

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380106

研究課題名（和文） パーキンサス属原虫の天然海域のアサリへの影響評価とアサリ資源回復のための特性解明

 研究課題名（英文） Study on impact and pathobiology of *Perkinsus* infection in wild Manila clam for recovery of Manila clam resources

研究代表者

良永 知義（YOSHINAGA TOMOYOSHI）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20345185

研究成果の概要（和文）：

アサリに寄生するパーキンサス属原虫の攻撃試験によって、この原虫はアサリに致死的で、致死的な感染強度は 10^6 cells/g 軟体部重量であることが示された。アサリ資源が大きく減少した有明海の定点で 3 年間調査した結果、この海域では感染率は 100% に対し、最大感染強度が致死的な感染強度と同じくらいに達するとアサリ生息密度が減少した。これらより、本原虫はアサリ資源の減耗要因になっていることが強く示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Experimental challenge of Manila clam with the protozoan *Perkinsus olseni* revealed that this protozoan was lethal to the host and that the lethal infection intensity to Manila clam was around 10^6 cells/g soft tissue weight. Three-year monitoring of the infection level of the protozoan and the dynamics of a host population was carried out at one location in Ariake Bay where Manila clam population has dramatically decreased since late 1970s. This monitoring demonstrated that the infection prevalence reached 100 % and the population sizes of Manila clams decreased when the highest infection intensities reached the lethal infection intensity experimentally obtained. The results strongly suggested that infection with the protozoa was the major factor for the depletion of Manila clam resources.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2011 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2012 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：アサリ, *Perkinsus*, 病害, 資源

1. 研究開始当初の背景
1980 年代以降、アサリの資源量は全国的に減少し、それに伴って漁獲量も大幅に減少して

いる。その原因については、乱獲、ダム建設による河口への砂礫の供給量の減少、水温などの環境変化、化学物質による環境汚染、食

害生物による被食など諸説あるが、定説となるものはなく、いまだに明らかになっていない。この資源減少の対策として、日本各地で、漁獲制限、砂礫の客土、覆砂網の設置、養母貝場の養成、食害生物の除去などの資源回復のための努力が続けられているが、資源減少の原因が不明なまま実施されていることもあり、これらの努力は期待した成果を得られていない。一方、国内の多くのアサリ集団では *Perkinsus* 属原虫が高いレベル（感染率、感染強度ともに）で感染していることが知られている。研究開始時までには、実験感染によって *P. olseni* がアサリ稚貝に致死的事象であることは感染実験で示していたが、致死的事象の詳細（アサリサイズとの関係、水温との関係など）は不明であった。また、天然アサリにおける感染強度も十分には明らかになっておらず、この原虫がアサリ資源に与える影響には疑問点もおおく、早急に明らかにすることが求められていた。また、仮に本原虫がアサリ資源に大きな影響を与えているとしたら、この原虫が存在している中でアサリ増殖を図る手法の開発が必要であり、そのために必要な情報として、この原虫の病原生物学の特性に関する知見を集積する必要があった。

2. 研究の目的

以下の項目を具体的な目的として研究を実施した。

(1) 国内のアサリには *Perkinsus* 属原虫が2種存在していることが知られている。そこで、研究を行うために必要な技術として、この2種を識別して感染強度を定量する手法の開発し、この手法を用いて国内のアサリにおける *Perkinsus* 属原虫2種の感染状況を明らかにする。

(2) 感染実験によって、*Perkinsus* 属原虫がアサリの生残におよぼす影響、病原性を評価するとともに、致死的事象レベルを実験的に求め、さらに、アサリのサイズや水温が病原性におよぼす影響を評価する。

(3) 天然アサリ集団におけるアサリの個体群動態と感染動態を経時的に調査することによって、*Perkinsus* 属原虫がアサリ個体群の減耗におよぼす影響を評価する。

(4) 国内各地のアサリ集団における感染レベルを調査して感染レベルが低い海域をさがし、その海域でなぜ感染レベルが低いかを明らかにするため、野外調査ならびに環境因子(温度、水温)のモニタリングを行う。環境因子が *Perkinsus* 属原虫の各発育段階の増殖・発達に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) アサリに寄生する *P. olseni* と *P. honshuensis* の2種を識別する分子生物学的

手法として、これまでのPCR-RFLPに加えて、real-time PCR および nested PCR を検討し、これらの手法を用いて日本各地のアサリにおける2種の寄生状況を定量的に調査した。

