

京都府立海洋センター研究論文

第 5 号

平成12年 1 月

SPECIAL REPORT No. 5

Kyoto Institute of Oceanic and Fishery Science

January 2000

クロアワビの筋萎縮症に関する研究

中津川 俊 雄

Studies on Amyotrophia of Japanese Black Abalone,

Nordotis discus discus

by

Toshio NAKATSUGAWA

研究論文集 第5号 平成12年1月

京都府立海洋センター

SPECIAL REPORT No. 5, January 2000

KYOTO INSTITUTE OF OCEANIC AND FISHERY SCIENCE

Odasyukuno, Miyazu City, Kyoto 626-0052 Japan

目 次

Abstract	1
緒 論	4
第I章 発生状況	6
第1節 クロアワビ種苗生産府県における大量斃死の発生状況	6
第2節 中間育成中における発生事例	13
第II章 原因究明	14
第1節 病理組織学的検討	15
第2節 伝染性の検討	16
第3節 筋萎縮症原因体の海水中での活性維持	20
第4節 原因体の性状	21
第5節 年齢別感受性の検討	24
第6節 細胞培養の試み	25
第7節 血球初代培養を用いての筋萎縮症原因体の分離	28
第8節 他県産クロアワビ病貝からの原因体の分離	31
第9節 粗精製培養上澄の病原性	32
第10節 病貝の磨砕粗精製液の病原性の検討	33
第III章 対 策	34
第1節 化学的不活化法	34
第2節 塩素処理時間と不活化の関係	36
第3節 物理的不活化法	37
第4節 感染経路の解明	39
第5節 対症療法としての昇温処理	45
第6節 予防対策の試み	47
第IV章 総合考察	49
謝 辞	53
要 約	54
引用文献	56

Studies on Amyotrophia of Japanese Black Abalone, *Nordotis discus discus*

Toshio NAKATSUGAWA

Abstract

Seed-production of abalones for stock enhancement had started in the 1970's in Japan. The outbreak of mass mortalities due to a disease of Japanese black abalone *Nordotis discus discus* has been reported in several hatcheries since 1980's. The disease called amyotrophia was studied from the standpoints of epidemiology (Chapter I), etiology (Chapter II), and prevention (Chapter III). The results were summarized as follows.

Chapter I. Epidemiology

Section 1. Outbreak of mass mortalities of Japanese black abalone

In Japan outbreaks of mass mortalities due to a disease in Japanese black abalone have been reported in 14 prefectural hatcheries out of 22 hatcheries where abalone seed production was conducted. The first outbreak was reported in 1977 from Kanagawa Prefecture, and the number of cases increased after 1981. The average survival rates of juveniles in the hatcheries where the disease occurred was 51.8%. The mass mortalities were reported to occur from April to August, especially from May to June, when the water temperature ranged from 16°C to 25°C. The disease tended to cease when the water temperature reached 25°C or higher.

Mass mortalities broke out not only in black abalone but also in madaka-awabi *Nordotis madaka* and ezo-awabi *Nordotis discus hannai*. The signs of the disease were decline of appetite and attachment activity of abalones, and moribund abalones showed atrophy of foot muscle, some of them having incisions on the front margin of the shells.

Chapter II. Etiology

Section 1. Histopathological study

A mass mortality due to the above-mentioned disease occurred in juvenile black abalones in Kyoto in 1985, and diseased samples were submitted to a histopathological study. Many abnormal cell masses, spherical or oval, were observed in the nerve trunk and peripheral nerve tissues in the foot muscle in diseased abalones in progressed stages. But such cell masses were not observed in normal juvenile abalones. These abnormal cell masses seemed to be a tumor. Any candidate of etiological agents were not detected by microscopy in/around abnormal cell masses of diseased juvenile abalones.

Section 2. Infectious nature of the disease

In order to investigate infectious nature of the disease, an infection experiment was made by exposing uninfected juvenile abalones to a 0.22 μm -filtrate of diseased abalone homogenates or to the drain water of an aquarium containing diseased abalones.

The juvenile abalones exposed to the filtrate died on and after 30th day post-challenge. The survival rate of this group was 26% on 71th day. The abalones exposed to the drain water started to die after 40th day, and the survival rate was 75% on 71th day. Abnormal cell masses similar to those observed in naturally diseased abalones were formed in these artificially infected abalones. Negative control groups of juvenile abalones were not infected, showing no histopathological changes. These results suggest that the disease is infectious and the causative agent is filtrable. This disease was designated as amyotrophia of Japanese black abalone, because the most prominent sign of diseased juvenile abalones was atrophy of foot muscle.

Sections 3 and 4. Characteristics of the causative agent

The duration of infectivity of the causative agent in sea water was examined by experimental infection. A filtrate (0.45 μm)

of diseased abalone homogenate was added to sterile sea water and submitted to infection experiments after storage at 10°C, 18°C or 25°C for 5, 10 or 20 days. As a result, the infectivity of the agent was lost in 5 days at 25°C or 20 days at 18°C, but maintained for at least 20 days at 10°C. This result supported the fact that the disease ceased at 25°C or higher.

The causative agent was susceptible to acid (pH 3.0) and heating (50°C, 30 min.), but not to ether.

Section 5. Susceptible size of black abalone

Amyotrophia usually broke out in juvenile black abalone (0⁺-year old), especially in juvenile just after detached from a spat feeder plate with cultured diatom. In order to know susceptible size of the host to the agent of amyotrophia, the relation between age of abalone and susceptibility was examined by artificial infection experiments with 0⁺, 1⁺ and 2⁺-year old black abalones. As a result, abalones of all ages (0⁺, 1⁺ and 2⁺-year old) were apparently infected by intramuscular injection with filtered homogenate of diseased abalones. Younger abalones (0⁺ and 1⁺-year old) were also infected by water borne challenge, but 2⁺-year-old was not infected by water borne method. These results indicated that the susceptibility of black abalone to the causative agent decreased with age, or growth of black abalone.

Sections 6~8. Isolation of causative agent using primary abalone hemocyte culture

Isolation trials of the causative agent were made by using primary cell culture of Japanese black abalone hemocytes. The filtrates of diseased abalone homogenate were inoculated to abalone hemocyte culture. After 7~9 days of incubation, the inoculated primary cell culture formed flocked cell masses and detached from the bottom of culture flask. The some cytopathic effect (CPE) was observed in the flask which was inoculated with the filtrate and IUdR (5-iododeoxyuridine).

Virus-like particles (diameter : about 120 nm) were observed in the CPE-showing hemocyte culture by electron-microscopy. These virus-like particles seemed to be formed by budding, being absent in the nuclei or in the cytoplasm of cells.

The filtrates of diseased abalone homogenate from Kanagawa, Fukuoka and Shimane Prefectures and Nagasaki City also produced CPE in hemocyte primary cultures after 7~12 days of incubation, and some virus-like particles (diameter : about 120 nm) were observed in these CPE-showing hemocytes.

Sections 9 and 10. Virulence of purified virus-like particles

The medium of the CPE-showing hemocyte culture was centrifuged and purified virus-like particles were inoculated into healthy abalone juveniles. However, the disease condition was not produced by the inoculation with purified virus.

In a separate experiment, the diseased abalone homogenate was directly purified by ultra-centrifugation, and virus-like particles (diameter : about 150~200 nm) were observed in a band formed by the centrifugation. The pathogenicity of the purified particles was demonstrated by intramuscular injection, producing 80% mortality of juvenile abalones and the characteristic histopathological changes in 6 individuals out of 9.

These results seemed to indicate that the causative agent is a virus with diameter of 120~200 nm. But the pathogenicity of the virus purified from infected cell culture was not proved positively, and virus-like particles (diameter : 150~200 nm) were also observed in apparently healthy juvenile abalones in the control group. Thus the causative virus of amyotrophia cannot be decided.

Chapter III. Prevention

Sections 1~3. Inactivation of the agent by physical and chemical treatments

Susceptibility to physical and chemical treatments of the causative agent was examined by a bio-assay where juvenile abalones were exposed to the treated or non-treated filtrate of diseased abalone. The agent was inactivated by treatments with chlorine 500 ppm for 5 min, 50 ppm for 10 min, iodine 50 ppm for 10 min, or 70% ethanol for 10 min. The agent was not susceptible to heat treatment by 35°C for 1 min, but inactivated at 70°C for 1 min. It was susceptible to ultra-violet irradiation of $4.0 \times 10^3 \mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$.

Sections 4 and 6. The infection route of amyotrophia

The possibility of horizontal and vertical transmission of the disease was assessed in order to elucidate the route of infection.

Juvenile abalones were succumbed to the disease by horizontal exposure to drain water from a tank containing 2 year-old abalones surviving from amyotrophía or by cohabitation with a brood stock.

On the other hand, vertical transmission was thought to happen, because washing fertilized eggs lowered the incidence of amyotrophía among juvenile abalones. Additional investigations are required to establish effective disinfection of fertilized eggs.

Section 5. Heat treatment of affected abalones

Naturally diseased juvenile abalones were divided into two groups. Water temperature of a tank containing one group was raised from 19°C up to 26°C in 1 day, and water temperature in the other tank (control group) was left intact. Survival rate of experimental group was 57%, significantly different from that (41%) of control group.

Chapter IV. Discussion

The infectious diseases and parasites of oysters and other molluscan shellfish were shortly reviewed. Some detailed studies on viral diseases of oysters and other shellfish have been taken, but diseases of abalones had scarcely been studied in the world. Only recently one viral disease, namely retro-like virus disease, was reported from ezo-awabi in China in 1997.

The mass mortalities of Japanese black abalone have been confirmed to be due to amyotrophía, an infectious disease caused by a filtrable agent, in the present study. One virus, 120 nm or 120~200 nm in diameter, was suspected as the causative agent of the disease, however, determination of the true causative agent has been left for the future studies.

緒 論

四方を海に囲まれた我が国において、漁業生産物は重要な食料供給源であり、国民一人当たりのタンパク質供給量に魚介類の占める割合は50%弱もあり、他の先進国に比較して非常に高い比率になっている。一方、200海里規制や燃料油の高騰等による遠洋漁業の減少、そして資源量の変動等に伴う沖合漁業生産量の頭打ちの中、近年沿岸漁業の重要性が増大してきた。しかし、多様化した国民の沿岸中高級魚介類に対する需要のため漁獲圧が増大し、これら沿岸重要魚介類の資源量が減少傾向にある。このような状況の中で、国策として沿岸漁業の一層の振興を図り、沿岸重要魚介類の資源回復と漁場造成を目指して、沿岸漁場整備開発や栽培漁業、いわゆる「つくる漁業」の推進が図られている。栽培漁業では、人工的に魚介類の種苗を生産し、育成して漁場に放流するという手法がとられ、これら種苗生産の技術開発が大学、国立の水産研究所ばかりでなく、都道府県の水産試験場等で取り組まれた。国営の栽培漁業センターが建設され、昭和38年から瀬戸内海をモデル海域としてマダイ *Pagrus major*、クルマエビ *Penaeus japonicus*、ガザミ *Portunus trituberculatus* の事業規模での種苗生産、放流が展開された。昭和48年以降には種苗を量産する栽培漁業センターが、沿海40都道府県に順次建設され、さらに国営の栽培漁業センターの設置も進められ（16事業場）、現在ではマダイ、ヒラメ *Paralichthys olivaceus*、アワビ類、クルマエビ、ウニ類等をはじめ、約90種もの魚介類種苗が生産放流されている。

種苗生産の技術開発は、魚類では当初マダイ、クロダイ *Acanthopagrus schlegelii* およびヒラメが取り上げられ、1960年代にはこれらの種苗生産が可能となった。こうした技術開発の背景には、魚類の仔稚魚の餌となるシオミズツボムシ *Brachionus plicatilis* およびワムシの餌となる海産藻類（海産クロレラ *Nannochloropsis* sp.）の大量培養法の確立が大きく寄与している。甲殻類では、クルマエビの種苗生産技術の開発が1930年代から取り組まれ、1960年代には種苗の大量生産が可能となった。

アワビ類の種苗生産の技術開発は、1960年代に着手され、小規模ながらエゾアワビ *Nordotis discus hannai* を主体に人工種苗の生産が行われるようになった。「アワビ属の採卵技術に関する研究」として菊池・浮（1974a, 1974b, 1974c, 1974d, 1974e, 1975）や浮・菊池（1982）の精力的な研究が進められ、それらの成果として、母貝育成の基礎となる成熟生理の解明や産卵制御技術の開発により、1970年代になってエゾアワビ種苗の量産技術に目処が立った。そして、この量産技術を応用して、他の暖流系アワビ

（クロアワビ *Nordotis discus discus*、メガイアワビ *Nordotis gigantea*、マダカアワビ *Nordotis madaka*）の量産技術開発が西日本の沿海都府県の水産試験場で進み、北日本地域の沿海道県の栽培漁業センターにおいてはエゾアワビを対象に、千葉県以西および福井県以西の西日本地域の栽培漁業センターではクロアワビを主対象にして、産業的に極めて有用なアワビ種苗の量産が行われることとなったのである。量産放流が可能となり、その放流効果が実証された魚種では、受益者負担の観点から、漁業者自身が種苗を購入し、漁場に放流して、漁場を管理し、漁獲するという栽培漁業本来の形態の定着化が図られ、アワビはその最も代表的な栽培漁業対象種とされた。このため、現在では殆どの都道府県で、量産されたアワビ種苗は放流用あるいは中間育成用種苗として漁業者により購入され、直接放流あるいは漁業者自身の手で中間育成された後放流されるようになった。また、栽培漁業センターの運営主体が公益法人化され、法人にとっては種苗の有償配布に伴って販売収入をあげ、運営経費の削減が可能となるというメリットが生じた。したがって、漁業者からの種苗配布希望の多いアワビ類は各都道府県の栽培漁業センターにとって重要な収入源となり、量産目標数量を希望数量の増加に合わせ高く設定し、目標数量の達成が極めて重要な運営要素となっているのが現状であろう。

アワビ文献抄録作成委員会（1995）および水産庁・日本栽培漁業協会のとりまとめによる、平成4年度～平成8年度の栽培漁業種苗生産、入手・放流実績（全国）によれば、全国では1977年に8,107千個のアワビ類種苗が公営施設で生産され、7,074千個の種苗が放流された。Tables 1 および2に示したように、1980年には、クロアワビ8,593千個、エゾアワビ7,537千個、マダカアワビ196千個およびメガイアワビ96千個の計16,422千個の種苗が生産され、クロアワビ4,786千個、エゾアワビ5,437千個、マダカアワビ197千個およびメガイアワビ98千個の計10,518千個の種苗が放流された。1990年には、クロアワビ9,929千個、エゾアワビ17,077千個およびメガイアワビ2,087千個の計29,093千個の種苗が生産され、クロアワビ5,988千個、エゾアワビ14,863千個およびメガイアワビ2,035千個の計22,886千個の種苗が放流された。1996年にはクロアワビ8,334千個、エゾアワビ18,501千個、マダカアワビ5千個およびメガイアワビ4,103千個の計30,943千個の種苗が生産され、クロアワビ6,978千個、エゾアワビ16,334千個、マダカアワビ1千個およびメガイアワビ3,653千個の計26,964千個の種苗が放流された。当初、種苗生産数量は年々増加する傾向にあったが、1984年以降は合計30,000千個前後で推移している。種類別にみると、エゾアワビの種

Table 1. Number of abalone seeds produced in hatcheries in Japan from 1980 to 1996

Year	Black	Ezo	Madaka	Megai	Total
1980	8,593	7,537	196	96	16,422*
1981	8,515	9,223	73	335	18,146
1982	7,681	11,219	31	337	19,268
1983	10,911	14,764		518	26,193
1984	12,650	14,860		1,588	29,098
1985	9,254	14,985	17	2,384	26,640
1986	11,225	15,398	54	3,018	29,695
1987	11,849	15,932	40	2,950	30,771
1988	10,139	16,034		2,366	28,539
1989	11,501	17,022		2,661	31,184
1990	9,929	17,077		2,087	29,093
1991	9,652	17,816	332	2,316	30,116
1992	9,389	17,944	189	1,803	29,325
1993	7,514	17,980	324	2,345	28,163
1994	7,525	19,486	15	3,342	30,368
1995	16,839	18,908	1	5,031	40,779
1996	8,334	18,501	5	4,103	30,943

Black: *Nordotis discus discus*, Ezo: *Nordotis discus hannai*, Madaka: *Nordotis madaka*, Megai: *Nordotis gigantea*.

* $\times 10^3$ individuals

苗生産数は1984年以降も増加し続け、1994年には19,486千個に達した。一方、クロアワビでは1995年の値を除いて1984年以降はやや減少傾向にある。しかし、アワビ文献抄録作成委員会および農林水産省統計情報部によれば、全国におけるアワビ類の漁獲量は、Fig. 1のように、1970年に6,466トンの漁獲を最高にして、減少傾向となり、1980年

Table 2. Number of abalone seeds released in Japan from 1980 to 1996

Year	Black	Ezo	Madaka	Megai	Total
1980	4,786	5,437	197	98	10,518*
1981	6,138	5,611	56	269	12,074
1982	5,005	6,908	63	278	12,254
1983	6,018	11,888	5	423	18,334
1984	5,747	11,189		1,447	18,383
1985	6,075	10,668	36	1,943	18,722
1986	6,941	11,269	12	2,219	20,441
1987	7,235	12,604	35	2,276	22,150
1988	6,050	12,465		1,795	20,310
1989	7,195	12,820		2,400	22,415
1990	5,988	14,863		2,035	22,886
1991	7,162	16,607		2,070	25,839
1992	6,525	18,416	199	1,725	26,865
1993	5,774	15,603	270	2,215	23,862
1994	4,630	16,549	35	1,864	23,078
1995	5,365	16,367		3,203	24,935
1996	6,976	16,334	1	3,653	26,964

* $\times 10^3$ individuals.

には4,878トン、1990年には3,353トン、1991年には3,066トンと1970年の半分以下となってしまった。さらに、1995年には2,000トンを超えて、1996年には1,941トンにまで減少しているのが現状である。

クロアワビを量産規模で種苗生産しているのは22都府県あるが、種苗生産数と種苗放流数を比較してみると、特にクロアワビにおける数字に大きな差異があることが判る(1980年～1996年の平均放流数量/同平均生産数量=60.4%)。

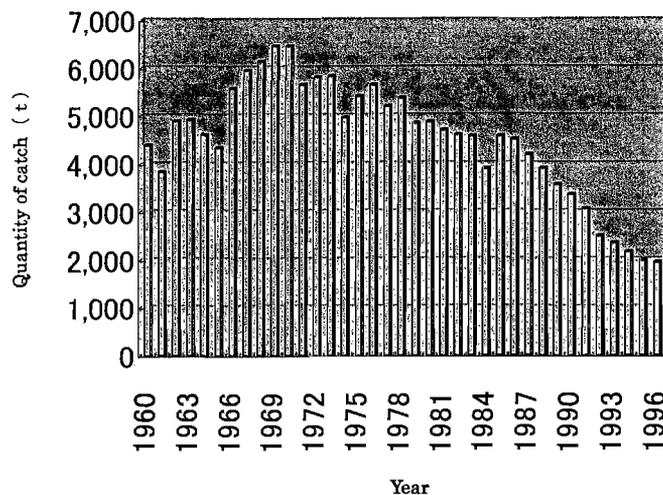


Fig. 1. Changes in catch of abalones in Japan from 1960 to 1996.

ある年の生産稚貝がそのまま放流に回ることはなく、一定の中間育成期間を経て放流されることが多く、府県によっては放流が翌年になることも多い。そのため、同一年の種苗生産数量と放流数量をそのまま比較することは難しい。しかし、クロアワビにおける大きな差異は、西日本を主としたクロアワビ種苗生産13府県において、種苗生産および中間育成過程の水温上昇期に大量斃死が発生していることと大いに関係があると思われる。すなわち、水温上昇期の大量斃死が過去に発生した、これら13府県の栽培漁業センターにおけるクロアワビ稚貝の被害（種苗生産数量に対する大量斃死終期の生残数あるいは中間育成終了時の生残数または放流実績の割合）は、単純平均で50%程度になっているからである。

1970年代終期頃から1980年代にかけ、クロアワビの種苗生産・中間育成過程の5月から7月の水温上昇期において稚貝の大量斃死が西日本の沿海府県を中心に発生するようになり、生残率が50%前後から5%程度にまで低下する事態が生じた。府県によっては生産目標数量に達しない事態も発生し、被害の大きな栽培漁業センターを中心に、水温上昇期の大量斃死問題として大きく取上げられるようになった。しかし、病理組織学的検査等の斃死原因についての検討は殆どなされず、病貝からの細菌分離や外観症状の観察、餌料と斃死との関係を調べた事例があるのみであり、対策としては飼育条件の改善等が試みられた。

著者は、1985年に京都府下の丹後半島にある漁港内で海面中間育成中のクロアワビ0年貝に発生した高率な斃死を伴う疾病の発生状況調査および瀕死貝の病理組織学的観察を行う機会に得た。

その後、著者は、このようなクロアワビ稚貝の大量斃死が京都府栽培漁業センターを含め、西日本の多くの栽培漁業センターで発生し、大きな問題となっていることを知り、クロアワビ稚貝の水温上昇期における大量斃死問題の研究に着手した。その結果、これらの大量斃死が疾病によるものであることが明らかになり、筋萎縮症と名付けた本疾病の原因および対策についていくつかの知見を得たので、以下にこれまでに著者が得た知見をまとめてみた。

第I章 発生状況

クロアワビの種苗生産および中間育成過程における水温上昇期の大量斃死が、クロアワビ種苗生産実施府県においていつ頃から発生していたのか、発生時の被害状況や症状、飼育状況と被害状況との関係等を把握するための調査を実施した。

第1節 クロアワビ種苗生産府県における大量斃死の発生状況

現在実施されているクロアワビの種苗生産、中間育成および放流までの流れについて、京都府栽培漁業センターでの事例を基に、その概要を述べると以下ようになる。

採卵用の親貝は、通常天然で漁獲された成貝をセンターの親貝専用水槽に収容し、乾燥コンブやワカメを与え育成する。生殖腺が成熟してくる10月に生殖腺の外観観察で雌雄に分け、成熟の進んだ個体を採卵、採精に供する。10月下旬から11月にかけて、設定採卵日の前日に雌雄別に採卵、採精用水槽に収容し、止水でエアレーションのみにして1晩おく。翌朝、紫外線照射海水を水槽にかけ流す。約1時間後には雄が反応して、白色の精液を呼水孔から放出し始め、その30分間～1時間後に雌が反応し、薄緑色の卵を呼水孔から放出し始める。卵をミューラーガーゼで作ったネットで回収し、汚れを軽く洗った後、精液を含む海水を加えて受精させる。余分の精子を洗い流した受精卵は、無通気の孵化水槽に収容して孵化させる。翌日、孵化水槽の上層にパッチ状に浮遊している孵化幼生をサイフォンで吸い取り、幼生飼育水槽に収容する。最近では幼生飼育水槽は弱い流水飼育とすることが多い。付着期幼生に変態する頃に、予め付着珪藻を繁殖させておいた塩ビ製波板をセットした稚貝飼育水槽に幼生を移して採苗する。稚貝飼育水槽は流水で、強く通気をし、付着珪藻の繁殖を促す。採苗後幼生は付着珪藻を摂餌して成長し、翌年3～4月に殻長が5～7mmになった頃に波板から剝離される。以前は1個ずつ筆で剝離していたが、現在ではアルコールで麻醉剝離する。剝離した稚貝は、稚貝飼育水槽内に釣り下げた、モジ網地で作った網カゴに収容して、流水カゴ飼育する。餌は市販のアワビ用配合飼料を用いる。京都府では剝離以降放流サイズまでの飼育期間を中間育成とするが、県によっては殻長10～15mm程度まで育成し、育成稚貝を漁業者に販売し、購入した漁業者が放流サイズまで育成する期間を中間育成とすることもある。また、剝離以降漁業者に販売するまでの育成期間を中間育成とする場合もある。いずれにしろ、剝離稚貝をカゴ飼育する段階を中間育成ということが多く、餌は配合飼料と天然海藻（アオサ、ワカメ等）あるいは乾燥コンブである。京都府では通常殻長25～30mmサイズを放流適サイズとしており、剝離後約1年間は中間育成を行う。剝離翌年の5月に府下沿岸に設置しているアワビ用人工漁礁あるいは水深の浅い所にある天然岩礁域に放流する。

クロアワビの種苗生産・中間育成を実施している西日本各県では、以前より水温上昇期の大量斃死が上記の波板飼

育期における稚貝剝離前後の時期あるいは中間育成期に発生し、稚貝のこのような大量斃死が種苗量産上の問題で、斃死対策が今後の重要な課題であると言われてきた。そこで、クロアワビの種苗生産・中間育成の過程における大量斃死の発生状況について取りまとめた。

材料および方法

各府県の栽培漁業センターや水産試験場等の事業報告書あるいは業務報告書において、クロアワビ種苗の斃死についての記載がある事例を探し、発生状況、症状や斃死率について、各県毎に且つ大まかな発生年代順に整理した。これらの報告集の中で、筋萎縮症によると思われる斃死事例については特に注意して取上げた。なお、事業報告書あるいは業務報告書が印刷製本されていない場合や他県に配布されていない場合もあり、クロアワビの生産を行っているすべての府県の情報が網羅されているわけではない。

結果

各県の報告書に大量斃死の記載があった年を、年代順にTable 3にまとめた。

また、各県における発生状況は以下のとおりであった。

神奈川県

種苗生産期におけるアワビの斃死事例の最初の記載は、1977年の神奈川県水産試験場、1978年の神奈川県水産試験場、1978)。しかし、この事例では、波板飼育以降、剝離稚貝での斃死が多いとの記載があるものの、斃死貝の症状や水温等の記載がない。原因については、細菌性疾患と仮定して調査研究が進められたが、細菌性疾患ではなく、他の要因が関与していると報告された(沼田ら、1982)。翌年には飢餓との関係で調査が行われているが、その後の業務概要には、この大量斃死の原因究明に関する調査研究についての記載はない。比較的最近になって、同県で生産されて

いるクロアワビおよびマダカアワビの斃死状況が改めて検討され、水温上昇期のクロアワビの斃死は病理組織学的にみて、筋萎縮症によるものであると報告されている(長谷川ら、1994)。

島根県

島根県栽培漁業センターでの事例について、奥田・山本(1978)は、1978年2月に波板から剝離したクロアワビ稚貝の中間育成において斃死個体が続出し、育成歩留まりは61%であったと報告した。以降、毎年中間育成過程における水温上昇期の剝離稚貝の大量斃死の発生が記載されている。奥田ら(1984)は、1984年4月下旬からクロアワビおよびマダカアワビにおける大量斃死が発生し、クロアワビの剝離後の歩留まりは5.7%で、マダカアワビのそれは46.4%であったと報告した。また、1987年10月初旬から1988年5月までの採卵用母貝の斃死事例について、日本獣医畜産大学での病理組織学的な診断の結果、筋萎縮症の可能性が指摘されたとの記載がある(奥田ら、1989)。その後も、クロアワビおよびマダカアワビの剝離稚貝の中間育成における筋萎縮症による大量斃死が継続して発生し、低い歩留まりが続いたが、平成6年採卵群からは筋萎縮症に強いとされるメガイアワビのみを生産しているという(清川・川上、1997)。

和歌山県

難波・坂本(1986)は、和歌山県栽培漁業センターでの1979~1984年におけるアワビの種苗生産の概要を述べ、その中でクロアワビとマダカアワビでは剝離稚貝の育成中5月を中心に大量斃死がみられたと記している。坂本ら(1986)によれば、1985年においても同様に剝離後の稚貝の斃死が主に4~5月と8~9月に集中し、クロアワビでの斃死率は約60%、マダカアワビのそれは約90%であったという。

愛知県

昭和53年度愛知県栽培漁業協会業務報告(1980)によれば、1979年6月下旬からクロアワビ剝離稚貝において斃死がみられ始め、貝殻の一部が欠け、足で付着する力がなく、仰向けになったまま死んでいく個体が増加した。その後、正式な報告はないが、少なくとも最近数年間は筋萎縮症によると思われる大量死が発生している(宇野将義、私信)。

静岡県

後藤ら(1982)は、静岡県栽培漁業センターで中間育成中のクロアワビ稚貝において1981年5月上旬から6月上旬頃に大量斃死が発生したことを報告し、症状等について詳細な記載を行っている。すなわち、斃死が落ち着いた8月中旬までに剝離稚貝の82%が斃死し、発生時の水温は

Table 3. First records on mass mortalities of Japanese black abalone in hatcheries in various prefectures of Japan

Year	Prefecture
1977 (Showa 52)	Kanagawa
1978 (Showa 53)	Shimane
1979 (Showa 54)	Aichi, Wakayama
1981 (Showa 56)	Shizuoka, Fukui
1982 (Showa 57)	Tokushima, Tottori, Mie
1983 (Showa 58)	Niigata, Kagoshima
1984 (Showa 59)	Kyoto, Fukuoka
1985 (Showa 60)	Ehime
1986 (Showa 61)	Miyazaki, Yamaguchi

18~21°Cであり、症状として摂餌量、付着力および移動性の低下並びに貝殻外唇部における欠刻の出現率の増大(10~30%)を挙げた。さらに、斃死原因の検討を行い、剥離作業や飼育方法には問題がなく、餌料の種類による死亡率の有意差はないとした。しかし、疾病の関与を裏付けるような発見はなく、水質条件が関与した疑いが強かったとしている。その後も、昭和62年度静岡県栽培漁業センター事業報告に至るまで、クロアワビの剥離稚貝における大量斃死の発生が継続したことが記載されている(町田ら、1988)。柳瀬ら(1984)は、昭和58年度事業報告の中で、1983年5月下旬から8月上旬中に発生した大量斃死事例について触れ、斃死個体では軟体部は萎縮し、貝殻の一部が欠刻した個体が多いと述べている。また、貝殻の欠刻した異常貝の実態調査を実施し、欠刻貝が斃死貝の10~30%を占め、欠刻部位は腹部側が圧倒的に多いとした(柳瀬、1984)。柳瀬・野中(1985)は、クロアワビ稚貝の斃死についての報告の中で、殻長と湿重量との関係を調べ、大量斃死した稚貝はやせていると述べた。また、同時に種苗生産、育成したメガイアワビでは斃死は発生しなかったと報告し、以降もメガイアワビでの斃死の発生報告はなかった。昭和63年度以降の事業報告では、クロアワビについても大量斃死についての記載はなかった。

福井県

中島・安田(1982)は、昭和56年度福井県栽培漁業センター事業報告書の中で、1981年5月中旬頃から摂餌がおとろえ仰向けになるクロアワビ稚貝が現れ、仰向けになった稚貝はその後死亡すると記載した。水槽内に繁茂した珪藻の種類によって出現状況が異なるとの記載もあった。関連調査として、貝殻の欠損についての調査を実施しており、剥離稚貝の飼育過程で生貝、死貝共に貝殻の先端が鋸の歯のように欠損している個体が観察されるとした。翌年度の事業報告書にも同様の記載があった。高垣ら(1987)は、1984年5~6月の水温上昇期に剥離稚貝の減耗があり、23.0~88.4%(平均59.9%)と低い生残率になったと報告した。彼らは、減耗原因としてコペポダの発生が関与していると推測した。1986年においても、水温上昇期の5~6月に剥離稚貝の斃死がみられ、取り揚げ出荷までの各水槽の生残率は11.8~92.1%(平均57.4%)であった(高垣ら、1989)。高垣・大江(1989)によれば、1987年6月中旬以降弱った個体や死亡した個体が大部分の水槽で見られた。1988年にもクロアワビ稚貝で斃死がみられ、平均生残率は53.0%で、原因の一つに餌料が考えられている(高垣・大江、1991)。また、1989年には剥離稚貝の飼育方式を、稚貝を水槽内に張ったネットに収容するネット飼育とネットに収容しないで直接水槽に収容する方式に分けた

ところ、直接収容する方式(直飼い飼育)の生残率はネット飼育の場合より10~25%良い結果となった(高垣・大江、1991)。大江・石本(1992、1994)並びに大江・嶋田(1994)によれば、1990年~1992年まではクロアワビの剥離稚貝での直飼い飼育で80%前後の平均生残率を示した。しかし、1993年には直飼い飼育で水温上昇期における大量斃死が発生し、水温20°Cの7月上旬より斃死が目立ち始め、摂餌量や付着力の低下、貝殻の欠損がみられ、9月上旬まで続いた(大江・鳥居、1994)。この年の取り揚げまでの飼育期間中の各水槽の生残率は21.9~98.4%(平均76.7%)であった。そして1994年にも6月下旬頃から斃死が目立ち始め、付着力が低下し、摂餌量が減少し、稚貝が少しずつ斃死していく傾向が取り揚げまで続いた。この年の飼育期間中の生残率は29.5~74.9%(平均51.7%)であり、報告書の中で初めて筋萎縮症による大量死と表現されている(大江・石田、1995)。

徳島県

昭和57年度徳島県栽培漁業センター事業報告書によれば、1982年に剥離後のクロアワビ稚貝の生残は悪く、7月までの生残率は71%であった(三浦ら、1983)。1983年の場合は4月下旬頃から瘦せて斃死する個体が目立ち始め、OTCによる薬浴や注水量の増加などの飼育環境の改善に努めたが効果はなく、6月末までの生残率は約50%であった(三浦ら、1984)。その後は、毎年度の事業報告書に剥離1カ月後から6月あるいは7月まで斃死が発生したとの記載がある。1995年にも例年見られる水温上昇期(4~7月)の斃死が多く、中間育成期間中(4~9月)の生残率は71%であった(東條ら、1997)。

鳥取県

増谷ら(1983)は、昭和56・57年度鳥取県栽培漁業試験場事業報告書において、1982年5月に1981年10月採苗分のクロアワビ剥離稚貝の斃死が目立ち、5月下旬での剥離からの歩留まりは約60%であったと報告した。1981年11、12月採苗分は剥離直後の斃死が目立ち、問題点として籠飼育中の水温上昇期の斃死を挙げていた。翌1983年の5、6月にも水温が15°C以上に上昇した後に斃死が増加した(金沢ら、1984)。1984年には稚貝の収容密度を低くしたり遮光を十分にすることで、水温上昇期の大量斃死をおさえることができたが、貝殻の欠刻した稚貝が現れるようになった(金沢ら、1985)。また、1988年には5月中旬頃から小サイズの稚貝の斃死が目立ち、7月までに約1/3が斃死し、要因として波板飼育期からの餌料不足の影響が挙げられた(金沢ら、1989)。

