. opisthorchis* に感染していた 5 個体のフサゴカイは、形態的な特徴から *Terebella* 属のものと考えられたが、形態的な解析からは種まで特定するに至らなかった。しかしながら、これらの検体は全て同じ特徴を備えていたことから、少なくとも全て同種と判断され、本種を *Terebella* sp. とした。一方、他の形態的に異なるフサゴカイ類についても探索を行ったが、住血吸虫の感染は確認されなかった。このことから、前述の *Terebella* sp. が、今回調査したクロマグロ養殖海域での主要な中間宿主であることが示唆された。他に中間宿主となり得る種がないかどうかについては、更なるフィールド調査が必要である。

C. forsteri は、地理的分布域および宿主域（北西大西洋の大西洋クロマグロ、スペインの地中海側の大西洋クロマグロ、オーストラリアのミナミマグロ）が広いことが知られている (Bullard et al., 2004 ; Aiken et al., 2007 ;

Cribb et al., 2011)。Cribb et al. (2011) は、*C. forsteri* の中間宿主であるフサゴカイ *L. modestus* はオーストラリア海域でしか生息が確認されていない (Hutchings & Glasby, 1988) ことから、*C. forsteri* の中間宿主は海域によって異なる可能性を予想した。そして、Shirakashi et al. (2016) によって和歌山県のクロマグロ養殖場ではフサゴカイ *Amphitrite* sp. が *C. forsteri* の中間宿主となっていることが発見されたことにより、Cribb et al. (2011) の仮説が証明された。さらに、Ogawa et al. (2011) は、*C. opisthorchis* もまた、地理的分布域および宿主域 (東太平洋の太平洋クロマグロ、スペインの大西洋クロマグロ) が広いことを分子遺伝学的データから示唆している。現在のところ、前述の *Terebella* sp. の地理的分布に関する情報はほとんどないが、この種の分布域に関する情報は *C. opisthorchis* の生活環の更なる解明に役立つものと思われる。

3 月に採集された 1 個体の感染 *Terebella* sp. は、採集されてから 59 日間紫外線殺菌海水中で維持されていた。このことから、*C. opisthorchis* の幼生ステージは少なくとも 2 ヶ月間は *Terebella* sp. 体内に居続けるということが示された。

5 個体の感染 *Terebella* sp. を含む多くのフサゴカイ類はフジツボの殻内に潜んでいた。通常、フジツボ等はクロマグロ養殖生簀のロープやフロートに多数付着している。海底から採取されたフジツボについても、生簀掃除によって落とされたものと思われる。もし *Terebella* sp. を含む大多数のフサゴカイ類がフジツボのような構造物内に棲息しているのであれば、これらの構造物は最も有力な感染源であると考えられる。したがって、生簀のロープやフロート等を頻繁に掃除してこれらの構造物を除去することにより、住血吸虫のクロマグロへの感染機会を減らすことができると考えられる。

Table 2-1 Taxa of invertebrates examined for infection with aporocotyid.

Group	Family	Total no.
Anopla	Lineidae	3
Anthozoa	Actiniidae	10
Bivalvia	Solemyidae	1
Gastropoda	Trochidae	4
	Muricidae	9
Malacostraca	Xanthidae	1
	Galatheidae	3
Ophiuroidea		36
Polychaeta	Ampharetidae	13
	Arabellidae	3
	Capitellidae	13
	Cirratulidae	170
	Dorvilleidae	204
	Eunicidae	18
	Glyceridae	3
	Hesionidae	1
	Lumbrineridae	31
	Magelonidae	3
	Maldanidae	12
	Nereididae	8
	Opheliidae	3
	Pectinariidae	4
	Polynoidae	13
	Sabellidae	3
	Serpulidae	2
	Spionidae	2
	Syllidae	32
	Terebellidae	139
Total		744

Table 2-2 Information on polychaetes infected with larval stages of *Cardicola opisthorchis*.

No.	Collection month	Collection point	Depth (m)	Days until detection	Species	Remarks
1	January	seabed	45	25	<i>Terebella</i> sp.	contained hundreds of sporocysts, cryptic within balanoid shells
2	January	seabed	45	25	<i>Terebella</i> sp.	contained scores of sporocysts, cryptic within balanoid shells
3	March	seabed	45	59	<i>Terebella</i> sp.	contained only one sporocyst, cryptic within balanoid shells
4	April	rope of tuna cage	2	21	<i>Terebella</i> sp.	contained hundreds of sporocysts and free-swimming cercariae, cryptic within balanoid shells
5	April	rope of tuna cage	2	21	<i>Terebella</i> sp.	contained scores of sporocysts, cryptic within balanoid shells



Fig. 2-1 *Terebella* sp. infected with larval stages of *Cardicola opisthorchis*. Scale bar 5 mm.

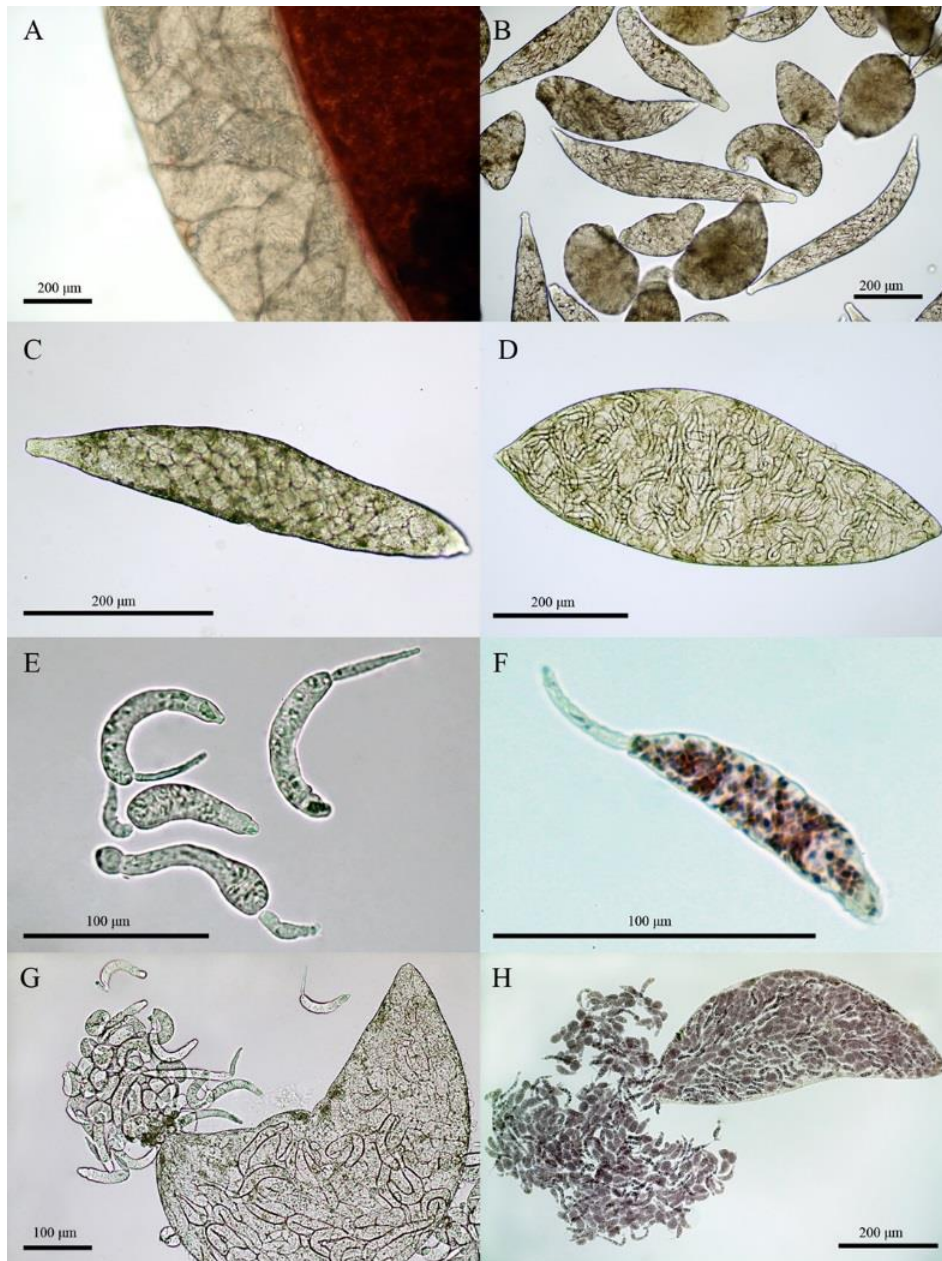


Fig. 2-2 Larval stages of *Cardicola opisthorchis* from *Terebella* sp. (A) Sporocysts in the body cavity of *Terebella* sp. (B) Sporocysts extracted from *Terebella* sp. (C) Sporocyst with undeveloped cercariae. (D) Sporocyst with developed cercariae that was flattened between slide glass and coverslip. (E) Cercariae of *C. opisthorchis*. (F) Cercaria of *C. opisthorchis* stained with alum carmine. (G) Cercariae out of sporocyst. (H) Cercariae out of sporocyst stained with alum carmine. Scale bars (A-D and H) 200 µm; (E-G) 100 µm.

第三章 養殖場における中間宿主 *Terebella* sp.と

C. opisthorchis 幼生の出現状況

第一節 養殖生簀ロープ付着物内における中間宿主 *Terebella* sp.および

C. opisthorchis 幼生の周年の出現状況

第二章において、クロマグロ養殖生簀のロープやフロートの付着物内から得られた *Terebella* 属フサゴカイの一種が *Cardicola opisthorchis* の中間宿主であることを突き止め、養殖場内で *C. opisthorchis* の生活環が回っていることを確認した。

そこで、クロマグロ養殖場における *Terebella* sp.と *C. opisthorchis* 幼生の季節的な出現動向を探るために、養殖生簀ロープの付着物を毎月採集し、周年の調査を行った。

材料および方法

検体の採集

長崎県対馬市のクロマグロ養殖場において、2014年1～12月に毎月1回サンプリングを実施した。サンプリングは、養殖生簀のロープ（水深約1～2m）の付着物内から *C. opisthorchis* の中間宿主であるフサゴカイ *Terebella* sp.を採集する方法で行った。各サンプリングにつき、約2時間を要し、採集したサンプルは3Lビン5本に海水とともに収容し、その日のうちに長崎県総合水産試験場に持ち帰り、紫外線殺菌海水の流水中で維持した。住血吸虫感染の確認は、採集した *Terebella* sp.をスライドガラスとカバーガラスで圧平して顕微鏡下で観察する方法で行い、感染が確認された *Terebella* sp.のう

ち、23 個体分のスポロシスト寄生数を計数した。検出したスポロシストは、圧平し、AFA で固定後、ハイデンハイン鉄ヘマトキシリン染色もしくはアラムカーミン染色を施し、透徹後、カナダバルサムで封入した。また、一部のスポロシストは DNA 解析用として 80%エタノールで固定した。

DNA 解析

スポロシストのゲノム DNA の抽出は、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて行い、抽出法は付属のマニュアルに従った。*C. opisthorchis* (GenBank accession no. HQ324228) と *C. orientalis* (HQ324226) の ITS2 rDNA の塩基配列を基に種特異的なプライマーセットを作製した。*C. opisthorchis* のプライマーセットは、COPI-YF (上流プライマー: 5'- TGT TTT TCC TAA ATG TGT GTG CAT T -3') と COPI-YR (下流プライマー: 5'- AAC AAG TAT CAA AAC ATC AAT CGA CAC -3'), *C. orientalis* のプライマーセットは、CORIEN-YF (上流プライマー: 5'- GAT TGC TTG CTA TTC CTA GAT GTT TAC GT -3') と CORIEN-YR (下流プライマー: 5'- GAA ACA TTG CAT CGT CAG TCG TT -3') で、それぞれの増幅産物は 285 bp と 290 bp の断片になると予想された。それぞれの成虫から抽出した DNA を鋳型 DNA として PCR を行ってプライマーの有効性を検討したところ、対象種の DNA を増幅することに成功し、その PCR 産物の塩基配列は各対象種のものと一致した。PCR の反応液は、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) をマニュアルに従って調合し、PCR 反応条件は、95°C 5 分の熱変性後、95°C 50 秒、62°C 50 秒、72°C 50 秒を 45 サイクル行い、72°C 5 分の伸長反応を行った。PCR 産物は 2%アガロースゲル中で電気泳動し、サイバーグリーンで染色した。

結 果

Terebella sp.と *C. opisthorchis* スポロシストの季節的な出現状況

クロマグロ養殖生簀のロープにおける周年調査の結果、*C. opisthorchis* の中間宿主であるフサゴカイ *Terebella* sp.は 949 個体採集された (Table 3-1)。*Terebella* sp.の採集数は、1~3 月と 11 月および 12 月は 100 個体を超える程多かったのに対し、4~8 月は少ない傾向が見られた。そのうち、54 個体 (5.7%) の *Terebella* sp.から吸虫類のスポロシストが検出され、それらのスポロシストは PCR 検査により全て *C. opisthorchis* と同定された。*C. opisthorchis* が感染した *Terebella* sp. (感染 *Terebella* sp.) は、1~3 月および 9~12 月に認められ、その寄生率は 2.0~18.4%であった (Table 3-1)。感染 *Terebella* sp.から検出されたスポロシストの大部分は、採集月に関わらず完全に発達したセルカリアを含有しており、その平均寄生数は感染 *Terebella* sp.1 個体あたり 270 個体 (5~1,800 個体) (n=23) であった。9 個体の感染 *Terebella* sp.の体腔内に、小型の娘スポロシストを含有するスポロシスト (Sporocystogenous sporocyst : 以下 SS) が認められた (Table 3-1, Fig. 3-1A)。*Terebella* sp.の体腔内に SS とセルカリアを含有するスポロシスト (Cercariogenous sporocyst : 以下 CS) (Fig. 3-1B) が混在しており、さらに、娘スポロシストとセルカリアの両方を含有するスポロシストも確認された。

考 察

中間宿主体内における魚類住血吸虫の季節的な出現状況については、これまでに *Aporocotyle simplex* の中間宿主である *Artacama proboscidea* につ

いて 12～9 月までに 8 回調査され、その寄生率は 3.9～13.6%であったとの 1 例の報告しかない (Køie, 1982)。本研究で中間宿主 *Terebella* sp.と *C. opisthorchis* 幼生の周年の出現状況を調査した結果、*C. opisthorchis* 幼生が感染した *Terebella* sp.は 1～3 月および 9～12 月に検出された (Sugihara et al., 2015)。また、*Terebella* sp.自体も同時期に多く、4～8 月は少なかったことから、*C. opisthorchis* 幼生の検出率は *Terebella* sp.の生息量に影響を受ける可能性が高いと思われた。さらに、ゴカイ類の住処となる養殖生簀の付着物の量は、低水温期に増加し、水温が上昇するにつれて減少する傾向があるため、このことと *Terebella* sp.の出現量および *C. opisthorchis* 幼生の検出率はよく一致している。一方、クロマグロ養殖現場においては、夏季に導入直後のクロマグロ種苗への住血吸虫感染が確認され、秋に住血吸虫症が蔓延する (第六章)。このことは、夏季に *C. opisthorchis* 幼生が検出されなかったという本調査結果と矛盾している。また、夏以前に *Terebella* sp.から放出されたセルカリアが海中で生存し、それが夏季にクロマグロ稚魚に感染する可能性は低いと考えられる。さらに、*Terebella* sp.は管棲多毛類であるため移動する可能性も低い。今回の水面下 1～2 m の養殖生簀ロープにおける調査では、当歳クロマグロへの住血吸虫の侵入時期と、*C. opisthorchis* 幼生が多く採集される時期が一致しない結果であった。そこで、夏季の感染源となる感染 *Terebella* sp.の生息場所が養殖生簀のロープ以外にある可能性を検証するため、養殖生簀網の底部付着物における *Terebella* sp.と *C. opisthorchis* 幼生の調査を行うこととした (詳細は本章第二節)。

本研究において、*C. opisthorchis* の中間宿主である *Terebella* sp.体内に娘スポロシストを含有するスポロシスト (SS) を初めて確認した。この発見は、*C. opisthorchis* が中間宿主体内で無性的に増殖する (スポロシストが多数の娘スポロシストを産生し得る) ことを示している。これは海産魚類住血吸虫

の SS に関する最初の報告である (Sugihara et al., 2015)。このことについては、第四章で詳細に記述する。

海産魚類住血吸虫類に属す *Aporocotyle simplex* は、多毛類を中間宿主とし、レジアのステージがあることが知られている (Køie, 1982)。今回、*C. opisthorchis* が感染している *Terebella* sp. を周年にわたって多数観察したが、レジアは確認できなかった。*C. forsteri* および *C. orientalis* もまた中間宿主は多毛類であるが、レジアは見つかっていない (Cribb et al., 2011 ; Shirakashi et al., 2016)。このことから、*Cardicola* 属はレジアのステージを持たない可能性が高いと推察される。同じ海産魚類住血吸虫類の間で、このような違いがあることは非常に興味深いことである。

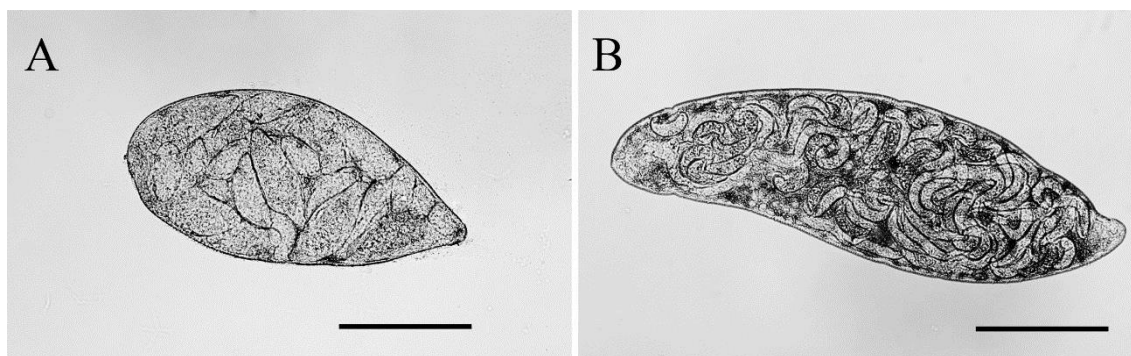


Fig. 3-1 Two types of sporocysts of *Cardicola opisthorchis*. (A) Sporocystogenous sporocyst. (B) Cercariogenous sporocyst. Scale bars: 200 μ m.

