

ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)のスクーチカ感染症

— スクーチカ繊毛虫の培養性状・薬剤感受性・病原性 —

吉水 守・日向進一・呉 明柱・生駒三奈子・木村喬久・森 立成*¹

野村哲一*²・絵面良男

北海道大学水産学部微生物学講座・*¹北海道立栽培漁業総合センター・*²水産庁北海道さけ・ますふ化場

On the development of hirame(*Paralichthys olivaceus*) culture, outbreak of scuticociliata infection was reported to cause severe damage in Japan. To establish effective measures for isolation and cultivation of this ciliata, we tried to culture this pathogenic ciliata using medium for bacteria and fish cell lines in vitro. Scuticociliata from the brain tissues of infected fish was aseptically inoculated to CHSE-214 cells cultured in MEM-10 without antibiotic. Scuticociliata grew well and the number of ciliata reached 10^6 cells/ml at temperatures of 15°C to 20°C for 10d. The number of ciliata cultured in the cell lines is 10 times higher than the numbers cultured in the liquid medium alone. This ciliata could be cloned by dilution method. Scuticociliata isolated could grow well on 42 different cell lines that were established from marine fish, warm freshwater fish, and salmonids. This ciliate could be preserved in liquid nitrogen for more than 6 months.

Subsequently, we observed the optimal temperature and salinity for growth, and tested the sensitivities of this organism to formaldehyde, flagyl(Metronidazole), Ekuteshin(Combination compound of sulfamonometoxin and ormethoprim), and ozonization. Optimal temperature for growth was 25°C and salinity was 1.0 to 1.5 ‰. Washed scuticociliata was killed by formaldehyde at the concentration of 50ppm for 10min, but was not completely killed even at a high concentration of 400ppm for 20min in MEM-5. Flagyl and Ekuteshin can inhibit the growth of scuticociliata at the concentration of 1,000 and 100µg/ml in MEM-10, respectively. More than 99% of this scuticociliata could be killed by ozonization at a dose equivalent to 1.0mg/ℓ oxidant for 30 sec in sea water. Isolated scuticociliata showed the pathogenicity to the cultured hirame by artificial infection(I. P. injection, 10^5 cells/fish).

The number of scuticociliata in the water could be counted by most probable number(MPN) method using tissue culture, and the minimum detectable number was 1.8 cells/ℓ. The number in the reservoir tank for water supply to the culture tank was 110 cells/l. After cleaning by elimination of the sediments from of the reservoir tank and disinfected with formaldehyde, number of scuticociliata decreased and was counted less than 1.8 cells/ℓ and infection rate of cultured hirame was decreased.

Key Words : *Paralichthys olivaceus*, Viral epidermal hyperplasia, HRV, RTG-2

魚の体表あるいは体内に寄生して起こる疾病で、1985年頃からその発生が報告され、1988年以降多くの県でその発生および魚病被害が見られるようになった(乙竹 1986、水野 1991)。北海道でもヒラメ養殖が普及するにつれ、スクーチカ繊毛虫の寄生によると考えられるヒラメ稚魚および養殖魚の死亡が発生するようになり、このスクーチカ繊毛虫感染症対策の確立が急務となった。このスクーチカ繊毛虫は、体表ばかりでなく、腹腔や脳等にも侵入することから、治療、防除が非常に困難である。

このスクーチカ症対策を検討するにあたり、まず本繊毛虫の培養法およびクローン化の検討を行ない、*in vitro*での本虫の増殖量、至適培養温度、至適食塩濃度を観察し、ついでホルマリン、Flagyl、SulfamonometoxinとOrmethoprimの合剤およびオゾンの殺虫効果について検討した。そして本虫の培養が可能となったことからスクーチカ症の防除を目的に、まず飼育用水からの本虫の検出法について検討を行い、本症が発生している養魚場の飼育用水中のスクーチカ数を測定し、施設消毒後の虫体数の経過と本症の発症状況を観察した。最後に本研究に供試した分離培養虫体が病原性スクーチカ繊毛虫か否かを人工感染試験により検討したので、これらの結果について報告する。

材料と方法

スクーチカ症の発生状況：

わが国および北海道におけるスクーチカ症の発生状況を魚病生動向調査(日本水産資源保護協会1984~1991)および日本海漁業振興特別対策事業報告書(小林1993)をもとに取りまとめた。

供試スクーチカ繊毛虫：

病魚の脳由来株(BR-9001)は、1990年8月に北海道福島町内の養殖施設でスクーチカ症と診断された当才魚のヒラメの脳を無菌的に摘出し、10% FBS 添加、抗生物質非添加のEagle's MEM(Gibco；以後MEM-10と称す)で培養したCHSE-214細胞(Fryer *et al.*, 1965)に接種して20℃で7日間培養し、後述の方法でクローニングしたも

のである。また環境水由来株(WA-9001)は同日の飼育用水から同様の方法で分離したものを供試した。なお環境水からの分離には抗生物質添加MEM-10を使用した。培養液が無菌であることを確認後、Hanks' BSSを用いて段階希釈を行い、CHSE-214細胞を培養した96well plate (Corning)に接種して、限界希釈法によるクローニングを行った。その後、魚類培養細胞の凍結保存(吉水1987、1990)と同一の方法により一部を液体窒素中に保存した。

