

## 貝類疾病の病原体特定に関する研究

|       |  |
|-------|--|
| メタデータ | 言語: Japanese<br>出版者: 日本魚病学会<br>公開日: 2022-09-28<br>キーワード: アコヤガイ; 赤変病; アワビ; 筋萎縮症<br>作成者: 松山, 知正<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="https://fra.repo.nii.ac.jp/records/76">https://fra.repo.nii.ac.jp/records/76</a>                        |

冊子をスキャンしたためテキストなし

## 令和2年度日本魚病学会研究奨励賞

## 貝類疾病の病原体特定に関する研究

松山知正\*

国立研究開発法人 水産研究・教育機構 水産技術研究所  
養殖部門病理部

**要旨**—貝類に発生する未知の感染症，特にウイルス性疾病や難培養性の細菌感染症では，病原体の特定は困難である。なぜなら，貝類ではウイルスの分離培養に欠かせない培養細胞が利用できず，特異的免疫機構が無いために感染個体の抗体を用いた病原体のスクリーニングも不可能なためである。さらに，特に二枚貝では正常な状態でも体内にウイルスを含む多様な微生物が存在し病原体と常在性の微生物を区別できない。次世代シーケンサー（NGS）はサンプル中のDNA/RNAの全容の解析を可能にし，未知の病原体の検出に革命的な進歩をもたらした。私達はNGS解析を手掛かりに，アコヤガイの赤変病とアワビの筋萎縮症について病原体を特定し，それぞれ *Candidatus Maribrachyspira akoyae* と Abalone asfa-like virus と命名した。本稿では，著者らが行ってきた研究を中心に両疾病について概説する。

**キーワード**：アコヤガイ，赤変病，*Candidatus Maribrachyspira akoyae*，アワビ，筋萎縮症，Abalone asfa-like virus

## 1. アコヤガイの赤変病

本病は1994年に一部地域で発生し，2年後には全国の真珠養殖海域へ拡大した。衰弱した個体の軟体部が赤褐色に変色することが本病名の由来である。累積死亡率が70%にも及ぶ大量死が数年間続けて発生し，真珠養殖業は壊滅的な打撃を受けた。真珠生産量は1993年の78.2tから1999年には24.6tに，真珠母貝の生産量は同期間に9,460tから2,403tに減少した（森実ら，2001）。養殖経営体も赤変病が顕在化した1996年以降に明らかに減少している（良永・花見，2018）。耐病性系統の利用や，飼育管理技術の工夫により被害は減少したが，本病は現在も発生している。

本病の原因として，感染症の他にプランクトンの減少，魚類養殖に当時駆虫剤として用いられていたホルマリンや養魚に与えた飼料から散逸する過酸化脂質の流入を原因とするなど様々な説が提唱された。しかし，病貝の組織や血リンパ液の移植試験（黒川ら，1999；中島，1999）と，病貝との同居試験（Nakayasu *et al.*, 2004）により健康貝に赤変病を再現できることから，本病が

感染症であることが明らかとなった。病貝の血リンパ液の0.45  $\mu$ m フィルター濾液に発病性が認められることから病原体はウイルスあるいは細菌と考えられたが，原因の特定は困難を極めた。筆者が本病に関わり始めた頃には，病原体の精製や分離培養（中易，栗田，伊東，中島氏ら），病貝DNAおよびRNAのショットガンクロニングによる遺伝子解析（栗田，藤原，中易氏ら），クロニングに基づいた16S rRNA 遺伝子解析（釜石氏ら）や Denaturant Gradient Gel Electrophoresis 法（坂見氏ら）による細菌叢の解析が行われていた。これらの解析により，病原体は精製過程において容易に失活すること，正常な個体でもアコヤガイの体内には極めて多様な微生物（原生動物，細菌，ウイルスを含む）が存在することが明らかとなった。しかし，微生物叢の多様さ故に病原体を見つけることはできなかった。状況を打開するためには，新たな解析技術の導入が不可欠と思われた。

