

## アワビ類の筋萎縮症に対する洗卵の効果

小林俊将

### Effects of egg washing against abalone amyotrophia

Toshimasa Kobayashi

#### Abstract

In order to confirm the effect of egg washing on abalone amyotrophia, fertilized eggs before and after egg washing were examined at two pacific abalone, *Haliotis discus hannai*, seedling production facilities where abalone amyotrophia was occurring. The gene for AbALV, the virus that causes abalone amyotrophia, was detected in all nine lots of fertilized eggs. Egg washing of fertilized eggs in which the AbALV gene was detected, either by decantation or by a combination of decantation and running water, resulted in the AbALV gene not being detected in five of the nine lots. The AbALV gene copy number was also significantly reduced in the four lots where the AbALV gene was detected. This suggests that the risk of vertical transmission of abalone amyotrophia can be reduced by egg washing operations conducted at seed production facilities.

**Key words:** abalone amyotrophia, *Haliotis discus hannai*, egg washing

キーワード: アワビ筋萎縮症, エゾアワビ, 洗卵

#### はじめに

アワビ類の筋萎縮症は 1970 年代後半からクロアワビ *Haliotis discus discus* 及びメガイアワビ *Haliotis gigantea* の種苗生産で発生し、稚貝において高い死亡率を示すことから問題となっている<sup>1-2)</sup>。病原体は長年不明であったが、近年、abalone asfa-like virus (AbALV) を病原体とするウイルス感染症であることが判明し、PCR による検出が可能になった<sup>3-4)</sup>。

2020 年 6 月に岩手県内のアワビ種苗生産施設で累積死亡率が 80% に達するエゾアワビ *Haliotis discus hannai* の稚貝 (殻長 3~5mm) の大量死があり、PCR 検査の結果、AbALV を病原体とする筋萎縮症であることが判明した。これまでエゾアワビの種苗生産では筋萎縮症の被害は発生しないと考えられていたが、エゾアワビの種苗生産においても筋萎縮症により大きな被害が出るようになった。

筋萎縮症の対策として、紫外線照射による飼育水中のウイルスの不活化が有効であることが知られており<sup>2,5-6)</sup>、岩手県内のアワビ種苗生産施設でも紫外線照射装置の整備が進んできている。一方で、同対策により給水からの水平感染の防除は期待できるが、親貝が AbALV に感染していた場合、親貝から種苗への垂直感染が懸念される。

クロアワビにおいて紫外線照射海水で洗卵した受精卵を、採卵した施設とは異なる施設に搬入し、当歳貝の期間を感染耐過一歳貝および採卵用親貝から隔離して飼育することで、筋萎縮症の発生が抑えられた事例が報告されている<sup>7)</sup>。この事例においては、隔離飼育することで感染耐過一歳貝および採卵用親貝からの水平感染を防除するとともに、紫外線照射海水による受精卵の洗卵が垂直感染の防除に有効であった可能性がある。

紫外線照射海水による受精卵の洗卵は不要な精子や有機物を除去し、幼生飼育期間中のバクテリアの繁殖を防ぐことを目的として、アワビ種苗生産施設では広く実

施されている。

そこで、本研究ではエゾアワビの種苗生産施設で通常実施されている紫外線照射海水での受精卵の洗卵作業において、筋萎縮症の垂直感染に対する防除効果が期待できるのか検証することにした。検証手法として、筋萎縮症の発生が問題となっているアワビ種苗生産施設において、洗卵前後の受精卵からの AbALV 遺伝子の検出を試みた。

## 材料と方法

### 検体の採取

筋萎縮症の発生履歴がある種苗生産施設 A から、2022 年 3 月 28 日に生産されたエゾアワビの受精卵を検体として採取した。同様に筋萎縮症の発生履歴がある種苗生産施設 B から、2022 年 4 月 18 日に生産されたエゾアワビの受精卵を検体として採取した。

