情報

蒸留水および紫外線の *Candidatus Xenohaliotis californiensis* に対する殺菌効果西岡豊弘^{1*}・釜石 隆²・内村裕之³・池上直也⁴・桐生郁也¹・湯浅 啓¹
嶋原佳子¹・乙竹 充¹・大迫典久⁵¹水産総合研究センター増養殖研究所, ²水産庁研究指導課, ³愛媛県農林水産研究所水産研究センター,
⁴千葉県水産総合研究センター, ⁵水産総合研究センター北海道区水産研究所

(2015年3月11日受付)

要旨—キセノハリオチス症原因菌 *Candidatus Xenohaliotis californiensis* に対する蒸留水 (DW) と紫外線 (UV) の殺菌効果をバイオアッセイで評価した。5 から60分間 DW と混合処理した感染クロアワビの糞便に未感染クロアワビを暴露した。また, UV 照射 (17または 30 mJ/cm²) した感染メガイアワビ飼育水を用いて未感染メガイアワビを飼育した。飼育後の PCR 陽性率に統計学的有意差は認められなかったものの, 本菌は DW 未処理区 (2/10個体) ならびに低 UV 区 (2/18個体) と UV 未照射区 (3/17個体) のみに検出され, DW 処理区や高 UV 区では検出されなかった。未処理区の陽性率が低かったこともあり明瞭な殺菌効果は認められなかったが, DW 処理や UV 照射により本菌の感染力を低減できる可能性が示された。

キーワード: *Candidatus Xenohaliotis californiensis*, アワビ, 蒸留水, 紫外線, 殺菌

OIE リスト疾病に指定されている *Xenohaliotis californiensis* 感染症は感染貝の腹足が萎縮することから Withering syndrome (WS) と呼ばれ, 細菌の *Candidatus Xenohaliotis californiensis* [Rickettsia-like organism (WS-RLO)] が種々のアワビ属の消化管細胞内に感染する疾病である (OIE, 2012)。

本疾病は1980年代に北米カリフォルニアの Black abalone *Haliotis cracherodii* の天然資源に壊滅的な被害を与え, その後, 南アメリカ, ヨーロッパ, アジアのアワビにおいても発生が確認されている (Crosson *et al.*, 2014)。日本では2011年に初めてクロアワビ *H. discus discus* 人工種苗において感染が確認され (Kiryu *et al.*, 2013), 現在は, 農林水産省消費・安全局より示されたガイドラインに基づき, PCR 陰性の親貝の使用と稚貝の PCR 検査により未感染の種苗の確保が図られている。一方で, 種苗生産機関からは, 生産過程における WS の防除対策を構築するために, 原因菌の消毒法が強く求められている。一般に細菌やウイルス等の病原体の消毒や不

活化に関する試験は, 病原体の分離培養を基本としたバイオアッセイが行われ, 消毒効果率が算出されるが (木村ら, 1976), 本菌は分離培養が出来ないために消毒効果の算出は困難である。本菌の不活化については, OIE の診断マニュアル (OIE, 2012) においても, 10%未満の漂白剤や 10 mg/mL 以上の次亜塩素酸カルシウムへの浸漬, 1%ヨード液により不活化されると記載されているが, 具体的な試験データを示した報告はなされていない。WS は, 原因菌を含む感染貝の糞便を, 未感染貝が経口的に摂取することにより感染するとされている (OIE, 2012)。そこで, 本研究では感染貝の糞便や糞便を含む飼育水を感染源とし, 未感染のクロアワビおよびメガイアワビ *H. gigantea* を用いたバイオアッセイにより, 蒸留水 (DW) および紫外線 (UV) 照射による本菌の殺菌効果を評価した。

材料および方法

蒸留水処理の WS-RLO の殺菌効果

20個体の食道後部を含む組織を PCR 法で検査し, 陰性が確認された飼育群のクロアワビ人工種苗 (平均殻長 26.4 ± 3.6 mm, 平均体重 2.2 ± 0.8 g) を未感染クロアワビとして用いた。供試貝は20°C の砂ろ過海水の流水で管理し, 適宜配合飼料 (S-A 型, コスモ海洋牧場株式会社)

* 連絡者

E-mail: toyohiro@affrc.go.jp

〒879-2602 大分県佐伯市大字上浦津井浦

水産総合研究センター増養殖研究所上浦庁舎

英語タイトル: Bactericidal effect of distilled water and ultra-violet on *Candidatus Xenohaliotis californiensis*

