

# 高品質アコヤ貝育成促進事業－V

## 感染症対策に関する試験

岩本 仁司・林 政博

### 1. 軟体部磨砕液および血リンパ液接種によるアコヤ貝の赤変化再現試験

#### 目 的

数年来、四国・九州地方でアコヤ貝の閉殻筋赤変化を伴った大量への死事例が多発していたが、平成8年から三重県内でも発生がみられるようになった。その原因については、ホルマリン、ウイルス（ビルナウイルス、アコヤウイルス）、高水温・餌不足と過密養殖、近親交配による弱体化、原虫説などが発表されている。しかし、未だに衆目の一致する原因の究明に至っていない。そこで、まず、このへの死が感染によるものかどうかについて明らかにすることを目的に実験を行った。

#### 方 法

##### 1) 期 間

平成9年11月18日～平成10年4月16日

##### 2) 供 試 貝

健全貝は三重県栽培漁業センターで採苗され熊野市で飼育されたものを用い、赤変貝は愛媛県から平成9年4月に購入し9月まで英虞湾で飼育されたものを用いた。

##### 3) 試験区分

I区：飼育海水を0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過した液を接種

II区：健全貝(5個)の軟体部全てを磨砕し0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過した液を接種

III区：健全貝(4個)の血リンパ液を閉殻筋より採取し混合したものを接種

IV区：赤変貝(5個)の軟体部全てを磨砕し0.45 $\mu$ mのフィルターで濾過した液を接種

V区：赤変貝(5個)の血リンパ液を閉殻筋より採取し混合したものを接種

VI区：健全貝(5個)の軟体部全てを磨砕しプランクトンネットで濾過した液に浸漬

VII区：赤変貝(5個)の軟体部全てを磨砕しプランクトンネットで濾過した液に浸漬

VIII区：無処理

##### 4) 接種液の処理

滅菌濾紙で丁寧に拭いたアコヤ貝軟体部を乳鉢に入れて滅菌ハサミで細切した後、約5倍量のPBSおよび5gの珪砂を加え氷冷中で磨砕した。その後、1500回転、5分間冷却遠心して上清を分離し、さらに7000回転、5分間冷却遠心をした上清を接種液として用いた。

##### 5) 接種方法

供試貝を0.05%フェノキシエタノール海水中で麻酔し、閉殻筋に接種液を0.1mlずつ注射した。

##### 6) 飼育条件

飼育には500 $\ell$ 円形水槽を用いて1区につき丸籠に40個を収容した。水温は、25 $^{\circ}$ Cに設定したが、19～24 $^{\circ}$ Cの範囲で推移した。飼育海水の流量は1分間に3.75 $\ell$ とし排水は次亜塩素酸ソーダで殺菌した。給与餌料にはパプロバまたは米粉をプランクトンネットで濾過したものを使用した。

##### 7) 検査項目

貝の死亡については毎日確認し、累積死亡率を算定した。実験開始後10, 20, 30, 49, 70, 90日は2個, 117, 149日は5個を各区より採取し、血液検査および閉殻筋の色調測定を行った。即ち、閉殻筋から血リンパ液を採取し、スライドガラス上に滴下し5分間静置後、2.5%グルタルアルデヒド海水液を加えカバーガラスで封入して泡状不明物(健全貝にはみられない不明物で異常貝の特徴と考えられている)の出現状況を位相差顕微鏡を用いて観察した。出現状況は  $\square$  が不明物なし、 $\oplus$  が全視野に数個、 $\oplus\oplus$  が全視野に散見される、 $\oplus\oplus\oplus$  が1視野に数個以上確認されたものと定めた。次に閉殻筋を取り出して色彩色差計(ミノルタ CR 100)にてL値、a\*値、b\*値を測定した。また各区2個体ずつ外套膜を採取しダビッドソンの液で固定後、常法にて薄切しHE染色を施して血管内皮変性(赤変アコヤ貝の特徴)の有無を調べた。

