

境川水系ヨシノボリ属魚類における粘液胞子虫 *Myxobolus nagaraensis* (ナガラシズクムシ) 寄生例

日置 尚之・来栖 可奈・島 瑞帆・増田 絢・松本 淳

Naoyuki Hioki, Kana Kurusu, Mizuho Shima, Aya Masuda
and Jun Matsumoto:

Myxobolus nagaraensis infection in freshwater gobies *Rhinogobius* spp.
from Sakai River, Kanagawa Prefecture, Japan

Abstract. *Myxobolus nagaraensis* (Myxozoa: Myxosporidia) was first reported in 2007 in freshwater gobies (*Rhinogobius* sp.) from Nagara River in the Gifu Prefecture, Japan. Although freshwater gobies are common fish species found in rivers of the Kanagawa Prefecture, infection of these fishes with *M. nagaraensis* has not been reported. Therefore, this study surveyed for *M. nagaraensis* infection in freshwater gobies from Sakai River, which runs through the Kanagawa Prefecture. Freshwater gobies were captured using hand nets at different locations along the Sakai River in November 2017 and February 2018. Diseased fish displaying enlarged abdomens and nodules in the caudal peduncle were caught from 2 locations which were 20 km apart. Cysts excised from these diseased fish contained parasitic spores resembling the morphology of *M. nagaraensis*. DNA was extracted from the cysts and the small subunit ribosomal RNA gene was amplified (SSU rDNA). Based on homology search, the amplified partial product was 99.6% identical with *M. nagaraensis* SSU rDNA (Accession no. AB274267). This is the first report of *M. nagaraensis* infection in freshwater gobies from a river in Kanagawa. Since prevalence of the parasite and its pathogenicity to the goby populations are still unclear, continued examination of other rivers in the prefecture is crucial.

はじめに

ミクソゾア門 (Phylum Myxozoa) に属する粘液胞子虫類は、現在までに 1,300 以上の種が報告されている。粘液胞子虫類の生活環は粘液胞子虫ステージと放線胞子虫ステージからなり、前者は魚類を、後者は環形動物をそれぞれ宿主とする (横山, 2004)。代表的な種としてニジマスの旋回病を引き起こす *Myxobolus cerebralis* が知られており、水産業・養殖業の現場で問題となっている (Kent *et al.*, 2001)。

Myxobolus nagaraensis は粘液胞子虫類に属し、2007 年に横山らにより新種記載された (Yokoyama *et al.*, 2007)。粘液胞子虫ステージの虫体が岐阜県・長良川水系に生息するハゼ科のヨシノボリ属の 1 種 (*Rhinogobius* sp. OR type) から検出され、形態的特徴と遺伝子解析により新種と同定された。その寄生部位

には白色泡沫状のシスト集塊が形成され、感染ヨシノボリは腹部膨満や尾柄部の膨隆を呈するのが特徴である。重度寄生例では、シスト集塊が諸臓器を圧迫して宿主に病害をもたらす (Yokoyama *et al.*, 2007)。この種における放線胞子虫ステージの形態や宿主は確認されておらず、生活環は不明である。

これまでに報告された *M. nagaraensis* 寄生例は、先述した横山らによる新種記載の報告があるのみで、感染個体が確認されたのは長良川水系の宝江川と両満川である (Yokoyama *et al.*, 2007)。一方、正式な報告はないものの、2011 年に静岡市・駿河区の浜川河口、さらに 2013 年には京都府・仙洞御所の南池にて採集されたヨシノボリ属魚類 (以下、ヨシノボリと記載) から *M. nagaraensis* が検出されている (横山, 私信)。また、東京都・井の頭公園内の池と栃木県・那珂川水系のヨシノボリについても *M. nagaraensis* 寄生を疑う個