を給餌した。ただし、試験に供する3日前からは無給餌とした。

自然感染した2012年生産のクロアワビ群から感染源の糞便を得た。感染クロアワビ群のPCRによるWS-RLOの検出では、食道後部を含む組織を5個体ずつプールして1検体とし、検査した30検体全てが陽性であった。感染クロアワビ群から無作為に採取した20個体（殻長 31.5 ± 3.0 mm, 体重 3.8 ± 1.2 g）をアクリル水槽（60 cm×30 cm×35 cm, 実水量 60 L）に収容し、1日に2回、飼育水量の約2/3量を砂ろ過海水で換水し、配合飼料を与えて飼育した。給餌した約12時間後に排出された糞便をサイホンにより2 L ビーカーに回収し、沈殿した糞便をスポイトで50 mL 遠心管に集め静置してさらに沈殿させ、これを湿重量0.5 g ずつ1.5 mL マイクロチューブに分取し、その一部をPCR検査により陽性を確認した。次いで、糞便0.5 g ずつを予め15 mL の蒸留水を入れた25 mL 遠心管に加え、5分間（DW5）、10分間（DW10）、30分間（DW30）及び60分間（DW60）、20°C のインキュベーター内で転倒混合し蒸留水と十分に接触させた。感染貝の糞便を砂ろ過海水と60分間混合した区を陽性対照として2区（SW-1 区, SW-2 区）設けた。

これらの蒸留水または砂ろ過海水で混合処理した感染貝の糞便を、未感染クロアワビ10個体を収容したポリスチレン製水槽（17 cm×17 cm×17 cm, 実水量 4 L）に添加し、通気しながら止水状態で24時間暴露し攻撃した。暴露中には同時に配合飼料も給餌し、暴露終了後には飼育水の全量を砂ろ過海水で換水した。以後は、飼育水の全量を1日2回砂ろ過海水で換水しつつ60日間給餌飼育した。飼育水温は20–23°C に調整した。

飼育期間中は毎日死亡の有無を観察するとともに死亡個体は–85°C で保存した。また、10, 20, 30, 40, 52, 60日目に糞便（約 60 mg）を採集した。採取した糞便と死亡及び試験終了時の生残個体から採取した食道後部を含む消化管組織からDNAを抽出した。DNAの抽出は糞便ではQIAamp DNA Stool Kit（QIAGEN）を使用しマニュアルに従い、食道後部を含む組織ではKiryu *et al.* (2013) の方法に準じて行った。これら抽出したDNAはPCR法（Andree *et al.*, 2000）により検査して感染の有無を調べた。

紫外線照射のWS-RLO 殺菌効果

食道後部を含む組織を個体別に30個体をPCR法で検査し、陰性であった人工生産メガイアワビ群（平均殻長 14.9 ± 1.9 mm, 平均体重 0.3 ± 0.1 g）を未感染メガイアワビとして試験に供した。供試貝は20°C の砂ろ過の流水で管理し、配合飼料を試験開始まで適宜給餌した。

2009年に生産され自然感染したメガイアワビ群（平均殻長 40.6 ± 4.4 mm, 平均体重 6.0 ± 2.0 g）から無作為

に選んだ80個体をアクリル水槽（90 cm×45 cm×45 cm, 実水量 150 L）に収容し感染源とした。なお、食道後部を含む組織のPCR検査では、10個体中5個体が陽性であった。感染メガイアワビは、飼育水量の約2/3量を1日2回砂ろ過海水と交換しながら適宜配合飼料を給餌して飼育した。この感染貝の糞便を含む飼育水を、多孔質の濾材を除いた簡易ろ過器（EHEIM professional3 2075）を通過させて攻撃に用いた。

アクリル水槽（45 cm×30 cm×30 cm, 実水量 35 L）に未感染メガイアワビを20個体ずつ収容し、供試貝の飼育水量の約2/3量を簡易ろ過器でろ過した後にUV照射した感染貝の飼育水と1日2回交換し、供試貝へのWS-RLO感染を誘導した。UV照射区は異なるUV照射装置を用いて照射量を変えた高UV区（UV照射量 30 mJ/cm^2 ）と低UV区（UV照射量 17 mJ/cm^2 ）の2区を設定した。UV照射には、高UV照射区ではターボツイスト Z9W（神畑養魚株式会社）、低UV照射区ではTetra UV-60（Tetra）を用い、照射量はそれぞれの装置のカタログ性能と流速から算出した。陽性対照区は、供試貝の飼育水を簡易ろ過した感染貝の飼育水と1日2回交換した。各試験区のメガイアワビには適宜配合飼料を給餌し、飼育水温を18–23°C に調整して90日間飼育した。その後、感染貝の糞便を未感染貝の体内から排出させるために、砂ろ過海水で1日2回換水しながら30日間飼育した。飼育期間中は死亡および腹足筋肉の萎縮状況を観察し、死亡個体は–85°C で凍結保存した。試験終了後に生残個体と凍結保存していた死亡個体の食道後部を含む組織を検査部位とし、前述の方法に従ってPCR検査を行い、WS-RLOの感染の有無を調査した。

