

## 血リンパ液中の非血球不明物を指標としたアコヤガイの閉殻筋の赤変化を伴う疾病の診断について

青木 秀夫・林 政博・岩本 仁司\*<sup>1</sup>・良永 知義\*<sup>2</sup>

Rapid Diagnosis of the Disease Causing Mass Mortality of Japanese Pearl Oyster  
by Using the Unidentified Bodies in Hemolymph as Indicator

Hideo AOKI, Masahiro HAYASHI, Hitoshi IWAMOTO,  
and Tomoyoshi YOSHINAGA

Since 1996, the disease causing mass mortalities of Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*, have occurred in western Japan. In the affected oyster, histopathological changes were commonly observed in the mantle and adductor muscle tissues, and the color of the adductor muscle turned to red brown. In this study, we examined hemolymph and histopathology of affected oysters experimentally produced by transplantation of the mantle tissue of naturally affected oysters and cultured oysters (total 123 individuals). In the hemolymph of the affected oysters, unidentified bodies (ca. 5 20  $\mu$ m) were characteristically found. The appearance of the unidentified bodies was coincident with the appearance of histopathological change; 41 of 42 oysters with the histopathological change in the mantle had the unidentified bodies and 41 of 49 with the unidentified bodies had the histopathological changes in the mantle. This indicates that the unidentified bodies can be used for rapid diagnosis of the disease causing mass mortalities of pearl oysters.

わが国で真珠養殖が行われている多くの養殖場において1996年以降、夏から秋にかけての高水温期にアコヤガイが大量にへい死し、母貝養殖業および真珠養殖業は深刻な被害を受けた(森実 1999, 高見 1999)。大量にへい死したアコヤガイには閉殻筋(および軟体部)が赤変した個体が多数出現するという特徴が多く、このへい死事例で共通して認められ、閉殻筋の赤変現象は大量にへい死に深く関連していると推察された。大量にへい死の原因について、黒川ら(1999)は赤変した病貝を用いた感染実験を行い、主原因は感染症であると考えられることを明らかにしている。病原体は現在のところ特定されていないものの、水産庁養殖研究所では、感染実験に基づきウイルスあるいはウイルス並みに小さい濾過性病原体であることを示している。<sup>\*3</sup>

アコヤガイの大量にへい死が感染症によるものであるとした場合、異常貝の移入禁止、隔離などの措置を講ずることは被害軽減を図る上で有効であり、同時に病貝の早期の診断技術を確立することが重要であると考えられる。赤変病貝の診断については、黒川ら(1999)は病理組織学的な指標として外套膜や閉殻筋の病変が適切であるとしている。また、前野ら(1999)は血球細胞の形態変化が本症の病態の指標となるとし、それを基にした本症の診断が可能であることを示している。

著者らは、アコヤガイの赤変異常に関する研究の過程で異常アコヤガイの血リンパ液中に血球細胞と形態の異なる不定形の不明物を多量に観察した。不明物の有無は血リンパ標本の顕微鏡による観察で判定できるので、不明物の出現を指標として本疾病の診断が可能であれば、

\*1 現所属：三重県中央家畜保健衛生所。

\*2 水産庁養殖研究所病理部。

\*3 水産庁養殖研究所(1999)：平成10年度アコヤ貝大量にへい死緊急調査対策研究担当者会議について(プレスリリース)。

簡便でかつ迅速に一次的な診断を行うことができると考えられる。そこで本研究では、健康および赤変異常アコヤガイにおける不明物の出現状況を比較し、その出現を本疾病の推定診断の指標として使えるかどうか検討した。

### 材料および方法

#### 不明物の定義

本研究で対象とする不明物の形態はFig. 1に示すとおり血球細胞と明らかに異なり、不定形である。不明物の内部構造は光学顕微鏡による観察では不明瞭で、透明感がある。大きさは、無作為に100個測定した結果では概ね50~200 $\mu$ m程度であった。不明物はそれ単独もしくは集合あるいは分割様の状態で観察される。

