

マボヤの被囊軟化症に対する加温処理の効果

小林俊将・大村敏昭

Effect of warm water treatment on soft tunic syndrome in the edible ascidian *Halocynthia roretzi*

Toshimasa Kobayashi *1 and Toshiaki Ohmura

Abstract

This study aimed to clarify the suitable conditions for preventing soft tunic syndrome in *Halocynthia roretzi* and obtain pathogen-free seeds using warm water treatment. Horizontal infection with the disease agent did not occur when tunic samples of diseased ascidians were incubated in water at 30 °C for 30 min. Moreover, the seeds exposed to the same condition remained viable. These results indicate that treatment with warm water can prevent soft tunic syndrome by ensuring that the seed is pathogen free. Furthermore, *Azumiobodo hoyamushi*, the disease agent, was destroyed when the sea-water samples used were incubated at 35 °C for 1 min or at more than 38 °C for 10 s.

Key words : *Halocynthia roretzi*, *Azumiobodo hoyamushi*, seed

キーワード : マボヤ, 鞭毛虫, 種苗

はじめに

マボヤの被囊軟化症は 2007 年に宮城県で初めて国内での発生が確認され¹⁾, 2008 年には岩手県でも発生が確認された。東日本大震災が起きる 2011 年までに発生海域が年々拡大したことから大きな問題となった¹⁻⁶⁾。発生当初は原因不明であったが, 近年, キネトプラスト綱ネオボド目の新種の鞭毛虫 *Azumiobodo hoyamushi* を病原体とする感染症であることが明らかとなった⁷⁾。病原体の大きさは 10 μm でマボヤの被囊内で増殖する²⁾。発症個体は被囊が軟化して薄くなり死亡する²⁾。累積死亡率は 20~100%と報告されている²⁾。

疫学的調査から本症は先に発生していた韓国から種苗を介して日本に入ってきたと考えられており¹⁾, 本疾病の防疫対策を考えるうえで病原体フリーの種苗を確保するための技術開発は重要である。熊谷ら⁸⁾は培養した病原体を用いた実験により, 30°C の高温水処理で病原体が 1 時間以内に不活化すること, 10 mm サイズの 0 歳種苗が 30°C での 1 時間処理に対して抵抗性を有することを報告している。また, 熊谷ら⁸⁾は有効ヨウ素 10 ppm または有効塩素 5 ppm で 5 分間受精卵を

消毒し, さらに病原体フリーの海水で管理することにより, 親由来の病原体の感染を防除できるとしている。被囊軟化症の病原体は被囊のみで寄生が確認されていることから, マボヤの種苗を温海水に浸漬して表面の被囊内部の温度を上昇させることにより病原体フリーの種苗を作出できると期待される。

そこで, 本研究では種苗の高温処理による病原体フリー化について適切な処理水温と処理時間を検討した。また, 高温処理による海水の病原体フリー化についても検討した。

材料と方法

病原体の温度耐性の検討

被囊軟化症の病原体である鞭毛虫は熊谷の手法²⁾を参考に以下のとおり採集した。被囊軟化症を発病したマボヤ 3 個体の被囊を幅約 5 mm の短冊状に刻んで水温 15°C のろ過海水を入れたビーカーに浸漬した。15°C の恒温室で 4 時間静置した後, 被囊から遊出した病原体を含む海水を準備した。この病原体を含む海水を 100 ml ずつ 4 つのビーカーに分注し, それぞれを 35°C, 40°C, 45°C, 50°C の恒温室に入れて徐々に加温した。各ビーカーから 10 分間隔で採水, 顕鏡して病

*1 岩手県内水面水産技術センター(Iwate Prefectural Inland Fisheries Technology Center)

原体が運動しているか観察した。病原体の運動停止が確認されたビーカーはその時点から 15°C の恒温室に移し、24 時間後に病原体が運動していないか再度確認した。対照区として病原体を含む海水の一部を加温処理せずに 15°C の恒温室に静置した。各ビーカーには記録式温度計を入れておき試験後に海水温の推移を確認した。