#### 結果および考察

##### 1) 累積死亡率

各区の死亡の経過については、赤変アコヤ貝関連区とその他の区に大きな差は確認できなかった(図1)。累

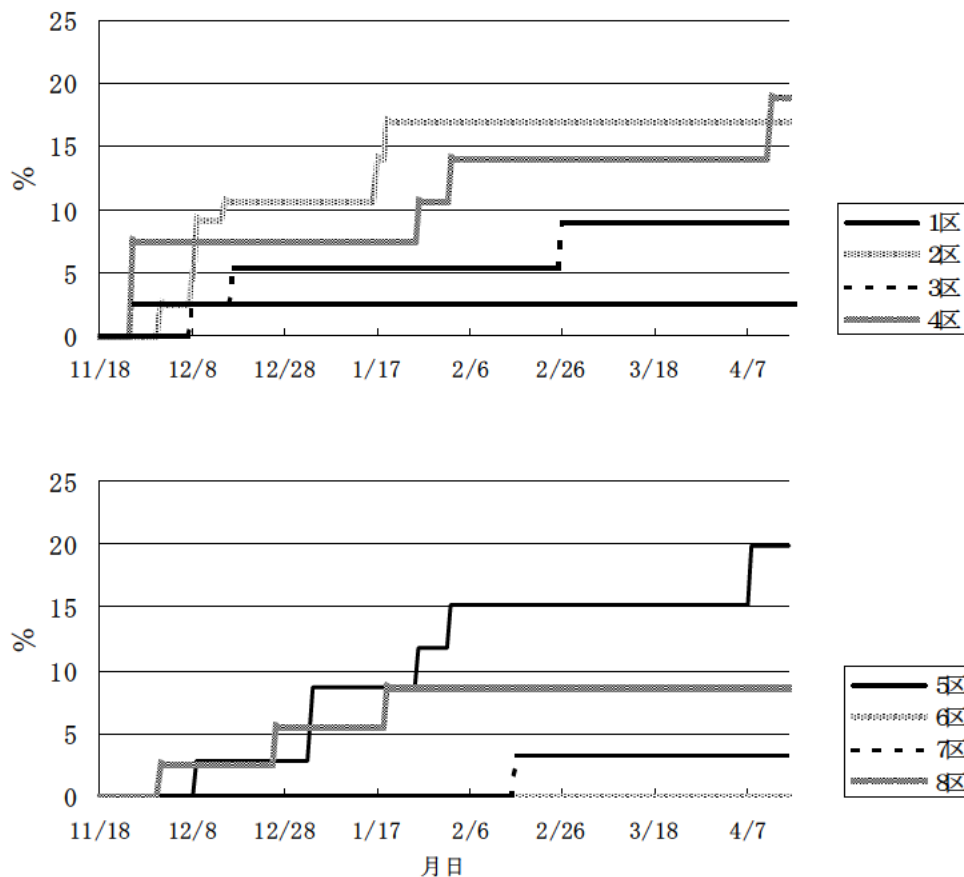


図1 累積死亡率

積死亡率の最も高かった区は赤変アコヤ貝の血リンパ液を接種したV区（19.9%）であった。

#### 2) 供試貝の重量

各採材時点における供試貝の重量には試験区間で大きな差は認められなかった。

#### 3) 血リンパ液の検査

泡状不明物は、I区およびVI区では全期間を通じて全く確認されなかった。その他の区では時期に関係なく散発的に確認された。試験区の中では赤変貝の血リンパ液を接種したV区が最も出現頻度が高く、117日目では5個中3個が+++で、149日目では5個全てが陽性であり3個が+++であった（表1）。泡状不明物は、赤変アコヤ貝と関連しないII、III、VIII区でも軽度ではあったが散見されており、その出現と赤変症状との関連について今後さらに調査する必要があると思われる。

#### 4) 閉殻筋の色調

本実験で使用した色彩色差計で、明らかに誰もが赤色であると認識できるa\*値が2.5以上のものを赤変貝として判定すると、30日目までは全ての区で2.5以下であったものの、I区の70日目（2個中1個）、II区の49日目

（2個中1個）、V区の117（5個中2個）および149日目（5個中3個）、VIII区の117日目（5個中1個）および149日目（5個中1個）で赤変貝が確認された。中でもV区では高率に確認された。L値およびb\*値については特徴的な変化は確認できなかった（表2）。