三重県

昭和57年度三重県栽培漁業センター事業報告書によれ

ば、1982年2月下旬から5月上旬にクロアワビ稚貝の波板からの剥離を実施したが、剥離後前年度(1981年)同様斃死が多く発生した(徳沢, 1983)。同センターでは1983年4月中旬～7月上旬にも剥離稚貝の大量斃死が発生し、生産計画を達成できなかった(柴原ら, 1984)。以降、平成8年度三重県栽培漁業センター、三重県尾鷲栽培漁業センター事業報告書までの毎年度の事業報告書には、クロアワビ剥離稚貝における4～8月の大量斃死(夏期の大量斃死と記載)の発生が記載され、大きな被害が報告されている。なお、岡田(1998)は、平成9年度地域特産種量産放流技術開発事業報告書(アワビ類種苗大量斃死要因調査)において、三重県栽培漁業センターでのクロアワビの夏期大量斃死事例でえられた衰弱稚貝は筋萎縮症罹病貝であることが病理組織学的に確認されたとしている。

新潟県

昭和57年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書によれば、クロアワビ剥離稚貝の網カゴ収容後は、前年と同様に、1983年8月の高水温期にかけ斃死が多かった(石川ら, 1984)。エゾアワビの生産も同時に行われたが、斃死があったとの記載はない。1984年には波板飼育の後期および網カゴ飼育に移行後の夏期高水温時に前年同様多くのクロアワビが斃死し、斃死率は49%あるいは44%であった(石川・金子, 1985)。昭和59年度同報告書によれば、1985年には網カゴ飼育中に大量斃死が発生し、剥離後12月末までにエゾアワビ稚貝で52.4%(例年は5～20%)、クロアワビでは96.1%(例年は30～40%)が斃死し、稚貝の斃死は4月上旬から8月末まで続いた(石川・金子, 1987)。また、例年はほとんど斃死のみられない、越年させたクロアワビ1年貝にも4月上旬から5月中旬に大量斃死が発生し、斃死率が一部では50%に達した。病貝は、網カゴ上部に這い上がり、相互にダンゴ状に付着し、シェルターの表側へ移動し、落ち着きのない行動を示し、更には摂餌量が極端に低下し、これらの症状がみられた数日後に斃死が発生した。1986年にも5月中旬から7月下旬まで斃死が続き、8月上旬までに約46%が斃死した。水温の点からみると、13°Cを超えた時から斃死が多くなり、15°Cを超えると急激に増加した(石川・金子, 1988)。1987年5月に波板から剥離し、網カゴに収容したクロアワビ稚貝は、6月10%、7月5%、8月4%と例年と同様の傾向で斃死し、11月末までに30.5%の斃死がみられ、斃死した稚貝は小型が多く、軟体部は痩せていた(山口・金子, 1989)。昭和63年度同報告書にも、山口・金子(1990)による同様の記載があった。木村・村川(1992)はマダカアワビとメガイアワビの種苗生産試験を実施し、マダカアワビでは1991年5月に波板から剥離して、網カゴ飼育に移行後水温が

17°Cを超えた6月に斃死が発生し、病貝は肉質部が痩せ、シェルターへの付着が低下し、殻に欠損が見られる等大量斃死時のクロアワビの症状と類似した症状を示した。また、メガイアワビでは斃死が起きなかったという。1992年にもマダカアワビの剥離稚貝において水温の上昇とともに7月中旬から斃死が見られ、9月上旬までに同様の症状を呈して90%が斃死した(木村・村川, 1993)。

鹿児島県

昭和56年度鹿児島県水産試験場事業報告によると、クロアワビ剥離稚貝が7～9月の高水温期に弱く、剥離から出荷までの歩留まりは17.3%であったとあるが、斃死発生期の水温や症状等には触れていない(山口ら, 1982)。昭和58年度の水試事業報告では、1983年6～8月に中間育成中のクロアワビ稚貝の20%程度が斃死したことを報告している(山中ら, 1984)。昭和62年度水試事業報告では(松元ら, 1988)、例年中間育成時の初夏から夏期にかけて大量斃死がみられるが、1987年にはこの時期の斃死は殆どなく、10月下旬から11月中旬および1988年2月下旬から3月上旬に大量斃死がみられたと報告されている。1989年には5月中旬以降水温の上昇につれ斃死個体が目立つようになり、特に6月中旬頃の24°Cに達した時期には4～10%/日の斃死があり、全滅に近い水槽もみられた(山中ら, 1991)。また、1990年にも5月中旬の水温が20°Cを越える頃より稚貝の斃死が急増し、10月中旬まで続き、斃死対策として底注水、注水量の増加、水槽掃除等を頻繁に行ったが効果は認められなかったという(山中ら, 1992)。同様の斃死状況は、1991年(山中ら, 1993)、1992年(山中ら, 1994)および1993年(山中ら, 1995)にも報告されている。山中ら(1994, 1995)の報告では、5月中旬頃の水温20°C前後から斃死が急増し、高水温期の8～9月頃からは減少し、10月下旬には斃死はほとんど見られなくなったと記載されている。平成6年度および7年度の鹿児島県栽培漁業センター事業報告によれば、1994年および1995年にもクロアワビの大量斃死が発生したことが窺える(山中ら, 1996, 1997)。

福岡県

佐々木(1994)は、平成5年度地域特産種量産放流技術開発事業報告書(あわび類大量斃死要因調査)の中で、福岡県においては1984年に初めて中間育成中のクロアワビ稚貝に大量斃死が発生し、生残率が22%であったと述べている。また、1980年から1983年までの中間育成中の生残率はいずれも50%以上であったが、1984年以降は、1986年の54.8%を除き、40%以下と低く、1991年には10%以下にまで低下した。1990年からはエゾアワビについても同様に中間育成が行われたが、1993年には4月から10月にかけて斃

死がみられ、10月の時点では生残率は40%以下となった。また、同報告書によれば、1992年の中間育成中にみられたクロアワビ罹病稚貝の病理組織観察を実施し、筋萎縮症の病変を確認している。

愛媛県

昭和60年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書(1986)には、クロアワビ種苗生産における問題点として平面飼育時の斃死と中間育成(殻長10~30mm)の歩留まりの悪さが挙げられている。昭和61年度同報告書(1987)によれば、1986年5月中旬頃(水温18°C)より剥離後の稚貝の斃死が目立ち始め、6月から7月に大量に斃死し、8月の高水温時には終息し、この間に剥離稚貝の60~70%が斃死したとされた。このような斃死は1987年の5月中旬から6月にかけての水温上昇期にも起こっている(愛媛県栽培漁業センター, 1988)。以降、毎年同様の斃死事例が報告され、1990年には、4月中旬(水温16°C)頃より付着力の低下した稚貝が見え始め、それ以降徐々に斃死が増加し、7月下旬(水温25~26°C)まで続き、この間の斃死率は48.6%であった。外観症状として筋肉の萎縮、殻の欠損および真珠層の着色が認められ、筋萎縮症が疑われている(愛媛県栽培漁業センター, 1991)。1991年には5月中旬より付着力が低下しシェルターから落下して斃死する個体が出始め、その後も斃死は8月中旬頃まで続いた(山崎・荒井, 1992)。更に1992年には5月上旬以降10月頃まで斃死が続き、剥離から10月の出荷までの生残率は僅か5.8%であった(久米ら, 1993)。その後も愛媛県栽培漁業センターにおいては、発生時期に多少の差異はあるものの、筋萎縮症によると思われる大量斃死が発生している(河本・荒井, 1994, 1995; 河本ら, 1997)。

宮崎県

宮崎県栽培漁業センターでは、剥離稚貝の斃死が1986年6月中旬の水温上昇期(水温が20°Cから22°Cに上昇する時期)と7月下旬から9月上旬の高水温期(水温25~28°C)に起こっている(河野・小金丸, 1987)。1988年においても、附着板飼育後半からの大量減耗が剥離後の平面飼育になっても続き、出荷までの平面飼育期間の生残率は15.7%であった。病貝の軟体部は痩せ、殻も脆弱な感じであったという(那須・杉田, 1990)。

山口県

山口県外海水産試験場では、1986年の生産において5月中旬までは順調な成育であったが、5月下旬からクロアワビ稚貝の摂餌量、付着力が徐々に低下し、斃死する状況が7月下旬まで続いた(由良野・国近, 1987)。病貝にはやせた個体が多く、殻の欠損があり、殻の内面に赤褐色部分が認められた。また、細菌検査の結果 *Vibrio* sp. に感染し

ていることが判ったため、対策として6月中旬からオキシテトラサイクリンによる薬浴を実施した。その効果かどうかは分からないが、8月上旬より殻欠損貝の殻の修復が見られるようになり、9月下旬には殻欠損部分が修復し、生残率は18.6%となった。斃死原因究明のため環境水、餌料および病気の面から検討が加えられ、餌料と病気の可能性が示唆された。翌1987年も同様の斃死が発生し、生残率は58.2%となった。この年には餌料および病気の検討がなされたが、明確な結果は得られなかった(由良野・国近, 1988)。この年からクロアワビ種苗生産の不足を補う意味で、エゾアワビが導入された。由良野ら(1989)は、1988年に斃死原因究明のため、餌料の比較試験と細菌感染試験等を実施し、直接餌料に起因するものではなく、細菌感染は二次的に起こったもので、摂餌低下、付着力低下、斃死にいたる一連の経過には、他の一次的な原因が関与するものと推定している。1989年6月中旬からクロアワビ剥離稚貝の斃死が増加し、9月に斃死は次第に終息したが、10月上旬における生残率は3.8%となった(水津・国近, 1990)。1990年より山口県ではクロアワビにかわりエゾアワビ主体の生産に入り、クロアワビは補助的の生産としたが、やはり長期にわたって少しずつの斃死が認められ、剥離収容時から7月中旬までの生残率は52.5%であった(水津・国近, 1991)。1991年はエゾアワビ、クロアワビとも飼育は順調で、クロアワビの生残率は97.6%であった(水津・国近, 1992)。しかし、1992年にはエゾアワビでは5月20日頃(水温17~18°C)より摂餌が不活発となり、6月上旬(水温19~20°C)に斃死はピークとなり、6月中旬(水温20~21°C)以降斃死数が次第に減少し、剥離からの生残率は66.0%になった。また、クロアワビでは5月10日頃(水温16~17°C)から摂餌不良となり、斃死は6月上旬がピークで剥離からの生残率は52.1%になった(水津・国近, 1993)。

京都府

昭和59年度京都府栽培漁業センター事業報告書によれば、1984年の5月下旬~6月上旬にかけてクロアワビ稚貝の原因不明の斃死が続き、剥離から出荷までの生残率は約33%であった(小倉, 1985)。1985年および1987年にも生残率に差はあるものの、同様に稚貝の大量斃死が起こっている(小倉, 1986; 岡部, 1988)。1988年にも4月下旬から7月にかけて稚貝の大量斃死が続いたが、一部の水槽で温調ポイラーによる加温飼育(25°C)を6月中旬以降行ったところ、自然水温群と比べ稚貝の回復がかなり早くみられ、斃死率もやや減少した(斃死率は約30%) (赤岩, 1989)。しかしながら、それ以降も依然として同じ病気によると思われる大量斃死が毎年発生している。

Table 4. Outbreak of mass mortalities and survival rate of Japanese black abalone in hatcheries

Year	Prefecture	Outbreak	Survival rate
1978	Shimane		61 %
1979	Shimane	June~July	56.1%
1980	Shimane	May~June	76 %
1981	Shimane	April~June	32 %
	Shizuoka	May~August	18 %
1982	Fukui		71.5%
	Shimane		78 %
	Mie		50 %
	Tokushima		71 %
1983	Tottori		60.4%
	Tokushima	April~June	50 %
	Kagoshima	June~August	80 %
1984	Niigata		51 %, 56%
	Fukui		59.9%
	Kyoto	May~June	33 %
	Tottori		69.8%
	Shimane	April~July	5.7%
	Mie	May~August	32.8%
	Shizuoka	April~August	55 %
	Tokushima		60 %
	Kagoshima		66.6%
	1985	Niigata	April~August
Kyoto		May~June	24 %
Tottori			83.9%
Shimane		May~June	40 %
Mie			59.8%
Shizuoka		April~August	71 %
Wakayama		April~May	40 %
Miyazaki		June~	39 %
1986	Niigata	May~August	54 %
	Fukui	May~June	57.4%
	Kyoto	May~June	60 %
	Tottori		88.1%
	Shimane	May~June	41.5%
	Yamaguchi	May~July	28.9%
	Mie		23.5%
	Shizuoka	April~	54 %
	Tokushima		59 %
	Ehime	May~August	24.4%
1987	Niigata	June~August	69.5%
	Fukui		47.4%
	Kyoto	April~July	70 %
	Tottori		95.0%
	Yamaguchi	May~June	58.2%
	Mie		70.4%
	Tokushima	~June	66.7%
	Ehime	May~	31 %
1988	Niigata	June~July	73.2%
	Fukui		53.0%
	Shimane		20.6%
	Yamaguchi	April~June	36.6%
	Tokushima		76.7%
	Ehime	May~August	39 %
	Miyazaki		15.7%
1989	Kyoto	April~July	51.3%
	Yamaguchi	May~September	3.8%
	Mie		54.5 %, 87.4%
	Tokushima		60 %
	Ehime	April~July	47.1%
1990	Kyoto		41 %
	Mie		24.5 %, 47.6%
	Tokushima		67.7%
	Ehime	April~July	45 %
	Kagoshima	May~	29.3%
1991	Kyoto	April~July	58.5%
	Mie		35.3%
	Tokushima		63 %
	Ehime	May~August	30.7%
	Kagoshima	May~	23.2%
1992	Fukui		76.7%
	Kyoto		77 %
	Yamaguchi	May~	57.2%
	Mie		48.5%
	Tokushima		69 %
	Ehime	May~	5.8%
	Kagoshima	May~	55.2%
1993	Fukui	July~September	70.7%
	Kyoto		43 %
	Tokushima	April~August	50 %
	Kagoshima	May~	61 %
1994	Fukui	June~September	51.7%
	Tokushima	April~July	88 %
	Kagoshima		66.4%
1995	Fukui		68.6%
	Mie		28.0%
	Tokushima	April~July	71 %
1996	Mie		36.6%

Table 4 に、各県の報告の中で生残率についての記載のあったものを、年代順にまとめて示した。

Table 4 の生残率を単純に平均することは、府県によって中間育成の設定期間が異なり、水温や飼育密度等の飼育条件が異なるため、あまり意味のあることではないが、単純に平均すると生残率は51.8%となった。

発生時期は、大まかな見方では4月から8月の水温上昇期であり、特に5月から6月にかけての時期に斃死のピークが現れた事例が多い。発生時期の水温は13~25°Cに集約された。

考 察

公営施設でクロアワビの量産規模での種苗生産を行っているのは、千葉県、東京都、神奈川県、福井県、静岡県、愛知県、三重県、京都府、兵庫県、和歌山県、鳥取県、島根県、山口県、徳島県、愛媛県、高知県、福岡県、長崎県、熊本県、大分県、宮崎県並びに鹿児島県の計22都府県である。このうち、千葉県、東京都、神奈川県、兵庫県、高知県、長崎県、熊本県並びに大分県の計8都県の栽培漁業センターの事業報告には、他県でみられるような水温上昇期の大量斃死は発生していないか、あるいは発生が公表されていない。しかし、それら以外の14府県では、毎年のように水温上昇期に大量斃死が発生し、単純平均で50%程度の被害を受けている。これは、アワビ類の種苗生産過程で、波板からの剝離後の中間育成期間中に生産数量が半減するということであり、生産コストが2倍になることを意味する。

大量斃死が発生したのはクロアワビばかりでなく、新潟県(木村・村川, 1992; 木村・村川, 1993)、神奈川県(長谷川ら, 1994)、島根県(奥田ら, 1984, 1985, 1989; 竹森・奥田, 1989; 勢村・奥田, 1990; 奥田・勢村, 1992; 奥田・清川, 1994, 1996)並びに和歌山県(難波・坂本, 1986; 坂本ら, 1986)では、マダカアワビ稚貝にも同様の水温上昇期の大量斃死が発生し、大きな被害が出ているケースもあった。さらに、新潟県(石川・金子, 1987)、福岡県(佐々木, 1994)並びに山口県(水津・国近, 1993)ではエゾアワビでも大量斃死の発生報告がある。一方、新潟県(木村・村川, 1992)並びに静岡県(柳瀬・野中, 1985; 柳瀬・川口, 1986; 柳瀬ら, 1987; 町田ら, 1988)の報告の中ではメガイアワビでは斃死が起きなかったとの記載がある。また、島根県では、1994年以降クロアワビの生産を止め、メガイアワビのみに切替え、以降大量斃死の発生はないという(清川・川上, 1997; 川上・若林, 1997)。したがって、アワビ類の中で大量斃死が発生するのは、クロアワビ、マダカアワビおよびエゾアワビ

の3種で、メガイアワビには発生しないと考えられる。

発生時期は、大体4月頃から高水温となる8月までであるが、斃死が9月上旬まで(福井県の事例; 大江・鳥居, 1994)あるいは10月中旬まで(鹿児島県の事例; 山中ら, 1992)続いたとの記載があった。新潟県の1992年におけるマダカアワビ稚貝の事例では、7月中旬から9月上旬まで90%の斃死があったとされた。発生時期の水温では概ね13~25°Cの範囲に入るものと考えられた。

クロアワビにおける大量斃死は、大部分の場合が波板からの剝離稚貝、すなわち0年貝に発生する。しかし、採卵用母貝において筋萎縮症によると思われる斃死事例が1例ではあるが報告されている(奥田ら, 1989)。また、1年貝における大量斃死事例も1例報告がある(石川・金子, 1987)。飼育中の採卵用親貝における大量斃死事例は京都府下ではない。しかし、剝離稚貝での斃死発生時期(水温上昇期)に、稚貝の症状と非常に良く似た症状(やせ、貝殻の欠刻および付着力の低下)を呈してクロアワビ1年貝が斃死する事例は京都府下の中間育成場においてもよくみられる(赤岩, 私信)。斃死率は低いものの、1年貝では同様の斃死が発生するものと推定される。一方、漁場に放流された稚貝や1年貝において大量斃死が発生したとの報告は全くないが、放流貝の生残率が低くなったという話はある。

衰弱・斃死するクロアワビ稚貝の症状については、静岡県で詳細な観察がなされている。後藤ら(1982)は、摂餌量、付着力および移動性の低下並びに貝殻外唇部における欠刻の出現率の増大を挙げた。また、柳瀬ら(1984)は、軟体部の萎縮と貝殻の一部の欠刻を挙げた。福井県においても同様の症状が観察されている(中島・安田, 1982; 大江・鳥居, 1994)。新潟県のマダカアワビの事例について、クロアワビの場合と類似し、肉質部の痩せ、付着力の低下と貝殻の欠損が観察されている(木村・村川, 1992)。山口県のクロアワビの事例では、由良野・国近(1987)は、摂餌量、付着力の低下、やせた個体の多さ、貝殻の欠損および貝殻の内面の赤褐色部分の存在を指摘した。したがって、摂餌量と付着力の低下、貝殻の欠刻および軟体部の痩せが、アワビ3種に共通した症状と考えられた。

これらクロアワビ稚貝における大量斃死が同一の疾病によるものかどうかは、非常に重要な問題である。残念ながら、1977~1989年にかけての大部分の発生事例では、大量斃死中の斃死貝あるいは衰弱貝の病理組織検査が全くなされていなかった。外観的な症状の観察や斃死貝からの細菌分離の試みがなされたに過ぎず、現在筋萎縮症と仮称される疾病がいつ頃から発生していたのか、確たる証拠はない。しかし、静岡県や福井県での1980年代当初の事例のよ

うに、詳細な貝殻についての外観観察や摂餌状況、軟体部のやせた状態等の外観症状の記載から、本症に極めて良く似た症状であることが判る。また、斃死の発生時期が水温上昇期の春から夏にかけてであるという点も共通している。後述するように、京都府の中間育成期のクロアワビでの大量斃死事例について著者らが検討し（中津川ら、1988）、筋萎縮症という病名を暫定的に提案した（中津川、1991）。その後、この病名は一応市民権を得たようで、一般的に使われるようになった（日本魚病学会、1996）。これに平行するように、すなわち1980年代の末頃からは筋萎縮症を念頭にいた症状の記載がなされるようになってきた。

1987年の鳥根県の事例では、病理組織学的な検討が加えられ、筋萎縮症の可能性が指摘されている（奥田ら、1989）。また、神奈川県（長谷川ら、1994；桃山、1994）、三重県（岡田、1998）および福岡県（佐々木、1994）では、1993年以降に筋萎縮症の存在が病理組織学的に確認され、更にこれらの県における過去の大量死も本症によるものと推定された。京都府および山口県では病理組織学的な検討の結果、少なくとも1989年以降の大量死は筋萎縮症によるものと判断され、それ以前の大量死も本症によるものであろうと推察された。以上のように、クロアワビ種苗の水温上昇期の大量死が本症によるものとの証拠が次々に重ねられている。

なお、最近著者らは、神奈川県、三重県、京都府、鳥根県、山口県、福岡県および長崎県におけるクロアワビ稚貝の大量死事例における病貝の病理組織学的な検討を行い、いずれの病貝にも本症に特有の病変が認められることを明らかにした（桃山ら、1999）。

第2節 中間育成中における発生事例

1985年に京都府竹野郡網野町内のY漁港内の海面中間育成施設でクロアワビ稚貝を育成中に高率の斃死を伴う疾病が発生した。著者が、初めてクロアワビ稚貝の水温上昇期の大量斃死に遭遇し、研究に着手する発端となった事例である。

材料および方法

1984年秋に京都府栽培漁業センターで採苗され、陸上水槽で飼育された平均殻長約15mmのクロアワビ稚貝を、1985年6月20日にY漁港内で最も潮通しの良い地点（水深6m）に設置した海面中間育成施設に収容し、同年9月30日まで飼育した。育成施設は10個の網カゴ（80×80×40cmの野菜カゴの内側に4mm目のネットを張ったもの）を延縄式に海面下3mに垂下したもので、その内部には

塩ビ製黒色波板（70×35cm）を2枚ずつシェルターとしていれ、1カゴ当たり稚貝2,000個体、合計20,000個体を収容した。育成期間中、1週間に1回アオサを餌として与えて、この際水温を測定した。期間中の6月25日、7月5日、7月9日、7月19日、8月8日および8月30日に死亡個体の計数と除去を行った。また、7月12日には取上げられた衰弱および死亡貝の症状の観察を行った。育成終了時の9月30日には死亡個体および生残個体の計数を行った。なお、網カゴの交換は期間中に1回実施した。

結果および考察

Fig. 2に、各調査月日間における1カゴ当りの日間平均死亡数の変化と育成期間中の水温（海面下3m）の変化を示す。

6月25日（水温19.8℃）には網カゴ10個中5個を取上げ、様子を見た。シェルターから脱落し仰向けになって衰弱した瀕死の稚貝や死亡した稚貝が多くみられ、297個体の稚貝を除去した。7月5日（21.8℃）には付着力の低下した稚貝が多く、摂餌量も低下しており、9カゴから合計1,936個体を瀕死もしくは死亡貝として取上げた。7月9日（21.9℃）および7月19日（23.8℃）にはすべてのカゴを取上げたところ、それぞれ1,220個体および1,671個体の

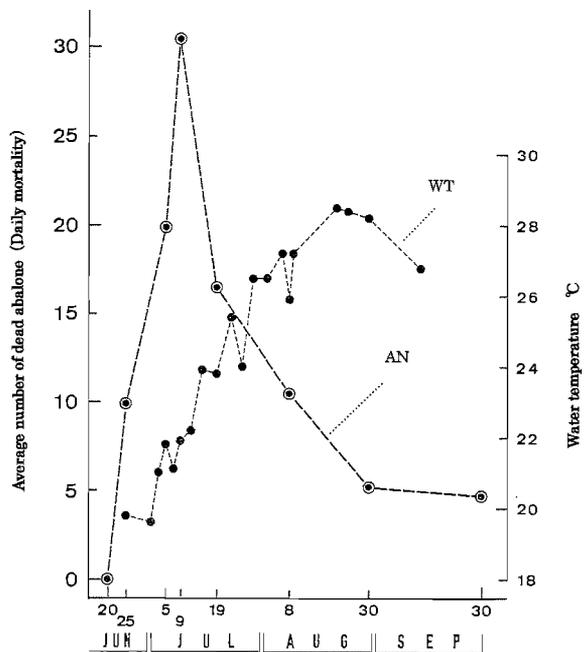


Fig. 2. Changes in average number of dead juvenile abalones per a day and water temperature. AN: average number of dead juvenile abalones per a day. WT: water temperature.

死亡稚貝を数えた。7月19日までの累積死亡数は5,124個体に上り、累積死亡率は25.6%であった。その後、死亡数は減少する傾向を示したが、7月20日から8月8日(25.9°C)までに2,103個体、8月9日から8月30日(28.3°C)までに1,142個体、また8月31日から育成終了時の9月30日までに1,455個体が死亡した。中間育成の開始から終了までの累積死亡数は9,824個体となり、累積死亡率は49.1%に達した。

Fig. 2 から判るように、1カゴ当りの日間平均死亡数は7月6日から7月9日までの間に30.5個体と最大値を示し、その後は急速に減少した。水温との関係では、日間死亡数は水温が22°Cまでは増加するが、水温が23°Cを越えると減少し始め、さらに水温が上昇するに伴って減少する傾向を示した。

一方、水温が25°Cに上昇した7月下旬には症状が回復傾向にある稚貝もみられ始め、8月下旬には症状の回復した稚貝が増加し、育成終了時には外見的な異常を示す貝は認められなくなった。

7月12日にサンプルとして取上げた瀕死貝(平均殻長16.5 mm, 平均体重0.74 g)を実体顕微鏡下で検査したところ、外套膜と腹足の萎縮・後退(Fig. 3)、貝殻辺縁部の欠刻(Fig. 4)および欠刻部分の貝殻内側の赤褐色化が各稚貝に共通してみられた。貝殻内側の着色部を顕微鏡下で観察すると、細菌、原生動物、線虫およびゴミ等が雑多に混在していた。また、症状の回復した個体では貝殻辺縁の欠刻部の内側から薄い貝殻の再生が認められた。後述するように、罹病貝の組織学的検査から、これらは筋萎縮症によるものであると判断されたが、この時点では原因については全く不明であった。

1983年および1984年に京都府舞鶴市内のT漁港内で同様の海面中間育成を実施したが、育成期間が冬季から翌年夏



Fig. 3. Appearance of a diseased juvenile abalone (*Nardotis discus discus*). Bar: 2.5 mm.



Fig. 4. Close appearance of the edge of shell in a diseased juvenile abalone. Bar: 1 mm.

季であったためか、このような斃死はみられず、生残率は96~97%であった。今回の斃死と水温、比重および溶存酸素といった育成環境要因との関連を検討したが、環境要因が直接の斃死因ではないと判断された。また、育成期間中の餌料は、一貫して従来から用いていた天然海藻のアオサであり、餌料が直接的に関与しているとは考え難かった。

第二章 原因解明

京都府下で発生したクロアワビ稚貝の中間育成中の大量死の原因が、先に述べたように、環境要因や餌料ではないと考えられたことから、何らかの寄生体による感染症ではないかとの想定に基づき検討を進めた。すなわちクロアワビ稚貝の大量死の原因を解明するため、まず病理組織学的な検討を加え、次いで伝染性、原因体の性状、原因体の分析等について研究を進めた。

ところで、長崎県ではクロアワビ稚貝の大量斃死のため種苗生産が低迷し、大幅な供給不足が続いている。大橋・吉越(1992)は、1991年に長崎県下のクロアワビ種苗生産施設において発生した大量斃死の事例で得られた稚貝の病理組織学的研究を行い、斃死は中腸腺の組織障害によるものであり、細菌やウイルス感染症によるものではないと報告した。藤井ら(1994)は、中腸腺の組織障害には給餌される塩蔵ワカメの質と量に問題があると考え、各種餌料による試験を行い、塩蔵ワカメ区で最も良い成長、生残率が得られたが、中腸腺の組織障害が顕著であったと報告した。また、我孫子ら(1998)は、長崎県、佐賀県、福岡県および京都府の種苗生産施設での水温上昇期の大量死事例での病貝の病理組織検査を行って、クロアワビ稚貝の大量死のメカニズムについて考察を加え、摂餌過多による消化盲囊組織(中腸腺組織)の崩壊とその後の再生に伴う稚貝

の衰弱が死亡をもたらす主な原因であるとしている。

一方、著者らが筋萎縮症と呼んでいる病気と餌料との関係については、由良野ら（1989）が詳細な検討を行い、直接餌料に起因するものではないとの結論を得ている。京都府栽培漁業センターでも餌料の種類については検討を行い、筋萎縮症は餌料によるものではないと判断されている（赤岩、私信）。大橋・吉越（1992）や我孫子ら（1998）の報告した事例は、筋萎縮症に認められるような異常細胞塊（腫瘍様構造物）が認められない等、主要な病理組織像が異なるため、別の疾病であると思われる。また、石川・金子（1987）の報告した、新潟県での越年クロアワビ1年貝における4月上旬から5月中旬の大量斃死の事例では、病貝が網カゴ上部に這い上がり、ダンゴ状に付着しあうといった症状がみられ、症状がみられた数日後に斃死したと記載されている。この場合も筋萎縮症でみられる症状とは明らかに異なり、別の疾病であろうと推察された。このように、アワビ類の大量斃死には本研究で扱う筋萎縮症以外の病気、あるいは要因によるものもあると考えられる。

第1節 病理組織学的検討

原因の解明には、まず病貝の病理組織像を観察することが重要と考え、著者が1985年に遭遇した中間育成事例での斃死貝について日本獣医畜産大学魚病学研究室の協力を得て検討を加えた（中津川ら、1988）。

材料および方法

1985年7月12日に採材したサンプルの内、正常稚貝（A）、中程度の症状を示す異常稚貝（B）および末期的重症異常稚貝（C）の3種類に類別した稚貝（以下、各々をA、B、C稚貝とする）を10%中性ホルマリン水で固定し、常法に従って組織切片とした後、ヘマトキシリン・エオシン（H & E）染色、ギムザ染色、アザン染色、PAS反応、PAS-アルシアンブルー染色およびチールネルゼン染色を施して鏡検に供した。

結果および考察

異常稚貝BおよびCの腹足筋肉中の中央に2本並列して走る神経幹や神経横連鎖および神経幹から分枝し腹足表層部に分布する末梢神経系には、円形もしくは長楕円形の異常細胞塊（結節状構造物）が多数みられ（Fig. 5）、しばしば神経幹の正常部位へ浸潤し、神経幹を閉塞させる程成長していた。同じような異常細胞塊は鰓および外套膜にもみられた（Figs. 6, 7）。一方、正常稚貝のAの腹足神経幹、その神経横連鎖、末梢神経系、鰓および外套膜には、このような異常細胞塊は全くみられなかった（Fig. 8）。異常細胞塊の周縁部の細胞は幼若で活性的であり不規則なうねり

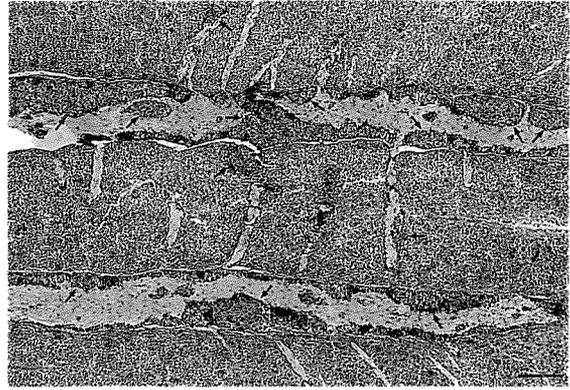


Fig. 5. Abnormal cell masses (arrows) observed in the nerve trunks of foot muscle of a diseased juvenile abalone (*Nordotis discus discus*) (C). Bar: 0.2 mm.

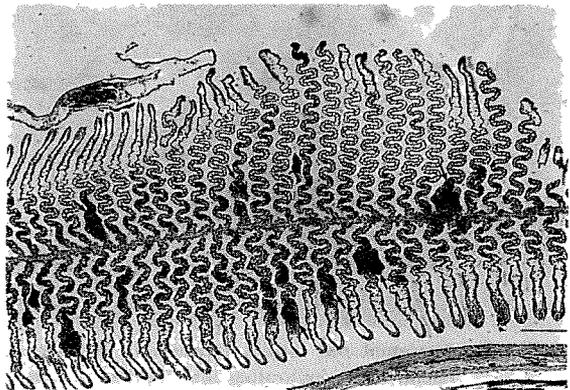


Fig. 6. Abnormal cell masses (arrows) observed in the gill of a diseased juvenile abalone (B). Bar: 0.2 mm.

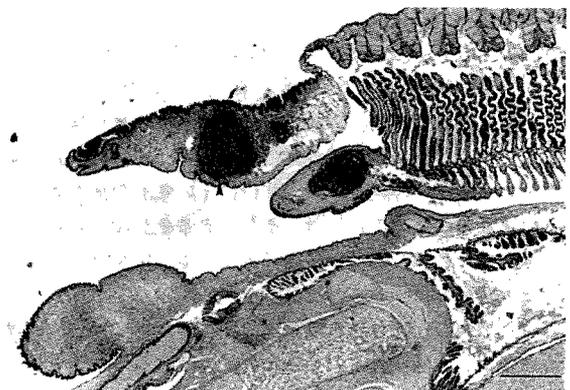


Fig. 7. A large mass of abnormal cells (arrow head) observed in the mantle of a diseased juvenile abalone (B). Bar: 0.5 mm.

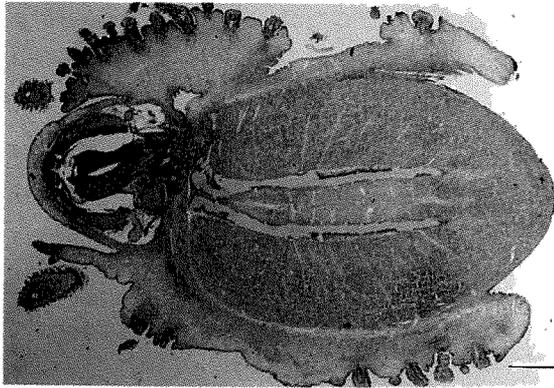


Fig. 8. Normal nerve trunks in foot muscle of a healthy juvenile abalone (A). Bar: 1 mm.