なお、両試験における試験排水は、次亜塩素酸ナトリウム 10 mg/L で2時間処理後にチオ硫酸ナトリウムで中和後排水した（Moore *et al.*, 2009）。

結果および考察

蒸留水によるWS-RLOの殺菌効果の試験では、全ての試験区において60日間の観察期間中に死亡する個体はなく、本症の症状を示す個体は観察されなかった。糞便および試験終了時の食道後部を含む組織のPCR検査では、蒸留水と混合した糞便に暴露した全ての試験区の供試貝の糞便は、試験期間中を通してPCR陰性であった（表1）。陽性対照のSW-1区において60日目に採集した糞便が陽性を示したが、SW-2区の糞便は試験期間中を通して全て陰性であった。試験終了時の60日目に全区のクロアワビの食道後部を含む組織をPCR検査した結果、蒸留水で感染貝の糞便を処理した試験区のクロアワビは全個体が陰性であった。一方、陽性対照区ではそれぞれ10個体のうち1および2個体が陽性を示した。

紫外線照射によるWS-RLOの殺菌効果の試験において

表1 蒸留水処理試験におけるクロアワビの糞便と食道後部からの PCR による WS-RLO の検出

試験区	処 理		糞 便							食道後部
			経過日数 (日)							
	溶媒	時間 (分)	10	20	30	40	52	60	60	
DW-5	蒸留水	5	—	—	—	—	—	—	0/10*	
DW-10	蒸留水	10	—	—	—	—	—	—	0/10	
DW-30	蒸留水	30	—	—	—	—	—	—	0/10	
DW-60	蒸留水	60	—	—	—	—	—	—	0/10	
SW-1	海水	60	—	—	—	—	—	+	1/10	
SW-2	海水	60	—	—	—	—	—	—	2/10	

* PCR 陽性数／検査数

表2 紫外線照射試験における生残および死亡したメガイアワビの食道後部からの PCR による WS-RLO の検出

試験区	紫外線照射量 (mJ/cm ²)	PCR 陽性数／検査数 (%)	
		生残*	死亡
低 UV 区	17	2/16 (12.5)	0/2 (0)
高 UV 区	30	0/20 (0)	0 (0)
陽性対照区	0	3/16 (18.8)	0/1 (0)

* 試験終了時の生残個体。

は、低 UV 区で飼育 4、5 日後に、それぞれ 1 個体が死亡するとともに、その他に人為的事故により 2 個体が死亡した。陽性対照区では飼育 72 日目に 1 個体が死亡し、人為的事故によって 3 個体が死亡した。しかし、何れの死亡個体にも腹足の萎縮は認められなかった。食道後部を含む組織の PCR 検査では、陽性対照区の生残個体 16 個体中 3 個体と低 UV 区の生残個体 16 個体中 2 個体が PCR 陽性を示した (表 2)。しかし、高 UV 区では生残した 20 個体は全て PCR 陰性であった。

蒸留水処理による糞便の殺菌効果の PCR 陽性率をフィッシャーの直接確率計算法により検定を行った結果、いずれの試験区も陽性対照区との間に危険率 5% で有意差は認められなかった。今回の試験条件では蒸留水により原因菌が殺菌されるとは判断出来なかった。しかし、少なくとも本試験期間内で DW 試験区のいずれのアワビにも感染が成立しなかったことから、糞便の蒸留水処理には菌体の感染力を低下させた可能性があると思われる。

紫外線照射の殺菌効果の試験では、試験区と陽性対照区の PCR 陽性率を同様にフィッシャーの直接確率計算法によって検定した結果、いずれの照射区も陽性対照区と比較して有意水準 $P < 0.05$ では有意差は認められなかった。しかし、陽性対照区および低 UV 区において PCR 陽性個体が認められた一方で、高 UV 区では全ての個体が PCR 陰性であり、検定において高 UV 区の P 値は高いものの ($P = 0.08$)、紫外線強度と各試験区の感染率

の間には、強度が高いほど感染率が低いという結果が得られており、紫外線量 30 mJ/cm² 以上で飼育水を処理することにより感染を阻止できる可能性が示唆された。クロアワビの種苗生産において、28–58 mJ/cm² の紫外線照射量で処理した用水は、クロアワビの種苗生産に支障を与えないことから (柴田ら, 2002)、用水を 30 mJ/cm² 以上の紫外線照射量で処理することでアワビ属の飼育に影響を与えずに、用水を介した WS-RLO の感染を低減できる可能性がある。