種苗生産施設 A 及び B では、紫外線照射海水処理刺激により複数の雌雄から卵及び精子を採取し、約 50 万粒を 1 ロットとして 20L コンテナ内で人工授精し、種苗生産施設 A ではデカンテーション方式で、種苗生産施設 B ではデカンテーション方式と流水方式の組み合わせで受精卵を洗卵している。

デカンテーション方式の洗卵の手順は以下のとおりで、①受精卵を収容した 20L の角型コンテナに紫外線照射海水約 15L を勢いよく加えて受精卵を攪拌する。②コンテナを 15 分以上静置して、受精卵を沈降させる。③コンテナを傾けて受精卵を含まない上澄みの海水を除去し、受精卵を含む海水を約 2L 残す。①～③の工程を 1 回のデカンテーションとして、連続して複数回実施する。

また、流水方式の洗卵の手順は以下のとおりで、底面に 40 $\mu$ m 目合のミューラーガーゼを張った径 150mm の塩化ビニール製パイプを高さ約 7cm のウオーターバス容器内に設置して受精卵を収容し、紫外線照射海水の流水下で 30 分間攪拌する。

種苗生産施設 A では連続で 8～10 回のデカンテーションで洗卵した 5 ロットについて、洗卵前後の受精卵を採取した。そのうち 1 ロット (Lot No.5) はデカンテーションでの洗卵回数ごとに受精卵を採取した。

種苗生産施設 B ではデカンテーションで 1 回洗卵した後に流水方式で 30 分間洗卵し、その後、再度デカンテーションを 2～4 回繰り返して洗卵した 4 ロットについて、洗卵ステージごとに受精卵を採取した。また、種苗生産施設 A では、海水中に放卵、放精された媒精前の未

受精卵及び精子もそれぞれ 1 検体ずつ採取した。

### 定量 PCR による AbALV 遺伝子の検出

検体毎に約 100 粒の受精卵を遠沈して回収し、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN 社製) を用いて DNA を抽出して 200 $\mu$ L の蒸留水に溶出した。定量 PCR は既報<sup>3)</sup>に従い、AbALV の p72 遺伝子を対象としたプライマーセット (Q-ASFV-like-F,R) と KOD sybr qPCR Mix (TOYOBO 社製) を用い、19 $\mu$ L の反応液に対して 1 $\mu$ L の DNA サンプルを添加し、One Step Plus Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems 社製) により行った。p72 遺伝子の検量線を作成し、受精卵の検体数を 100 粒と仮定して 1 粒中のウイルス遺伝子コピー数を推定した。

## 結 果

### 種苗生産施設 A での洗卵効果

種苗生産施設 A から採取した 5 ロットについて洗卵前後の受精卵のウイルス遺伝子のコピー数を Table 1 に示した。洗卵前の受精卵について、5 ロット全てからウイルス遺伝子が検出された。各ロットのウイルス遺伝子のコピー数は 2.4 $\times$ 10<sup>2</sup>～8.6 $\times$ 10<sup>2</sup> コピー/卵だった。洗卵後のウイルス量はロット 1, 3, 5 で非検出、トロット 2 及び 4 においても 1 コピー/卵以下の低い値を示した。

次にロット 5 について、洗卵ステージごとのウイルス遺伝子のコピー数を Fig. 1 に示した。洗卵前に 7.2 $\times$ 10 コピー/卵あったコピー数が、2 回のデカンテーション後には 1 コピー/卵以下まで減少、その後、1～10 コピー/卵以下の検出が継続し、9 回のデカンテーション後には非検出となった。

