血リンパ接種による軟体部の赤変化を 伴うアコヤガイ疾病の再現

森実庸男¹・山下浩史¹・藤田慶之¹・川上秀昌²・
越智 脩³・前野幸男⁴・釜石 隆⁵・伊東尚史⁶・
栗田 潤⁶・中島員洋^{6,8*}・芦田勝朗⁷

(2001年10月11日受付)

Experimental Reproduction of a Disease Causing Mass Mortality of Japanese Pearl Oyster *Pinctada fucata martensii* by Injection of Diseased Oyster Hemolymph

Tsuneo Morizane¹, Hirohumi Yamashita¹,
Yoshiyuki Fujita¹, Hidemasa Kawakami²,
Osamu Ochi³, Yukio Maeno⁴,
Takashi Kamaishi⁵, Takafumi Ito⁶,
Jun Kurita⁶, Kazuhiro Nakajima^{6,8*}
and Katsurou Ashida⁷

¹Ehime Prefectural Fisheries Experimental Station, 5516
Shitaba, Uwajima, Ehime 798-0104, Japan

²Ehime Prefectural Fish Disease Control Center,
Sakashizu, Uwajima, Ehime 798-0087, Japan

³Ehime Women's Junior College, 421 Ibukicyo,
Uwajima, Ehime 798-0025, Japan

⁴Japan International Research Center for Agricultural
Sciences, 1-1 Ohwashi, Tsukuba,
Ibaraki 305-8686, Japan

⁵National Research Institute of Aquaculture, Fisheries
Research Agency, Nansei, Mie 516-0193, Japan

⁶Inland Station, National Research Institute of
Aquaculture, Fisheries Research Agency,
Tamaki, Mie 519-0423, Japan

⁷National Research Institute of Fisheries and Environment
of Inland Sea, Fisheries Research Agency, 2-7-15,
Maruishi, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan

⁸Present address: Headquarters, Fisheries Research

¹ 愛媛県水産試験場

² 愛媛県魚病指導センター

³ 愛媛女子短期大学

⁴ 国際農林水産業センター水産部

⁵ 養殖研究所

⁶ 養殖研究所玉城分室

⁷ 瀬戸内海区水産研究所

⁸ 現所属：水産総合研究センター本部

* Corresponding author

E-mail: kazuhiro@fra.affrc.go.jp

Agency, Fukuura, Kanazawa-ku,
Yokohama 236-8648, Japan

(Received October 11, 2001)

ABSTRACT—To elucidate the causative agent of the mass mortality of cultured pearl oyster *Pinctada fucata martensii*, with a reddish brown adductor muscle and histopathological changes in the loose connective tissue, experimental challenges on healthy oysters were undertaken using hemolymph from diseased oysters as an inoculum under a feeding or a non-feeding condition. The oysters inoculated with the supernatant, the precipitated hemocytes or the filtrate of the diseased oyster hemolymph died within 2 to 3 months, showing signs similar to those of spontaneously affected oysters. These results indicate that a filterable agent in both the supernatant and the pellet of hemolymph of diseased oysters causes the disease.

Key words: *Pinctada fucata martensii*, experimental infection, hemolymph, pearl oyster, mass mortality

1994年頃から愛媛県を始めとする西日本各地の真珠及び真珠母貝の養殖場において、アコヤガイ *Pinctada fucata martensii* 軟体部の赤変化を伴う大量死が発生し、1996年以降は顕在化するとともに産業上深刻な被害をもたらしている¹⁾。黒川ら²⁾は、病貝の外套膜細片を健常貝に移植する実験及び病貝と健常貝の同居飼育による実験の結果から、本大量死が感染症に因るものであることを強く示唆したが、その原因体については特定されるに至っていない³⁾。本症の病理において、病貝に最も普遍的にみられるのは外套膜の結合組織の病変であり、閉殻筋においても特徴的な病変が観察される²⁾。また、血リンパにも特徴的な病状が出現することが明らかにされ、病貝血リンパ中に本疾病の原因体が存在することが示唆された⁴⁾。そこで、病貝の血リンパを健常貝の閉殻筋に接種し、本疾病の再現を試みた。

