

アサリ (*Ruditapes philippinarum*) に寄生するパーキンサス属原虫 (*Perkinsus* sp.) の北海道における感染状況とその感染性について

西原 豊*¹

Infection of protozoan *Perkinsus* in the short-necked clam (*Ruditapes philippinarum*) on the Hokkaido coastal region and the infection examination.

Yutaka NISHIHARA*¹

The Ray's fluid thioglycollate medium (RFTM) assay technique was used to study *Perkinsus* infection in the short-necked clam (*Ruditapes philippinarum*) in the Hokkaido coastal region between 1999 and 2001. Formation conditions for the *Perkinsus* zoospore were observed, with particular attention to favorable temperature and salinity ranges. The zoospore was then cultured with short-necked clam tissues and experimentally infected into short-necked clam, Japanese scallop (*Patinopecten yessoensis*), Japanese oyster (*Crassostrea gigas*), and Ezo abalone (*Haliotis discus hannai*) at various temperatures.

The protozoan was not detected in the Pacific Ocean or the Okhotsk Sea, but it was detected at all tested locations in the Sea of Japan. No effect on zoospore formation was observed to result from variation in salinity (0-3%). In the laboratory, zoospore formation was observed at 20°C and 25°C, but not at 15°C. In the lab portion of the study, however, when *Perkinsus* infection was attempted at 20°C infection was not confirmed in any of the four tested species. At 25°C, however, infection was confirmed in the short-necked clam.

キーワード：アサリ, 寄生, パーキンサス属原虫, 感染域, 感染試験, 北海道

まえがき

パーキンサス属原虫はアピコンプレックス門に属する原虫で、これまでにアメリカガキ (*Crassostrea virginica*) に寄生する *Perkinsus marinus*^{1, 2)}, アワビ類に寄生する *P. olseni*³⁾, ホタテガイ (*Patinopecten yessoensis*) に寄生する *P. qugwadi*⁴⁾ などが知られており、いずれも宿主である貝類の大量斃死を招くことが知られている。アサリ類で海外における寄生報告として、1987年にポルトガルでアサリの一種である *Ruditapes decussatus* の大量斃死が発生した際に *P. atlanticus* の寄生が原因とされている⁵⁾。一方、日本国内では1998年に熊本県と広島県のアサリ (*R. philippinarum*) にパーキンサス属原虫が寄生しているとの報告があった^{6, 7, 8)}。1999年に浜口⁹⁾ は全国78地点のアサリおよびヒメアサリ (*R. variegates*) を調査し、

北海道の道東、道北地区を除いた全ての地点で本原虫の寄生を確認した。

本研究では、さらに調査地点を増やし北海道周辺海域のアサリのパーキンサス属原虫の詳細な感染状況の確認をすると共に、遊走子形成条件および感染性を検討したので報告する。

材料および方法

道内15か所からアサリを採取し、Rayの方法¹⁰⁾をChoi *et al.* が改変を加えたRay's fluid thioglycollate medium (RFTM) 法¹¹⁾ でパーキンサス属原虫の栄養体 (trophozoites) を培養し、前遊走子嚢 (prezoosporangia) を形成させることにより本原虫の検出を試みた。また、パーキンサス属原虫の前遊走子嚢から遊走子嚢

報文番号 A453 (2009年12月) 日受理)

*1 北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Central Fisheries Experiment Station, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan)

(zoosporangia) を経て遊走子 (zoospore) の形成を試み、その形成適正条件を培養温度と塩分濃度の点から調べた。さらに、形成された遊走子を用い、アサリに対する感染条件を調べると共に、北海道内における重要資源であるホタテガイ、マガキ (*Crassostrea gigas*)、エゾアワビ (*Haliotis discus hannai*) に対する感染試験を行った。