なお、本研究では使用した鞭毛虫の種判別は行っていないが、発病個体の被嚢を浸漬した海水中には熊谷の報告²⁾と同じ大きさ、形状の鞭毛虫のみが大量に遊泳していることを確認し、これらを被嚢軟化症の病原体である *A. hoyamushi* であると推定して実験した。

加温処理による被嚢内の病原体不活化の検討

被嚢軟化症を発病したマボヤ 4 個体の被嚢を幅約 5 mm の短冊状に刻んで混合し、4 等分して別々のネットに入れた (被嚢の重量: 32 g/ネット)。各ネットを 30°C の温海水に 10 分、20 分、30 分間浸漬した後、個別の 20 L 水槽の給水直下に垂下した。対照区の被嚢は温水処理をせずに水槽に垂下した。各水槽には健全なマボヤ (重量約 100 g) を 12 個体ずつ入れ、自然水温のろ過海水 (18.9 ± 1.9°C) を掛け流して 30 日間飼育し、被嚢軟化症の発病率を比較した。被嚢軟化症の発病は触診による被嚢の軟化及び被嚢浸漬海水中の鞭毛虫の観察で判断した。感染源の被嚢を入れたネットは 5 日後に水槽から取り除いた。また、死亡した個体はその都度水槽から取り除いた。

種苗の加温処理耐性の検討

シュロ糸に付着させた平均体幅 4.0 ± 0.6 mm のマボヤの人工種苗 10 個体ずつを 30°C のろ過海水に 30 分、1 時間、1 時間 30 分浸漬させた。なお、加温処理前の飼育水温は 8.5°C だった。その後、自然水温のろ過海水 (7.9 ± 0.7°C) を掛け流して飼育し、14 日後、及び 28 日後の生残を比較した。それぞれ、加温処理しない種苗を対照区とした。人工種苗はシュロ糸に付着した状態で実験に用いた。

加温処理による病原体フリー海水の作出条件の検討

病原体を含む海水は前述と同様に発病個体の被嚢を海水に浸漬する手法で準備した。病原体を含む 13°C のろ過海水を入れたビーカーに 80~82°C に加温した海水を適量加えて混合し、瞬間的に 25°C、30°C、33°C、35°C、38°C、40°C、42°C に昇温した。10 秒~5 分後にそれぞれ 10 ml ずつ採水し、病原体の入っていない 13°C の海水

100 ml の入ったビーカーに入れて瞬間的に 13~15°C に降温した。降温後に海水を顕鏡して病原体が運動しているか観察した。また、一部サンプルについては 13°C の恒温室に静置して 12 時間後にも病原体の運動を観察した。

結果

病原体の温度耐性の検討

各恒温室に入れた海水の温度の推移、及び病原体の運動停止が観察された時間 (矢印) を Fig. 1 に示した。35°C 恒温区では 80 分後 (29.3°C)、40°C 恒温区では 50 分後 (31.6°C)、45°C 恒温区では 30 分後 (33.2°C)、50°C 恒温区では 20 分後 (32.3°C) にそれぞれ病原体の運動停止が観察された。また、いずれの場合も 15°C の恒温室に戻して 24 時間後に観察しても病原体の運動は確認されなかった。一方、対照区の海水中の病原体は 24 時間後でも運動していた。

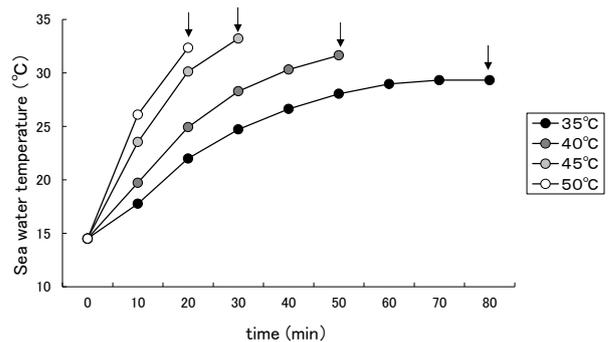


Fig.1 Effect of change in water temperatures of 35 °C, 40 °C, 45 °C, and 50 °C on *Azumiobodo hoyamushi* activity (arrow).