#### 5) 病理組織検査

水産庁養殖研究所から示された外套膜の血管内皮変性の特徴を基準に判定すると、赤変アコヤ貝と関連性のないI、II、III、IV、VIII区のうちI、III、VIII区でも異常が確認されたが、その程度は軽度であった。一方、V区では117日および149日目でも重度の異常が確認された（表3）。

以上の結果から、8試験区の中で赤変アコヤ貝の血リンパ液を接種したV区に大きな変化及び異常が認められ、赤変を伴う病徴が再現されたと考えられる。したがって、赤変アコヤ貝の血リンパ液中及びその関係組織には赤変症状を引き起こす何らかの感染源が存在する可能性が高いと推察された。また、血リンパ液中の泡状物の出現と閉殻筋のa\*値との関連をみると、泡状物が多いものほど閉殻筋のa\*値が高い傾向がみられた（図2）。

本試験では、飼育海水の殺菌および水温調整（25℃程

度)がでなかったこと、給与餌料が単一であったこと、一回の検査検体数が少なかったことなどが試験結果の精度の低下を招いたとも考えられるので、これらの点を踏まえて追試験をする必要があると考える。

表1 血リンパ液中の泡状物出現頻度の推移

試験区	出現頻度	経過日数							
		10	20	30	49	70	90	117	149
I	-	2	2	2	2	2	2	5	5
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
II	-	2	2	1	0	2	1	4	5
	+	0	0	1	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	1	0	0
	+++	0	0	0	1	0	0	0	0
III	-	2	2	2	2	2	2	4	4
	+	0	0	0	0	0	0	1	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
IV	-	2	2	2	0	2	2	5	5
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	1	0	0	0	0
V	-	2	1	1	2	1	0	2	0
	+	0	0	1	0	0	1	0	1
	++	0	1	0	0	1	0	0	1
	+++	0	0	0	0	0	1	3	3
VI	-	2	2	2	2	2	2	5	5
	+	0	0	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
VII	-	2	1	2	2	2	1	4	5
	+	0	0	0	0	0	1	1	0
	++	0	1	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0	0	0
VIII	-	2	2	2	0	2	2	2	4
	+	0	0	0	0	0	0	1	1
	++	0	0	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	1	0	0	0	0

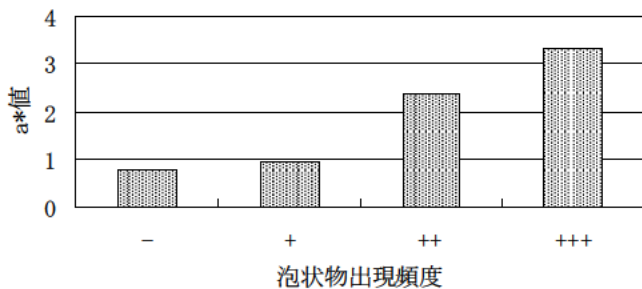


図2 血リンパ液中泡状物出現頻度と閉殻筋色の関係

表2 閉殻筋色 (a\*値) の推移

試験区	経過日数							
	10	20	30	49	70	90	117	149
I	1	1.2	0.1	1.8	1.3	0.7	1	1.2
	1.1	0.9	0.5	1.6	2.5	1.1	0.5	1.3
	·	·	·	·	·	·	0.3	0.8
	·	·	·	·	·	·	1	0.7
II	0.9	1.2	0.2	4.9	1.1	0.9	0.1	0.6
	0.6	0.8	0.4	1.4	0.4	2	2	0.6
	·	·	·	·	·	·	0.1	1.3
	·	·	·	·	·	·	0.2	0.8
III	0.5	1.3	0.2	1.8	0.3	1.3	0.2	0.9
	0.8	0.4	0.4	1.2	1.8	0.7	0.3	0.6
	·	·	·	·	·	·	1.7	0.7
	·	·	·	·	·	·	0.5	NT
IV	0.3	0.6	0.8	2.2	1.1	1.2	0.5	0.3
	0.6	1.1	0.3	1.9	0.6	0.8	0.1	0.8
	·	·	·	·	·	·	0.5	0.8
	·	·	·	·	·	·	0.1	1.2
V	0.2	0.5	0.1	1.9	1.5	1.8	0.4	2.9
	0.7	1.2	0.7	1.4	2.4	1.2	2.7	0.4
	·	·	·	·	·	·	3.8	5.9
	·	·	·	·	·	·	2.3	5.5
VI	0.6	1.3	0.1	1.5	0.9	1.5	0.3	1
	1.3	0.9	0.2	1.3	1.1	NT	0.6	1
	·	·	·	·	·	·	0.3	0.5
	·	·	·	·	·	·	0	0.8
VII	0.5	0.8	0.1	2	1.1	0.4	0.2	1.1
	0.3	1.8	0.2	1.8	0.1	NT	0.1	1.4
	·	·	·	·	·	·	0.1	0.9
	·	·	·	·	·	·	0.1	0.5
VIII	0.2	1.6	0.1	1.4	2	NT	0.2	1.5
	0.6	0.6	0.4	1.2	1	1	0.7	0.8
	·	·	·	·	·	·	0.3	1.2
	·	·	·	·	·	·	0.2	1.6