1. 北海道沿岸における感染域

1999年に日本海側の江差、小樽市忍路の2地点、2000年は津軽海峡の上磯、日本海側中部の石狩市厚田、北部日本海側の稚内、利尻町礼文の2地点、オホーツク海側として枝幸、紋別、網走の3地点および北部太平洋側として浜中、散布、厚岸の3地点、2001年は石狩川の河口縁辺部と太平洋側の静内からアサリを採取した (Fig.1)。1地点12~24個を中央水産試験場に輸送し、RFTM法を用いて栄養体から前遊走子囊の培養を行いパーキンサス属原虫の検出を試みた。

RFTM法による栄養体の培養は、外套膜および鰓組織の一部をペニシリンGカリウム 500単位/mL、硫酸ストレプトマイシン 500 μ g/mLを含むチオグリコレート培地で25 $^{\circ}$ C、5日間暗所で培養し、ルゴール液で染色後、前遊走子囊の観察を行った。栄養体の観察は光学顕微鏡を用い、200倍で1サンプルにつき100視野を観察し、前遊走子囊が観察されないものを陰性とした。以下の試験でも同様の方法で行った。

2. 遊走子の形成条件

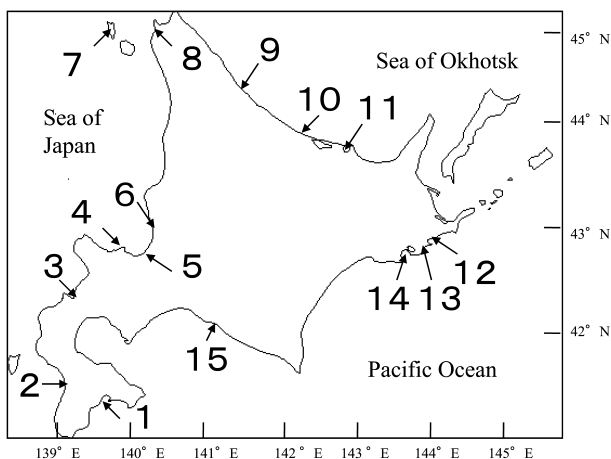


Fig.1 Location of collection sites for Short-necked clam used in this study. 1:Kamiiso, 2:Esashi, 3:Suttsu, 4:Oshoro, 5:Ishikari, 6:Atsuta, 7:Rebun, 8:Wakkanai, 9:Esashi, Okhotsk, 10:Monbetsu, 11:Abashiri, 12:Hamanaka, 13:Chirippu, 14:Akkeshi, 15:Shizuna

遊走子を形成する温度と塩分濃度条件を調べた。RFTM法で培養した前遊走子囊を24穴プレートに収容し、4000単位/mLのペニシリンGカリウムと硫酸ストレプトマイシンを含む滅菌人工海水 1 mLを加え25 $^{\circ}$ Cで24時間培養後、人工海水を捨てて、新たに培養培地¹²⁾ (DMEM: Ham's F12 = 2:1, 5%仔牛血清, 人工海水) を1 mL加え15 $^{\circ}$ C, 20 $^{\circ}$ Cおよび25 $^{\circ}$ Cで7日間培養し、前遊走子囊の細胞分裂と、遊走子形成の有無を確認した。

塩分濃度の検討を行うために、滅菌人工海水 1 mLを加え25 $^{\circ}$ Cで24時間培養後、人工海水を捨て塩分濃度をそれぞれ0%, 7.5%, 15%, 22.5%に調整した培養培地を1 mL加え、25 $^{\circ}$ Cで7日間培養し、前遊走子囊の細胞分裂と、遊走子形成の有無を確認した。

3. 遊走子を用いた感染試験

3. 1. アサリ

飼育水槽には、底面に砂を敷いた10L容量の亚克力水槽を用いた。飼育水は中央水産試験場の立地する余市沖から取水したろ過海水を用いた。また感染実験に用いたアサリは、前項1であらかじめパーキンサス属原虫が陰性であることを確認した地域のアサリを用いた。飼育中はエアレーションを施し、キートセラスを適宜給餌した。