材料及び方法

供試貝

接種材料作製のため、病貝として、愛媛県の養殖場において明瞭な軟体部の赤変化、外套膜並びに閉殻筋組織に異常がみられるアコヤガイ1年貝(平均殻長68.3±6.53 mm)を用いた。また、健常貝として、石川県能登産のアコヤガイ1年貝(平均殻長74.3±6.90 mm)を用いた。感染実験には、健常貝(平均殻長72.0±2.10 mm)を供した。

攻撃液の調整

接種材料として、健常貝または病貝各20個体の閉殻筋から注射器を用い、1個体当たり1 mL採取し混合した血リンパを、実験に供した。血リンパを遠心分離（実験1, 2; 2,500 rpm, 5分, 20°C, 実験3; 1,500 rpm, 5分, 4°C）し得られた上清を血リンパ上清とし、それをポアサイズ0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過したものを上清濾液とした。供試した血球は5 mLの血リンパの遠心分離により得られた沈渣を濾過滅菌海水で3回洗浄し、5 mLの濾過滅菌海水に懸濁したものとした。

攻撃方法

接種に際し、健常貝を0.1~0.5% 2-フェノキシエタノールで麻酔し、閉殻した後に、閉殻筋に0.1 mL/個体ずつ材料を接種した。実験1においては、病貝血リンパ接種区、病貝血リンパ上清接種区、病貝血リンパ上清濾液接種区、健常貝血リンパ接種区の4区とし、1区当たり20個を用いた。実験2においては、病貝血リンパ接種区、病貝血球接種区及び健常貝血リンパ接種区の3区とし、1区30個を用い、実験3においては、病貝血リンパ接種区、健常貝血リンパ接種区、病貝血リンパ上清接種区、健常貝血リンパ上清接種区、病貝血球接種区、健常貝血球接種区及び無処理区の7区を設定し、各区20個を供した。

飼育方法

実験1, 2は給餌実験系で行い、3.8 tコンクリート水槽において、紫外線照射海水を用い、流水下で飼育した。餌料として塩素消毒処理（100 ppm, 48時間）した海水を用いて培養した珪藻類を主として与えた。実験3は無給餌実験とし、60 Lアクリル水槽において、紫外線照射海水を用い、流水下で飼育した。試験期間は実験1では122日間、実験2では167日間、実験3は84日間とした。飼育水温は実験1では、接種後100日目までは23~28°Cとし、101日目より加温し25~26°Cに設定した。実験2, 3では、水温は、25~26°Cに設定した。

感染の有無の判定

試験終了時には、すべての試験区で無作為に3個体または5個体を採取し、病理組織観察に供した。採取した個体の外套膜の一部を、昇汞ホルマリンまたはDavidsonの固定液で固定後、常法に従いパラフィン包埋し、4 μm 厚の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し、光学顕微鏡で観察した。閉殻筋の色調の判定では、測色計（ミノルタCR-13）を用い、a値を測定した¹⁾。また、死亡率の統計処理は、Fisherの直接確率検定法により行った。

結果及び考察

攻撃試験及び病理組織観察の結果をTable 1に示した。

Table 1. Cumulative mortality, pathological changes of mantle arterial and a-value of adductor muscles of pearl oysters injected with hemolymph of diseased oysters

Inoculum	Cumulative mortality (%)										Pathological change ^{*2}	a-value ^{*3}
	20	40	60	80	84	100	120	122	140	168 dPI ^{*1}		
Challenges under feeding condition												
Experiment 1												
DO ; HL	0	10	20	30		45	55	55	—	—	4/5	4.5–12.4 ^a
DO ; Supernatant of HL	0	15	20	50		50	60	60	—	—	3/5	6.0–10.1 ^a
DO ; Supernatant filtrates of HL	5	15	15	15		40	45	50	—	—	3/5	4.0–9.4 ^a
HO ; HL	0	10	10	10		10	10	10	—	—	0/5	1.1–3.2 ^b
Experiment 2												
DO ; HL	0	0	0	3		3	20		37	73	3/5	1.5–7.8 ^a
DO ; HC	0	0	0	0		0	3		7	30	4/5	1.9–6.6 ^a
HO ; HL	0	0	0	0		0	3		3	7	0/5	0.5–2.2 ^b
Challenges under unfeeding condition												
Experiment 3												
DO ; HL	0	0	0	45	50	—	—	—	—	—	3/3	—
DO ; Supernatant of HL	0	0	25	55	75	—	—	—	—	—	2/3	—
DO ; HC	0	0	0	60	60	—	—	—	—	—	3/3	—
HO ; HL	0	0	0	0	5	—	—	—	—	—	0/3	—
HO ; Supernatant of HL	0	0	0	5	5	—	—	—	—	—	0/3	—
HO ; HC	0	0	10	15	25	—	—	—	—	—	0/3	—
No treatment	0	0	0	20	25	—	—	—	—	—	0/3	—