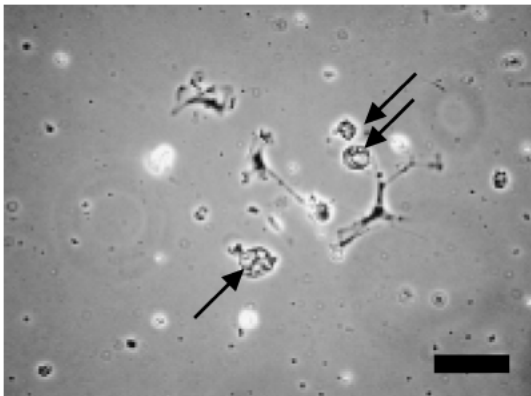
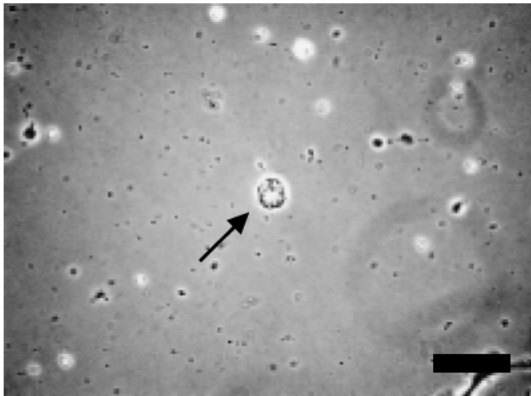


Fig.1. Photographs of the unidentified bodies in hemolymph of the affected Japanese pearl oysters. Bar marker represents 50  $\mu$ m.

#### 不明物の観察方法

本研究では、アコヤガイの閉殻筋より注射器(23G)を用いて採血した血リンパ液をスライドガラス上に滴下し、そのまま5分静置して血球細胞をガラス面に着底させた後、カバーガラスで封入した標本を位相差顕微鏡で観察した。

#### 供試貝

本研究では、健康貝を海面の養殖場で育成し定期的に採取したアコヤガイ(試験1)と室内の水槽を用いて飼育した健康貝に対して健康貝および赤変病貝の外套膜をそれぞれ移植した後に定期的に採取したアコヤガイ(試験2)を供試貝とした。試験の概要は以下のとおりである。

試験1：供試貝には石川県能登産の天然貝を健康貝として用いた。これらを三重県内の尾鷲市賀田湾、南島町神前浦、浜島町英虞湾の3漁場でそれぞれ70個体ずつ、平成10年2月18日から10月13日まで約8ヶ月間垂下養殖した。試験開始時に5検体採取し、その後5月から毎月1回各漁場のへい死数を確認するとともに30~50個体ずつ採取した。採取した貝の重量は約30~80gであった。

試験2：供試貝は試験1と同様に水産庁養殖研究所より譲渡された石川県能登産の天然貝を用いた。移植に供した外套膜は、水産庁養殖研究所により病貝の血リンパ液の接種によって作出した赤変病貝および健康貝より採取したのを用い、専門業者に依頼してそれぞれ健康貝50個体に移植した(それぞれ試験区および対照区とする)。飼育には500 $\ell$ 円形水槽を用い、養殖用籠に各50個体ずつ収容した。飼育水には紫外線殺菌海水(流量：3.75 $\ell$ /min)を使用し、水温は25 $^{\circ}$ C前後に設定した。試験期間中、*Pavlova lutheri* または米の粉を適量給餌した。試験開始後31, 45, 58, 76, 89日目に両区より20~50個体ずつ採取した。採取した貝の重量は約30~80gであった。

#### 検査項目

検査項目は上述した方法による不明物の有無の判定の他に黒川ら(1999)により示された本症の病理組織学的診断指標である外套動脈の血管壁の病変の有無および閉殻筋の赤色度(a値)とした。

病理組織検査：採血したアコヤガイの片側の貝殻をはずして外套膜を採取し、ダビッドソン液で固定した後、定法によりパラフィン切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡で観察した。