## 1-1. NGS を利用したショットガンメタゲノム解析

革命的な解析能力を有するNGSの登場により研究は大きく進展した。病原体の精製は難航していたが，血リンパ液中の病原体は2万×g 60分間の遠心で完全に沈殿し上清には残らないことが，すでに明らかにされていた（中易氏ら）。この比較的弱い遠心条件で完全に沈殿しかつ濾過性の病原体は，巨大ウイルスあるいは細菌類と考えられる。そこで，病原体が含まれる遠心沈渣についてNGSを用いたショットガンメタゲノム解析を行った

\* 連絡者

E-mail: matsuyum@fra.affrc.go.jp

〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1

国立研究開発法人水産研究・教育機構水産技術研究所養殖部門病理部

英語タイトル：Research on discovery and identification of pathogens of shellfish diseases

(Matsuyama *et al.*, 2017)。得られた配列の相同性解析では、既知のウイルスに相同性を示す配列も多く含まれたが、大部分がバクテリオファージ由来の配列と考えられ、動物に感染するウイルスに相同性を示す配列は少なく、巨大ウイルスに相同な配列はごく僅かであった。一方で、得られた配列の多くは細菌に相同性を示したため、病原体は細菌ではないかと考え、抗生物質による発病の抑制試験を行った。感染試験の開始直後から10日間連続で海水中にペニシリンを添加したところ、非投与群では感染試験開始から111日後までに約半数が死亡し生残個体の軟体部は赤色化していたのに対し、投与群ではこの期間に死亡は殆ど起こらず、生残個体も赤色化していなかった。

抗生物質で発病が抑制されることから、予測どおり本病は細菌感染症と考えられた。なお、すでに感染が成立した病貝に抗生物質を投与しても治療は困難であることを申し添えておく。というのも、感染個体群への抗生物質投与では、後に述べる原因細菌（スピロヘータの一種）が一時的に減少し、赤色度も低下するため回復したかに見えるが、比較的短期間のうちに原因細菌は再び増加に転じ再発する（未発表）。そのため、薬剤により感染個体から病原細菌を完全に除去するのは困難であった。治療目的での投薬は効果がないばかりか、薬剤耐性菌の出現にも繋がりがねず、さらに未承認薬の使用は薬事法違反でもあるため行ってはならない。