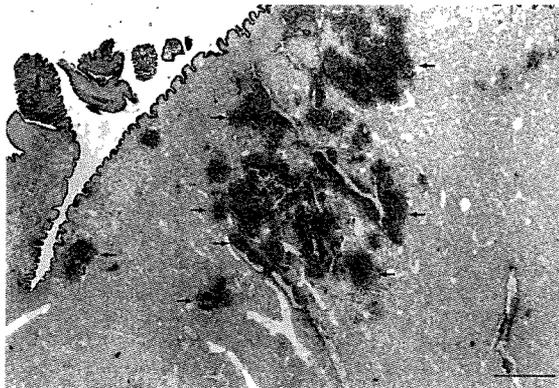


Fig. 9. Abnormal cell masses (arrows) in the peripheral nerve infiltrating into the foot muscle (C). Bar: 0.5 mm.

を呈し、中心部は壊死している場合もあった。C稚貝の腹足筋肉部では、神経幹から分枝した末梢神経幹の異常細胞塊が筋組織へ浸潤成長している像が観察された (Fig. 9)。また、大きく成長した異常細胞塊が表皮の破損を起こして、体外へ脱落した像も観察された (Fig. 10)。この異常細胞塊は、ヒトなどの神経鞘腫または平滑筋腫に類似した腫瘍のように思われるが、その由来を判断するには至らなかった。また、神経幹の分布していない腹足の筋深部にはこの病変はみられなかった。また、異常細胞塊が認められる病変部における細菌や真菌の感染あるいは寄生虫の寄生は組織所見では認められなかった。

腹足筋肉の形態と染色性から、症状の進行に伴い、筋繊維が萎縮し、筋繊維中の多糖類の減少が生じるものと推察された。すなわち、腹足の付着力の低下はこのことに関わっていると考えられるが、稚貝の衰弱、死亡に繋がる本質的な原因は異常細胞塊 (腫瘍) の形成による、筋繊維等を支

配している神経の障害であると思われた。

第2節 伝染性の検討

水温上昇期のクロアワビ稚貝の大量死の原因についてこれから述べる著者の研究を除けば、詳細な検討を行った事例はほとんどない。第1章 発生状況 第1節「クロアワビ種苗生産府県における大量斃死の発生状況」の項で述べたように、1981年に静岡県で大量死が発生した事例では、稚貝は剥離後かなり成長してから死んでおり、剥離作業および餌料の転換に伴う斃死ではないとされた (後藤ら, 1982)。また、1986年に山口県で初めて水温上昇期の大量斃死が発生した事例では、アオサ単一投与への切り替えおよび毎日の飼育池の掃除を実施したが、効果はなかったという (由良野・国近, 1987)。飼育水の水温、溶存酸素および硫化物を調べても、斃死原因となるような異常は認められなかったが、アオサおよび人工餌料の餌料別の飼育試験では、人工餌料区で貝殻の欠刻個体が非常に多くなり、62日後の生残率はアオサ区の94.5%に対し人工餌料区では58%と低くなったという (由良野・国近, 1987)。

由良野・国近 (1988) は、人工餌料中の動物性タンパク質含量と貝殻の欠刻出現率との関係に着目した試験を実施し、含量が15%以上になると出現率が上昇し、斃死が多くなるという結果を得、5~10%付近が適当であるとした。また、人工餌料と天然餌料 (アオサ, ワカメ, アラメ) との混合投与、人工餌料単一投与および天然餌料の組み合わせ投与を比較したところ、人工餌料と天然餌料 (アオサ, アラメ) との混合投与区が最も成長がよく、斃死率は天然餌料 (アオサ, アラメ) 投与区と同程度であったという。さらに、カルシウムを強化した人工餌料を試験し、貝殻の欠刻個体の出現を抑える効果が認められたという。

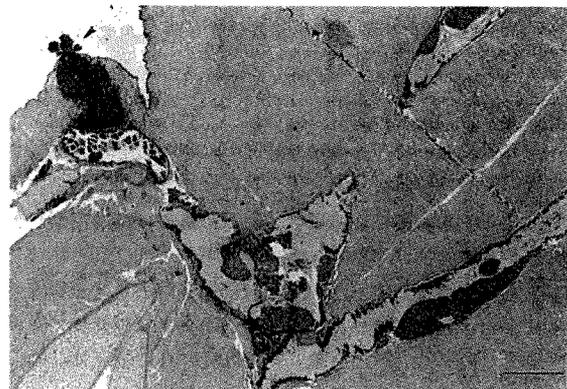


Fig. 10. Large masses of abnormal cells (arrow head) projecting to the exterior part of body (C). Bar: 0.5 mm.

由良野ら (1989) は、クロアワビの斃死原因究明試験で餌料の比較試験を実施した。動物性タンパク質含量7%でカルシウムを2倍に強化した人工餌料を基本に、これに強肝剤を0.01%添加した人工餌料と天然餌料(アオサ, アラメの細切り)を用意して、人工餌料単一投与、天然餌料との混合投与および天然餌料のみの投与を比較したところ、強肝剤添加人工餌料と天然餌料との混合投与では生残率が高く、成長がよかったという。しかし、このような餌料を投与した区でも斃死は起き、貝殻の欠刻個体が出現することから、稚貝の斃死原因は直接餌料に起因するものではなく、摂餌の低下、付着力の低下から斃死に至る一連の経過には、一次的な要因があるものとした。

京都府栽培漁業センターで独自に実施された大量斃死対策の試みでは、飼育方法や注水方式、注水量の多寡は関係がなく、また、少なくとも餌料は直接斃死に関わるものではないとの結果が出されていた(赤岩, 私信)。したがって、飼育環境および餌料以外の要因を求めて検討を始めた。前節で述べたように、京都府下のクロアワビ稚貝の中間育成での大量死の事例で得られたサンプルの病理組織学的な検討では、病因として細菌、真菌あるいは寄生虫の関与には否定的な見方がなされた。そこでまず、本病が伝染性の疾病であるか否かを明確にする検討を行った。1989年に京都府栽培漁業センターにおいて、1985年の中間育成中に発生した疾病と同一と考えられる疾病が発生したので、それらの罹病個体を用いて感染試験を行い、濾過性病原体による伝染性の有無を検討した。

材料および方法

供試稚貝

隔離された施設で種苗生産・育成されたクロアワビ健康稚貝140個(平均殻長11.8mm)を感染試験に供した。

感染材料

感染材料としたクロアワビ稚貝の病貝は、京都府栽培漁業センターにおいて1988年11月に採苗された群で、1989年4月下旬以降死亡が増加し始め、7月にかけて約50%が死亡した。攻撃実施日に採材した平均殻長11.3mmの衰弱稚貝35個を材料とした。衰弱稚貝の症状は、付着器質からの脱落(付着力の低下)および摂餌の低下で、軟体部は痩せて外套膜並びに腹足筋肉は萎縮していた。一部の稚貝では貝殻辺縁部の欠刻および着色(赤褐色)がみられた。

試験区

試験区を3区設定し、1区は対照区とし、2および3区は攻撃区とした。供試貝の数は1および2区では50個、3区では数が不足したため40個とした。

攻撃方法

攻撃は以下のようにして試みた。上記の感染材料貝の軟体部3gを無菌的に採取し、滅菌PBS(-)(Ca⁺⁺, Mg⁺⁺を含まず)12mLとともにホモジナイズして遠心分離(10,960×g, 10°C, 20分間)の後、上澄を0.22μmのメンブレンフィルターで濾過し、その濾液10mLを滅菌海水1Lに添加して、2区の供試稚貝をこの中に20分間(約20°C)浸漬した。1区の供試貝は病貝磨砕濾液を含まない海水1L中に20分間浸漬する処置を施した。3区では、飼育開始10日後の6月30日から7月1日にかけての24時間、別に用意した自然発症群の飼育水槽からの排水を導入して感染を試みた。

飼育方法

これらの処置を施した各区の供試貝はそれぞれ塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴ(36×36×23cm)に収容し、各カゴは50×37×21cmの水槽内に置き、各水槽には換水率6~7回転/時間で濾過海水を流した。2~3日に1度水槽掃除および投餌を行い、8月30日までの71日間飼育した。餌は主に市販のアワビ用配合飼料を用いた。水槽掃除の際、供試稚貝の摂餌状況やシェルターへの付着状況を観察した。

病貝の症状の観察および病理組織検査

2および3区で、シェルターから脱落し、仰向けになったまま腹足筋肉を動かさない衰弱貝や軟体部が腐敗せずに残っている死亡貝13個を採取し、症状を観察した後、10%中性ホルマリン水で固定して、その内11個を病理組織観察に供した。軟体部が腐敗した死亡貝については、採取して貝殻の異常を観察した。また、感染試験に供した自然発症衰弱貝、供試健康稚貝および試験終了時の各区の生残貝、各5個を同様に病理組織観察に供した。

10%中性ホルマリン水で固定した病理組織材料は、常法に従って組織切片とした後、ヘマトキシリン・エオシン(H&E)染色、もしくはクロム明礬カルミン染色を施して鏡検に供した。

結 果

感染試験の結果をFig. 11に示す。対照区とした1区では試験期間中に1個体死亡したが、その他の貝においては摂餌の低下やシェルターからの脱落は見られなかった。攻撃区の2区では攻撃17日後頃から摂餌が低下し、動きが鈍くなり、25日後にはシェルターから脱落する衰弱貝が見られた。30日後からは死亡する貝が出始め、試験期間中に37個を衰弱貝および死亡貝として採取した。採取された衰弱貝をも死亡貝とみなした場合、生残率は26%であった。3区では攻撃15日後から摂餌が低下し、24日後にシェルター

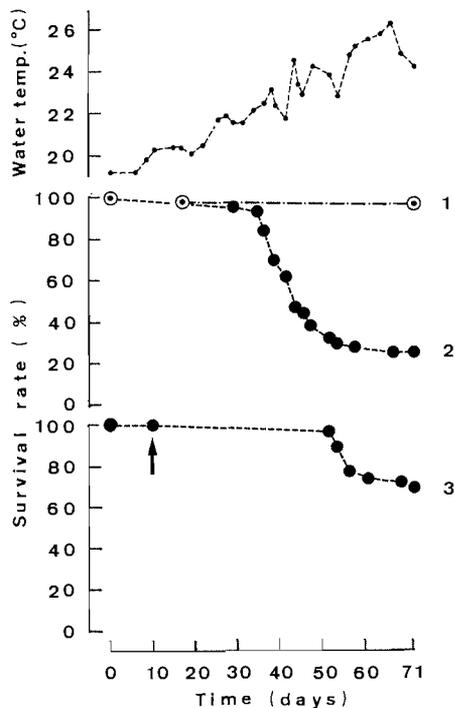


Fig. 11. Changes in survival rate of infected abalones and water temperature during experimental period. 1, Control; 2, Exposed to a 0.22 μm -filtrate of diseased abalone homogenate at the start of the experiment; 3, Exposed to the drain water from a tank containing diseased abalones for 24 h on the 10th day after the start of the experiment (arrow).

から脱落する貝が見られ、40日後から死亡が始まった。試験期間中に12個が衰弱あるいは死亡し、生残率は70%であった。いずれの攻撃区でも水温が25°C以上になると、死亡は急減した。試験終了時における稚貝の平均殻長は、1区で18.4 mm (n=10)、2区で15.0 mm (n=13)、そして3区では17.6 mm (n=10)であった。

2および3区で見られた衰弱貝および死亡貝には、感染試験に供した自然発症貝にみられたと同様の貝殻辺縁部の欠刻および着色(赤褐色)や外套膜並びに腹足筋肉の萎縮が認められた。また、2区のすべての生残貝には貝殻辺縁部の欠刻および着色が見られた。3区の生残貝28個のうち20個には軽微ながら同様の貝殻の異常が認められた。一方、試験開始前にサンプリングした供試稚貝および1区の生残貝には、外観の異常は全く認められなかった。また、1区の死亡貝(1個)にも、外観の異常は認められなかった。

著者が1985年に観察した中間育成の事例と同様に、感染試験に供した自然発症貝には病理組織学的に腹足筋肉中の

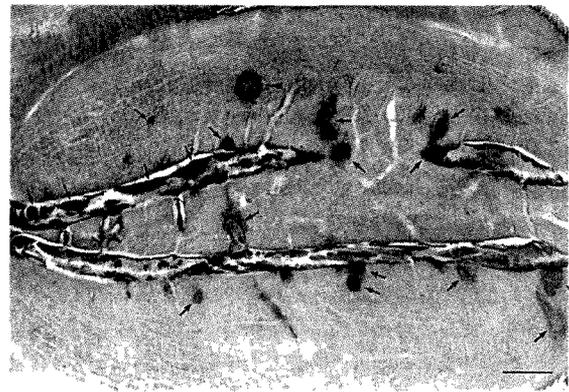


Fig. 12. Section of the foot muscle of a naturally diseased juvenile abalone, showing multiple cell masses formed in the foot muscle. H. & E. stain. Bar: 0.5 mm.

神経系(神経幹および末梢神経系)に異常細胞塊が多数認められた(Fig. 12)。組織観察に供した2および3区の衰弱貝もしくは死亡貝11個すべてにおいて、自然発症貝と同様の異常細胞塊が見られた。異常細胞塊の大きさおよび数は、攻撃後の経過日数によって異なった。例えば、2区の攻撃29日後の1衰弱貝では、腹足筋肉中に小さい異常細胞塊が1切片上に1カ所に見られたに過ぎなかった(Fig. 13)、57日後のものでは、大小の異常細胞塊が1切片で14カ所に認められた(Fig. 14)。また、Fig. 14のように、攻撃後50~60日経過したものでは、腹足神経幹のような中枢部分に異常細胞塊が見られた。しかし、試験終了時に当たる攻撃71日後の2区の1生残貝では、腹足筋肉中に小さい異常細胞塊が1切片で2カ所見られたに過ぎなかった(Fig. 15)。組織観察に供した2および3区の他のすべての生残貝においても、同様に腹足筋肉中などに少ないながらも小さい異常細胞塊が見られた。これら実験感染で稚貝に形成された異常細胞塊は自然発症貝に見られたものと同様の構造を持ち、周縁部には幼若で活性的な細胞が存在し、中心部は壊死している場合もあった(Fig. 16)。

一方、感染試験に供した健全稚貝および対照区としての1区の生残貝には、異常細胞塊は認められなかった。また、1区の死亡貝にも異常細胞塊は見られなかった。

考 察

供試健全稚貝並びに対照区(1区)の生残貝および死亡貝(1個)において、貝殻などの外観観察および軟体部の組織学的観察で異常が認められなかったことから、供試稚貝は本疾病に罹病しておらず、また対照区においても本疾病の発症はなかったことが確認された。病貝磨砕濾液を用いて浸漬攻撃した2区では、攻撃25日後に衰弱貝、30日後



Fig. 13.

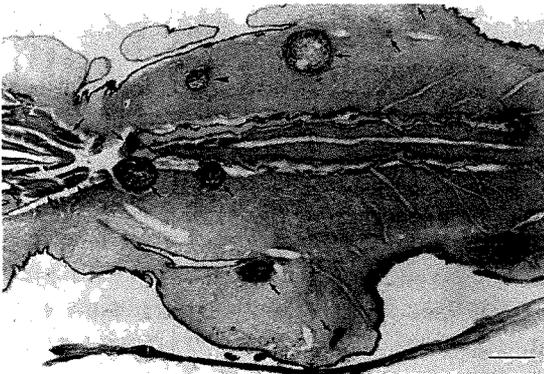


Fig. 14



Fig. 15

Figs. 13-15. Sections of the foot muscle of an artificially infected abalone in the 2nd group, showing cell masses in the foot muscle and other parts. 13: 29 days after challenge. One cell mass (arrow head) was seen in the foot muscle. H. & E. stain. Bar: 0.25 mm. 14: 57 days after challenge. 14 cell masses were seen in the section of foot muscle and the snout muscle. H. & E. stain. Bar: 0.5 mm. 15: 71 days after challenge. 2 cell masses (arrow head) were seen in the section of the foot muscle. H. & E. stain. Bar: 0.5 mm.

に死亡貝が出現し、これらの衰弱貝および死亡貝の外観症状と病理組織学的所見は、自然発症貝のそれらと同一であった。2区における衰弱貝および死亡貝の出現するまでの日数および最終生残率(26%)からみると、本疾病の進行は緩やかではあるが、累積死亡率としてはかなり高くなることが判った。また、自然発症貝の飼育排水を導入した3区では、攻撃40日後に死亡貝が出現したが、45日頃から死亡が急減し、死亡率は30%に留まった。しかし、3区の生残貝28個のうち20個には貝殻の異常および腹足筋肉中の異常細胞塊が認められたことから、殆どの個体で感染は成立したものの、Fig. 11に見られるように、攻撃45日を経過した頃から病状の進行が止まったため、死亡率があまり高くならなかったものと考えられた。この原因として水温の上昇が挙げられる。2および3区のいずれにおいても死亡は同一時期(試験開始のおよそ55日後)に急減し、この

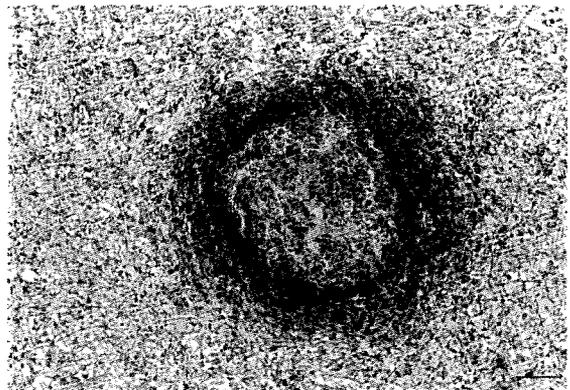


Fig. 16a



Fig. 16b

Fig. 16. Higher magnification of cell masses. H. & E. stain. Bar: 0.05 mm. a: naturally formed cell mass shown by an arrow head in Fig. 12. b: artificially formed cell mass shown by an arrow head in Fig. 14.

前後の水温は 23~25°C に上昇していた。先に述べたように、著者が観察した中間育成の事例（自然発症例）においては、日間死亡数は水温が 23°C を越えると減少し始め、さらに水温が上昇するに伴って減少する傾向を示した。したがって、今回の感染試験の結果は、自然発症例での現象を裏付けるものとなった。

感染試験に供した稚貝の試験期間中における成長を比較するため、試験終了時の各区間の平均殻長について統計的有意差を調べた。その結果、1区と2区の平均殻長の間には有意差があり、1区と3区および2区と3区の間には有意差はなかった。したがって、本疾病に罹病すると成長はかなり劣ることが明らかとなったが、このことは、2区での摂餌が攻撃17日後から低下し、衰弱貝が見られた頃には殆ど摂餌していないような状態であったことと結びつくものであった。このように、本疾病はクロアワビ稚貝の中間育成中における成長にも影響を与えるものと考えられた。

以上のように、浸漬攻撃のみならず排水曝露攻撃によっても病気が再現され、本疾病は伝染性の疾病であることが明らかとなった。更に、その病原体は 0.22 μm のメンブレンフィルターを通過することから、ウイルスに代表される、いわゆる濾過性病原体である可能性が高いと判断された（中津川，1990）。また、飼育排水を介した攻撃でも感染が成立したことは、病貝は病原体を水中に排出し、本疾病は水を介して伝染する病気であることを物語っている。外観症状の1つである腹足筋肉の萎縮が特徴的であることから、本疾病をクロアワビの筋萎縮症と仮称することにした（中津川，1991）。

このように京都府栽培漁業センターで1989年に発生したクロアワビ稚貝の大量死は、濾過性病原体による感染症である筋萎縮症が原因と考えられた。同センターで毎年のように発生し大量死を起こしていた疾病では、今回の症状や発生時期（水温を含め）と同一であり、死亡と回復の経過や摂餌の状況も酷似していた。したがって、従来から同センターで発生した大量死も筋萎縮症によるものと推察された。さらには、他県の栽培漁業センターで発生し問題となっているクロアワビ稚貝の水温上昇期の大量死も、同一疾病によるものではないかと疑われた。

なお、魚類由来の RTG-2、CHSE-214 および EPC 細胞を用いて、常法どおりウイルスの分離・培養を試みたが、いずれの細胞においても不成功に終わった。

第3節 筋萎縮症原因体の海水中での活性維持

クロアワビの種苗生産および中間育成過程において大量死を引き起こす筋萎縮症は、上記のように、濾過性病原体による感染症であることが明らかとなった。著者の観察し

た本症の自然発生事例では、水温が 23°C を越えると死亡数が減少し始め、さらに水温が上昇するに伴って減少した。また、人為感染試験でも、水温が 23~25°C に上昇した時期に死亡が急減した。本症には、このように水温度動が死亡の増減を左右する特徴がある。そこで、異なる水温度条件の海水中での本症原因体の活性の持続性を検討した（中津川，1995）。

材料および方法

供試稚貝

隔離された施設で種苗生産・育成された健全なクロアワビ稚貝275個（殻長 7.6±0.9 mm）を感染試験に供した。なお、試験開始前に同一稚貝群の中から任意に選んだ8個体について病理組織検査を行い、本疾病に罹病していないことを確認した。

攻撃液の調製および保存

-80°C で2カ月間冷凍保存されていた自然発症衰弱・死亡貝の軟体部 15 g に滅菌 PBS (-) 60 mL を添加して磨砕し、遠心分離 (24,650×g, 15°C, 30分間) した。得られた上澄を 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過し、その濾液を 5 mL ずつ10本に分けた。10本のうち1本は直ちに攻撃試験に供し、残る9本はそれぞれ滅菌海水 500 mL に加え、10, 18°C および 25°C の3段階の温度に3本ずつ保存した。各温度における3本の攻撃液の保存期間を、それぞれ5, 10および20日間とした。

攻撃方法

前記の稚貝を各区25個ずつ用い、各温度で保存されていた磨砕濾液添加海水に20分間浸漬した。陰性対照区では滅菌海水を用い同様の処理を行った。先に述べた調製直後の濾液を添加した滅菌海水を用いた攻撃区を陽性対照区とした。

飼育方法

攻撃後の観察期間は原則として各区80日間とした。この間飼育水は約 16°C から 23°C に徐々に上昇したが、水槽間における温度の差はなかった。

浸漬処理した供試貝は各区毎に塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴ (36×36×23 cm) に入れ、それぞれ別々のプラスチック水槽 (50×37×21 cm) に収容した。各水槽には換水率 5~6 回転/時間で濾過海水を流した。観察期間中 2~3 日に1度水槽掃除と投餌を行った。餌は市販のアワビ用配合飼料 (日配ハリオス S) を用いた。

感染の有無の判定

死亡あるいは衰弱貝がみられた場合には、10%中性ホルマリン水で固定し病理組織観察に供するとともに、各試験区毎に死亡貝 (衰弱貝も含む) の数を計数した。試験終了

Table 5. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones infected by exposure to the causative agent of amyotrophia stored at different temperatures

Storage* ¹		Survival rate* ² (%)	Histopathological changes No. positive* ³ /No. examined
Temp. (°C)	Period (days)		
10	5	4	4 / 5
	10	4	5 / 5
	20	20	15 / 15
18	5	4	4 / 5
	10	36	7 / 8
	20	100	0 / 5
25	5	100	0 / 5
	10	100	0 / 3
	20	100	0 / 3
Negative control* ⁴		100	0 / 5
Positive control* ⁵		4	5 / 5

*¹ Filtrates (0.45 μm) of homogenized diseased abalones suspended in sea water were kept at three different temperatures for three different periods of time. *² Twenty-five juvenile abalones were used in each test group. *³ Individual abalone showing typical histopathological changes of amyotrophia was judged as positive. *⁴ Abalones were immersed in sea water without filtrate of homogenized diseased abalones. *⁵ Abalones were immersed in sea water containing fresh filtrate of homogenized diseased abalones.

時まで衰弱・死亡貝が見られなかった試験区については、各区3個または5個の生残貝を病理組織観察に供した。固定した貝から常法に従ってパラフィン切片を作製し、H & E染色を施し、本症の特徴的な病変の有無を観察することにより、感染の成立を判定した。

結果および考察

攻撃試験結果（生残率）および病理組織観察の結果をTable 5に示す。

陰性対照区では、80日間の飼育期間中に衰弱・死亡貝は全くみられず、摂餌も良好であった。陽性対照区では、攻撃46日後に摂餌が低下し始め、54日後以降衰弱・死亡貝が多くみられ、試験終了時には1個（4%）が生残したに過ぎなかった。

病貝磨砕濾液添加海水を10°Cに5日間もしくは10日間保存した場合、陽性対照区と比べて起病力の低下は全くみられず、20日間経過してもわずかに起病力の低下がみられたのみであった。

18°Cに保存した場合、5日間では陽性対照区と差は認められなかったが、10日間では生残率36%となりやや起病力が低下した。20日間では衰弱・死亡貝はみられず、起病力は完全に失われていた。

25°Cで保存した場合は、いずれの試験区においても観察期間中に衰弱・死亡する貝は認められず、また組織学的検査によっても発病した個体は認められなかった。

以上の実験結果から、滅菌海水に添加した本症原因体の感染性は、18°Cでは20日後に、25°Cでは5日後に完全に失われていたと判断される。

筋萎縮症は、自然発生例では13~25°Cの範囲で流行し、23°C以上では終息に向かう傾向が認められている。この現象は、25°Cでは比較的短期間で原因体の感染力が喪失するという本実験結果とよく結びつくように思われる。反面、水温18°C以下、特に10°Cでは感染力が比較的長期間維持されることが明らかになり、この知見は本症の予防対策に生かす必要があろう。

なお、著者が別途実施した、25°Cに12時間病貝の磨砕濾液添加海水を保存した感染試験では、起病力は低下せず、感染性は維持されていた（中津川、1993）。

第4節 原因体の性状

筋萎縮症が濾過性原因体による感染症であり、原因体としてウイルスが最も疑わしいと考えられた。そこで、先に述べた病貝の磨砕濾液を用いた人為感染の手法によって、ウイルスと想定される原因体のいくつかの性状（酸感受

性、エーテル感受性および熱安定性)について検討した。

材料および方法

供試稚貝

隔離された施設で種苗生産・育成された健全なクロアワビ稚貝300個(殻長 12.2 ± 1.9 mm)を感染試験に供した。

攻撃液の調製

-80°Cで20日間冷凍保存されていた自然発症衰弱貝の軟体部18gに滅菌PBS(-)66mLを添加して磨砕し、遠心分離(10,960×g, 10°C, 30分間)した。得られた上澄を0.22μmのメンブレンフィルターで濾過し、44mLの濾液を得た。濾液を12mL(6mL×2), 14mL(7mL×2)および18mL(9mL×2)の3グループに分けた。

①酸感受性

1N塩酸でpH3.0に調整した滅菌海水90mLを予め15°Cに保存しておき、これに濾液6mLを添加して混和後、時々攪拌しながら15°Cに保存した。3時間後に取り出し、1N水酸化ナトリウム溶液で中和した。中和後、滅菌海水900mLに添加し、攻撃液とした。対照攻撃液としては、滅菌海水90mLに濾液6mLを添加して混和後、15°Cに3時間静置し、滅菌海水900mLに添加したものをを用いた。

②エーテル感受性

滅菌海水30mLに濾液9mLを加えて混和後、ジエチ

ルエーテル(試薬特級, 和光)10mLを添加し、密栓して4°Cに保存し時々攪拌した。18時間後に室温に戻して、空気のバブリングによりジエチルエーテルを除去した後、滅菌海水950mLに添加し、攻撃液とした。対照攻撃液としては、滅菌海水30mLに濾液9mLを加えて混和後、4°Cに18時間保存後バブリングせず、滅菌海水950mLに添加したものをを用いた。

③熱安定性

滅菌海水90mLを予め50°Cに保存しておき、濾液7mLを加えて、攪拌しながら50°Cで30分間保持した。30分後に15°Cの滅菌海水900mLに加え、攻撃液とした。対照攻撃液としては、滅菌海水90mLに濾液7mLを加えて、15°Cに30分間静置後、滅菌海水900mLに添加したものをを用いた。

攻撃方法

前記の稚貝を各区50個ずつ用い、上記①(1区), ②(3区)および③(5区)の各攻撃液並びに各対照攻撃液(それぞれ2, 4および6区)に20分間浸漬した。

飼育方法

試験期間は70日間とした。飼育期間中の水温は、Fig. 17に示すように、17°Cから26°Cまで上昇した。浸漬処理した供試貝は各区毎に塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴ(36×36×23cm)に入れ、それぞれ別々のプラスチック水槽(50×37×21cm)に収容した。各水槽には

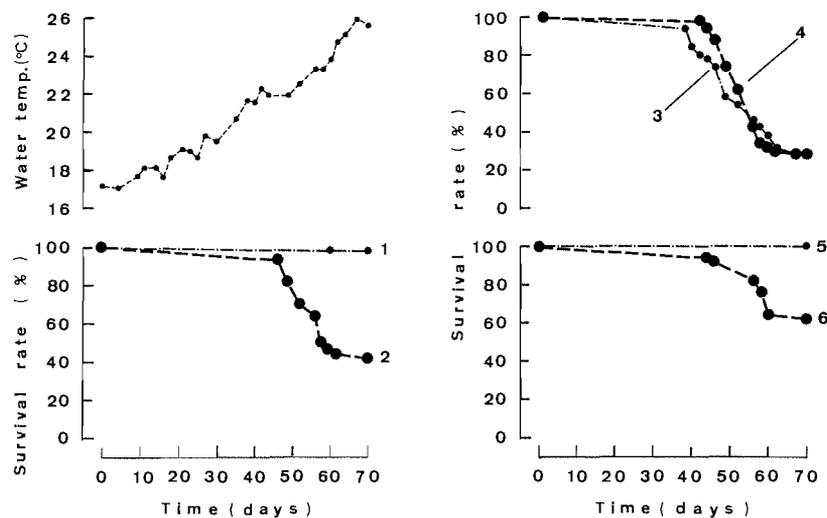


Fig. 17. Changes in survival rate of infected abalones and water temperature during experimental period. 1, Exposed to a filtrate of diseased abalone homogenate which was treated with pH 3.0 for 3 hours; 2, Exposed to the same filtrate as 1 without pH treatment; 3, Exposed to a filtrate treated with ether; 4, Exposed to the same filtrate as 3 without ether treatment; 5, Exposed to a filtrate treated with heat at 50°C for 30 minutes; 6, Exposed to the same filtrate as 5 without heat treatment.

Table 6. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones infected with filtrates of diseased abalone homogenate treated with pH, ether or heat

Group No.	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
No. 1 (pH 3.0)	98	0 / 4
No. 2 (control)	42	6 / 7
No. 3 (ether)	28	5 / 6
No. 4 (control)	28	7 / 7
No. 5 (50°C)	100	0 / 3
No. 6 (control)	62	5 / 7

No. 1: Exposed to a filtrate of diseased abalone homogenate which was treated with pH 3.0 for 3 hours. No. 2: Exposed to the same filtrate as No. 1 without pH treatment. No. 3: Exposed to a filtrate treated with ether at 4°C for 18 hours. No. 4: Exposed to the same filtrate as No. 3 without ether treatment. No. 5: Exposed to a filtrate treated by heat at 50°C for 30 minutes. No. 6: Exposed to the same filtrate as No. 5 without heat treatment.