Table 3-1 Seasonal occurrence of sporocysts of *Cardicola opisthorchis* in the intermediate polychaete host, *Terebella* sp. collected at a tuna culture site in Nagasaki Prefecture.

Month	No. of polychaetes examined	No. of infected polychaetes (%)	No. of polychaetes bearing sporocystogenous sporocysts
January	103	19 (18.4)	4
February	173	7 (4.0)	2
March	196	15 (7.7)	1
April	44	0	0
May	15	0	0
June	21	0	0
July	4	0	0
August	1	0	0
September	45	1 (2.2)	0
October	50	1 (2.0)	1
November	188	6 (3.2)	1
December	109	5 (4.6)	0
Total	949	54 (5.7)	9

第二節 高水温期の養殖生簀網底付着物内における中間宿主 *Terebella* sp. および *C. opisthorchis* 幼生の検出

前節で述べたとおり，水深 1~2 m の養殖生簀ロープの調査では，高水温期に *Terebella* sp.が減少し，*C. opisthorchis* 幼生が感染した *Terebella* sp.は見つからなかった。一方，養殖場では，夏季に導入されたクロマグロ種苗に *C. opisthorchis* が侵入することがわかっている（第六章）。

そこで，高水温期の感染源が水面に近い養殖生簀ロープ以外にある可能性を検証するため，養殖生簀網底の付着物内における *Terebella* sp.と *C. opisthorchis* 幼生の出現状況を調査した。

材料および方法

第二章および本章前節と同じ長崎県対馬市のクロマグロ養殖場において，2016年8月29日にサンプリングを実施した。サンプリング時の養殖場の海面水温は 27.0℃であった。網替えのために船上に引き上げられた養殖生簀網の網底部分（水深約 15 m）の付着物と，対照区として，前節と同様の生簀ロープ（水深約 1 m）の付着物を採集した。網底の付着物は 3 L ビン 4 本，生簀ロープの付着物は 3 L ビン 2 本に海水とともに収容し，その日のうちに長崎県総合水産試験場に持ち帰り，紫外線殺菌海水の流水中で維持した。採集してから数日中に付着物からフサゴカイ類を取り出し，スライドグラスとカバーグラスで圧平して顕微鏡下で住血吸虫幼生の有無を調べた。検出された住血吸虫幼生は前節の種特異的な PCR によって種を判別した。

結 果

採集場所別のフサゴカイ *Terebella* sp. および感染 *Terebella* sp. の個体数を Table 3-2 に示す。生簀網底付着物（3 L ビン×4 本分）から 157 個体のフサゴカイ類が得られ、その内、145 個体が *Terebella* sp. であった。さらに、36 個体の体腔内に住血吸虫のスポロシストが確認された。他方、生簀ロープ付着物（3 L ビン×2 本分）からは 11 個体の *Terebella* sp. が得られ、その内 1 個体の体腔内に住血吸虫のスポロシストが認められた。得られた住血吸虫のスポロシストは、PCR 検査の結果、全て *C. opisthorchis* と同定された。

考 察

海面近くの生簀ロープ付着物内には *Terebella* sp. が少なく、*C. opisthorchis* 幼生感染個体を得ることが困難であり、前節の調査結果と一致した。一方、生簀網底付着物内には多数の *Terebella* sp. が生息しており、*C. opisthorchis* 幼生の感染率が約 25% と高い値であった。このことから、水面近くのロープよりも、生簀網下部の付着物内に生息する *Terebella* sp. が感染源となっていることが強く示唆された。これが高水温期だけの現象かどうかは不明であるが、少なくとも前節の調査では確認できなかった夏季の感染源が判明した。

C. opisthorchis に感染した *Terebella* sp. を含むフサゴカイが、海面近くの生簀ロープよりも生簀網底の付着物内に多く生息していたのは、海面付近よりも深い場所の方が水温や塩分が安定しているからかもしれない。今後、*C. opisthorchis* 幼生および *Terebella* sp. の調査を行う際は、海面付近よりも少し深い生簀網の側面や底部等の付着物を採集する方がよいということが分か

った。

Table 3-2 Appearance of intermediate polychaete host *Terebella* sp. infected with *Cardicola opisthorchis* at tuna cage bottom and rope.

	Depth (m)	No. of Terebellid polychaetes examined	No. of <i>Terebella</i> sp.	No. of infected <i>Terebella</i> sp. (%)
Periphyton of tuna cage bottom	15	157	145	36 (24.8)
Periphyton of rope attached to tuna cage	1	11	11	1 (9.1)
Total		168	156	37

第四章 中間宿主 *Terebella* sp.体内における *C. opisthorchis* 幼生の増殖動態

第一節 スポロシストを産生するスポロシスト

第二章において、セルカリアを含有する *C. opisthorchis* のスポロシストが中間宿主 *Terebella* sp.の体腔内に観察されたことを述べた。哺乳類の住血吸虫類 (schistosome) では、中間宿主の巻貝に侵入したミラシジウムが母スポロシストに変態し、その母スポロシストは娘スポロシストを産生し、娘スポロシストがセルカリアを産生することが知られている (Oliver & Mao, 1949)。さらに、哺乳類の住血吸虫類の娘スポロシストはさらなる娘スポロシストを繰り返し産生することが報告されている (Hansen, 1975 ; Jourdane et al., 1980)。しかしながら、魚類住血吸虫においては、淡水産魚類住血吸虫のスポロシストによるスポロシストの産生 (Sendersky et al., 2002), 海産魚類住血吸虫のスポロシストやレジアからのセルカリアの産生 (e.g. Køie, 1982 ; Kirk & Lewis, 1993 ; Nolan & Cribb, 2004 ; Cribb et al., 2011) およびレジアからのレジアの産生 (Køie, 1982) についての報告はあるものの、海産魚類住血吸虫のスポロシストによるスポロシストの産生に関する報告はなかった。そのような中、本研究において、*C. opisthorchis* 幼生と中間宿主について調査している過程でスポロシストを産生するスポロシスト (Sporocystogenous sporocyst : SS) が発見された (第三章第一節)。本節では、この SS について記載するとともに、SS と、SS により産生された娘スポロシストの *in vitro* での培養を試みた (Sugihara et al., 2015)。

材料および方法

検体の採集

検体の採集時期、採集場所、採集方法、観察方法および固定方法は前章と同様である。全ての測定は、生きたスポロシストを使用し、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA) を使って行った。

スポロシストを産生するスポロシスト (SS) の培養

SS と、SS により産出される娘スポロシストの発達および生存期間の知見を得るために、SS の培養を試みた。培養には Leibovitz's 15 (L-15) 培地と、海産多毛類の体内の塩分濃度は海水に近いことから、L-15 培地に NaCl を添加して塩分を 3% に調整した培地 (L-15-3 培地) の 2 種類を使用した。両培地には 5% の牛胎児血清と 1% の Antibiotic-Antimycotic (100×) (Gibco) を添加した。感染 *Terebella* sp. から抽出した 6 個体の SS のうち、3 個体は通常の L-15 培地、残りの 3 個体は L-15-3 培地を満たした 48 well プレート (IWAKI) の各 well に 1 個体ずつ収容し、15°C で維持して毎日 1 回倒立顕微鏡下で観察した。

セルカリアを産生するスポロシストから放出されるセルカリアの計数

セルカリアを産生するスポロシスト (Cercariogenous sporocyst : CS) からのセルカリアの放出数を調べるために、CS の培養を試みた。予備実験において、CS を L-15 培地に投入すると、翌日に体内の全てのセルカリアを放出する個体が数個体見られた。そのため、感染 *Terebella* sp. から抽出した 6 個体の CS を、L-15 培地を満たした 48 well プレートに各 well につき 1 個体ずつ収容し、そこから放出されるセルカリア数を倒立顕微鏡下で計数した。

また、放出されたセルカリアの生存能力を調べるために、紫外線殺菌海水中で 5 日間観察した。試験期間中、全ての培地や殺菌海水は 15°C で維持した。

結 果

スポロシストを産生するスポロシスト (SS)

記載：*Terebella* sp.の体腔内で CS とフリーな状態で混在。体形は滑らかな紡錘形で、CS と類似 (Fig. 3-1 参照)。長さ 462~714 μm (平均 563 μm)、幅 156~240 μm (平均 191 μm) (n=11)。5~20 個体程の小さな娘スポロシストと胚、もしくは多数のセルカリアを含有。産孔あり。

備考：1月に採集した Table 4-1 の No.2 および 4 の感染 *Terebella* sp.は、どちらも各 5 個体ずつスポロシストを含有しており、そのうち 4 個体は SS で、残りの 1 個体はその体内に未発達の胚を含んだ他よりも明らかに小さいスポロシストであったことから、これらの *Terebella* sp.は感染初期と推測された (Table 4-1 参照)。10月に採集された 1 個体の感染 *Terebella* sp. (No.8) から、娘スポロシストとセルカリアの両方を同時に含有するスポロシストが認められた。SS をスライドグラスとカバーグラスで圧平すると、その圧力により内部の娘スポロシストが産孔より押し出された。娘スポロシストはその体内に多数の胚を含んでいたが、それがスポロシストに発達するのかセルカリアに発達するのかは確認できなかった。

培地内におけるスポロシストの観察

SS は L-15 培地内で 2~63 日間 (Table 4-2 の A, B, C), L-15-3 培地内で

1~4日間 (D, E, F) 生存した。B, C および E の SS は娘スポロシストを放出する前に死亡したが、娘スポロシスト (6~14 個体) は死亡した SS 体内で生きていた。そのため、死亡した SS から娘スポロシストを取り出して、同じ培地内で培養を継続した (Fig. 4-1A)。A および D の SS は自発的に娘スポロシストを放出した ; D は娘スポロシストを 1 個体のみ放出し、A は培養を開始してから 11, 16, 20, 21 日目に 1 個体ずつ計 4 個体の娘スポロシストを放出した (Fig. 4-1B)。産出された娘スポロシストを SS と同様に維持したところ、L-15 培地内で 6~66 日間、L-15-3 培地内で 7~32 日間生存した (Table 4-2)。

娘スポロシストの外観は成熟したスポロシストと類似していたが、それらは体内に多数の胚を含んでいた。娘スポロシストは L-15 培地内において最長 66 日間生存したが、その間、体サイズの増大や体内の胚のスポロシストやセルカリアへの分化は認められなかった。娘スポロシストのサイズは、長さ 122~255 μm (平均 209 μm)、幅 31~44 μm (平均 38 μm) (n=18) であった。

セルカリア放出数

5 個体の CS が L-15 培地に投入された翌日に体内の全てのセルカリアを放出した。セルカリア放出数は 8~75 個体であった (Table 4-3)。放出された全てのセルカリアは紫外線殺菌海水中で 5 日間以上生存した。

考 察

本研究において、*C. opisthorchis* の中間宿主である *Terebella* sp. 体内において SS を確認した。この発見は、*C. opisthorchis* が中間宿主内で無性的に

増殖する（スポロシストが多数の娘スポロシストを産生し得る）ことを示している。これは海産魚類住血吸虫の SS に関する最初の報告である。

魚類住血吸虫科に属す *Sanguinicola inermis* では、母スポロシスト (= SS) がこれまでに見つかっていないことについて、Kirk & Lewis (1993) は、母スポロシストのステージは娘スポロシストが発生した後には持続しないのではないかと推察した。さらに、彼らは *S. inermis* のセルカリアは娘スポロシストから膜壁を破って出てくるのではないかと述べている (Kirk & Lewis, 1993)。彼らの観察と推察から、*S. inermis* の娘スポロシストも母スポロシストから膜壁を破って出てくる可能性があると考えられる。それに対して、*C. opisthorchis* の SS は *Terebella* sp. 体内において CS と同居することを確認した。さらに、娘スポロシストやセルカリアが SS や CS の膜壁を破らずに放出され、SS や CS が放出後も生存していたことを確認したが、その後、その SS や CS がさらに娘スポロシストやセルカリアを産生できるかどうかは本研究では確認することができなかった。哺乳類の住血吸虫科に属する *Schistosoma rodhaini* では、娘スポロシストは母スポロシストの外壁を破って脱出し、そのセルカリアは娘スポロシストの産孔から放出される (Théron & Touassem, 1989)。このようなことから、*C. opisthorchis* と *S. inermis* は、同じ科に属しているが、スポロシストからのセルカリアや娘スポロシストの放出様式は異なるのかもしれない。

Cribb et al. (2003) は、二生類 (Digenea) の娘スポロシストは母スポロシストと似た形状をしていると論じている。*C. opisthorchis* のスポロシストやセルカリアはスポロシストの膜壁を破ることなく脱出するため、ミラシジウムから発達した最初の SS がその娘スポロシストとともに存在し、今回観察された SS に含まれていた可能性はあるが、それを見分けることはできなかった。このことを解明するためには、ミラシジウムを使った感染実験が必

要である。

軟体動物体内における哺乳類の住血吸虫類の幼生の増殖過程については過去に研究されている；*Schistosoma mansoni* (Théron & Jourdane, 1979； Jourdane et al., 1980), *S. haematobium* (Kechemir & Théron, 1980), *S. bovis* (Touassem & Théron, 1986), *S. rodhaini* (Théron & Touassem, 1989)。 Jourdane & Théron (1987) は、スポロシストによるスポロシストの産生には3つの異なる経路があると述べている。すなわち、直接的なスポロシストの産生、セルカリア産生の後のスポロシストの産生、およびスポロシストとセルカリアの同時産生である。本研究においては、娘スポロシストとセルカリアを同時に含有するスポロシストを確認した。哺乳類の住血吸虫類と同様に、*C. opisthorchis* においても複数の経路でスポロシストが産生される可能性がある。

今回、L-15 培地を用いて SS と娘スポロシストの培養を試みた。試験期間内に娘スポロシスト体内の胚がスポロシストやセルカリアに分化することは確認できなかったが、1 個体の SS と 1 個体の娘スポロシストはそれぞれ 60 日以上生存した。これは *C. opisthorchis* のスポロシストの寿命が長いことを示しており、L-15 培地よりもおそらく適した環境である *Terebella* sp. の体内ではさらに長い期間生存することを示唆している。この長い生存期間中に、スポロシストはセルカリアや娘スポロシストを産生し続ける可能性がある。

今回の調査において、天然海域から採集した *Terebella* sp. 1 個体に最高約 1,800 個体のスポロシストが含まれていたことを確認しており、また、L-15 培地内において CS が最高 75 個体のセルカリアを放出したことを確認している。これらのことから、1 個体の感染 *Terebella* sp. から最大で 135,000 個体のセルカリアが放出され得ると試算される。このような高いセルカリア産生能力を持つ *Terebella* sp. が、養殖生簀というクロマグロに非常に近い場所に

生息していることから、クロマグロ住血吸虫症対策では養殖場周辺の *Terebella* sp.の量を減らすことが重要である。

海産多毛類体液の浸透圧は海水とほぼ同等であるため、塩分を 3%に調整した培地の方が低塩分培地よりもスポロシスト培養試験に適していると予想したが、それよりも塩分無調整の L-15 培地の方がスポロシストの生残期間は長かった。このデータは今後のスポロシスト培養実験に役立つと考えられる。

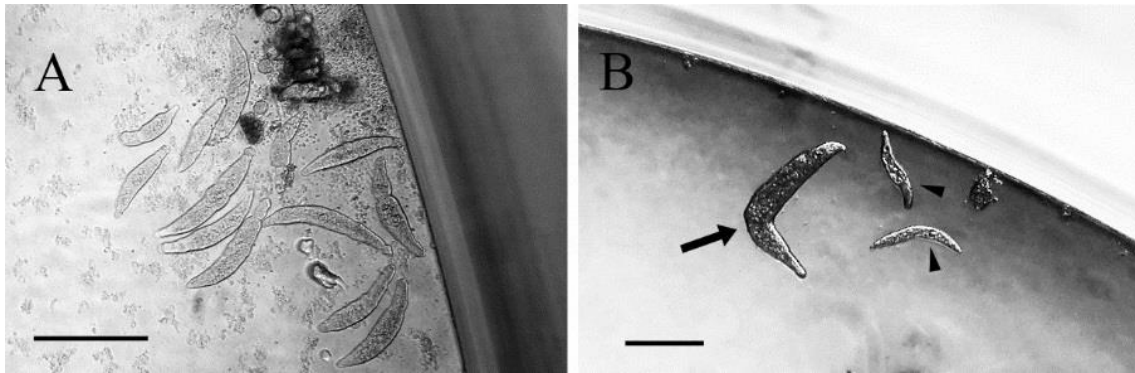


Fig. 4-1 Sporocysts of *Cardicola opisthorchis* in L-15 medium. (A) Daughter sporocysts which came out of a dead sporocystogenous sporocyst. (B) Sporocystogenous sporocyst (arrow) and spontaneously released daughter sporocysts (arrowheads). Scale bars: 200 μ m.

Table 4-1 Status of sporocystogenous sporocysts of *Cardicola opisthorchis* in the intermediate polychaete host *Terebella* sp.

Polychaete	Collection month	No. of sporocysts contained	Ratio of sporocystogenous sporocysts	Contents of sporocystogenous sporocysts
1	January	450	about 1/10	daughter sporocysts and germinal masses
2	January	5	4/5	daughter sporocysts and germinal masses
3	January	25	6/25	daughter sporocysts and germinal masses
4	January	5	4/5	daughter sporocysts and germinal masses
5	February	200	about 1/4	daughter sporocysts and germinal masses
6	February	200	about 1/3	daughter sporocysts and germinal masses
7	March	100	about 1/2	daughter sporocysts and germinal masses
8	October	650	3/650	both daughter sporocysts and cercariae simultaneously
9	November	56	20/56	daughter sporocysts and germinal masses

Table 4-2 *In vitro* survival of sporocystogenous sporocysts and released daughter sporocysts of *Cardicola opisthorchis*.