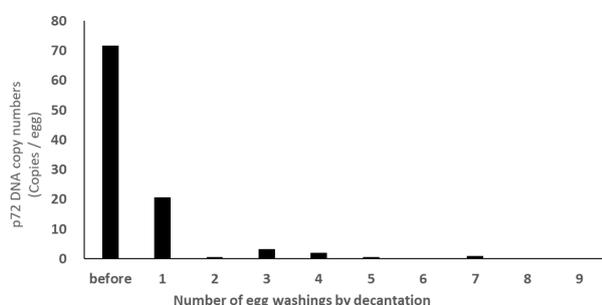
### 種苗生産施設 B での洗卵効果

種苗生産施設 B から採取した 4 ロットについて洗卵ステージごとの受精卵のウイルス遺伝子のコピー数を Table 2 に示した。4 ロット全てからウイルス遺伝子が検出された。ロット 2～4 の洗卵前のウイルス遺伝子のコピー数は 1.3～8.3 コピー/卵だった。また、ロット 1 は洗卵前のデータが欠測となったが、1 回のデカンテーション後のウイルス遺伝子のコピー数は 2.8 $\times$ 10 コピー/卵であり、洗卵前のウイルス遺伝子のコピー数は最も高かったと考えられる。洗卵後のウイルス量はロット 2 及び 4 で非検出、トロット 1 及び 3 においても 1 コピー/卵以下の低い値を示した。

また、定量 PCR により未受精卵及び精子からもウイルス遺伝子が検出された。なお、検体の卵数及び精子濃度が不明であったことから、単位量あたりのコピー数は不明である。

**Table 1** Number of the AbALV p72 gene of fertilized eggs before and after egg washing in *H.discus hannai*.

Lot No.	p72 DNA copy numbers (Copy/egg)		Number of decantation
	Before egg washing	After egg washing	
1	$2.4 \times 10$	0.0	8
2	$3.9 \times 10$	0.1	10
3	$8.6 \times 10^2$	0.0	10
4	$5.0 \times 10$	0.8	10
5	$7.2 \times 10$	0.0	9



**Fig.1** Number of the AbALV p72 gene of fertilized eggs per egg washing stage in Lot 5

**Table 2** Number of the AbALV p72 gene of fertilized eggs per egg washing stage in *H.discus hannai*.

Egg washing stage	p72 DNA copy numbers (Copy/egg)			
	Lot No.1	2	3	4
Before egg washing	ND	1.9	8.3	1.3
Decantation (1st)	$2.8 \times 10$	0.2	1.0	0.1
Running water (30min)	0.6	0.0	0.0	0.4
Decantation (2nd)	0.2	0.0	0.0	0.0
Decantation (3rd)	0.1	0.0	0.1	—
Decantation (4th)	0.3	—	—	—
Decantation (5th)	0.2	—	—	—

## 考 察

松山ら<sup>8)</sup>は筋萎縮症に感染したクロアワビにおいて、部位別にウイルス量を比較し、リンパ液、頭部、鰓、腸管、外套膜、中腸腺及び筋肉からウイルス遺伝子を検出している。本研究でエゾアワビの卵及び精子からもウイルス遺伝子が検出されたことから、アワビの筋萎縮症においては卵あるいは精子が保有するウイルスにより垂直感染が生じることが懸念される。

2つの種苗生産施設において、検査した9ロットの受精卵全てからウイルスが検出されており、筋萎縮症が発生している種苗生産施設では高率で受精卵がウイルスを

保有していることが明らかとなった。いずれの種苗生産施設でも、産卵誘発は洗卵と同じ系統の海水に紫外線を照射して使用している。また、いずれのロットでも、洗卵によりウイルス量が減少することから、受精卵から検出されたウイルスは産卵誘発や洗卵に使用した海水由来ではなく親貝由来であると考えられる。受精卵が保有する親貝由来のウイルスにより垂直感染が成立するかは未確認であるが、受精卵1粒あたり $10^2$ のレベルでウイルスを保有しているロットがあることから、垂直感染が成立する可能性は十分にあると考えられる。