閉殻筋のa値測定：閉殻筋を白色板上に乗せ、切断面に色彩色差計(ミノルタCR100またはCR300)の測定ヘッドを直接押しあてて測定した。

## 結 果

### 試験 1

各漁場から採取した検体における異物と外套動脈の組織病変の有無をTable 1に示す。血リンパ液中の不明物は2月、5月、6月の検査ではいずれの漁場とも観察された個体はなく、組織病変のみられた個体もなかった。不明物が最初に確認されたのは7月に浜島漁場から採取した個体であった(3個体中1個体)が、その個体では組織病変はみられなかった。その後8月には尾鷲漁場では不明物のみられた個体はなかったものの、神前および浜島漁場では採取した10個体全てに不明物が観察された。9月には尾鷲漁場で5個体中2個体に、神前および浜島漁場では採取した10個体全てに不明物が観察された。10月には全ての漁場で全ての個体(11個体)に不明物がみられた。これらの8月以降に不明物がみられた個体の殆ど全てには組織病変が観察された。組織病変のみられた個体で不明物がみられなかった個体はなかったが、一方で組織病変のみられなかった47個体では2個体でごく少数の不明物がみられたにとどまった。試験1では、不明物と組織病変の有無が一致した個体数は78個体中76個体で、これは全体の97%であった。

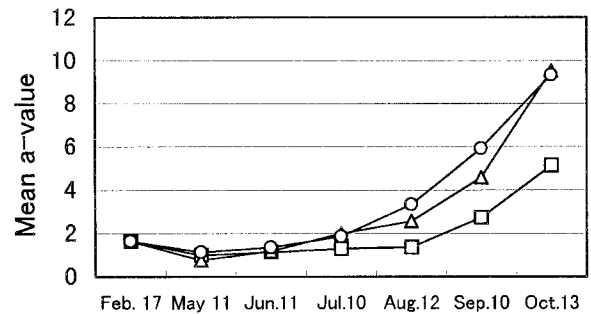
**Table 1.** Results of hemolymph and histopathological examinations of Japanese pearl oyster reared at three farming fields

Date	Number of examined oyster	Number of oysters								
		UB <sup>+</sup>	HC <sup>+</sup>	UB	HC	UB	HC	UB	HC	
		+	+	+	-	-	+	-	-	
<i>Initial</i>										
Feb. 17	5									5
<i>Hamajima</i>										
May 11	3									3
Jun. 11	3									3
Jul. 10	3				1					2
Aug. 12	5		5							
Sep. 10	4		4							
Oct. 13	2		2							
<i>Kamisaki</i>										
May 11	3									3
Jun. 11	5									5
Jul. 10	4									4
Aug. 12	5		5							
Sep. 10	5		4		1					
Oct. 13	4		4							
<i>Owase</i>										
May 11	3									3
Jun. 11	5									5
Jul. 10	4									4
Aug. 12	5									5
Sep. 10	5									3
Oct. 13	5		5							
Total	78		31		2		0			45

\* UB+: the unidentified bodies were observed in hemolymph, HE+: histopathological changes were observed in mantle, UB- & HE--negative.

検体の閉殻筋の a 値の推移をFig. 2に示す。検体に不明物および組織病変がみられなかった7月までは各漁場とも閉殻筋の a 値は0.5 2.5程度で、肉眼的には赤変し

ていない正常な状態であるとみなされた。その後8月には、不明物および組織病変がみられた神前・浜島漁場の個体では a 値は3前後に上昇した。この2漁場ではその後も a 値は上昇し、10月には9程度と明らかに赤変した状態となった。また尾鷲漁場では、不明物および組織病変がみられなかった8月までの a 値は2以下であったものの、9月以降上昇して10月には5程度となった。このように尾鷲漁場の個体では浜島漁場・神前漁場に比べて a 値の赤変状態のレベルまでの上昇が1ヶ月ほど遅かった。月間の死亡率は各漁場とも8月が最も高かった。累積死亡率は浜島漁場が92%と最も高く、次いで神前漁場が66%で、a 値の上昇が遅れた尾鷲漁場では17%と他に比べて低かった。



**Fig. 2.** Periodical changes of the a value of adductor muscle from Japanese pearl oyster reared at three farming fields (n=25). (□:Owase, △:Kamisaki, ○:Hamajima)

### 試験 2

対照区(健全貝)と試験区(赤変病貝)における不明物の出現状況と組織病変の有無をTable 2に示す。対照区では外套膜移植後58日目に2個体、76日目に1個体で不明物が観察されたものの、その数は標本の全視野で1、2個程度と極めて少ないものであった。また対照区では採取した全個体で外套膜の組織病変はみられなかった。一方、試験区では移植後45日目までは不明物のみられた個体はなかったものの、58日目以降では5個体中4個体あるいは全てで不明物がみられた。また移植後45日目には4個体中1個体で組織病変がみられ、その後58および76日目には5個体中3個体、89日目には5個体中4個体と日数の経過とともに病変個体が多くなる傾向がみられた。試験区では不明物が観察された13個体のうち、組織病変のみられなかった個体が58日目および76日目に計3個体あった。試験2では不明物と組織病変の有無が一致した個体数は45個体中38個体(全体の84%)であった。