換水率 5～6 回転/時間で濾過海水を流した。試験期間中 2～3 日に 1 度水槽掃除と投餌を行った。餌は市販のアワビ用配合飼料 (日配) を用いた。

感染の有無の判定

死亡あるいは衰弱貝がみられた場合には、10%中性ホルマリン水で固定し病理組織観察に供するとともに、各試験区毎に衰弱・死亡貝の数を計数した。試験終了時にはすべての試験区で各 3 個の生残貝を病理組織観察に供した。固定した貝から常法に従ってパラフィン切片を作製し、H & E 染色を施し、本症の特徴的な病変の有無を観察することにより、感染の成立を判定した。

結 果

感染試験における生残率の変化を、水温の変化とともに Fig. 17 に、病理組織観察結果を Table 6 に示す。

①酸感受性

pH 3.0 で 3 時間処理した磨砕濾液で攻撃した 1 区では、摂餌の低下はみられず、攻撃 60 日後に 1 個体が死亡したのみで、この死亡個体に病変はみられなかった。無処理の磨砕濾液で攻撃した 2 区 (対照区) では、攻撃 40 日後以降摂餌が低下し、38 日後には付着力が低下してシェルターから脱落する個体が出現し、46 日後に死亡し始めた。以降衰弱・死亡貝が急増したが、60 日後からは殆ど死亡しなくなり、21 個が生残した。試験期間中の衰弱、死亡貝 4 個体についての病理組織観察では、すべてに病変がみられ、試験終了時の 3 個体の内 2 個体にも病変がみられたが、1 個体には認められなかった。

②エーテル感受性

エーテル処理磨砕濾液で攻撃した 3 区では、攻撃 34 日後

にシェルターからの脱落貝が出現し、37 日後には死亡貝がみられた。摂餌が低下し、以降死亡が急増したが、63 日後以降は減少し、14 個が生残した。試験期間中の死亡貝 3 個体には、すべてに病変がみられ、終了時の生残貝 3 個体の内 2 個体にも病変があったが、1 個体には認められなかった。対照攻撃の 4 区では、攻撃 39 日後以降摂餌が低下し、41 日後に死亡し始めた。以降死亡が急増したが、59 日後以降は減少し、14 個が生残した。試験期間中の死亡貝 4 個体には、すべてに病変がみられ、試験終了時の 3 個体にも病変が認められた。

③熱安定性

50°C、30 分間処理磨砕濾液で攻撃した 5 区では試験期間中に衰弱・死亡貝は全くみられず、摂餌は良好であった。終了時の生残貝 3 個体には病変は認められなかった。対照攻撃の 6 区では、攻撃 40 日後以降摂餌が低下し、44 日後に死亡し始めた。以降死亡は急増したが、60 日後以降殆ど死亡しなくなり、31 個が生残した。試験期間中の衰弱貝 4 個体には、すべてに病変がみられ、終了時の 3 個体の内 1 個体にも病変があったが、2 個体には認められなかった。

考 察

今回の感染試験でも、病貝の磨砕濾液を用いた人為感染は成立したことが確認され、この手法により、ある程度は原因体の不活化や感受性サイズの検討などを行うことができる目処がついた。また、自然発症の事例と同様に、摂餌量および付着力の低下といった症状と病理組織像における病変の有無の観察で、感染の成立を判定することが可能であることを追認できた。

これまでの人為感染試験では、水温が23~25°Cに上昇する時期には死亡が急速に減少する傾向がみられたが、今回の試験でも攻撃60日前後以降は、各区における死亡数が急減し、自然発症の事例とも良く一致した。

今回実施した試験の結果から、ウイルスと想定される筋萎縮症の原因体は、酸(pH3.0)に感受性があり、熱(50°C, 30分間)には不安定であるが、エーテルには感受性がないことが示された。但し、精製された原因体を用いた試験ではなく、磨砕濾液を用いた試験であるため、混在したタンパク質等の変性により間接的に原因体の感染力が阻害されたというような可能性を完全に否定できない。

第5節 年齢別感受性の検討

筋萎縮症は、クロアワビの種苗生産および中間育成の過程において、波板から剥離後の稚貝で発生することが大部分であり、0年貝での発症が通例である。これまでに示した人為感染試験でも波板から剥離後の稚貝を供試している。しかし、第I章「発生状況」の中で述べたように、採卵用親貝に本症が発生した例がないわけではなく(奥田ら, 1989)、クロアワビにおける感受性サイズをある程度特定しておく必要があると考えた。そこで、0年貝, 1年貝および2年貝を用いて人為感染試験を行い、クロアワビの成長と本症原因体に対する感受性との関係について検討した。

材料および方法

供試貝

隔離された施設で種苗生産, 育成された健全なクロアワビ0年貝(平均殻長6.4mm)62個, 1年貝(平均殻長

34.1mm)45個および2年貝(平均殻長47.2mm)45個を感染試験に供した。

攻撃液の調製

-80°Cで約21カ月間冷凍保存されていた自然発症衰弱・死亡貝の軟体部2.8gに滅菌海水28mLを添加して磨砕し、遠心分離(990×g, 5°C, 10分間)した。得られた上澄を0.45μmのメンブレンフィルターで濾過し、25mLの濾液を回収した。

攻撃方法

0年貝の内32個は攻撃区, そして30個は陰性対照区とした。攻撃区では、濾液2mLを添加した海水100mLに60分間浸漬した。陰性対照区では、供試貝を海水100mLに60分間浸漬する処理を施した。

1年貝および2年貝は、15個ずつ筋注区, 浸漬区および陰性対照区の3区に分けた。筋注区では、マイクロシリンジで濾液を直接供試貝の腹足筋肉中に注射した。1年貝には50μLずつ, 2年貝には100μLずつ筋注した。浸漬区では、濾液8mLを添加した海水400mLに60分間浸漬した。陰性対照区では、供試貝を海水400mLに60分間浸漬する処理を施した。

飼育方法

試験期間は136日間とした。この間に飼育水温は11°Cから29°Cへ上昇した。

攻撃後の供試貝は各区毎に100L容コンテナに収容し、流水で飼育した。餌は生鮮ワカメあるいは冷凍塩ワカメを塩出して与えた。

感染の有無の判定

死亡あるいは衰弱貝がみられた場合には、適宜10%中性

Table 7. Survival rate and histopathological changes in abalones infected by immersion or intramuscular injection with filtrate of diseased abalones

Age group	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
0 ⁺ Immersion	46.9	8 / 8
Control	100	0 / 3
1 ⁺ Immersion	86.7	4 / 5
IM injection	53.3	3 / 4
Control	100	0 / 3
2 ⁺ Immersion	100	0 / 3
IM injection	53.3	3 / 4
Control	100	0 / 3

Immersion: abalones were immersed in sea water containing filtrate (0.45 μm) of homogenized diseased abalones for 60 minutes. Intramuscular (IM) injection: abalones were injected with filtrate by a microsyringe. Control: abalones were immersed in sea water without filtrate for 60 minutes.

ホルマリン水で固定し病理組織観察に供するとともに、各試験区毎に死亡貝（衰弱貝を含む）を計数した。試験終了時には、すべての試験区で無作為に3個体あるいは5個体を採取し、病理組織観察に供した。固定した貝から常法に従ってパラフィン切片を作製し、H & E 染色を施し、本症の特徴的な病変の有無を観察することにより、感染の成立を判定した。

結果および考察

攻撃試験の結果（生残率）および病理組織観察の結果をTable 7に示す。

0年貝の浸漬区では、攻撃79日後に死亡が始まった。以降死亡は増加したが、118日後以降は死亡しなくなり、15個が生残した。死亡しなくなった頃の水温は23~25°C以上に上昇していた。病理組織観察に供した死亡貝、衰弱貝および生残貝（5個体）のすべての個体で病変がみられた。陰性対照区では、試験期間中に衰弱・死亡する貝は認められず、組織学的検査によっても実験終了時の貝に病変はみられなかった。

1年貝の浸漬区では、攻撃114日後および119日後に各1個体が衰弱し、13個が生残した。衰弱貝の組織観察ではいずれも病変が観察され、3個体の生残貝の内2個体には病変が認められた。筋注区では、攻撃84日後に死亡が始まり、以降死亡は増加した。しかし、105日後以降死亡はなく、8個が生残した。病理組織観察では、死亡貝1個体および生残貝2個体に病変が認められた。陰性対照区では、試験期間中に衰弱・死亡貝はなく、病変もみられなかった。

2年貝の筋注区では、攻撃96日後に死亡が始まり、以降死亡は増加したが、124日後以降は死亡しなくなり、8個が生残した。病理組織観察では、死亡貝1個体および生残貝2個体に病変が認められた。浸漬区および陰性対照区では、試験期間中に衰弱・死亡貝はなく、病変もみられなかった。

以上の結果から、筋注法では2年貝においても感染は成立するが、浸漬法では成立せず、0年貝および1年貝においては浸漬法でも感染が成立することが判った。しかし、1年貝においては、浸漬法で感染はしているものの死亡率は低く、筋注法では1年貝および2年貝での死亡率が高かったことから、病貝磨砕濾液の筋注法による人為感染試験がより確実であることが明らかとなり、以降人為感染試験には筋注法を採用することとした。

浸漬法での死亡率の比較では、0年貝で53.1%、1年貝では13.3%および2年貝では0%（感染も0%）であったことから、クロアワビの本症原因体に対する感受性は、年

齢すなわち貝の成長とともに低下するものと判断された。なお、桃山（私信）によれば、クロアワビの孵化幼生を用いた人為感染試験でも感染が成立したという。したがって、成長に伴って低下するものの、クロアワビでは本症に対し孵化幼生から2年貝に至るまで感受性を示すものと推察された。

ところで、今回の感染試験には、-80°Cで約21カ月間冷凍保存した自然発症クロアワビ稚貝の衰弱・死亡貝を用いて、磨砕濾液を作製した。感染性は十分に残存していることが確認されたわけで、感染材の長期保存には-80°Cでの保存が有効であることが判った。

第6節 細胞培養の試み

桃山・門永（1995）および桃山ら（1997）は、筋萎縮症罹病クロアワビ稚貝の組織中におけるウイルス粒子を発見するため電子顕微鏡観察を行ったが、原因ウイルスと思われるウイルス様粒子は発見できなかったと述べた。

ウイルス性疾患の検査あるいは研究では、通常原因ウイルスに感受性のある培養細胞による分離培養法が用いられる。本症の場合、魚類由来の培養細胞である、RTG-2細胞、CHSE-214細胞やEPC細胞に病貝の磨砕濾液を接種したが、病原体の分離培養はできなかったことは既に述べた。これは、これらの魚類由来細胞が本症原因体に感受性がないためであろうと考えられた。NAGANUMA *et al.* (1994)は、アカネアワビ *Haliotis rufescens* の孵化幼生由来細胞の初代培養に成功している。そこで、この事例を参考にしてクロアワビ孵化幼生由来細胞の培養を試みた。また、培養に適した培地の検討、細胞増殖因子の添加効果の検討も合わせて行った。更に、クロアワビの孵化幼生細胞の入手は採卵時期のみと時期的に限られるため、入手が容易なクロアワビの血リンパの培養を試みた。

材料および方法

①クロアワビ孵化幼生由来細胞の培養

人工採苗から孵化したクロアワビのトロコフォア幼生を供試した。4L容プラスチックビーカー中の孵化幼生をサイフォンで吸い取って、プランクトンネットに回収した。回収した幼生をピペットで5mLの海水とともにプラスチック遠心管に入れ、遠心分離（110×g, 15°C, 5分間）した。沈渣に滅菌海水5mLを加え、再度遠心分離した。沈渣に0.25%トリプシン液（PBS（-）で希釈）5mLを加えて、15°Cで45分間作用させた。遠心分離して上澄を捨て、沈渣に培養用培地2mLを添加してピペッティング後、予め培養用培地を2mLずつ分注しておいた24ウェルプレート（プライマリア, FALCON）の各ウェルに、0.2

mL ずつ植え込んだ。なお、ここで用いた培養用培地とは、E-RDF 培地（極東：抗生物質は添加済み）に FBS (Fetal bovine serum: GIBCO) を 20% に添加し、最終 NaCl 濃度を 1.4% に調整したものである。培養条件は、20°C、5% 炭酸ガス濃度とした。植え込み 2 日後、5 日後、12 日後および 19 日後に培地の更新を行い、26 日後まで観察した。

②培養用培地の検討

クロアワビの孵化幼生細胞を培養する培地として 4 種の市販培地の適性を検討した。すなわち、Leibovitz's L-15 培地 (GIBCO; 以下 L-15 と略記)、Media 199 (GIBCO; 以下 M-199 と略記)、Amphibian Culture Medium (GIBCO; 以下 ACM と略記) および E-RDF 培地（極東）の 4 種類である。これらの培地には、FBS (GIBCO) を 10% 添加し（使用した市販 ACM は添加済み）、最終 NaCl 濃度は 2% に調整した。また、細胞増殖因子として bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor: GIBCO) を 5 ng/mL 各培地に添加した。L-15、M-199 および ACM には抗生物質としてゲンタマイシンを 50 μg/mL 添加した。

約 40,000 個の孵化幼生をプランクトンネットで濾しとって集め、4 mL の海水とともにプラスチック遠心管に入れ、遠心分離 (110×g, 15°C, 5 分間) した。沈渣に滅菌海水 5 mL を加え、再度遠心分離した。上澄を捨て、沈渣に 0.25% トリプシン液 10 mL を添加して滅菌プラスチックシャーレに移した。緩く攪拌しながら 15°C で 1 時間作用させた。遠心分離して上澄みを捨て、沈渣に滅菌海水 8 mL を加えてピペティングの後、予め 4 種の培養用培地を 1.8 mL ずつ分注しておいた 24 ウェルプレートの各ウェルに 0.2 mL ずつ植え込んだ。培養条件は 20°C、5% 炭酸ガス濃度とした。植え込み 1 日後および 7 日後に培地の更新を行い、10 日後まで観察した。

③細胞増殖因子の添加効果

細胞増殖因子として上記の bFGF の他に aFGF (Acidic Fibroblast Growth Factor: GIBCO) および EGF (Epidermal Growth Factor: GIBCO) が市販されているので、それらの添加効果を検討した。培養培地としては 10% FBS を添加した L-15 培地を用いた。最終 NaCl 濃度は 3% とし、aFGF は 100 ng/mL、EGF は 1 μL/mL の割合で培地に加えた。抗生物質として Antibiotic-Antimycotic liquid (GIBCO) を 10 μL/mL 添加した。

2 L 容のビーカーに収容したクロアワビの孵化幼生をサイフォンで吸い取り、プランクトンネットで濾しとって集めた。5 mL の海水とともに遠心管に入れ、遠心分離 (110×g, 15°C, 5 分間) した。上澄を捨て、沈渣に滅菌海水

5 mL を加えて遠心分離し、上澄を捨てる洗浄操作を 4 回行った。洗浄後、沈渣に 0.25% トリプシン液を 5 mL 添加し、15°C で 1 時間作用させた。遠心分離後、沈渣に培養用培地 1.5 mL を加えて、酵素作用を停止させ、ピペティングを行った。さらに、10.5 mL の培地を加えて、24 ウェルプレートの各ウェルに 1.5 mL ずつ植え込んだ。培養条件は 20°C で 1% 炭酸ガス濃度とした。植え込み 2 日後に培地を更新し、20 日後まで観察した。

④クロアワビ血リンパの培養

クロアワビ孵化幼生は、先に述べたように、常時入手できるものではないため、もし初代培養を利用するとすれば随時入手できる材料の方が有利である。クロアワビ成員の腹足に浅くメスを入れると、多くの血リンパ液が滲出することが判っており、この血リンパ液を利用することを考えた。

府下で漁獲され、室内水槽で濾過海水の流水により給餌飼育しておいた天然クロアワビ成員を供試した。成員の腹足を十分にアルコール綿で消毒した後、腹足の体軸方向の中央線に直角に浅くメスを入れた。湧出する血リンパ液をプラスチックポイトで採取し、培養用培地（改変 L-15 培地、組成については後で示す）で 5 倍に希釈した。24 ウェルプレートの各ウェルに培地とよく混和させた血リンパを 1 mL ずつ植え込んだ。培養条件は 18°C、5% 炭酸ガス濃度とし、培地の更新をせずに植え込み 70 日後まで観察した。

結果および考察

①クロアワビ孵化幼生細胞の培養

植え込み 2 日後に培地の更新を行い、浮遊物を除去し、培養容器底面に接着した細胞の有無を観察した。Fig. 18 および Fig. 19 に示すように、培養 3 日目には底面に接着した細胞がみられたが、5 日目に至って細胞は全く増殖していないことが判った。接着細胞は繊維芽状に伸長したものやアメーバ状になったものが観察された。植え込み 12 日後の観察では、接着細胞数が減少し、19 日後には殆ど見られなくなった。

NAGANUMA *et al.* (1994) が報告したように、培養容器底面に接着するクロアワビの孵化幼生由来の細胞が培養できることは確認できた。しかし、培養培地が不適當であるためか、あるいは細胞増殖因子が欠如しているためか、NAGANUMA *et al.* (1994) の場合と異なり、これらの細胞は増殖せず、ウイルス分離に使える状態ではなかった。

②培養用培地の検討

植え込み 1 日後に培地を更新し浮遊物を除去して、接着細胞の有無を観察したが、4 種の培地のいずれを用いた培

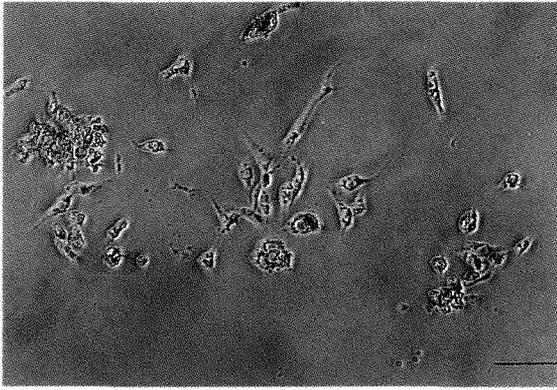


Fig. 18.

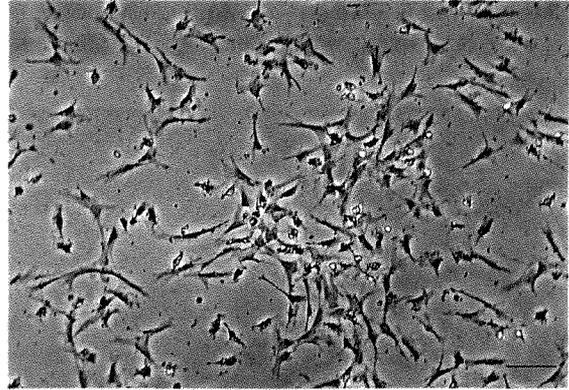


Fig. 20

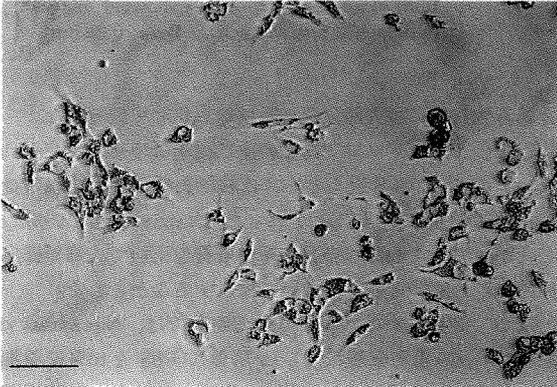


Fig. 19

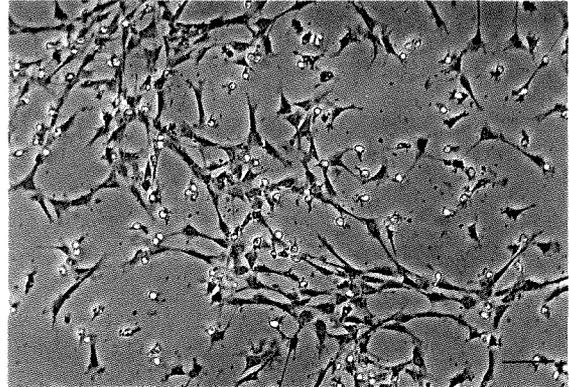


Fig. 21

Figs. 18, 19. Primary cell culture (3 days incubation) derived from larvae of black abalone. Bars: 0.1 mm.

Figs. 20, 21. Primary cell cultures (1 day incubation) of abalone hemocytes in the modified L-15 medium at 18°C, 5% CO₂. Bars: 0.1 mm.

養においても接着細胞がみられた。培養細胞の大よその数は、L-15, ACM, M-199 および E-RDF の順に少なくなった。植え込み10日後には、L-15 以外の3種の培地を分注したウェルでは接着細胞がみられなくなった。しかし、L-15 培地のウェルでも細胞の増殖は認められなかった。

NAGANUMA *et al.* (1994) は、孵化幼生由来細胞を L-15 培地により培養しており、今回の試験でも、4種の培地の中では L-15 が最も多い接着細胞数であったことから、L-15 を基本的な培養用培地とすることとした。また、bFGF を添加しても接着細胞の増殖が認められなかった。したがって、他の増殖因子の添加を検討する必要があると考えられた。

③細胞増殖因子の添加効果

2種類の増殖因子を加えた L-15 培地に植え込んだ2日

後に培地（各増殖因子を加えた培地）を更新し、接着細胞の観察を行った。ウェル底面に多数の接着細胞が認められたが（但し、無添加の培地と同程度）、やはり細胞の増殖は確認できなかった。また、日数の経過とともに接着細胞数は減少し、植え込み11日後以降は殆どみられなくなった。したがって、aFGF と EGF の2種の増殖因子の添加効果は認められなかった。

④クロアワビ血リンパの培養

植え込み1日後には、Figs. 20 および 21 のように、血球細胞は培養容器の底面一面に多数接着していた。血球細胞は凝集しやすいためか、所々に塊状の部分もみられたが、ほぼ均一に分散しており、細胞は繊維芽状に伸長した形で接着していた。Figs. 22 および 23 に示したように、植え込み26日後にもまだ多数の接着細胞がみられたものの日数の経過とともに接着細胞数は減少し、増殖は認められ

なかった。植え込み48日後には、球形化して容器底面から剥離した状態の細胞が増加した (Figs. 24 および 25)。植

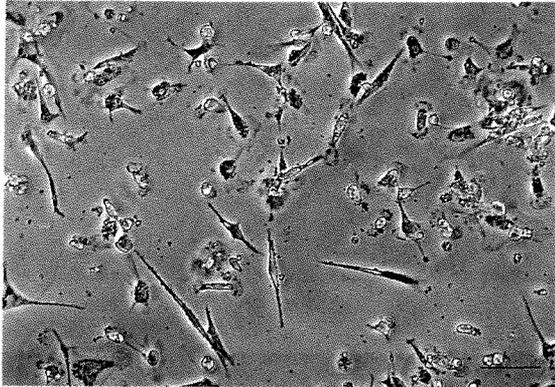


Fig. 22

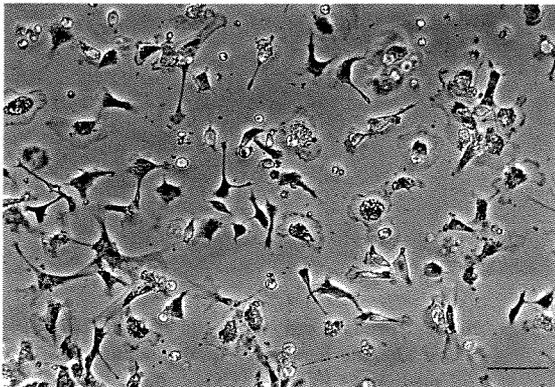


Fig. 23

Figs. 22, 23. Primary cell cultures (26 days incubation) of abalone hemocytes in the modified L-15. Bars: 0.1 mm.

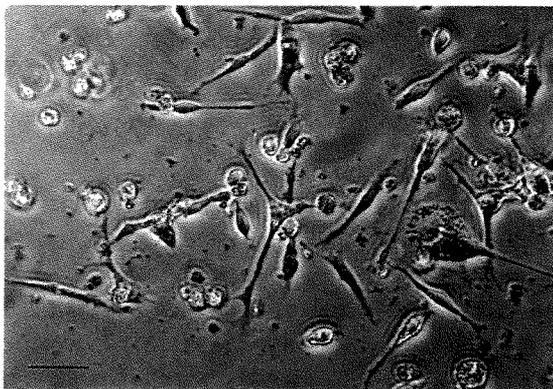


Fig. 24

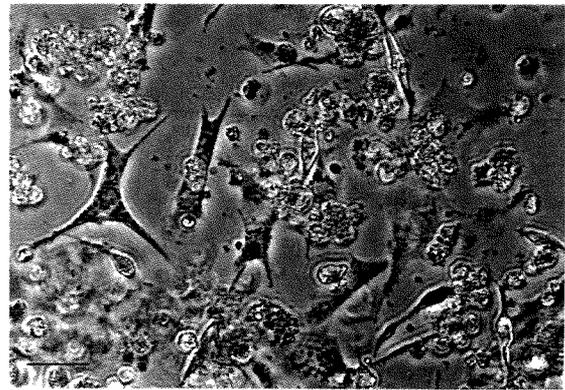


Fig. 25

Figs. 24, 25. Primary cell cultures (48 days incubation) of abalone hemocytes, showing increase of detached spherical cells. Bars: 0.05 mm.

え込み70日後には大部分の細胞は球形化して剥離した。

以上のように、クロアワビの血球細胞は増殖はさせられないもの、2カ月近くという比較的長期間接着細胞の維持培養が可能であることが判った (NAGAI *et al.*, 1998)。したがって、この血球細胞の初代培養を用いて、筋萎縮症原因体の分離の可能性について検討することとした。

なお、血リンパの培養用培地の組成では、NAGANUMA *et al.* (1994) の報告を基に、L-15 培地に FBS を10%に添加し、最終 NaCl 濃度を1.8%にすることとした。血球細胞の培養においても EGF あるいは aFGF の添加効果はやはりなかったので、添加しないこととした。培地組成は以下のとおりである。この培養用培地を、以下改変 L-15 培地とする。

Leibovitz's L-15 (GIBCO)	175 mL
FBS (GIBCO)	20 mL
イーストレート溶液 (GIBCO)	2 mL
脂肪酸濃縮液 (GIBCO)	2 mL
硫酸ストレプトマイシン	20 mg
アンピシリンナトリウム	10 mg
アンホテリシン B	50 μ g
7.5% NaHCO ₃	1 mL
NaCl	2 g
pH	7.6~7.8

第7節 血球初代培養を用いての筋萎縮症原因体の分離

クロアワビ血球細胞の維持培養が可能であったことから、この初代培養を用いて筋萎縮症原因体の分離を行った。

材料および方法

血リンパの培養

隔離施設で種苗生産、育成された健常なクロアワビ5年貝を供試した。腹足部をアルコール綿で十分に消毒し、メスで浅く切開し、湧出する血リンパを滅菌プラスチックスポイトで無菌的に採取した。改変 L-15 培地で10倍に希釈し、よく混和後、24ウェルプレートの10ウェルに各ウェル当たり 1 mL を植え込んだ。培養条件は 20°C、5%炭酸ガス濃度とした。

また、別途入手した天然クロアワビ成貝から血リンパを採取し、10倍量の改変 L-15 培地に混和させ、250 mL 容培養フラスコに植え込んだ。培養条件は 20°C であった。

磨砕濾液の調製

2カ月間 -80°C で冷凍保存しておいた筋萎縮症罹病衰弱貝60個(平均殻長 10.1 mm)の軟体部 4 g に、滅菌 PBS (-) 16 mL を加えて磨砕し、遠心分離 (15,780×g, 4°C, 30分間) した。上澄を 0.8 μm のメンブレンフィルターで濾過し、濾液 12.5 mL を得た。接種に供しない濾液は 0.5 mL ずつ分注し -80°C で冷凍保存した。

磨砕濾液の接種と経過観察

2日間前培養した血リンパの培養プレートのうち4ウェルに、調製した磨砕濾液を1ウェル当たり 10 μL ずつ接種した。2ウェルには陰性対照として滅菌 PBS (-) を同量接種した。残る4ウェルには接種せず、20°C、5%炭酸ガス濃度でそのまま培養を続け、倒立顕微鏡で2~3日に1度経過を観察した。

1日間血リンパを前培養した培養フラスコでは、L-15 培地を除去後、ハンクス塩類緩衝液 (HBSS, 日本) で5倍に希釈した磨砕濾液 100 μL を接種し、20°C で30分間静置した。再度、改変 L-15 培地を加え、20°C で培養した。陰性対照として HBSS 100 μL を接種して、同様に培養した。また、別の培養フラスコには磨砕濾液および HBSS を接種後、DNA ウイルスの増殖阻害剤として知られる 5-ヨードデオキシウリジン (IUdR) を終濃度 50 μg/mL となるように添加した改変 L-15 培地で1カ月間培養し、経過を観察した。

培養細胞の電子顕微鏡観察

磨砕濾液接種7日後の培養フラスコおよび陰性対照のフラスコに、2.25%パラフォルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒドを含む 0.075 M カコジレート緩衝液 (pH 7.5) を加え、4°C で1晩各血リンパ細胞を固定した後、培養フラスコ底面からラバーポリスマンで細胞を剝離させ、遠心分離 (3,000×g, 4°C, 5分間) により細胞を回収した。回収された細胞を1.5%低融点アガロースで前包

埋し、1%オスミウム酸で4°C、90分間後固定した。エタノールおよびプロピレンオキシドにより脱水し、エポキシ樹脂 (応研商事) に包埋した。約 60 nm の超薄切片を作成後、酢酸ウラニルおよび硝酸鉛で染色し、80 kV の電圧で透過型電子顕微鏡 (日立、H-600A) を用いて観察した。

結 果

24ウェルプレートでの培養経過観察

前培養した血球細胞は、培養容器底面の一面に繊維芽状に伸長して接着していた。磨砕濾液を接種後9日を経過した頃から、接種ウェルでは多くの細胞が球形化してブドウの房状に増集し、ウェル底面から剥がれた状態になるのが観察された (Fig. 26)。陰性対照のウェルでも、一部の細胞が球形化してウェル底面から剝離する像は観察された

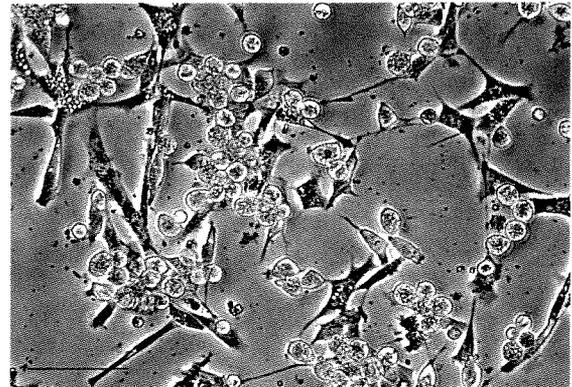


Fig. 26. Cytopathic effects (CPE) in the primary cell culture of abalone hemocytes induced by filtered homogenate from diseased abalone (10 days after inoculation of the homogenate). Bar: 0.1 mm.

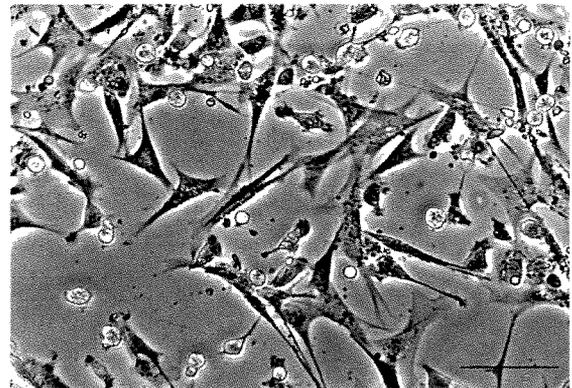


Fig. 27. Control primary cell culture of abalone hemocytes inoculated with PBS (-) (10 days after inoculation of PBS). Bar: 0.1 mm.

(Fig. 27)。しかし、その後日数の経過とともに病貝接種ウェルでは、球形化してブドウの房状に蟻集する細胞が増加し、17日後にはほぼ半分以上の細胞が球形化して蟻集剥離し、30日後にはほぼ全面の細胞が蟻集剥離した。一方、対照ウェルや未接種のウェルでは接着細胞数が経日的に減少はしたが、30日後までには蟻集剥離は観察されなかった。

IUdR を添加した培養フラスコでの培養経過観察

磨碎濾液を接種し IUdR 添加培地で培養したフラスコでは、接種1週間後に細胞の球形化、蟻集剥離が観察され始めた。一方、HBSS を接種し IUdR を添加したフラスコでは、そのような変化は見られなかった。

培養細胞の電子顕微鏡観察

磨碎濾液を接種して7日後の培養フラスコでは、上記と

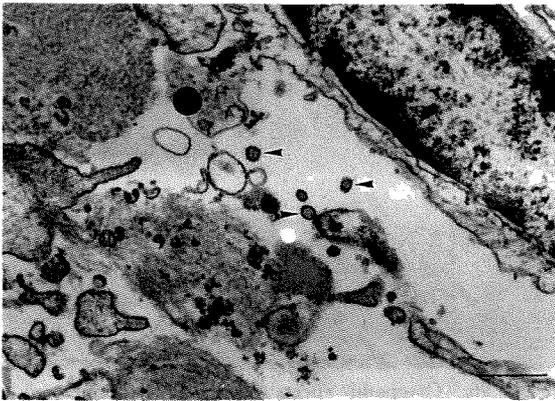


Fig. 28. Electron micrograph of virus-like particles (arrow heads) in the CPE showing hemocyte primary culture inoculated with the filtrate of diseased abalone homogenate. Bar: 500 nm.

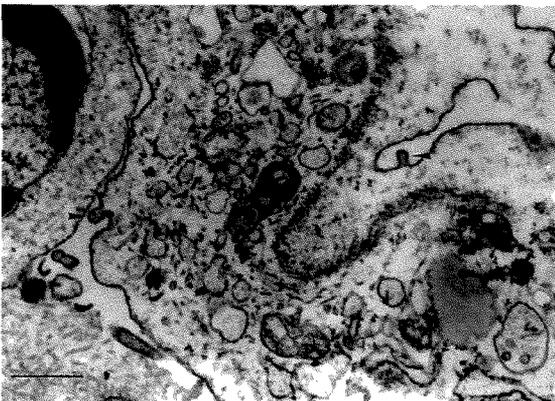


Fig. 29. Electron micrograph of virus-like particles in budding stage (arrow heads). Bar: 500 nm.



Fig. 30. Electron micrograph of virus-like particles (arrow heads) in the hemocyte primary culture. Bar: 500 nm.

