クロアワビ筋萎縮症の水平感染¹

中津川俊雄^{2*}・岡部三雄²・室賀清邦³

(1999年7月26日受付)

Horizontal Transmission of Amyotrophia in Japanese Black Abalone¹

Toshio Nakatsugawa^{2*}, Mitsuo Okabe² and Kiyokuni Muroga³

²Kyoto Institute of Oceanic and Fishery Science, Miyazu, Kyoto 626-0052, Japan

³Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University,
Higashihiroshima, Hiroshima 739-8528, Japan

(Received July 26, 1999)

ABSTRACT — The amyotrophia of Japanese black abalone *Nordotis discus discus*, an infectious disease caused by an unknown filterable agent, is the most serious problem in abalone hatcheries in western Japan. In the present study, it was experimentally demonstrated that the disease agent was transmitted through water to susceptible 0-year-old abalones from convalescent 2-year-old carriers which had previously been produced by immersion challenge. The agent was also transmitted via water to juvenile abalones from female adults which were caught in the sea as brood stocks and suspected to be inapparently infected. These results indicate the importance of prevention of horizontal transmission of the amyotrophia agent in abalone hatcheries.

Key Words: amyotrophia, Japanese black abalone, filterable agent, horizontal transmission, *Nordotis discus discus*

クロアワビ *Nordotis discus discus* の筋萎縮症については、最初に京都府での事例について病理組織学的な検討がなされ(中津川ら, 1988), 次いで本症が濾過性病原体による伝染性疾病であることが明らかにされた(中津川, 1990)。本症は、西日本を中心とした各地の栽培漁業センターや中間育成場でのアワビ属稚貝の大量死に深く関与していることが最近になって確認された(桃山ら, 1999)。Nagai *et al.* (1998) は、クロアワビ血球の初代培養を用いて本症の原因体の分離を試み、細胞変性効果(CPE)と考えられる変化を認め、電顕によりウイルス様粒子を観察した。しかしながら、その培養上澄を用いた感染試験で本症を再現することはできず、原因体

は未だ特定されていない(Nakatsugawa *et al.*, 1999)。

本症の感染防除対策法を確立するには、感染経路を明らかにする必要がある。そこで、感染経路の一つと想定される感染耐過貝および採卵用親貝からの水平感染の可能性について検討した。中津川(1990)は、自然発症したクロアワビ稚貝の飼育水槽の排水に健常な稚貝を浸漬することにより、感染、発病させ得ることを報告している。本報では、回復したと考えられる感染耐過貝あるいは外観的には少なくとも本症には罹病していないと考えられる採卵用親貝を用いて健常なクロアワビ稚貝への水平感染の有無を検討した。

材料および方法

感染耐過貝からの伝播実験

感染耐過貝: 隔離施設で種苗生産、育成された健常なクロアワビ1年貝(平均殻長および標準偏差: 17.3 ± 2.5 mm) 40個体に対し、筋萎縮症発生時に採材し4ヶ月間

¹ 京都府立海洋センター業績 No. 134

² 京都府立海洋センター

³ 広島大学生物生産学部

* Corresponding author

Fax: 0772-25-1532

凍結保存（ -80°C ）しておいた病貝の軟体部を磨砕して作製した濾液を用いて浸漬攻撃した。その結果、攻撃後263日目までに本症に特有の症状を呈して14個体が死亡したが、その後は死亡する個体は見られなかった。生残した26個体の内、16個体を飼育し、これらを感染耐過クロアワビ2年貝（殻長： 41.3 ± 6.1 mm）として供試した。また、陰性対照区用として本症に非感染の2年貝25個体（殻長： 38.6 ± 3.5 mm）を供試した。なお、1年貝への人為感染試験で生じた衰弱もしくは死亡貝4個体には、病理組織検査でいずれも本症に特徴的な病変である腫瘍様異常細胞塊の形成がみられ、感染耐過貝とした2年貝の16個体すべてに本症の後遺症である貝殻辺縁部における欠刻痕と着色が観察された。

供試稚貝：上記と同様に隔離施設で種苗生産、育成された健全なクロアワビ稚貝（0年貝）100個体（殻長： 6.7 ± 0.8 mm）を感染試験に供した。なお、試験開始前に供試稚貝と同一群の中から任意に選んだ10個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

攻撃方法：感染源とした感染耐過2年貝の飼育排水を、健全稚貝を50個体収容した攻撃区の飼育水槽に15日間流入させ、その後は通常の濾過海水に切替えた。陰性対照区では、非感染2年貝の飼育排水を同様に15日間飼育水槽に流入させた。攻撃期間中の水温は $11.8 \sim 14.4^{\circ}\text{C}$ であった。