供試魚類培養細胞：

上記CHSE-214細胞の他、Table 3に示す当研究室で継代培養中の42種類の魚類由来培養細胞(Yoshimizu *et al.*, 1988、吉水 1993)を供試し、上記と同様の方法で各Wellに培養虫体(10⁶虫体/ml)を0.5ml宛接種し、20℃における増殖の有無を観察した。

スクーチカ繊毛虫の走査電子顕微鏡像：

供試スクーチカ(BR-9001およびWA-9001株)をCHSE-214細胞を用いて培養後、5℃で1,000rpm 5分間遠心分離し、上清を捨て、PBSに懸濁後同様に遠心分離し、再度PBSに懸濁した。同様の操作を再度行った後、2%グルタルアルデヒドを含むPBSで24時間固定した。固定後上記同様に遠心・洗浄を2回行い、ついでアルコール系列により脱水し、2-プロパノールに浸漬後-18℃で30分間凍結した。凍結後速やかに真空下で乾燥し、金を蒸着後、日立Alpha-10型走査電子顕微鏡で観察した。

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* における増殖量と至適増殖 度および至適食塩濃度の影響：

CHSE-214細胞を培養した25cm²組織培養用フラスコ(Falcon)に培養虫体(BR-9001株10⁶虫体/ml)を0.1ml接種後、20℃で10日間培養し、培養液中の虫体数を経日的に観察した。ついで5、10、15、20、25、30℃で10日間培養し、同様に培養液中の虫体数を観察した。さらに食塩耐性CHSE-214細胞を用い培養液の食塩濃度が1.0、1.5、2.0、2.5、3.0%になるように調整した後、同様に培養虫体を0.1ml接種後10日間虫体数の変化を経日的に観察した。なお虫体数の測定はホルマリン固定後、血球計数盤によ

った。

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* におけるホルマリン感受性：

供試スクーチカ(BR-9001株)の培養液を3,000rpm 10分遠心分離後、培養液を捨て1%食塩水または5% FBS加MEMに 10^6 虫体/mlとなるように懸濁した。この虫体懸濁液を20、100、200、300、400ppmのホルマリン液に1/10量混合し、室温で1、5、10、20分間作用させた。所定時間経過後直ちにMEM-10を等量添加して再度遠心分離し、上清を除去後、虫体を培養液に懸濁して培養細胞に接種し、生存虫体の検出を行った。

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* におけるFlagyl(1-(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole)感受性：

CHSE-214細胞を培養した25cm²容組織培養用フラスコに供試スクーチカ(BR-9001株)を接種し、培地にFlagyl (Rhone-Poulenc)を0.001、0.01、0.1、1、10mg/mlとなるように加え20℃で5日間培養し、その間の虫体数を測定した。

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* におけるエクテシン感受性：

エクテシン(SalfamonometoxinとOrmethoprimの合剤：第一製薬)を100、50、25、12.5、6.3、3.1μg/mlとなるように細胞培養液に加え、供試スクーチカ(BR-9001株)を接種し、48時間後にフラスコ下面に引いた直線上の100虫体を観察し動きのある虫体数を測定した。ついでエクテシンを100、200、400、800μg/ml濃度に添加した細胞培養系にスクーチカを接種しその後の生存性を観察した。

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* におけるオゾン感受性：

原料ガスに酸素を使用し、無声放電式のオゾン発生装置(荏原実業株式会社)を用いてオゾンを発生させ、海水1lに注入してオキシダントを生成させた。海水中の残留オキシダント濃度はヨウ素滴定法によって測定した。

供試スクーチカ(BR-9001株)の培養液(10^6 虫体/ml)を3,000rpmで10分間遠心分離後、上清を捨て、等量の1%

食塩水を加えて懸濁後、再度3,000rpmで10分間遠心分離した。山清を捨て、濾過海水を5ml加え、これを試料とし、オゾン処理海水100mlに1ml宛接種した。接種後0、15、30秒、1、2.5、5、7.5、10分後に海水試料を採取し、直ちに同量のFBSと混合させ残留オキシダントを不活化させた後Hank's BSSで10進希釈し、96 wellマイクロプレートに培養したCHSE-214細胞に接種して20℃ 7日間培養した。接種時の虫体数をTCID₅₀法により測定した。

スクーチカ繊毛虫の虫体数の最確数(MPN)法による測定法の検討：

最確数法の液体培地の代わりにCHSE-214細胞を培養した25cm²フラスコおよび24wellプレートを供試しMPN法の検定を行った。まずBR-9001株培養液を海水に懸濁し、その一部をホルマリンで処理した後、血球計数盤を用いて計数し、約 1.0×10^7 /mlとなるように再度海水を希釈した。ついで同虫体数となるように希釈したスクーチカ懸濁海水を25cm²フラスコに10ml、24wellプレートに1.0、0.1、0.01ml宛各5個あるいは穴に接種し、MPN 5本法による最確数を、直接計数値との比較を行った。

ヒラメ飼育水中のスクーチカ繊毛虫の最確数法による測定：

1991年4月から1992年3月にかけ計9回、スクーチカ症が発生している北海道福島町の養魚場を対象に、水源、貯水タンク、貯水タンク中の沈澱物、養魚水槽および排水路のスクーチカ類繊毛虫数をMPN法により測定した。養魚環境水は組織培養用フラスコ75cm²、25cm²および24wellプレート各5個あるいは5穴に100、10、1ml宛接種する方法および濾過膜を用いて1000、100、10mlを濾過後、濾過膜を接種する方法を用いて上記MPN法により測定した。また沈澱物中のスクーチカ数は、沈澱物を1、0.1、0.01g宛接種して測定した。