試験1として、平均殻長47.2mmのアサリ5個体を飼育水槽に収容し、前項2の方法で用意したパーキンサス属原虫遊走子液を1 mL加え20 $^{\circ}$ Cと25 $^{\circ}$ Cで24時間浸漬した後、飼育水を全交換し、それぞれの温度で33日間恒温器内において止水で飼育し、7日間に2回を目安に、同温度に調整した飼育水を全交換した。止水飼育終了後、約20 $^{\circ}$ Cの流水で30日間飼育した。飼育終了後、鰓と外套膜をRFTM法で培養し、栄養体の形成の有無を確認した。さらに栄養体の形成が確認された個体については、定法により組織切片標本作製し、パーキンサス属原虫の組織内での感染形態を確認した。

試験2として、飼育水槽を2水槽用意し、平均殻長40.6mmのアサリを各5個体ずつ収容し、パーキンサス属原虫遊走子液を1 mL加え20 $^{\circ}$ Cで24時間浸漬した後、20 $^{\circ}$ Cの流水で69日間飼育した。飼育終了後、鰓と外套膜をRFTM法で培養し、感染成立の有無を確認した。

3. 2. 他種貝類

10L容量の亚克力水槽に平均殻長17.1mmのホタテガイ稚貝20個体と平均殻長39.2mmのマガキ10個体をそれぞれ収容し、パーキンサス属原虫遊走子液を1 mL加え20 $^{\circ}$ Cで24時間浸漬した後、約20 $^{\circ}$ Cの流水で30日間飼育した。飼育中はキートセラスを適宜給餌した。飼育終了後、鰓

と外套膜をRFTM法で培養し、感染成立の有無を確認した。

エゾアワビでは、10L容量の亚克力水槽に平均殻長29.1mmのエゾアワビ稚貝10個体を収容し、アサリのパーキンサス属原虫遊走子液を1mL加え20℃で24時間浸漬した後に飼育水を全交換し、恒温器内で33日間止水飼育した後、約20℃の流水で101日間飼育した。飼育中はアワビ用配合餌料を適宜給餌した。飼育終了後、鰓と外套膜をRFTM法で培養し、感染成立の有無を確認した。

結果

1. 北海道沿岸における感染域

栄養体の培養の結果、上磯、江差、寿都、小樽市忍路、石狩川河口縁辺部、石狩市厚田、稚内、礼文で採取されたアサリから前遊走子嚢 (Fig.2) が観察された。各地点ごとの感染率をTable 1に示した。感染率は石狩川の河口縁辺部の20%を除くと80%以上と高率であり、特に江差、小樽市忍路、稚内、礼文では調査したすべてのアサリに寄生が確認された。一方、江差、紋別、網走、浜中、散布、厚岸、静内で採集されたアサリからは本原虫は観察されなかった。

2. 遊走子の形成条件

25℃区では培養液接種から56時間後に前遊走子嚢の細胞分裂と遊走子の放出を確認した。20℃区では80時間後から一部で細胞分裂が確認され、96時間後から遊走子 (Fig.3矢印) の放出が確認された。15℃区では細胞分裂も確認されず、遊走子の放出も確認されなかった (Table 2)。

また塩分濃度を0%、7.5%、15%、22.5%と調整した培養培地のいずれでも56時間後から遊走子の放出が確認され、塩分濃度の違いによる遊走子形成能に差は見られなかった。

3. 遊走子を用いた感染試験

3. 1. アサリ

試験1では、25℃区、20℃区のいずれの区においても飼育中の死亡は確認されなかった。25℃区では試験に用いた5個体全ての鰓および外套膜からRFTM法で栄養体が検出された。また、組織切片標本の観察からも、結合組織内にパーキンサス属原虫の寄生形態である栄養体を確認された (Fig.4)。一方、20℃区では5個体全てで陰性であった。