飼育方法：試験期間は、15日間の攻撃期間を含めて120日間（4月12日～8月10日）としたが、この間に水温は約 11°C から 26°C に徐々に上昇した。各区の供試貝は、それぞれ塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴ（ $36 \times 36 \times 23$ cm）に入れ、別々のプラスチック水槽（ $50 \times 37 \times 21$ cm）に収容した。各水槽には5～6回転／時間となるよう濾過海水を流した。試験期間中2～3日に1度市販のアワビ用配合飼料を投与し、水槽掃除を行った。

感染・発病の判定：死亡あるいは衰弱貝がみられた場合には、10%中性緩衝ホルマリン水で固定して病理組織観察に供した。各区の試験終了時の生残貝から無作為に5個体を選び、病理組織観察に供した。固定した貝は常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、本症の特徴的な病変の有無を観察することにより、感染・発病の有無を判定した。

採卵用親貝からの伝播実験

採卵用親貝：若狭湾にある、京都府舞鶴市の無人島である冠島地先で採卵用親貝として採捕された天然クロアワビ22個体（♂、♀各11個体）をそれぞれ♂貝群（以下C群とする）および♀貝群に分け、♀貝群はさらに2群（5個体と6個体）に分けて、室内コンクリート水槽

（ $1 \times 2 \times 1$ m）で飼育した。採捕後約5ヶ月経過した頃から♀貝群の中に摂餌不良の個体が見られたため、摂餌の良好な♀7個体（以下A群とする）と不良な♀4個体（以下B群とする）に分け直し、飼育を継続した。C群には摂餌不良等の異常な徴候を示す個体は認められなかった。餌には乾燥コンブを用いた。なお、この冠島には過去1度も人工種苗を放流したことがない。また、本島は京都府下沿岸から最短でも9 kmと離れている孤島であるため、人工種苗を放流している水域からの人工種苗の移動はないものと考えられる。京都府栽培漁業センターで採卵に使用される親貝は、すべて冠島地先で採捕されたものである。

供試稚貝：隔離された施設で種苗生産、育成された健全なクロアワビ稚貝（0年貝）207個体（殻長： 7.6 ± 0.4 mm）を供試した。なお、試験開始前に供試貝と同一群の中から任意に選んだ5個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

攻撃方法：A群、B群およびC群の親貝飼育水槽内に浮かべた飼育カゴにそれぞれ、49、54および49個体の攻撃区の稚貝を収容し、5日間飼育した。陰性対照区では、供試貝55個体をそのまま稚貝飼育水槽に収容した。なお、同居飼育を行った期間の親貝飼育水槽の水温は 11°C であった。

飼育方法：試験期間は、同居攻撃期間を含め60日間（3月21日～5月20日）とし、水温を 18°C に調節した濾過海水を流入させた。同居攻撃に供した貝は、各区毎に塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴ（ $38 \times 24 \times 25$ cm）に入れ、それぞれ別々のプラスチック水槽（ $50 \times 37 \times 21$ cm）に収容した。試験期間中2～3日に1度市販のアワビ用配合飼料を投与し、水槽掃除を行った。

感染・発病の判定：試験期間中に衰弱貝がみられた場合には、取上げて10%中性緩衝ホルマリン水で固定し病理組織観察に供し、各区毎に死亡数を計数した。試験終了時には各区の生残貝5個体を病理組織観察に供し、感染・発病の有無を検査した。

結 果

感染耐過貝からの伝播

試験期間中の水温および生残率の変化をFig. 1に示した。また、感染試験における生残率および病理組織観察の結果をTable 1に示した。

陰性対照区では、試験期間中に摂餌の低下はなく、シェルターからの脱落個体もみられなかったが、試験終了直前の119日後に2個体死亡し、48個体が生残した。調べた5個体の対照区の生残貝には、筋萎縮症の特徴的な病理組織学的病変、すなわち腹足筋肉内神経系、鰓および外套膜等における異常細胞塊は観察されなかった。

感染耐過貝からの排水に曝した区では、試験開始3日

Fig. 1. Changes in survival rate of infected abalones and water temperature during the experiment period. A broken line shows the control group exposed to the drain water from a tank containing non-infected abalone (2-year-old) for 15 days. A solid line shows the infected group exposed to the drain water from another tank containing infected abalone (2-year-old) for 15 days.

