

福島県松川浦のアサリにおける 2015 年 8 月の *Perkinsus* 属原虫の感染状況

阿部博和¹、佐藤太津真²、浜口昌巳³、梶原直人³、神山孝史⁴

¹岩手医科大学 教養教育センター 生物学科、²福島県内水面水産試験場、³国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所廿日市拠点、⁴国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所長崎本所

Prevalence of *Perkinsus* protozoan among the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Matsukawa-ura Lagoon, Fukushima Prefecture in August 2015

Hirokazu Abe¹, Tatsuma Sato², Masami Hamaguchi³, Naoto Kajihara³,
Takashi Kamiyama⁴

¹ Department of Biology, Center for Liberal Arts & Sciences, Iwate Medical University;
² Fukushima Prefectural Inland Water Fisheries Experimental Station; ³ Hatsukaichi Field Station, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency; ⁴ Nagasaki Station, Fisheries Technology Institute, Japan Fisheries Research and Education Agency

はじめに

Perkinsus 属の原生生物は貝類に寄生してパーキンサス原虫症を引き起こす病原体として知られており、世界のいくつかの地域では貝類の増養殖業に大きな産業被害を与えている(良永 2007)。現在 7 種が有効種と見なされており、*P. beihaiensis* と *P. marinus*、*P. mediterraneus* はカキ類を中心とした二枚貝類、*P. honshuensis* はアサリ、*P. qugwadii* はホタテガイの寄生虫として知られ、*P. chesapeaki* と *P. olseni* は幅広い貝類を宿主とすることが報告されている(Villalba et al. 2004、Dungan & Reece 2020)。*Perkinsus* 属原虫の生活環は、宿主体内で分裂増殖する栄養体期と海水中での遊走子形成期からなる。貝類の体内で分裂を繰り返して増殖した栄養体は、宿主の死亡等により嫌気的条件になると大型化して前遊走子嚢に変化し、海水中で放出管を形成して遊走子嚢に変化する。遊走子嚢の内部では遊走子が増殖し、放出管から海水中に放出された遊走子が新たな宿主個体に取り込まれることで水平伝播する(良永 2007)。

国内のアサリから *Perkinsus* 属原虫を初めて報告したのは Hamaguchi et al. (1998) であり、ITS 領域と 5.8S rRNA 遺伝子領域の塩基配列から *P. atlanticus* や *P. olseni* に極めて近い種と判断された。後に、Murrell et al. (2002) によって *P. atlanticus* が *P. olseni* にシノニマイズされたことによって、国内のアサリに寄生している種は *P. olseni* とされるようになった。

その後、Dungan & Reece (2006) によって国内のアサリから *P. honshuensis* が新種記載され、国内のアサリに寄生している *Perkinsus* 属原虫は 2 種と見なされるようになった。これまで、*P. olseni* は国内の様々な海域から報告されている一方で、*P. honshuensis* は限られた海域からしか報告されていないことは対照的である(鳥羽 2017)。また、*P. olseni* と *P. honshuensis* は時には 1 個体のアサリから同時に検出されることもあるが、複数の海域において感染強度は常に *P. olseni* で高いことが報告されている(Umeda & Yoshinaga 2012)。これらの *Perkinsus* 属原虫が日本在来種か外来種かは現時点では不明であるが、他海域からアサリの移植を行っている場所で感染率が高い傾向があることから、外国産や他海域産の種苗の移植放流に伴う拡散の可能性も指摘されている(浜口ほか 2002、池浦 2005、酒井・小野寺 2006)。

1980 年代半ばから 1990 年代にかけての国内のアサリ資源の大幅な減少にパーキンサス原虫症が関与していた可能性については 1998 年以降たびたび議論されてきたが、漁獲量が大幅に減少した時期のデータが不足していることが仮説検証の隘路となり明確な答えは出ていない(鳥羽 2017)。しかしながら、少なくとも殻長 3~6 mm 程度の稚貝においては、*P. olseni* の感染強度が 10^6 cells/gww よりも高い場合に水温 23°C 以上の条件で致死的な影響が出ることが室内実験によって示されており(Waki et al. 2012、Waki & Yoshinaga 2013、2015)、殻長 5~9 mm の稚貝では *P. olseni* の感染によって成長速度や肥満度、潜砂能力、濾過速度に影響が出る可能性が指摘されている(Waki & Yoshinaga 2018)。有明海のアサリ野生集団では、新規加入した稚貝における *P. olseni* の感染強度が 10^6 cells/gww に達した秋頃に、稚貝の生息密度が低下し始めることも報告されている(Waki et al. 2018)。