20℃における流水状態による試験2では、1個体の死亡が確認されたが、感染は確認されなかった。飼育終了

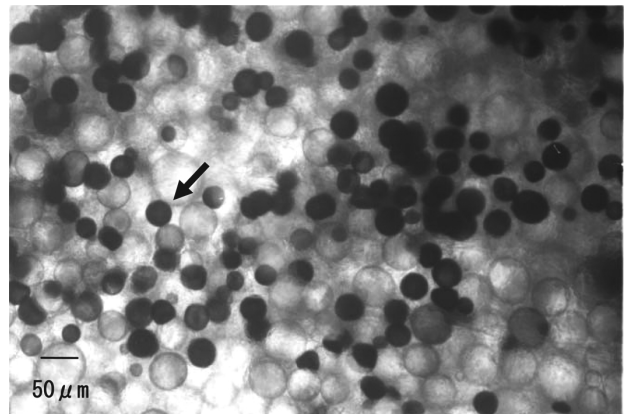


Fig.2 Prezoosporangia of the organism in *Ruditapes philippinarum*.Mantle tissue stained with Lugol's iodine solution(arrow)

Table 2 The rate of detection of prezoosporangia infected into short-necked clam in Hokkaido.

Location No.	Site	Sampling Date	N	Size±SD(mm)	Positive rate(%)
1	Kamiiso	2000/4/20	15	25.2±5.3	93
2	Esashi	1999/10/20	24	30.4±3.1	100
3	Suttu	2001/5/1	20	33.2±2.6	80
4	Oshoro	1999/10/27	23	33.2±4.0	100
5	Ishikari	2001/10/11	20	21.6±1.6	20
6	Atsuta	2000/2/7	12	34.8±3.4	83
7	Rebun	2000/6/20	20	28.8±5.9	100
8	Wakkanai	2000/6/1	20	36.6±3.2	100
9	Esashi,Okhotsk	2000/8/17	20	32.3±1.4	0
10	Abashiri	2000/9/13	20	39.9±1.8	0
11	Monnbetsu	2000/10/26	20	34.2±6.5	0
12	Hamanaka	2000/9/12	20	42.2±2.6	0
13	Chirippu	2000/9/27	20	45.9±2.0	0
14	Akkeshi	2000/9/12	20	36.2±2.0	0
15	Shizunai	2001/10/23	20	29.3±5.4	0

後、生残個体での感染は確認されなかった。

3. 2. 他種貝類

飼育期間中にホタテガイおよびマガキの死亡は観察されなかった。試験に用いた個体の鰓および外套膜から本原虫は確認されなかった。

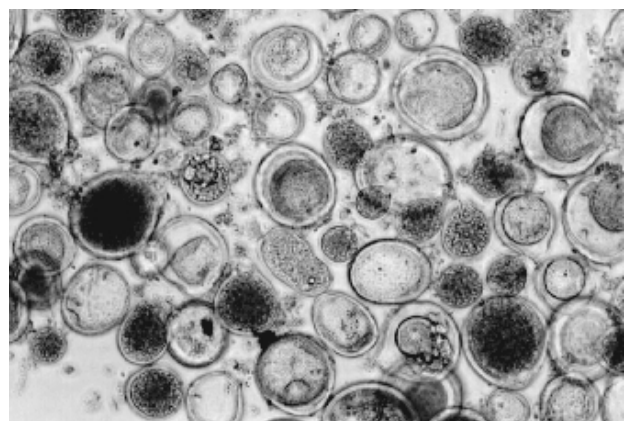


Fig.3 In vitro zoosporulation of *Penkinsus* sp.(arrow).

Table 2 In vivo cultured zoosporangia in culture medium (DMEM : Ham's F12 = 2:1 added 5 % FCS with ASW) at 25,20,and 15°C.