·:検体なし NT:検査出来ず

表3 外套膜血管内皮性変の推移

試験区	経過日数							
	10	20	30	49	70	90	117	149
I	0	0	0	0	0	0	1	0
II	0	0	0	0	0	0	0	0
III	0	0	0	0	0	0	1	0
IV	0	0	0	0	0	0	1	0
V	0	1	0	0	0	0	2	2
VI	0	0	0	0	0	0	0	0
VII	0	0	0	0	0	0	0	0
VIII	0	1	0	0	0	0	1	0

各区検査数は2個体で表示数字は陽性数

## 2. 外套膜移植によるアコヤ貝の赤変化再現試験

### 目的

水産庁養殖研究所では赤変化アコヤ貝の外套膜を健康アコヤ貝に移植することにより赤変化アコヤ貝を再現することに成功した。本試験では、この追試験として養殖研究所より再現された赤変アコヤ貝と健康アコヤ貝の分与を受け、再度赤変アコヤ貝の外套膜を移植することによる赤変化アコヤ貝の再現に取り組んだ。

### 方法

#### 1) 期間

平成10年1月16日～平成10年4月15日

#### 2) 供試貝および移植方法

移植に供した外套膜は、養殖研究所で再現された赤変貝および健康貝から採取し、試験貝には能登産健康貝(天然貝)を用いた。移植は専門業者に依頼し、真珠の核入れ作業と同じ方法で行った。

#### 3) 試験区分

I区：養殖研究所から分与された赤変化アコヤ貝の外套膜を移植(50個)

II区：養殖研究所から分与された健康アコヤ貝の外套膜を移植(50個)

III区：試験に供した能登産健康アコヤ貝の外套膜を移植(10個)

(III区については、能登産アコヤ貝に異常のないことを確認するために設置)

#### 4) 飼育条件

飼育には500ℓ円形水槽を用い、I区およびII区はポケット籠にそれぞれ50個を、III区は10個を収容した。II区とIII区は同一水槽で飼育した。水温は、パネルヒーターを用いて25℃前後に設定した。飼育水は紫外線殺菌海水で、流量および排水の殺菌方法は試験1と同様とした。給与餌料にはパプロバまたは米粉をプランクトンネットで濾過したものを使用した。

#### 5) 検査項目

貝の死亡については毎日確認し、累積死亡率を算定した。実験開始後31、45、58、76、89日にI区およびII区は5個、III区は2個を採取し、試験1と同じ方法で血液検査(泡状物の観察)、閉殻筋の色調測定および外套膜の病理組織検査を行った。

### 結果および考察

#### 1) 死亡経過及び累積死亡率

各区の死亡の経過をみると、I区およびII区は試験開

始後5日目にそれぞれ1個・2個ずつ死亡したがそれ以後50日以上死亡がなかった。その後I区で82日目に3個が死亡し、89日目までに計5個が死亡した。II区では87日目に1個が死亡した。III区においては29日目に1個が死亡したがそれ以後の死亡はなかった。

累積死亡率は、I区が18.8%、II区が7.5%、III区が10%であった。しかし、室内感染実験で赤変化が発症すると言われている40～50日以降で比較すると、I区が17.2%、II区が3.6%、III区が0%であり、I区が他区に比べて高かった。