福島県松川浦のアサリ個体群は、2011 年 3 月 11 日に発生した東北地方太平洋沖地震に伴う津波によりほぼ壊滅状態となったが、2013 年に発生した卓越年級群により資源量が大きく回復したことで、年によっては天然発生群のみで十分に資源が形成されることが示された(Abe et al. 2017)。その一方で、2012 年と 2013 年の夏には原因不明の稚貝の大量減耗が発生しており(Abe et al. 2017)、資源の持続的利用のためにはその原因究明が望まれる。震災以前の松川浦のアサリ漁業は、アサリ種苗の移植に依存する形となっており、アサリの移植に伴い外来性巻貝であるサキグロタマツメタやカイヤドリウミグモが松川浦に非意図的に移入した経緯がある(富山ほか 2011、鳥羽ほか 2019)。そのため、*Perkinsus* 属原虫が移植アサリとともに侵入し、松川浦内で感染が拡大している可能性も懸念されるだろう。本研究では、2015 年 8 月に *Perkinsus* 属原虫の感染状況について調査を行ったので、その結果をここに報告する。

材料と方法

2015 年 8 月 5 日に松川浦内の棚脇(5 個体)、川口前(6 個体)、地島南(5 個体)、揚汐(5 個体)、宇多川河口(5 個体)、沖ヶ島(4 個体)の 6 地点にて合計 30 個体のアサリを採集した(図 1)。採集したアサリは、殻長、殻高、殻幅、殻付重量、軟体部重量を測定後、以下の計算式により肥満度(鳥羽・深山 1991)と丸型指数(柿野 1988)を算出した。

$$\text{肥満度} = \text{軟体部湿重量 (g)} \div [\text{殻長 (cm)} \\ \times \text{殻高 (cm)} \times \text{殻幅 (cm)}] \times 10^5$$

$$\text{丸型指数} = \text{殻幅 (mm)} \div \text{殻長 (mm)} \\ \times 100$$

各測定値間の関係を調べるため、Microsoft Excel 2016 を用いて殻長と殻高、殻幅、肥満度、丸型指数との間および肥満度と丸型指数との間の線形回帰分析と相関分析を行った。また、統計解析ソフト R の nls 関数を用いて、殻長と殻付重量、軟体部重量との間の非線形回帰分析（累乗近似）を行った。

Perkinsus 属原虫の感染状況調査では、軟体部重量が 1 g 未満のアサリは全軟体部組織を、1 g 以上のアサリは鰓を取り出して湿重量（処理重量 gww）を測定し、試料とした。試料は 15 ml の遠沈管に入れて解剖バサミを用いて細片化し、抗生物質溶液を加えた RFTM 培地（Ray's fluid thioglycollate medium）を 5 ml（処理重量の 5 倍以上）加えて 25℃暗所で一週間培養することで、*Perkinsus* 属原虫の栄養体を前遊走子嚢まで発達させた。RFTM 培地の作製では、500 ml の蒸留水に fluid thioglycollate medium（BD Difco 社、225650）を 14.6 g、NaCl を 10 g 加え、色が赤くなるまでスターラーで攪拌した後、オートクレーブで 121℃15 分の滅菌を行った。抗生物質溶液は、100 ml の蒸留水に力価 718 unit/mg の硫酸ストレプトマイシン（和光純薬、194-08512）7 g と力価 1440 unit/mg のベンジルペニシリンカリウム（和光純薬、021-07732）3.5 g を加え、RFTM 培地で 100 倍希釈することで最終力価をそれぞれ約 500 unit/ml とした。一週間の培養後、2000 rpm で 5 分間の遠心分離を行って上澄みを除去し、2M NaOH 水溶液を 5 ml 加えて 60℃で振とうすることでアサリの組織を完全に溶解した（前遊走子嚢は溶解しない）。遠心分離を行って上澄みを除去後、蒸留水を 5 ml 加えて遠心分離、上澄みの除去を 2 回繰り返す、蒸留水で試料を 1 ml に定容した。