Temperature	Culture time															
	8h	24h	32h	48h	56h	72h	80h	96h	104h	120h	128h	144h	152h	168h		
25°C	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	ND	ND
20°C	-	-	-	-	-	-	-*	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : negative of zoospore , + : positive of zoospore , -* : confirmed cell division

またエゾアワビでも、飼育期間中に供試貝の死亡は観察されなかった。試験に用いた個体の鰓、外套膜から本原虫は確認されなかった。

考察

アサリに寄生するパーキンサス属原虫は、道東、道北を除くと国内ほとんどの地点に分布することが知られている^{6, 7, 8, 9, 13}。今回北海道沿岸のほぼ全域にわたる調査の結果、津軽海峡と日本海側の8地点で採取したアサリからパーキンサス属原虫の栄養体が観察され、このうち7地点では80–100%の高率で感染が確認された。一方、太平洋、オホーツク海側7地点で採取したアサリからは栄養体は観察されなかった。このことから、本原虫は北海道において日本海側では広く感染し、現在までのところ、太平洋、オホーツク海側では感染していないことを示している。本調査の結果は浜口ら⁹の結果と一致し、これらの結果からパーキンサス属原虫の感染地域の拡散には、日本海を北上する対馬暖流が関与しているのではないかと考えられた。

アサリに寄生するパーキンサス属原虫は、遊走子が体内に侵入し、主に結合組織内で栄養体を形成し、内部で細胞分裂を繰り返す。この後、貝が死亡するなどして嫌

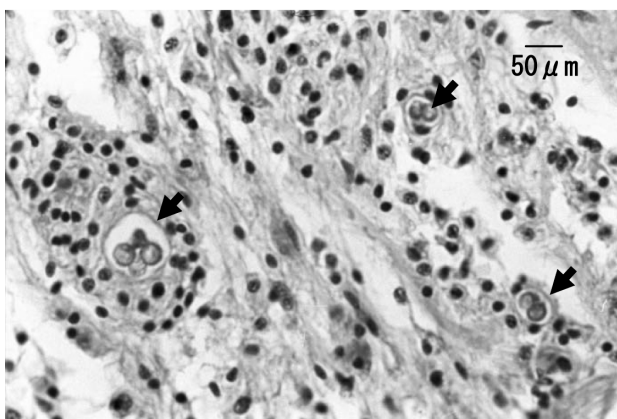


Fig.4 *Perkinsus* sp. infected foci in the tissue of *Ruditapes philippinarum*.
Arrows : Trophozoites of *Perkinsus* sp. H-E stain.

気的狀況になると前遊走子嚢に変化する。前遊走子嚢は海水中で遊走子嚢となり、遊走子を形成するという生活環を持つことが知られている¹⁴。本研究では、前遊走子嚢から遊走子嚢を経て遊走子が放出される条件として15°C以下の水温では遊走子が形成されず、20°C以上で形成されることが明らかになった。また、遊走子を用いたアサリに対する感染試験では、25°Cで感染が認められたものの、20°Cでは全く感染が起こらなかったことから、夏期の高水温期に感染拡大することが示唆された。そこで、今回感染が確認された日本海側の江差、厚田、稚内と、感染の確認されなかったオホーツク海側の北見枝幸、網走に近いサロマ湖、太平洋側の厚岸について、1989年から1999年の過去11年間の水温を、高水温期である8月上旬から9月上旬にわたる海水温の観測記録¹⁵から抽出し、この間の平均水温と最高水温の平均を比較した(Table 3)。この結果、高水温期の平均水温は江差23.0°C、厚田21.2°C、稚内20.5°C、枝幸19.5°C、サロマ湖19.8°C、厚岸15.6°Cであり、最高水温の平均は江差23.8°C、厚田22.1°C、稚内21.6°C、枝幸20.6°C、サロマ湖20.7°C、厚岸17.0°Cであった。このように、本原虫が未侵入である地域は感染地域に比較して夏期の水温が低く、さらに冬期の水温も地域によっては氷点下になる地区もあり、パーキンサス属原虫の感染には不適な環境であると考えられる。しかし、アサリの生育域は干潮時に干潟となる箇所もあり、これらの地域でも夏期には一時的に感染に適した温度域になる可能性も否定できない。以上のことから、本原虫の感染地域から未感染地域へのアサリの移殖は極力さけることが望ましいと考えられる。