(2) *P. olseni* 培養株で攻撃した成貝（殻長 18-22 mm）および稚貝（殻長 3-6 mm）とそれらの対照個体を、室内の4つの循環式水槽（水温 18℃、23℃、28℃および30℃）で飼育し、アサリの生残とアサリ体内の栄養体の動態を調べた。

(3) アサリ資源の減耗が著しい有明海干潟上の定点（地点名は地元漁協の要望によって匿名とする）で3年間にわたって、アサリの加入と減耗、*Perkinsus* 属原虫の感染強度の動態を調査し、併せて水温と塩分の環境データも得た。さらに、天然アサリから分離した *Perkinsus* spp. の遊走子で攻撃したアサリ（殻長 約 12 mm、寄生強度 106 cells/g WWT 程度）と対照個体を、有明海の干潟に設置したカゴに収容し、1-2カ月後に籠の中のアサリの生残率、殻長および *Perkinsus* 属原虫の感染強度を調べた。同様の実験を時期を変えて3回行った。また、感染時期の特定のため、未感染のアサリを干潟に埋設し、1ヶ月後の感染率を調べた。

(4) 日本各地の感染レベルの調査によりアサリ資源が良好な状態で維持されている愛知県の六条潟ならびに横浜市海の公園で *Perkinsus* 属原虫の感染レベルが低いことが明らかとなった。そこで、当該海域において、アサリ個体群の増減と感染状況、ならびに環境データを蓄積した。さらに、*Perkinsus* 属2種の栄養体を水温・塩分環境を変えて培養し、その影響を観察した。また、アサリに注射して得た前遊走子嚢の発達および遊走子の放出に水温・塩分が与える影響を実験的に調べた。

4. 研究成果

(1) real-time PCR および nested PCR による識別法を開発した。既報のPCR-RFLP法による識別法は、利用した制限酵素の切断部位にこれまで知られていなかった一塩基多型の存在が確認されたため、この方法では2種を識別できないことが判明した。国内の主要なアサリ生産地での上記2種の感染率・感染強度を調査した結果、*P. olseni* では、また、RFTM法で求めた感染強度とreal-time PCR法から測定された感染強度は有意に相関していたが、感染強度が低い場合は、検査に使用する試料量が多いRFTM法のほうが検出感度が高くなった。*P. olseni* はほとんどの地点で検出されたが、多くの地点で *P. honshuensis* は検出されず、検出された地点でも感染率・感染強度ともに *P. olseni* に比較して極めて低かった。以上より、国