供試スクーチカ類繊毛虫の病原性試験：

ヒラメ人工種苗(平均体重5.1g)を各郡50尾宛0.5t水槽に收容し、脳および飼育環境水から分離したスクーチカ繊毛虫(BR-9001およびWA-9001株)を、浸漬法(10^3 虫体/

ml、60分)および腹腔内接種法(10^3 虫体/尾)により攻撃試験を行い、さらにスクーチカ症罹病魚5尾との同居法による感染試験を行った。その後30日間約0.5l/minの流量で間流水飼育し、死亡数を観察した。なお水温は20℃であった。

結 果

ヒラメのスクーチカ症の発生状況：

1984年から1991年にかけての、わが国におけるスクーチカ症の発生状況(報告件数)をTable 1に示した。ヒラメのスクーチカ症による魚病被害は1986年から報告されるようになり、1989年以降増加の傾向にあり、1991年におけるヒラメの魚病発生件数の原因別調査では第4位に位置している(Table 2)。

Table 1. Outbreak of scuticociliatida infection of cultured hirame(*Paralichthys olivaceus*) in Japan reported from Prefectural Fisheries Experimental Station to Fish Disease Center(FIDIC)

Year	Scuticociliatida infection	Disease problems of hirame
1984	—	172
1985	—	195
1986	5	255
1987	4	250
1988	—	402
1989	27	713
1990	39	692
1991	63	856

Fish Disease Center, Japan Fisheries Resource Conservation Association.

Table 2. Diseases of cultured hirame (*Paralichthys olivaceus*) in Japan reported from Prefectural Fisheries Experimental Station to Fish Disease Center, in 1991.

Disease	Number of outbreak
Edwardsiella tarda infection	268
Gliding bacteria infection	202
Streptococcus infection	83
Scuticociliatida infection	63
Ichthyobodo infection	28
Vibrio anguillarum infection	28
Ichthyophthirius marinus infection	17
Other bacterial infection	12
Lymphocystis disease	10
Gas problem disease	7
Others	27
Unidentified(Unknown disease)	111
Total	856

Fish Disease Center, Japan Fisheries Resource Conservation Association

一方北海道におけるスクーチカ症の発生は1989年から見られるようになり、本症による死亡率も12.5%から78.9%に及び(Fig. 1)、Fig. 2に見られるように甚大な被害を被った所もあり、ヒラメ以外にも鱈類の一種であるマツカワ(*Verasper moseri*)にもその発生が見られている(Fig. 3)。

魚類由来培養細胞を用いたスクーチカ繊毛虫の分離・培養：

スクーチカ症病魚の脳材料をCHSE-214細胞に接種すると、1~2日後に細胞変性様変化が現れ、細胞は数日後に崩壊した。細胞培養液に細菌の増殖は認められず、無菌的な培養が可能であった。培養虫体を新しい細胞に接種することにより継代培養が可能であり、限界希釈クローニングによりクローンが分離された。環境水由来材料でも同様にクローニングが可能であった。なお一部の試

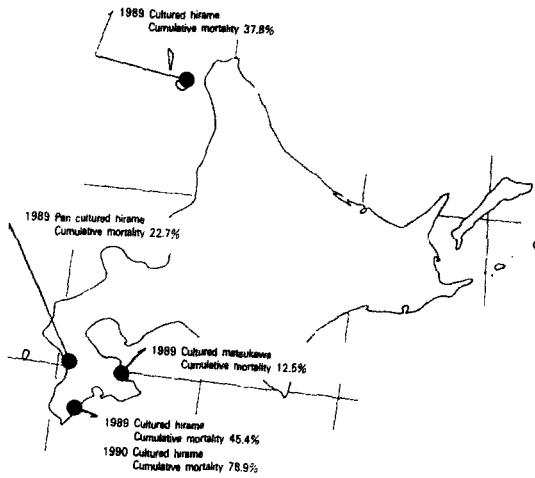


Fig. 1. Outbreak of scuticociliata infection in Hokkaido.

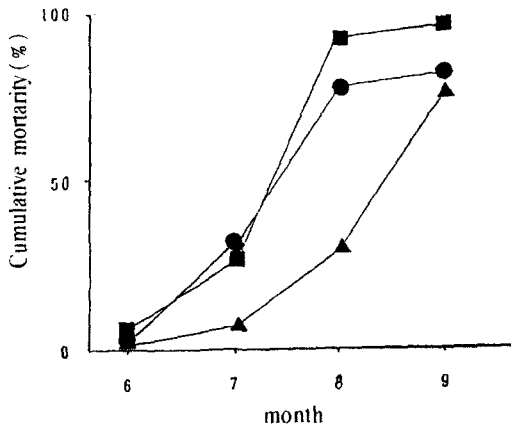


Fig. 2. Cumulative mortality of cultured hiramé (*Paralichthys olivaceus*) caused by scuticociliata infection in Fukushima. Larva were provided from three seed production center, Shikabe, Mano, and Miyako.