^{*1} dPI : days post-inoculation

^{*2} Number of abnormal individuals/number of examined individuals

^{*3} Values are expressed as minimum-maximum. Values with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Mann-Whitney's *U*-test.

Abbreviations : DO (diseased oysters), HO (healthy oysters), HL (hemolymph), HC (hemocytes)

実験1においては、病貝血リンパ及び病貝血リンパ上清接種区では攻撃60日目以降に、また病貝血リンパ上清濾液接種区では80日目以降、死亡個体数が増加した。その結果、実験終了時における累積死亡率はそれぞれ、健康貝血リンパ接種区に対して有意に高かった ($p < 0.01$)。実験終了時におけるa値は、病貝血リンパ、病貝血リンパ上清、病貝血リンパ上清濾液接種区で、健康貝血リンパ接種区に比べ有意に高かった。また、病貝血リンパ、病貝血リンパ上清、病貝血リンパ上清濾液接種区で外套膜血管内皮に損傷が観察された。外套神経環に隣接する外套動脈の血管壁は断裂し、病変の著しい個体では管構造が不明瞭になっていた²⁾。

実験2において、病貝血リンパ接種区では100日目以降死亡個体数が増え、病貝血リンパ血球接種区では140日目以降死亡個体数が増え、累積死亡率はいずれも、健康貝血リンパ接種区に対して有意に高かった。

実験終了時におけるa値は、病貝血リンパ、病貝血球接種区で、健康貝血リンパ接種区及び病貝血球磨碎濾液接種区に対し有意に高かった。病貝血リンパ、病貝血球接種区で外套膜血管内皮の損傷が確認された。

実験3においては、病貝血リンパ、病貝血リンパ上清及び病貝血球接種区の累積死亡率は健康貝区に対し、有意差が認められた ($p < 0.05$)。目視による赤変個体の出現はなかった。外套膜の血管内皮の損傷が病貝血リンパ、病貝血リンパ上清、病貝血球接種区で観察された。

以上より、病貝の血リンパ、その濾液、血球を健康貝

に接種することで死亡、軟体部の赤変及び外套膜血管内皮の損傷が起こり、軟体部の赤変を伴うアコヤガイ大量死の症状を再現することができた。さらに、無給餌の場合は、赤変しないが組織の損傷は認められることが明らかになった。

これらの給餌実験及び無給餌実験の結果から、原因体は血リンパ液中及び血球に存在するとともに、 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを通過する濾過性病原体であると考えられる。また、今回確立した血リンパ接種による感染実験手法は、黒川ら²⁾の病貝外套膜移植と比較し接種原の調製が簡便であるため今後の原因体の解明に有効であると考えられた。

謝 辞

本研究の一部は水産庁委託事業の魚病対策技術開発研究の中で行われたことを付記して、感謝する。

文 献

- 1) 森実庸男・滝本真一・西川 智・松山紀彦・蝶野一徳・植村作治郎・藤田慶之・山下浩史・川上秀昌・小泉喜嗣・内村祐之・市川 衛 (2001): 魚病研究, **36**, 207-216.
- 2) 黒川忠英・鈴木 徹・岡内正典・三輪 理・永井清仁・中村弘二・本城凡夫・中島員洋・芦田勝朗・船越将二 (1999): 日水誌, **65**, 241-251.
- 3) 室賀清邦・乾 靖夫・松里寿彦 (1999): 魚病研究, **34**, 219-231.
- 4) 前野幸男・伊東尚史・釜石 隆・森実庸男・中島員洋 (2001): 魚病研究, **36**, 225-230.