Sporocystogenous sporocyst	Survival time (day)		No. of daughter sporocysts released (or removed) from sporocystogenous sporocyst	Medium
	Sporocystogenous sporocyst	Daughter sporocyst		
A	63	6-29	4	L-15
B	3	13-66	8	L-15
C	2	12-52	6	L-15
D	4	22	1	L-15-3
E	3	14-31	14	L-15-3
F	1	7-32	9	L-15-3

A and D: Sporocystogenous sporocyst released daughter sporocysts spontaneously.

B, C, E and F: Sporocystogenous sporocyst died before releasing daughter sporocysts. Daughter sporocysts were isolated from the dead sporocystogenous sporocyst.

Table 4-3 Number of cercariae released from cercariogenous sporocysts of *Cardicola opisthorchis* in L-15 medium.

Cercariogenous sporocyst	No. of cercariae released
G	8
H	9
I	30
J	50
K	75
L	-

Sporocyst L did not release cercariae.

第二節 中間宿主 *Terebella* sp.に移植した *C. opisthorchis* スポロシストの増殖動態

前節において、*C. opisthorchis* の中間宿主である *Terebella* sp.の体内に、多数の娘スポロシストを含有するスポロシスト（Sporocystogenous sporocyst : SS）を見出し、*Terebella* sp.体内でスポロシストが増殖する可能性が示唆された。魚類住血吸虫における中間宿主体内での幼生の発達に関する知見は少なく、*C. opisthorchis* 幼生の発達について研究するには、そのミラシジウムを *Terebella* sp.に感染させて観察を行うことが最も確実な方法であるが、ミラシジウムを入手するのは難しい。

哺乳類の住血吸虫では、過去に *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. bovis* および *S. japonicum* において、中間宿主である巻貝へのスポロシストの移植実験が行われている（Jourdane & Théron, 1980 ; Jourdane et al., 1981, 1984, 1985）。また、マンソン住血吸虫 *S. mansoni* では、巻貝内の娘スポロシストがセルカリアの産生をやめてスポロシストを産生するプロセスが報告されている（Jourdane et al., 1980）。

本節では、*C. opisthorchis* のスポロシストを *Terebella* sp.に移植し、中間宿主体内での *C. opisthorchis* 幼生の発達の様子を観察した（Sugihara et al., 2017）。

材料および方法

ドナー *Terebella* sp.

2014年11月25日に長崎県対馬市のクロマグロ養殖生簀羅の付着物から採集した *Terebella* sp.のうち、体内にスポロシストが見られた1個体を

ドナーとして使用した。ドナー体内のスποロシストは種特異的な PCR によって *C. opisthorchis* であることが確認された。なお、ドナー体内のスποロシストは全てセルカリアを含有したスποロシスト (Cercariogenous sporocyst : CS) であった。

レシピエント *Terebella* sp.

2014 年 10 月 28 日に対馬市のクロマグロ養殖生簀羅から採集され、検鏡検査によってスποロシストに感染していないことが確認された *Terebella* sp. をレシピエントとして使用した。検鏡での見落としや、ミラシジウムの感染がないことを確認するために、約 1 ヶ月間滅菌海水中で維持し、再度検鏡にてスποロシストに感染していないことを確認した後、試験に使用した。

移植方法

実体顕微鏡下で解剖してドナーから取り出したスποロシストを 26 G 注射針付き 1 ml 注射筒で吸い込み、レシピエント 5 個体の体腔内に数個体ずつ注入する方法でスποロシストの移植を行った。移植を終えたレシピエントは、1%の Antibiotic-Antimycotic (100×) (Gibco) を添加した滅菌海水 20 ml を入れた 25 cm² 細胞培養用フラスコ (Iwaki) に各々収容して 20°C のインキュベータ内で維持し、3~10 日ごとにスライドガラスとカバーガラスで圧平して、光学顕微鏡下で体内のスποロシストの様子を観察した。観察期間中は、週 2 回程度、餌料用微細藻類のパブロバ *Pavlova lutheri* を給餌した。

結 果

スポロシストの移植を試みた 5 個体のレシピエントのうち、2 個体の体腔内に各 2 個体のスポロシスト (CS) を移植することに成功した (Fig. 4-2A)。移植 17 日後にそれらレシピエント体腔の CS の体内にセルカリアに混じって娘スポロシストらしきものが見られるようになり (Fig. 4-2B), 移植 25 日後にはレシピエント 1 個体の体腔内に CS より産出された娘スポロシスト 3 個体が観察された (Fig. 4-2C, 4-3A)。移植した CS の体内は、娘スポロシストを放出した後も常に娘スポロシストで満たされていた。産出された娘スポロシストが成長すると、その体内に娘スポロシストが確認された (Fig. 4-2D)。つまり、移植した CS がスポロシストを産生するスポロシスト (SS) に変化して娘スポロシストを産出し、さらに産出された娘スポロシストが娘スポロシストを産出することによってレシピエント体腔内のスポロシスト数が増加した (Fig.4-4)。

レシピエント体腔内においては、移植 38 日後に体内に多数のセルカリアを含有するスポロシスト (CS) が出現し (Fig. 4-2E), 移植 46 日後にはその CS の割合が 3 割を超えた。移植 51 日後には、1 個体のレシピエントの体腔内において、スポロシストが 136 個体にまで増加し (Fig. 4-2F, 4-3B, 4-4), スポロシストから放出されたセルカリアが観察されたが、もう一方のレシピエントは死亡した。移植 57 日後にレシピエント体外に 14 個体のセルカリアが放出され (Fig. 4-2F), その背疣足 (notopodia) 基部の膨らみにセルカリアが集積しているのが確認された (Fig. 4-3C)。その翌日には 105 個体のセルカリアの放出が確認されたが、さらにその翌日にレシピエントが死亡したため試験を終了した。

移植されたスポロシストの長さは、移植直後は約 450~820 μm (平均 675

μm) (n=4)であったが、次第に大きくなり、移植 38 日後には約 1,120~1,330 μm (平均 1,200 μm) (n=4) に達した。一方、産出された娘スポロシストの長さは約 120~900 μm で、SS と CS でサイズの違いは認められなかった。また、移植されたスポロシストは娘スポロシストよりも黒っぽく見えた。このサイズと色の特徴から、移植された 2 個体ずつのスポロシストは娘スポロシストと容易に判別することが可能であった (Fig. 4-3D)。

考 察

レシピエント体腔内においてセルカリアを含有していたスポロシスト (CS) が娘スポロシストを産生して放出したことから、移植したスポロシストがセルカリア産生スポロシスト (CS) からスポロシスト産生スポロシスト (SS) へと変化することが示された。さらに、娘スポロシストを放出した後も、体内には常に娘スポロシストが充満していたことから、娘スポロシストの産生・放出を繰り返すことが示唆された。また、産出された娘スポロシストも SS となって娘スポロシストを産出することが確認されたことから、何世代かにわたって SS が出現し、*Terebella* sp. 体腔内でスポロシストが増殖することが強く示唆された。

これは中間宿主体内における住血吸虫の成長観察に成功した初めてのケースである。クロマグロ住血吸虫 *C. orientalis* の中間宿主 *Nicolea gracilibranchis* は大型であるため、*Terebella* sp. のように体壁を通して内部を観察することが難しい。この意味で、*Terebella* sp. と *C. opisthorchis* の組合せは中間宿主体内の住血吸虫の成長を観察するのに優れた実験モデルと言える。

吸虫類の幼生については、環境要因によって娘スポロシスト産生や娘レジ

ア産生からセルカリア産生へと転換する事例がいくつか報告されている。Jourdane & Théron (1987) は、哺乳類の多くの *Schistosoma* 属住血吸虫の娘スポロシストは、中間宿主である巻貝の特定の部位に移動するとセルカリアを産生し始めると報告している。また、Dinnik & Dinnik (1964) によると、反芻動物の肝蛭症の原因寄生虫である *Fasciola gigantica* のレジアは 16°C 以下では娘レジアしか産生しないが、平均最大温度が 20°C を超えると直ちにセルカリア産生へと切り替わる。Lie & Nasemary (1973) は、イロコス棘口吸虫 *Echinostoma ilocanum* のレジアが宿主である巻貝の心臓腔から内臓へ移動した後すぐにレジア産生からセルカリア産生に切り替わったのは、宿主サイズが小さかったからと推察している。*C. opisthorchis* の幼生は *Terebella* sp. の体腔内で SS と CS が混在しているため、セルカリアを産生し始めるポイントは寄生部位ではないと考えられる。また、今回は 20°C の一定の温度条件で実験を行ったため、温度変化が関与している可能性も低い。考えられることとしては、感染からの期間や *Terebella* sp. 体腔内のスポロシストの密度が関与している可能性があるが、これらの仮説を証明するには更なる研究が必要である。

スポロシストの再生産については、マンソン住血吸虫 *S. mansoni* でいくつか報告されている。Lie (1969) は、長期間の単独寄生か、他種吸虫類のレジアとの中間宿主体内での対立によって著しく変質させられた娘スポロシストからのみ第 3 世代のスポロシストが生産されたと報告しており、Jourdane et al. (1980) は、寄生の持続時間が 26°C で 40 日を超えれば、例外なくセルカリア産生を止めてスポロシスト産生に切り替わるステージが出現すると報告している。一方、Hansen (1973) は、自然感染後 14 日という早い時期の巻貝内において娘スポロシストを含有する娘スポロシストを確認している。本研究では、*Terebella* sp. 体腔内に移植した *C. opisthorchis* のセルカリア産

生スポロシスト (CS) が娘スポロシストを産出した。*C. opisthorchis* のスポロシストの再生産のメカニズムはまだ解っていないが、マンスン住血吸虫のようにある一定期間が経過するとセルカリア産生からスポロシスト産生へと切り替わるのかもしれないし、あるいは、*Terebella* sp. 体腔内のスポロシスト数が少ないことに反応して、数を増やす戦略としてセルカリア産生をやめてスポロシスト産生に変化した可能性も考えられる。いずれにせよ、*C. opisthorchis* のスポロシストが *Terebella* sp. の体腔内においてセルカリア産生からスポロシスト産生へ変化することができるのならば、一旦 *Terebella* sp. への寄生が成立すると、その *Terebella* sp. が死ぬまで寄生が継続する可能性が考えられる。

移植した直後のスポロシストの長さ (約 450~820 μm) は、第二章で記載したスポロシストの長さ (347~829 μm) の範囲内であったが、その後、これらのスポロシスト (移植第一世代) は成長し、1,330 μm にまで達した。これは第二章で記載したスポロシストの最長値の 1.5 倍である。一方、移植第二世代以降の娘スポロシストは、SS, CS に関わらず約 120~900 μm で、ほぼ第二章および前節で記載したスポロシストの長さ (122~255 μm (放出直後), 347~829 μm) の範囲内であった。このことから、*C. opisthorchis* のスポロシストは、セルカリア産生からスポロシスト産生へ切り替わることで、通常よりも大きく成長する可能性が考えられた。

移植 57 日後に、*Terebella* sp. 体腔内の背疣足基部の膨らみにセルカリアの集積が認められ、その翌日に 105 個体のセルカリアが *Terebella* sp. 体外へ放出されたが、その *Terebella* sp. は次の日に死亡した。このことから、セルカリアが *Terebella* sp. の体壁に穴を開けて脱出した可能性が考えられた。しかし、他の実験において、天然海域で採集した *C. opisthorchis* 感染 *Terebella* sp. は 3 ヶ月以上に亘って無傷で生き続け、その間、ほぼ毎日のように数個体

から 2 万個体程のセルカリアを放出し続けた（未公表データ）。これらのことから、セルカリアは *Terebella* sp. の腎管突起（nephridopore）を通過して体外へ脱出した（放出された）可能性もあると考えられた。

今回の試験では、スポロシストの移植に成功した 2 個体の *Terebella* sp. 体腔内においてセルカリアが産出され、うち 1 個体の *Terebella* sp. の体外へセルカリアが放出されるまで観察することができた。第三章の調査では、クロマグロ養殖場において、その体腔内に数百個体（最大 1,800 個体）のスポロシストが寄生している *Terebella* sp. を確認しているが、これらのスポロシストは、今回の移植実験の結果から、おそらく 1 個体～数個体のミラシジウムの感染から始まったものと推察された。今回の試験は 2 個体の *Terebella* sp. を用いた 1 回のみでの観察結果である。*C. opisthorchis* 幼生の詳細な増殖様態を解明するには、さらに長い期間観察して、スポロシストの寿命や再生産の動態、およびセルカリアの放出量等のデータを収集するとともに、ミラシジウムによる *Terebella* sp. への感染実験も必要と思われる。

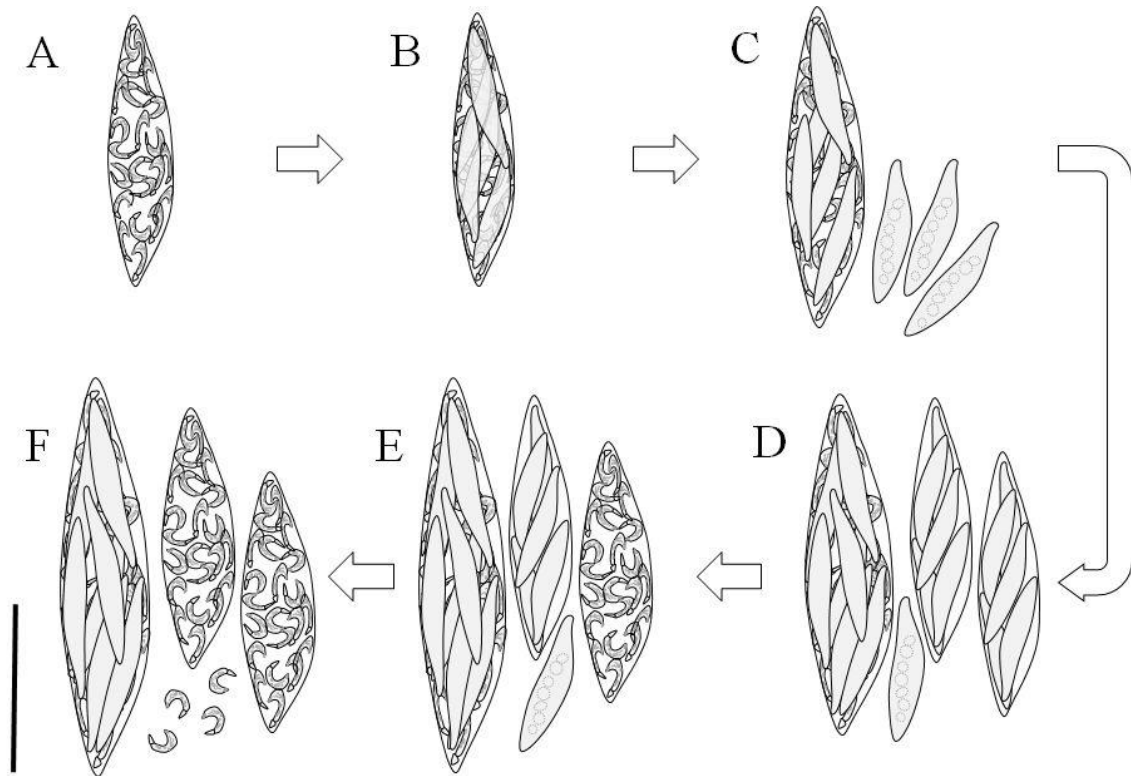


Fig. 4-2 Morphological changes of sporocysts of *Cardicola opisthorchis* inside the recipient polychaete, *Terebella* sp. (A) Transplanted sporocyst; sporocyst containing a large number of cercariae. (B) At 17 days after transplantation (d.a.t.); daughter sporocysts were seen inside the sporocyst. (C) At 25 d.a.t.; three daughter sporocysts were released from the first generation sporocyst. (D) At 31 d.a.t.; further daughter sporocysts were seen inside the released daughter sporocysts. (E) At 38 d.a.t.; daughter sporocysts that contained cercariae were seen. (F) At 51 d.a.t.; free swimming cercariae were seen inside the polychaete. Scale bar 500 μ m.

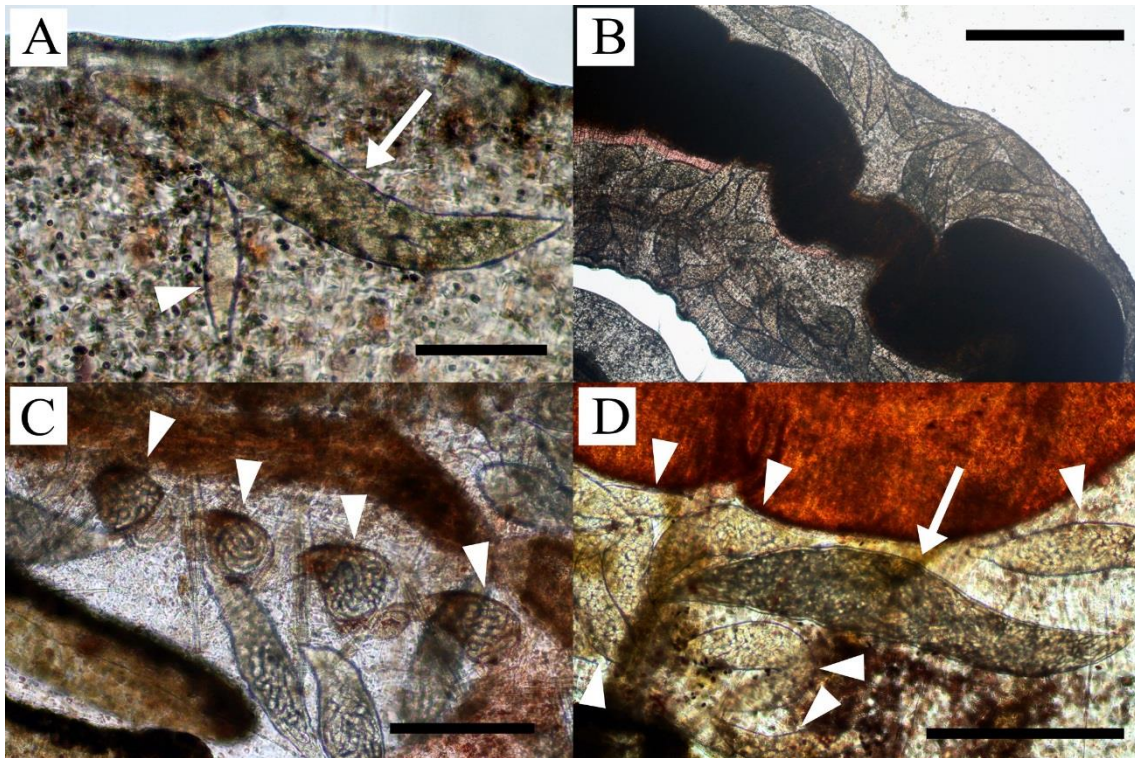


Fig. 4-3 *Cardicola opisthorchis* larvae inside the polychaete into which the sporocysts had been transplanted. (A) Transplanted sporocyst (arrow) and released daughter sporocyst (arrowhead) at 17 days after transplantation (d.a.t.) (B) Daughter sporocysts that had multiplied at 51 d.a.t. (C) Cercariae accumulated inside the bulge of the ventral base of the notopodia (arrowheads) of the polychaete. (D) Transplanted sporocyst (arrow) is larger and darker in color (more blackish) than daughter sporocysts (arrowheads). Scale bars (A and C) 200 μm ; (B) 1 mm; (D) 500 μm .