料で細菌の増殖が認められたが、スクーチカ繊毛虫の増

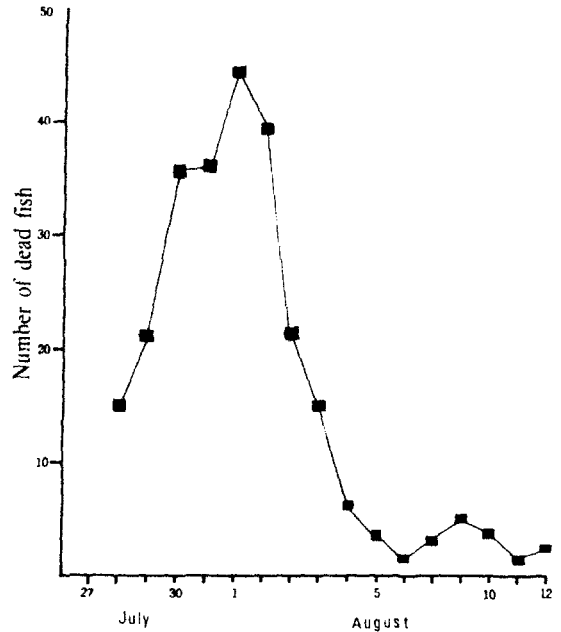


Fig. 3. Mortality pattern of cultured matsukawa; barfin flounder (*Verasper moseri*) caused by scuticociliata infection in Shikabe; Hokkaido Marine Cultivation Center.

▼: Formalin treatment, 250ppm, 40~60 min.

殖に影響は見られず、むしろ時間の経過と共に細菌数が減少した。ついでCHSE-214細胞を含む42種類の魚類由采培養細胞を用い、脳由采株(BR-9001株)の増殖能を観察したが、Table 3に示した全ての細胞を利用して増殖することが可能であった。

スクーチカ繊毛虫の形態:

上記の脳由采株および環境水由采株(BR-9001 & WA-9001株)は共に培養細胞上では紡錘形を呈し、大きさは長さ20~40μm、幅8~15μmであった。走査顕微鏡による観察では長さ23~30μm、幅8~12μmであり、縦に数本の溝があり、この溝に沿って繊毛の配列が観察された(Photo 1)。

Table 3. Growth of scuticociliata on fish cell lines

Origin	Cell line	Growth
Salmonid fish		
Chum salmon	CHH-1, SE, SEH, SET	+
Masu salmon	MSE, YNK	+
Chinook salmon	CHSE-214a, b	+
Kokanee salmon	KO-6	+
Rainbow trout	RTG-2, RTE, RTE-2, RTH, RTT	+
Steelhead trout	STE	+
Atlantic salmon	AS-6, ASE	+
Ciprinid		
Carp	EPCa, b	+
Fathead minnow	FHMa, b	+
Gold fish	EPG	+
Warm water fish and others		
Ayu	AF-29	+
Eel	EK-1, EO-2	+
Blue gill	BF-2	+
Chanel catfish	CCO	+
Brown bullhead	BB	+
Smelt	PF, WF-1, WF-2	+
Snakehead fish	SHH	+
White serdine	WSF	+
Marine fish		
Hirame	HF-1	+
Red sea bream	SBK	+
Kue* ¹	KRE, KRE-2	+
Gizzard shad	GSE	+
Konoshiro* ²	JSKG	+
Rock fish	RF-1, FRF	+
Smelt	SF-2	+
Kanpachi* ¹	PAS	+

*¹: Kelp and red spotted grouper hybrid, *²: Gizzard shad, *³: Purplish amberjack.

Photo. 1. Cultured scuticoculiata observed by scanning electron microscope. A : strain BR-9001, B : strain WA-9001. — : 5um

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* における増殖量:

供試スクーチカ(BR-9001株)を 10^4 虫体/フラスコ宛接種し 20°C で10日間培養した。Fig. 4に見られるように7日で $10^6/\text{ml}$ に、10日後には 5.0×10^6 虫体/mlに増加した。また本虫は培養細胞中で1カ月以上生存が可能であり($15 \sim 20^{\circ}\text{C}$)、1カ月毎に新しい培養細胞に植え替えることにより継代が可能であった。さらに液体窒素中での保存も可能であった。

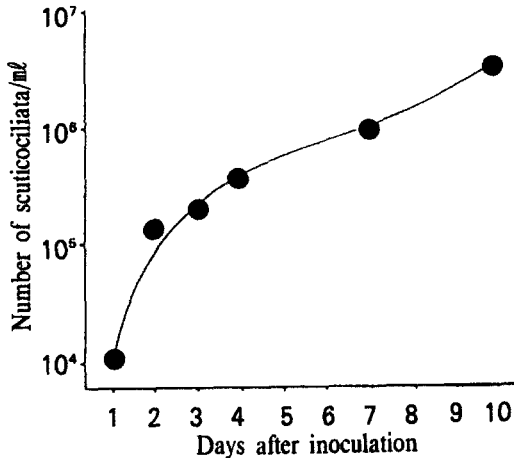


Fig. 4. Growth curve of scuticociliata in 20°C .