検体の閉殻筋の a 値の推移を Fig. 3 に示す。対照区の検体の a 値は概ね 1 以下で、肉眼的にも閉殻筋は赤変していない正常な状態であるとみなされた。一方、試験区では 58 日目までは a 値は 1 程度であったものの、その後上昇し 89 日目には 4 程度となり赤変した状態となった。両区とも試験開始後 5 日目に 1、2 個死亡したが、これは赤変化を伴う疾病によるものではなく、外套膜片の移植に伴う取扱いによる影響と考えられた。室内実験で赤変化を伴う疾病が発症するといわれている 40-50 日目以降の死亡率は対照区が 3.6%、試験区が 17.2% で、試験区の方が高かった。

Table 2. Results of hemolymph and histopathological examinations of Japanese pearl oyster experimentally infected by mantle piece transplantation and reared in tanks

Days after transplantation	Number of examined oyster	Number of oysters							
		UB <sup>+</sup>	HC <sup>+</sup>	UB <sup>-</sup>	HC <sup>-</sup>	UB <sup>-</sup>	HC <sup>+</sup>	UB <sup>-</sup>	HC <sup>-</sup>
<i>Control</i>									
31	5								5
45	5								5
58	4				2				2
76	3				1				2
89	5								5
Total	22	0		3		0			19
<i>Experiment</i>									
31	4								4
45	4						1		3
58	5		3		1				1
76	5		3		2				
89	5		4						1
Total	23		10		3		1		9
Cont.+Expt.	45		10		6		1		28

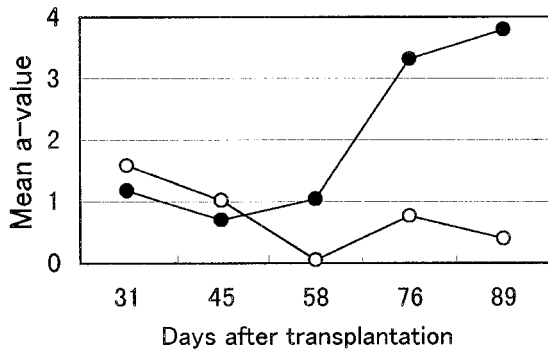


Fig. 3. Periodical changes of the a value of adductor muscle from Japanese pearl oyster after transplantation of the mantle piece (n=3 5). Open circles: control, solid circles: experiment.

### 不明物および組織病変の有無

試験 1 と試験 2 の検査結果をあわせると、合計 123 個体のうち不明物と組織病変の両方がみられた個体数が 41、両方みられなかった個体数が 73 であった。このように両者の有無が一致した個体は 114 個体であり、これは全体の 93% であった。両者の有無が一致しなかった検体では“不明物あり・組織病変なし”が 8 個体で、その逆を示す個体より多かった。

### 考 察

本研究で検査した全個体のうち不明物と組織病変の有無が一致していた個体の割合は 93% (114/123 個体) と高く、両者の有無は概ね一致すると考えられた。それらの出現する時期についてもほぼ一致しているとみなされた。また感染実験 (試験 2) の結果から、不明物は赤変化を伴う疾病に罹ったアコヤガイに特異的に高率でみられることが分かった。これらのことから不明物の出現は赤変化を伴う疾病の発症と密接に関係しており、不明物の有無は本症の推定診断の指標として使えると考えられた。不明物を指標とした本診断法の鋭敏さについては、病理組織学的診断法と同程度とみなすことができると思われる。不明物の観察方法は上述したとおり位相差顕微鏡での検鏡のみで、ごく短時間の内にその有無が判定できる。したがって、本法はその簡便性および迅速性といった特徴から、多量の検体を診断する場合に有効に活用できると考えられる。