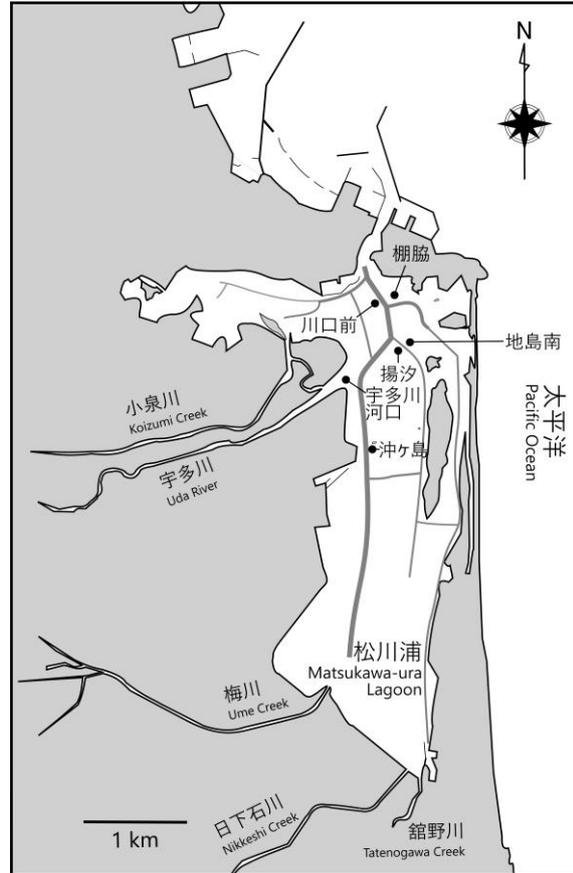


図 1. 松川浦におけるアサリ採集地点。

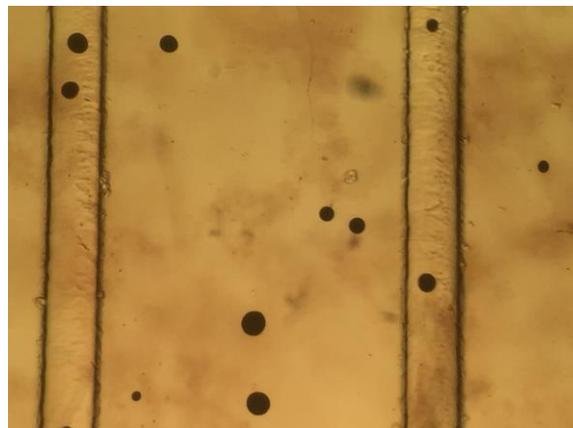


図 2. 観察された *Perkinsus* 属原虫の前遊走子嚢（ルゴール染色）。

定容試料は攪拌後に 100 μ l を取り(3 反復)、96 ウェルプレートを用いて蒸留水で 1000 倍希釈まで 3 段階の 10 倍連続希釈を行った後、すべての希釈倍率のウェルに 3 倍希釈したルゴール液(ヨウ素 5 g、ヨウ化カリウム 6 g、蒸留水 300 ml)を 90 μ l 加えて前遊走子嚢の染色を行った(図 2)。最初に、最も希釈倍率の高い試料(1000 倍希釈)をスライドチャンバーに移して前遊走子嚢を計数し、前遊走子嚢数が 20 以上の場合は 3 反復の平均値から感染密度と感染強度を算出した。前遊走子嚢数が 20 未満の場合は希釈倍率の低い試料(100 倍、10 倍)を順に計数して感染密度と感染強度を算出した。感染密度(軟体部湿重量当たりの感染細胞数)と感染強度は、以下の計算式を用いて算出した。

$$\text{感染密度 (cells/gww)} = \frac{\text{計数した前遊走子嚢数の平均 (cells)} \times \text{試料の希釈倍率}}{\text{処理重量 (gww)}}$$