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* における増殖温度域と至適増殖温度:

供試スクーチカ(BR-9001株)を5、10、15、20、25、 30°C で5日間培養し、その間の増殖量を測定した結果をに示した。供試したスクーチカ繊毛虫は $15 \sim 30^{\circ}\text{C}$ の範囲でよく増殖し、至適増殖温度は 25°C であった。

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* における至適食塩濃度:

供試スクーチカ(BR-9001株)を培地の食塩濃度が1.0、1.5、2.0、2.5、3.0%下で 20°C 10日間培養した時の増殖量をFig. 5に示した。供試スクーチカは1.0~2.0%食塩濃度でよく増殖し、増殖至適食塩濃度は1.0~1.5%であり、2.5%以上では増殖量の明かな低下が観察された。

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* におけるホルマリン感受性:

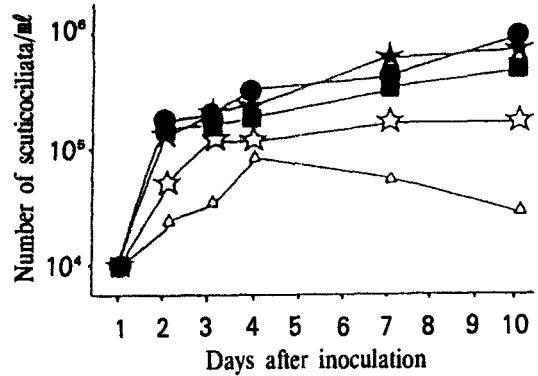


Fig. 5. Growth curves of scuticociliata cultured in different NaCl concentration.

● : 1.0%, ★ : 1.5%, ■ : 2.0%,
☆ : 2.5%, △ : 3.0%.

供試スクーチカ(BR-9001株)をホルマリン処理した場合、洗浄虫体では50ppm 10分間の処理で増殖が阻止されたが、FBSを5%含む場合は400ppm 10分でも死滅しないケースが認められた(Table 4).

Table 4. Formalin sensitivity of scuticociliata

Concentration (ppm)	Treatment(min)			
	1	5	10	20
Washed ciliata in 1% NaCl				
0	+++	+++	+++	+++
10	+++	++	+	+
50	+++	++	-	-
100	+++	+	-	-
150	+++	+	-	-
200	++	+	-	-
Ciliata in MEM containing 5% FBS				
0	+++	+++	+++	+++
10	+++	+++	+++	+++
50	+++	+++	+++	+++
100	+++	+++	+++	+++
150	+++	++	++	++
200	++	++	++	++
400	++	++	-	+

+++ : Too many, ++ : Many, + : Few,

- : No growth

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* におけるFlagyl感受性：
 供試スクーチカ(BR-9001株)をCHSE-214細胞を培養した25cm²容組織培養用フラスコに接種し、培地にFlagylを0.001、0.01、0.1、1、10mg/mlとなるように加え20℃で5日間培養し、その間の増殖量を測定した結果をFig. 6.に示した。供試スクーチカはFlagylが1および10mg/ml存在下では3~5日目以降減少傾向を示したが、0.1mg/ml以下ではFlagylの増殖阻害効果は認められなかった。

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* におけるエクテシン感受性：

エクテシン(SO合剤)を100、50、25、12.5、6.3、3.1μg/ml含む細胞培養系での培養48時間後の虫体の動きを観察したが、Table 5に見られるように100μg/ml添加区で活動が鈍くなる傾向が認められた。

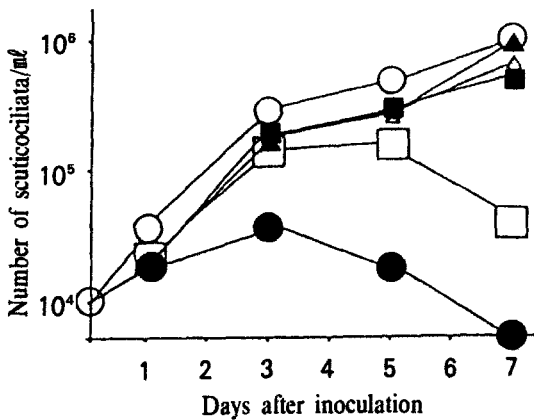


Fig. 6. Sensitivity of scuticociliata to Flagyl.

○ : Control, ● : 10 mg/ml, □ : 1 mg/ml,
 ■ : 0.1 mg/ml, △ : 0.01 mg/ml, ▲ : 0.001 mg/ml

ついでエクテシンを100、200、400、800μg/ml濃度に添加した細胞培養系にスクーチカを接種しその後の消長を観察したが、100μg/ml以上の濃度のエクテシンを含む細胞培養系でのスクーチカの増殖は認められなかった。

Table 5. Effect of Ekuteshin on growth of scuticociliata

Concentration (μg/ml)	Percent of motile ciliata (800 ciliata were observed)	
100	9	15
50	21	47
25	26	67
12.5	53	52
6.25	66	67
3.13	58	75

Concentration Growth of ciliata on cultured cell

500	no
400	no
300	no
200	no
100	no

スクーチカ繊毛虫の *in vitro* におけるオゾン(オキシダント)感受性：

供試スクーチカ(BR-9001)を1.8~9.2×10⁵虫体/100mlの濃度で1.50、1.18、1.01、0.77、0.58、0.43mg/l(ppm)のオキシダントを含む海水に懸濁し、供試スクーチカの生存数を経時的に観察した結果をTable 6に示した。オキシダント濃度が0.43mg/lでは殺虫効果はほとんど認められなかったが、0.58mg/l以上で時間の経過とともに生存数が減少し、0.77および1.01mg/lで30秒、1.18mg/l以上では15秒でスクーチカの生存率は0.1%以下に減少した。

Table 6. Effect of oxidants produced by ozonization on scuticociliata in sea water