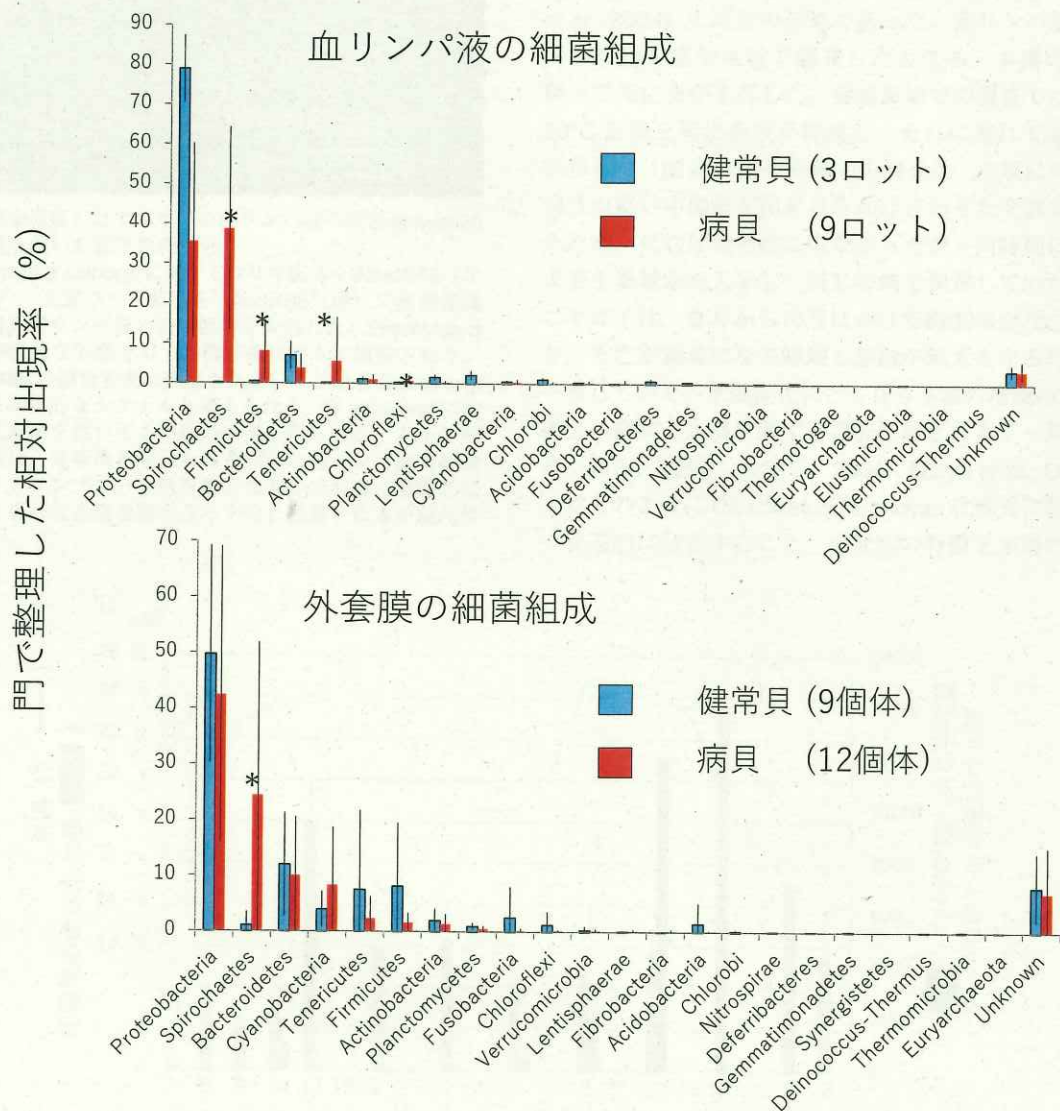


図1 16S rRNA 遺伝子に基づくアコヤガイの細菌叢の解析

2011年から2014年にかけて採取した赤変病非発生海域の健常アコヤガイと、発症貝を含む赤変病発生海域のアコヤガイについて、血リンパ液と外套膜の細菌組成を調査した。検出される菌種が極めて多いため、図では門のレベルで各分類群の存在比を正規化して比較した。血リンパ液の解析に用いた健常貝3ロットと病貝9ロットは、それぞれ1~17個体の血リンパ液を混合した後にDNAを抽出し細菌組成を解析した。外套膜は健常貝9個体と、病貝12個体について、個体ごとに細菌組成を解析した。各分類群（横軸）に含まれたリード数のロットあるいは個体の平均相対出現率を算出し、標準偏差とともに示した。アスタリスクは健常貝と病貝で出現頻度に有意差があることを示す（ウィルコクソンの符号順位検定,  $P < 0.05$ ）。

## 1-2. 細菌叢の解析

病原体は細菌類と考えられたことから、16S rRNA 遺伝子を対象としたメタゲノム解析を行った (Matsuyama *et al.*, 2017)。由来の異なる複数の病貝と健常貝について細菌組成を比較したところ、スピロヘータ門だけが病貝の血リンパ液と外套膜の両方で有意に多く存在していた (図 1)。より分類群が下位の科で集計してもスピロヘータ科が優先する結果に変わりはなかった。しかも、解析した全ての病貝からスピロヘータの遺伝子が検出された。しかし、健常貝にもスピロヘータの配列が少数検出される個体があったため、配列を精査した。スピロヘータの 16S rRNA 遺伝子に相同な配列を整理すると 38 種類に分類された。そのうち 1 種類の配列は、スピロヘータに割り当てられた全リードの 98.5% を占め、病貝のみから検出された。この配列に割り当てられたリード数は、健常貝と病貝から得られた全リードの 24.0% に相当した。よって特異性と出現頻度の高さから、この配列は病原体のゲノムの一部と示唆された。