$$\text{感染強度} = \text{Log}_{10}(\text{感染密度})$$

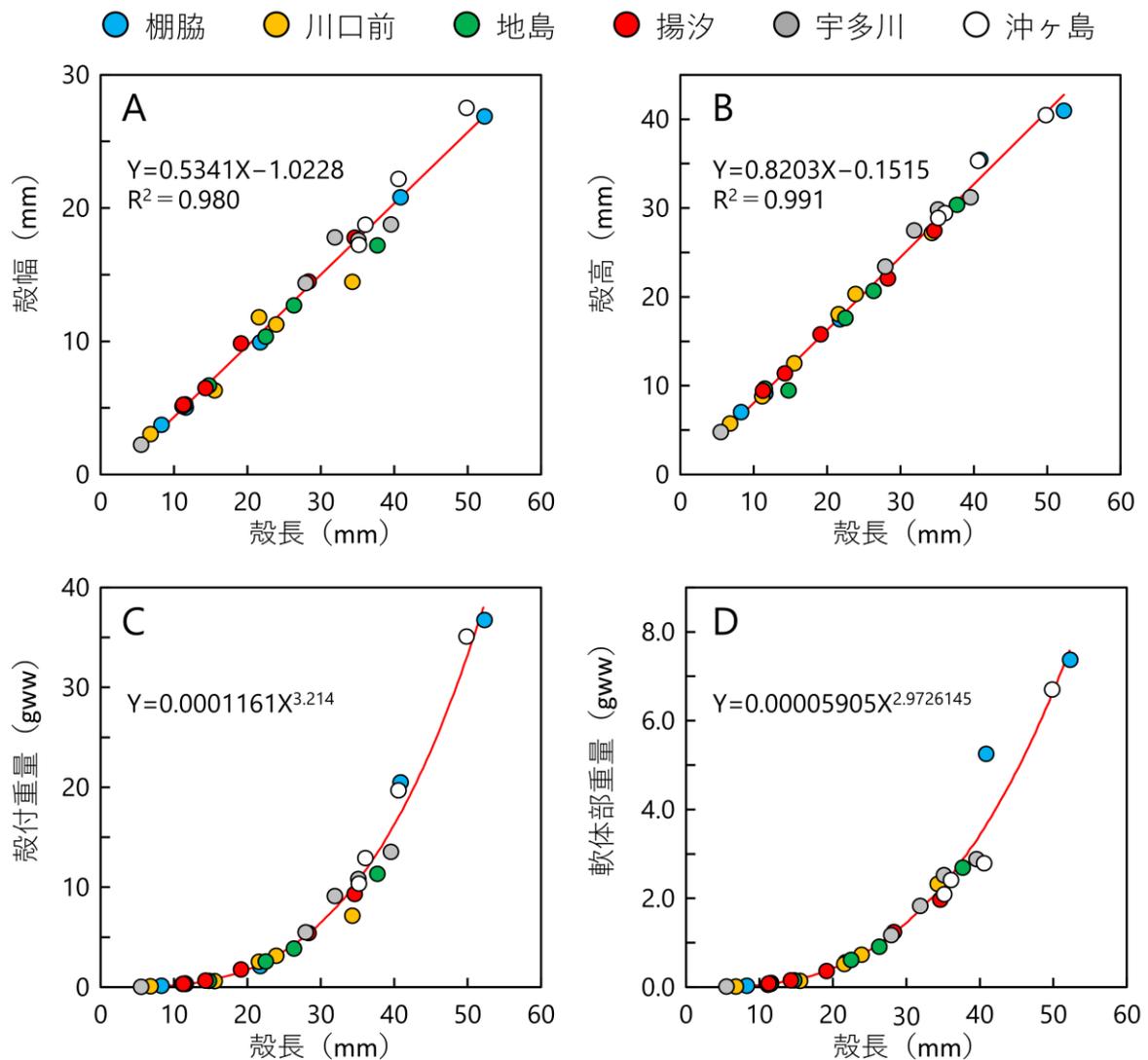


図 3. 松川浦 6 地点で採集されたアサリの殻長と殻幅(A)、殻高(B)、殻付重量(C)、軟体部重量(D)との関係。

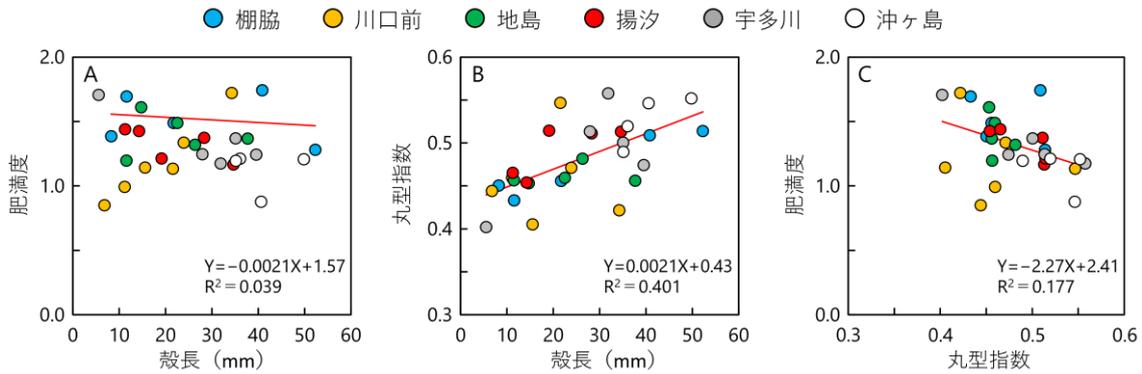


図 4. 松川浦 6 地点で採集されたアサリの殻長と肥満度 (A)、丸型指数 (B) の関係および丸型指数と肥満度 (C) の関係。

結果と考察

採集されたアサリの殻長は、高い決定計数 (R^2) で殻幅、殻高と線形近似が得られた (図 3A、B)。殻長-重量間の累乗近似では、殻付重量で $a=1.161 \times 10^{-4}$ (推定誤差 4.77×10^{-5} , $p=0.0215$)、 $b=3.214$ (推定誤差 0.11, $p < 2 \times 10^{-16}$)、軟体部重量で $a=5.905 \times 10^{-5}$ (推定誤差 3.23×10^{-4} , $p=0.0785$)、 $b=2.9726145$ (推定誤差 0.14, $p < 2 \times 10^{-16}$) となり、当てはまりの良い近似式が得られた (図 3C、D)。一般的に、動物の体重は体長の 3 乗に比例すると言われるが、累乗近似の指数はそれぞれ 3.21、2.97 となり、殻付重量、軟体部重量は概ね殻長の 3 乗に比例するという結果が得られた。殻長と殻幅、殻高、殻付重量、軟体部重量との明瞭な関係が示されたことから、以後は殻長をアサリのサイズの指標として考察を行う。