Treatment		Concentration of oxidant(mg/ℓ)					
time		1.50	1.18	1.01	0.77	0.58	0.43
0	sec	3.5×10^5	1.8×10^5	1.8×10^5	3.5×10^5	1.8×10^5	9.2×10^5
15	〃	1.8×10^1	7.9×10^2	—	4.6×10^2	1.8×10^5	9.2×10^5
30	〃	1.8×10^1	2.0×10^1	2.0×10^1	1.1×10^2	1.8×10^5	5.4×10^5
1	min	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	7.8×10^1	1.8×10^5	1.6×10^5
2.5	〃	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	3.5×10^4	1.8×10^5
5	〃	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	7.0×10^3	3.5×10^4
7.5	〃	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	4.9×10^1	9.2×10^4
10	〃	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	1.8×10^1	7.9×10^1	5.4×10^4

Number of scuticociliata/ml

スクーチカ繊毛虫の虫体数の最確数(MPN)法による測定法の検討:

供試スクーチカ(BR-9001株)の培養液を海水に懸濁し、その一部をホルマリンで処理後計数し、再度 1.0×10^4 /mlに調整したスクーチカ懸濁海水を対象に培養細胞

を用いたMPN法による計数を行った結果をTable 7に示した。MPN法で $1.6 \sim 5.4 \times 10^4$ /mlと若干高に値を示したが、MPN法によりスクーチカの計数が可能と考えられた。またスクーチカを含む水試料を濾過後、濾過膜を培養する方法でも検出が可能であった。

Table 7. Comparison of direct count number and MPN

Direct count number (Haemocytometer) (100ml)	Number of positive tube					MPN (100ml)
	10	1	0.1	0.01	0.001	
1.0×10^4	5	5	5	4	MT* ¹	1.6×10^4
1.0×10^4	5	5	5	5	NT	$\geq 1.8 \times 10^4$
1.0×10^4	NT	5	5	4	2	5.4×10^4

*¹: Not tested

ヒラメ飼育環境水中のスクーチカ繊毛虫数:
1991年4月から1992年3月にかけ計9回、スクーチカ症

が発生している北海道福島町の養魚場を対象に、水源、貯水タンク、貯水タンク中の沈殿物、養魚水槽および排

水路のスクーチカ繊毛虫数をMPN法により測定した。

1991年4月の調査結果をTable 8に示したか、水源および水源からのポンプアップ地点からはスクーチカは検出

されなかった。しかし貯水タンクから110虫体/ml、養魚水槽から130虫体/ml、さらに貯水タンクの沈澱物に1,100虫体/gものスクーチカ類繊毛虫が検出された。

Table 8. Number of scuticociliata in the hirame culture system

Date	Sample	Place	Viable counts of bacteria (ml, g)	Scuticociliata (l, g)
April 17 1991	Water	Water source	2.0×10^1	<1.8
		Poump station	1.2×10^1	<1.8
		Sedimentation tank	1.1×10^1	110
		Culture tank	1.2×10^1	130
	Mud* ¹	Sedimentation tank	1.4×10^1	1100

*¹: Mixed with water sample

そこで1991年7月に貯水タンクを洗浄し、その後のスクーチカ類繊毛虫数を観察した。Table 9に見られるようにタンク洗浄によりスクーチカは検出されなくなったが、約2カ月後沈澱物から再度検出され、9月、10月と増加し、47虫体/gに達した。11月に再度タンクの洗浄を行い、この時はホルマリン200ppm噴霧処理を行った。スクーチカ数は大幅に減少したが、完全には除去できず、3カ月後の翌年2月には7.5虫体/gとなった。

供試スクーチカ繊毛虫の病原性の検討:

ヒラメ人工種苗を対象に、脳および飼育環境水から分離したスクーチカ(BR-9001およびWA-9001)を用い、浸漬法、腹腔内接種法および罹病魚同居法による攻撃試験を行った結果をFig. 7. に示した。攻撃後30日間の累積死亡率は対照群が28%、浸漬攻撃群では脳由采株攻撃区が30%、環境水由采株攻撃区が26%と対照区と差は認められなかった。これに対し病魚同居飼育区群では48%の累積死亡率を示し、さらに腹腔内接種群では脳由采株接種区が76%、環境水由采株接種区が82%と高い死亡率を示し、供試スクーチカが病原性を有する繊毛虫であることが確認された。

Table 9. Number of scuticociliata in the hirame culture system

Date	Sample	Place	Scuticociliata (l, g)
July 4 1991	Water	Poump station	< 1.8
		Sedimentation tank* ¹	< 1.8
July 11	Water	Sedimentation tank	< 1.8
July 30	Water	Poump station	< 1.8
		Sedimentation tank	< 1.8
		Culture tank	2.0
Aug. 29	Water	Poump station	< 1.8
		Sedimentation tank	< 1.8
		Culture tank	< 1.8
	Mud* ²	Sedimentation tank	1.1
Sep. 27	Water	Sedimentation tank	13
Oct. 3	Mud	Sedimentation tank	47
Nov. 12	Water	Water source	< 1.8
		Sedimentation tank* ³	< 1.8
		Culture tank	< 1.8
	Mud* ²	Sedimentation tank	2.0
Feb. 3 1992	Water	Poump station	< 1.8
		Sedimentation tank	2.0
	Mud* ²	Sedimentation tank	7.5

*¹: After removing the mud and washed with tapwater.

*²: Mixed with water sample.

*³: After removed the mud and washed with tapwater with folmalin, 100ppm.