## 1-3. 推定病原体 *Candidatus Maribrachyspira akoyae* の分類

メタゲノム解析により得られた部分配列を手がかりに、本細菌の 16S rRNA 遺伝子の全長を解読し、系統解析を

行ったところ、本菌は *Brachyspira* 属に近縁な新属に分類されると考えられた (図 2)。哺乳類の腸管スピロヘータ症の原因細菌である *B. aalborgi* と *B. pilosicoli* に対して作成されたウサギ抗血清を用いて、アコヤガイの血液標本を免疫染色したところ、いずれの抗血清を用いた場合でも、病貝の血液には長さ 5~11  $\mu\text{m}$  の屈曲したらせん菌が観察された (図 3)。また、本菌の 16S rRNA 遺伝子に対する蛍光プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにおいても、同様の形態の細菌が病貝のみに観察された。なお、スピロヘータ科細菌の染色性は一般的に極めて低く、プローブを用いない通常の染色では本菌の観察は困難である (図 3)。本菌の 16S rRNA 遺伝子配列、観察された形態に基づき、アコヤガイ由来の海の *Brachyspira* を意味する新属新種の名称として *Candidatus Maribrachyspira akoyae* を提唱した (Matsuyama *et al.*, 2017)。

## 1-4. *Candidatus M. akoyae* の疫学調査

*Candidatus M. akoyae* の 16S rRNA 遺伝子を対象とした PCR 系の構築を試みたが特異性が不十分であったため、ショットガンメタゲノム解析データから *Brachyspira* 属に相同性のある配列を選び、プライマーを設計した (Matsuyama *et al.*, 2018)。9 種類の配列に対するプライ

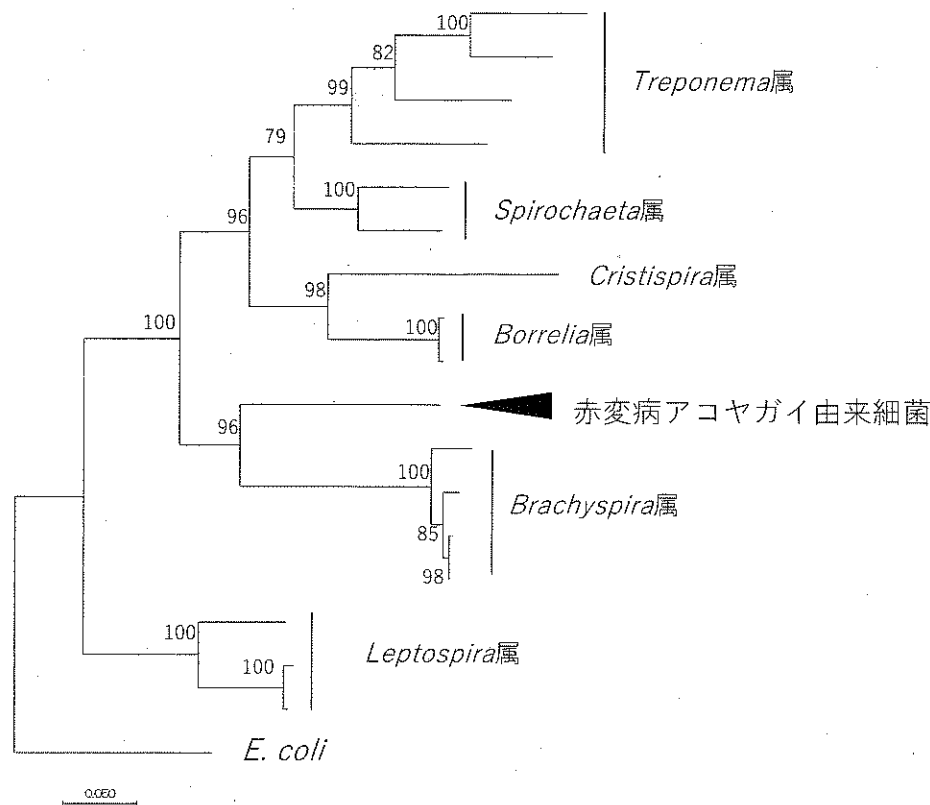


図 2 16S rRNA 配列に基づいたスピロヘータの系統樹  
スピロヘータ科の各属の代表種と赤変病を発症したアコヤガイから得られた 16S rRNA 遺伝子配列をもとに、最尤法で作成した。枝上の数値はブートストラップ確率を、スケールバーは進化距離を示す。