#### 2) 重量

各採材時点における供試貝の重量には試験区間で大きな差は認められなかった。

#### 3) 血リンパ液の検査

血リンパ液中の泡状不明物はI区では58日目に5個中4個、76日目に5個中5個、89日目には5個中4個で確認された。またII区では58日目に4個中2個、76日目に4個中1個、III区では58日目に2個中1個で確認された。不明物の出現状況をみると、I区では++以上のものが多く、II区およびIII区ではいずれも+であった(表4)。

表4 血リンパ液中の泡状物出現の経時変化

試験区	出現頻度	経過日数				
		31	45	58	76	89
I	—	4	4	1	0	1
	+	1	0	1	2	1
	++	0	0	1	2	3
	+++	0	0	2	1	0
II	—	5	4	2	3	5
	+	0	0	2	1	0
	++	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0
III	—	2	2	1	1	2
	+	0	0	1	0	0
	++	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0

I、II区で5、III区で2に満たない場合は検査材料とれず

#### 4) 閉殻筋の色調

a\*値が2.5以上の個体数は、I区では58日目に5個中1個、76日目に5個中3個、89日目に5個中3個であったものの、II区およびIII区では全く確認されなかった。L値およびb値については、大きな変化は認められなかった(図3)。

#### 5) 病理組織検査

外套膜の血管内皮変性がみられた個体数は、I区では45日目に5個中1個、58日および76日目に5個中2個、89日目に5個中4個であった。II区では全期間を通じて異常は確認されなかった。しかし、III区では45日目に2個中1個に軽度の異常が確認された(表5)。

以上の結果から、赤変アコヤ貝の外套膜を移植することにより赤変症状が再現されることが再度確認された。また、血リンパ液中の泡状物の出現頻度が+~+++の検体ではのものに比べて閉殻筋の a\*値が高かった。さらに I, II 区を併せて外套膜血管内皮変性の有無と閉殻筋の色とを比較すると、a\*値については外套膜血管内皮変性が陽性の方が高かった (図 4, 図 5)。

表 5 外套膜血管内皮性変の推移

試験区	経過日数				
	31	45	58	76	89
I	0/5*	1/5	3/5	3/5	4/5
II	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
III	0/2	1/2	0/2	0/2	0/2