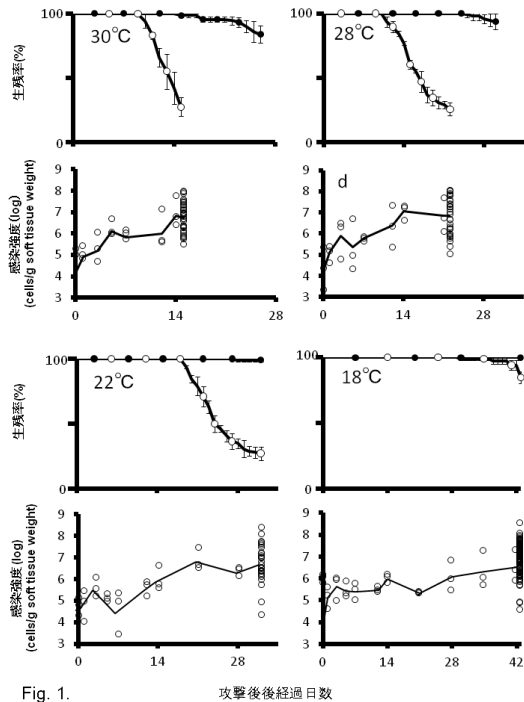


Fig. 1. 稚貝に対する攻撃試験における生残率と寄生強度の推移

図1. 稚貝に対する攻撃試験における生残率と寄生強度の推移

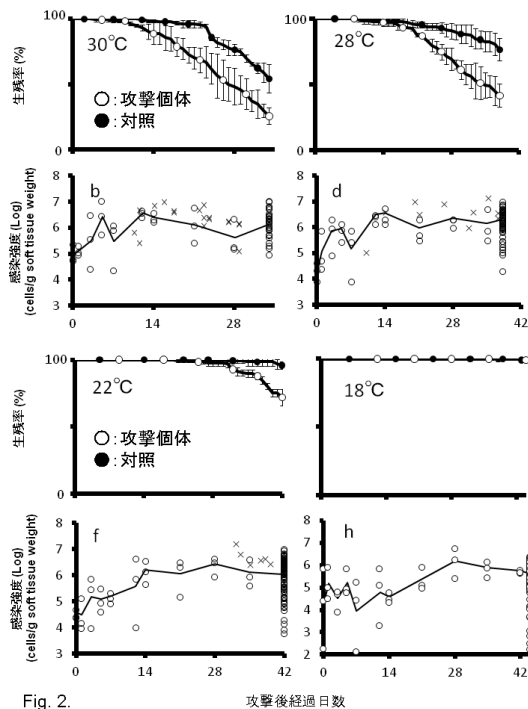


Fig. 2. 成貝に対する攻撃試験における生残率と寄生強度の推移

図2. 成貝に対する攻撃試験における生残率と寄生強度の推移

内の主要なアサリ生産地において *P. olseni* が *P. honshuensis* よりも優占することが明らかになり、アサリの資源量への影響という観点からは *P. honshuensis* の影響は小さく、無視できる程度であることが示唆された。

(2) 感染実験の結果、18°Cの成貝を除き、室内で飼育した成貝と稚貝のいずれについても、攻撃区が生残率は対照区より低く、有意差が検出された (U検定、 $p < 0.05$) (図1, 2)。生残率に有意差の検出された時期には攻撃区の平均感染強度は、飼育水温にかかわらず、成貝で 10^6 cells/g 軟体部重量 (以下 cells/g WSW)、稚貝で 10^6 から 10^7 cells/g WSW に達していた。水温間の比較では、攻撃個体と対照間の死亡率の有意差は水温が高いほど早く検出された。幼貝、成貝で比較すると、幼貝のほうが有意差が早く検出された。以上より、感染は水温が高いほど強く影響し、かつ、幼貝に強く影響することが示唆された。また、幼貝、成貝のどちらでも、平均感染強度が 10^6 cells/g 軟体部重量 (以下 cells/g STW) 程度に達すると感染による死亡が開始し、この値が実験的な致死感染強度として求められた。

(3) 有明海定点での調査では、アサリに8つのコホートが確認できたが、そのうち4コホートについては、個体群の出現から消滅するまでの感染強度と個体数密度の推移を追跡できた (図3)。夏季に初めて出現した3つのコホートの寄生強度は、出現直後においてはいずれも0から $10^{5.6}$ cells/g STW 程度であった。この後、感染率が100%に達し、全体の感染強度も増加して最大 10^6 から 10^7 cells/g STW 程度に達した。感染強度が 10^6 cells/g STW 程度の個体が現れる時期にこれらのコホートの個体数密度が減少し、つづいて、各コホートの寄生強度の最大値が減少傾向を示した。この寄生強度と個体数密度の変動は出現1年目と2年目の両方で観察された。2011年の冬に出現したコホートの感染強度は、出現直後ですでに最大 10^6 cells/g STW 程度に達していた。この後、感染強度は秋季まで増加傾向を示し、その後は横ばいで推移した。このコホートの個体数密度は秋季以降減少した。カゴ放流実験では、いずれの時期においても対照区が生残率は75%以上と高かったが、攻撃区が生残率は3-18%と低く、有意な差が見られた。併せて、攻撃区のアサリには成長の有意な抑制が観察された。

以上の感染実験 (2)、野外調査 (3)、かご放流実験 (3) の結果より、少なくとも調査した有明定点では、*Perkinsus* 属原虫の感染強度がおおよそ 10^6 cells/g STW 程度になるとアサリが死亡しており、*Perkinsus* 属原虫のアサリ減耗への関与が示唆された。