マーセットのうち、6種類は病貝特異的に目的配列の増幅物が得られたため、これらは *Candidatus M. akoyae* のゲノム DNA を増幅していると仮定して疫学調査に用いた。2001年から2016年にかけて、赤変病が発生している海域5地点から15集団と、発生していない3地点の海域

(小田原ら, 2011) から5集団の計20集団, 合計124個体のアコヤガイを収集した。6種類の遺伝子はいずれも非発生海域3地点の5集団のアコヤガイからは検出されず, 発生海域のアコヤガイでは, 年代にかかわらず15集団全てに6種の遺伝子が検出された。特に本病の発症の目安である赤色度3.0を超える個体は, 全個体に6遺伝子が検出された。

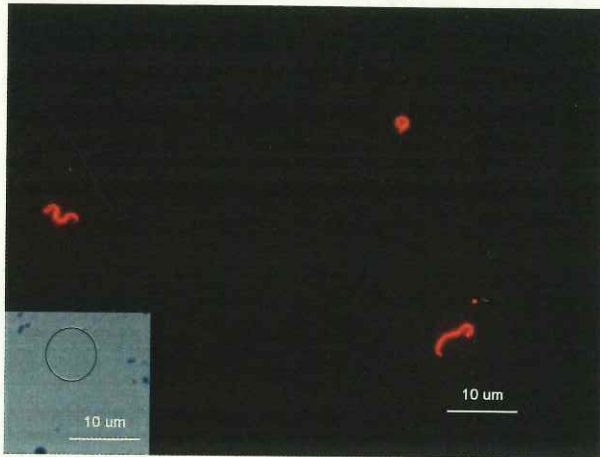


図3 赤変病を発症したアコヤガイ血リンパ液の抗 *Brachyspira aalborgi* 抗血清を用いた蛍光免疫染色  
*Brachyspira aalborgi* に対するウサギ抗体を Alexa555 (オレンジ), 正常ウサギ抗体を Alexa488 (緑) で直接標識し, 病貝血リンパ液の塗抹標本を染色した。*Brachyspira* 属に特徴的な形態を示す細菌が病貝のみに観察された。Alexa488 の緑色蛍光は観察されないことから *B. aalborgi* 抗体に特異的なシグナルと考えられる。*B. pilosicoli* に対する抗血清を用いても同様の結果が得られた。左下の明視野像は, 免疫染色を行なった個体の血リンパ液塗抹標本にメチレンブルー染色を施したものである。形態的に本菌と思われる構造物がうっすらと観察されるが染色性は悪い。

6種類の遺伝子のうち1種類を対象に定量PCRを構築し, 感染試験と養殖場のアコヤガイについて本菌の挙動を解析した (Matsuyama et al., 2019)。病貝の体内では, 本菌は閉殻筋, 血リンパ液および外套膜に多く分布し, 鰓, 桿晶体, 血球, 心臓および中腸腺には少なく, 感染試験により推定された本病病原体の組織分布 (Nakayasu et al., 2004) と同様の結果であった。血リンパ液中の本菌の挙動を感染試験で調査したところ, 本菌の増加に伴って死亡率が上昇した。養殖海域での調査では, 水温 20°C 前後を境に菌数が増減し, それに遅れて赤色度が推移した (図4)。養殖海域での調査は, 本病に対して耐病性の高い中国貝と国産貝を掛け合わせた交雑貝を用いたため, 死亡は殆ど起こらなかったが, 同時期に赤変病未発生海域から入手し, 同じ海域で飼育していた国産アコヤガイは, 9月から10月にかけて約30%が死亡しており, 死亡が顕著になる時期と菌数が最大となる時期とは一致していた。水温変化にともなう本菌の増減の様子は, 過去の発病と水温に関する調査結果ともよく一致している (和田, 1999; 永井ら, 2004; Nagai et al., 2007)。