同様に、細胞の球形化、蟻集剥離が観察され始めた。これらの培養細胞の電子顕微鏡観察像を Fig. 28 に示す。蟻集剥離の観察された血球細胞では、直径約 120 nm の球形ウイルス様粒子とその出芽像 (Fig. 29) が観察されたが、陰性対照の細胞では同様の粒子は観察されなかった。このウイルス様粒子は細胞外にのみ存在し (Fig. 30)、核内および細胞質内には認められなかった。例外的に細胞質中に観察されたウイルス様粒子は膜状構造物に包まれる形でみられた (NAKATSUGAWA *et al.*, 1999)。

考 察

今回、病貝の磨碎濾液を接種した血球初代培養では接種後7～9日目以降に、細胞の球形化、蟻集剥離が観察され、陰性対照区ではそのような変化はほとんどみられなかった。さらに、変化のみられた接種ウェルの上澄を、別の血球初代培養に接種したところ、7日目頃から同様の球形化、蟻集剥離が観察された。したがって、この培養血球細胞の球形化、蟻集剥離は継代できると考えられ、これらの変化は細胞変性効果 (CPE) であると判断された。

なお、その後も同様の実験を行ったところ、CPE を呈する細胞からの継代は常に成立するわけではなく、10例中3例で同様の CPE が2代目の継代培養で形成されるに過ぎなかった。このことは、原因ウイルスは血球初代培養に感染し CPE を形成するものの、ウイルス粒子の産生量はかなり少ないことを示唆しているように思われる。

磨碎濾液を接種し IUdR 添加培地で培養したフラスコでは CPE が観察され、HBSS を接種して IUdR 添加培地で培養したフラスコでは観察されなかったことから、発現した CPE が IUdR の毒性によるものではなく、IUdR により阻害されないウイルスによるものであることが明らか

となった。

CPE を呈した初代培養血球細胞の電子顕微鏡観察で、直径約 120 nm のウイルス様粒子が観察されたが、このウイルス様粒子は細胞核内および細胞質内において粒子が形成されず、出芽によって粒子が形成されるという特徴を持っていた。また、上記のように、一般に DNA ウイルスの増殖阻害剤とされる IUdR によって CPE の発現を阻害されないことは、本ウイルスの分類を考える上で重要なポイントである。OPRANDY *et al.* (1981) は、米国においてセイヨウオオノガイ *Mya arenaria* の疾病に関連してレトロ様ウイルスを観察しているが、今回血球初代培養を用いて分離されたウイルスは、それに似ているように思われる。

以上のように、筋萎縮症の病原体はクロアワビの血球初代培養に感染し、CPE を示すことが判った。また、CPE を呈した細胞培養中にウイルス様粒子が観察され、このウイルスが本症の原因ウイルスである可能性が示唆された。

第 8 節 他県産クロアワビ病貝からの原因体の分離

京都府栽培漁業センターで種苗生産、中間育成中のクロアワビ稚貝に発生した筋萎縮症病貝から作製した磨砕濾液では、クロアワビ血球初代培養で CPE の発現が観察され、ウイルス様粒子が見つかった。そこで、他県産の病貝から作製した磨砕濾液でも同様の CPE が発現するか、そして CPE 発現細胞で同様のウイルス様粒子が確認できるかどうかを検討した。

材料および方法

血リンパの培養

山口県沿岸で漁獲され、京都府立海洋センターで隔離飼育していた天然クロアワビ成貝（殻長 104.0 mm）を供試し、10 mL を採血した。改変 L-15 培地を加えて 10 倍量に希釈しよく混和後、50 mL 容培養フラスコに 5 mL ずつ植え込んだ。培養条件は 20°C、5% 炭酸ガス濃度とし、細胞接種後 3 日間前培養した。

磨砕濾液の調製

1992年から1997年にかけて、神奈川県栽培漁業センター、福岡県栽培漁業センター、鳥根県栽培漁業センター並びに長崎市栽培漁業センター（鳥根県並びに長崎市のサンプルは、山口県内海水産試験場の桃山氏提供）から提供を受けた各県のクロアワビ病貝から、それぞれ以下の手順で磨砕濾液を調製した。また、京都府内産の病貝の磨砕濾液も調製した。

- 神奈川県産病貝 1997年5月に採材後 -20°C で輸送され、-80°C で冷凍保存してあった自然発症病貝の軟体部を貝殻からはずし、軟体部 5.4 g に滅菌 PBS (-) を

加えて 5 倍量に希釈し、磨砕した。遠心分離 (15,780 × g, 4°C, 20分間) の後、上澄を採取し、0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過した。得られた濾液は、接種試験に供するまで -80°C で冷凍保存した。また、病貝 5 個体を 10% 中性ホルマリン水で固定して、病理組織観察に供した。

- 福岡県産病貝 1997年4月に採材後一旦 -80°C で冷凍保存してあった自然発症病貝を、-20°C で輸送後、-80°C で再度冷凍保存しておいた。貝殻からはずした軟体部 20 g に滅菌 PBS (-) 40 mL を加えて磨砕し、遠心分離の後、上澄を採取して磨砕濾液を調製した。また、同様に病貝 5 個体を病理組織観察に供した。
- 鳥根県産病貝 1993年5月に採材後貝殻から軟体部をはずし、-80°C で4年間ほど冷凍保存してあった自然発症病貝を供試した。軟体部 10 g に滅菌 PBS (-) 40 mL を加え、磨砕濾液を調製した。5 個体の軟体部を病理組織観察に供した。
- 長崎市産病貝 1992年6月に採材後貝殻から軟体部をはずし、-80°C で約5年間冷凍保存してあった自然発症病貝を供試した。軟体部 2 g に滅菌 PBS (-) 8 mL を加え、磨砕濾液を調製した。
- 京都府産病貝 1996年3月に採材後、-80°C で1年間冷凍保存してあった自然発症衰弱貝を供試した。軟体部 4.9 g に滅菌 PBS (-) 20 mL を加え、磨砕濾液を調製した。なお、この自然発症群が筋萎縮症に罹病していることは、事前の病理組織観察で確認済みであった。調製された各磨砕濾液は、小分けして -80°C に冷凍保存し、必要な分を解凍して使用した。

磨砕濾液の接種と経過観察

前培養後の培養フラスコ各 2 本に、調製した各磨砕濾液を 50 μL ずつ接種し、陰性対照として滅菌 PBS (-) を同量接種した。40日間培養を継続し、細胞の状況を倒立顕微鏡で観察した。

培養血リンパの電子顕微鏡観察

磨砕濾液接種 7 日後に各 2 本の培養フラスコの内 1 本のフラスコの培養細胞を、前節と同様の方法で固定し、電子顕微鏡観察に供した。

結果および考察

他県産病貝の磨砕濾液を接種した培養フラスコでは、京都府産病貝の磨砕濾液接種フラスコと同様、接種 7~12 日後頃から細胞の球形化、蜷集剥離する CPE が観察され始めたが、PBS (-) を接種したフラスコでは全く CPE は認められなかった。

5 府県の病貝磨砕濾液により、CPE を呈した培養細胞

の電子顕微鏡観察では、いずれからも前記 (Figs. 28, 29, 30) と同様の、直径約 120 nm の球形ウイルス様粒子がみつけれられた。

病理組織観察に供した各県の病貝 (長崎市以外) には、いずれも筋萎縮症に特徴的な病変が観察された。桃山 (私信) によれば、長崎市の病貝においても病理組織観察の結果病変が確認されており、他県産の磨砕濾液の調製に供した病貝群はすべて本症の罹病群と判断できた。

したがって、他県産の本症罹病貝の磨砕濾液でも、京都府の病貝と同様に CPE の発現が確認でき、同一と考えられるウイルス様粒子が見つかったわけで、5 府県の病貝には共通する病原体の存在が強く示唆され、培養細胞に認められたウイルス様粒子が本症の原因ウイルスである可能性は一層高くなった。

第9節 粗精製培養上澄の病原性

罹病貝磨砕濾液をクロアワビ血球初代培養に接種し CPE を発現させ、その培養上澄を濃縮粗精製し、電子顕微鏡観察でウイルス様粒子を確認した上で、これを健康稚貝に接種して筋萎縮症を再現できれば、このウイルス様粒子が原因ウイルスであることはほぼ確定的となると考えた。そこで、粗精製培養上澄のクロアワビ稚貝に対する病原性を検討することとした。

材料および方法

供試稚貝

隔離施設で種苗生産、育成された健康なクロアワビ稚貝 60 個 (殻長 11.0 ± 1.5 mm) を感染試験に供した。なお、試験開始前に供試貝と同一群の中から任意に選んだ 10 個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

培養上澄の濃縮粗精製

前節「第8節 他県産クロアワビ病貝からの原因体の分離」で用いたと同じ、京都府産病貝からの冷凍保存磨砕濾液を、クロアワビの血球初代培養に接種して、CPE を発

現させた。培養上澄を採取し、遠心分離 ($4,000 \times g$, 4°C , 20 分間) の後、上澄を超遠心分離 ($80,000 \times g$, 4°C , 2 時間) にかけて、得られた沈渣を PBS (-) に懸濁させた。懸濁液を 20~35~50% -ST 緩衝液 (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5) 不連続蔗糖密度勾配に重層し、超遠心分離 ($80,000 \times g$, 4°C , 100 分間) を行った後、20~35% 間および 35~50% 間に濃縮された試料を採取した。各試料を PBS (-) で 10 倍に希釈し、再度超遠心分離 ($150,000 \times g$, 4°C , 1 時間) にかけて濃縮し、PBS (-) に再懸濁させた。各試料の一部をコロジオン・カーボン補強支持膜上で 2% リンタングステン酸によりネガティブ染色して透過型電子顕微鏡で観察した。

攻撃方法

上記稚貝を 20 個ずつ 3 群に分け、陰性対照区、陽性対照区および粗精製培養上澄 (35~50% 層: 後述するように 20~35% 層にはウイルス様粒子が観察されなかったため、35~50% 層のみを感染試験に供した) 接種区とした。攻撃は筋注法とし、陰性対照区では、滅菌 PBS (-) $10 \mu\text{L}$ をマイクロシリンジで腹足筋肉中に注射した。陽性対照区では、上記磨砕濾液 $10 \mu\text{L}$ を接種し、粗精製培養上澄接種区では、濃縮粗精製した上澄 (35~50% 層) $10 \mu\text{L}$ を同様に注射した。

飼育方法

接種後の供試貝は、各区毎に塩ビ製波板をシェルターとしていた網カゴ ($24 \times 38 \times 25$ cm) に入れ、それぞれ別々のプラスチック水槽 ($50 \times 37 \times 21$ cm) に収容した。飼育期間は 90 日間とし、当初は水温 18°C に加温調節した濾過海水を換水率 5~6 回転/時間で流した。しかし、自然水温の上昇により攻撃 39 日後に加温を中止し、以降は自然水温としたため、試験終了時には 22.5°C まで上昇した。観察期間中 2~3 日に 1 度水槽掃除を行い、市販のアワビ用配合飼料を与えた。

感染の有無の判定

飼育期間中の衰弱貝および試験終了時の生残貝は、それ

Table 8. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones infected with purified virus

Group	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Negative control	100	0 / 10
Positive control	45	9 / 10
Injected with purified virus	100	0 / 10

Negative control: abalones were injected with PBS (-). Positive control: abalones were inoculated with filtered homogenate of diseased abalones. Injected with purified virus: abalones were inoculated with purified virus cultured in the primary hemocyte culture.

ぞれ10%中性ホルマリン水で固定し、病理組織観察に供した。固定した貝から常法に従ってパラフィン切片を作製し、H & E 染色を施し、本症の特徴的な病変の有無を観察することにより、感染の成立を判定した。

結果および考察

濃縮粗精製培養上澄の電子顕微鏡観察では、20~35%間試料にはウイルス様粒子がみられなかった。35~50%間試料には、先に Figs. 28, 29 および 30 に示すウイルス様粒子と同様の、直径約 120 nm のウイルス様粒子が微量ながら認められた。

攻撃試験の結果（生残率）および病理組織観察の結果を Table 8 に示す。

陰性対照区および粗精製培養上澄接種区では、期間中に衰弱・死亡個体はなく、生残率は100%であった。病理組織観察に供した各10個の生残貝には病変はみられなかった。

陽性対照区では、攻撃57日後に死亡が始まり、以降衰弱、死亡貝が増加し、期間中に11個が取上げられた。生残率は45%であった。病理組織観察に供した衰弱貝5個および終了時の生残貝5個、計10個の内9個では本症に特徴的な病変がみられ、病貝磨砕濾液による人為感染の成立は確認された。

一方、病理組織観察の結果から判るように、粗精製培養上澄の接種では全く感染が成立せず、粗精製培養上澄の病原性は確認できなかった。したがって、クロアワビ血球細胞の初代培養で分離培養でき、電子顕微鏡観察で観察された直径約 120 nm の球形ウイルス様粒子の病原性は確認できず、これが原因ウイルスであるとの結論は得られなかった (NAKATSUGAWA *et al.*, 1999)。先にも述べたように、培養で得られたウイルス様粒子は *in vitro* でも感染性が低く、また電顕観察によっても非常に数が少ないことが示されている。したがって、今回の感染実験の結果をもって、観察されたウイルス様粒子が原因体ではないと断定することも問題があり、今後更に検討を重ねる必要があると考えられた。

第10節 病貝の磨砕粗精製液の病原性の検討

クロアワビ血球初代培養で分離培養されたウイルス様粒子の病原性は確認することができなかった。そこで、確実に病原性を示すことが判っている筋萎縮症罹病貝の磨砕濾液を材料に、原因ウイルスを検索することとした。すなわち、病貝の磨砕液を濃縮粗精製し、粗精製液中にウイルス様粒子の存在を確認した上で、この粗精製液に病原性があるかどうかを検討することとした。

材料および方法

供試貝

隔離施設で種苗生産、育成されたクロアワビ健康0年貝30個（殻長 20.5±1.9 mm）を供試した。

磨砕液の調製

京都府栽培漁業センターで発生した本症罹病貝（衰弱・死亡貝）を感染材とした。貝殻から軟体部をはずし、4倍量の滅菌 PBS（-）を添加して氷冷しながらポリトロン（KINEMATICA: PCU11）で磨砕した。遠心分離（15,780×g, 4°C, 30分間）の後、上澄を採取し磨砕液とし、-80°C で冷凍保存した。

磨砕粗精製液の調製

冷凍保存された磨砕液を解凍後、前項「第9節 粗精製培養上澄の病原性」で述べた、不連続蔗糖密度勾配遠心法により濃縮粗精製し、不連続蔗糖密度35~50%間試料を磨砕粗精製液とした。この粗精製液の一部を透過型電子顕微鏡で観察し、直径約 150~200 nm の球形ウイルス様粒子の存在を事前に確認した。なお、蔗糖密度20~35%画分についても電顕観察を行ったが、そのようなウイルス様粒子は認められなかった。

攻撃方法

供試貝を10個ずつ3群に分け、陰性対照区、陽性対照区および粗精製液接種区とした。陰性対照区では、滅菌 PBS（-）10 μL を供試貝の腹足筋肉中にマイクロシリンジで注射した。陽性対照区では、磨砕液を 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過し、濾液 10 μL を注射した。粗精製液接種区では、上記の磨砕粗精製液 10 μL を同様に注射した。

飼育方法

飼育期間は140日間とし、無給餌飼育とした。筋注法で攻撃した供試貝は、各区毎に2個の2L容プラスチックビーカーに5個体ずつ収容し、各ビーカーには1.5Lの濾過海水を入れた。18°C 一定の恒温槽に収容し、2~3日に1度海水を交換した。

感染の有無の判定

各区の飼育期間中の衰弱貝および試験終了時の生残貝は、それぞれ10%中性ホルマリン水で固定し、病理組織観察に供した。固定した貝から常法に従ってパラフィン切片を作製し、H & E 染色を施して、本症の特徴的な病変の有無を観察することにより、感染の成立を判定した。

結 果

攻撃試験結果（生残率）および病理組織観察の結果を Table 9 に示す。

陰性対照区では、飼育終了時の攻撃140日後までに死亡

Table 9. Survival rate and histopathological changes in abalones infected by intramuscular injection with purified homogenate of diseased abalones with amyotrophy

Group	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Negative control	100	0 / 10
Positive control	40	7 / 10
Purified homogenate	80	6 / 9

Negative control: abalones were injected with PBS (-). Positive control: abalones were inoculated with filtered homogenate of diseased abalones. Purified homogenate: abalones were inoculated with homogenate purified by ultra-centrifugation. Survival rate was determined after 140 days post-inoculation.

する個体はなく、生残員には本症に特徴的な病変は観察されなかった。

陽性対照区では、攻撃59日後に死亡し始め、以降108日後までに6個体が衰弱、死亡した（但し、1個体は事故死）。終了時には4個体が生残した。これら衰弱、死亡員および生残員の内、7個体には病変がみられた。

磨砕粗精製液接種区では、攻撃69日後に1個体が衰弱したが、その後は118日後に1個体が死亡するまで衰弱、死亡はなかった。140日後の生残率は80%であった。病理組織観察に供した9個体の内6個体には病変がみられたが、残る3個体には本症に特有の病変は認められなかった。

考 察

Table 9 に示すように、生残率および組織学的病変の発現から、陽性対照区および磨砕粗精製液接種区では感染が成立したことが確認された。磨砕粗精製液は、陽性対照区で接種した磨砕濾液と同一の病員磨砕液から調製したものであり、磨砕濾液中の病原体は磨砕粗精製液中に濃縮されると期待した。しかし、実験結果では陽性対照区（磨砕濾液）と粗精製液区とを比較すると、生残率においては粗精製液区の方が高く、病変の発現ではほとんど差がなかった。これは、精製の過程でウイルス粒子が何らかの影響を受け、感染性が低下したためではないかと考えられる。

磨砕液を濃縮精製して得られた、35～50%分画には直径約150～200 nmの球形ウイルス様粒子の存在が確認され、このウイルス様粒子と血球初代培養で分離培養されたウイルス様粒子との関連が目される。大まかな形態は似ているが、測定された大きさに若干の違いがある。

孔径の異なるフィルターで濾過した病員磨砕濾液を用いた実験から、本病の病原体の大きさは100 nm以上であることが推定されている（桃山・門永, 1995; 高野, 1999）。したがって、培養細胞に見出されたウイルス粒子と今回35～50%分画に認められたウイルス粒子は同一のウ

イルスで、それが筋萎縮症の原因体である可能性が極めて高いと考えられた。しかしながら、念のために行った外見的健康クロアワビの磨砕濾液の35～50%分画中にも同様のウイルス様粒子が観察され、この150～200 nmのウイルス様粒子が本症の原因体であるとの結論には至らなかった。

第三章 対 策

ウイルス性疾病の対策を考える上で、疾病の原因となるウイルスの不活化法を見出すことと、感染源を特定しその感染経路を遮断することが最も重要と考えられる。筋萎縮症の場合、原因はウイルスであると考えられるが、特定がされておらず、現段階では前述の事柄を検討することが困難な状況にある。しかしながら、種苗生産の現場においては1日も早く何等かの防除法を開発することが求められている。そこで、本章ではいくつかの基本的な不活化法を試み、感染経路を想定した感染試験で感染源の絞り込みを行った。また、発生した場合の対症療法として、飼育水温を人為的に上昇させる、昇温処理を試みた。

第1節 化学的不活化法

病員の磨砕濾液を用いて感染試験を行うバイオアッセイを利用して、筋萎縮症原因体の塩素剤、ヨード剤およびエタノールによる化学的不活化法を検討した。

材料および方法

供試稚貝

隔離された施設で種苗生産、育成された健康なクロアワビ稚貝（殻長 8.6 ± 0.9 mm）300個を供試した。なお、試験開始前に供試員と同一群の中から任意に選んだ10個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

磨碎濾液の調製

自然発症した本症罹病貝（衰弱もしくは死亡貝）の軟体部 15 g に滅菌 PBS (-) 60 mL を加えて磨碎し、遠心分離 (15,780 × g, 10°C, 1 時間) した。得られた上澄を 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過し、その濾液を 10 mL ずつ 5 本に分けた。

消毒剤の調製および不活化処理

塩素剤として次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光，アンチホルミン）を用いた。滅菌海水に当初有効塩素濃度が 500 ppm および 50 ppm となるように塩素剤を添加し，病貝磨碎濾液 10 mL を加えて，全量を 1,000 mL とした。10 分間 20°C の恒温槽に静置し，10 分後に 1/10 N-チオ硫酸ナトリウムで中和した。ヨード剤としてはポピドンヨード剤（明治製菓，水産用イソジン）を用いた。当初有効ヨウ素濃度が 50 ppm となるように滅菌海水 189 mL にポピドンヨード剤 1 mL を加え，病貝磨碎濾液 10 mL を添加した。10 分間 20°C の恒温槽に置き，10 分後に滅菌海水 800 mL で希釈した。エタノール（試薬特級，和光）35 mL を病貝磨碎濾液 10 mL に加え，これに滅菌 PBS (-) 5 mL を添加して，70% エタノール濃度とした。10 分間 20°C の恒温槽に静置し，10 分後に滅菌海水 950 mL を加え希釈した。

攻撃方法

不活化処理したそれぞれの磨碎濾液添加海水に前記の供試貝を各区 50 個ずつ 30 分間浸漬した。陰性対照区では，滅菌海水 1,000 mL に供試貝 50 個を 30 分間浸漬した。陽性対照区では，未処理の磨碎濾液 10 mL を滅菌海水 990 mL に加えて，供試貝 50 個を 30 分間浸漬した。

飼育方法

試験期間は 139 日間とし，この間飼育水温は開始当初の 20°C から 59 日目の最高 26.2°C にまで上昇したが，59 日目以降は低下して試験終了時には 19°C となった。

浸漬処理した供試貝は，各区毎に塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴ (36×36×23 cm) に入れ，それぞれ別のプラスチック水槽 (50×37×21 cm) に収容した。各水槽には 5～6 回転/時間で濾過海水を流した。試験期間中 2～3 日に 1 度，水槽掃除を行い，市販のアワビ用配合飼料（日配）を投与した。

感染の有無の判定

死亡あるいは衰弱貝がみられた場合には，10% 中性ホルマリン水で固定して病理組織観察に供し，各区毎に死亡の数を計数した。試験終了時には，各区の生残貝 5 個体を病理組織観察に供した。固定した貝から先と同様パラフィン切片を作製し，本症の特徴的な病変の有無を観察することにより，感染の成立を判定した。

結果および考察

攻撃試験の結果（生残率）および病理組織観察の結果を Table 10 に示す。

陰性対照区，有効塩素 50 ppm 区および 70% エタノール区では，いずれも生残率は 98% であり，試験期間中それぞれ 1 個体の死亡があったのみである。これら 3 区における試験終了時の生残貝の病理組織検査でも，本症の特徴的な病変はみられなかった。有効塩素 500 ppm 区およびヨウ素 50 ppm 区では，生残率はそれぞれ 92% および 96% で

Table 10. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones infected with filtrate of diseased abalone homogenate, which were treated with chlorine, iodine or ethanol

Group	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Negative control	98	0 / 5
Positive control	30	7 / 12
Cl ⁻ 500 ppm	92	0 / 5
Cl ⁻ 50 ppm	98	0 / 6
Iodine 50 ppm	98	0 / 6
70% Ethanol	98	0 / 5

Negative control: abalones were immersed in sterile sea water for 30 minutes. Positive control: abalones were exposed to the filtrate of diseased abalone for 30 minutes. Cl⁻ 500 ppm: abalones were exposed to the filtrate treated with Cl⁻ 500 ppm for 10 min. Cl⁻ 50 ppm: abalones were exposed to the filtrate treated with Cl⁻ 50 ppm for 10 min. Iodine 50 ppm: abalones were exposed to the filtrate treated with iodine 50 ppm for 10 min. 70% Ethanol: abalones were exposed to the filtrate treated with 70% ethanol for 10 min. Survival rate was determined after 139 days post-inoculation.

あったが、調べた各区5個体の生残貝あるいは1個体の死亡貝（ヨウ素 50 ppm 区）に病変は観察されなかった。

陽性対照区では、攻撃45日後以降死亡がみられたが、この頃の水温は 25°C 以上であった。そのためか、47日後、59日後、74日後および82日後の各1個体の衰弱貝あるいは死亡貝計4個体には病変はみられなかった。水温が 24°C 以下に低下し始めた82日後以降死亡数が増加した。そして、攻撃90日後の3個体の衰弱貝および4個体の生残貝には、病変が観察された。

試験開始時期が遅れ、水温が 24°C 以上の期間が55日間も続いてしまったという、試験設定時期の拙さもあり、陽性対照区でも衰弱、死亡貝の一部に病変がみられないという結果となった。しかし、水温が低下した90日後の衰弱貝および139日後の生残貝には病変がみられたことから、供試した磨砕濾液による感染は成立したものと判断された。一方、塩素 500 ppm 区、50 ppm 区、ヨウ素 50 ppm 区および70%エタノール区では、生残率は90%以上であり、生残貝に病変はなかったことから、磨砕濾液中の病原体はこれらの薬剤で不活化され、感染は成立しなかったと考えられた。したがって、筋萎縮症原因体はハロゲン系消毒剤である塩素剤、ヨード剤およびエタノールに感受性があるものと判断された。

第2節 塩素処理時間と不活化の関係

前項の試験により、当初有効塩素濃度 50 ppm および 500 ppm の次亜塩素酸ソーダ溶液を、10分間筋萎縮症病貝の磨砕濾液に作用させることによって、磨砕濾液中の本症原因体が不活化されることが判った。そこで、作用時間について更に検討することとした。

材料および方法

供試稚貝

隔離施設で種苗生産、育成された健全なクロアワビ稚貝 200個（殻長 6.1 ± 0.7 mm）を感染試験に供した。なお、

試験開始前に供試稚貝と同一群の中から任意に選んだ10個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

磨砕濾液の調製および不活化処理

-80°C で約7カ月間冷凍保存してあった本症罹病貝（衰弱、死亡貝）の軟体部 6g に滅菌 PBS (-) 24 mL を添加して磨砕し、遠心分離 (24,650×g, 15°C, 30分間) した。得られた上澄を 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過し、その濾液を 5 mL ずつ4本に分けた。予め 20°C にしておいた滅菌海水に、次亜塩素酸ナトリウム溶液（和光、アンチホルミン）を当初有効塩素濃度が 500 ppm となるように添加し、全量を 500 mL とした。これに上記病貝磨砕濾液 5 mL を加えてよく攪拌し、30秒間、2分間および5分間それぞれ作用させ、1/10 N-チオ硫酸ナトリウムで中和して作用を停止させた。

攻撃方法

供試稚貝を50個ずつ4区に分け、不活化処理した濾液を添加した海水 500 mL に20分間浸漬した。陽性対照区では、無処理の磨砕濾液 5 mL を滅菌海水 500 mL に加えてよく攪拌し、これに供試稚貝50個を20分間浸漬した。

飼育方法

飼育期間は80日間とし、飼育期間中の水温は 18°C に保った。浸漬処理した供試稚貝は各区毎に塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴ (36×36×23 cm) に入れ、それぞれ別々のプラスチック水槽 (50×37×21 cm) に収容した。各水槽には5~6回転/時間で調温濾過海水を流した。飼育期間中2~3日に1度水槽掃除を行い、市販のアワビ用配合飼料（日配ハリオス S）を投与した。

感染の有無の判定

死亡もしくは衰弱貝がみられた場合には、各水槽毎に数を計数し、衰弱貝は10%中性ホルマリン水で固定して先と同様病理組織観察に供した。試験終了時には各区の生残貝3あるいは5個体をそれぞれ固定し、病理組織観察に供した。

Table 11. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones exposed to the diseased abalone filtrates treated with Cl⁻ 500 ppm at different periods

Period of treatment with chlorine	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
30 sec	12	11 / 11
2 min	50	11 / 11
5 min	100	0 / 5
Positive control (not treated)	10	9 / 10

The filtrates of homogenized diseased abalones suspended in seawater were treated with Cl⁻ 500 ppm for three different periods of time (30 sec, 2 min, 5 min). Abalones were exposed for 20 min to each filtrate treated with chlorine.

結 果

攻撃試験の結果（生残率）および病理組織観察の結果を Table 11 に示す。

陽性対照区では、攻撃33日後以降摂餌が低下した。40日後には衰弱貝が始め、以降急に衰弱、死亡貝が増加した。試験終了時には5個が生残した。病理組織観察に供した衰弱貝7個および生残貝3個の内、すべての衰弱貝および生残貝2個体に本症に特徴的な病変がみられた。

磨砕濾液に30秒間塩素を作用させた区では、攻撃47日後以降摂餌が低下し、51日後に死亡し始めた。以降急速に衰弱、死亡貝が増加し、試験終了時には6個が生残した。病理組織観察に供した衰弱貝8個および生残貝3個のすべてに病変が観察された。

2分間塩素を作用させた区では、攻撃58日後以降摂餌が低下し、63日後に衰弱貝が始めた。以降衰弱、死亡貝が増えたが、試験終了時には25個が生残した。病理組織検査に供した衰弱貝6個および生残貝5個のすべてに病変が観察された。

5分間塩素を作用させた区では、試験期間中に衰弱、死亡貝はみられず、病理組織検査に供した5個体の生残貝に病変はなかった。

考 察

有効塩素濃度 500 ppm の次亜塩素酸ソーダを磨砕濾液に作用させたところ、5分後には有効塩素濃度は 385 ppm に低下した。一般にハロゲン系不活化剤は有機物の存在下では不活化効果が著しく阻害されることがよく知られているが、今回の試験でも実効塩素濃度は 500 ppm から 385 ppm の間であった。塩素濃度 385 ppm（正確には 385～500 ppm）、5分間の作用時間で磨砕濾液中の原因体の持つ起病力は完全に不活化できた。しかし、この濃度でも2分間の作用時間では、原因体の起病力は殆ど不活化できていないことが判った。磨砕濾液中には水溶性タンパク等の有機物が多量に含まれるため、今回の試験結果だけで明確な判断はできないが、高濃度の塩素による消毒でも5分以上の時間を要すると思われた。

今回試験に供した有効塩素濃度 500 ppm、5分間という設定濃度での消毒処理は、種苗生産の現場においてはアワビ飼育水槽あるいは飼育に供する器具類には、用いることができよう。また、前節で示したように試験した有効塩素濃度 50 ppm、10分間処理も同様に現場での器具類等の消毒に利用できると考えられる。原因体が培養でき、原因体そのものを使った試験法が実施できるようになれば、より詳細な不活化効果を検討できるであろう。なお、アワビの受精卵はハロゲン系不活化剤に感受性が高く、魚類の受精

卵で用いられるヨード剤、5 ppm での消毒処理で発生が進まなくなるということであった（赤岩、私信）。

第3節 物理的不活化法

筋萎縮症原因体の物理的な不活化法として、熱および紫外線を検討した。なお、第二章 第4節「原因体の性状」の項で述べたように、原因体は 50°C、30分間の熱処理には不安定であることが既に明らかとなっている。

1) 熱による不活化

種苗生産および中間育成の施設で実行可能な方法としては、できるだけ短時間で最大の効果が出るようにすることが重要である。このため、処理時間を1分間に絞り、処理温度は 35、50、70°C および 90°C の4段階について検討した。

材料および方法

供試稚貝

隔離施設で種苗生産、育成された健康なクロアワビ稚貝 35個（殻長 13.6 ± 1.4 mm）を供した。なお、試験開始前に供試貝と同一群の中から任意に選んだ5個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

攻撃液の調製および温度処理

-80°C で18日間冷凍保存してあった本症罹病貝（衰弱、死亡稚貝：平均殻長 9.9 mm）の軟体部 4g に滅菌海水 16 mL を添加して磨砕し、遠心分離（24,650×g、10°C、30分間）した。得られた上澄を 0.45 μm のメンブレンフィルターで濾過した。35、50、70°C および 90°C にそれぞれ設定したオイルバス中に、予め 5 mL 容の滅菌プラスチックチューブを固定しておき、それぞれに濾液 100 μL を入れた。1分間後にチューブを取り出し、直ちにチューブごと氷冷した。なお、本実験では陰性対照区の1つとして、健康なクロアワビ稚貝から得た磨砕濾液を接種する区を設けた。

攻撃方法

前記の供試稚貝を5個ずつ用い、氷冷後の各濾液 5 μL をマイクロシリンジで腹足筋肉中に注射した。陽性対照区では無処理の磨砕濾液 5 μL を筋注した。陰性対照区-1では滅菌海水 5 μL を筋注したが、陰性対照区-2では、別途調製した供試健康稚貝の磨砕濾液 5 μL を筋注した。

飼育方法

試験期間は50日間で、無給餌飼育とした。注射された供試貝は、各区毎に 2 L 容のプラスチックビーカーに収容し、ビーカーには濾過海水 2 L を入れた。18°C 一定の恒

Table 12. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones infected with filtered homogenate of diseased abalones, which were treated by heating at different temperatures for 1 minute

Temperature for treatment (1 min) of filtrate	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Negative control-1	100	0 / 5
Negative control-2	100	0 / 5
Positive control (not heated)	80	4 / 5
35°C	40	4 / 5
50°C	100	1 / 5
70°C	100	0 / 5
90°C	100	0 / 5

Negative control-1: abalones were inoculated by intramuscular injection with sterile sea water. Negative control-2: abalones were injected with the filtrate of healthy juvenile abalones. Positive control: abalones were injected with the non-treated filtrate of diseased abalones.

温槽にピーカーを収容し、飼育期間中3～4日に1度海水を交換した。

感染の有無の判定

試験期間中の衰弱貝および試験終了時の生残貝は各区毎に10%中性ホルマリン水で固定し、病理組織観察に供し、感染の成立を判定した。

結 果

攻撃試験の結果（生残率）および病理組織観察の結果をTable 12に示す。

陰性対照区-1および陰性対照区-2では、50日間の飼育期間中に衰弱、死亡貝は全くみられず、試験終了時の生残貝各5個体に病変は観察されなかった。

陽性対照区では、攻撃45日後に1個が衰弱し、4個が生残した。病理組織観察では衰弱貝と生残貝4個体の内3個体に病変がみられた。

磨碎濾液に35°C、1分間の熱処理を施して攻撃した区では、攻撃34日後、35日後および37日後に各1個の衰弱貝がみられ、2個が生残した。衰弱貝2個体および生残貝2個体には病変が観察された。

50°C、1分間の熱処理区では、試験期間中に衰弱、死亡はなく、5個体の生残貝の内1個体には腹足内の末梢神経に小さい病変が1カ所にのみみられた。

70°Cおよび90°C、1分間の熱処理区では、試験期間中に衰弱、死亡貝はみられず、各5個体の生残貝に病変は観察されなかった。

考 察

今回の感染試験の結果から、筋萎縮症の原因体は熱に感受性が高く、35°C、1分間の加熱では不活化されないものの、70°Cおよび90°Cでは1分間の加熱で完全に不活化

されることが明らかとなった。また、50°C、1分間でもかなりの起病力の低下が認められ、おそらく60°C以上であれば1分間の加熱処理で十分不活化できるものと推察された。

陰性対照区-2では、健康稚貝の磨碎濾液を筋注したが、感染は成立しなかった。これまでの筋注法による実験における陰性対照区では常にPBS(-)を注射してきたが、健康貝の磨碎濾液を接種しても何等異常が起きないことが今回の実験により初めて確認された。したがって、本症を感染、発症させる原因体は病貝にのみ存在することが確認された。

2) 紫外線による不活化

一般に、種苗生産および中間育成の過程で発生するウイルス性疾患の原因ウイルスが、紫外線に対し感受性を有するかどうかは、種苗生産施設においては飼育水からの病原体の侵入を防ぐ上で重要なことである。そこで、筋萎縮症の原因体が紫外線に感受性があるかどうかを検討した。

材料および方法

供試稚貝

隔離施設で種苗生産、育成されたクロアワビの健康稚貝25個（殻長15.1±1.1mm）を感染試験に供した。なお、試験開始前に供試稚貝と同一群の中から任意に選んだ5個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

攻撃液の調製および紫外線処理

-80°Cで2年7カ月間冷凍保存してあった本症罹病貝（衰弱、死亡貝：平均殻長15.9mm）の軟体部5gに滅菌海水5mLを添加して磨碎し、遠心分離（24,650×g、

5°C, 30分間)した。上澄を0.22 μmのメンブレンフィルターで濾過し、得られた濾液各100 μLを3個の滅菌プラスチックシャーレ中にそれぞれ滴下した。15 Wの紫外線ランプ(松下電器製殺菌灯, GL-15)の直下30 cmの位置にシャーレを置き、それぞれ10秒間, 1分間および10分間ランプを点灯して、紫外線を照射した。なお、紫外線の照射強度は、Black・Ray Ultra-Violet Meter (UVP Inc. Model J225)で測定したところ、 $4.0 \times 10^2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ であった。

攻撃方法

前記供試稚貝を各区5個ずつ用い、紫外線の照射時間を変えた3種の磨砕濾液10 μLを腹足筋肉中にマイクロシリンジで注射した。陰性対照区では滅菌PBS(-)10 μLを、陽性対照区では無処理の磨砕濾液10 μLを筋注した。

飼育方法

試験期間は50日間で、無給餌飼育とした。注射された供試貝は各区毎に2 L容プラスチックビーカーに収容し、ビーカーには1.5 Lの濾過海水をいれた。18°C一定の恒温槽に収容し、試験期間中3~4日に1度海水を交換した。

感染の有無の判定

試験期間中の衰弱貝および試験終了時の生残貝は、各区毎に10%中性ホルマリン水で固定し、病理組織観察に供し、感染の成立を判定した。

結果および考察

攻撃試験の結果(生残率)および病理組織観察の結果をTable 13に示す。

陰性対照区、紫外線1分間照射区および10分間照射区では、試験期間中に衰弱、死亡貝はみられず、病理組織観察に供した各区5個体の生残貝にはいずれも病変が認められなかった。

紫外線10秒間照射区では、試験終了時に1個の衰弱貝が

あったが、病理組織検査では本症に特徴的な病変はみられなかった。4個の生残貝にも病変はなかった。

陽性対照区では、試験終了時に1個の死亡貝があり、4個が生残した。衰弱貝1個体および生残貝2個体には病変が認められた。

今回の感染試験の結果から、筋萎縮症原因体には紫外線に対する感受性があることが明らかとなり、紫外線の照射強度では $4.0 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 以上の紫外線照射量で不活化できるものと推定された。

第4節 感染経路の解明

感染経路を明らかにすることによって、筋萎縮症の感染を防止することができるものと期待される。そこで、水平感染の成立の成否、天然貝における感染の有無および採卵用親貝からの垂直感染の可能性について検討した。

1) 水平感染

自然発症したクロアワビ稚貝の飼育水槽の排水に浸漬することにより、健全な稚貝における感染が成立することは既に確認した。ここでは、感染耐過貝からの感染および採卵用親貝からの水平感染の可能性を検討した。

材料および方法

①感染耐過貝からの感染

感染耐過貝

隔離施設で種苗生産、育成された健全なクロアワビ稚貝を継続して隔離飼育した。こうして育成された健全な1年貝(殻長 $17.3 \pm 2.5 \text{ mm}$)40個に対し病貝の磨砕濾液で浸漬攻撃し、生残した26個の内、16個を継続して飼育し、これらを感染耐過クロアワビ2年貝(殻長 $41.3 \pm 6.1 \text{ mm}$)として供試した。また、陰性対照区用として非感染の2年貝25個(殻長 $38.6 \pm 3.5 \text{ mm}$)を供試した。なお、1年貝への人為感染試験での衰弱、死亡貝4個体には病理組織検

Table 13. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones infected with the diseased abalone filtrate exposed to ultra-violet $4.0 \times 10^2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ for three different periods of time

Period of UV treatment	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Negative control	100	0 / 5
Positive control (not treated)	80	3 / 5
10 sec	80	0 / 5
1 min	100	0 / 5
10 min	100	0 / 5

Negative control: abalones were injected with PBS (-) by intramuscular injection. Positive control: abalones were injected with the non-treated filtrate of diseased abalone.