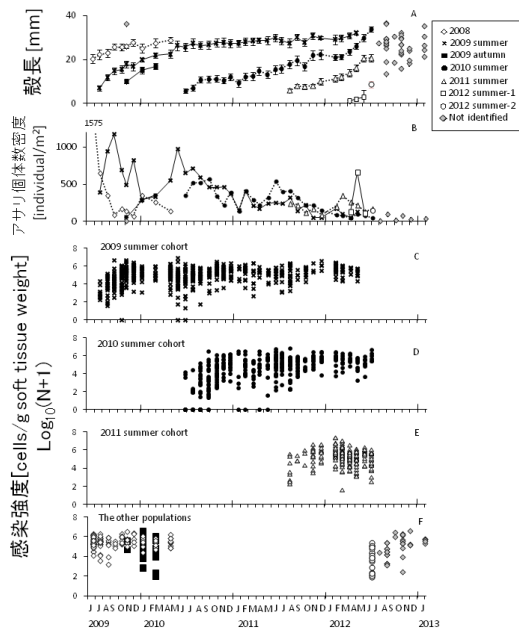


図3. 有明海定点における感染強度とアサリ個体群密度の推移

また、アサリへの *Perkinsus* 原虫の侵入は主として高水温期に生じ、冬季にはほとんど起こらないことも明らかとなった。

(4) 栄養体の増殖は *P. olseni* では 28°C、600-800 mOsm (18-24%) で、*P. honshuensis* では 28°C、700-1080 mOsm (21-33%) で最大であった。遊走子放出率は両種とも 25-30°C、25-35‰ で最大であった。これらより、アサリが通常生息している環境では、低塩分環境は栄養体および遊走子の発達の抑制要因にならないことが示された。

六条潟では感染率が 0-18% 程度、感染強度は最大で 10^4 cells/g STW 以下と有明海定点に比較して感染レベルが極めて低く、また、海の公園では感染率が 14-97%、感染強度は最大で 10^6 cells/g STW であったが、有明定点のデータと比べると感染強度の低い個体が多く、中程度の感染レベルであった。当初、これらの海域は河口域あるいは内湾域にあるため塩分が低く、このことが感染の抑制要因となって感染強度が低く推移していると考えたが、前述の栄養体および遊走子形成への低塩環境の影響に関する実験的データならびにこれらの海域で得られた塩分データから、これらの海域では低塩環境は感染の抑制要因とならないことが示された。このため、これらの海域で感染強度が低く推移している原因は不明のまま残った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Umeda, K., Shimokawa, J., Yoshinaga, T. 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*, 査読あり, 48, 2113, p. 13-16.
- ② Umeda, K., Yoshinaga, T. Development of real-time PCR assays for two *Perkinsus* spp. in the Manila clam *Ruditapes philippinarum*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 査読あり, 99, 2112, p. 215-225.
- ③ Waki, T., Shimokawa, J., Watanabe, S., Yoshinaga, T., Ogawa, K. Experimental challenges of wild Manila clams with *Perkinsus* species isolated from naturally infected wild Manila clams. *Journal of Invertebrate Pathology*, 査読あり, 111, 2112, p. 50-55.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 梅田剛佑・高橋美希・良永知義・小川和夫：“アサリに寄生する *Perkinsus* 属原虫 2 種の Real-time PCR による識別・定量法 “平成 23 年度日本魚病学会春季大会 (20110326). 東京
- ② 高橋美希・良永知義・小川和夫：“アサリに寄生する *Perkinsus* 属 2 種の攻撃試験法の開発 “平成 23 年度日本魚病学会春季大会 (20110326)
- ③ 悦喜達也・良永知義：“野外調査アサリにおけるパーキンサス感染強度定量のための RFTM 法の標準化 “平成 23 年度日本魚病学会春季大会 (20111002) 長崎
- ④ Umeda, K.・Yoshinaga, T.：“Development of real-time PCR assay for discrimination and quantification of two *Perkinsus* spp. in Manila Clam *Ruditapes philippinarum*” 8th symposium of Diseases of Aquaria Aquaculture (20111123) Mangalore, India.
- ⑤ 梅田剛佑・良永知義：“アサリに寄生する *Perkinsus* 属原虫 2 種の国内分布 “平成 25 年度日本魚病学会春季大会 (20130309) 東京
- ⑥ 脇司・良永知義：“アサリに寄生する *Perkinsus* 属原虫の病害性の実験的評価 “平成 25 年度日本水産学会春季大会 (2013026) 東京
- ⑦ 脇司・良永知義：“有明海定点における *Perkinsus* 属原虫のアサリの減耗への関与”

平成 25 年度日本水産学会春季大会
(20130326) 東京

⑧梅田剛佑・高橋美希・脇司・悦喜達也・良永知義：“アサリの *Perkinsus* 属原虫の分布に影響する環境要因について” 平成 25 年度日本水産学会春季大会(20130326) 東京

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

良永知義 (YOSHINAGA TOMOYOSHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：20345185