体が見つかった（間野，私信）。しかし，神奈川県内における *M. nagaraensis* の感染例はこれまで報告がなく，県内における分布状況は不明である。ヨシノボリは国内に広く分布しており，神奈川県内を流れる25の河川においても生息が確認されている（齋藤ほか，2012）。神奈川県北部の城山湖付近を源流とし，町田市・横浜市・相模原市・大和市・藤沢市・鎌倉市を流れて相模湾に注ぐ全長 52.14 km の境川水系でも，カワヨシノボリ・オオヨシノボリ・シマヨシノボリ・ゴクラクハゼ・トウヨシノボリの5種が確認されている（齋藤ほか，2012）。そこで本研究では，境川水系に生息するヨシノボリを対象に，*M. nagaraensis* の感染状況を調査した。

材料と方法

2017年11月と2018年2月に，図1に示す境川水系の7地点（町田駅付近・鶴瀬橋付近・新道大橋付近・境川遊水地付近・東橋付近・笠間大橋付近・青葉橋付近）において，手網を使ってヨシノボリを採集した。採集地点は，齋藤ほか（2012）に記載されたヨシノボリの分布を参考に選定した。採集個体の中から *M. nagaraensis* 寄生を疑うものを選出し，病変部組織片を採取して光学顕微鏡観察した。病変部組織片から検出された虫体胞子については，ウェットマウント

で20個の胞子を観察し，正面観で胞子および極囊のサイズ（長さ×幅），側面観で胞子の厚さをそれぞれ計測し，平均値を算出した。次に，顕微鏡観察により虫体が検出された病変部組織から，DNeasy Blood and Tissue kit（Qiagen）を用いてキットのプロトコールに従いDNAを抽出した。このDNAを鋳型として，粘液胞子虫類の小サブユニットリボソームDNA（SSU rDNA）を標的とするPCR（Yokoyama *et al.*, 2007）をおこなった。PCRに用いたプライマーの配列は，Andree *et al.*（1999）に従い次の通りとした；MX5：5'-CTGCGGACGGCTCAGTAAATCAGT-3'，MX3：5'-CCAGGACATCTTAGGGCATCACAGA-3'。増幅反応には TaKaRa Ex Taq（タカラバイオ）を使用し，反応液組成および増幅条件は Yokoyama *et al.*（2007）に従った。得られた増幅産物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit（Macherey Nagel）を用いてキットのプロトコールに従い精製し，ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解読した。PCR法で使用したプライマーと Myxo18S 575F：5'-CGCCGGTAATTCCAGCTCCAG-3'（Kato *et al.*, 2017）をシーケンス用プライマーとして用いた。塩基配列の解読は株式会社ファスマック（神奈川県・厚木市）に委託した。以上の方法により得られたPCR増幅産物の塩基配列を，GenBank（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>）に登録された配列情報と比較し，ヨシノボリから検出された虫体の種同定を試みた。

結果および考察

神奈川県藤沢市内の境川遊水地付近および東京都・町田駅付近の2地点において，寄生が疑われるヨシノボリが採集された（図1）。なお，他の5地点ではヨシノボリが採集されなかった。形態的特徴と分布域から，境川遊水地付近で採集した個体はトウヨシノボリ，町田駅付近で採集した個体はカワヨシノボリと考えられた（中坊編，2000；齋藤ほか，2012）。しかし，ヨシノボリの分類，特にトウヨシノボリの分類学的位置付けに関しては未だ議論の余地が残されていることをふまえ（中坊編，2013），本稿では感染個体の種の記載は避け，ヨシノボリとする。境川遊水地付近および町田駅付近の2地点において，腹部膨満および尾柄部の膨隆を呈するヨシノボリが複数確認された（図2）。これら感染個体の病変部組織片を圧平して光学顕微鏡下で観察したところ，胞子殻と2個の極囊を有する卵型の虫体胞子が多数検出された（図3）。境川遊水地付近で採取されたヨシノボリ由来の胞子（ $n = 20$ ）を観察した結果，得られた主要な計測値の平均（範囲）は次の通りであった。胞子長：11.7（10.5–12.5） μm ，胞子幅：8.8（8.2–9.4） μm ，極囊長：5.3（4.9–5.9） μm ，極囊幅：2.8（2.3–3.1） μm ，胞子厚：6.0（4.9–6.7） μm 。以上，大きさと形態的特徴が原記載の *M. nagaraensis* の粘液胞子虫ステージと重複した。これら