査でいずれも本症に特徴的な病変がみられ、感染耐過貝とした16個の2年貝には貝殻辺縁部に欠刻と着色が例外なく観察された。

供試稚貝

同様に隔離施設で種苗生産、育成された健全なクロアワビ稚貝100個（殻長 6.7 ± 0.8 mm）を感染試験に供した。なお、試験開始前に供試稚貝と同一群の中から任意に選んだ10個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

攻撃方法

感染源とした感染耐過2年貝の飼育排水を、健全稚貝を50個収容した攻撃区の飼育水槽に15日間流した。その後は通常の濾過海水に切替えた。陰性対照区では、非感染2年貝の飼育排水を同様に15日間飼育水槽に流した。

飼育方法

試験期間は120日間とし、この間に水温は約 11°C から 26°C に徐々に上昇した。各区の供試貝は、それぞれ塩ビ製波板をシェルターとしていた網カゴ（ $36 \times 36 \times 23$ cm）に入れ、別々のプラスチック水槽（ $50 \times 37 \times 21$ cm）に収容した。各水槽には5～6回転/時間で濾過海水を流した。観察期間中2～3日に1度水槽掃除を行い、市販のアワビ用配合飼料（日配）を投与した。

感染の有無の判定

死亡あるいは衰弱貝がみられた場合には、10%中性ホルマリン水で固定して病理組織観察に供し、取上げた貝の数を計数した。各区の試験終了時の生残貝5個体についても病理組織観察に供し、感染の成立を判定した。

②採卵用親貝からの水平感染

採卵用親貝

若狭湾にある、京都府舞鶴市の無人島である冠島（Fig. 31）地先で採卵用親貝として採捕された天然クロアワビ22

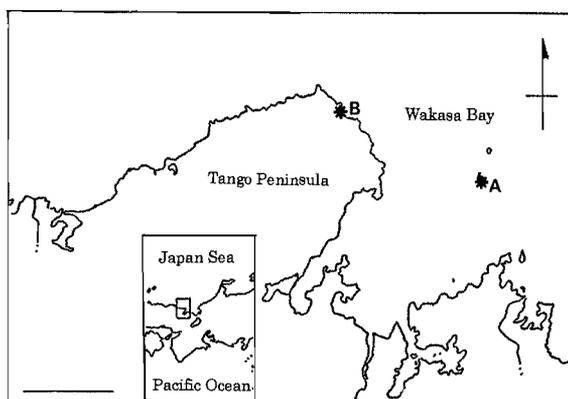


Fig. 31. Map showing the survey points. Bar: 10 km. A: Kanmurijima Island, B: Yabeta.

個（♂, ♀各11個）をそれぞれ♂貝群（以下C群とする）および♀貝群に分け、♀貝群はさらに2群に分けて、室内コンクリート水槽（ $1 \times 2 \times 1$ m）で飼育した。採捕後約5カ月経過した頃から♀貝群の中に摂餌不良の個体が見られたため、摂餌の良好な♀7個（以下A群とする）と不良な♀4個（以下B群とする）に分け直し、飼育を継続した。C群には摂餌不良等の異常な徴候を示す個体は認められなかった。餌には乾燥コンブを用いた。なお、この冠島には過去1度も人工種苗を放流したことがない。また、本島はアワビ種苗放流水域からかなり離れている孤島であるため、人工種苗を放流している府下沿岸からの移動はないものと考えられる。京都府栽培漁業センターで採卵に使用される親貝は、すべて冠島地先で採捕されたものである。

供試稚貝

隔離された施設で種苗生産、育成された健全なクロアワビ稚貝207個（殻長 7.6 ± 0.4 mm）を供試し、約50個ずつ4区に分けた。なお、試験開始前に供試貝と同一群の中から任意に選んだ5個体について病理組織検査を行い、本症に罹病していないことを確認した。

攻撃方法

A（ $n=49$ ）、B（ $n=54$ ）およびC（ $n=49$ ）群攻撃区では、供試貝をそれぞれA群、B群およびC群の親貝飼育水槽内に浮かべた飼育カゴに5日間収容した。陰性対照区では、供試貝55個をそのまま稚貝飼育水槽に収容した。なお、同居飼育を行った時期の親貝飼育水槽の水温は 11°C であった。

飼育方法

同居攻撃後の観察期間は60日間とし、水温を 18°C に調節した濾過海水を流した。同居攻撃した供試貝は、各区毎に塩ビ製波板をシェルターとしていた網カゴ（ $38 \times 24 \times 25$ cm）に入れ、それぞれ別々のプラスチック水槽（ $50 \times 37 \times 21$ cm）に収容した。試験期間中2～3日に1度水槽掃除を行い、市販のアワビ用配合飼料（日配ハリオスS）を投与した。

感染の有無の判定

試験期間中に衰弱貝がみられた場合には、取上げて10%中性ホルマリン水で固定し病理組織観察に供し、各区毎に死亡数を計数した。試験終了時には各区の生残貝5個体を病理組織観察に供し、感染の成立を判定した。

結果および考察

①感染耐過貝からの感染

試験期間中の水温および生残率の変化を Fig. 32 に示す。また、感染試験の結果（生残率）および病理組織観察の結果を Table 14 に示す。

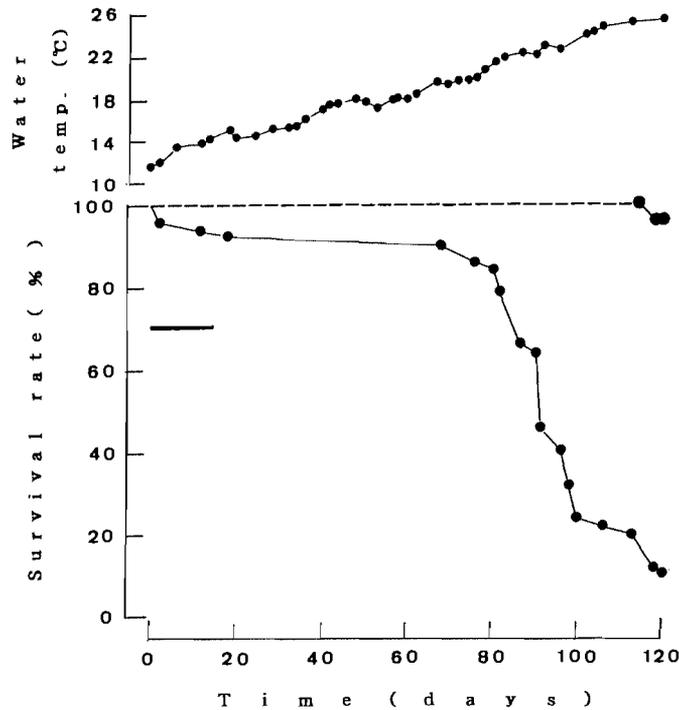


Fig. 32. Changes in survival rate of infected abalones and water temperature during experiment period. 1, Exposed to the drain water from a tank containing non-infected abalone (2-year-old) for 15 days (control); 2, Exposed to the drain water from another tank containing infected abalone (2-year-old) for 15 days.

Table 14. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones infected by exposure for 15 days to drain water from tanks containing 2 year old abalones surviving from amyotrophia

Infection source	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Negative group (healthy abalones)	96	0 / 5
Infected group (survivors)	10	9 / 12

陰性対照区では、試験期間中に摂餌の低下はなく、シェルターからの脱落個体もみられなかったが、試験終了直前の119日後に2個死亡し、48個が生残した。調べた5個体の生残貝には病理組織学的病変は観察されなかった。

感染耐過貝からの排水に曝した区では、試験開始3日後に2個、12日後に1個および18日後に1個の計4個の死亡があったが、以降しばらく死亡はなかった。摂餌が急に低下した73日後に死亡が始まり、以降は衰弱、死亡が多くなった。87日後から101日後までに27個が死亡し、この間殆ど摂餌しなかった。水温が24°C以上に上昇した104日後以降は死亡が減少した。病理組織検査では、7個体の衰弱、死亡貝および5個体中2個体の生残貝には病変がみられ、3個の生残貝には病変は観察されなかった。なお、試

験開始直後から18日後までの死亡貝については検査していない。

以上のように、感染耐過した2年貝から飼育排水を介して水平感染が成立することが明らかとなった。非感染の2年貝からの飼育排水に曝した区では感染は起こらなかった。したがって、感染耐過したクロアワビを稚貝と同じ施設内で育成する場合には、水平感染の可能性を十分考慮して作業すべきであると考えられた。なお、今回の試験期間中に耐過2年貝の死亡はなかった。

②採卵用親貝からの水平感染

各区の生残率および病理組織観察の結果を Table 15 に示す。

Table 15. Survival rate and histopathological changes in juvenile abalones cohabitated for 5 days with a brood stock

Donor (brood stock) for cohabitation	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Negative control (no donor)	94.5	0 / 6
A group	67.3	7 / 10
B group	55.6	4 / 12
C group	95.9	1 / 6

A group: apparently healthy female abalones of a brood stock. B group: weakened female abalones of a brood stock. C group: healthy male abalones of a brood stock.

陰性対照区では、試験期間中に3個の衰弱貝が取上げられ、52個が生残した。病理組織検査に供した衰弱貝1個および生残貝5個すべてにおいて、本症の特徴的な病変はみられなかった。

A群同居攻撃区では、試験開始40日後以降衰弱、死亡が増加して、16個が取上げられ、33個が生残した。病理組織観察に供した5個の衰弱貝の内4個および5個の生残貝の内3個に病変が観察された。

B群攻撃区では、A群と同様に、試験開始40日後以降衰弱、死亡が増加して、24個が取上げられ、30個が生残した。病理組織検査では、供試した7個体の衰弱貝の内4個体には病変がみられたが、残る3個体の衰弱貝と5個体の生残貝には異常は観察されなかった。

C群攻撃区では、試験期間中に2個の衰弱貝が取上げられたのみで、47個が生残した。病理組織検査では、調べた衰弱貝の内1個体および生残貝5個体の内の1個体に病変が観察された。

以上のように、親貝の飼育水槽に供試稚貝を5日間同居させると、同居稚貝に感染が成立することが明らかとなった。供試稚貝と親貝との直接的接触はなく、飼育水槽内に浮かべた飼育カゴに稚貝を収容しただけであり、明らかに水を介した感染が成立したと推察された。親貝の性別にみると、♀貝と同居させた稚貝における発病率が明らかに高いことが判る。また、外見的に健康な♀貝と病的徴候を示した♀貝の場合を比較すると、それぞれの稚貝における死亡率および発病率にはさほど大きな差がなかった。したがって、親貝、特に♀貝は外見的な健康状態にあまり関係なく、飼育水中に本症原因体を排出していることとなり、防疫対策上重要な問題と考えられた。感染耐過貝と同様、種苗生産施設における作業上、親貝からの水平感染の可能性には十分注意することが必要である。また、今回供試した採卵用親貝は、人工種苗をこれまで全く放流したことのない冠島地先で採捕された天然クロアワビ成貝であり、放流種苗の影響を直接的に受けていない天然貝の中にも筋萎

縮症の原因体の感染を受けている個体があると考えられた。

2) 天然貝における感染の有無

上記のように、採卵用親貝とした天然採捕クロアワビ成貝から健康稚貝への水平感染が確認され、天然貝の中に筋萎縮症の罹病貝が含まれている疑いが強くなった。そこで、京都府下2カ所の地先で採捕された、天然クロアワビにおける本症の罹病個体の有無を検討することとした。

材料および方法 漁場

京都府下で、毎年人工種苗を放流している漁場およびこれまで1度も人工種苗を放流したことのない漁場の2カ所とした。放流漁場としては京都府与謝郡伊根町蒲入のヤベタ漁場 (Fig. 31) を選定し、未放流漁場としては前出の冠島を選んだ。

供試天然貝

2カ所の漁場で1994年6月に潜水採捕された天然クロアワビ (ヤベタ漁場では11個、冠島では5個) を供試した。また、1996年7月にヤベタ漁場で潜水採捕された天然貝42個も供試した。

年齢査定

殻長を測定後、ワイヤーブラシで貝殻を磨き、貝殻に形成された年輪を指標として、天然貝の年齢を査定した。

罹病個体の有無の判定

貝殻から軟体部をはずし、腹足筋肉部の一部、鰓、外套膜および内臓部分の一部を切取って採材し、10%中性ホルマリン水で固定し病理組織観察に供し、前述のように罹病個体かどうかを判定した。

結果および考察

1994年6月および1996年7月にヤベタ漁場および1994年6月に冠島で採捕された天然クロアワビにおける、年齢別の病理組織観察の結果を Table 16 に示す。

Table 16. Histopathological changes in abalones captured at Yabeta and Kanmuriijima Island in 1994 and 1996

Year of collection	Location of collection	Age (year) of abalone	Shell length (mm)	Histopathological changes No. positive/No. examined
1994	Yabeta	1	47.1~ 56.0	0 / 4
		2	78.3	0 / 1
		3	76.4~105.8	1 / 4
		4	101.0, 116.8	2 / 2
1996	Yabeta	1	43.1~ 55.8	1 / 11
		2	66.6~ 91.9	5 / 29
		3	88.1, 109.3	1 / 2
1994	Kanmuriijima	1	64.0	0 / 1
		2	79.3~ 82.3	1 / 3
		3	91.4	0 / 1

1994年のヤベタ漁場の11個体内、3年貝1個体および4年貝2個体の計3個が罹病個体と判定された。1996年の42個体内、1年貝の1個体、2年貝の5個体および3年貝の1個体の計7個体が罹病個体とされた。ヤベタ漁場には感染耐過した人工種苗（1年貝）が毎年放流されているためもあってか、筋萎縮症に罹っていると考えられる天然個体が27%あるいは17%という割合で存在することが判った。

1994年の冠島の5個体内、2年貝の1個体が罹病個体と判定された。調査個体が少ないため、ヤベタ漁場との罹病率を比較することはできないが、人工種苗をこれまで全く放流したことのない冠島にも、天然罹病個体が存在することが明らかとなった。

以上のことから、筋萎縮症は京都府下沿岸に生息する天然クロアワビ中に元々存在していた可能性が窺われる。もしそうではなく過去に何等かの経路で種苗生産中の稚貝が感染し、それを放流することにより天然アワビにまで感染が広がったにせよ、現時点では天然クロアワビにも本症の原因体が存在することは間違いないものと考えられる。したがって、天然貝を親貝として採卵に供する場合、罹病個体が含まれることに十分留意すべきである。

3) 垂直感染

感染試験に供試する健全な稚貝は、隔離施設で試験的に数百~数千個体という単位で、小規模な種苗生産、育成を行い、水平感染を防除する形で飼育し確保してきた。しかし、量産規模で同様な隔離飼育を実施しても、筋萎縮症の発生がみられ（赤岩ら, 1997; 赤岩ら, 1998）、1993年採卵分では試験生産においても本症の発生があった。したがって、主に感染耐過貝や親貝からの水平感染を防除する

隔離飼育だけでは、本症の発生を防げないことが明らかとなった。

天然貝における筋萎縮症罹病個体の確認で、採卵に供する親貝からの水平感染ばかりでなく、原因体による卵膜周囲の汚染を含めた親貝からの垂直感染の可能性を検討する必要が生じた。そこで、卵汚染の可能性を検証するため、受精卵の洗浄による発症予防の効果について検討した。

材料および方法

採卵用親貝

1994年6月に若狭湾の冠島地先で潜水採捕され、京都府立海洋センターの親貝専用水槽で約1年4カ月間隔離飼育してきた♂、♀各3個（事前に生殖腺の色で雌雄を分け、生殖腺の成熟度の進んだものを供試）を採卵に供した。♂および♀各1個を1グループとして、A、BおよびCの3グループを設定した。

採卵

各グループの雌雄を個別別に採卵、採精することとした。卵および精液の排出の誘発は、一般的にアワビ類で行われる夜間止水とUV照射海水の組み合わせによる刺激に因った。すなわち、採卵予定の前日に個別別に採卵、採精用水槽に移し、1晩濾過海水の注水を止めて、エアレーションのみを行った。採卵日の朝、UV照射装置（千代田工販、フロライザー）に濾過海水を通し、UV照射した海水を緩く各水槽に注水した。注水を開始して1~2時間後に♂が精液を排出し始め、さらに30分~1時間後には♀が卵を呼水孔から吐出し始めた。卵をプランクトンネットで回収してプラスチックビーカーに海水とともに入れ、精液で白く濁った海水を加えて、受精させた。媒精後、A、BおよびCグループの受精卵をそれぞれ2群に分

けた。

受精卵の洗浄

2群に分けた各グループの受精卵の内、一方は洗浄を行う群、他方は行わない群とし、Aグループの洗浄群はA群、非洗浄群はa群とした。同様にBグループの洗浄群はB群、非洗浄群はb群とした。Cグループには非洗浄群を設けず、洗浄群はC群とした。

A, BおよびC群での洗浄の方法は以下のとおりであった。

i. 媒精後の受精卵を、UV照射海水を張ったバットにいたれたプランクトンネット製の集卵ネットに収容した。

ii. UV照射海水を掛け流して洗い、集卵ネットに受精卵を収容したまま水を切って、UV海水を張った別のバットに移した。

iii. iiの操作を30回繰り返して洗った後、濾過海水を張った60L容のプラスチック水槽（以下、ポリタルと呼称）に受精卵を収容した。

a群およびb群では、媒精後の受精卵をUV照射海水で余分の精子を軽く洗い流して、濾過海水を張ったポリタルにそのまま収容した。

孵化幼生の回収

それぞれ5個のポリタル中で孵化させた翌日、A, BおよびC群では、海水を攪拌させないように十分注意して、浮遊幼生（トロコフォア幼生）をサイフォンで吸い取って別のポリタルに回収した。a群およびb群では、ポリタル内の海水を一旦攪拌させ、しばらくして卵膜等が沈下してから、浮遊幼生をサイフォンで吸い取って回収した。回収したトロコフォア幼生がベリジャー幼生に変態した段階で、それらをポリタルから波板飼育水槽に移した。

波板飼育

予め付着珪藻を繁殖させておいた塩ビ製波板をセットした室外の波板飼育水槽に幼生を収容して波板に付着させ、稚貝に珪藻を摂餌させて育成した。A, B, aおよびb群

では100L容のパンライト水槽をそれぞれ2水槽用いた。また、C群では0.5m³容のFRP水槽を2水槽用いた。なお、水槽間の水平感染を防止するため、各水槽には透明塩ビ板で蓋をした。

稚貝飼育

殻長5mmに成長した稚貝は、塩ビ製波板から筆を用いて剥離し、各区約200個ずつを稚貝飼育に供した。剥離稚貝は、塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴ（38×24×25cm）に入れ、それぞれ別々のプラスチック水槽（50×37×21cm）に収容した。飼育期間は80日間とし、18°Cに調温した濾過海水を流した。期間中2～3日に1度水槽掃除を行い、市販のアワビ用配合飼料（日配ハリオスS）を投与した。なお、A, BおよびC群では、供試した200個以外の稚貝をそれぞれ剥離し、A'（731個）、B'（697個）およびC'群（2,943個）として、自然水温（13～18°C）で134日間別途飼育した（途中46日間のみ18°C一定水温とした）。

感染の有無の判定

各群の飼育期間中の衰弱貝および剥離50日後の生残貝各5個体（もしくは10個体）を10%中性ホルマリン水で固定し病理組織観察に供し、感染の成立を判定した。

結果および考察

飼育試験の結果（生残率）および50日後の生残貝における病理組織観察の結果をTable 17に示す。

193個の剥離稚貝を供試したA群では、80日後の生残率は98.5%であった。200個を供試したB群では100%であり、232個を供試したC群では99.1%であった。病理組織検査に供した、各区の50日後の生残貝には、いずれも病変はみられなかった。

193個の稚貝を供試したa群および200個を供試したb群では、30日経過した頃から衰弱、死亡が増加し、80日後のa群の生残率は53.1%で、b群のそれは76.0%であった。病理組織観察に供したa群の衰弱貝10個体および生残貝5

Table 17. Survival rate and histopathological changes in reared juvenile abalones hatched from washed or non-washed eggs obtained from 3 pairs of spawners

Group	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Washed A group	98.5	0 / 5
B group	100	0 / 10
C group	99.1	0 / 5
Non-washed a group	53.1	15 / 15
b group	76.0	22 / 22

A, B and C groups: fertilized eggs were obtained from different 3 pairs of spawners (A, B, C). a and b groups: control groups of A and B, respectively.

個体では、すべてに病変がみられた。b群の衰弱貝12個体および生残貝10個体のすべてにも病変が観察された。

一方、A' (731個)、B' (697個) および C' 群 (2,943個) では、生残率はそれぞれ95.8、96.6および98.4%であったが、A' 群では衰弱貝11個体中8個体には病変が観察され、生残貝5個体には観察されなかった。B' 群では衰弱貝9個体すべてに病変がみられ、生残貝10個体にはみられなかった。C' 群では生残貝10個体に病変は観察されなかった。

以上のように、受精卵を十分に洗浄したA、BおよびC群では非常に生残率が高く、生残貝に病変がみられなかったことから、これらの群は罹病しなかったものと考えられた。しかし、AおよびB群とそれぞれ同一受精卵を用いて洗浄しなかったaおよびb群では、AおよびB群に比べ生残率が低くなり、衰弱貝および生残貝のすべてに病変がみられたことから、洗浄しなかったために本症の感染が成立したものと推察された。したがって、受精卵を洗浄することによって、罹病を防げることが明らかとなり、受精卵の卵膜周囲に付着した原因体によって感染が成立するのではないかと考えられた。このように、感染経路として採卵用親貝からの垂直感染があることが明らかになった。

一方、A'、B' および C' 群では、生残率は非常に高かったものの、自然水温に戻した5月初旬頃から摂餌が低下し始め、衰弱貝が少しずつみられるようになった。A' および B' 群の衰弱貝では本症の特徴的な病変が観察され、感染が成立していたことが判った。その後 C' 群の衰弱貝の一部でも病変が確認され、本症に罹病していたと考えられた。

クロアワビの未受精卵あるいは受精卵の卵膜周囲にはゼリー層が存在しており、今回、洗浄後の受精卵にゼリー層が完全ではないが残っていることが実体顕微鏡観察で確認された。A'、B' および C' 群で本症の発生を完全に防止できなかったのは、洗浄で完全には落とせなかったゼリー層に原因していると考えられた。

第5節 対症療法としての昇温処理

筋萎縮症の発生を防止するためには、感染経路を遮断することが最も重要なことは既に述べたが、遮断できずに発生した場合、本症によるクロアワビ種苗の大量死をどのようにして軽減できるかということも種苗生産施設にとっては重要なことである。

第II章 第2節「伝染性の有無の検討」の項で述べた人為感染試験では、試験期間中水温は経日的に変動したが、水温がある限度を超えると感染稚貝の死亡率は急速に低下することが認められた。すなわち、水温が23~25°C以上

に上昇すると死亡率が急低下した。同様の傾向は、第I章第2節「中間育成における発生事例」の項で述べた自然発生例でもみられており、そこでは水温が25°Cを超えると死亡数は減少し始めた。また、第II章 第3節「筋萎縮症原因体の海水中での活性維持」の項で述べたように、25°Cでは5日後に病貝磨砕濾液の感染力が失われた。これらの事実は、水温の上昇により本症の病状の進行が抑制されることを強く示唆している。そこで、本症が発生した場合の対症療法として、飼育水温を人為的に上昇させることによって死亡数を抑制しうるかどうかにについて検討した。

材料および方法

供試稚貝

京都府立海洋センターで飼育中、本症が自然発生し、死亡し始めたばかりのクロアワビ稚貝群 (平均殻長 12.3 mm) 1,765個を供試した。これらの稚貝は、自然水温の濾過海水を流した飼育水槽中の網カゴにシェルターとして入れた2枚の塩ビ製波板 (28×20 cm) に付着しており、波板に付着した稚貝をそのまま1枚ずつの2群に分けた。1枚には792個の稚貝が付着し、他の1枚には973個が付着していた。

飼育方法

飼育期間は66日間とした。波板1枚 (792個) の群を試験群とし、別の1枚 (973個) を対照群とした。試験群は目合2 mmの網カゴ (100×100×50 cm) に収容し、水温を26°Cに設定した濾過海水を流したFRP水槽内に置いた。試験開始前の自然水温は19°Cであった。対照群は同じ目合の網カゴ (36×36×23 cm) に収容し、自然水温の濾過海水を流した別の水槽内に置いた。各水槽の換水率は6~7回転/時間とした。飼育期間中2~3日に1度水温を測定し、水槽掃除を行い、同時に市販のアワビ用配合飼料 (日配) と塩蔵ワカメを投与した。

死亡数の計数

水槽掃除の際、シェルターから脱落した衰弱貝および死亡貝を各群毎に計数し、両群の経時的な生残率の変化を比較した。

結果および考察

飼育期間中の試験群および対照群の生残率の経時的変化と水温の変化を Fig. 33 に示す。

試験群では、19°Cから26°Cへ急激に飼育水温を上昇させたため、発症貝が一気に死亡したことによると思われる多数の死亡 (225個) が昇温後1日以内に起こった。しかし、以降死亡は日数の経過とともに減少し、昇温2日後から10日後の間では71個、さらにその後の10日間では29個

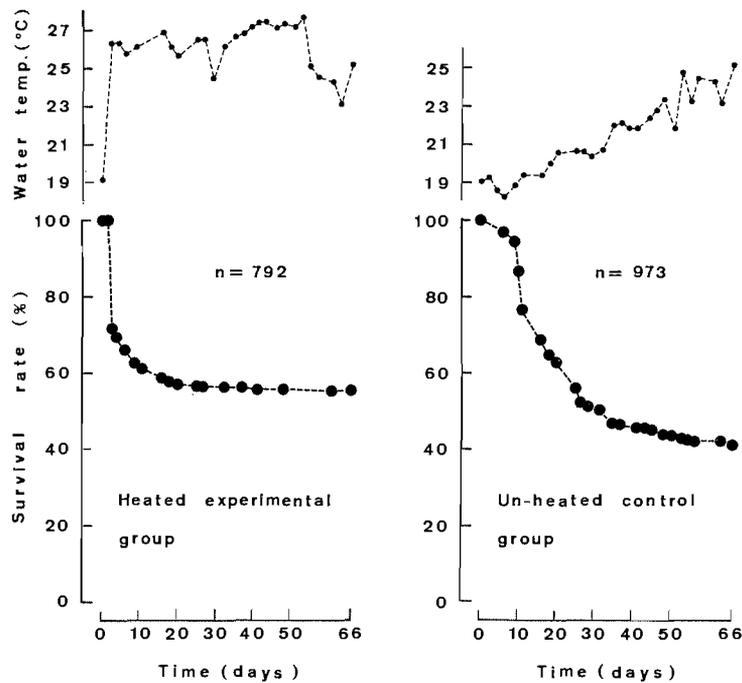


Fig. 33. Changes in survival rate of affected abalones and water temperature.