受精前の卵及び精子からもウイルス遺伝子が検出されたことから、受精卵から検出されたウイルス遺伝子は卵由来及び精子由来のウイルス遺伝子が併せて検出されていると考えられる。エゾアワビの卵は透明な寒天物質である厚いゼリー層に覆われており、媒精後は多数の精子がゼリー層に侵入する<sup>9)</sup>。受精卵の洗卵により精子を含むゼリー層が卵から剥がれることが知られており、本研究結果から受精卵はゼリー層部分がウイルスに汚染されていて、洗卵によりゼリー層が剥離した結果、受精卵から検出されるウイルス量が低下したと推察される。

また、本研究において、洗卵を繰り返すことでウイルス遺伝子が検出されなくなったことから、卵内感染は生じていないか、生じているとしても極めて微量であると推察される。

デカンテーション方式による洗卵では、回数を重ねるごとに海水中に浮遊するゼリー層の破片や精子の濃度は低下するが、常にコンテナ内に一定量の海水が残ることから、それらを全て除去することは難しい。除去されなかったゼリー層の破片や精子はウイルスを保有していると思われ、本研究においても9ロット中4ロットの受精卵で洗卵後もウイルス遺伝子が検出されている。しかし、洗卵後に検出されたウイルス遺伝子のコピー数は、いずれのロットにおいても1コピー/卵以下まで低下しており、洗卵により垂直感染のリスクは低下すると考えられる。種苗生産における垂直感染の防除策としては洗卵よりも卵消毒が効果的であるが、アワビ類では卵消毒技術が確立されていないことから、筋萎縮症の垂直感染対策としては紫外線照射海水による洗卵を十分に行うことが必要と思われる。

また、本研究の結果から、筋萎縮症が発生している種苗生産施設においては、洗卵の際に生じるデカンテーションの廃水や使用した器具機材はウイルスで汚染されている可能性があるため、使用した器具機材の消毒や産卵誘発及び洗卵作業を行う場所と稚貝の飼育場所の隔離は、

施設内のウイルスによる汚染を防除するうえで重要と考えられる。

## 文 献

- 1) 中津川俊雄・畑井喜司雄・窪田三朗：筋萎縮を伴うアワビ稚貝の病理組織学的所見. 魚病研究, 23(3), 203-204 (1988).
- 2) 中津川俊雄・岡部三雄・室賀清邦：クロアワビ筋萎縮症の水平感染. 魚病研究, 35(1), 11-14 (2000).
- 3) T. Matsuyama, T. Takano, I. Nishiki, A. Fujiwara, I. Kiryu, M. Inada and C. Nakayasu: A novel Asfarvirus-like virus identified as a potential cause of mass mortality of abalone. *Scientific reports*, 10(1), 4620. (2020).
- 4) T. Matsuyama, I. Kiryu, T. Mekata, T. Takano, K. Umeda and Y. Matsuura: Pathogenicity, genomic analysis and structure of abalone asfa-like virus: evidence for classification in the family Asfarviridae. *Journal of General Virology*, 104(8), 001875. (2023).
- 5) 柴田利治・筑紫康博・中本崇・渡辺健二・永島孝之：給水の紫外線消毒によるクロアワビ筋萎縮症の予防. 水産増殖, 50(2), 227-232 (2002).
- 6) 相川英明・鈴木将幸・原田幸二・今井利爲：神奈川県下のアワビ類種苗生産施設における Abalone Asfa-like ウイルス調査. 魚病研究, 57(1), 30-32 (2022).
- 7) 岡田一宏・西村守央・河村剛：クロアワビ当歳貝の隔離飼育による筋萎縮症の予防. 水産増殖, 48(4), 657-663 (2000).
- 8) 松山知正・桐生郁也・稲田真理・中易千早：PCR による Abalone asfa-like virus の検出に適した検体採取部位の検証. 魚病研究, 56(1), 18-21 (2021).
- 9) 西川信良：貝類種苗培養技術開発試験 (エゾアワビ). 昭和 52 年度北海道栽培漁業センター事業報告書, 1-12 (1978).