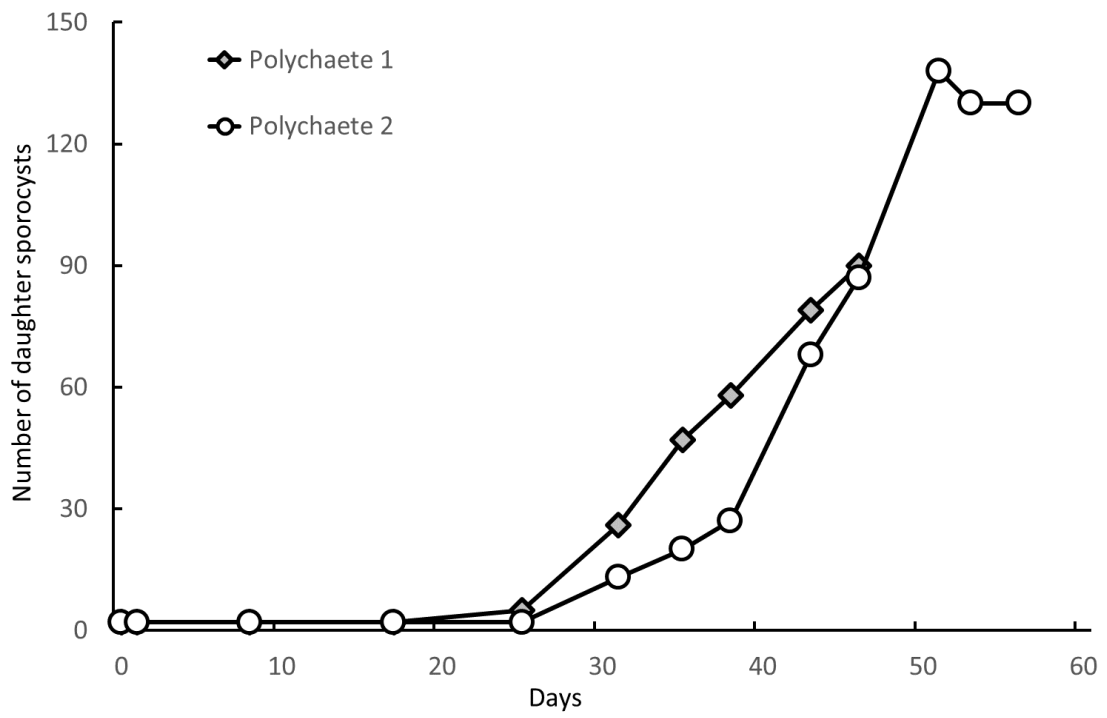


Fig. 4-4 Changes in number of daughter sporocysts produced inside the two polychaetes.

第五章 クロマグロ養殖場への侵入経路の解明

これまで、長崎県の養殖クロマグロからは *C. orientalis* と *C. opisthorchis* の 2 種の住血吸虫が報告されている (Ogawa et al., 2010 ; Ogawa et al., 2011)。そのうち *C. opisthorchis* については、第二章において養殖生簀の付着物内に生息するフサゴカイ *Terebella* sp. が中間宿主となり養殖場内で生活環が回っていることを明らかにしたが、*C. opisthorchis* の養殖場への侵入経路については明らかでない。他方、天然クロマグロにおける *C. orientalis* および *C. opisthorchis* の寄生については、地中海の大西洋クロマグロにおいて確認されている (Palacios-Abella et al., 2015) もの、日本の太平洋クロマグロでは確認されていない。

そこで、本章では、天然種苗による養殖場への住血吸虫供給の可能性を検討するため、採捕時の天然種苗における住血吸虫 2 種の寄生状況を調査した (Sugihara et al., 2016)。

材料および方法

天然種苗サンプル

長崎県五島沖において、養殖用種苗として曳縄もしくは巻網にて採捕された天然クロマグロ幼魚 4 漁獲群 (2011 年, 2013 年, 2014 年曳縄, 2014 年巻網) 合計 532 尾を供試魚として使用した。供試魚の情報 (採捕期間, 検体数, 魚体重, 尾叉長) を Table 5-1 に示す。供試魚は、採捕後養殖場に導入される前に死亡した個体を使用し、それらは検査まで冷凍で保管した。

住血吸虫の検出

C. opisthorchis の虫卵は鰓全体に分布し、*C. orientalis* の虫卵は第二鰓弓の中央部に多く分布する (Shirakashi et al., 2012a)。そのことから、左鰓の第二鰓弓の中央部付近の一次鰓弁を 50 枚切り出し、それを検鏡する方法で虫卵の検出を行った。虫卵の種はその形状と寄生部位により判別した。すなわち、*C. opisthorchis* の虫卵は三日月形で小入鰓動脈に分布し、*C. orientalis* の虫卵は楕円形で鰓薄板に分布する (Shirakashi et al., 2012a)。検鏡検査で見落とした虫卵や鰓に寄生している虫体を検出するために鰓の PCR 検査を行った。すなわち、各検体につき鰓弁 1 枚を取り出し (虫卵が確認されたものは、その鰓弁を用いて)、第三章で示した PCR によって種を判別した。

C. opisthorchis の虫体は心臓に寄生し (Ogawa et al., 2011)、*C. orientalis* の虫体は鰓と心臓に寄生する (Ogawa et al., 2010) ため、心臓を検査することにより住血吸虫 2 種の虫体の検出を行った。解剖して取り出した心臓を、生理食塩水を満たしたシャーレの中でほぐし、出てきたものを全て集めてスライドグラスに乗せて検鏡した。鰓に寄生している *C. orientalis* の虫体は鰓の動脈内にいるため、見つけるのが非常に難しい。そのため、鰓の検鏡検査において *C. orientalis* の虫卵が確認された検体のみ、鰓の虫体の検鏡検査を試みた。すなわち、生理食塩水を満たしたシャーレ内で虫卵が検出された鰓を柄つき針の腹でこそぎ、鰓の血管から出てきたものを検鏡した。検出した虫体は上記と同様の PCR により種判別を行った。

結 果

2011～2014 年に採捕されたクロマグロ種苗における *Cardicola* 2 種の検出率を Table 5-2 に示す。調査した全漁獲群から *C. orientalis* および *C.*

opisthorchis の両種が検出された。その検出率は *C. opisthorchis* の方が *C. orientalis* よりも高い傾向がみられ、PCR の方が検鏡検査よりも常に高かった。2011 年の曳縄種苗においては、検鏡検査では虫体も虫卵も検出されなかったにも関わらず、PCR 検査では住血吸虫 2 種ともに全漁獲群中最も高い検出率が得られた。また、心臓から得られた虫体は全て *C. opisthorchis*、鰓から得られた虫体は全て *C. orientalis* であった。

考 察

養殖用種苗として採捕されたクロマグロ天然種苗 4 漁獲群全てにおいて、クロマグロ住血吸虫の *C. orientalis* および *C. opisthorchis* が検出された。天然の太平洋クロマグロでの上記 2 種の住血吸虫の寄生は初確認である。このことから、住血吸虫に感染した天然種苗によって住血吸虫が養殖場に供給されると推察された。

本研究で調査した種苗の漁獲群を導入した五島のクロマグロ養殖場では、住血吸虫症の発生と *C. opisthorchis* の中間宿主である *Terebella* sp. の生息が確認されている。*Terebella* sp. が生息する養殖場では *C. opisthorchis* の生活環が回る可能性が高いことを第二章で述べた。このことから、この養殖場に住血吸虫に感染した天然種苗を導入すると、持込まれた住血吸虫が養殖場内の中間宿主 *Terebella* sp. に感染し、住血吸虫の生活環が成立し、その生活環の維持に寄与することが強く示唆された。

住血吸虫の検出率は漁獲群によって大きなバラつきが見られた。各漁獲群は、魚群のサイズや魚群が形成される漁場が異なることから、これらを一概に比較することは難しいが、2011 年曳縄種苗の鰓の PCR での検出率 (*C. opisthorchis* が 74.6%, *C. orientalis* が 20.9%) や、2014 年巻網種苗の鰓の

検鏡検査での検出率（*C. opisthorchis* が 20.6%，*C. orientalis* が 11.5%）は比較的高かった。このことから，天然海域でも高い確率で住血吸虫の寄生を受けることが分かった。

一方，2013 年曳縄種苗における検出率は，鰓の PCR で *C. opisthorchis* が 4.1%，*C. orientalis* が 1.0%と低かった。しかしながら，*C. opisthorchis* の成虫は 1 個体当たり 16,600 個の卵を産出し（Shirakashi et al., 2012a），卵から孵化したミラシジウムが *Terebella* sp.に感染する。さらに，感染された *Terebella* sp.は 1 個体で最大 135,000 個体のセルカリアを放出し得ることを第三章で試算した。このことから，仮に養殖場に導入された天然種苗の住血吸虫の寄生率が低くても，その漁場に *Terebella* sp.が生息していれば，産卵と中間宿主内の幼生ステージで増殖し，他のクロマグロへ感染が拡大することが予想される。

C. opisthorchis の検鏡検査の結果を見ると，曳縄種苗（3 群）の検出率は 0～4.3%であったのに対し，2013 年の巻網種苗の検出率は心臓の虫体が 11.5%，鰓の虫卵が 20.6%と比較的高かった。平均魚体重が 253～445 g であったことから，曳縄種苗（3 群）はその年の春に東シナ海南部で生まれた当歳魚である可能性が高く（Tanaka & Suzuki, 2015），2013 年巻網種苗は平均魚体重が約 2.6 kg であったことから，前年生まれで 1 歳前後であると考えられる（伊藤, 2009）。このことから，2013 年巻網種苗の方が曳縄種苗（3 群）よりも長い期間生きているため，魚体内で成長した虫体またはそこから放出された虫卵が多く検出された可能性が高い。

2011 年の曳縄種苗は，鰓の PCR 検査では *C. opisthorchis* と *C. orientalis* の検出率はそれぞれ 74.6%と 20.9%と高かったが，鰓と心臓の検鏡検査で虫体は検出されなかった。これは本群が住血吸虫に感染しているが，その住血吸虫がまだ検鏡で検出されないステージであった可能性が考えられる。セル

カリアによる魚体への侵入からそれほど時間がたっておらず、虫体が小さくて検鏡では見つけられなかったのかもしれない。この結果から PCR は検鏡よりも感度が高い検出方法であり、感染の有無を調べるには鰓の PCR 検査が求められる。

クロマグロ住血吸虫の虫体の駆除にプラジクアンテル製剤が有効であることが知られている (Shirakashi et al., 2012b ; Ishimaru et al., 2013)。但し、その薬効は虫卵には低く、投薬後も鰓弁内の虫卵は発達し孵化するとの報告もある (Shirakashi et al., 2012b)。今回の調査結果では、全ての漁獲群から住血吸虫 2 種が確認され、また、検鏡よりも鰓の PCR 検査の方が、検出感度が高い傾向が見られた。このことから、天然種苗導入時に PCR 検査で住血吸虫の感染を調べ、感染していた場合はプラジクアンテルを投薬することにより、養殖場への住血吸虫の持ち込みを抑えることができると思われる。

Table 5-1 Information of Pacific bluefin tuna (PBT) caught off the Goto Islands, Nagasaki Prefecture.*

Fish group	Period caught	No. of fish	Average fish weight (g)	Average fork length (cm)
Troll-caught PBT in 2011	2011/Aug./27 ~2011/Sept./14	67	445 (158~968)	26.5 (19.5~34.8)
Troll-caught PBT in 2013	2013/July/19 ~2013/Aug./3	98	253 (116~609)	22.7 (17.8~29.5)
Purse seine-caught PBT in 2014	2014/May/3	321	2,571 (1,431~3,969)	49.6 (41.8~59.0)
Troll-caught PBT in 2014	2014/July/28 ~2014/Aug./29	46	357 (157~1,096)	25.1 (19.3~35.5)
Total no.		532		

* Parentheses indicate ranges.

Table 5-2 The detection rates of the two species of *Cardicola* in the juvenile Pacific bluefin tuna (PBT) caught between 2011 and 2014.

Fish group	Microscopy (%)						PCR (%)	
	Eggs in gills		Adults from heart *		Adults from gills *		Gill	
	<i>C. orientalis</i>	<i>C. opisthorchis</i>	<i>C. orientalis</i>	<i>C. opisthorchis</i>	<i>C. orientalis</i>	<i>C. opisthorchis</i>	<i>C. orientalis</i>	<i>C. opisthorchis</i>
Troll-caught PBT in 2011	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	20.9	74.6
Troll-caught PBT in 2013	0.0	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	1.0	4.1
Purse seine-caught PBT in 2014	0.0	20.6	0.0	11.5	0.0	0.0	1.9	32.1
Troll-caught PBT in 2014	2.2	4.3	0.0	2.2	2.2	0.0	4.3	13.0

* The species of adults were determined by the species-specific PCR.

第六章 長崎県の養殖場におけるクロマグロ住血吸虫 2 種の出現状況 および寄生動態

第一章で述べたとおり、長崎県のクロマグロ養殖場では 2002 年 3 月に *C. orientalis* による住血吸虫症が初めて確認されて以来、ほとんどのクロマグロ養殖場で毎年住血吸虫症が発生している。しかし、住血吸虫 2 種 (*C. orientalis*, *C. opisthorchis*) の出現状況や寄生動態の詳細な知見は不足している。

そこで、養殖場でのクロマグロ住血吸虫 2 種の出現状況を調べるために、2011～2014 年度に長崎県総合水産試験場に住血吸虫検査で持ち込まれたクロマグロにおける住血吸虫卵の出現状況と、住血吸虫が検出された魚体サイズについてデータをとりまとめた。また、沖出し後の日数経過によって、住血吸虫の出現部位がどのように変化するかを調べるために、2014 年および 2015 年に紫外線照射海水を用いて陸上水槽で生産された人工種苗を養殖場に沖出し後、毎日サンプリングし、部位毎に PCR 検査を行った。

材料および方法

出現状況調査

2011 年 4 月から 2015 年 3 月までに住血吸虫検査として長崎県総合水産試験場に持ち込まれたクロマグロ 1,071 検体 (2011 年度 : 435 検体, 2012 年度 : 325 検体, 2013 年度 : 142 検体, 2014 年度 : 169 検体) を供試魚として使用した。検体は養殖場で死亡し、養殖業者が住血吸虫症の疑いがあると判断したものである。魚体重を測定後、左鰓の第一鰓弓の中央部付近の一次鰓弁を 20 枚切り出し、それを検鏡する方法で鰓の虫卵の検出を行った。虫卵

の種はその形状と寄生部位により判定した。

人工種苗サンプル

2014年と2015年に長崎県総合水産試験場にて生産された人工種苗を各年度2ラウンドずつの計4回、長崎県五島市の養殖場に沖出しした。沖出し翌日からほぼ毎日潜水により回収された死亡魚を検体とし、日付毎にポリ袋に入れて、検査するまで冷凍で保管した。各ラウンドの検体情報をTable 6-1に示す。1日当たりの検体数は死亡状況によって変化し、2014年1ラウンドが6~26検体、2ラウンドが2~13検体、2015年1ラウンドが2~10検体、2ラウンドが1~11検体であった。沖出し直前の種苗は各ラウンド10検体の鰓をPCR検査し、住血吸虫が検出されないことを確認した。

各検体について、体重と尾叉長を測定後、各部位（鰓、皮膚、心臓、胃、頭腎、筋肉、血液）を採材した。鰓は左鰓の第一鰓弁を試料とした。メスを用いて魚体を2枚に卸し、左半身の皮膚をピンセットを用いて全て剥がし皮膚試料とし、皮膚を剥ぎ取った筋肉を筋肉試料とした。腎臓は右側の頭腎を採材し、血液は1ml注射器を用いて心臓から採取し、血液を抜き取った心臓を心臓試料とした。各試料からDNA mini Kit（キアゲン）を用いてDNAを抽出し、第三章と同様の種特異的なプライマーを用いたPCRによって*Cardicola* 2種の検出を試みた。また、心臓や鰓の住血吸虫（虫卵および虫体）を検鏡によって確認できる時期を特定するために、各ラウンド25日目以降のサンプルについては第五章の方法に準じて検鏡による検査を実施した。

結 果

出現状況

2011～2014 年度のクロマグロ住血吸虫検査における住血吸虫卵の検出検体数を Fig. 6-1 に、持ち込まれたクロマグロ検体の魚体重の分布を Fig. 6-2 に示す。検査した 1,071 検体のうち、429 検体（40%）から *C. opisthorchis* 卵が、171 検体（16%）から *C. orientalis* 卵が検出された。住血吸虫卵は 2 種ともほぼ周年認められたが、住血吸虫感染魚持ち込み数のピークは、*C. opisthorchis* が 9～3 月と 5、6 月、*C. orientalis* が 12～3 月であった。

持ち込まれた検体の魚体重は、1.3 g～8,680 g で、その内、住血吸虫卵が確認されたのは 2.0 g～8,680 g であった。また、持ち込まれた検体の 99%以上が 5 kg 未満であった。