が死亡した。昇温20日後から試験終了時までの45日間では、16個が死亡したに止まった。試験終了時の生残数は451個で、生残率は57%であった。

一方、対照群では10日後までの死亡は230個で、その後の10日間では135個、さらにその後の10日間では125個が死亡した。30日経過後頃から死亡数は減少し始めたが、だらだらとした死亡は試験終了時まで続いた。試験終了時の生残数は402個で、生残率は41%であった。

試験群と対照群の生残率の差は、1%の有意水準で有意義であった。稚貝を収容した網カゴの飼育密度は、試験群では792個/m²、対照群では6,110個/m²と大きな差があった。しかし、稚貝は殆どが波板に付着しているため、波板付着面積(36×20 cm)当たりの密度で見ると、試験群は5,500個/m²、対照群は6,657個/m²となり、大差はない。したがって、生残率の差は昇温による差であろうと判断した。なお、栽培漁業センターでの通常の飼育では、飼育密度は殻長10 mm サイズで10,000個/m²とされる。

注目すべきことは、試験群では昇温10日後頃から摂餌が活発になり、死亡数が減少したことであり、特に20日後以降は対照群に比べ極端に死亡数が少なくなった事実である。このことは、供試稚貝群の中で試験開始時に既に症状が相当進んだ発症貝や衰弱貝は昇温によるショックで死亡し、ある程度進んだ個体も20日後頃までに逐次死亡した

が、試験開始当初には比較的軽微な症状であった個体では、26°Cという高水温下で症状の進行が抑制され、摂餌状態が改善されたことを示すものと考えられた。しかし、23~24°C程度の水温では死亡が完全には止まらないことは、今回の対照群の生残曲線から推察され、これまでの自然発生事例や人為感染試験例からも類推された。

飼育水温を一気に上昇させた今回の昇温試験では、昇温開始直後の死亡が大きすぎるため、段階的な昇温が実際であろう。また、発生が予測される場合には、死亡が始まる前に昇温させておく方が望ましい。実際、ある民間種苗生産施設では、ある年の春、死亡が始まる前に飼育水温を26°Cに昇温させたところ稚貝が全く死亡しなかったが、水温が低下した秋から冬にかけて本症による大量死が発生したとの情報があった。また、京都府栽培漁業センターでは年により一部の水槽で飼育水温を昇温させる加温飼育を実施しており、第1章 第1節「クロアワビ種苗生産実施府県における大量斃死の発生状況」の項で述べたが、1988年4月下旬から発生した大量斃死では6月中旬以降一部の水槽で調温ボイラーによる加温飼育(25°C)を行い、自然水温群と比べ稚貝の回復がかなり早くみられ、斃死率もやや減少した(赤岩, 1989)。1996年の事例では、加温効果がなかなか顕れず、昇温後2週間経過して回復がみられた(赤岩ら, 1997)。

上記の民間施設の例からも判るように、昇温による加温飼育は感染を予防するものではなく、単に死亡を抑制するものである。昇温前に飼育群での感染が既に成立しているため、加温飼育を実施しなかった秋から冬にかけては本症による大量死が発生したのである。また、飼育水温を昇温させるには、通常調温ボイラーを用いなければならない。本症が発生し始める時期の水温は13°C頃からであるため、10°C以上も飼育水温を上げる必要があり、燃料消費量が相当嵩むことになる。ボイラーの購入費や配管設備費も必要となり、種苗生産コストを上昇させる要因となるため、加温処理は実用的な方法とは言い難い。

第6節 予防対策の試み

感染経路として採卵用親貝からの垂直感染が最も重要であることが明らかとなり、受精卵の洗浄により筋萎縮症の発生をある程度防除できる可能性が示唆された。しかし、十分な洗浄によっても受精卵の卵膜周囲にあるゼリー層が完全には除去できないためか、本症の感染を完全には防止できないことが判った。

ウイルス性神経壊死症(VNN)はシマアジをはじめ5日11科22種(海外での事例を含む)もの魚類の仔稚魚に発生し、我が国のみならず東南アジアやヨーロッパではこれらの魚種の仔稚魚の生産に多大な被害をもたらしている(室賀ら, 1998)。このVNNの原因ウイルスの不活化法についてはいくつかの消毒剤等が検討され、410 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 4分間の紫外線照射や0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (残留オキシダント) 2.5分間のオゾン処理が原因ウイルスの不活化に有効であると報告されている(Arimoto *et al.*, 1996)。Watanabe *et al.* (1998)は、マツカワにおけるVNNの発生防止対策として、抗体検査で陰性と判定された親魚を用いて人工受精を行い、受精卵をオゾン処理海水で消毒し、孵化仔魚をオゾン殺菌した海水で飼育することによりVNNの発生を抑えることができたと報告した。

ここでは、クロアワビの筋萎縮症の発生予防対策として、オゾン海水による受精卵の処理および処理後の受精卵の洗浄との組み合わせが有効かどうか検討した。

材料および方法

クロアワビ受精卵

京都府栽培漁業センターから提供を受けたクロアワビ受精卵を供試した。この受精卵を2群に分け、1群はオゾン処理と洗浄を行う洗卵群とし、他の1群は無処理の対照群とした。

オゾン海水の調製

無声放電法による可搬型のオゾン発生器(荏原実業(株)水

産研究所製)を用いて発生させたオゾンを接触層で流水状にした濾過海水中に吹き込み、できたオゾン海水を1 m^3 容パンライト水槽に貯めた。残留オキシダント濃度を約0.5 ppmとなるように調整した。なお、実験開始前、実施中および終了時に測定した残留オキシダント濃度はそれぞれ0.42 ppm, 0.33 ppm および0.43 ppmであった。

オゾン処理および洗浄操作

洗卵群の受精卵をプランクトンネット製の集卵ネットに収容し、パンライト水槽に貯めたオゾン海水を、集卵ネットをいれたバットに緩くかけ流して5分間浸漬処理した。その後、本章第4節第3項「垂直感染」で述べた洗浄操作を15回行った。処理後の受精卵は、ポリタルに収容して孵化させた。対照群では、無処理のままポリタルに収容し孵化させた。

ゼリー層の観察

洗浄操作前後における受精卵の卵膜周囲のゼリー層の付着状況を顕微鏡で観察した。受精卵を含んだ海水をペトリ皿にとり、墨汁を海水で100倍に希釈したものを同量加えて、墨汁の濃淡でゼリー層を浮き上らせて観察した。

孵化幼生の回収

両群ともポリタル内で孵化させた翌日(孵化率は洗卵群で88.0%, 非洗卵群では89.5%), ポリタル内の海水を攪拌させないように十分注意して浮遊幼生をサイフォンで吸い取ってそれぞれ別々のポリタルに回収した。ベリジャー幼生に変態した段階でポリタルから波板飼育水槽に移した。

波板飼育

予め附着珪藻を繁殖させた塩ビ製波板をセットした3.6 m^3 容のコンクリート水槽に洗卵群の幼生を移し、波板に沈着稚貝を附着させて採苗した。稚貝には附着珪藻を摂餌させ飼育した。対照群では、同様に、附着珪藻を繁殖させた波板をセットした100 L容ポリカーボネイト水槽に移して、飼育した。

稚貝飼育

殻長5 mm程度に成長した稚貝を順次筆で波板から剝離し、約200~500個毎に塩ビ製波板をシェルターとして入れた網カゴに入れ、それぞれ別々のコンテナ水槽(洗卵群No. 1~10, 非洗卵群No. 11)に収容して、隔離飼育した。コンテナ水槽には5~6回転/時間で濾過海水を流し、3~4日に1度水槽を掃除し、市販のアワビ稚貝用配合飼料(日配ハリオスS)を投与した。

感染の有無の判定

各コンテナにおける試験期間中の衰弱貝および試験終了時の生残貝計5個(コンテナNo. 1, 3および8では生残貝を各1個)を、10%中性ホルマリン水で固定し病理組織

Table 18. Survival rate and histopathological changes in offsprings from washed and non-washed eggs

Group	Container No. (number of individuals)	Survival rate (%)	Histopathological changes No. positive/No. examined
Washed eggs	No. 1 (210)	99.0	1 / 1
	No. 2 (205)	97.5	5 / 5
	No. 3 (210)	96.1	1 / 1
	No. 4 (210)	91.9	5 / 5
	No. 5 (200)	90.0	5 / 5
	No. 6 (190)	86.3	5 / 5
	No. 7 (206)	100	0 / 5
	No. 8 (253)	97.6	1 / 1
	No. 9 (485)	98.1	5 / 5
	No. 10 (243)	90.9	5 / 5
Non-washed eggs	(275)	94.5	5 / 5

Washed eggs No. 1~10: fertilized eggs were disinfected with ozonated seawater with 0.5 ppm of TROs for 5 minutes, and washed 15 times with filtered sea water. Hatched larvae were reared in a tank to juvenile abalones, and removed into separate containers (No. 1~10). Non-washed eggs: fertilized eggs were not disinfected or washed.

観察に供した。固定された貝から常法に従ってパラフィン切片を作製し、本症の特徴的な病変の有無を観察することにより、感染の成立を判定した。

なお、稚貝の剥離時期はコンテナにより最大43日間の差があるうえ、飼育中に衰弱、死亡貝が始め、死亡率が10%程度に達して、これら衰弱、死亡貝の貝殻に欠刻がみられた場合には、コンテナ間の水平感染を防止するため、その時点で飼育を中止し、飼育していた稚貝は全数廃棄処分とした。このため、飼育期間は各コンテナによりバラバラとなった。

結果および考察

洗卵群の各コンテナに収容した剥離稚貝数と非洗卵群における剥離稚貝数、飼育終了時での生残率および病理組織観察の結果を Table 18 に示す。

洗卵群における生残率は、No. 4~6 および No. 10 の4コンテナでは86.3~91.9%であったが、他の6コンテナでは96.1~100%であり、いずれも非常に高かった。非洗卵群でも生残率は94.5%であったため、生残率に差異はなかった。また、病理組織観察では、No. 7 のコンテナのみ病変が観察されず、他のすべてのコンテナでは衰弱貝および生残貝に病変がみられた。

一応飼育開始後の水平感染がなかったと仮定すれば、本実験の結果からは、受精卵を当初残留オキシダント濃度0.5 ppm のオゾン海水に5分間浸漬し、その後受精卵を15回洗浄しても、受精卵周囲を汚染した本症原因体は不活化あるいは除去できなかったと考えられた。洗浄前の受精

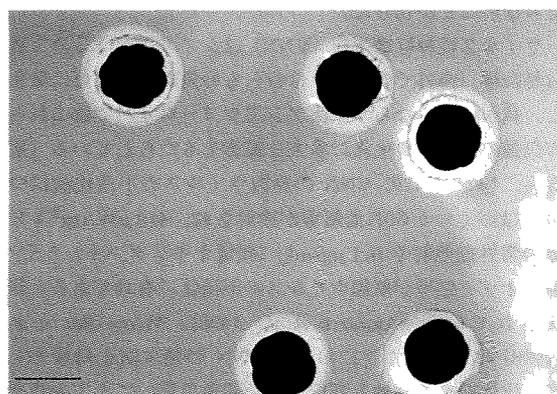


Fig. 34. Eggs coated with jelly before washing. Bar: 0.2 mm.

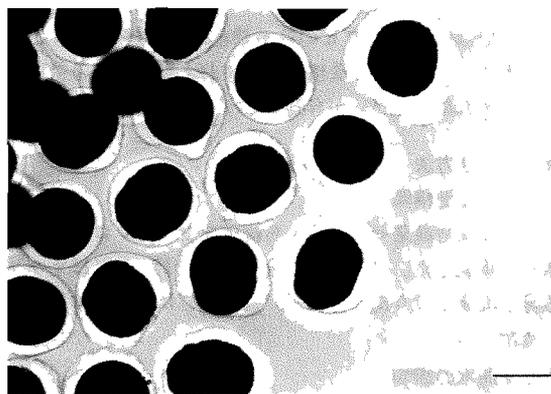


Fig. 35. Eggs after washing. Bar: 0.2 mm.

卵周囲のゼリー層の付着状況を Fig. 34 に、洗浄後の付着状況を Fig. 35 に示すが、ゼリー層の完全な除去はできておらず、これが一部の汚染を残す原因になったのではと推察された。無論、本症原因体が受精卵の内部に存在する可能性は否定できず、その場合には受精卵を消毒して本症の発生を防止することは不可能となろう。

なお、クロアワビ受精卵を十分に洗浄して、卵膜周囲のゼリー層を薄くするか、ゼリー層を除去してから、残留オキシダント濃度 0.5~1.0 ppm のオゾン海水に浸漬すると、浸漬時間に比例して受精卵の卵膜が消失してしまう比率が高まること、予備試験で明らかとなった。しかしその場合、正常な孵化ができなくなり、孵化率が低下したり、卵が完全に破壊された。今回の試験では、このような予備試験の結果を踏まえて、オゾン海水処理を先に実施し、その後卵洗浄を行うことにしたが、本症の予防対策としては効果が少なく、オゾン海水はクロアワビ受精卵の消毒には使用できないと判断せざるを得なかった。今後は、どのようにすればゼリー層を除去することができるか、種苗生産施設でも実施可能な方法で検討しなければならぬ。

第IV章 総合考察

海産無脊椎動物の中で軟体類の二枚貝類には、カキ類、ムラサキイガイ類、ホタテガイ類、ザルガイ類、ハマグリ類およびオオノガイ類等と経済的に重要な位置を占める種類が多くあり、世界中で多量に漁獲され、消費されている。巻貝類の中では、世界的にみればアワビ類が最も重要な資源の一つと考えられる。

LAUCKNER (1983) は、二枚貝類の疾病に関する総説の中で、長い間後生動物門の寄生虫による疾病が、海産二枚貝類の主要な疾病と考えられてきたが、ここ20~30年の研究で微生物や原生動物による疾病が基本的に重要であることが判ってきたと述べている。また、彼は、ウイルスおよび真菌類は浮遊幼生期の二枚貝類にとって主要な病原体と考えられ、細菌や真菌類は二枚貝類の種苗生産場で問題となり、主に Labyrinthomorpha, Apicomplexa や Ascetospora 門の原生動物は経済的に重大な損失を与える疾病を二枚貝類に引き起こすとも述べている。

SINDERMAN and LIGHTNER (1988) は、北米での海産軟体類養殖における疾病についての総説の中で、養殖、天然を問わず二枚貝類には広範な微生物による疾病がありとしており、種苗生産期におけるピブリオ病や真菌類の関与する病気がカキ養殖での問題とされ、一方、*Haplosporidium nelsoni* と *Perkinsus marinus* といった原生動物が北米中部大

西洋岸やメキシコ湾のカキ養殖海域での主要な損失の原因となっていると述べている。また、ほとんどの海産養殖対象種の場合と同様に、二枚貝類の幼生期においてもピブリオ病は重要な病気となっている。1970年代以降、カキ類、ハマグリ類やムラサキイガイ類といった多くの二枚貝類の稚貝や成貝において、致死的で広範な分布を示す播種性肉腫と呼ばれる疾病が流行しており、未だ原因は不明であると述べている。この播種性肉腫については後でもう一度触れる。

BOWER *et al.* (1994) は、産業的重要介類の伝染性疾病と寄生虫症についての総説の中で、カキ類、ムラサキイガイ類、ハマグリ類、オオノガイ類、ザルガイ類およびホタテガイ類といった二枚貝類の疾病をウイルスや細菌、原生動物といった原因別に症状や診断法、対策について多くの紙面を割いて記載している。彼らは、需要の急増に応じて介類養殖が世界中で急速に発展し、それに伴う生産物や種苗の移動が介類の疾病の拡散を助長してきたと述べている。彼らの総説では、特に *Haplosporidium* や *Marteilia* 等の原生動物による疾病が多く取り上げられており、これらの原虫症が二枚貝類における深刻な病気であることが判る。なお、国際的移動の制限が貝類の疾病伝播の防除にいかに重要であるかは、最近になってようやく理解されるようになった (RENAULT, 1996; HINE, 1996)。

海外では、二枚貝類の中でも古くからカキ類の養殖が盛んで、カキ類における疾病の研究が最も進んでいることが上記の事例からも伺える。そこで、カキ類の病気についてさらに触れることとする。

ヨーロッパや米国では原虫類寄生による養殖カキの被害は1950年代から問題となっており、1980年代までのそれらに関する研究成果は、“Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs” にとりまとめられている。この本の中で、GRIZEL *et al.* (1988) は、ヨーロッパヒラガキ *Ostrea edulis* の原虫 *Bonamia ostreae* に起因するボナムア症による経済的な損失が、軟体類における疾病研究の成果をもたらしたと論じた。HASKIN and ANDREWS (1988) は、米国西岸のチェサピーク湾からデラウェア湾にかけて過去30年間に亘ってアメリカガキ *Crassostrea virginica* に重大な被害をもたらした *Haplosporidium nelsoni* (MSX) の被害の実態について報告し、累積死亡率は90~95%に達したと述べている。FIGUERAS and MONTES (1988) は、ヨーロッパヒラガキの Aber disease は、Occulusosporida 目か Paramyxia 目に分類される原生動物に属する *Marteilia refringens* が原因とされる疾病で、ヨーロッパヒラガキにとって非常に深刻な被害を及ぼすと紹介している。ANDREWS (1988) によれば、原虫の *Perkinsus marinus* は米国のチェサピーク湾以

南の大西洋岸からメキシコ湾にかけてのアメリカガキの主要な疾病の原因であり、この病原体は温暖な水温を好み、少なくとも12~15‰以上の塩分濃度が必要であるとした。

なお、これらの原虫症は現在でも重要視され、国際獣疫事務局 (OIE) ではボナミア症、ハブロスポリジウム症、マルテイリア症、マイクロサイトス症およびパーキンサス症といった5種類の原虫症を、届出を要する疾病に挙げている (OIE, 1997)。

SINDERMANN and LIGHTNER (1988) は、カキ類の疾病として11種の病気を挙げ、原因、宿主、症状、診断法、流行病学的知見、病原性、対策や予防法等について記載している。11種の病気とは、マガキ *Crassostrea gigas* の Oyster velar virus disease, アメリカガキ, マガキおよびヨーロッパヒラガキの Vibriosis of larval oysters (幼生期のビブリオ病, bacillary necrosis), アメリカガキおよびヨーロッパヒラガキの Vibriosis of juvenile oysters (稚貝期のビブリオ病), アメリカガキ幼生の Larval mycosis, マガキの Digestive tract impaction of larval oysters, アメリカガキの Herpes-type virus disease, アメリカガキの Apicomplexan disease (*Perkinsus marinus*), アメリカガキの *Haplosporidium nelsoni* disease, アメリカガキの *Haplosporidium costale* disease, アメリカガキ, マガキおよびオリンピアガキ *Ostrea lurida* の Hematopoietic neoplasms 並びにマガキおよびオリンピアガキの *Mytilicola* disease の計11種である。BOWER *et al.* (1994) は、カキ類の病気として45種もの疾病名を挙げ、これらの病気の原因、宿主、分布域および診断法について主に解説している。

次に、これらのカキ類の病気のうちからウイルス病を取り上げてみた。LAUCKNER (1983) は、二枚貝類における初めてのウイルス性疾病の事例としてアメリカガキにおける Herpes-type virus を挙げており、同様のウイルスがマガキにもみつかった事例とアメリカガキの Ovocystis disease (=Viral gametocytic hypertrophy) の原因としての Papovavirus の事例を紹介した。

COMPS (1988) は、ポルトガルガキ *Crassostrea angulata* の Gill necrosis virus disease と Hemocytic infection virus dis-

ease およびマガキの Oyster velar virus disease の罹病貝における組織および細胞病理学的な特徴について述べ、いずれもイリドウイルスに類似したウイルスが原因であるとした。

GIBBONS and BLOGOSLAWSKI (1989) は、北米における二枚貝類の養殖についての総説の中で、ウイルス性疾病としてアメリカガキにおけるヘルベスウイルス感染症、ポルトガルガキおよびマガキの Gill disease の原因とされるイリド様ウイルス、大量死のマガキからみつかったイリド様ウイルスの例をあげている。BOWER *et al.* (1994) は、Oyster velar virus disease, Gill disease of Portuguese oysters, Hemocytic infection virus disease, Viral gametocytic hypertrophy および Herpes-type virus disease の5種を挙げている (Table 19)。これらのうち3種 (Oyster velar virus disease, Gill necrosis virus disease, Hemocytic infection virus disease) はいずれも、イリドウイルスが原因ウイルスだと考えられている。なお、OIE (1997) の診断マニュアルではこれらをイリドウイルス症としてまとめ、軟体類の重要疾病に挙げられている。Viral gametocytic hypertrophy (VGH) および Herpes-type virus disease の2種は、Papillomavirus-like papovavirus および Herpes-type virus がそれぞれ原因とされる。したがって、5種のうち4種の病気は DNA ウイルスが原因とされ、RNA ウイルスが原因と想定されるカキのウイルス病の報告は VGH 1種のみである。これら5種のウイルス病の予防や治療法は、これまでのところいずれも知られていない。

次に、他の貝類の疾病の中でウイルスが原因とされる、あるいは原因と想定されるものを調べてみた。OPRANDY *et al.* (1981) は、セイヨウオオノガイ *Mya arenaria* における造血細胞腫 (現在では播種性肉腫に含められている) の原因ウイルスの分離に成功し、B型レトロウイルス様だと報告している。LAUCKNER (1983) は、ホンビノスガイ *Mercenaria mercenaria* からアメリカガキの Herpes-type virus と同様のウイルスがみつかった事例および IPN ウイルスと免疫学的性質が類似した1種のレオウイルス (現在の分類ではビルナウイルス) がニッコウガイ科の二枚貝 *Tel-*

Table 19. Major viral diseases of oyster in the world

Disease	Host species	Virus
Oyster velar virus disease (OVVD)	<i>Crassostrea gigas</i> (larvae)	Icosahedral DNA virus (iridovirus)
Gill necrosis virus disease (GNVD)	<i>C. angulatus</i> , <i>C. gigas</i>	Icosahedral DNA virus (iridovirus?)
Hemocytic infection virus disease (HIVD)	<i>C. angulatus</i> , <i>C. gigas</i>	Icosahedral DNA virus (iridovirus?)
Viral gametocytic hypertrophy (VGH)	<i>C. virginica</i> (<i>C. gigas</i> , <i>C. commercialis</i> , <i>C. rhizophorae</i> , <i>Ostrea lurida</i>)	Papillomavirus-like Papovavirus
Herpes-type virus disease	<i>C. virginica</i> , <i>C. gigas</i>	Herpes-type virus

lina tenuis から分離された事例を紹介している。GIBBONS and BŁOGOSŁAWSKI (1989) は、ホンビノスガイから分離されたビルナウイルスおよびセイヨウオオノガイからみつかったパボバ様ウイルスの例を挙げている。

しかし、LAUCKNER (1983) は、二枚貝類から報告のあったウイルスあるいはウイルス様粒子は他の疾病に罹病した個体や環境ストレスを被った個体から検出された例があり、単なる‘ストレス寄生体’と考えられる場合があると述べている。また、これらのウイルスが海産二枚貝類における疾病の中で担っている役割が十分に理解されていない、すなわち、第一次病原体なのか二次的なストレス寄生体なのかを明らかにする必要があり、さらには二枚貝類は水中からヒトのエンテロウイルスを濃縮することも考慮すべきだとしている。

PETERS (1988) は、海産二枚貝類での発生報告がある播種性肉腫 (disseminated sarcoma) (=造血細胞腫) に関する研究についての総説の中で、これらの肉腫の原因としては貝類の代謝異常に影響する環境ストレス、石油由来の炭化水素、多環芳香族炭化水素やニトロソアミン等の発癌物質との関連、ウイルスの感染およびこれらの複合作用、また、二枚貝自身の細胞内にあるプロウイルスの存在等、多角的に検討する必要があると指摘した。また、彼は、播種性肉腫の原因としてウイルスが想定される事例がいくつかあり、海産二枚貝類からはいくつかのウイルスの検出報告があるが、OPRANDY *et al.* (1981) の原因ウイルスの分離には疑問があり (追試として実施した電子顕微鏡観察でウイルス様粒子が観察されなかった)、ウイルス原因説には追試が必要であると述べている。この播種性肉腫 (disseminated neoplasia) は、1969年に最初にカキで発見され、既に30年も経過するが、依然として原因は特定されていない。最近 HOUSE *et al.* (1998) は、セイヨウオオノガイを用いて本病について検討しており、罹病貝の磨砕液を接種することにより病気を再現し得たが、磨砕液を濾過 (0.45 μm) したものでは感染を引き起こすことはできなかった。また電顕観察によってもウイルス粒子は捉えられなかったが、病貝からは逆転写酵素が検出され、レトロウイルスが関与している可能性が残された。

このように、海産二枚貝類からウイルスが検出されたからといって、そのウイルスが疾病を引き起こし貝を死亡させるかどうかは別問題であり、そのことを実証することはかなり難しいと考えざるを得ない。

鈴木 (1990) は、二枚貝類を中心にした海産無脊椎動物にみられる腫瘍についての総説の中で、11種の海産二枚貝類における腫瘍発生リストを示し、殆どが造血細胞腫であることを示している。また、この総説の中で、二枚貝類で

は培養株化細胞が得られていないため、細胞レベルでの研究が行われておらず、ウイルスと腫瘍との関係は十分に理解されていないとしている。

以上のように、二枚貝類においては多くの病気についての研究がなされ、ウイルスが関係すると考えられる病気の事例もいくつかあった。そこで、今度は、世界におけるアワビ類での疾病の報告を調べてみた。

ELSTON (1990) によれば、広く養殖される *Haliotis rufescens* におけるピブリオ病の事例、オーストラリアで漁獲される天然 *H. ruber* における *Perkinsus olseni* による原虫症の事例および *H. rufescens* と *H. kamtschataka* における *Labyrinthuloides haliotidis* による原虫症の事例を挙げている。*L. haliotidis* による原虫症は、アワビの種苗生産場で育成中の稚貝に大量死を引き起こす原因と報告されている。

前出の BOWER *et al.* (1994) は、アワビの病気として以下の4種を挙げている。*Haliotis rufescens* および *H. kamtschataka* の稚貝におけるピブリオ病 (*Vibrio* spp.; 米国およびカナダの種苗生産場)、*H. ruber*、*H. laevigata* および *H. cyclobates* における *Perkinsus* disease (*P. olseni*; 南オーストラリア)、*H. cracherodii*、*H. rufescens*、*H. corrugata*、*H. fulgens*、*H. walallensis* および *H. kamtschataka* における *Kidney coccidia* (種未同定の *coccidia*; 米国、カナダ) 並びに *H. kamtschataka* および *H. rufescens* 稚貝における *Labyrinthuloides haliotidis* (カナダ西海岸) の4種である。

ALSTATT *et al.* (1996) によれば、米国西海岸のカリフォルニア中部沿岸では、1980年代以降クロアワビ *H. cracherodii* の天然資源の著しい減少が問題となっており、その原因は Withering syndrome と呼ばれる疾病によるものと考えられている。GARDNER *et al.* (1995) は、この Withering syndrome 罹病貝の病理組織検査を行い、消化盲嚢の酵素分泌細胞や腸管の上皮細胞に感染した細胞内原核生物をみつけた。この原核生物は、桿状でリボゾームに富み、グラム陰性で三重構造の細胞壁を有することから、リケッチア目に属すると考えられた。微生物学および原生動物学的な検査で他の微生物は確認されず、多環芳香族炭化水素やPCB、塩素系殺虫剤等の化学物質の汚染もないことが確認され、この細胞内原核生物 (リケッチア) が原因と考えられた。また、腎臓に寄生するコクシジウムが問題にされたこともあったが、現在ではそれが原因であるという見方は否定され、またリケッチアが原因とは断定できないという報告もある (FRIEDMAN *et al.*, 1997)。

一方、中国での養殖エゾアワビにおいて稚貝の大量死が発生し、罹病貝の腹足、外套膜および内臓器官の血液細胞内に直径 90~140 nm のレトロ様ウイルス粒子が観察され、人為感染試験により自然発症貝と同様の症状が再現さ

れ、50%の死亡率がもたらされた (WANG *et al.*, 1997)。

我が国におけるアワビ類の病気についての報告例では、松永 (1967) によるクロアワビおよびメガイアワビでの傷アワビ症 (*Vibrio sp.*) に関する事例があるのみである。

以上のように、我が国を含めて巻貝類であるアワビ類の疾病に関する研究は、世界的にも二枚貝類に比べて非常に少なく、特にウイルス性疾病についての研究例は中国における1例しか見当らなかった。

我が国におけるクロアワビの筋萎縮症は、本症罹病貝の磨砕濾液を用いた人為感染が成立したことから、本症は濾過性病原体による感染症であることが明らかになった。病貝ばかりでなく感染耐過貝や採卵用親貝も原因体を水中に排出し、水を介して水平感染が成立することも判った。同様に、人為感染試験の結果から、本症の病状の進行は非常に緩やかであり、亜急性～慢性疾患であろうと判断された。

本症に罹病した貝には、摂餌および付着力の低下、腹足筋肉の萎縮および貝殻辺縁部の欠刻、着色が認められた。しかし、確実に診断するためには、これらの症状の観察に加えて、病理組織検査を実施し、特徴的な病変、すなわち、腹足神経幹および末梢神経系、鰓、外套膜あるいは上足等における異常細胞塊 (腫瘍) の存在を確認する必要がある。

本症の人為感染手法としては、病貝の磨砕濾液を用いた浸漬法と筋注法が有効であるが、いずれの場合も、試験期間が50日間以上と長くなるため、試験区間の水平感染の防止や飼育作業時における感染防止には十分な注意が必要である。

クロアワビにおける本症の感受性サイズは、感染試験によれば孵化幼生から2年貝までと幅が広いが、成長とともに感染しにくくなり、死亡しなくなる。このことは、実際の中間育成場で1年貝や2年貝での発症、死亡といった被害が少ないことと一致するように思われる。

本症の原因体は濾過性病原体であり、塩素および紫外線に感受性があることから、ウイルスであろうと考えられた。桃山・門永 (1995)、桃山ら (1997) および桃山ら (1999) は、本症罹病貝の組織を電子顕微鏡を用いて観察したが、ウイルス粒子は観察できなかった。これは組織中のウイルス粒子が非常に少ないためと考えられるが、いずれにせよ罹病貝組織中の原因ウイルス粒子の探索は難しいと考えられた。

本症罹病貝の磨砕濾液を用いた各種の人為感染試験の結果、本症原因体は熱 (50°C, 30分間) に不安定で、酸 (pH 3.0) に感受性があり、エーテルには感受性がないこ

とが判った。桃山・門永 (1995) は、病貝磨砕濾液の濾過サイズ別の感染試験を行い、病原体の大きさは0.1 μm以上であるとした。著者の感染試験結果から、0.22 μm以下であることは判っており、原因ウイルスの大きさは0.1~0.22 μmの範囲内にあると考えられた。大きさ、形およびIUdRに非感受性であったことからレトロウイルスに近いとも考えられるが、現段階では分類学的検討を行えるだけの十分なデータはない。なお、確実に感染性を有する病貝磨砕濾液中のウイルスを特定できていないことや、血球初代培養を用いて分離したウイルスの病原性が確認できていないことから、原因ウイルスは未だ特定されていないといわざるを得ない。

メガイアワビは本症に罹らないことは先にも述べたが、PETERS (1988) が指摘しているように、アワビの細胞内におけるプロウイルスの存在の可能性も考慮する必要がある。また、畑中 (1997) が述べているように、レトロウイルスは感染性のない未成熟粒子として出芽し、環境中のpHの変化とウイルス粒子のプロテアーゼ活性により成熟し感染性を獲得するとされる。小林 (1992) によれば、癌遺伝子を有するレトロウイルスでは、培養で得られる粒子は唯一の例外を除いていずれも欠損型ウイルスであることが知られている。本症の原因ウイルスがレトロウイルスであるとすれば、クロアワビの血球初代培養で分離培養されたウイルスは癌遺伝子を持たない増殖型のウイルスであった可能性がある。いずれにせよ、分離培養したウイルスを用いての感染試験の例数が少ないこともあり、今後培養方法を変えるなどして更に検討を加える必要はあろう。

原因ウイルスは、塩素剤 (当初有効塩素濃度 500 ppm, 5分間; 50 ppm, 10分間) やヨード剤 (当初有効ヨウ素濃度 50 ppm, 10分間) といったハロゲン系消毒剤で不活化でき、70%エタノール (10分間) によっても不活化が可能であった。また、50°C以上であれば、1分間で不活化できた。

本症の発生水温は、13~25°C (大体4月~7月) の範囲であるが、23~25°C以上に上昇すると、死亡数が減少し自然終息する傾向が強い。本症罹病貝の磨砕濾液を滅菌海水中に混ぜて、10, 18°C および 25°C の各温度で5, 10 および20日間おいた後感染試験を行ったところ、25°Cでは5日後には感染性が完全に失われており、高水温で原因体の感染性が失われやすいことが裏付けられた。また、人為的に飼育水温を26°Cに昇温させると、死亡数を抑制できることが明らかとなり、本症の対症療法としては有効であると判断された。

京都府栽培漁業センターでは、過去に全く人工種苗を放流したことのない若狭湾の冠島地先 (Fig. 31) で採集され

た親貝を、これまで採卵に供してきた。しかし、冠島地先で採集された天然クロアワビにも本症の特徴的な病変が病理組織観察でみつかった。採卵用親貝を採集していた地先の天然クロアワビに病変がみつかったこと、および受精卵の洗浄が本症の防除に有効であった事例が存在したことから、採卵用親貝からの垂直感染（卵汚染を含む）が重要な感染経路である可能性が考えられた。冠島以外の丹後半島地先の天然クロアワビにも筋萎縮症罹病個体がみつかり、本症は、元々府下の天然クロアワビ資源に存在していたのではないかと考えられた。したがって、原因ウイルスに感染したクロアワビ成貝が、種苗量産施設に持ち込まれ、高率に垂直感染を引き起こし、過密飼育の中で水平感染を繰り返す、高い死亡率をもたらすようになったものと思われる。

受精卵を洗浄することによる防除を試みたが、受精卵の卵膜周囲にはゼリー層が存在するためか、その効果は上がらなかった。そこで、何度も洗浄することによってゼリー層を除去することを試みたが、完全には除去できず、卵洗浄の効果は認められなかった。このゼリー層は、酸性海水、 Ca^{++} 欠如液、蛋白酵素によって溶けると記載されている（岩波生物学辞典、1960）。梶山（1975）は、ゼリー層は機械的にはがして集めることができ、海水の pH を 5.8 くらいまで下げて溶解させようとしている。これらのことから、酸性にした海水あるいは Ca^{++} 欠如食塩水等を用いて、ゼリー層の剝離、溶解を試みたが、いずれも失敗に終わった。今後はトリプシン等の酵素を実験してみる必要はあろう。

細菌性疾患やウイルス性疾患等の感染症では、その診断には免疫学的手法が採用されることが多い。しかし、無脊椎動物であるクロアワビには抗体が存在しないため、免疫学的診断手法の応用はできない。現状では本症の診断方法としては病理組織学的手法しかなく、原因ウイルスを特定し、ウイルス遺伝子の解析に基づく PCR 法やモノクローナル抗体による確定診断法や早期診断法の開発が待たれる。

クロアワビの筋萎縮症罹病貝では、Withering syndrome 罹病貝にみられるような、消化盲嚢や腸管上皮における病変は確認できなかった（GARDNER *et al.*, 1995）。また、Withering syndrome は天然の成貝を含めすべての大きさの貝に発生するとされ、専ら稚貝に発生する筋萎縮症とは異なり、本症は Withering syndrome とは異なる疾病であると判断した。

アワビ類からのウイルス性疾患として唯一の事例である、中国の養殖エゾアワビの例（WANG *et al.*, 1997）では、筋萎縮症でみられるような異常細胞塊（腫瘍）の形成につ

いての記載がなく、また人為感染試験では経口攻撃9日後に死亡が始まり、20日目以降には死亡する個体がないとなっており、筋萎縮症とは異なると考えられた。

なお、OHTSU and SASAKI（1997）は、福岡県下で発生したクロアワビの筋萎縮症罹病稚貝を電子顕微鏡で観察し、神経幹の近くの細胞質中に直径約 100 nm のウイルス様粒子を観察しているが、感染試験は実施しておらず、そのウイルス様粒子の病原性は不明である。

以上の如く、本研究では原因ウイルスそのものを特定するには至っていないが、いくつかの状況証拠から本症はウイルスを原因とする感染症であると考えられる。今後は原因ウイルスを特定するとともに、感染してから筋萎縮症を呈するに至るまでの病理過程を明らかにする必要がある。ウイルスそのものが捉えられれば、上述の如く分子生物学的手法を用いてウイルスフリーの親貝の選択が可能となり、防除対策への道が開けるものと考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始懇切なる御指導並びに御教示を賜り、さらに本論文の御校閲を頂きました恩師 広島大学生物生産学部 室賀清邦教授に謹んで深謝の意を表します。

また、広島大学生物生産学部 西澤豊彦助手には多大の御助言と御指導を賜りましたことを心より感謝申し上げます。本論文を原稿の段階でお読みいただき、種々の有益な御指摘をいただいた、同学部の中川平介教授、難波憲二教授および中井敏博助教授に謝意を表します。磨砕濾液の濃縮精製や電子顕微鏡観察では、同学部水族病理学研究室の永井崇裕氏（現 広島県水産試験場淡水魚支場）並びに高野良子氏の御協力なくしてはできなかったことを記して、感謝の意を表します。

本研究の開始当初から、有益な御助言と御協力並びに御指導を賜りました、山口県水産研究センターの桃山和夫博士並びに由良野範義氏に感謝の意を表します。

本研究に供するサンプルの御提供や御協力を頂いた、京都府栽培漁業センターの西村元延元所長、生田哲郎前所長（現 京都府水産事務所長）並びに赤岩健二氏をはじめとする職員の方々に感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり種々の御配慮と御鞭撻を頂きました京都府立海洋センター 篠田正俊前所長並びに桑原昭彦所長に厚く御礼申し上げます。また、感染試験に供するクロアワビ無病種苗の試験生産や受精卵の洗浄試験等で多大の御協力と御指導を頂いた、共同研究者の同センター 岡部三雄氏に謝意を表します。さらには、同センター海洋生

物部の大橋徹前部長（現 京都府農林水産部理事）をはじめ歴代の職員の方々並びに関係各位に御礼申し上げます。

最後に、本研究の一部は水産庁開発課（当時）所管の国庫補助事業であった地域特産種量産放流技術開発事業（大量斃死要因調査）によったことを記して感謝の意を表します。

要 約

1980年代当初から発生しているクロアワビの筋萎縮症について、その発生状況（第Ⅰ章）、原因究明（第Ⅱ章）および対策（第Ⅲ章）の観点から研究し、以下のような結果を得た。