加温処理による被嚢内の病原体不活化の検討

30°C での加温処理時間別の発病率の推移を Fig. 2 に示した。対照区、10 分処理区、20 分処理区で 5 日目から 22 日目にかけて発病個体が増加し、各区の発病率はそれぞれ 41.2%、50.0%、16.7% だった。一方、30 分処理区では発病個体は出現しなかった。

種苗の加温処理耐性の検討

加温処理時間別の 14 日後、28 日後の生残率を Fig. 3 に示した。14 日後の生残率は未処理区、30 分処理区で 100%、60 分処理区、90 分処理区で 90% だった。また、28 日後の生残率は未処理区、30 分処理区で 90%、60 分処理区、90 分処理区で 60% だった。

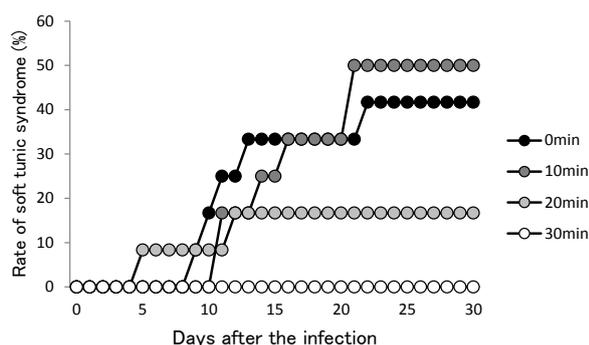


Fig.2 *Halocynthia roretzi*. Individuals with softened tunics in the infection experiment. The tunics of diseased individuals were cut into small pieces and treatment incubated in warm water at 30 °C for 0 min, 10 min, 20 min, and 30 min before use in the infection experiment.

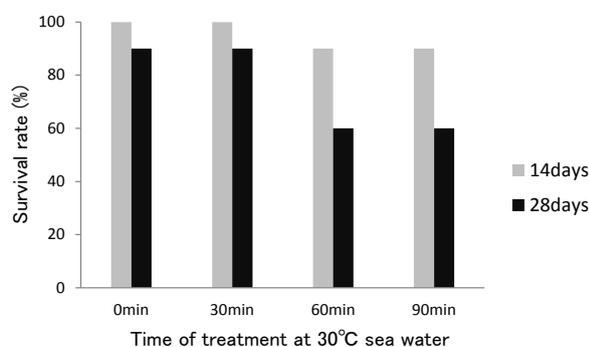


Fig.3 *H. roretzi*. Survival rate of seeds 14 and 28 days after incubation at 30 °C for 0 min, 30 min, 60 min, and 90 min.

加温処理による病原体フリー海水の作出条件の検討

処理水温と処理時間別の病原体の観察結果を Table 1 に示した。水温 30°C では 5 分間の処理でも病原体の運動は停止しなかった。しかし、水温が 33°C では 2 分を過ぎ

ると運動が微弱となった。更に 35°C では 20 秒を過ぎると運動が微弱になり、1 分を超えると運動が停止した。そして、38°C 以上では 10 秒以内に病原体の運動が停止し、その後、水温を降温させても運動が再開しなかった。また、13°C を維持した対照区では 12 時間後でも病原体の運動が確認された。

考 察

病原体の温度耐性の実験において海水温が 30°C を越すと 10 分以内に病原体の運動が停止した。これらは 15°C の恒温室に移して 24 時間後も運動が停止していたことから加温処理により病原体が死滅したと推察された。続いて行った感染実験では、発病個体の被囊を 30°C、30 分処理することにより水平感染が成立しなくなった。これは被囊を加温したことにより被囊内の病原体が死滅したか、大幅に減耗したためと考えられる。

本研究では被囊を感染源とする水平感染が成立しなくなる条件下 (30°C の海水に 30 分浸漬) で処理した種苗の生残率は未処理の対照区と変わらなかった。このことから、種苗を 30°C の海水に 30 分浸漬することにより、種苗の生残性を低下させることなく水平感染が成立しなくなるレベルまで被囊内部に寄生している病原体を減少あるいは死滅させることができることが示唆された。

熊谷ら⁹⁾によると、培養した病原体を 30°C に加温した結果、30 分後には 90% 以上が死滅し、60 分後には全滅したとされている。このことから、本研究では 30°C、30 分処理で水平感染が成立しなくなったものの、完全に病原体フリーの種苗を作出するには 30°C で 60 分程度の処理が必要な可能性がある。ただし、本研究では 30°C で 60 分処理した種苗の 28 日後の生残率が 60% まで低下したことから、この条件で種苗を加温処理する場合は、付

Table 1 Effect of water temperature and treatment time on *A. hoyamushi* activity.

