

## アサリに寄生した初期幼体の顕微鏡観察によるカイヤドリウミグモの現行モニタリング法の検証

黒田伸郎・村内嘉樹

(2016年12月6日受付, 2017年2月7日受理)

### Verification of the current monitoring method for the sea spider *Nymphonella tapetis* by microscopic observation of early larvae infecting the asari clam *Ruditapes philippinarum*

KURODA Nobuo\* and MURAUCHI Yoshiki\*

**Abstract:** Infection of the asari clam *Ruditapes philippinarum* collected along the eastern coast of the Chita Peninsula, Mikawa Bay, central Japan with the sea spider *Nymphonella tapetis* were detected visually and fluorescent microscopically from April 2015 to March 2016. Visual detection (usual method), which has been applied for periodical monitoring of the sea spider infection in our laboratory, can determine overall infection of larval sea spider conveniently by naked eyes or through loupe. Fluorescent microscopic detection is defined accurately enable to determine minute early larvae of the sea spider using fluorescent staining for chitin. Variation patterns of prevalence of infection (number of infected clams/ number of observed clams) and mean abundance of infection (total number of observed larvae/ total number of infected clams) by the usual method changed nearly with those by the fluorescent method. The growth period of the parasites from initiation of infection to visual size was estimated to be about one month during spring to summer. Survival of the larvae from start of infection to visual size was estimated at least 30%. Usual method can be applied effectively as fluorescent method for the detection of infecting small larvae in epidemical investigation of the sea spider with natural asari clam.

**キーワード;**カイヤドリウミグモ, 初期幼体, 成長速度, 生残率

本県でのカイヤドリウミグモ *Nymphonella tapetis* (以下「ウミグモ」という) のアサリ *Ruditapes philippinarum* への寄生は, 2008年に知多半島東岸域で確認された後寄生範囲が徐々に拡大し, 現在まで三河湾沿岸で二枚貝類への寄生が継続している。<sup>1, 2)</sup> 本種には, 二枚貝に寄生する幼体期, 自由生活をする成体期があり, 成体が交尾後, 雄が卵塊を抱え, 卵塊からふ化した幼生ははじめ二枚貝の鰓に寄生し, 幼体となってからは軟体部に嘴を刺して宿主の体液を吸って成長することがわかっている。<sup>3)</sup>

ウミグモが本県で確認された2008年から, 愛知県水産試験場は主要なアサリ漁場での寄生状況を把握するために, 漁業者と協力してモニタリング調査を実施している。

具体的には, アサリを開殻し肉眼であるいはルーペを使って, 寄生しているウミグモを確認, 計数し, アサリ全体に占める被寄生アサリの割合(寄生率)および被寄生アサリ1個体あたりのウミグモ寄生個体数(平均寄生強度)を算出している。この方法で確認できる幼体は体長0.5mm程度以上に限られ, 体長1mm以下の幼体では見落としも多いし, 見落としの程度には個人差もあると考えられる。また, 寄生直後の幼体は体長0.1mm程度であること, 寄生後肉眼で確認できる0.5mmまでの成長速度が不明であることなどから, 現在の調査に基づく変動予測の妥当性は不明である。

そこで, モニタリング調査と合わせて, 肉眼では確認できない微小な初期幼体を抽出し顕微鏡下で観察するこ

\* 愛知県水産試験場漁業生産研究所 (Marine Resources Research Center, Aichi Fisheries Research Institute, Toyohama, Minamichita, Aichi 470-3412, Japan)

とにより、肉眼視による現行のモニタリング法の妥当性を検討したので報告する。

### 材料及び方法

Fig. 1 に示した知多半島東岸の 2 地点において、2015 年 4 月から 2016 年 3 月まで毎月アサリを徒手で採取した。採取個体数は St. 1 では 100 個体、St. 2 では 50 個体とした。ただし、2015 年 12 月は、採取時の潮位が高く、St. 2 ではアサリが採取できなかった。