沖出しした人工種苗からの住血吸虫の検出

人工種苗沖出しからサンプリング終了までの PCR による *Cardicola* 2 種の部位別検出率を Fig. 6-3 に示す。*C. orientalis* の検出率は全てのラウンドで鰓が最も高く、その他の部位は鰓と比べると 1/3 以下であった。*C. opisthorchis* の検出率が最も高かった部位は、筋肉（4 ラウンド中 2 ラウンド：以下 2/4）と血液（2/4）で、その次に検出率が高かった部位は心臓であった。それに対して、最も検出率が低かった部位は、*C. orientalis* では胃（2/4）、皮膚（1/4）、筋肉（1/4）および血液（1/4）で、*C. opisthorchis* では全てのラウンドで胃（4/4）からの検出率が最も低かった。

住血吸虫の魚体への侵入部位を検討するために、沖出し後 3 日間の部位別 *C. orientalis* 検出率を Fig. 6-4 に、沖出し後 3 日間の部位別 *C. opisthorchis* 検出率を Fig. 6-5 に示した。2015 年 1 ラウンドでは沖出し 3 日後に鰓から

初めて *C. orientalis* が検出されたが、その他の 3 ラウンドでは沖出し翌日の各臓器から住血吸虫 2 種が検出された。沖出し後 3 日間の部位別検出率を見ると、*C. orientalis* の検出率は、全てのラウンドで鰓が最も高く、2015 年 2 ラウンドでは心臓も鰓と同等の検出率であった。一方、*C. opisthorchis* の検出率は、3 ラウンドで鰓が最も高かったものの、2015 年 1 ラウンドでは皮膚が最も高く、また 2014 年 1 ラウンドでは頭腎も鰓と同等の検出率であった。

検鏡による虫体および虫卵の検査については、調査期間が比較的短かった 2014 年の 1 ラウンド (33 日間) および 2 ラウンド (30 日間) では住血吸虫 (虫体および虫卵) は検出されなかった。一方、調査期間が比較的長かった 2015 年においては、1 ラウンドは 43 日目、2 ラウンドは 42 日目にはじめて心臓に *C. opisthorchis* の虫体が確認され、鰓の虫卵は、2015 年の 1 ラウンドでは 44 日目、2 ラウンドでは 55 日目にはじめて確認された (Fig. 6-6)。

考 察

長崎県総合水産試験場に持ち込まれた養殖クロマグロ検体における住血吸虫卵の出現率は、*C. opisthorchis* (40%) が、*C. orientalis* (16%) の 2.5 倍であった。また、第五章の天然種苗における *Cardicola* 2 種の検出率についても、*C. opisthorchis* が *C. orientalis* よりも高かった (Table 5-2)。さらに、第二章および第三章でクロマグロ養殖生簀付着物内の中間宿主探索を行った際に、*C. opisthorchis* が寄生したフサゴカイ *Terebella* sp. は何度も見ついているのに対し、*C. orinetalis* については、その中間宿主であるフサゴカイ *Nicolea gracilibranchis* (Shirakashi et al., 2016 参照) は長崎県内のクロマグロ養殖生簀においてもごく普通に見られる種であるにも関わらず、*C. orientalis* の幼生が寄生した *N. gracilibranchis* は未だ見つかっていない。

他方、和歌山県では *C. orientalis* が寄生した *N. grancilibranchis* はかなりの量が見つかっているにも関わらず、*C. opisthorchis* の中間宿主 *Terebella* sp. は全く見つかっていない（白樫・小川，2016）。これらのことから、長崎県周辺漁場の環境は、*C. orientalis* よりも *C. opisthorchis* の生息に適している可能性が高いと考えられる。

持ち込まれた養殖クロマグロにおける住血吸虫卵が検出された個体数は、*C. opisthorchis* は9月頃から増加し、*C. orientalis* は12月頃から増加する傾向が見られた。クロマグロ養殖では、通常、7～8月頃から種苗（天然ヨコワおよび人工種苗）を導入することから、種苗導入から1～2ヶ月後に *C. opisthorchis* の虫卵保有魚の持込みが増加する。この現象は、後述する *C. opisthorchis* は魚体侵入後遅くとも40日前後で成虫になり、速やかに産卵するという結果ともよく一致する。すなわち、*C. opisthorchis* による住血吸虫症は、種苗導入後の養殖場内で感染が拡大している可能性が高い。それから2～3ヶ月遅れて *C. orientalis* の虫卵が増加しているが、*C. orientalis* については生活環の情報が少ないため、その理由の解明は今後の課題である。

持ち込まれたクロマグロの魚体重は1.3 g～8.7 kg で、住血吸虫卵が検出されたのは2.0 g～8.7 kg であった。魚体重が5 kg を超えると住血吸虫症の相談が極端に減少する。40 kg サイズでも鰓に *C. opisthorchis* の卵が見られる（未公表データ）が、約5 kg 以上になると住血吸虫が寄生していても養殖現場では斃死しなくなる。その理由としては、鰓の血管が太くなり虫卵が詰まらなくなる、もしくは、魚体が大きくなると相対的に鰓も大きくなるため、多少虫卵が詰まっても血流に影響が出難くなる可能性が考えられるが、今回の観察ではそれを明らかにすることはできなかった。

人工種苗を沖出しした翌日の死魚サンプルから PCR 検査によって *C. opisthorchis* は全ての部位（鰓、皮膚、心臓、胃、頭腎、筋肉、血液）から、

C. orientalis は鰓、皮膚、心臓、頭腎、筋肉から検出された。このことから、クロマグロ住血吸虫が生息する養殖場では、沖出しから最短で1日以内に住血吸虫が魚体内に侵入することが明らかとなった。

哺乳類の住血吸虫 *Schistosoma* のセルカリアは、終宿主の皮膚に触れると数分のうちに侵入する (McKerrow & Salter, 2002; He et al., 2005)。 *C. opisthorchis* のセルカリアについては、第二章において養殖生簀の付着物内に生息していた *Terebella* sp. から得られたセルカリアを、第四章において48well プレート内でスポロシストから放出されたセルカリアをそれぞれ観察したが、短い尾を激しく動かすものの、遊泳行動はほとんど見られなかった。また、顕微鏡下で生きた稚魚にセルカリアをかけて観察したが、セルカリアは活発に動いていたものの2時間経過しても体表および鰓から魚体内部に侵入する様子は認められなかった (未公表データ)。このことから、セルカリアが魚体内に侵入するには、ある程度の時間を要すると思われた。セルカリアが魚体にすぐに侵入できないのなら、受動的に鰓に引っかかるか、経口的に飲み込まれた後に血管系へ侵入するという仮説が立てられる。今回の結果から、胃での検出率は期間をとおして低かったことから、胃から侵入する可能性は低いと考えられる。沖出し後3日間のデータでは、 *C. orientalis* は全てのラウンドで鰓からの検出率が最も高く、鰓から魚体内に侵入するという仮説を支持する結果であったが、 *C. orientalis* は寄生部位が鰓であるため、鰓が侵入部位とするには更なる検証が必要である。他方、 *C. opisthorchis* も鰓からの検出率が高い傾向は見られたものの、ラウンドによっては鰓よりも皮膚からの検出率が高い場合もあったことから、皮膚から侵入する可能性も残った。本研究では、部位毎に住血吸虫の DNA を検出することによって、クロマグロへのセルカリアの侵入経路を解明しようとしたが、侵入部位を明確に示す結果は得られなかった。

人工種苗を沖出し後、*C. opisthorchis* の虫体が検鏡検査によって最初に心臓から検出されたのは 42 あるいは 43 日目であった。また、2011 年に五島の 2 養殖場で行った同様の予備調査では、それぞれ 39 日目と 41 日目に初めて心臓に *C. opisthorchis* の虫体が確認されている（未公表データ）。これらのことから、*C. opisthorchis* は、クロマグロの体内に侵入してから 40 日前後で心臓に虫体が出現すると考えられる。さらに、本調査の 2015 年 1 ラウンドでは、沖出し後 43 日目に最初に心臓に虫体が確認された翌日に鰓に虫卵が確認されており、また 2011 年の予備調査では沖出し後 41 日目に心臓で虫体が確認されたと同時に鰓で虫卵が確認されている。一方、2015 年 2 ラウンドでは沖出し後 42 日目に心臓に虫体が確認されたにも関わらず、鰓の虫卵は 55 日目まで確認されなかった。これらの検体は同一個体を経目的に見ているのではなく、また死亡魚を用いていることから、群全体の寄生動向を反映していない可能性はあるが、少なくとも心臓に虫体が確認された後、速やかに虫卵が産出されると推測される。本研究では虫体サイズの検討はしていないが、病魚の心臓で見られる虫体と同サイズであったことから、心臓で見られた虫体は成虫と考えられる。

各ラウンドの 30～57 日間の調査では、*C. orientalis* は鰓からの検出率が最も高かった (Fig. 6-3)。一方、*C. opisthorchis* は、筋肉、血液、心臓からの検出率が高い傾向が認められた。この中で注目したいのは *C. opisthorchis* が筋肉から高率で検出されている点である。前述したように、心臓に出現する *C. opisthorchis* は成虫である可能性が高い。一方、未成熟虫の生息部位は明らかとなっていない。本研究の沖出し 3 日間のデータを見ると、4 ラウンド中 3 ラウンドでは、*C. opisthorchis* は筋肉から検出されていない。にも関わらず、その後、筋肉からの検出率が高くなっている。これは、未成熟虫が筋肉中の血管に生息している可能性を示唆している。今後、この未成熟虫の

寄生動態についても明らかにしたい。

Table 6-1 Information of the artificial seeds of Pacific bluefin tuna used for this examination.

Rounds of seedling production	No. of introduced fish	No. of examined fish	Sampling preiod (Days)	Fork length (cm)	Fish weight (g)
Round 1 in 2014	4,264	382	2014/July/29 ~2014/Aug./30 (33)	3.3~14.6	0.3~47.6
Round 2 in 2014	5,270	267	2014/Sept./8 ~2014/Oct./7 (30)	3.4~16.3	0.4~89.7
Round 1 in 2015	3,340	172	2015/July/25 ~2015/sept./6 (44)	3.7~24.0	1.4~279.4
Round 2 in 2015	5,595	349	2015/Sept./11 ~2015/Nov./7 (57)	4.1~21.6	1.1~270.2
Total no.	18,469	1,170			

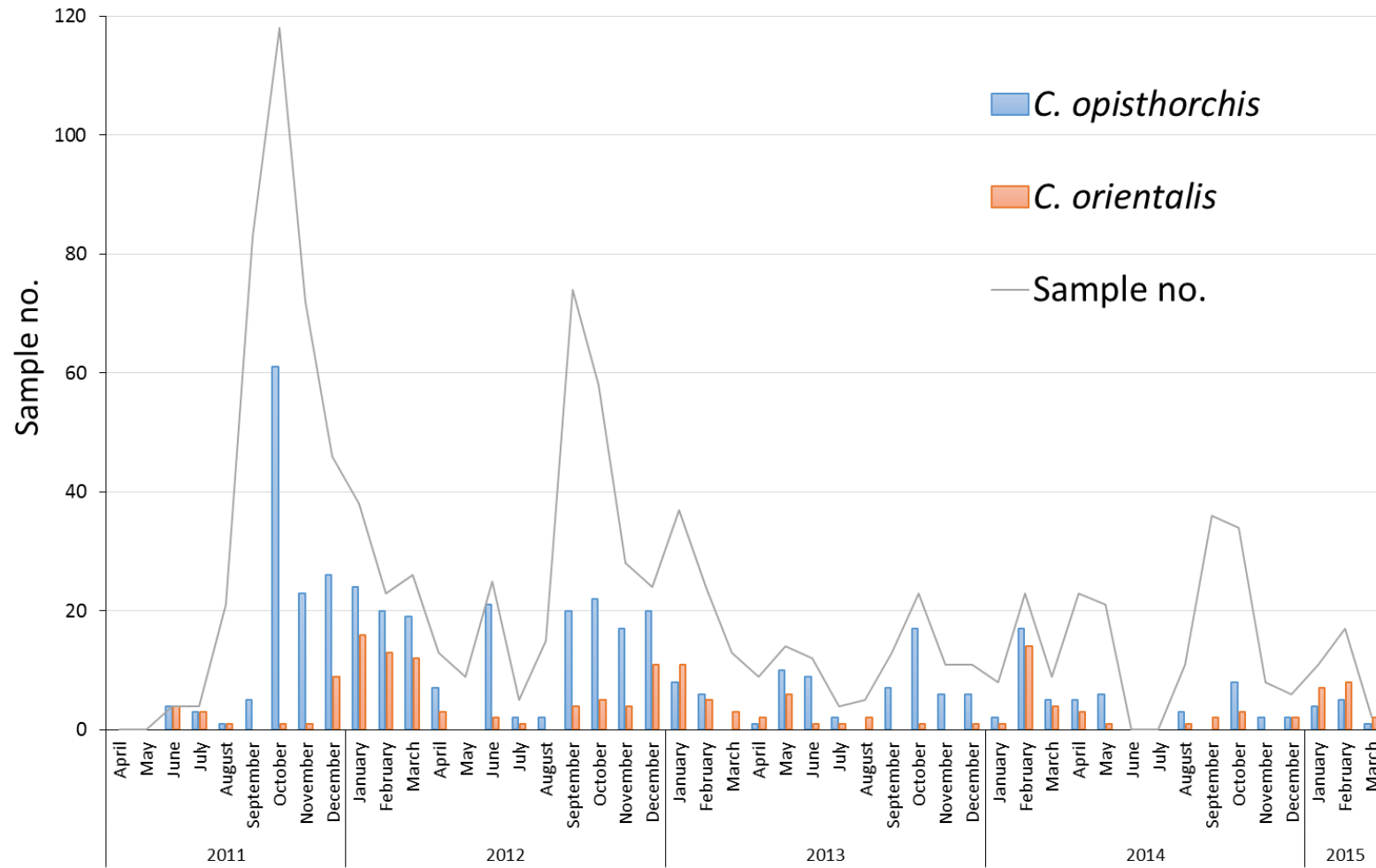


Fig. 6-1 Number of Pacific bluefin tuna specimens detected the blood flukes eggs in Nagasaki from 2011 to 2014.

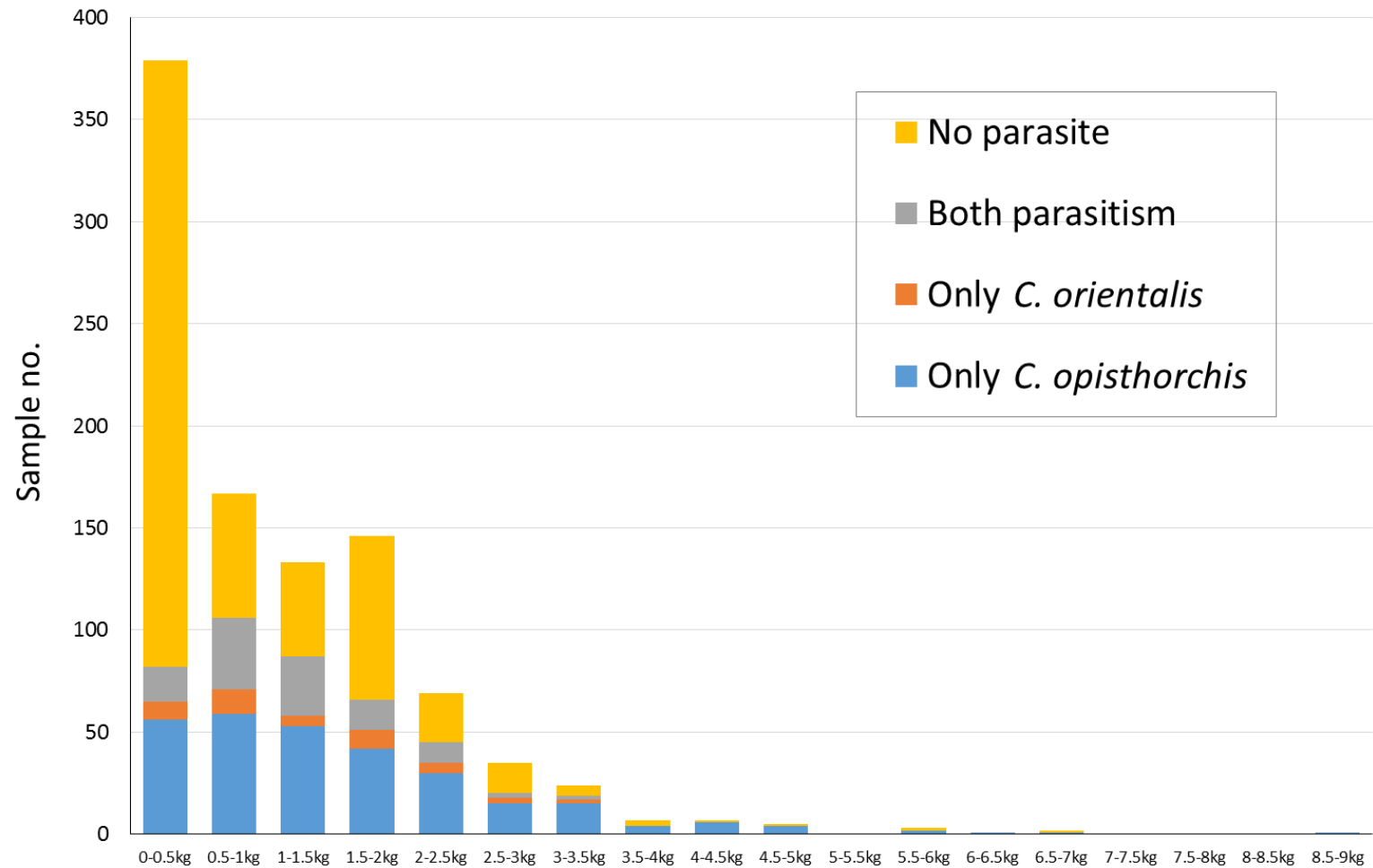


Fig. 6-2 Distribution of the size of cultured Pacific bluefin tuna inspected in Nagasaki from 2011 to 2014.