Table 1. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones challenged by exposure for 15 days to drain water from tanks containing 2-year-old abalones, surviving from amyotrophy or healthy (control)

Infection source	Survival rate of juvenile (%)	Histopathological changes* (No. positive / No. examined)
Control group (healthy abalones)	96	0 / 5
Infected group (survivors)	10	9 / 12

* Abnormal cell masses observed in the nerve tissue of foot muscle, gill and mantle.

後に2個体、12日後に1個体および18日後に1個体の計4個体の死亡があったが、以降71日後までは死亡がみられなかった。摂餌が急に低下した73日後に再び死亡が始

まり、その後衰弱あるいは死亡する個体が多くなった。87日後から101日後までに27個体が死亡したが、この間殆ど摂餌しなかった。水温が24°C以上に上昇した104日後以降は死亡が減少した。病理組織検査では、調べた7個体の衰弱、死亡貝(73日後、83日後および120日後の各1個体、93日後および99日後の各2個体の計7個体)のすべてに、また5個体中2個体の生残貝に本症に特有の病変がみられたが、3個体の生残貝には病変は観察されなかった。なお、試験開始3日後の死亡貝については取り扱いによる死亡と考え、組織学的検査は実施しなかった。12日後および18日後の死亡貝2個体では軟体部が腐敗しており、組織学的検査には供試できなかった。

採卵用親貝からの伝播

各区の生残率および病理組織観察の結果をTable 2に示した。

陰性対照区では、試験期間中に3個体の衰弱貝が取上げられ、52個体が生残した。病理組織検査に供した衰弱貝1個体および生残貝5個体のいずれにおいても、腹足筋肉内神経系、鰓および外套膜における異常細胞塊の出現という筋萎縮症の特徴的な病変はみられなかった。

A群同居攻撃区では、観察を開始してから40日後(同居期間の5日間を含む)以降衰弱あるいは死亡する個体が増加して、60日後までに16個体が取上げられ、33個体が生残した。病理組織観察に供した5個体の衰弱貝の内4個体および5個体の生残貝の内3個体に、本症に特有の病変が観察された。

B群攻撃区では、A群と同様に、観察開始40日後以降衰弱ないし死亡する個体が増加し、60日後までに24個体が取上げられ、30個体が生残した。病理組織検査では、供試した7個体の衰弱貝の内4個体には病変がみられたが、残る3個体の衰弱貝と5個体の生残貝には異常は観察されなかった。

C群攻撃区では、観察期間中に2個体の衰弱貝が取上げられたのみで、47個体が生残した。病理組織検査では、調べた衰弱貝1個体には病変はみられず、生残貝5個体

Table 2. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones challenged by cohobitation with an inapparently infected brood stock for 5 days

Donor (brood stock) for cohobitation	Survival rate of juvenile (%)	Histopathological changes* (No. positive / No. examined)
Control (no donor)	94.5	0 / 6
Group A	67.3	7 / 10
Group B	55.6	4 / 12
Group C	95.9	1 / 6

Group A : 7 apparently healthy female, group B : 4 weakened female, and group C : 11 healthy male abalones of a brood stock.

* Abnormal cell masses observed in the nerve tissue of foot muscle, gill and mantle.

の内の1個体に病変が観察された。

考 察

巻貝類であるアワビ類の疾病に関する報告は、世界的に非常に少ない。米国西海岸のカリフォルニア中部沿岸では、1985年以降 Whithering syndrome と呼ばれる疾病によるクロアワビ *Haliotis cracherodii* の天然資源の著しい減少が問題となっており (Alstätt *et al.*, 1996), その原因としてリケッチア様微生物が挙げられている (Gardner *et al.* 1995)。最近、中国の養殖エゾアワビ *Haliotis discus hannai* の稚貝でレトロ様ウイルスによると考えられる大量死の発生が報告されている (Wang *et al.*, 1997)。また、我が国におけるアワビ類の病気については、クロアワビおよびメガイアワビ *Nordotis gigantea* での傷アワビ症 (*Vibrio* sp. 感染症; 松永, 1967) および蓄養アワビでの真菌症 (*Haliphthoros milfordensis*) (畑井, 1982) の事例等がある。

我が国におけるクロアワビの筋萎縮症は、本症罹病貝の磨砕濾液を用いた人為感染試験が成立することから、濾過性病原体による感染症であることが明らかにされている。本症の原因体の特定は未だなされていないが、中国におけるレトロ様ウイルス病とは実験的感染における死亡までの日数の違いおよび異常細胞塊の形成の記載がないことから、異なる病気であると考えられる。