\*: 陽性数/検査数

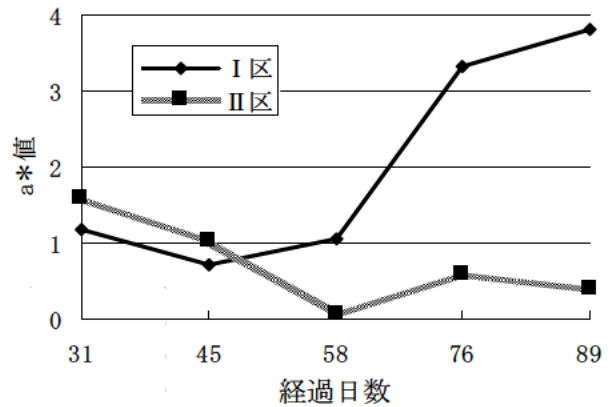


図 3 閉殻筋色の推移 (a\* 値) の関係

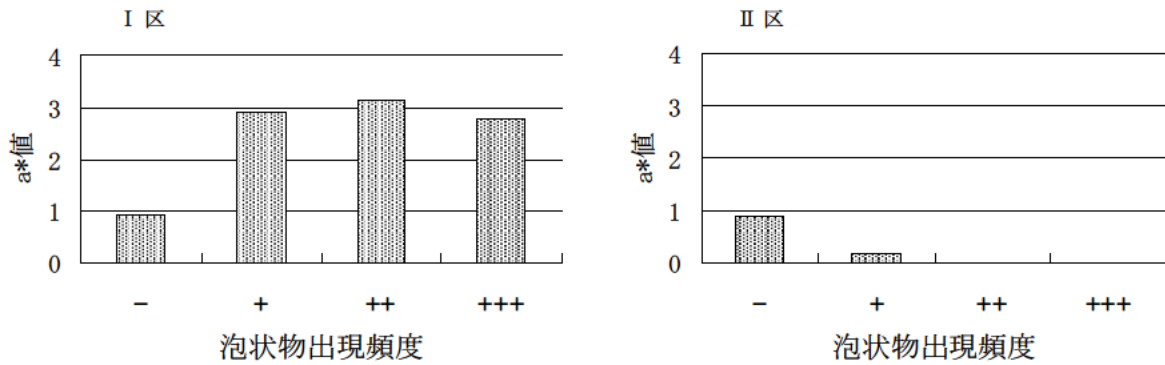


図 4 血リンパ液中の泡状物出現頻度と閉殻筋色の関係

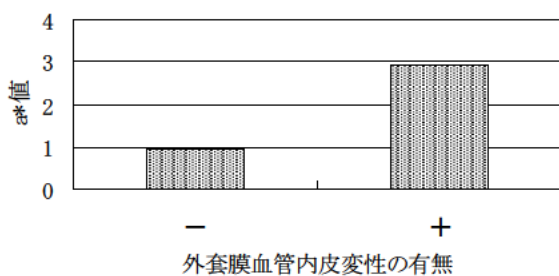


図 5 外套膜血管内皮性と閉殻筋色 (a\* 値) の関係

### 3. 野外におけるアコヤ貝の赤変病徴再現調査

#### 目的

三重県内で飼育されているアコヤ貝の赤変症状の発症状況を把握するため、県内 3 カ所に石川県能登産のアコヤ貝を垂下し定期的に採材してその変化について観察した。

#### 方法

##### 1) 期間

平成10年 2月18日～平成10年10月13日

##### 2) 供試貝

試験貝には石川県能登産健全貝 (天然貝) を用いた。

##### 3) 試験区分

1区: 尾鷲市賀田湾に垂下 (70個)

2区: 南島町神前浦に垂下 (70個)

3区: 浜島町英虞湾に垂下 (66個)

##### 4) 飼育条件



各区とも2個の丸籠に試験貝を35個ずつ入れて水深約3～5 mに垂下した。

#### 5) 採 材

平成10年5月から約30日間隔で1区当たり3～5個採取し、その都度死亡数を確認した。また同時に貝の表面に付着物の清掃も実施した。

#### 6) 検査項目

累積死亡率は、各検査日に採取した貝が生存し続けていると仮定して算定した。調査期間は5～10月までとし、採材は毎月1回実施した。検査項目は試験1および2と同じで、血液検査、閉殻筋の色調測定、外套膜の病理組織検査を行った。

### 結果および考察

#### 1) 死亡経過及び累積死亡率

調査開始（2月18日）から5月6日までの期間における死亡数は1区が2個、2区および3区がそれぞれ1個であった。6月には各区とも死亡はなく、7月は3区のみ1個、8月は3区が8個、2区が1個であった。その後9月には3区が28個、2区が24個と激増し、1区も5個と増加した。月間死亡率は全区とも8月から9月の間が急激に高くなり、3区では66.7%で、2区でも48.0%と高率であった。累積死亡率は1区・2区・3区でそれぞれ17.0%、66.4%、91.5%と試験区間で大きな差がみられた（図6、図7）。