殻長と肥満度の間には相関関係は認められなかった (図 4A)。殻長と丸型指数の間には相関が見られ ($r=0.63$)、殻長が大きくなるほど丸型指数は増加する傾向が見られた (図 4B)。川口前で採集されたアサリで殻長が大きくなるほど肥満度が増加する傾向が見られたことを除いては、地点による差異は認められなかった。川口前のアサリを除き、丸型指数が増加するほど肥満度は低下する傾向が見られた (図 4C)。これは、肥満度が同程度でも殻長が大きくなるほど丸型指数が増加する傾向にあることに起因するものと思われる。

検査を行った 30 個体のアサリのうち 19 個体で *Perkinsus* 属原虫の感染が確認され、感染率は地島で最も高く (100%)、沖ヶ島 (75%)、棚脇・揚汐・宇多川河口 (それぞれ 60%) と続き、川口前で最も低かった (33%)。

アサリの殻長と *Perkinsus* 属原虫の感染強度の間には相関が認められ ($r=0.60$)、殻長が大きくなるほど感染強度が高くなる傾向が明瞭に認められた (図 5A)。*Perkinsus* 属原虫の生活環から考えると、アサリの感染強度は宿主個体による遊走子の取り込み量と、宿主体内での栄養体の増殖速度によって規定されるものと思われる。Umeda et al. (2020) は、*P. olseni* の前遊走子嚢の形成と肥大が高温条件下 (25°C、35°C) と比べて低温条件下 (5°C、15°C) で有意に抑制されることを実験的に示している。また、*P. olseni* の遊走子形成は 15~32°C の範囲で起こり、Casas et al. (2002) では 19~28°C が、Umeda et al. (2013) では *P. olseni* と *P. honshuensis* の両種ともに 25~20°C が遊走子形成の最適温度であると示され