次に、石狩川河口縁部から採取したアサリの感染率が著しく低いことから、遊走子形成に塩分濃度が依存するのではないかと考えた。そこで、前遊走子嚢から遊走子嚢の形成を経た後に遊走子を作成する際に、培地成分から人工海水を0%から75%の4段階、塩分濃度にして0%から22.5%に調整した実験区を設け、遊走子形成能の比較を行った。この結果、すべての実験区において100%人工海水で調整した培地と同様に遊走子の形成が確認された。このことから、塩分濃度は遊走子嚢から遊走子の形成に対する影響はないと考えられたが、塩分濃度が前遊走子嚢から遊走子嚢の形成に関する影響、および形成された遊走子の宿主に対する感染性の強弱に何らかの影響を及ぼす可能性は、この実験だけで全て説明することは無理があり、今後の課題となった。

パーキンサス属原虫は一般的に宿主に対する感染特異性があると考えられているが、近年の研究ではアサリに感染するパーキンサス属原虫である*P. atlanticus*と、アワビに感染する*P. olseni*は極めて近縁ではないかとされ

Table 2 Average sea water temperature during high temperature period from the beginning August to the beginning September at 6 sites in Hokkaido, during 1989 to 1999.

Site	Mean sea water temperature(°C)±SD	
	Maximum temp.	Mean temp.
Esashi	23.8±1.4	23.0±1.6
Atsuta	22.1±1.0	21.2±1.4
Wakkanai	21.6±1.1	20.5±1.5
Esashi, Okhotsk	20.6±1.3	19.5±1.5
Saroma	20.7±1.4	19.8±1.6
Akkeshi	17.0±2.0	15.6±2.5

ている¹⁶⁾。そこで、本道で貝類の重要資源であるホタテガイ、マガキ、エゾアワビに本原虫が感染するかを調べたが、いずれも感染は認められなかった。今回の試験ではアサリで感染成立しない20℃で行ったため、特殊な高水温時の環境では感染成立の可能性は完全には否定できないが、一般的なこれら貝類の生育環境では、本原虫は感染しないものと考えられた。ただし、ホタテガイに寄生する *P. qugwadi*⁴⁾ のように、現地に生息していた貝類等に不顕感染していた原虫が、ホタテガイに顕著な病原性を示したものと考えられている例もあり、他の地域から生物を移殖することにより、全く別の生物に対して甚大な被害を与える可能性から、移殖に際しては十分な注意が必要である。

今後の課題として、定時的な調査により感染の認められていない地域のアサリを検査し、パーキンサス属原虫の感染拡大の有無を確認する必要があると考えられる。また、本研究に取り組んだ当時はアサリのパーキンサス属原虫の種の同定方法が確立されていなかったため一括して取り扱っていたが、今後は本道で検出されるパーキンサス属原虫の分類を行う必要があると考える。

要約

1999年から2001年に、北海道沿岸のアサリに寄生するパーキンサス属原虫の感染を、RFTM法を用いた栄養体の検出により調査した。また、本原虫の遊走子を形成する温度と塩分条件を調べた。さらに形成した遊走子のアサリ、ホタテガイ、マガキ、エゾアワビに対する感染性を調べた。

この結果、日本海側を中心とする8地点で本原虫に感染したアサリを確認したが、太平洋およびオホーツク海側ではいずれも確認されなかった。また、本原虫の遊走子は約20℃で形成され、塩分濃度による形成阻害等は認められなかった。さらに遊走子を用いた感染試験では、