以上のように *Candidatus M. akoyae* は病貝に特異的かつ普遍的に分布すること, 赤変病の特徴を本菌の挙動で

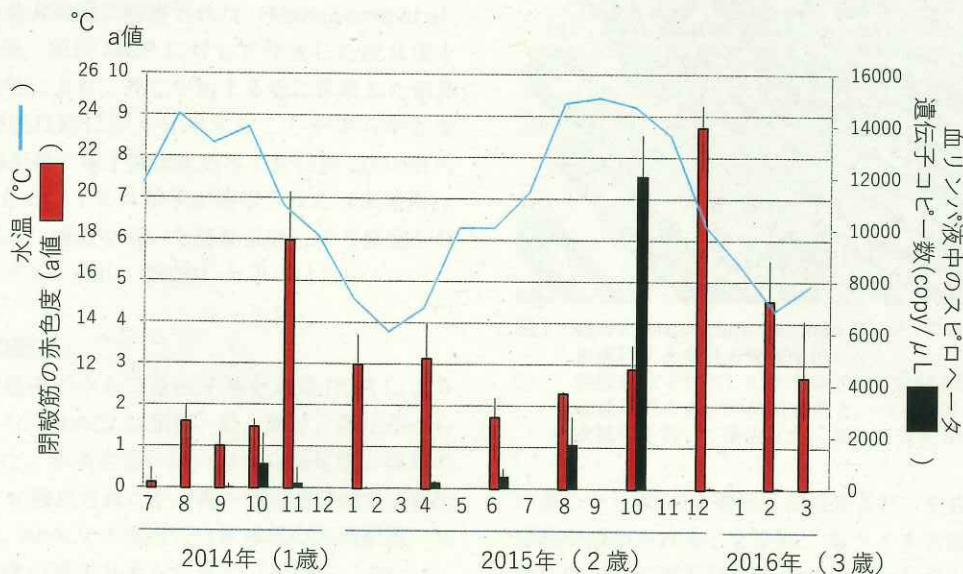


図4 真珠養殖海域で飼育したアコヤガイの血リンパ液中の *Candidatus Maribrachyspira akoyae* 遺伝子量, 閉殻筋の赤色度と水温の季節変化  
 赤棒は閉殻筋の赤色度, 黒棒は血リンパ液中の *Candidatus M. akoyae* 遺伝子コピー数の5個体の中央値と標準誤差を, 線グラフは水温を示す。中国産と国産アコヤガイを親として作成した交雑貝を2014年4月から真珠養殖海域に垂下飼育し, 定期的に5個体について測定した。

矛盾なく説明できることから、本菌が赤変病の原因と考えられる。

### 1-5. 結果とその後

本菌の分離培養には成功しておらず、コッホの原則は満たしていないが、疫学的状況証拠から赤変病の病原体と考えてまず間違いないと考えている。赤変病の発生から20年以上地道に継続された研究が実り、ようやく病原体の解明にたどり着いたばかりだが、2019年から2年連続でアコヤガイの原因不明の大量死が発生した。本事例も感染症であることが実験的に確かめられている (Matsuyama et al., 2021)。

私の初めての学会発表は平成8年魚病学会秋季大会であり、赤変病が養殖海域全域で顕在化した年である。会場の外には赤変病の被害を受けた真珠養殖業者によると思われる、学会に助けを求める張り紙があった。その後本病は、我が国最大の魚病被害をもたらすこととなる (山下・小田原, 2016)。赤変病も、後述するアワビの筋萎縮症も、原因が特定されるより前に試行錯誤的な努力により時間をかけて対策方法が見つけられてきた。2019年より発生した新たな疾病には、可能な限り早く病原体を特定し、研究面から被害の低減に貢献したい。

## 2. アワビの筋萎縮症

本病は70年代後半にアワビの種苗生産過程で発生したウイルス性疾病である (中津川, 1990; 桃山, 2000)。累積死亡率が90%を超えることもあり、アワビの種苗生産において最も恐れられる疾病である。病理学的には主に神経に形成される異常細胞塊が特徴とされている (中津川ら, 1988; 桃山ら, 1999)。電子顕微鏡観察等により原因ウイルスの特定が試みられてきたが、成功していなかった。