採取当日あるいは翌日に St. 1 についてはアサリ 100 個体、St. 2 については 50 個体を開殻して、肉眼視によりあるいはルーペを用いて寄生したウミグモ幼体の数を計数し、寄生率、平均寄生強度を算出した。この方法を以下「常法」という。肉眼で確認された幼体をすべてアサリ軟体部からピンセットで取り除いたあと、アサリ 20 個体を任意に選びポリエチレン製サンプル容器に収容し、70%エタノール水溶液に浸漬して室温で初期幼体観察時まで保存した。また、2015 年 6 月以降は採取した幼体の任意の個体数について吻から尾部までの体長を実体顕微鏡の接眼マイクロメータで測定した。

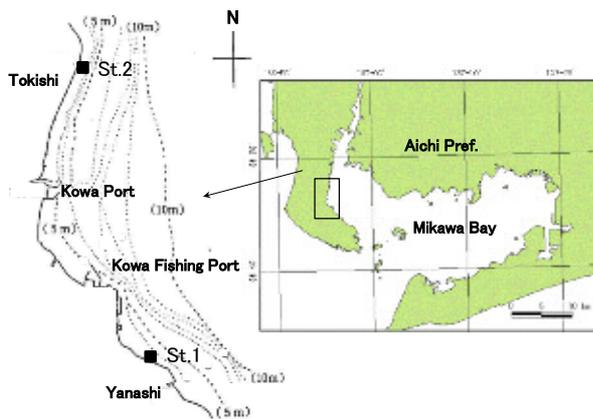


Fig. 1 Location of the sampling stations

初期幼体観察は、試料採取後 1 カ月以内に Yoshinaga *et al.*<sup>4)</sup> の方法に従って行った。アサリの鰓をピンセットで軟体部からはずし、2N-NaOH 10ml が入った 15ml 容のポリプロピレン製遠沈管に収容し、60°C のウォーターバス中で 1 時間置き、タンパク質を溶解した。遠沈管を 20,000×g、5 分間遠心後、上澄み液を捨て、沈殿物に純水を加え 10ml とし、同じ条件で遠心後、0.4ml とした沈殿物に 1% 4,4-ビス(2-スルホスチリル)ピフェニルナトリウム(Uvitex2B)PBS 溶液 0.1ml を加えて室温で 30 分間置き、幼体のキチン質を染色した。染色後、純水を加え 10ml とし、同様に遠心後、沈殿物 1ml を回収し観察試料とした。試料を落射蛍光顕微鏡(オリンパス製 VANOX

AHBS3) で U 励起光下、40 倍で観察し、青色の蛍光色を発するウミグモ幼体を計数し、2015 年 5 月以降は、可能であれば体長を接眼マイクロメータで測定した。この方法を以下「蛍光法」という。

### 結果

St. 2 は St. 1 に比べ通年アサリ密度が低かったため、調査期間中の 7 月から 10 月には 50 個体を採取することができなかった。St. 2 の 7, 8, 9, 10 月の常法のデータは、それぞれ採取できたアサリ 38, 13, 28, 30 個体に対する観察結果から算出した。蛍光法は、St. 2 の 8 月が 13 個体であった以外はすべて 20 個体についてデータを取ることができた。

Fig. 2 にウミグモ初期幼体の蛍光顕微鏡写真を示した。幼体の体長は、胴の先端から尾部までの長さとした。幼体は、落射蛍光下で透過光を入れて検鏡すると輪郭が明瞭に確認でき、容易に観察することができた。蛍光法で確認された幼体の多くは歩脚が未発達で、常法で確認される幼体とは発育段階が異なった。<sup>3)</sup>

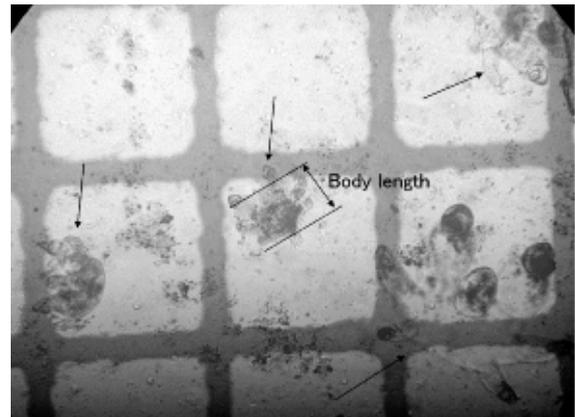


Fig. 2 Fluorescent microscopic photograph of early larvae of the sea spider. Larval body length were measured with an indicated bar. The mesh size of the slide glass is 1mm.