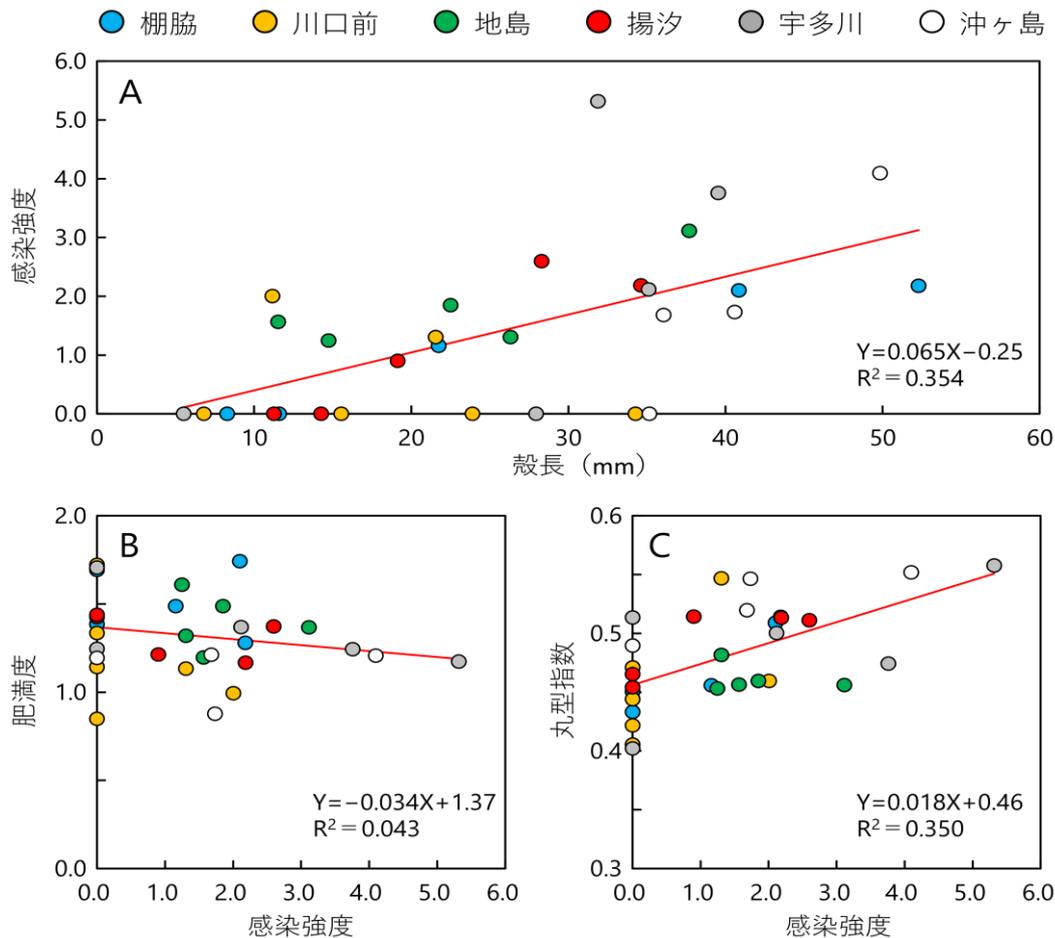


図 5. 松川浦 6 地点で採集されたアサリの殻長と *Perkinsus* 属原虫の感染強度の関係 (A) および感染強度とアサリの肥満度 (B)、丸型指数 (C) との関係。

ている。北海道のアサリに寄生する未同定の *Perkinsus* sp. においても、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は 20℃ 以上であると報告されている (西原 2010)。これらの結果と松川浦の水温の季節変動 (e.g. 加茂ほか 2012、Wada et al. 2014) から、海水中に *Perkinsus* 属原虫の遊走子が出現し始めるのは 7 月以降と予想され、特に生まれてからの期間が短く、ろ過摂食のろ水速度も低い稚貝 (Waki & Yoshinaga 2019) においては、8 月の時点で *Perkinsus* 属原虫の遊走子との接触機会が少なく、感染率・感染強度ともに低い結果になったものと推察される。遊走子形成のみならず、宿主体内での栄養体の増殖速度についても高水温条件 (28℃) で高くなることが *P. olseni* と *P. honshuensis* の両種で示されている (Umeda et al. 2013)。松川浦のアサリの殻長の年間成長量は 7.1~15.7 mm 程度と推定されており (Abe et al. 2017)、大型のアサリは複数回の高水温期 (夏期) を経験していることになるため、大型のアサリほど感染率と感染強度が高くなったものと考えられる。

感染強度は、最も高い個体でも 5.3 であり、*Perkinsus* 属原虫の影響を受けやすい稚貝においては総じて感染率・感染強度が低かったことから、2015 年 8 月の時点でアサリに致死的な影響を及ぼしている可能性は低かったと判断できる。しかしながら、相関係数は低いも