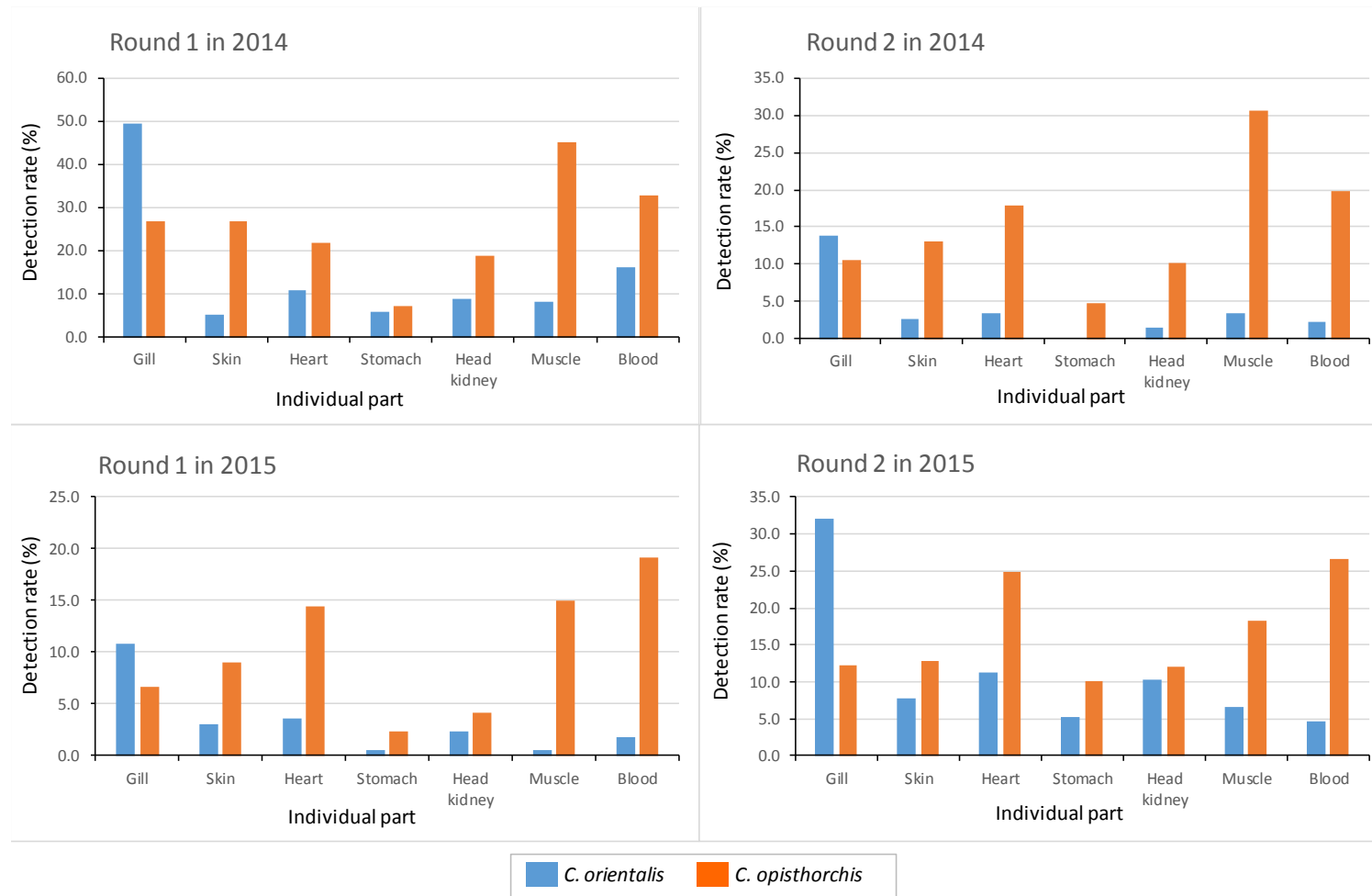


Fig. 6-3 Detection rates of the two species of *Cardicola* in the individual parts of the Pacific bluefin tuna from seed introduction to the each sampling end.

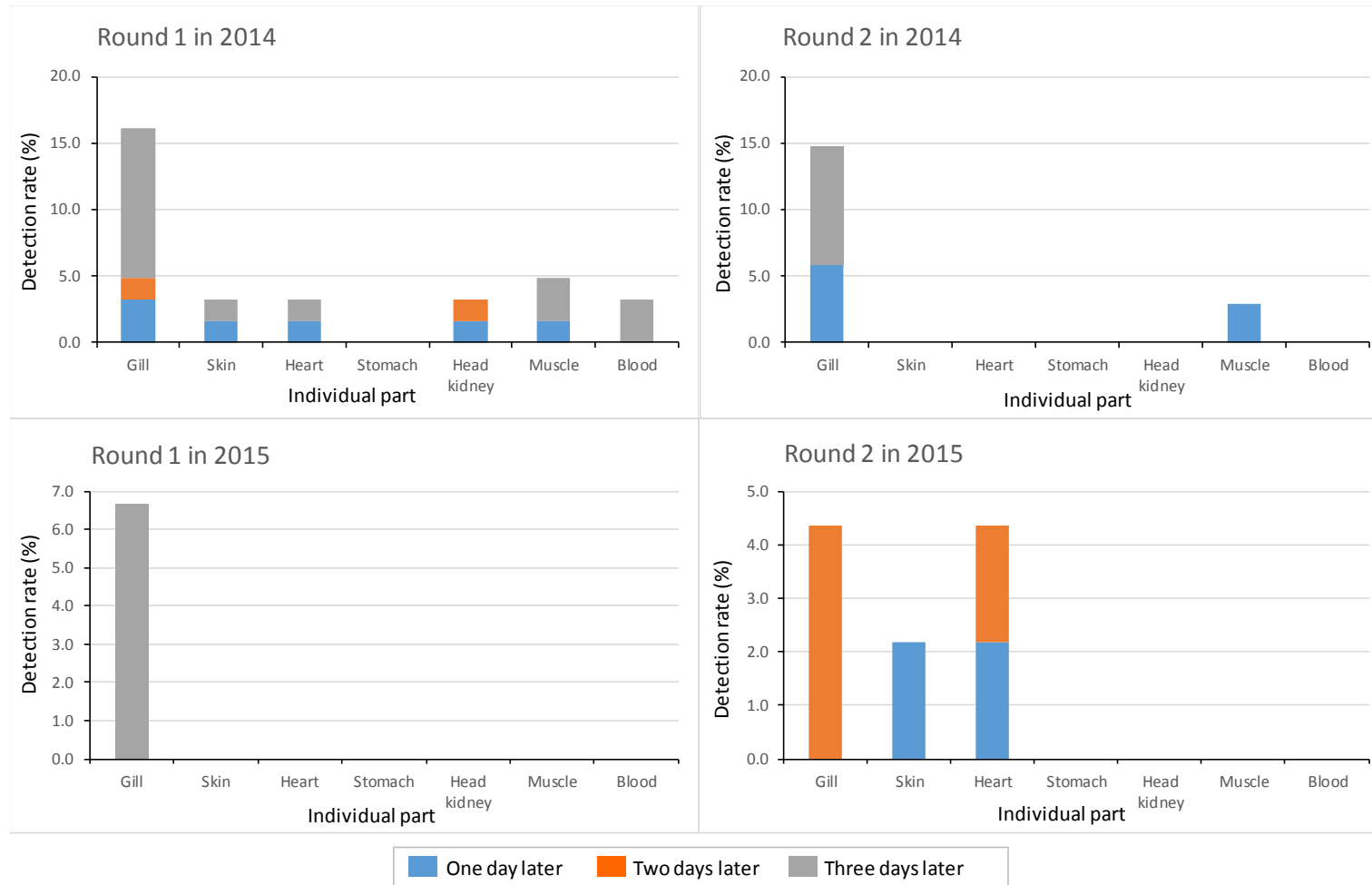


Fig. 6-4 Detection rates of *Cardicola orientalis* in the individual parts of artificial seed of the Pacific bluefin tuna for three days after transfer to net cages.

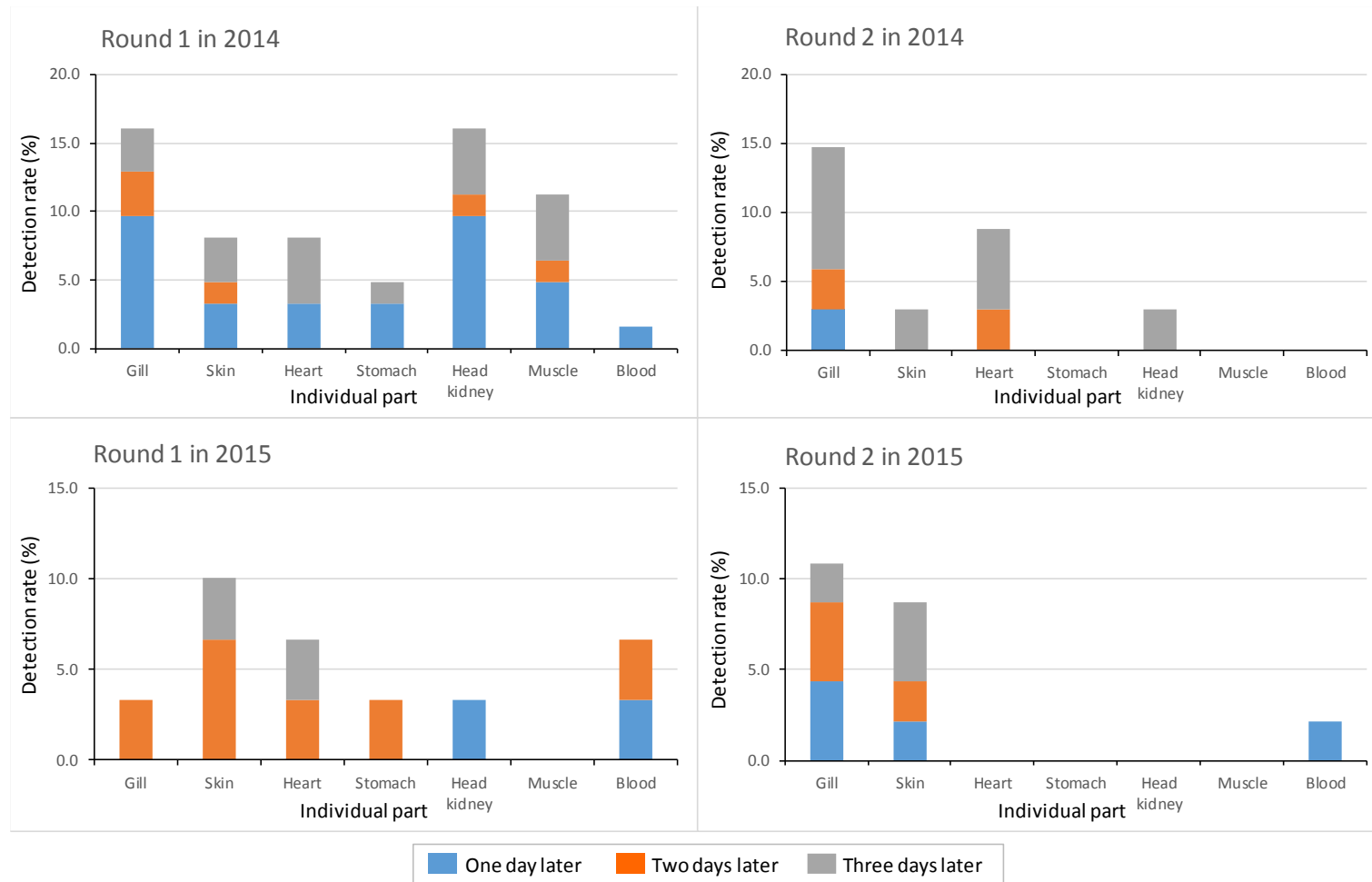


Fig. 6-5 Detection rates of *Cardicola opisthorchis* in the individual parts of artificial seed of the Pacific bluefin tuna for three days after transfer to net cages.

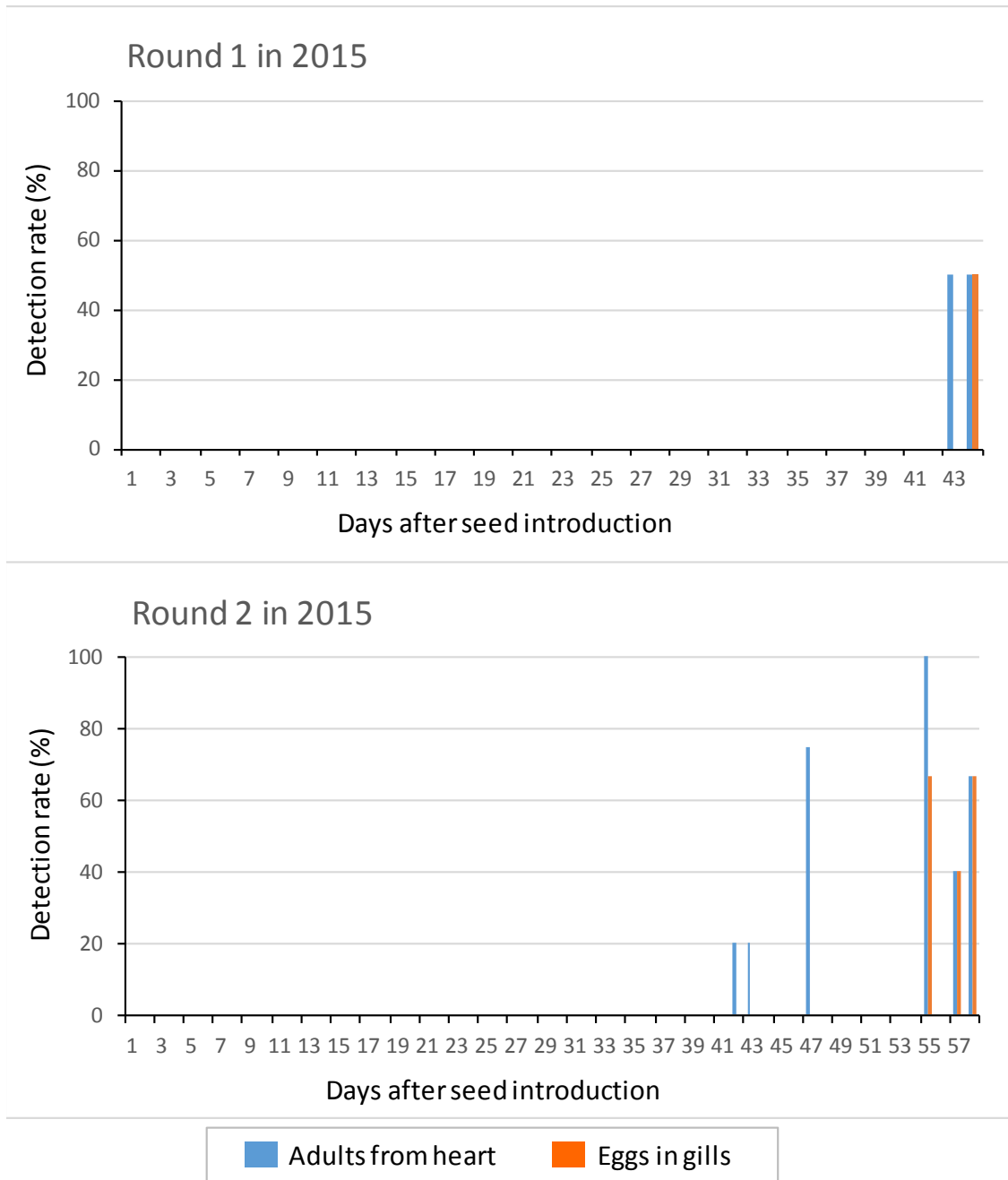


Fig. 6-6 Detection rates of *Cardicola opisthorchis* in the Pacific bluefin tuna by microscopic examination.

第七章 総合考察

クロマグロ住血吸虫の中間宿主について

これまで、魚類住血吸虫の中で生活環が判明しているものは淡水産が多く、これらの中間宿主は主に巻貝や二枚貝であった。一方、海産の魚類住血吸虫については、終宿主は分かっていないが幼生が見つかっている中間宿主としてはカンザシゴカイ類 (Linton, 1915; Martin, 1944b), カザリゴカイ類 (Oglesby, 1961), フサゴカイ類 (Cribb et al., 2011) の報告があり、終宿主と中間宿主の両方が確認されているものは、ヨーロッパの異体類に寄生する *Aporocotyle simplex* の中間宿主がフサゴカイ類 *Artacama proboscidea* と *Lanassa nordenskiöldi* であること (Køie, 1982; Køie & Petersen, 1988) と、オーストラリアのミナミマグロに寄生する *Cardicola forsteri* の幼生が、僅か 1 個体のフサゴカイ類 *Longicarpus modestus* から見つかった報告 (Cribb et al., 2011) があつた。このことから、海産魚類住血吸虫の主な中間宿主は多毛類であろうと考えられていた。そのような中、本研究において、クロマグロ住血吸虫 *C. opisthorchis* の中間宿主がフサゴカイの一種 *Terebella* sp. であることが明らかになったことにより、フサゴカイ類が *Cardicola* 属の主要な中間宿主である可能性が高まり、その後、近畿大学の研究者らによる和歌山県のクロマグロ養殖生簀周辺のフサゴカイの探索によって、*C. orientalis* の幼生がフサゴカイ *Nicolea gracilibranchis* から、*C. forsteri* の幼生がフサゴカイ *Amphitrite* sp. から見出された。これらのフサゴカイは全て Terebellidae 科、Terebellinae 亜科に属することから、*Cardicola* 属住血吸虫の中間宿主は Terebellinae 亜科フサゴカイである可能性が高いと推測される。

中間宿主の生息場所（＝感染源）について

これまで、クロマグロ住血吸虫症の感染源がどこにあるかは判っていなかったが、養殖生簀の付着物内に中間宿主である *Terebella* sp. が生息していることが判明したことから、住血吸虫の感染環が養殖場内で回っていることが強く示唆された。このことにより、養殖場内の感染環を断ち切ることができれば住血吸虫症を防除することが可能となる。また、第五章により、クロマグロ住血吸虫 2 種は、養殖用種苗として採捕された天然種苗（ヨコワ）によって養殖場に持ち込まれることが判明した。さらに、養殖場において、生簀ロープの付着物内における、*Terebella* sp. と *C. opisthorchis* 幼生の周年の出現状況を調査した結果、*Terebella* sp. が生息するフジツボ等の付着物が多い低水温期に *Terebella* sp. と *C. opisthorchis* 幼生の出現率が高くなる傾向が認められた。養殖現場では、種苗を導入する夏季から住血吸虫の寄生が確認されることから、*C. opisthorchis* 幼生が感染している *Terebella* sp. が夏季にも養殖場周辺に生息するはずであるが、生簀ロープ付着物内での検出率は低かった。そこで、高水温期に生簀網底の付着物を採集して調べたところ、*Terebella* sp. が多く採取され、*C. opisthorchis* 幼生の感染率も高いことが判明した。このことから、*C. opisthorchis* による住血吸虫症の感染源は養殖生簀網の付着物であり、少なくとも夏季は海面付近よりも深い網底の付着物の方が感染源となっていると推察された。