25℃でアサリに感染したが、20℃ではアサリ、ホタテガイ、マガキ、エゾアワビに対する感染は確認されなかった。

謝辞

アサリの採取にご協力いただきました、各地の水産技術普及指導所および漁業協同組合に感謝いたします。

文献

- 1) Mackin, J.G., Owen, H.M. and Colloer, A.: Preliminary note on the occurrence of a new protistan parasite, *Dermocystidium marinum* sp. in *Crassostrea virginica* (Gemelin). *Science*, 111, 328-329 (1950)
- 2) Perkins, F.O. and Menzel, R.W.: Morphological and cultural studies of a motile stage in the life cycle of *Dermocystidium marinum*. *Proc. natl. shellfish. Ass.*, 56, 23-30 (1966)
- 3) Lester, R.G. and Davis, G.H.Q.: A new Perkinsus species (Apicomplexa, Perkinsea) from the abalone *Haliotis ruber*. *Jour. of Invertebrate Pth.*, 37, 181-187 (1981)
- 4) Blackburn, J., Bower, S.M. and Meyer, G.R.: *Perkinsus qugwadi* sp. Nov. (incertae sedis), a pathogenic protozoan parasite of Japanese scallops, *Patinopecten yessoensis*, cultured in British Columbia, Canada. *Canadian Jour. Of Zooloogy*, 76, 942-953 (1998)
- 5) Azevedo C.: Fine structure of *Perkinsus atlanticus* n. sp. (Apicomplexa, Perkinsea) parasite of the clam *Ruditapes decussates* from Portugal. *Jour. of Parasitology*, 75, 627-635 (1989)
- 6) Hamaguchi, M., Suzuki, M., Usuki, H. and Ishioka, H.: Perkinsus Protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. *Fish Pathol.*, 33(3), 473-480 (1998)
- 7) Maeno, Y., Yoshinaga, T. and Nakajima, K.: Occurrence of Perkinsus Species (Protozoa, Apicomplexa) from Manila Clam *Tapes philippinarum* in Japan. *Fish Pathol.*, 34(3), 127-131 (1999)
- 8) 室賀清邦, 乾 靖夫, 松里寿彦: ワークショップ「貝類の新しい疾病」アサリのパーキンサス症. *Fish Pathology*, 34(4) 219-231 (1999)
- 9) 浜口昌己, 佐々木美穂, 薄 浩則: 日本国内におけ

- るアサリ *Ruditapes philippinarum* の *Perkinsus* 原虫の感染状況. 日本ベントス学会誌, 57, 168-176 (2002)
- 10) Ray, S.M.: A culture technique for the diagnosis of infection with *Dermocystidium marinum* Mackin, Owen and Collier in oyster. *Science*, 116, 360-361 (1952)
 - 11) Choi, K.-S., Lewis, D. H., Powell, E.N. and Ray, S.M.: The energetic coat of *Perkinsus marinus* parasitism in oysters: quantification of the thioglycollate method. *Journal of Shellfish Research*, 8, 125-131 (1989)
 - 12) Ordas, M.C. and Figueras, A.: In vitro culture of *Perkinsus atlanticus*, a parasite of the carpet shell clam *Ruditapes decussates*. *Dis. of Aqua. Org.*, 33, 129-136 (1998)
 - 13) 西原 豊: アサリに寄生するパーキンサス属原虫について, 北水試だより., 49, 10-11 (2000)
 - 14) Auzoux-Bordenave, S., Vigario, A.M., Ruano, F., Domart-Coulond, I. And Doumenc, D.: In vitro sporulation of the clam pathogen *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) under various environmental conditions. *Journal of Shellfish Research*, 14, 469-475 (1995)
 - 15) 社団法人北海道栽培漁業振興公社: 養殖漁場海況観測とりまとめ 第十九号~第二十九号. (1990-2000)
 - 16) 良永知義: 貝類のパーキンサス原虫症. 海洋と生物, vol.29 no. 4, 321-327 (2007)