第Ⅰ章 発生状況

第1節 クロアワビ種苗生産府県における大量斃死発生状況

クロアワビの種苗生産を実施している22都府県の栽培漁業センター等の事業報告書あるいは業務報告書を基にクロアワビ稚貝の大量斃死の発生状況および症状等をまとめた。

(1) 最初の事例は1977年に神奈川県で観察され、1981年以降発生県数は増加し、特に1984年以降は急増し、これまでに14府県で大量斃死の報告があった。

(2) 発生府県における稚貝の単純平均生残率は51.8%であった。

(3) 発生時期は4月から8月の水温上昇期に当り、特に5月から6月にかけて（水温 16～25°C）斃死率が高かった。

(4) 斃死はクロアワビばかりでなく、マダカアワビおよびエゾアワビにも発生しているが、メガアワビには同様の斃死はなかった。

(5) 摂餌および付着力の低下、貝殻の欠刻並びに軟体部の痩せが特徴的な症状であった。

第2節 中間育成中における発生事例

1985年に京都府下のY漁港内で海面中間育成中のクロアワビ稚貝に大量死が発生した。6月20日に稚貝（平均殻長約 15 mm）20,000個体を収容したが、6月25日（水温 19.8°C）以降衰弱、死亡が目立ち始め、育成終了時（9月30日）までに9,824個体が死亡した（累積死亡率49.1%）。死亡あるいは衰弱貝には、外套膜と腹足の萎縮・後退および貝殻辺縁部の欠刻が認められた。

第Ⅱ章 原因究明

第1節 病理組織学的検討

1985年に京都府下で海面中間育成中のクロアワビ稚貝に

大量死が発生したが、その事例の衰弱貝について病理組織学的な検討を加えた。

重症の罹病貝では、腹足筋肉中の中央の神経幹や神経横連鎖および神経幹から分枝して腹足表層部に分布する末梢神経系に、円形もしくは長楕円形の腫瘍様の異常細胞塊が多数みられ、神経幹を閉塞させる程に成長していた。異常細胞塊が認められる病変部には細菌や真菌の感染あるいは寄生虫の寄生は認められなかった。

第2節 伝染性の検討

本症は飼育環境による死亡や餌料性疾病ではないと考えられたので、本疾病が伝染性であるか否かを検討した。

(1) 自然発症衰弱貝の磨砕濾液（0.22 μm のメンブレンフィルターで濾過）を含む滅菌海水に健全稚貝を浸漬したところ、攻撃30日後に死亡し始め、71日後の生残率は26%となった。病理組織検査で衰弱、死亡貝には自然発症貝と全く同様の異常細胞塊（病変）が確認された。

(2) 自然発症群の飼育排水に健全稚貝を24時間浸漬したところ、攻撃40日後に死亡が始まり、生残率は70%となり、衰弱、死亡貝には病変が観察された。

これらの結果から、この疾病は伝染性の疾病であることが明らかとなり、腹足筋肉の萎縮が特徴的であることから、本疾病をクロアワビの筋萎縮症と仮称した。

第3節 筋萎縮症原因体の海中での活性維持

自然発生事例や人為感染試験で水温が 23°C を越えると本症による死亡数が減少することから、異なる水温条件の海中での本症原因体の活性（感染力）の持続性を検討した。

10°C では20日後まで活性が維持され、18°C では10日後まで活性は維持されていたが、20日後に失われた。しかし、25°C では5日後に活性が失われ、水温 25°C 以上になると病勢が衰えることと結びつくと考えられた。

第4節 原因体の性状

筋萎縮症の原因体の性状について、物理的、化学的条件に曝した病貝の磨砕濾液を人為感染試験に供することによって、検討した。

原因体は、酸（pH 3.0）に感受性があり、熱（50°C、30分間）には不安定であったが、エーテルには感受性がなかった。

第5節 年齢別感受性の検討

筋萎縮症は、主として波板から剝離後のクロアワビ稚貝に発生するが、0年貝、1年貝および2年貝を用いて人為感染試験を行い、宿主の年齢と感受性との関係について検討した。

(1) 筋注法による攻撃では、0年貝、1年貝および2年貝で感染が成立した。

(2) 浸漬法による攻撃では、0年貝および1年貝で感染したが、2年貝では成立しなかった。

以上の結果および感染率から、クロアワビの本症原因体に対する感受性は、年齢すなわち貝の成長とともに低下すると判断された。

第6節 細胞培養の試み

筋萎縮症原因体の分離培養を目的に、クロアワビ由来細胞の培養を試みた。

孵化幼生由来の細胞および血球細胞の培養を試みたところ、いずれの場合も増殖はしなかったが、一定期間細胞を維持できた。特に、血球細胞では2ヵ月近く接着細胞を維持できることが判った。

第7節 血球初代培養を用いての筋萎縮症原因体の分離

クロアワビの血球細胞の初代培養を用いて筋萎縮症原因体の分離を行った。

京都府産病貝の磨碎濾液を培養血球細胞に接種したところ、接種7～9日目以降に、細胞の球形化および蟻集剥離が観察された。なお、このCPE形成はIUdR添加によっては阻害されなかった。

CPEを呈した血球細胞に直径約120nmのウイルス様粒子が観察された。このウイルス様粒子は核内および細胞質内では形成されず、出芽によって形成されるという特徴があった。

第8節 他県産クロアワビ病貝からの原因体の分離

他県産の筋萎縮症病貝の磨碎濾液によっても同様なCPEが発現するのかどうかを検討した。

神奈川県、福岡県、鳥根県および長崎市産の各病貝の磨碎濾液を調製し、血球初代培養に接種したところ、いずれにおいても接種7～12日後頃から細胞の球形化および蟻集剥離を特徴とするCPEが観察され、それらの細胞培養にはいずれも直径約120nmのウイルス様粒子が観察された。

第9節 粗精製培養上澄の病原性

血球初代培養でCPEを発現した培養上澄を濃縮粗精製し、電顕観察でウイルス様粒子を確認後、この粗精製上澄を健康な稚貝に接種してその病原性を検討した。

濃縮粗精製培養上澄中に微量ながら直径約120nmのウイルス様粒子が確認されたが、その上澄を接種したクロアワビ稚貝には病変は認められなかった。

第10節 病貝の磨碎粗精製液の病原性の検討

筋萎縮症病貝の磨碎濾液を濃縮粗精製し、粗精製液中

にウイルス様粒子の存在を確認した上で、病原性試験を行った。

粗精製液中には直径約150～200nmのウイルス様粒子が観察され、この粗精製液を接種したクロアワビの死亡率は80%であり、9個体中6個体の稚貝に本症に特徴的な病変が観察された。

これらの実験結果から、本症の原因体は大きさ120～200nmのウイルスであると考えられたが、分離培養したウイルス粒子の病原性が陰性であったことや、対照とした外見的健康貝に大きさ150～200nmのウイルス様粒子が観察されたことなどから、原因ウイルスを特定することはできなかった。

第三章 対策

第1節 化学的不活化法

病貝の磨碎濾液を用いて感染試験を行うというバイオアッセイにより、筋萎縮症原因体の塩素剤、ヨード剤およびエタノールに対する感受性を検討した。

本症原因体は有効塩素50ppm、有効ヨウ素50ppmおよび70%エタノールに感受性があり、いずれも10分間の作用時間で不活化された。

第2節 塩素処理時間と不活化の関係

有効塩素濃度を500ppmとした場合、2分間では殆ど不活化できなかったが、5分間処理で原因体の起病力を完全に不活化できた。

第3節 物理的不活化法

本症原因体の物理的な不活化法として、熱および紫外線を検討した。

(1) 熱に感受性が高く、35°C1分間の加熱では不活化されなかったが、70°Cでは1分間の加熱で完全に不活化された。

(2) 紫外線にも感受性があり、 $4.0 \times 10^3 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ 以上の紫外線照射量であれば不活化できると推定された。

第4節 感染経路の解明

感染経路を明らかにするため、水平感染および垂直感染の可能性について検討した。

(1) 感染耐過したクロアワビ2年貝から飼育排水を介して稚貝への水平感染が成立した。

(2) 採卵用親貝の飼育水槽に同居させた稚貝に水を介した水平感染が成立した。

(3) クロアワビの受精卵を十分に洗浄することにより、非常に高い生残率で健康な稚貝が生産できたが、非洗浄群には本症が発生し、生残率が低かった。しかし、洗浄した

別の稚貝群には本症が発生し、洗浄法により常に垂直感染を防止し得るものではないことが判った。

第5節 対症療法としての昇温処理

本症の対症療法として、飼育水温を人為的に上昇させることによって死亡を抑制しうるかどうか検討した。

本症が自然発生した稚貝群を2群に分け、一方(試験群)の飼育水温を19°Cから26°Cへ上昇させ、他方(対照群)は自然水温のままとした。試験群の生残率は57%であり、対照群の生残率は41%で、それらの間には有意差があった。

第6節 予防対策の試み

本症の発生防除における受精卵の洗浄効果が不十分なのは、受精卵の卵膜周囲におけるゼリー層の存在が原因と推定された。そこで、本症の発生予防としてオゾン海水による受精卵の処理および処理後の受精卵の洗浄との組み合わせが有効かどうか検討した。

残留オキシダント濃度0.5 ppmの海水に受精卵を5分間浸漬した後、十分に洗浄した。しかし、ゼリー層は完全には除去できず、結果的にこれらの卵から孵化して成長した稚貝に本症が発生した。したがって、今回の結果では、オゾン海水による浸漬処理と洗浄で本症の発生を予防することはできなかった。

第4章 総合考察

世界的に見た貝類における疾病の研究の現状、特に研究の進んでいるカキ類におけるウイルス病を取りまとめた。一方、アワビ類における疾病の研究は非常に少なく、中でもウイルス性疾病に関する報告は、最近の中国におけるエゾアワビでのレトロ様ウイルスによる疾病のみであった。

次に、クロアワビの筋萎縮症に関する本研究の結果を取りまとめた。各地の栽培漁業センターにおける水温上昇期の大量斃死が、筋萎縮症と著者が仮称した疾病に起因するものであり、本疾病が濾過性病原体による、水を介する伝染病であることを明らかにした。また、本疾病の原因体の性状(大きさおよび易熱性、UV感受性等)から原因体がウイルスであると考えられたが、原因ウイルスを特定するには至らなかった。本症は、海外でこれまでに報告のある疾病のいずれとも異なるものであると判断された。

引用文献

我孫子千春・佐藤紀子・金井欣也・吉越一馬・西村 真・大橋智志. 1998. 種苗生産過程におけるアワビ類稚貝の大量死の病理と生理Ⅳ. クロアワビ稚貝の大

量死のメカニズム. 平成10年度日本魚病学会春季大会講演要旨集, P.8.

愛知県栽培漁業協会. 1980. アワビ種苗生産. 昭和53年度愛知県栽培漁業協会業務報告, 17-22.

赤岩健治. 1989. クロアワビ中間育成. 昭和63年度京都府栽培漁業センター事業報告書, 15-17.

赤岩健治・丸山和夫・永浜雅和・吉本二郎. 1997. アワビ種苗生産. 平成7年度京都府栽培漁業センター事業報告書, 30-33.

赤岩健治・丸山和夫・永浜雅和・吉本二郎. 1998. アワビ種苗生産. 平成8年度京都府栽培漁業センター事業報告書, 30-33.

ALSTATT, J.M., R.F. AMBROSE, J.M. ENGLE, P.L. HAAKER, K.D. LAFFERTY and P.T. RAIMONDI. 1996. Recent declines of black abalone *Haliotis cracherodii* on the mainland coast of central California. Mar. Ecol. Prog. Ser., **142**: 185-192.

ANDREWS, J.D.. 1988. Epizootiology of the disease caused by the oyster pathogen *Perkinsus marinus* and its effects on the oyster industry. In "Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs (Ed. by W.S. Fisher)", American Fish. Soc., Special Publication 18, Bethesda (USA), 47-63.

ARIMOTO, M., J. SATO, K. MARUYAMA, G. MIMURA and I. FURUSAWA. 1996. Effect of chemical and physical treatment on the inactivation of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). Aquaculture, **143**: 15-22.

アワビ文献抄録作成委員会. 1995. アワビ文献抄録集. アワビ増殖技術研究会, 水産庁振興部開発課, 東京, 300 p.

BOWER, S.M., S.E. MCGLADDERY and I.M. PRICE. 1994. Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Ann. Rev. Fish Dis., **4**: 1-199.

COMPS, M.. 1988. Epizootic diseases of oyster associated with viral infections. In "Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs (Ed. by W.S. Fisher)", American Fish. Soc., Special Publication 18, Bethesda (USA), 23-37.

愛媛県栽培漁業センター. 1986. アワビ. 昭和60年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 17-19.

愛媛県栽培漁業センター. 1987. アワビ. 昭和61年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 20-30.

愛媛県栽培漁業センター. 1988. アワビ. 昭和62年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 19-21.

- 愛媛県栽培漁業センター. 1991. アワビ. 平成2年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 22-25.
- ELSTON, R.A.. 1990. Diseases of abalone. In "Molluscs Disease". Washington Sea Grant University of Washington, Seattle, 39-40.
- FIGUERAS, A.J. and J. MONTES. 1988. Aber disease of edible oysters caused by *Marteillia refringens*. In "Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs (Ed. by W.S. Fisher)". American Fish. Soc., Special Publication 18, Bethesda (USA), 38-46.
- FRIEDMAN, C.S., M. THOMSON, C. CHUN, P.L. HAAKER and R.P. HEDRICK. 1997. Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *J. Shellfish Res.*, **16**: 403-411.
- 藤井明彦・高木信夫・前迫信彦. 1994. 介類種苗生産技術研究. 平成5年度長崎県水試事業報告, 96-99.
- Gardner, G.R., J.C. Harshbarger, J.L. Lake, T.K. Sawyer, K.L. PRICE, M.D. STEPHENSON, P.L. HAAKER and H.A. TOGSTAD. 1995. Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invert. Pathol.*, **66**: 111-120.
- GIBBONS, M.C. and W.J. BLOGOSLAWSKI. 1989. Chapter 7. Predators, pestes, parasites and diseases. In "Clam Mariculture in North America (Ed. by J.J. Manzi and M. Castagna)", *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, Vol. 19, Elsevier, Amsterdam, 167-200.
- 後藤裕康・大滝高明・川口 敏. 1982. アワビの種苗生産(55年度アワビ種苗生産). 昭和56年度静岡県栽培漁業センター事業報告, 15-18.
- GRIZEL, H., E. MIALHE, D. CHAGOT, V. BOULO and E. BACHERE. 1980. Bonamiasis: A model study of disease in marine molluscs. In "Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs (Ed. by W.S. Fisher)". American Fish. Soc., Special Publication 18, Bethesda (USA), 1-4.
- 長谷川 理・沼田 武・星野 茂. 1994. 種苗生産中に発生したアワビ稚貝の大量斃死状況. 神奈川県水試研究報告, **15**: 21-24.
- HASKIN, H.H. and J.D. ANDREWS. 1988. Uncertainties and speculations about the life cycle of the eastern oyster pathogen *Haplosporidium nelsoni* (MSX). In "Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs (Ed. by W.S. Fisher)". American Fish. Soc., Special Publication 18, Bethesda (USA), 5-22.
- 畑中正一. 1991. レトロウイルス, 「ウイルス学」, 畑中正一編, 朝倉書店, 東京, 308-338.
- HINE, P.M.. 1996. Southern hemisphere mollusc diseases and an overview of associated risk assessment problems. *Rev. Sci. Tech., Off. Int. Epiz.*, **15**: 563-577.
- HOUSE, M.L., C.H. KIM and P.W. RENO. 1998. Soft shell clams *Mya arenaria* with disseminated neoplasia demonstrate reverse transcriptase activity. *Dis. Aquat. Org.*, **34**: 187-192.
- 石川義美・藤田利昭・金子英二郎. 1984. アワビ種苗生産. 昭和57年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書, 第7号: 21-23.
- 石川義美・金子英二郎. 1985. アワビ種苗生産. 昭和58年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書, 第8号: 18-21.
- 石川義美・金子英二郎. 1987. アワビ種苗生産事業. 昭和59年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書, 第9号: 28-31.
- 石川義美・金子英二郎. 1988. アワビ量産技術向上研究(クロアワビ). 昭和61年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書, 第11号: 66-67.
- 岩波生物学辞典. 1960. 山田常雄・前川文夫・江上不二夫・八杉竜一編, 岩波書店, 東京, viii+1278 pp.
- 神奈川県水産試験場. 1978. 病害対策研究. 昭和52年度神奈川県水試業務概要, 21-22.
- 金沢忠佳・浜田文彦・梶川 晃・山本栄一. 1984. クロアワビ種苗生産事業. 昭和58年度鳥取県栽培漁業試験場事業報告書, 96-99.
- 金沢忠佳・浜田文彦・梶川 晃・山本栄一. 1985. クロアワビ種苗生産事業. 昭和59年度鳥取県栽培漁業試験場事業報告書, 113-118.
- 金沢忠佳・浜田文彦・山本栄一. 1989. クロアワビ種苗生産事業. 昭和63年度鳥取県栽培漁業試験場事業報告書, 第7号: 92-96.
- 川上勲輝・若林英人. 1997. アワビの種苗生産. 平成6・7年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 50-53.
- 河本 泉・荒井才智. 1994. クロアワビ. 平成5年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 18-19.
- 河本 泉・荒井才智. 1995. クロアワビ. 平成6年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 16-17.
- 河本 泉・藤田慶之・荒井才智. 1997. クロアワビ. 平成8年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 16-17.

- 菊池省吾・浮 永久. 1974a. アワビ属の採卵技術に関する研究 第1報 エゾアワビの性成熟と温度との関係. 東北水研研究報告, No. 33 : 69-78.
- 菊池省吾・浮 永久. 1974b. アワビ属の採卵技術に関する研究 第2報 紫外線照射海水の産卵誘発効果. 東北水研研究報告, No. 33 : 79-86.
- 菊池省吾・浮 永久. 1974c. アワビ属の採卵技術に関する研究 第3報 精虫濃度と受精率の関係. 東北水研研究報告, No. 34 : 67-72.
- 菊池省吾・浮 永久. 1974d. アワビ属の採卵技術に関する研究 第4報 生殖巣の受精能力の持続時間と温度との関係. 東北水研研究報告, No. 34 : 73-75.
- 菊池省吾・浮 永久. 1974e. アワビ属の採卵技術に関する研究 第5報 クロアワビの性成熟と温度との関係. 東北水研研究報告, No. 34 : 77-85.
- 菊池省吾・浮 永久. 1975. アワビ属の採卵技術に関する研究 第6報 マダカアワビの性成熟について. 東北水研研究報告, No. 35 : 85-90.
- 木村 憲・村川明文. 1992. アワビ量産技術向上試験. 平成2年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書, 第15号 : 48-49.
- 木村 憲・村川明文. 1993. アワビ量産技術向上試験. 平成3年度新潟県栽培漁業センター業務. 研究報告書, 第16号 : 45-46.
- 清川智之・川上勲輝. 1997. アワビの種苗生産. 平成6・7年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 10-13.
- 小林信之. 1992. レトロウイルスの遺伝子構造. 蛋白質核酸 酵素, **37** : 2440-2446.
- 河野秀伸・小金丸 隆. 1987. クロアワビ・トコブシ種苗生産. 昭和60年度宮崎県栽培漁業センター事業報告書, 24-30.
- 久米 洋・辻村有美・荒井才智. 1993. クロアワビ. 平成4年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 17-18.
- LAUCKNER, G.. 1983. Diseases of Mollusca : Bivalvia. In "Diseases of Marine Animals, Vol. II Introduction, Bivalvia to Scaphopoda (Ed. by O. Kinne)", Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, 477-961.
- 町田益己・窪田 久・植松正幸・柳瀬良介. 1988. アワビ種苗生産 (昭和61年度アワビ種苗生産). 昭和62年度静岡県栽培漁業センター事業報告, 31-35.
- 増谷龍一郎・梶川 晃・山本栄一. 1983. クロアワビ種苗生産事業. 昭和56・57年度鳥取県栽培漁業試験場事業報告書, 65-70.
- 松元正剛・山中邦洋・神野芳久・松元則男・山口昭宣. 1988. クロアワビの種苗生産供給事業—Ⅶ. 昭和62年度鹿児島県水試事業報告書, 69.
- 松永順夫. 1967. 傷アワビ症に関する研究—II 原因菌の分離と復元試験. 魚病研究, **2** : 11-21.
- 三浦三郎・川西喜久・川野美晃・伊沢 元. 1983. あわび (昭和57年度). 昭和57年度徳島県栽培漁業センター事業報告書, 17-21.
- 三浦三郎・川西喜久・川野美晃・伊沢 元. 1984. アワビ種苗生産 (中間育成). 昭和58年度徳島県栽培漁業センター事業報告書, 27-29.
- 桃山和夫. 1994. 平成5年度地域特産種量産放流技術開発事業報告書 (あわび類種苗大量斃死要因調査), 山口県, 1-11.
- 桃山和夫・門永圭史. 1995. 平成6年度地域特産種量産放流技術開発事業報告書 (あわび類種苗大量斃死要因調査), 山口県, 1-14.
- 桃山和夫・門永圭史・由良野範義. 1997. 平成8年度地域特産種量産放流技術開発事業報告書, 山口県, 1-13.
- 桃山和夫・中津川俊雄・由良野範義. 1999. アワビ属稚貝の筋萎縮症による大量死. 魚病研究, **34** : 7-14.
- 室賀清邦・古澤 徹・古澤 巖. 1998. シマアジのウイルス性神経壊死症. 水産増殖, **46** : 473-480.
- NAGAI, T., T. NAKATSUGAWA, T. NISHIZAWA and K. MUROGA. 1998. Primary culture of hemocytes from Japanese black abalone *Nordotis discus discus*. Fish Pathol., **33** : 147-148.
- NAGANUMA, T., B.M. DEGNAN, K. HORIKOSHI and D.E. MORSE. 1994. Myogenesis in primary cell cultures from larvae of the abalone, *Haliotis rufescens*. Mol. Mar. Biol. Biotechnol., **3** : 131-140.
- 中島輝彦・安田政一. 1982. アワビ種苗生産事業. 昭和56年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 31-51.
- 中津川俊雄. 1990. 筋萎縮を伴うクロアワビ稚貝の疾病の伝染性. 魚病研究, **25** : 207-211.
- 中津川俊雄. 1991. 筋萎縮症罹病クロアワビ稚貝の加温処理事例. 魚病研究, **26** : 157-158.
- 中津川俊雄. 1993. クロアワビの「筋萎縮症」病原体の感染性と水温の関係. 京都府立海洋センター研究報告, **16** : 35-38.
- 中津川俊雄. 1995. クロアワビ「筋萎縮症」病原因子の海水水中での活性の持続性. 魚病研究, **30** : 283-284.
- 中津川俊雄・畑井喜司雄・窪田三朗. 1988. 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** : 203-204.
- NAKATSUGAWA, T., T. NAGAI, K. HIYA, T. NISHIZAWA and K.

- MUROGA. 1999. A virus isolated from juvenile Japanese black abalone *Nordotis discus discus* affected with amyotrophy. *Dis. Aquat. Org.*, **36**: 159-161.
- 難波武雄. 坂本博規. 1986. 昭和54-59年度の種苗生産の概要, アワビの種苗生産. 和歌山県栽培漁業センター報告, 第1号: 9-11.
- 那須 司・杉田 浩. 1990. クロアワビ・トコブシ種苗生産. 昭和63年度宮崎県栽培漁業センター事業報告書, 39-48.
- 日本魚病学会. 1996. 選定された魚病名. 魚病研究, **31**: 109-116.
- 農林水産省統計情報部: 平成4-8年漁業・養殖業生産統計年報. 農林統計協会, 東京. 沼田 武・田内 大・近山通正・高田啓一郎. 1982. 量産種の斃死対策研究. 昭和56年度神奈川県水試業務概要, 30-31.
- 大江秀彦・石田敏一. 1995. アワビ種苗生産事業. 平成6年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 11-14.
- 大江秀彦・石本健治. 1992. アワビ種苗生産事業. 平成2年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 15-22.
- 大江秀彦・石本健治. 1994. アワビ種苗生産事業. 平成3・4年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 13-16.
- 大江秀彦・嶋田雅弘. 1994. アワビ種苗生産事業. 平成3・4年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 120-123.
- 大江秀彦・鳥居正三. 1994. アワビ種苗生産事業. 平成5年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 11-14.
- 小倉正規. 1985. アワビ中間育成. 昭和59年度京都府栽培漁業センター事業報告書, 19-20.
- 小倉正規. 1986. アワビ中間育成. 昭和60年度京都府栽培漁業センター事業報告書, 20-21.
- 大橋智志・吉越一馬. 1992. 給餌飼育中に発生したクロアワビ稚貝の大量斃死に関する病理学的研究(予報). 長崎県水試研究報告, 第18号: 33-38.
- 岡部三雄. 1988. アワビ中間育成. 昭和62年度京都府栽培漁業センター事業報告書, 19-20.
- 岡田一宏. 1998. 平成9年度地域特産種量産放流技術開発事業報告書(あわび類種苗大量斃死要因調査), 7-8.
- 奥田 進・清川智之. 1994. アワビの種苗生産. 平成3年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 16-19.
- 奥田 進・清川智之. 1996. アワビの種苗生産. 平成4・5年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, **21-24**: 75-79.
- 奥田 進・本池和久・竹森昭夫. 1984. アワビの種苗生産. 昭和58年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 21-25.
- 奥田 進・勢村 均. 1992. アワビの種苗生産. 平成元年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 16-20.
- 奥田 進・竹森昭夫・日野裕介・中村幹雄. 1985. アワビ種苗生産. 昭和59年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 18-22.
- 奥田 進・竹森昭夫・勢村 均. 1989. アワビの種苗生産. 昭和60・61・62年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 171-174.
- 奥田 進・山本孝二. 1978. あわびの種苗生産. 昭和52年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 13-17.
- OIE (Office International des Epizootics). 1997. *Diagnostic Manual for Aquatic Animal Diseases* (2nd ed.), OIE, Paris, 251 p.
- OPRANDY, J.J., P.W. CHANG, A.D. PRONOVOST, K.R. COOPER, R.S. BROWN and V.J. YATES. 1981. Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. *J. Invert. Pathol.*, **38**: 45-51.
- ORTSU, R. and K. SASAKI. 1997. Virus-like particles detected from juvenile abalones (*Nordotis discus discus*) reared with an epizootic fatal wasting disease. *J. Invert. Pathol.*, **70**: 167-168.
- PETERS, E.C.. 1988. Recent investigations on the disseminated sarcomas of marine bivalve molluscs. In "Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs (Ed. by W.S. Fisher)", American Fish. Soc. Special Publication 18, Bethesda (USA), 74-92.
- RENAULT, T.. 1996. Appearance and spread of diseases among bivalve molluscs in the northern hemisphere in relation to international trade. *Rev. Sci. Tech., Off. Int. Epiz.*, **15**: 551-561.
- 坂本博規・吉本 洋・難波武雄. 1986. 昭和60年度の種苗生産の概要, アワビの種苗生産. 和歌山県栽培漁業センター報告, 第1号: 15-18.
- 佐々木和之. 1994. 平成5年度地域特産種量産放流技術開発事業報告書(あわび類種苗大量斃死要因調査), 福1-福12.
- 勢村 均・奥田 進. 1990. アワビの種苗生産. 昭和63年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 16-18.
- 柴原正志・徳沢秀波・浜口とり子・山本くるみ. 1984. アワビの種苗生産. 昭和58年度三重県栽培漁業センター事業報告書, 17-20.
- SINDERMANN, C.J. and D.V. LIGHTNER. 1988. Chapter 4.

- Molluscan Diseases. In "Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture", Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol. 17, Elsevier, Amsterdam, 266-317.
- 相山正雄. 1975. 卵の精子受容と付活. 「現代生物学の課題4, 卵と精子」, 日本動物学会編, 学会出版センター, 東京, 121-147.
- 水産庁・日本栽培漁業協会. 平成4～8年度栽培漁業種苗生産, 入手・放流実績(全国).
- 水津洋志・国近正雄. 1990. アワビ種苗生産事業. 平成元年度山口県外海水試事業報告, 104-117.
- 水津洋志・国近正雄. 1991. アワビ種苗生産事業. 平成2年度山口県外海水試事業報告, 85-107.
- 水津洋志・国近正雄. 1992. アワビ種苗生産事業. 平成3年度山口県外海水試事業報告, 65-82.
- 水津洋志・国近正雄. 1993. アワビ種苗生産事業. 平成4年度山口県外海水試事業報告, 74-81.
- 鈴木 徹. 1990. 第3章 無脊椎動物にみられる腫瘍, 軟体動物およびその他の海産無脊椎動物, 図説臨床[癌]シリーズ No. 35, 比較腫瘍学, メジカルビュー社, 東京, 13-19.
- 高垣 守・中島輝彦・大江秀彦. 1987. アワビ種苗生産事業. 昭和59・60年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 23-29.
- 高垣 守・中島輝彦・大江秀彦. 1989. アワビ種苗生産事業. 昭和61・62年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 18-25.
- 高垣 守・大江秀彦. 1989. アワビ種苗生産事業. 昭和61・62年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 87-91.
- 高垣 守・大江秀彦. 1991. アワビ種苗生産事業. 昭和63年度・平成元年度福井県栽培漁業センター事業報告書, 16-22: 146-150.
- 高野良子. 1999. クロアワビ筋萎縮症原因ウイルスの検出の試み. 広島大学大学院生物圏科学研究科(生物学専攻)修士論文, 38 p.
- 竹森昭夫・奥田 進. 1989. アワビの種苗生産. 昭和60・61・62年度鳥根県栽培漁業センター事業報告書, 18-30: 87-95.
- 東條秀雄・伊沢 元・池脇義弘. 1997. アワビ種苗生産(中間育成). 平成7年度徳島県栽培漁業センター事業報告書, 39-40.
- 徳沢秀渡. 1983. アワビの種苗生産. 昭和57年度三重県栽培漁業センター事業報告書, 9-13.
- 浮 永久・菊池省吾. 1982. アワビ属の採卵技術に関する研究 第8報 紫外線照射海水によるエゾアワビの放卵・放精行動の発現状況の特徴. 東北水研研究報告, No. 44: 83-90.
- WANG, B., X. LI and C. GOU. 1997. Infection of spherical virus from *Haliotis discus hannai* Ino. *Virologica Sinica* (中国病毒学), 12, 360-363 (In Chinese).
- WATANABE, K., S. SUZUKI, T. NISHIZAWA, K. SUZUKI, M. YOSHIMIZU and Y. EZURA. 1998. Control strategy for viral nervous necrosis of barfin flounder. *Fish Pathol.*, 33: 445-446.
- 山口昭宣・山中邦洋・中村章彦・神野芳久・上村 勲・西原拓夫. 1982. クロアワビの種苗生産供給事業—I. 昭和56年度鹿児島県水試事業報告書, 60.
- 山口好一・金子英二郎. 1989. クロアワビ種苗生産技術開発試験. 昭和62年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書, 第12号: 64-65.
- 山口好一・金子英二郎. 1990. クロアワビ種苗生産技術開発試験. 昭和63年度新潟県栽培漁業センター業務・研究報告書, 第13号: 62.
- 山中邦洋・神野芳久・松元則男・野村祐美・水野 豊. 1994. 種苗生産供給事業(クロアワビ—XIII). 平成4年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告書, 8-11.
- 山中邦洋・神野芳久・松元則男・野村祐美・椎原久幸. 1995. 種苗生産供給事業(クロアワビ—XIV). 平成5年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告書, 7-9.
- 山中邦洋・神野芳久・外城和幸・松元則男・椎原久幸. 1996. 種苗生産供給事業(クロアワビ—XV). 平成6年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告書, 14-15.
- 山中邦洋・神野芳久・外城和幸・松元則男・椎原久幸. 1997. クロアワビ種苗生産供給事業—XVI. 平成7年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告書, 2.
- 山中邦洋・松元則男・神野芳久・服部祐美・水野 豊・福元 誠・有馬康隆. 1992. 種苗生産供給事業(クロアワビ—XI). 平成2年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告書, 23-26.
- 山中邦洋・松元則男・神野芳久・野村祐美・水野 豊. 1993. 種苗生産供給事業(クロアワビ—XII). 平成3年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告書, 20-22.
- 山中邦洋・椎原久幸・神野芳久・松元則男・服部祐美・武田健二・福元 誠・有馬康隆. 1991. クロアワビの種苗生産. 平成元年度鹿児島県栽培漁業センター事業報告書, 23-27.

- 山中邦洋・山口昭宣・藤田正夫・神野芳久・西原拓夫. 1984. クロアワビの種苗生産供給事業一Ⅲ. 昭和58年度鹿児島県水試事業報告書, 66.
- 山崎和久・荒井才智. 1992. アワビ. 平成3年度愛媛県栽培漁業センター業務報告書, 16-17.
- 柳瀬良介. 1984. アワビ種苗生産 (アワビ稚貝貝殻の欠刻). 昭和58年度静岡県栽培漁業センター事業報告, 17-21.
- 柳瀬良介・川口 敏. 1986. アワビ種苗生産 (昭和59年度アワビ種苗生産). 昭和60年度静岡県栽培漁業センター事業報告, 22-25.
- 柳瀬良介・川口 敏・石渡敏郎・大滝高明. 1984. アワビ種苗生産 (57年度アワビ種苗生産). 昭和58年度静岡県栽培漁業センター事業報告, 11-12.
- 柳瀬良介・川口 敏・植松正幸. 1987. アワビ種苗生産 (昭和60年度アワビ種苗生産). 昭和61年度静岡県栽培漁業センター事業報告, 16-19.
- 柳瀬良介・野中 忠. 1985. アワビ種苗生産 (稚貝の斃死). 昭和59年度静岡県栽培漁業センター事業報告, 28-29.
- 由良野範義・国近正雄. 1987. アワビ種苗生産事業. 昭和61年度山口県外海水試事業報告, 70-86.
- 由良野範義・国近正雄. 1988. アワビ種苗生産事業. 昭和62年度山口県外海水試事業報告, 81-91.
- 由良野範義・陣之内征龍・国近正雄. 1989. アワビ種苗生産事業. 昭和63年度山口県外海水試事業報告, 103-112.