蛍光法では、体長が 1mm 以上の常法で見落とされたと考えられる幼体も確認されたが、その割合は約 10% と低く、本研究の目的の一つが常法の妥当性の検討であることから、蛍光法で観察の対象とする幼体は体長 1mm 未満とした。

Fig. 3 に両地点の常法と蛍光法によるウミグモ幼生のアサリへの寄生率の推移、Fig. 4 に同様に平均寄生強度の推移を示した。

寄生率は、両地点とも常法と蛍光法でよく似た変動パターンを示し、St. 1 の 4 月と 8 月、St. 2 の 8 月以外の試料では蛍光法の方が常法よりも高い値を示した。St. 1 で

は、常法では7月に54%、蛍光法では6月に70%のピークを示したあと急減して9月に前者が12%、後者が20%の谷値を示した。10月からは両者とも増加を続け、2月に前者で61%、後者で95%の2回目のピークを示した。St. 2では、6月に常法で78%、蛍光法で90%の高いピークがみられたあと急減し、前者は9月に11%、後者は8月に8%の谷値となった。その後は類似した変動傾向で増減を示し、1月に前者で40%、後者で70%の2回目のピークを示した。

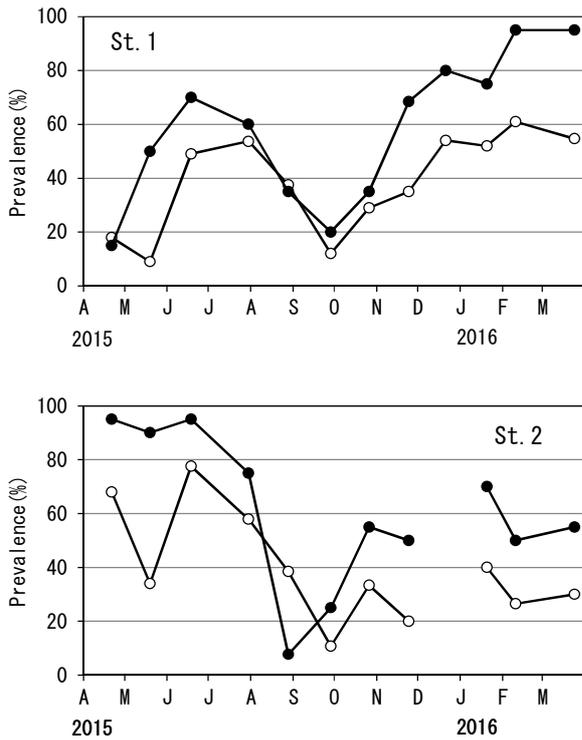


Fig. 3 Comparison of the prevalence of infection of the asari clam with the sea spider larvae between the usual and the fluorescent methods

-○-: usual method -●-: fluorescent method

平均寄生強度も、地点ごとに常法と蛍光法で類似した変動パターンを示した。また、両地点とも寄生率と同様に、春季から夏季に1回目のピークがみられ、秋季に低下したあと再度増加するパターンを示した。St. 1は、常法では1.4から4.8の範囲を変動し、蛍光法では、1.3から6.9の範囲で変動した。St. 2は、St. 1よりも平均寄生強度の変動の幅が大きく、増減も急激であった。常法では2.0から18.7の範囲、蛍光法では1.0から16.2の範囲で変動した。

Fig. 5に、常法と蛍光法によるウミグモの体長組成を示した。なお、両法とも2地点の試料を合わせた結果を示

した。また、蛍光法では8, 9, 10月に、常法では5, 8, 9, 10月にはウミグモの寄生率が低く、採取個体数が少なかったため、体長組成を示すことができなかった。常法では、体長が1mm以下のウミグモの出現頻度は約10%前後と低い場合が多かったが、12月には53%、1月には22%と高い割合を占めた。また、12月、1月、2月にはそれぞれ3mm以下、4mm以下、5mm以下の個体しかみられなかった。一方蛍光法では、平均体長は0.21mmから0.46mmの範囲にあり、体長0.5mm以下の個体が65%から100%と大半を占めた。