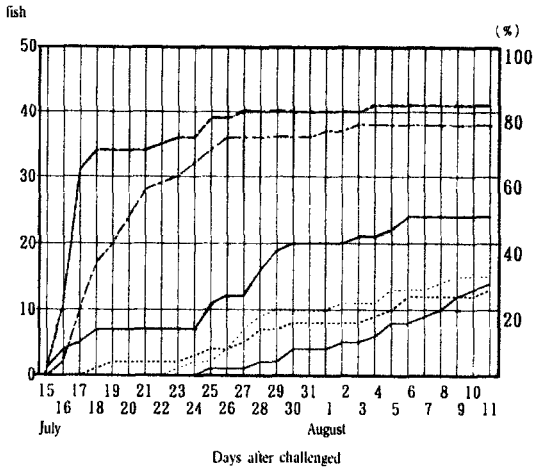


Fig. 7. Cumulative mortality of cultured hirame (*Paralichthys olivaceus*) challenged with cultured scuticociliate strains isolated from brain tissue of diseased fish (BR-9001) and pond water (WA-9001).

- : Control
- : Water born infection (BR-9001 ; 10^3 /ml 1h)
- ... : Water born infection (WA-9001 ; 10^3 /ml 1h)
- · - : Cultured with 5 diseased fish
- : IP injection (BR-9001 ; 10^5 /fish)
- : IP injection (WA-9001 ; 10^5 /fish)

考 察

ヒラメのスクーチカ類繊毛虫感染増はヒラメの種苗生産および養殖が軌道に乗り、全国的な規模でヒラメの飼育が始まった頃から見られるようになった疾病であるが、本感染症は他の寄生虫症と異なり、体表への寄生のみでなく、腹腔や脳等にも侵入することから、防除が非常に困難である。本感染症の病原体であるスクーチカ繊毛虫の培養に関しては、細菌用の液体培地を用いた細菌との共同培養法で研究が行われてきたが、増殖はさほど良くなく、効率的な培養方法の確立が望まれていた。今回ウイルス検査用の魚類由来培養細胞にスクーチカを接種したところ、スクーチカは培養細胞を啄むような行動を

示し、分裂増殖の様子が観察された。当初マスノスケの胚胎由来のCHSE-214細胞を用いたが、当研究室で継代培養中の42種類の細胞を用いて増殖の有無を観察したところ、ヒラメ由来細胞はもちろん、海産魚のマダイ、クエ、コノシロをはじめサケ科魚類、コイ科魚類、その他ウナギ、ブルーギル、アメリカナマズ、ワカサギ、キノボリウオ由来細胞をも利用して増殖した。CHSE-214細胞での増殖量は20℃10日間の培養で 5×10^7 /mlになり、ブレインハートインヒュージョン培地での増殖量の約10倍に達した。しかも本虫は培養細胞中で1カ月以上無菌的に生存が可能であり、1カ月毎に新しい細胞に移植することにより継代が可能となっている。

このように魚類由来培養細胞を用いることにより、スクーチカ繊毛虫の無菌的な培養が可能となったことから、スクーチカ症対策を検討するにあたり、まず本繊毛虫の性状を *in vitro* で調べた。本繊毛虫は15～30℃の範囲でよく増殖し、増殖至適温度は20～25℃であった。一方食塩濃度は1.0～2.0%でよく増殖し、増殖至適食塩濃度は1.0～1.5%であった。さらにホルマリンの効果を検討したところ、遠心管浄虫体の場合は50ppm、10分の処理で死滅したが、5% FBS加MEM中では400ppmで10分間の処理でも死滅しなな場合があったことから、体表粘液中や残餌等の有機物中に存在するスクーチカの完全な殺虫・駆除は困難と考えられる。以上のようにスクーチカは20～25℃、1.0～2.5%食塩濃度の海水中でよく増殖することが明らかになり、北海道の福島町の養殖施設の飼育環境の水温20℃、塩分濃度2.0～2.5%とよく一致し、スクーチカにとってはむしろ好適な環境であることが明らかになった。一方有機物存在下ではホルマリンの効果が十分期待できず、且つ体内に侵入した虫体の殺虫は不可能である。

そこで殺原虫剤の効果を実験することにし、古くから魚類の寄生虫；Cryptocaryon, Hexamita, Ichthyophthirius, Tricomonasなどに対する効果の報告があるFlagylおよびウシ等のコクシジウム症対策に用いられているサルファモノメトキシシとオルメトプリムの

合剤(SO合剤：エクテシン)のスクーチカに対する効果を検討したところ、Flagylが1および10mg/ml存在下で生存数が減少する傾向が見られ、エクテシンの場合も100 μ g/ml以上で増殖が抑制された。今後はin vivoでの効果を確かめる必要があると考える。

次にスクーチカ症の効果的防除対策を検討するにあたり、その来源および虫体数の変動を追跡調査する必要があると考え、まず環境水中に存在するスクーチカ数を計数するに際し、上記の魚類培養細胞を用いた本虫の培養法を基礎に培養細胞を用いたMPN法の検討を行った。ホルマリン処理で直接計数した数とMPN法による計数値を比較したところ、MPN法の方が若干高に値を示したが、オーダに差はなくMPN法によりスクーチカの計数が可能と考えた。またスクーチカを含む水試料を濾過後、濾過膜を培養する方法でも検出が可能であった。