WS-RLO の感染試験では、これまでに感染貝との同居、感染貝飼育水を用いた未感染貝の飼育、感染貝の食道後部組織の磨砕液を未感染貝へ経口投与することにより感染が成立する事が報告されている (Moore *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2002)。また、感染貝の糞便中には多量の原因菌が含まれており、未感染貝が感染貝の糞便を経口的に取り込むことにより、感染が成立することが推察されている (Moore *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2002; Kiryu *et al.*, 2014)。本研究において砂ろ過海水で混合した感染貝の糞便を、未感染貝の飼育水槽に投与し 24 時間混合物に暴露した陽性対照区で感染が成立したことから、本症は感染貝の糞便を介して伝播することが実験的に証明された。

今回の二つの試験では、陽性対照区の陽性率が低く、また供試個体数が少ないこともあり、蒸留水ならびに UV 照射の効果を十分には検出できなかった。今後は、定量 PCR 法 (Friedman *et al.*, 2014) による攻撃菌量の把握や試験期間の延長、人為感染で高い感染率を示すフクトコブシ *H. diversicolor diversicolor* (西岡ら^{*1}) を使用するなどにより、試験条件の設定を行い、蒸留水や紫外線による殺菌効果を明確にすることで、WS の防除対策の構築に繋げたい。

謝 辞

本研究を実施するに当たり、貴重なクロアワビやメガ

*1 西岡豊弘ら (2014), 平成 26 年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, p. 20.

イアワビを提供頂くと共に飼育に関する助言を頂いた(公財)愛知県水産業振興基金 荒川純平主査、(公財)三重県水産振興事業団 三重県栽培漁業センターの岡田一宏業務課長と濱辺篤技術員並びに試験の準備や設定及び試験期間中の試験員の飼育管理に御協力頂いた、国立研究開発法人水産総合研究センター増養殖研究所南勢庁舎の伊勢谷法代氏、林 香氏、中西明子氏、丸山愛己氏に深謝いたします。

文 献

- Andree, K. B., C. S. Friedman, J. D. Moore and R. P. Hedrick (2000): A polymerase chain-reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with withering syndrome in black abalone (*Haliotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218.
- Crosson, L. M., N. Wight, G. R. VanBlaricom, I. Kiryu, J. D. Moore and C. S. Friedman (2014): Abalone withering syndrome: distribution, impacts, current diagnostic methods and new findings. *Dis. Aquat. Org.*, **108**, 261–270.
- Friedman, C. S., W. Biggs, J. D. Shields and R. P. Hedrick (2002): Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21**, 817–824.
- Friedman, C. S., N. Wight, L. M. Crosson, S. J. White and R. M. Strenge (2014): Validation of a quantitative PCR assay for detection and quantification of 'Candidatus Xenohaliotis californiensis'. *Dis. Aquat. Org.*, **108**, 251–289.
- 木村喬久・吉水 守・田島研一・絵面良男・坂井 稔 (1976): 養魚用水の紫外線殺菌について – I 魚病原菌ならびに養魚水中生存菌の紫外線感受性について. *日水誌*, **42**, 207–211.
- Kiryu, I., J. Kurita, K. Yuasa, T. Nishioka, Y. Shimahara, T. Kamaishi, M. Ototake, N. Oseko, N. Tange, M. Inoue, T. Yatabe and C.S. Friedman (2013): First detection of *Candidatus Xenohaliotis californiensis*, the causative agent of withering syndrome, in Japanese black abalone *Haliotis discus discus* in Japan. *Fish Pathol.*, **48**, 35–41.
- Kiryu, I., T. Nishioka, K. Yuasa, J. Kurita, Y. Shimahara, M. Ototake, N. Ikegami and N. Oseko (2014): Rapid and simple detection method of "Candidatus Xenohaliotis californiensis" using fecal PCR in abalone *Haliotis discus discus* and *H. gigantea*. *Fish Pathol.*, **49**, 41–48.
- Office International des Epizooties (OIE) (2012): Infection with *Xenohaliotis californiensis*. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2012. World Organisation for Animal Health, Paris, pp. 511–523.
- Moore, J. D., T. T. Robbins, R. P. Hedrick and C. S. Friedman (2001): Transmission of the Rickettsiales-like prokaryote "Candidatus Xenohaliotis californiensis" and its role in withering syndrome of California abalone, *Haliotis* spp.. *J. Shellfish Res.*, **20**, 867–874.
- Moore, J. D., C. I. Juhasz, T. T. Robbins and L. I. Vilchis (2009): Green abalone, *Haliotis fulgens* infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regime permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.*, **156**, 2325–2330.
- 柴田利治・筑紫康博・中本 崇・渡辺健二・永島孝之 (2002): 給水の紫外線消毒によるクロアワビ筋萎縮症の予防. *SUISANZOSHOKU*, **50**, 227–232.