	Sea water temperature							
	25°C	30°C	33°C	35°C	38°C	40°C	42°C	
Time of treatment	10sec	○(○)	○(○)	○(○)	○(○)	×(×)	×(×)	×(×)
	20sec	○(-)	○(-)	○(-)	△(○)	×(-)	×(-)	×(-)
	30sec	○(-)	○(-)	○(○)	△(△)	×(×)	×(-)	×(-)
	1min	○(-)	○(-)	○(○)	×(×)	-	-	-
	2min	○(○)	-	△(△)	-	-	-	-
	3min	-	○(-)	△(×)	×(×)	-	-	-
	5min	-	○(○)	-	×(×)	-	-	-

○ : active
 △ : a little active
 × : not active
 - : ND
 () : after 24hours

着密度が高い種苗を用いる等の検討が必要と考えられる。

なお、マボヤの成体（平均重量 70.1 ± 16.7 g）10 個体を 35°C のろ過海水に 20 分浸漬させたところ、数日以内に全ての個体が死亡した（小林, 未発表）ことから、種苗の処理水温を 30°C 以上に上げて処理時間の短縮を図ることは難しいと思われる。

更に、本研究結果から、飼育水中の病原体は 35°C 以上であれば 1 分間、 38°C 以上であれば 10 秒間処理すれば海水中の病原体を死滅させることができると考えられた。海水の加温設備がある種苗生産施設では簡易に被囊軟化症の病原体フリーの飼育水を確保する手法として有効と思われる。

謝 辞

本研究に対して検体を提供いただいた漁業協同組合関係者に感謝申し上げます。また、研究を進めるにあたり多くの助言をいただいた宮城県内水面水産試験場（現宮城県気仙沼水産試験場）の熊谷明氏に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 須藤篤史・田邊 徹・富川なす美・中家 浩：ホヤの新疾病（被囊軟化症）の疫学的研究, 「平成 19 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書」, 社団法人 日本水産資源保護協会, 東京, 2008, pp.32-47.
- 2) 熊谷 明：マボヤの被囊軟化症（The soft tunic syndrome）診断・防疫マニュアル, 養殖衛生対策推進協議会, 東京, 2012, 24pp.
- 3) 熊谷 明・須藤篤史・田邊 徹・熊野芳明：ホヤの新疾病（被囊軟化症）の疫学的研究, 「平成 20 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書」, 社団法人 日本水産資源保護協会, 東京, 2009, pp.3-16.
- 4) 熊谷 明・伊藤 博・田邊 徹：ホヤの新疾病（被囊軟化症）の疫学的研究, 「平成 21 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書」, 社団法人 日本水産資源保護協会, 東京, 2010, pp.3-14.
- 5) Kumagai A., A. Suto, H. Ito, T. Tanabe, K. Takahashi, T. Kamaishi, and S. Miwa: Mass mortality of cultured ascidians *Halocynthia roretzi* associated with softening of the tunic and flagellate-like cells. *Dis. Aquat. Org.*, 90, 229-240 (2010).
- 6) 熊谷 明・伊藤 博・田邊 徹：ホヤの被囊軟化症の防除技術に関する研究, 「平成 22 年度養殖衛生管理問題への調査・研究成果報告書」, 社団法人 日本水産資源保護協会, 東京, 2011, pp.27-97.
- 7) Hirose E., A. Nozawa, A. Kumagai, and S. Kitamura: *Azuminobodo hoyamushi* gen. nov. et sp. Nov. (Euglenozoa, Kinetoplastea, Neobodonida): a pathogenic kinetoplastid causing the soft tunic syndrome in the ascidian aquaculture. *Dis. Aquat. Org.*, 97, 227-235 (2012).