そこで組織培養用フラスコ75cm²、25cm²および24wellプレートへの100、101ml接種および濾過膜を用いた、1,000、100、10ml接種のMPN法により、北海道福島町の養魚施設を対象に環境水中のスクーチカ数を測定してみた。なお沈澱物中のスクーチカ数は沈澱物を1、0.1、0.01g接種して測定した。スクーチカ症発生時の同施設の水源およびポンプアップ地点からはスクーチカは検出されなかったが、貯水タンクおよび飼育水槽水からは1ℓ当たり110~130虫体ものスクーチカが検出された。さらに貯水タンクの沈澱物中に1,100虫体/gと多様のスクーチカが検出され、貯水タンクからの本虫駆除が緊急の課題となった。直ちに貯水タンクにバイパス水路を設置し、タンク内の洗浄を行ったところスクーチカ数は激減し検出限界以下となった。しかし約2ヵ月後再びスクーチカが検出されるようになり、今度は洗浄後、タンクにホルマリンの噴霧を行った。しかしスクーチカは現在までのところ完全に駆除できず、タンク下部の構造を改善する必要がある指摘されている。このようにスクーチカを完全に駆除するには至っていないが、定期的なタンクの洗浄により虫体数は検出限界を越えることはなくなり、ヒラメのスクーチカ感染率も減少し、1991年秋に0.03%減少し、1993年

の種苗にはスクーチカ症は認められなくなっている。

このようにスクーチカ類繊毛虫の発生場所の特定と除去作業により魚病被害は軽減されたが、天然海水に依存する場合、湾が汚染され、常時虫体が侵入するケースも考えられ、用水の処理技術の開発も必要になっている。寄生虫に対しては紫外線を用いた流水殺菌装置では効果が期待できず(吉水・日向1991)、今回オゾン処理を検討してみた。海水をオゾン処理した場合、海水中に存在する臭素等とオゾンが反応し、オキシダントが生成される。このオキシダントは強い魚毒性を示すと共に殺菌・殺虫作用を示す(吉水1992)ことが知られていることから、海水をオゾン処理し、生成されるオキシダント量を基にスクーチカの生存性を検討した。オキシダント濃度が0.43mg/l以下では殺虫効果がほとんど認められなかったが、0.58mg/l以上で時間の経過とともに生存数が減少し、0.77および1.01mg/lで30秒、1.18mg/l以上では15秒でスクーチカの生存率は0.1%以下に減少した。このように飼育用水をオゾン処理することにより用水中のスクーチカの殺虫が可能であると考えられる。実際にオゾン発生機を設置し、オキシダント濃度1mg/lで8.5分間海水を処理し、その後活性炭槽を通して残留オキシダントを除去後、ヒラメ稚魚を飼育したところ、対照群に比し成長に悪影響は認められず、疾病の発生も認められなかった(吉水1992)。

最後に、本研究に供試した分離培養虫体が病原性繊毛虫か否かを人工感染試験により検討したところ、脳および飼育用水から分離したスクーチカ類繊毛虫共に、浸漬攻撃では対照群と差は認められなかったものの、腹腔内接種により高い死亡率を示し、いずれも病原繊毛虫であることが確認された。このように、今回スクーチカ類繊毛虫の培養法の確立により、分離培養と共に計数が可能となり、来源の特定が可能となった。さらに2、3の薬剤にin vitroではあるが殺虫効果が認められ、用水処理に関しても可能性が示唆された。今後はこれらの知見がより有効に発展応用され、スクーチカ症の防除、防疫に役立つことを期待したい。

文 献

- Fryer, J. L., A. Yusha, and K. S. Pilcher: The in vitro cultivation of tissue and cells of Pacific salmon and steelhead trout. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 126, 566~586, 1965.
- 小林 正・大沢秀一・鳥居茂樹・高丸豊好・斎藤節雄・森 立成・絵面良男・吉水 守・村田 駿・小林 清・村井 茂・西村陽一: 日本海漁業振興特別対策事業(環境調査事業)、ヒラメ疾病対策試験、総合報告書、35p, 1993.
- 日本水産資源保護協会: 魚病発生状況調査, 1984~1991.
- 水野芳嗣: ヒラメのスクーチカ症-現場での発生状況と対策について、*養殖*, 28(3), 78~82, 1991.
- 乙竹 充・松里寿彦: ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 稚魚のスクーチカ繊毛虫(膜口類)症、*養殖年報*, 9, 65~68, 1986.
- 吉水 守: 動物培養細胞および癌細胞の凍結保存、魚類培養細胞、酒井昭編、凍結保存-動物・植物・微生物-、朝倉書店、94~96, 1987.
- Yoshimizu, M., M. Kamei, S. Direkbusarakom, and T. Kimura: Fish cell lines: Susceptibility of salmonid viruses. In "Invertebrate and Fish Tissue Culture". Kuroda, Y., E. Kurstak, and K. Maramorosch(Eds.) Japan Scientific Societies Press, Tokyo /Springer-Verlag, pp. 207~210, 1988.
- 吉水 守: 海洋生物のジーンバンク、-系統保存・凍結保存-、*魚類培養細胞*, 海洋, 22, 154~158, 1990.
- 吉水 守: 魚類養殖および栽培漁業でのオゾンの利用、*オゾン年鑑*編集委員会編、*オゾン年鑑 1993~1994年度版*、リアライズ社、東京、pp. 401~409.
- 吉水 守・日向進一: 養魚用水の殺菌法-紫外線およびオゾンの利用-工業用水、*404*, 2~8, 1992.
- 吉水 守: は乳類以外の有用細胞、サケSE、瀬野完二・小山英機・黒木登志夫編、*動物培養細胞マニュアル*、共立出版、東京、pp. 328~329, 1993.