本研究では不明物の定量を行っていないが、不明物の出現数は組織病変の程度が軽度のものに比べて重度の方が高い傾向が認められたことから、その出現数によって病状の程度についてもある程度の推察が可能ではないかと思われた。著者らが 6 月から 10 月にかけて英虞湾内で飼育したアコヤガイ 2 年貝 (人工生産種) における血リンパ液中の不明物の出現状況、へい死率および閉殻筋の赤色度の変化を調べた結果でも、へい死率および赤色度の上昇に伴って不明物の出現数 (顕微鏡 1 視野当たり) が増加する傾向が認められた。<sup>\*4</sup> さらに著者らがアコヤガイ病貝の低水温処理による治療効果について調べたところ、処理後に外套動脈の組織病変を示す個体の占める割合や閉殻筋の赤色度が低下してある程度症状が回復したと判断された試験区では不明物の出現数も減少した。<sup>\*5</sup> これらの結果から、不明物の出現数と病状の程度との間にはある程度同調した関係があると考えられた。本疾病

\* 4 林 政博・青木秀夫 (1999) : 平成 10 年度三重県科学技術振興センター水産技術センター事業報告, p.12-15.

\* 5 林 政博・青木秀夫 (2000) : 平成 11 年度三重県科学技術振興センター水産技術センター事業報告, p.15-17.

では、通常貪食機能を発揮する血球細胞(無顆粒血球、顆粒血球)に膨潤や細胞質中の空砲・顆粒の出現といった変化が現れることが報告されている(前野ら 1999)。血球細胞におけるこれらの変化が貪食機能に及ぼす影響は明らかではないが、疾病の進行に伴い不明物の出現数が増加する現象は、このような血球細胞に現れる変化によって不明物(異物)を貪食し排除する機能が低下したことを示しているのかもしれない。

このように、不明物の出現は感染症の発症と密接に関係していることがわかったが、不明物の由来については現在のところ明らかではない。上述したとおり黒川ら(1999)は感染症に罹ったアコヤガイの病理組織学的な特徴として外套膜の結合組織や外套動脈の血管壁の異常を挙げている。不明物がこのような組織病変に伴う生体由来のものである可能性があると思われる。また本研究の試験2ではごく少数ではあるものの健全貝にも不明物が観察されていることから、不明物の全てが疾病の発症に伴い生じるものであるとも断定できない。健全な貝であっても飼育環境などの影響により血球の機能を含めた生理状態は変化すると考えられることから、そのような生理機能の変化が不明物の出現に関わっている可能性はあると思われる。

以上の結果をまとめると、アコヤガイにおいて血リンパ液中に出現する不明物は赤変化を伴う疾病の発症と密接に関係しており、その出現は外套膜の組織病変と同程度に鋭敏な本疾病の迅速的な推定診断の指標として使用できると考えられた。さらに、その出現数によって疾病の病態をある程度把握することも可能であることが示唆された。今後は不明物の由来および出現のメカニズムを解明するとともに不明物の定量方法を確立して出現数の変化と病態との関係についてさらに検討することが望まれる。

## 要 約

アコヤガイの閉殻筋の赤変化を伴う疾病の診断に関して、血リンパ液中に出現する不定形の不明物を指標とした推定診断が可能かどうか検討した。自然発症貝(78個体)および人為感染貝(45個体)を用いて、不明物の出現と本症の病理組織学的診断指標である外套動脈の組織病変の有無について調べた。その結果、閉殻筋が赤変化したアコヤガイの血リンパ液中には不明物が特異的に高率で観察され、不明物の出現と疾病の発症には密接な関係があると考えられた。検査個体のうち不明物と組織病変の有無が一致していた割合は93%と高く、不明物の出現は外套膜の組織病変と同程度に鋭敏な本疾病の推定診断の指標として使えることが示唆された。

## 文 献

- 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)：外套膜片移植および同居飼育によるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻筋の赤変化を伴う疾病の人為的感染. 日水誌, 65(2), 241-251.
- 森実庸男(1999)：愛媛県におけるアコヤガイ大量死の発生状況. 魚病研究, 34(3), 223-224.
- 高見生雄(1999)：長崎県対馬におけるアコヤガイの大量死の発生状況について. 魚病研究, 34(3), 224-225.
- 前野幸男・釜石 隆・森実庸男・中島員洋(1999)：アコヤガイ自然発症貝および実験感染貝の血リンパ像の経時的な変化. 平成11年度日本魚病学会春季大会講演要旨, p.31.