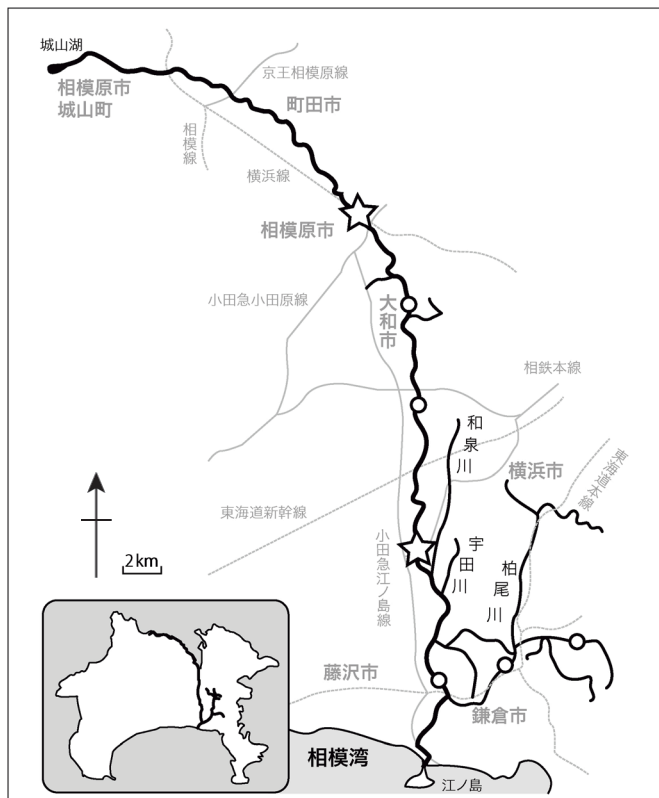


図1. 境川流路図とヨシノボリの採集地点。7地点で採集をおこない，ヨシノボリが採集された2地点を☆，採集されなかった5地点を○で示した。（参照：神奈川県HP・境川）。

の観察結果から、境川水系ヨシノボリから検出された虫体を *M. nagaraensis* と同定した。

横山・長澤（2014）は、養殖魚介類の寄生虫の標準和名目録を作成し、*Myxobolus* には「シズクムシ属」という標準和名を与えている。この目録に倣い、*M. nagaraensis* の標準和名（新称）を、ナガラシズクムシ（長良シズクムシ）とすることを提唱したい。なお、*M. nagaraensis* については原記載論文 Yokoyama *et al.*（2007）に十分な記述と明瞭な図・写真が掲載されていることから、これを基準とする。

次に、境川遊水地付近由来の虫体から抽出した DNA を鋳型として、粘液胞子虫類に特異的な SSU rDNA を標的とする PCR をおこなった結果、約 1,600 bp の増幅産物を得た。この PCR 増幅産物の塩基配列を解読して GenBank 上の配列と照合した結果、*M. nagaraensis* の SSU rDNA（Accession No. AB274267）と 99.6% の相同性を示した。*Myxobolus* は、同じ種内でも SSU rDNA の配列に 0.1 ～ 3.6% の変異が認められるとの報告がある（Atkinson *et al.*, 2015）。本研究における解析では GenBank 上の配列と比べて 0.4% の変異がみられたが、この違いは種内変異の範囲内と考えられる。ただし、本研究において塩基配列を正確に解析したのは境川遊水地付近で採集された 1 個体由来の虫体のみのため、今後、宿主となるヨシノボリの種類や採集場所による塩基配列の種内変異について、さらに検討していきたい。

本調査により、*M. nagaraensis* が境川水系にも分布

することが初めて明らかとなった。今回調査した 7 地点のうち、地理的に離れた 2 地点（境川遊水地付近および町田駅付近）において感染ヨシノボリが確認されたことから、*M. nagaraensis* の分布は限局的ではなく、境川水系に広く分布していると推測される。また、境川で確認されたヨシノボリには両側回遊型の生活史をとる種も存在し（Tsunagawa & Arai, 2008）、海に降りた個体が元の河川以外の川に遡上する可能性がある。そのため、神戸川や引地川など近隣河川においても感染個体が存在する可能性が考えられる。