クロアワビの種苗生産および中間育成の過程での本症の防除方法の開発は急務であり、感染経路を明らかにすることは重要である。今回実施した実験で示されたように、感染耐過した2年貝から飼育排水を介して水平感染が成立することが明らかとなった。したがって、感染耐過したクロアワビを稚貝と同じ施設内で育成する場合には、水平感染の可能性を十分考慮して作業すべきであると考えられた。

更に Table 2 に示したように、親貝の飼育水槽に供試稚貝を5日間同居させることにより、感染が成立し発病することが明らかとなった。供試稚貝と親貝との直接的な接触はなく、飼育水槽内に浮かべた飼育カゴに稚貝を収容しただけであり、明らかに水を介して感染が成立したと推察された。親貝の性別で見ると、♀貝と同居させた稚貝における発病率は、♂貝同居稚貝と比べて明らかに高かった。また、外見的に健康な♀貝と摂餌不良等の病的徴候を示した♀貝の場合を比較すると、それぞれに同居させた稚貝の死亡率および発病率には顕著な差異は認められなかった。したがって、親貝、特に♀貝は外見的な健康状態にはあまり関係なく、飼育水中に本症原因体を排出しうるものと考えられ、防疫対策上重要な問題

と考えられた。すなわち、採卵用親貝は筋萎縮症原因体のキャリアーであるとみなし、徹底した隔離が必要である。可能であれば、親貝飼育、種苗生産および中間育成はそれぞれ別の施設で実施すべきである。種苗生産施設と同一の場所にある施設で、感染耐過貝や親貝を飼育せざるを得ない場合には、これらからの水平感染には十分注意し、飼育作業における消毒の励行が必要である。飼育水からの本症原因体の侵入の可能性は否定できないため、飼育水の殺菌も考慮する必要がある。なお最近、福岡県栽培漁業センターでは、親貝の遠隔隔離飼育、受精卵の丁寧な洗浄、洗浄後の卵あるいは孵化幼生の種苗生産施設への搬入、飼育水の紫外線殺菌および飼育設備の徹底した消毒により、本症の発生を予防することに成功したという (柴田利治, 私信)。

今回供試した採卵用親貝は、人工種苗をこれまで全く放流したことのない冠島地先で採捕された天然クロアワビ成貝であったが、本実験の結果から放流種苗の影響を直接的に受けていない天然貝の中にも筋萎縮症原因体の感染を受けている個体があると考えられた。

文 献

- Alstätt, J. M., R. F. Ambrose, J. M. Eagle, P. L. Haaker, K. D. Lafferty and P. T. Raimondi (1996) : Recent declines of black abalone *Haliotis cracherodii* on the mainland coast of central California. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **142**, 185–192.
- Gardner, G. R., J. C. Harshbarger, J. L. Lake, T. K. Sawyer, K. L. Price, M. D. Stephenson, P. L. Haaker and H. A. Togstad (1995) : Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.*, **66**, 111–120.
- 畑井喜司雄 (1982) : 蓄養アワビから分離された *Haliphthoros milfordensis* について. 魚病研究, **17**, 199–204.
- 松永順夫 (1967) : 傷アワビ症に関する研究—Ⅱ原因菌の分離と復元試験. 魚病研究, **2**, 11–21.
- 桃山和夫・中津川俊雄・由良野範義 (1999) : アワビ属稚貝の筋萎縮症による大量死. 魚病研究, **34**, 7–14.
- Nagai, T., T. Nakatsugawa, T. Nishizawa and K. Muroga (1998) : Primary culture of hemocytes from Japanese black abalone *Nordotis discus discus*. *Fish Pathol.*, **33**, 147–148.
- 中津川俊雄 (1990) : 筋萎縮を伴うクロアワビ稚貝の疾病の伝染性. 魚病研究, **25**, 207–211.
- 中津川俊雄・畑井喜司雄・窪田三朗 (1988) : 筋萎縮を伴うアワビ稚貝の病理組織学的所見. 魚病研究, **23**, 203–204.
- Nakatsugawa, T., T. Nagai, K. Hiya, T. Nishizawa and K. Muroga (1999) : A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophy. *Dis. Aquat. Org.*, **36**, 159–161.
- Wang, B., X. Li and C. Gou (1997) : Infection of spherical virus from *Haliotis discus hannai* Ino. *Virologica Sinica* (中国病毒学), **12**, 360–363. (In Chinese.)