の ($r=0.21$)、感染強度の高い個体で肥満度が若干低下する傾向が見られたことから(図 5B)、多少の生理的な影響があった可能性は否定できない。丸型指数は感染強度の高い個体で増加する傾向が見られたが(図 5C)、これは感染強度の高い大型個体で丸型指数が高いことに関連しているものと思われ、*Perkinsus* 属原虫との因果関係は不明である。

松川浦では、8月以降も *Perkinsus* 属原虫の増殖・遊走子形成に好適な水温条件が続くため、高水温条件下でアサリの死亡個体が増える場合には、遊走子嚢の形成を通じた感染拡大により稚貝に影響を及ぼす可能性も懸念される。特に、潜砂深度の浅い小型のアサリの場合は、日射による干出時の地温上昇にもさらされやすいため、*Perkinsus* 属原虫の増殖に好適な条件が整いやすい可能性もあるだろう。有明海においては、秋頃になって新規加入群の感染強度が6を超えることが報告されている(Waki et al. 2018)。松川浦における *Perkinsus* 属原虫の動態と影響の解明のためには、夏から秋にかけての継続的なモニタリングが必要であろう。また、本研究では、RFTM法により培養した *Perkinsus* 属原虫を計数したのみで種の同定を行わなかった。*P. olseni* と *P. honshuensis* ではその感染動態や病原性が異なることも予想されるため、PCR検査等で種判別を行うことが望まれる。

謝辞

福島県水産試験場相馬支場の松本育夫氏にはフィールド調査にご協力いただいた。宮城県水産技術総合センターの熊谷明氏には、*Perkinsus* 属原虫の検出・計数方法をご教示いただいた。また、熊谷明氏、岩手医科大学の松政正俊氏には、論文をまとめるにあたり有益な助言をいただいた。東邦大学の脇司氏には本論文を執筆する上で重要となる文献をご提供いただいた。この場を借りて厚く御礼申し上げる。本研究は、水産庁漁場復旧対策支援事業「漁場生産力向上対策事業」の一環として行われた。

引用文献

- Abe H, Sato T, Iwasaki T, Wada T, Tomiyama T, Sato T, Hamaguchi M, Kajihara N, Kamiyama T (2017) Impact of the 2011 tsunami on the Manila clam *Ruditapes philippinarum* population and subsequent population recovery in Matsukawa-ura Lagoon, Fukushima, northeastern Japan. *Regional Studies in Marine Science*, 9: 97-105.
- Casas SM, Villalba A, Reece KS (2002) Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). I. Identification of the aetiological agent and in vitro modulation of zoosporulation by temperature and salinity. *Diseases of Aquatic Organisms*, 50: 51-65.
- Dungan CF, Reece KS (2006) In vitro propagation of two *Perkinsus* spp. parasites from Japanese Manila clams *Venerupis philippinarum* and description of *Perkinsus honshuensis* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53: 316-326.
- Dungan CF, Reece KS (2020) 5.2.1 *Perkinsus* spp. infections of marine molluscs