M. nagaraensis が感染した宿主は、腹部のシスト集塊により血管や鰓、腸管が圧迫され、臓器壊死や異常遊泳、消化不良などを呈するとされ、これらが原因となって死に至るとされている（Yokoyama *et al.*, 2007）。*M. nagaraensis* の分布域が拡大した場合、宿主となるヨシノボリの生息個体数や種構成、さらには生態系にも影響を与えることが懸念される。今後も、神奈川県および周辺地域における *M. nagaraensis* の分布の広がりを監視していく必要がある。境川および近隣河川では、県レッドデータ生物調査で準絶滅危惧種に指定されているゴクラクハゼとオオヨシノボリの生息が確認されている（勝呂・瀬能, 2006; 齋藤ほか, 2012）。これら稀少なヨシノボリへの *M. nagaraensis* 感染状況を明らかにすることも、環境保全の観点から重要である。今後の感染拡大を防ぐためには、*M. nagaraensis* の生活環、放線胞子虫ステージの宿主やヨシノボリへの感染経路についても知見を積み重ねる必要があり、さらなる研究の進展が望まれる。

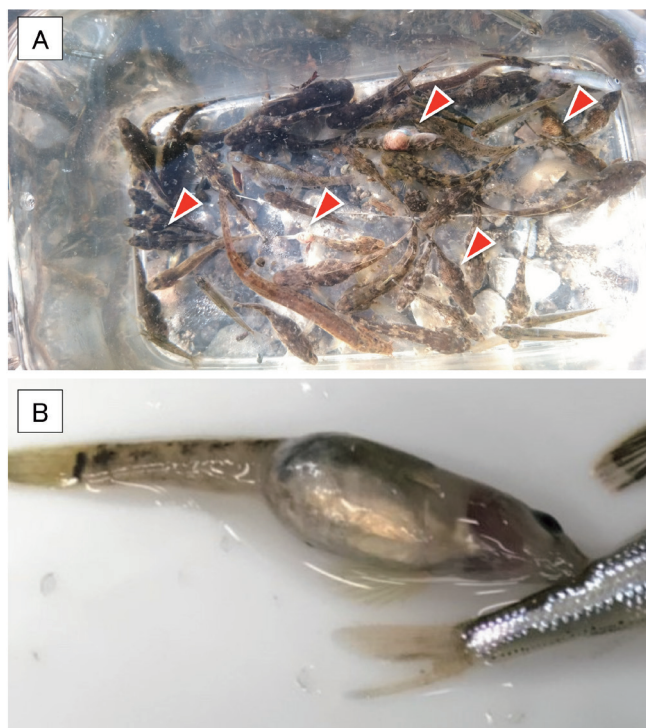


図 2. A, 境川にて採集したヨシノボリ。腹部膨満・尾柄部の膨隆（矢印）を呈する個体が複数認められた。B, 腹部膨満を呈した個体。

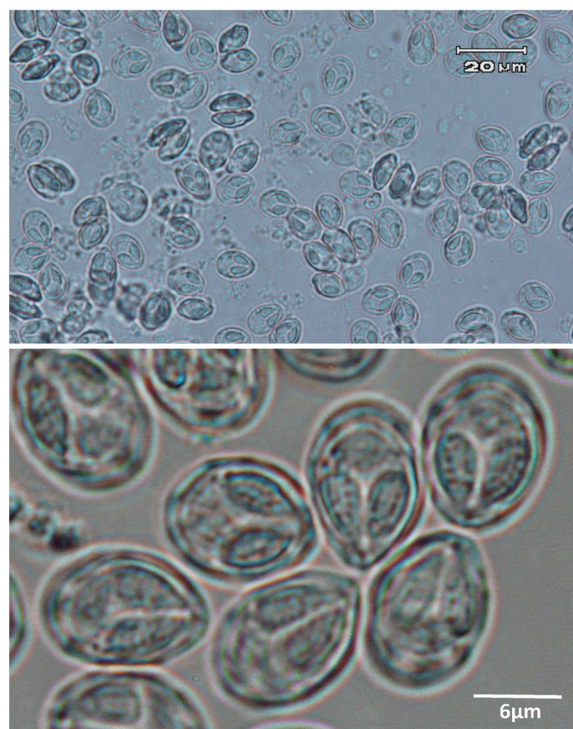


図 3. 光学顕微鏡下で観察された虫体。卵型で、胞子殻と 2 個の極嚢を有する虫体胞子が、多数確認された。

謝 辞

本調査を実施するにあたり、横山 博 氏（東京大学大学院農学生命科学研究科水圏生物科学専攻 魚病学研究室）、間野 伸宏 氏（日本大学生物資源科学部 海洋生物資源科学科）、齋藤 和久 氏・長谷部 勇太 氏（神奈川県環境科学センター）から有益な助言を頂いた。謹んで感謝の意を表す。また、研究活動を支援してくださった日本大学生物資源科学部 獣医学科学術研究サークル基礎班の部員の皆様、同サークル顧問の森友 忠昭 教授・岡林 堅 専任講師に厚くお礼を申し上げる。

引用文献

- Andree, K. B., C. Székely, K. Molnár, S. J. Gresoviac & R. P. Hedrick, 1999. Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bivalvulidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. *The Journal of Parasitology*, **85**(1): 68–74.
- Atkinson, S. D., P. Bartošová-Sojková, C. M. Whipps, & J. L. Bartholomew, 2015. Approaches for characterising myxozoan species. In Okamura, B., A. Gruhl, & J. L. Bartholomew (eds.), *Myxozoan evolution, ecology and development*, pp. 111–123. Springer, Switzerland.
- 神奈川県, online. 境川. <http://www.pref.kanagawa.jp/docs/ex5/river/sakaigawa/> (Accessed on 2018 July-20).