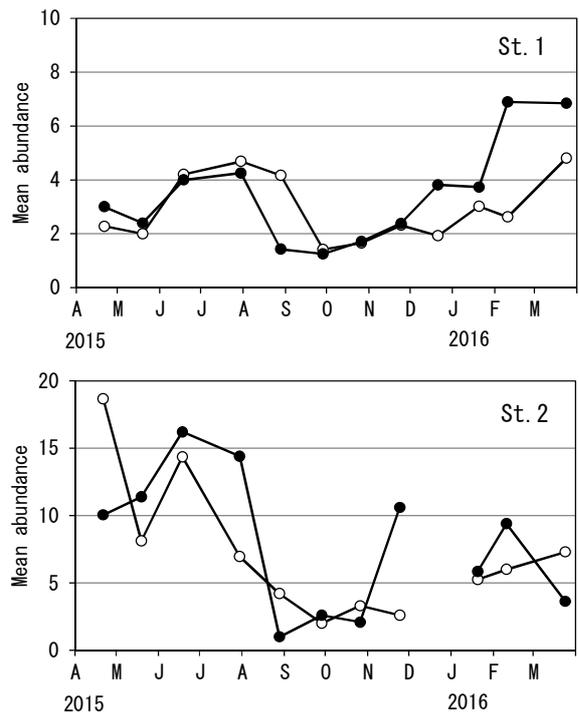


Fig. 4 Comparison of mean abundance of infection of the asari clam with the sea spider larvae between the usual and the fluorescent methods

-○-: usual method -●-: fluorescent method

## 考 察

ウミグモ初期幼体の寄生率は、ほとんどの資料で蛍光法の方が常法より高い値を示したが、両方の結果は類似した変動パターンを示した。このことは、常法では確認できない微小なウミグモしか寄生していないアサリが一定数以上いるものの、月1回のモニタリングにおいては、肉眼とルーペによる確認で十分ウミグモの寄生状況の変動を正しく把握できることを示している。また、寄生率の変動状況を詳しくみると、St. 1では蛍光法による寄生