- (2020). In: AFS (American Fisheries Society) Fish Health Section (ed) Fish Health Section Blue Book: Suggested Procedures for the Detection and Identification of Certain Finfish and Shellfish Pathogens, 2020 Edition. 25 pp.
<https://units.fisheries.org/fhs/fish-health-section-blue-book-2020/>
- Hamaguchi M, Suzuki M, Usuki H, Ishioka H (1998) *Perkinsus* protozoan infection in short-necked clam *Tapes (=Ruditapes) philippinarum* in Japan. Fish Pathology, 33: 473-480.
- 浜口昌巳、佐々木美穂、薄浩則 (2002) 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.
- 池浦繁 (2002) 豊前海産アサリにおけるパーキンサス原虫の保有状況. 福岡県水産海洋技術センター研究報告、12: 127-129.
- 柿野純 (1988) 東京湾、千葉県沿岸におけるアサリ・バカガイの生息と環境. 水産海洋研究会報、52: 45-47.
- 加茂崇、山下善、涌井邦浩、鷹崎和義、神山亨一、西隆一郎、林健太郎 (2012) 福島県松川浦の東日本大震災津波前後での水質変化. 水路、163: 6-12.
- Murrell A, Kleeman SN, Barker SC (2002) Synonymy of *Perkinsus olseni* Lester & Davis, 1981 and *Perkinsus atlanticus* Azevedo, 1989 and an update on the phylogenetic position of the genus *Perkinsus*. Bulletin Archive European Association of Fish Pathology, 22: 258-265.
- 西原豊 (2010) 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. 北海道立水産試験場研究報告、77: 83-88.
- 酒井敬一、小野寺淳一 (2006) 宮城県におけるアサリの *Perkinsus* 原虫感染症の疫学的調査. 宮城県水産研究報告、6: 77-81.
- 鳥羽光晴 (2017) アサリ資源の減少に関する議論への再訪. 日本水産学会誌、83: 914-941.
- 鳥羽光晴、深山義文 (1991) 飼育アサリの性成熟過程と産卵誘発. 日本水産学会誌、57: 1269-1275.
- 鳥羽光晴、小林豊、石井亮、岡本隆、村内喜樹、岡本俊治、山本直生、黒田伸郎、富山毅、涌井邦浩、岩崎高資、張成年、山本敏博、良永知義 (2019) カイヤドリウミグモによる漁業被害とその対策. 生物科学、70: 78-88.
- 富山毅、鈴木孝男、佐藤利幸、加藤靖、亀岩翔太、杉林慶明、大越健嗣 (2011) 外来性巻貝サキグロタマツメタの松川浦における移入および分布. 日本水産学会誌、77: 1020-1026.
- Umeda K, Yoshinaga T (2012) Development of real-time PCR assays for discrimination and quantification of two *Perkinsus* spp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Diseases of Aquatic Organisms, 99: 215-225.
- Umeda K, Shimokawa J, Yoshinaga T (2013) Effects of temperature and salinity on the in

- vitro proliferation of trophozoites and the development of zoosporangia in *Perkinsus olseni* and *P. honshuensis*, both infecting Manila clam. *Fish Pathology*, 48: 13-16.
- Umeda K, Yang X, Waki T, Yoshinaga T, Itoh N (2020) The effects of environmental and nutritional conditions on the development of *Perkinsus olseni* prezoosporangia. *Experimental Parasitology*, 209: 107827
- Villalba A, Reece KS, Ordás MC, Casas SM, Figueras A (2004) Perkinsosis in molluscs: A review. *Aquatic Living Resources*, 17: 411-432.
- Wada T, Shimamura S, Nemoto Y (2014) Feeding, growth, and dispersal of hatchery-reared spotted halibut *Verasper variegatus* released in a shallow brackish lagoon: Matsukawa-ura, northeastern Fukushima, Japan. *Aquaculture Science*, 62: 75-88.
- Waki T, Yoshinaga T (2013) Experimental challenges of juvenile and adult Manila clams with the protozoan *Perkinsus olseni* at different temperatures. *Fisheries Science*, 79: 779-786.
- Waki T, Yoshinaga T (2015) Suppressing effects of low salinity and low temperature on in-vivo propagation of the protozoan *Perkinsus olseni* in Manila clam. *Fisheries Pathology*, 50: 16-22.
- Waki T, Yoshinaga T (2018) Experimental evaluation of the impact of *Perkinsus olseni* on the physiological activities of juvenile Manila clams. *Journal of Shellfish Research* 37: 29-39.
- Waki T, Yoshinaga T (2019) Mortality of spats of Manila clam *Ruditapes philippinarum* experimentally challenged with the protozoan parasite *Perkinsus olseni*. *Fish Pathology*, 54: 34-36.
- Waki T, Shimokawa J, Watanabe S, Yoshinaga T, Ogawa K (2012) Experimental challenges of wild Manila clams with *Perkinsus* species isolated from naturally infected wild Manila clams. *Journal of Invertebrate Pathology* 111: 50-55.
- Waki T, Takahashi M, Eki T, Hiasa M, Umeda K, Karakawa N, Yoshinaga T (2018) Impact of *Perkinsus olseni* infection on a wild population of Manila clam *Ruditapes philippinarum* in Ariake Bay, Japan. *Journal of Invertebrate Pathology*, 153: 134-144.
- 良永知義 (2007) 貝類のパーキンサス原虫症. *海洋と生物*, 29: 321-327.

みちのくベントス、5: 24-32