- Kato, E., A. Kasai, H. Tomochi, Y.C. Li & H. Sato, 2017. Four *Myxobolus* spp. (Myxosporea: Bivalvulida) from the gill lamellae of common carp (*Cyprinus carpio*) and Japanese silver crucian carp (*Carassius langsdorffii*) in the western part of Japan, with the description of three new species (*M. tanakai* n. sp., *M. paratoyamai* n. sp., and *M. gimbuna* n. sp.). *Parasitology Research*, **116**(9): 2427–2441.
- Kent, M. L., K. B. Andree, J. L. Bartholomew, M. El-Matbouli, S. S. Desser, R. H. Devlin, S. W. Feist, R. P. Hedrick, R. W. Hoffmann, J. Khattra, S. L. Hallett, R. J. G. Lester, M. Longshaw, O. Palenzeula, M. E. Siddall & C. Xiao, 2001. Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, **48**(4): 395–413.
- 中坊徹次 編, 2000. 日本産魚類検索 全種の同定 第二版. 東海大学出版会. 東京.
- 中坊徹次 編, 2013. 日本産魚類検索 全種の同定 第三版. 東海大学出版会. 東京.
- 齋藤和久・金子裕明・勝呂尚之・大竹哲男, 2012. 神奈川県内河川におけるヨシノボリ属魚類の分布. 神奈川自然誌資料, (33): 85–93.
- 勝呂尚之・瀬能 宏, 2006. 汽水・淡水魚類. 神奈川県レッドデータ生物調査報告書, 275–298.
- Tsunagawa, T. & T. Arai. 2008. Flexible migration of Japanese freshwater gobies *Rhinogobius* spp. as revealed by otolith Sr: Ca ratios. *Journal of Fish Biology*, **73**(10): 2421–2433.
- 横山 博, 2004. 魚類に寄生する粘液胞子虫の生活環と起源. 原生動物学雑誌, **37**(1): 1–9.
- 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., T. Kageyama, K. Ohara & T. Yanagida, 2007. *Myxobolus nagaraensis* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) causes abdominal distension of freshwater goby *Rhinogobius* sp. OR type from the Nagara River. *Fisheries Science*, **73**(3): 633–639.

日置 尚之・来栖 可奈・島 瑞帆：日本大学 生物資源科学部 獣医学科学術研究サークル基礎班
増田 絢・松本 淳：日本大学 生物資源科学部 獣医学科 医動物学研究室