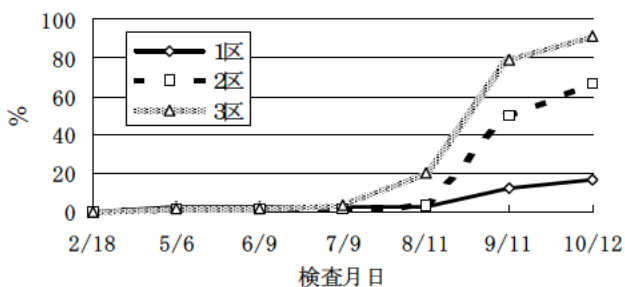


図6 累積死亡率

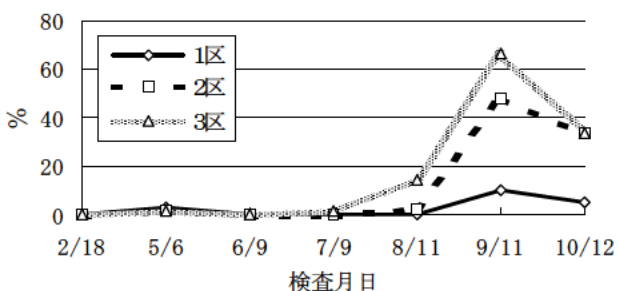


図7 月間死亡率の推移

#### 2) 重 量

各採材時点における供試貝の重量には試験区間で大きな差は認められなかった。

#### 3) 血リンパ液の検査

血リンパ液中の泡状不明物は1区では8月まで全く確認されなかった。しかし、その後に陽性の検体が増加し10月の検査では全検体が陽性であった。2区では7月まで確認されなかったものの、8～10月ではいずれも全検体が陽性であった。3区では6月まで確認されなかったが、7月に+が確認され、それ以後10月までは全検体が陽性であった（図8）。

#### 4) 閉殻筋の色調

a\*値は7月までは全区とも大きな変化は認められなかったが、8月には2区および3区で上昇傾向が認められ、9月・10月にかけて大きく上昇した。1区については、1ヶ月遅れの9月から上昇し、10月には2区および3区には及ばないものの平均で5.1と高い値となった。b\*値もa\*値と同様に暫時上昇傾向にあった。L値については、全区ともに同様な傾向で推移し大きな差異は認められなかった（図9）。

#### 5) 病理組織検査

外套膜の血管内皮の状態は、1区では8月まで正常であったものの、その後9月には40%、10月には全ての検体で組織異常がみられた。2区および3区では7月までは異常が確認されなかったが、8月以降全検体で異常が確認された（図10）。

以上の結果を地区別にまとめると、

- ①尾鷲市賀田湾（1区）では、8月まで特に異常が認められなかった。9月には死亡と血リンパ液中の泡状物が少し観察され、a\*値がやや上昇し、外套膜の血管内皮変性は約60%が異常であった。10月には死亡数はそれほど増加しなかったが血リンパ液中の泡状物の出現および外套膜の血管内皮変性は全ての検体で認められ、a\*値も平均で5.1と赤色化が確認された。
- ②南島町神前浦（2区）では、7月まで特に異常が認められなかった。8月には血リンパ液中の泡状物の出現および外套膜の血管内皮変性が全検体で認められたが、死亡数は少なく、a\*値も低いレベルであった。しかし、9月には死亡数も急増してa\*値も全て3以上となり最高では8.3と高い値であった。
- ③浜島町英虞湾（3区）では、6月まで特に異常が認められなかったが、7月には血リンパ液中の泡状物が確認された。8月には、全ての検体で泡状物の出現および外套膜の血管内皮変性がみられ、死亡数も増加し、

a\*値も平均で3.3と上昇傾向にあった。

これらの結果から、3地区を比較すると、供試貝に異常が現れたのは北東側の3区が最も早く、次いで1ヶ月遅れで南西側の2区、さらに1ヶ月遅れで1区での発症となり、北側から南側へと発症時期が遅れることが確認された。

また、貝にみられる異常所見については、まず血リンパ液中に泡状物が現れ、次いで外套膜血管内皮の変性、さらにa\*値の上昇（赤変化）と死亡数の増加へと症状が進行することが推測された。さらに血リンパ液中の泡状物の出現頻度と閉殻筋色の関係を見ると、泡状物出現頻度が高くなるほどa\*値が高くなる傾向がみられた。外套膜血管内皮変性の度合いと閉殻筋色の関係でも、外套膜血管内皮の変性度合いが高いほどa\*値も高くなる傾向が認められた（図11、図12）。