Terebella sp. 体内での *C. opisthorchis* 幼生の増殖

第二章で最初に中間宿主 *Terebella* sp. の体腔内で見つけた *C. opisthorchis* 幼生は、「セルカリアを含有しているスポロシスト（Cercariogenous sporocyst : CS）」で、そのスポロシストからセルカリアが出てくる様子が観察された。その後、第三章第一節の養殖場における周年調査では、CS に加え

て「スポロシストを含有しているスポロシスト (Sporocystogenous sporocyst (= Mother sporocyst) : SS)」を確認し、スポロシストが *Terebella* sp.体内で増殖することが示唆された。さらに、第四章第一節で、培地内で SS が娘スポロシストを産出することを確認した。当初、中間宿主 *Terebella* sp.体内での住血吸虫幼生の発達については、*Terebella* sp.に侵入する最初のステージであるミラシジウムを *Terebella* sp.に感染させ、その様子を観察しようと考えていた。しかしながら、孵化する直前の新鮮な虫卵およびミラシジウムを得ることができなかつたことからミラシジウムによる感染実験ではなく、感染 *Terebella* sp.の体腔内から取り出したスポロシストを非感染 *Terebella* sp.体腔内に移植する方法で観察を試みた。SS を移植すれば *Terebella* sp.体内でスポロシストが増殖し、その後、セルカリアを産生する様子が観察できると考えたが、SS も入手困難であったことから、比較的容易に入手できる CS を使用した。その結果、*Terebella* sp.体内で CS が SS に変化し、娘スポロシストを産出した。さらに産出された娘スポロシストも娘スポロシストを産出した。これを何代か繰り返して、*Terebella* sp.体内である程度スポロシスト数が増加した頃 CS が出現し、最終的には *Terebella* sp.体腔内にセルカリアが放出され、その後、そのセルカリアは *Terebella* sp.体外へ脱出するに至った。この SS が数世代に亘って出現してスポロシストが増殖することは予測していた。なぜならば、養殖場で採集した感染 *Terebella* sp.体内には 1 個体当たり数百～最大 1,800 個体程のスポロシストが寄生していたため、それだけの数のミラシジウムが 1 個体の *Terebella* sp.に侵入したと考えるよりも、*Terebella* sp.体内でスポロシストが増殖したと考える方が自然だからである。しかし、CS が SS に変化することを見出した意義は大きい。この CS が SS に変化する要因については、*Terebella* sp.体内のスポロシストの密度と関係があるかもしれない。スポロシストの密度が低いことに反応して、セ

ルカリアを産生するよりもスポロシストを産生することを生き抜く戦略として選んだとも考えられる。この仮説は推測の域を出ないが、条件によって CS が SS に変化するのであれば、一度 *Terebella* sp. への感染が成立すると、その *Terebella* sp. が死ぬまでその体内でスポロシストとセルカリアの産生が繰り返されることが強く示唆される。つまり、感染 *Terebella* sp. は、クロマグロへの直接の感染ステージであるセルカリアを漁場に生涯供給し続けることが考えられる。

第四章において、1 個体の感染 *Terebella* sp. が 10 万個体以上の *C. opisthorchis* のセルカリアを放出し得ると試算した。実際に感染 *Terebella* sp. を毎日観察していたところ、最高 2 万個体のセルカリアを 1 日で放出したことがあった（未公表データ）。他方、*C. opisthorchis* の成虫は 1 個体あたり 16,600 個の卵を放出するという報告がある（Shirakashi et al., 2012a）。これらのことから、*C. opisthorchis* は、魚体内で大量に産卵することにより *Terebella* sp. に感染する確率を高め、*Terebella* sp. 体内で幼生が大量に増殖することによりクロマグロに感染する確率を高めることによって、自然界で感染環を成立させていると考えられる。

***C. opisthorchis* の生活環**

本研究およびこれまでの知見から導き出される *C. opisthorchis* の生活環は以下のとおりである（Fig. 7）。まず、クロマグロの心臓に寄生する成虫が産卵すると、虫卵が鰓の小入鰓動脈に詰まる。そこで孵化したミラシジウムは鰓から脱出し、養殖生簀の付着物、とりわけフジツボ等の硬い構造物内に生息するフサゴカイ *Terebella* sp. の体内に侵入し（もしくは取り込まれ）スポロシストになる。スポロシストは *Terebella* sp. 体腔内で無性生殖で増殖し、その体内にセルカリアを産生する。*Terebella* sp. 体腔内においてスポロシス

トから放出されたセルカリアは、*Terebella sp.*を傷つけることなく体外へ脱出する。*Terebella sp.*体外へ脱出したセルカリアは、比重が海水よりも大きく、遊泳力もほとんどないため、潮流により終宿主であるクロマグロに辿り着き、その体内へ侵入する。魚体内に侵入した幼生はおそらく筋肉中の血管内で成長し、40日前後で成虫となって心臓に出現し、卵を放出する。

養殖場では、終宿主のクロマグロと中間宿主 *Terebella sp.*との距離が近い
ため、相互の感染が成立する確率が高く、養殖クロマグロでの寄生率および寄生強度が高くなると考えられる。それにより重篤な寄生が起こるとクロマグロが死亡するケースが出てくる。見方を変えると、養殖場内で生活環が成立することは容易であるが、自然界において、大洋を回遊するクロマグロと海底等に生息する *Terebella sp.*の間で、この生活環が成立していることに驚きを隠せない。実際に、第五章で天然種苗が住血吸虫に感染していたことを確認していることから、自然界において生活環が回っていることは明らかである。

***C. opisthorchis* の生活環から導かれる効果的な投薬スケジュール**

住血吸虫の生活環が成立している養殖場では、新たな種苗を導入すると、住血吸虫のセルカリアは速やかに魚体内に侵入し、*C. opisthorchis*は40日前後で成虫になり、卵を放出する。そして、投薬して虫体がいなくなっていた群も、投薬後30~40日で再び心臓に虫体が見られるようになる。つまり、再感染が確認されている。また、第六章で、住血吸虫症によって死亡する期間は、種苗導入時から魚体重が5kg程度までということが示された。これらことから、*C. opisthorchis*を対象とした投薬は、30~40日間隔で魚体が5kg程度になるまで行うのが適当と考えられる。また、第五章の調査によって、天然種苗が養殖場に住血吸虫を供給することが分かったため、天然種苗導入

時の投薬も有効と考えられた。

しかしながら、水産用医薬品の使用については感染の確認や医薬品の使用に関する指導を受ける必要がある。*C. opisthorchis* の検出については、第 5 章でヨコワサイズの種苗では鰓の PCR が検鏡検査よりも検出感度が高いことを示し、第 6 章で導入後間もない人工種苗では筋肉や血液の PCR が有効であることを確認した。このことから、投薬前に鰓の虫卵の検鏡検査、もしくは鰓、筋肉または血液の PCR 検査によって *C. opisthorchis* の寄生を確認することが必要である。

薬剤を使用しない防除法についての検討

現在、クロマグロ住血吸虫駆除用として使用できる薬剤はプラジクアンテルのみである。単一薬剤を多用すると住血吸虫が薬剤耐性を獲得する可能性が考えられる。実際にヒトの住血吸虫であるマンソン住血吸虫では、長年プラジクアンテルが多用されてきたエジプトにおいてプラジクアンテル耐性虫の出現が報告されている (Ismail et al., 1999)。薬剤を使用しない寄生虫の防除としては生活環 (感染環) のどこかを遮断する方法がある。例えば、海産魚で問題となる白点病の原因寄生虫である白点虫 *Cryptocaryon irritans* は、最盛期である高水温期 (水温 24℃以上) では、魚体に寄生している期間は 3~7 日間 (Colorni, 1985) で、魚体から脱落して海底でシストとなり、そこから仔虫が放出されるまでには最短で 4 日かかる (良永, 2009)。この生活環を利用すれば、陸上水槽では、3 日おきに水槽換えを 3~4 回繰り返すことによって魚体に寄生していた白点虫が全て脱落し、且つ、水槽底のシストから仔虫が放出される前に水槽が換わるため、白点虫を水槽内から排除することが可能である。この方法は実際に陸上養殖現場で使用されている。それでは、クロマグロ住血吸虫で、この生活環を遮断することは可能だろうか。

和歌山県のクロマグロ養殖場では、*C. forsteri* の中間宿主 *Amphitrite* sp. はほぼ全てが生簀網底の堆積物から採取されている（白樫・小川, 2016）。一方、*C. orientalis* の中間宿主 *Nicolea gracilibranchis* は水深 4 m 以浅では生息数、住血吸虫寄生率ともに高いが、それ以深ではゴカイの生息数、住血吸虫寄生率ともに減少する（白樫・小川, 2016）。本研究の *C. opisthorchis* の中間宿主 *Terebella* sp. についても、夏場の調査では、水深 1 m のロープでは生息数、住血吸虫寄生率ともに低いが、水深 15 m の網底からは 145 個体の *Terebella* sp. が採取され、その 25% 程が住血吸虫の寄生を受けていた。他方、和歌山県では、養殖クロマグロに *C. opisthorchis* の寄生が多いにも関わらず、長崎県で見ついている *Terebella* sp. は全く見つかっておらず（白樫・小川, 2016）、また同様に、長崎県でも養殖クロマグロに *C. orientalis* が寄生し、且つ、中間宿主 *Nicolea gracilibranchis* も多く見られるものの、感染個体は未だ見つかっていない。このことから、住血吸虫の感染源となるフサゴカイは、漁場や種によって生息域がある特定の場所に集中している可能性が考えられる。したがって、このフサゴカイが集中する場所を見つけてフサゴカイの住処である付着物や堆積物を除去すれば、住血吸虫のクロマグロへの寄生を低減させることができ、クロマグロ住血吸虫症による被害を抑えることが可能と考えられる。実際に、オーストラリアのミナミマグロ蓄養場では、*C. forsteri* の中間宿主が海底の堆積物から見つかっており、生簀を水深 40 m 以上の沖合いに移動することで被害を軽減することに成功している（Kirchhoff et al., 2011）。

クロマグロ住血吸虫症の抜本的な対策には、生活環（感染環）のどこかを遮断することが非常に有効であることから、より実施しやすい防除法を開発するために、今後、さらに生活環の詳細な知見を収集していく必要がある。

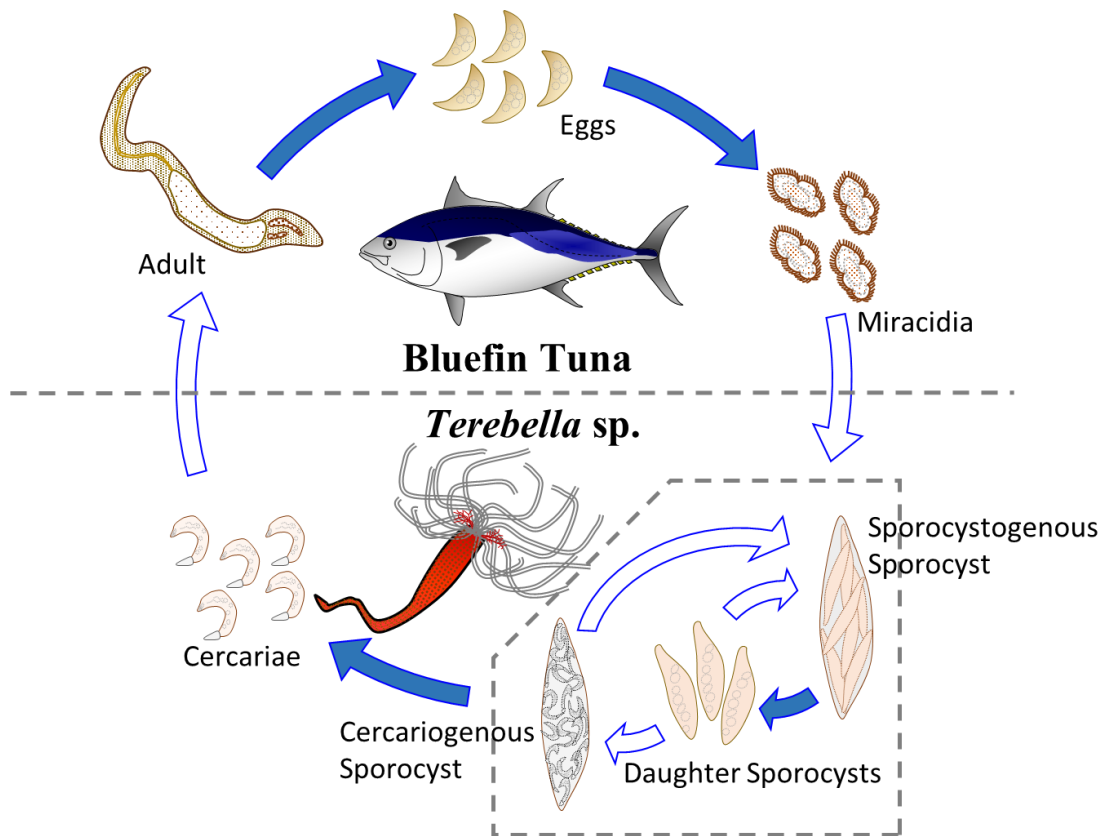


Fig. 7 Life cycle of *Cardicola opisthorchis*. White arrow; Development or Transformation. Blue arrow; Release or Hatching.

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始御指導、御助言を賜りました長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科環境海洋資源学専攻魚病学研究室 金井欣也教授に深く感謝いたします。本研究を行う上で必要な知識、技術などの御指導を頂きました公益財団法人目黒寄生虫館 館長 小川和夫博士に厚く御礼申し上げます。長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 玉置昭夫教授、吉越一馬名誉教授、菅向志郎准教授、長崎県総合水産試験場種苗量産技術開発センター魚類科長 山田敏之博士、大阪市立自然史博物館 館長 山西良平博士、串本海中公園 名誉館長 内田紘臣博士、近畿大学水産研究所白浜実験場 白樫正博士には、本研究内容について多くの御助言を賜りました。ここに感謝いたします。

調査を進めるにあたり労を惜しまず御協力を頂きました金子産業株式会社 木下敬文氏、三宅利宗氏、岩本寛之氏、井手巧一郎氏、榎田輝氏、株式会社みつしま水産 乗田孝雄氏、西山陽二氏、東洋冷蔵株式会社 岩本輝一氏、櫻井啓介氏、ならびに対馬および五島の水産業普及指導センターの職員の皆様に御礼を申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました長崎県総合水産試験場長 柳村智彦氏、前場長 藤井明彦博士、環境養殖技術開発センター所長 平野慶二博士、漁業資源部長 一丸俊雄博士、環境養殖技術開発センター養殖技術科長 宮木廉夫博士、上五島水産業普及指導センター所長 山本純弘氏、研究を進めるにあたり御協力を頂きました介藻類科 岩永俊介博士、養殖技術科 宮原治郎氏、松倉一樹氏、対馬振興局水産課 横山文彦氏、ならびに養殖技術科員の皆様に心から御礼申し上げます。

引用文献

- Aiken, H. M., Bott, N. J., Mladineo, I., Montero, F. E., Nowak, B. F., Hayward, C. J. 2007. Molecular evidence for cosmopolitan distribution of platyhelminth parasites of tunas (*Thunnus* spp.). *Fish Fish.*, 8: 167-180.
- Braicovich, P. E., Etchegoin, J. A., Timi, J. T., Sardella, N. H. 2006. A new species of *Cardicola* Short, 1953 (Digenea: Sanguinicolidae) parasitizing the Brazilian flathead, *Percophis brasiliensis* Quoy et Gaimard 1824, from the coasts of Mar del Plata, Argentina. *Parasitol. Int.*, 55: 175-177.
- Bullard, S. A. 2010. A new species of *Cardicola* Short, 1953 (Digenea: Aporocotylidae) from the heart and branchial vessels of two surfperches (Perciformes: Embiotocidae) in the Eastern Pacific Ocean of California. *J. Parasitol.*, 96: 382-388.
- Bullard, S. A. 2013. *Cardicola langeli* sp. n. (Digenea: Aporocotylidae) from heart of sheepshead, *Archosargus probatocephalus* (Actinopterygii: Sparidae) in the Gulf of Mexico, with an updated list of hosts, infection sites and localities for *Cardicola* spp. *Folia Parasitol.*, 60: 17-27.
- Bullard, S. A., Overstreet, R. M. 2004. Two species of *Cardicola* (Digenea: Sanguinicolidae) in drums (Sciaenidae) from Mississippi and Louisiana. *J. Parasitol.*, 90: 128-136.
- Bullard, S. A., Goldstein, R. J., Goodwin, R. H., Overstreet, R. M. 2004. *Cardicola forsteri* (Digenea: Sanguinicolidae) from the heart of a northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Scombridae), in the northwest Atlantic Ocean. *Comp. Parasitol.*, 71: 245-246.
- Bullard, S. A., Baker, T., de Buron, I. 2012. New species of *Cardicola* (Digenea:

- Aporocotylidae) from heart of Atlantic croaker, *Micropogonias undulates* (Perciformes: Scianidae), of the South Atlantic Bight. *J. Parasitol.*, 98: 328-332.
- Colorni, A. 1985. Aspects of the biology of *Cryptocaryon irritans*, and hyposalinity as gilt-head sea bream *Sparus aurata*. *Dis. Aquat. Org.*, 22: 19-22.
- Cribb, T. H., Daintith, M., Munday, B. 2000. A new blood-fluke, *Cardicola forsteri* (Digenea: Sanguinicolidae) of southern blue-fin tuna (*Thunnus maccoyii*) in aquaculture. *Trans. R. Soc. S. Aust.*, 124: 117-120.
- Cribb, T. H., Bray, R. A., Olson, P. D., Timothy, D., Littlewood, J. 2003. Life cycle evolution in the Digenea: a new perspective from phylogeny. *Adv. Parasitol.*, 54: 197-254.
- Cribb, T. H., Adlard, R. D., Hayward, C. J., Bott, N. J., Ellis, D., Evans, D., Nowak, B. F. 2011. The life cycle of *Cardicola forsteri* (Trematoda: Aporocotylidae), a pathogen of ranched southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyi*. *Int. J. Parasitol.*, 41: 861-870.
- Dinnik, J. A., Dinnik, N. N. 1964. The influence of temperature on the succession of redial and cercarial generations of *Fasciola gigantica* in a snail host. *Parasitology*, 54: 59-65.
- Evans, W. A., Heckmann, R. A. 1973. The life history of *Sanguinicola klamathensis*. *Life Sci.*, 13: 1285-1291.
- Forte-Gil, D., Holzer, A. S., Peckova, H., Bartošová-Sojková, P., Peñalver, J., Dolores, E. M., Muñoz, P. 2016. Molecular and morphological identification of *Cardicola* (Trematoda: Aporocotylidae) eggs in hatchery-reared and migratory Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture*, 450: 58-66.
- 藤井明彦 2015. 長崎県におけるクロマグロ養殖業の現状と課題. 季刊「しま」, 241: 42-51.