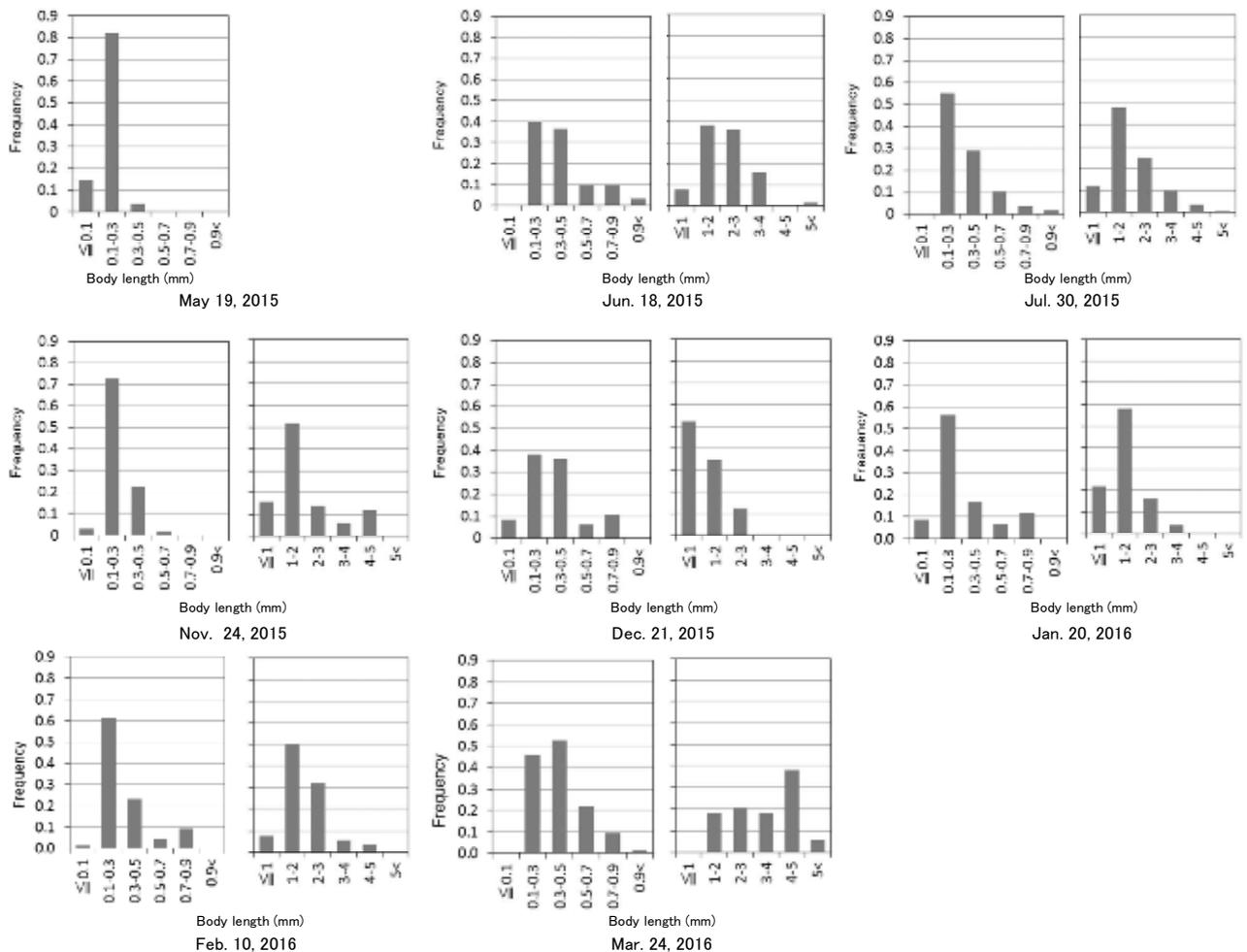


Fig.5 Frequency of the body length of the sea spider larvae

The left figures show the results by the fluorescent method and the others by the usual method.

率は4月から6月にかけて増加し、7月から9月にかけて減少しているのに対し、常法では5月から7月にかけて増加し、8月から10月にかけて減少している。St.2ではこのようなパターンはみられなかったが、夏季の谷の時期が、蛍光法では8月、常法では9月にみられた。

Fig.5に示されるように、ウミグモの成長には同期がみられず、成長速度には個体差が大きいことが推察されるものの、上述のような春季から秋季にかけて両方法でみられた寄生率の時間的ずれは、この時期の寄生直後のウミグモ幼体が肉眼視できる体長に成長する期間が平均的には約1カ月であることを示唆している。

平均寄生強度も、常法と蛍光法で類似した変動パターンを示した。上述のように、春季から夏季に初期幼体が肉眼視できる体長になるまで約1カ月とすると、ある月の蛍光法による初期幼体の平均寄生強度と翌月の常法による幼体の平均寄生強度を比較することにより、アサリの体内に入った直後から肉眼視できるまでのウミグモ幼体の生残率が推定できると考えられる。このようにして

求めた生残率は、4月から9月にかけてSt.1では0.66から1.75の範囲、St.2では0.29から2.0の範囲で変動した。前月の初期幼体の平均寄生強度より、翌月の幼体の平均寄生強度の方が高くなっている場合もあり、単純に生残率を示しているとは言えない。このことは、やはり幼体の成長速度に個体差があることに起因していると考えられるが、1カ月後の推定生残率が最も低い場合でも約30%であることから、アサリに侵入したウミグモ幼体の生残率はかなり高く、多くの個体が成体まで成長することが示唆された。時間的変動を無視して、1年間の平均寄生強度の平均を比較すると、St.1では蛍光法が3.5、常法が2.9であり、St.2では、蛍光法が7.9、常法が7.2であり、かなり近い値であった。このことから、ウミグモ幼体はアサリ体内で高い確率で生残、成長するものと考えられる。

蛍光法による微小幼体の体長組成をみると、多くの場合が0.5mm以下の個体が大半を占めていた。このことは、体長約0.1mmのウミグモ幼生が0.5mmまで成長するのに