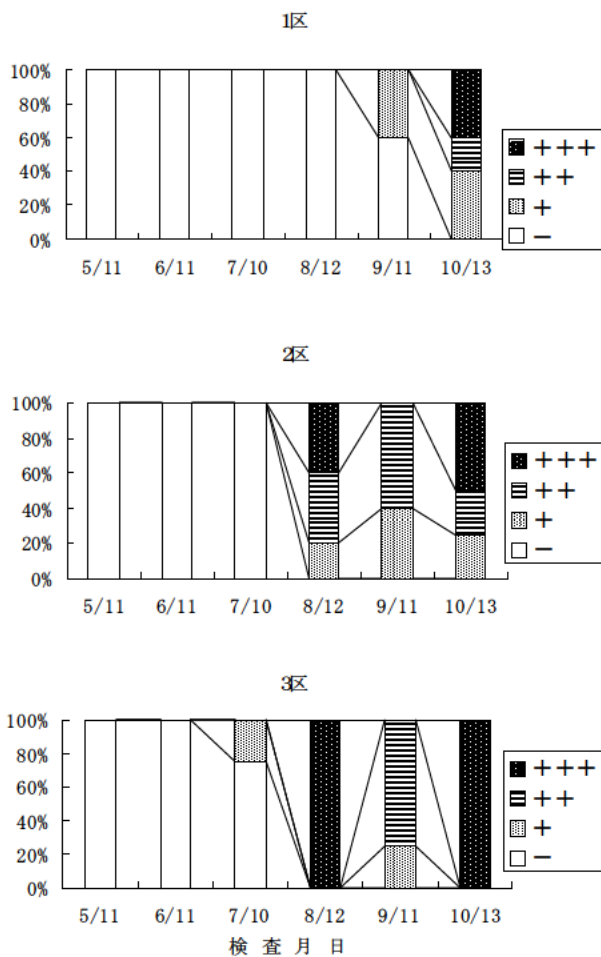


図8 血リンパ液中泡状物出現頻度の推移

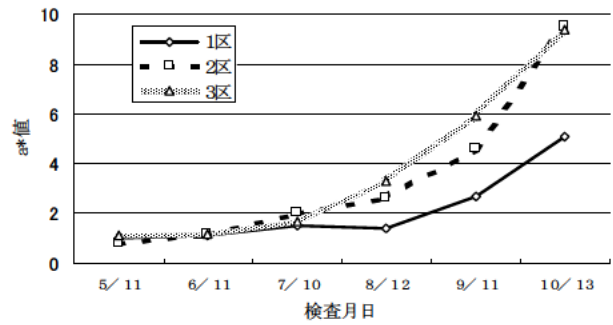


図9 閉殻筋色（a\*値）の推移

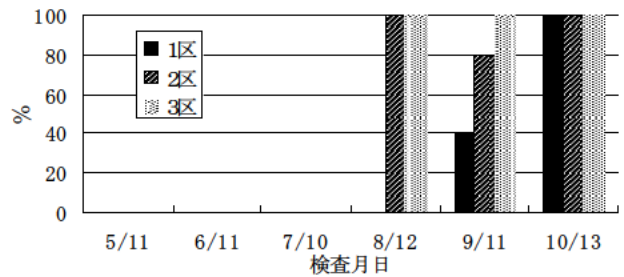


図10 外套膜血管内皮変性率の推移

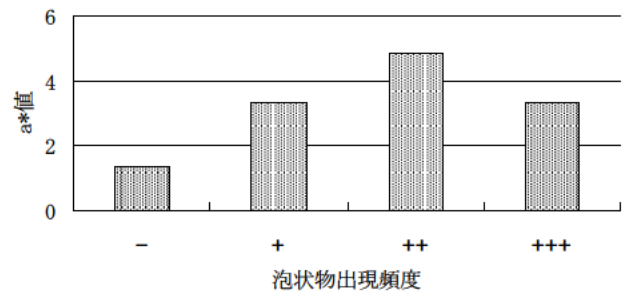


図11 血リンパ液中泡状物出現頻度と閉殻筋色の関係

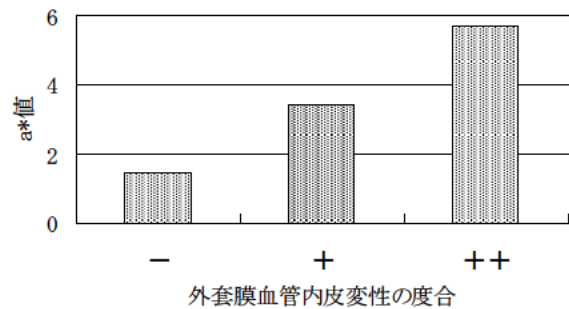


図12 外套膜血管内皮変性と閉殻筋色の関係