- 浜口 尚 2011. マグロ類の利用に関する一考察. 園田学園女子大学論文集, 45: 195-214.
- Hansen, E. L. 1973. Progeny-daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Int. J. Parasitol.*, 3: 267-268.
- Hansen, E. L. 1975. Secondary daughter sporocysts of *Schistosoma mansoni*: their occurrence and cultivation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 226: 426-436.
- He, Y. X., Salafsky, B., Ramaswamy, K. 2005. Comparison of skin invasion among three major species of *Schistosoma*. *Trends Parasitol.*, 21: 201-203.
- Holzer, A. S., Montero, F. E., Repulles, A., Nolan, M. J., Sitja-Bobadilla, A., Alvarez-Pellitero, P., Zarza, C., Raga, J. A. 2008. *Cardicola aurata* sp. n. (Digenea: Sanguinicolidae) from Mediterranean *Sparus aurata* L. (Teleostei: Sparidae) and its unexpected phylogenetic relationship with *Paradeontacylix* McIntosh, 1934. *Parasitol. Int.*, 57: 472-482.
- Hutchings, P. A., Glasby, C. J. 1988. The Amphitritinae (Polychaeta: Terebellidae) from Australia. *Rec. Aust. Mus.*, 40: 1-60.
- Imajima, M., Hartman, O. 1964. The polychaetous annelids of Japan. *Allan Hancock Foundation Spec. Public.*, 26: 1-452.
- Ishimaru, K., Mine, R., Shirakashi, S., Kaneko, E., Kubono, K., Okada, T., Sawada, Y., Ogawa, K. 2013. Praziquantel treatment against *Cardicola* blood flukes: Determination of the minimal effective dose and pharmacokinetics in juvenile Pacific bluefin tuna. *Aquaculture*, 402-403: 24-27.
- Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L. F., Day, T. A., Bennett, J. L. 1999. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 60: 932-935.

- 伊藤智幸 2009. 耳石日輪と 0 歳魚の体長別漁獲データから推定したクロマグロの産卵期別資源寄与率. *日本水産学会誌*, 75: 412-418.
- Jourdane, J., Théron, A. 1980. *Schistosoma mansoni*: cloning by microsurgical transplantation of sporocysts. *Exp. Parasitol.*, 50: 349-357.
- Jourdane, J., Théron, A. 1987. Larval development: eggs to cercariae. In “The biology of schistosomes, from genes to latrines” (ed. by D. Rollinson and A. J. G. Simpson). Academic Press, London, pp. 83-113.
- Jourdane, J., Théron, A., Combes, C. 1980. Demonstration of several sporocysts generations as a normal pattern of reproduction of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop.*, 37: 177-182.
- Jourdane, J., Kechemir, N., Combes, C. 1981. Mise en évidence d’une répllication des sporocystes fils de *Schistosoma haematobium* après transplantation microchirurgicale chez *Bulinus truncatus*. *C. R. Acad. Sci.*, 293: 531-533.
- Jourdane, J., Mouahid, M., Touassem, R. 1984. Evolution des sporocystes de *Schistosoma bovis* après transplantation microchirurgicale chez *Bulinus truncatus*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 59: 459-466.
- Jourdane, J., Liang, Y., Bruce, J. I. 1985. Transplantation of *Schistosoma japonicum* daughter sporocysts in *Oncomelania hupensis*. *J. Parasitol.*, 71: 244-247.
- Kechemir, N., Théron, A. 1980. Existence of replicating sporocysts in the development cycle of *Schistosoma haematobium*. *J. Parasitol.*, 66: 1068-1070.
- Kirchhoff, N. T., Rough, K. M., Nowak, B. F. 2011. Moving cages further offshore: effects of Southern bluefin tuna, *T. maccoyii*, parasites, health and performance. *PLoS One*, 6: e23705.
- Kirk, R. S., Lewis, J. W. 1993. The life-cycle and morphology of *Sanguinicola inermis* Plehn, 1905 (Digenea: Sanguinicolidae). *Syst. Parasitol.*, 25: 125-133.

- Knoff, M., Amato, J. F. R. 1992. Nova espécie do gênero *Cardicola* Short, 1953 (Sanguinicolidae: Cardicolinae) parasita de tainhas *Mugil platanus* Günther, 1880 da costa do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Bras. Biol.*, 51: 567-570.
- Køie, M. 1982. The redia, cercaria and early stages of *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Sanguinicolidae) - a digenetic trematode which has a polychaete annelid as the only intermediate host. *Ophelia*, 21: 115-145.
- Køie, M., Petersen, M. E. 1988. A new annelid intermediate host (*Lanassa nordenskiöldi* Malmgren, 1866) (Polychaeta: Terebellidae) for *Aporocotyle* sp. and new final host family (Pisces: Bothidae) for *Aporocotyle simplex* Odhner, 1900 (Digenea: Sanguinicolidae). *J. Parasitol.*, 74: 499-502.
- Lie, K. J. 1969. Role of immature rediae in antagonism of *Paryphostomum segregatum* to *Schistosoma mansoni* and larval development in degenerated sporocysts. *Z. Parasitenk.*, 32: 316-323.
- Lie, K. J., Nasemary, S. 1973. Studies on Echinostomatidae (Trematoda) in Malaysia. XVI. The life history of *Echinostoma ilocanum* (Garrison, 1908). *Proc. Helminth. Soc. Wash.*, 40: 59-65.
- Linton, E. 1915. Sporocysts in an annelid. *Biol. Bull.*, 28: 115-118.
- Manter, H. W. 1947. The digenetic trematodes of marine fishes of Tortugas, Florida. *Am. Midl. Nat.*, 38: 257-416.
- Manter, H. W. 1954. Some digenetic trematodes from fishes of New Zealand. *Trans. R. Soc. N. Z.*, 82: 475-568.
- Martin, W. E. 1944a. *Cercaria solemyae* n. sp., probably a blood fluke, from the marine pelecypod, *Solemya velum*. *J. Parasitol.*, 30: 191-195.
- Martin, W. E. 1944b. Studies on trematodes of Woods Hole IV. Additional observations upon *Cercaria loossi* Stunkard developing in an annelid. *Trans. Am.*

- Microsc. Soc.*, 63: 237-243.
- McKerrow, J. H., Salter, J. 2002. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. *Trends Parasitol.*, 18: 193-195.
- Meade, T. G., Pratt, I. 1965. Description and life history of *Cardicola alseae* sp. n. (Trematoda: Sanguinicolidae). *J. Parasitol.*, 51: 575-578.
- Meng, F., Yokoyama, H., Shirakashi, S., Grabner, D., Ogawa, K., Ishimaru, K., Sawada, Y., Murata, O. 2011. *Kudoa prunusi* n. sp. (Myxozoa: Myxosporae) from the brain of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844) cultured in Japan. *Parasitol. Int.*, 60: 90-96.
- 宮下 盛 2002. クロマグロの種苗生産に関する研究. *近畿大学水産研究所報告*, 8: 1-171.
- 桃山和夫, 小林知吉 2004. 日本海山口県沖で漁獲されたクロマグロに寄生していたディディモゾーン数種. *山口県水産研究センター研究報告*, 2: 125-132.
- 長崎県まぐろ養殖協議会事務局 2016. 長崎県のクロマグロ養殖 産地としての特徴と種苗確保への取り組み. *月刊養殖ビジネス*, 665: 12-15.
- Nagasawa, K. 2011. *Caligus macarovi* (Copepoda, Caligidae) from Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, cultured in Japan. *Crustaceana*, 84: 1145-1147.
- Nagasawa, K. 2015. Infection of *Brachiella thynni* (Copepoda, Lernaepodidae) on Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Actinopterygii, Scombridae), cultured in Japan. *Crustaceana*, 88: 945-948.
- 長澤和也 2015. 養殖クロマグロに寄生していた大型吸虫 *Hirudinella* sp. *生物圏科学*, 54: 81-87.
- Nolan, M. J., Cribb, T. H. 2004. The life cycle of *Paracardicoloides yamagutii* Martin, 1974 (Digenea: Sanguinicolidae). *Folia Parasitol.*, 51: 320-326.

- Nolan, M. J., Cribb, T. H. 2006. *Cardicola* Short, 1953 and *Braya* n. gen. (Digenea: Sanguinicolidae) from five families of tropical Indo-Pacific fishes. *Zootaxa*, 1265: 1-80.
- Nolan, M. J., Miller, T. L., Cutmore, S. C., Cantacessi, C., Cribb, T. H. 2014. *Cardicola beveridgei* n. sp. (Digenea: Aporocotylidae) from the mangrove jack, *Lutjanus argentimaculatus* (Perciformes: Lutjanidae), and *C. bullardi* n. sp. from the Australian spotted mackerel, *Scomberomorus munroi* (Perciformes: Scombridae), from the northern Great Barrier Reef. *Parasitol. Int.*, 63: 735-745.
- 小川和夫 2005. 魚類寄生虫学. 東京大学出版会, pp.215.
- Ogawa, K., Egusa, S. 1986. Two new species of *Paradeontacylix* McIntosh, 1934 (Trematoda: Sanguinicolidae) from the vascular system of a cultured marine fish, *Seriola purpurascens*. *Fish Pathol.*, 21: 15-19.
- Ogawa, K., Nagano, T., Akai, N., Sugita, A., Hall, K. A. 2007. Blood fluke infection of cultured tiger puffer *Takifugu rubripes* imported from China to Japan. *Fish Pathol.*, 42: 91-99.
- Ogawa, K., Tanaka, S., Sugihara, Y., Takami, I. 2010. A new blood fluke of the genus *Cardicola* (Trematoda: Sanguinicolidae) from Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844) cultured in Japan. *Parasitol. Int.*, 59: 44-48.
- Ogawa, K., Ishimaru, K., Shirakashi, S., Takami, I., Grabner, D. 2011. *Cardicola opisthorchis* n. sp. (Trematoda: Aporocotylidae) from the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844), cultured in Japan. *Parasitol. Int.*, 60: 307-312.
- Ogawa, K., Akiyama, K., Grabner, D. 2015. *Paradeontacylix buri* n. sp. (Trematoda: Aporocotylidae) from *Seriola quinqueradiata* cultured in Japan with a

- description of unidentified *Paradeontacylix* sp. from *S. lalandi*. *Fish Pathol.*, 50: 183-191.
- Oglesby, L. C. 1961. A new cercaria from an annelid. *J. Parasitol.*, 47: 233-236.
- Olivier, L., Mao, C. P. 1949. The early larval stages of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, in the snail host, *Australorbis glabratus* (Say, 1818). *J. Parasitol.*, 35: 267-275.
- Oréllis-Ribeiro, R., Arias, C. R., Halanych, K. M., Cribb, T. H., Bullard, S. A. 2014. Diversity and ancestry of flatworms infecting blood of nontetrapod craniates “fishes”. *Adv. Parasitol.*, 85: 1-64.
- Palacios-Abella, J.F., Rodriguez-Llanos, J., Mele, S., Montero, F.E. 2015. Morphological characterisation and identification of four species of *Cardicola* Short, 1953 (Trematoda: Aporocotylidae) infecting the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* (L.) in the Mediterranean Sea. *Syst. Parasitol.*, 91: 101-117.
- Sawada, Y., Okada, T., Miyashita, S., Murata, O., Kumai, H. 2005. Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aqua. Res.*, 36: 413-421.
- Sendersky, I. V., Kurbatov, I. V., Dobrovolsky, A. A. 2002. Parthenogenetic generations of *Sanguinicola armata* (Trematoda: Sanguinicolidae). *Parazitologiya*, 36: 469-477 (In Russian with English abstract).
- 白樫 正, 小川和夫 2016. 防疫 魚類住血吸虫の現状と生態的防除の可能性 ～薬剤を用いない予防法開発に向けて～. *月刊アクアネット*, 216: 44-49.
- Shirakashi, S., Kishimoto, Y., Kinami, R., Katano, H., Ishimaru, K., Murata, O., Itoh, N., Ogawa, K. 2012a. Morphology and distribution of blood fluke eggs and associated pathology in the gills of cultured Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Parasitol. Int.*, 61: 242-249.

- Shirakashi, S., Andrews, M., Kishimoto, Y., Ishimaru, K., Okada, T., Sawada, Y., Ogawa, K. 2012b. Oral treatment of praziquantel as an effective control measure against blood fluke infection in Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Aquaculture*, 326-329: 15-19.
- Shirakashi, S., Tsunemoto, K., Webber, C., Rough, K., Ellis, D., Ogawa, K. 2013. Two species of *Cardicola* (Trematoda: Aporocotylidae) found in southern bluefin tuna *Thunnus maccoyii* reared in South Australia. *Fish Pathol.*, 48: 1-4.
- Shirakashi, S., Tani, K., Ishimaru, K., Shin, S. P., Honryo, T., Uchida, H., Ogawa, K. 2016. Discovery of intermediate hosts for two species of blood flukes *Cardicola orientalis* and *Cardicola forsteri* (Trematoda: Aporocotylidae) infecting Pacific bluefin tuna in Japan. *Parasitol. Int.*, 65: 128-136.
- Short, R. B. 1953. A new blood fluke, *Cardicola laruei* n. g., n. sp., (Aporocotylidae) from marine fishes. *J. Parasitol.*, 39: 304-309.
- 総務省統計局 2011－2015. 『家計調査年報（平成 23～27 年）』. 日本統計協会, 東京.
- 水産庁 2016. プレスリリース 平成 27 年における国内のクロマグロ養殖実績について（速報値）. 水産庁 HP.
- 杉原志貴, 高見生雄, 塚原淳一郎 2002. 魚類防疫体制推進整備事業. 平成 13 年度長崎県総合水産試験場事業報告, 175-180.
- Sugihara, Y., Yamada, T., Tamaki, A., Yamanishi, R., Kanai, K. 2014. Larval stages of the bluefin tuna blood fluke *Cardicola opisthorchis* (Trematoda: Aporocotylidae) found from *Terebella* sp. (Polychaeta: Terebellidae). *Parasitol. Int.*, 63: 295-299.
- Sugihara, Y., Yamada, T., Ogawa, K., Yokoyama, F., Matsukura, K., Kanai, K. 2015.

- Occurrence of the bluefin tuna blood fluke *Cardicola opisthorchis* in the intermediate host *Terebella* sp. *Fish Pathol.*, 50: 105-111.
- Sugihara, Y., Yamada, T., Ichimaru, T., Matsukura, K., Kanai, K. 2016. Detection of bluefin tuna blood flukes (*Cardicola* spp.) from wild juvenile Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* caught for aquaculture. *Aquaculture*, 452: 9-11.
- Sugihara, Y., Yamada, T., Iwanaga, S., Kanai, K. 2017. Transplantation of *Cardicola opisthorchis* (Trematoda: Apocotylidae) sporocysts into the intermediate host, *Terebella* sp. (Polychaeta: Terebellidae). *Parasitol. Int.*, 66: 839-842.
- Tanaka, Y., Suzuki, N. 2015. Early Life History, in: Kitagawa, T., Kimura, S. (Eds.), *Biology and Ecology of Bluefin Tuna*. CRC Press, Boca Raton, pp.19-46.
- Théron, A., Jourdane, J. 1979. Sequence de reconversion des sporocystes de *Schistosoma mansoni* producteurs de cercaires, en vue de la production de nouvelles generations de sporocystes. *Z. Parasitenkd.*, 60: 63-71 (In French with English abstract).
- Théron, A., Touassem, R. 1989. *Schistosoma rodhaini*: intramolluscan larval development, migration and replication processes of daughter sporocysts. *Acta Trop.*, 46: 39-45.
- Touassem, R., Théron, A. 1986. Study on the intramolluscal development of *Schistosoma bovis*: demonstration of three patterns of sporocystogenesis by daughter sporocysts. *Parasitology*, 92: 337-341.
- Yamaguti, S. 1970. *Digenetic trematodes of Hawaiian fishes*, Tokyo: Keigaku Publishing Co.
- 山砥稔文, 石田直也 2016. 島嶼海域での低密度赤潮による新たな漁業被害の発生. 有害有毒プランクトンの科学 (今井一郎, 山口峰生, 松岡數充編). 恒星社厚生閣, 東京, pp.131-138.

- 横山 博, 長澤和也 2014. 養殖魚介類の寄生虫の標準和名目録. *生物圏科学*, 53: 73-97.
- Yokoyama, H., Suzuki, J., Shirakashi, S. 2014. *Kudoa hexapunctata* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the somatic muscle of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* and re-description of *K. neothunni* in yellowfin tuna *T. albacares*. *Parasitol. Int.*, 63: 571-579.
- Yong, R. Q., Cutmore, S. C., Miller, T. L., Adlard, R. D., Cribb, T. H. 2013. The ghost of parasites past: eggs of the blood fluke *Cardicola chaetodontis* (Aporocotylidae) trapped in the heart and gills of butterflyfishes (Perciformes: Chaetodontidae) of the Great Barrier Reef. *Parasitology*, 140: 1186-1194.
- 良永知義 2009. 大被害を及ぼす海産白点病大発生メカニズムの解明が進む. *月刊養殖*, 582: 22-25.
- Zhang, J., Meng, F., Yokoyama, H., Miyahara, J., Takami, I., Ogawa, K. 2010. Myxosporean and microsporidian infections in cultured Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in Japan. *Fish. Sci.*, 76: 981-990.