は時間がかかるが、0.5mm から1mm まで成長する期間は比較的短いことを示している。また、蛍光法でも0.5mm から1mm の幼体が少ないことは、常法でこの体長の幼体を見落とすことがあるとしても、寄生率の算出に与える影響はあまり大きくないと言える。一方、常法では1mm 以下のウミグモの出現頻度は低い場合が多いが、22%、53%と高い場合もあった。このことは、1mm 以下の肉眼では見落とす可能性のあるウミグモも、出現頻度が高い場合は、調査者が注意深く確認するので、見落とす率が低くなることを示唆している。

ところで、冬季の12月から2月にかけて、ウミグモ幼体の体長組成の上限が3mm、4mm、5mm と1mm ずつ大きくなり、それ以上の幼体が出現しなかったことは、冬季の水温では、ウミグモ幼体の成長速度が1カ月に約1mm であることを示している。この間アサリ体内から出て繁殖を行うウミグモ成体の個体数は極めて少なかったと考えられる。しかし、この時期にも蛍光法では0.1mm 以下の寄生直後の幼体が確認され、平均寄生強度も1月から2月にかけて増加していることから、実際にはこの時期にも再生産とアサリへの新たな寄生がある程度進行したことがうかがわれる。2015年の冬季は暖冬であったため、<sup>1)</sup>秋季に自由生活に移行した成体が長期間にわたって生残して再生産を継続した可能性がある。また、冬季に成体となった個体が極めてわずかであっても、アサリが新たな感染を受ける程度は、宿主であるアサリ自身の密度とも密接に関連するので、今回みられた冬季の新たな感染の原因については、今後さらに検討する必要がある。

以上のように、常法と蛍光法によるウミグモ幼体の寄生率、平均寄生強度の変動パターンは類似しており、常法による小型の幼体を見落としの影響も小さいことから、現行の愛知県水産試験場が実施しているウミグモ幼体の寄生状況のモニタリング法は、十分役割を果たしていることが確認された。また、ウミグモ初期幼体の動向を見ることによって、春季から夏季のウミグモ幼体の成長速度、年間を通じた寄生期間中のウミグモ幼体の生残率を推定することができた。

## 要 約

知多半島東岸で、2015年4月から2016年3月まで、アサリに寄生したカイヤドリウミグモの幼体を肉眼で観

察（以下「常法」という）した後、常法で確認できなかった初期幼体を顕微鏡下で観察し、両者の結果を比較した。両法による寄生率、平均寄生強度の変動は類似したパターンを示した。春季から夏季にかけては、蛍光法でみられた寄生率に近い値が常法で1カ月後に出現することから、幼生がアサリに寄生してから肉眼で確認できる大きさに成長する期間は約1カ月であると考えられた。同じ時期に、蛍光法でみられた平均寄生強度と1カ月後に常法でみられた平均寄生強度は、最も低下した場合でも0.3であったことから、幼生がアサリに寄生している期間の生残率はかなり高いと考えられた。常法で小さい体長の幼体を見落とす影響は小さいと考えられたため、現在実施している本種の監視体制に大きな問題はないことが確認された。

## 謝 辞

冬季には夜間のアサリ採取作業に尽力していただくなど、通年にわたり試料の採取、カイヤドリウミグモの寄生状況モニタリング調査に協力していただいた、愛知県水産試験場栽培漁業グループの研究員各位に感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) 黒田伸郎・宮脇 大・石田俊朗・和久光靖 (2016) 二枚貝類有害生物対策監視調査. 平成27年度愛知県水産試験場業務報告, 112.
- 2) 村内嘉樹・岡本俊治・平井 玲・宮脇 大・山本直生・日比野学・川村耕平・原田 誠・岡村康弘・服部克也 (2014) 知多半島東岸におけるカイヤドリウミグモの生活年周期とアサリへの寄生動態に及ぼす水温の影響. 水産増殖, 62, 183-190.
- 3) 宮崎勝己・小林 豊・鳥羽光晴・土屋 仁 (2010) アサリに内部寄生し漁業被害を与えるカイヤドリウミグモの生物学. タクサ, 28, 45-54.
- 4) Yoshinaga T., Y. Kobayashi, M. Toba and Y. Miyama (2011) Development of a sensitive method for the detection of young larvae of the parasitic pycnogonid *Nymphonella tapetis* in Manila clam *Ruditapes philippinarum*. Fish Patho., 46, 38-41.