我々は粗精製した病原体分画のNGS解析と感染試験により、病原体の特定を試み、アフリカ豚熱の原因である African swine fever virus (ASFV) に類似したウイルスを本病の病原体として特定した (Matsuyama et al., 2020)。

### 2-1. NGSとPCR/RT-PCRによる病原体の探索

NGSを用いた病原体の探索において解析の邪魔になる宿主由来の核酸を除去するために、病員の磨砕濾液にヌクレアーゼを添加し、25°Cで超遠心に供試し、遠心中に粒子外の核酸を分解しつつ沈渣を得た。健全なクロアワビに本沈渣を接種したところ、130日後には約半数が死亡し、生残個体には異常細胞塊が形成されたことから、本沈渣に病原体が存在することが確認できた。そこで、本沈渣に含まれるDNAとRNAをNGSにより網羅的に解読した。沈渣由来のリードと、健全なアワビのゲノムから取得したリードを合わせてアセンブルした。沈渣由来のリードのみから形成されたスキファールドを抽出

し、500 bp以上の塩基長を持つ74配列を得た。このうち15配列は、Blast解析でアワビの配列に相同性を示したため除外した。残りの59配列についてPCR、RT-PCR法により健全貝と病貝を対象に配列の有無を調査したところ、12配列が病貝のみから特異的に検出されたことから、病原体由来の配列と考えられた。

### 2-2. ギャップの増幅と部分ゲノム解析

上記の解析で得られた12配列について、各配列の外側に向けてプライマーを設計し、配列間のギャップを増幅したところ、10配列間のギャップが増幅し約155 kbpの1つの長い配列にまとめられた。つまり、少なくとも本10配列は、一つの連続したゲノムに由来することが明らかとなった。本配列には159個の遺伝子が予測され、47遺伝子はASFVの遺伝子に相同性検索でトップヒットした。よって、筋萎縮症の病原体はASFVに近縁なウイルスと考えられる (図5)。本解析で得られた約155 kbpの部分ゲノム配列と、ASFVのゲノムを比較するとシクニも保存されていた (図6)。本ウイルスのゲノム全長は未解読であり、ウイルス粒子も観察できていないことから正式な命名はできないが、暫定的な仮称として *Abalone asfa-like virus* (AbALV) を提唱した。ASFVは豚に極めて高い病原性を示す産業上重要なウイルスであり精力的に研究されているが、近縁種が存在せず1科1種の珍しいウイルスである。登録されたメタゲノムデータを含めてもAbALVとASFVは最も近縁関係にあり (Karki et al., 2021)、AbALVはウイルス学的にも重要な位置を占める。AbALVの分類学的な位置を明確にし、正式な名称を与えるために、全ゲノム配列の取得とウイルス粒子の構造解析を進めている。

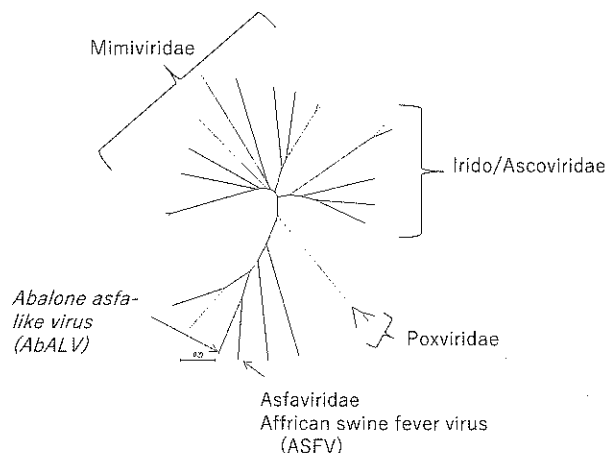


図5 巨大核質DNAウイルスの分子系統樹  
一例として、巨大核質DNAウイルス (Nucleocytoplasmic large DNA viruses) が共通に持つDNA polymerase B遺伝子に基づいた最尤法による系統樹を示す。

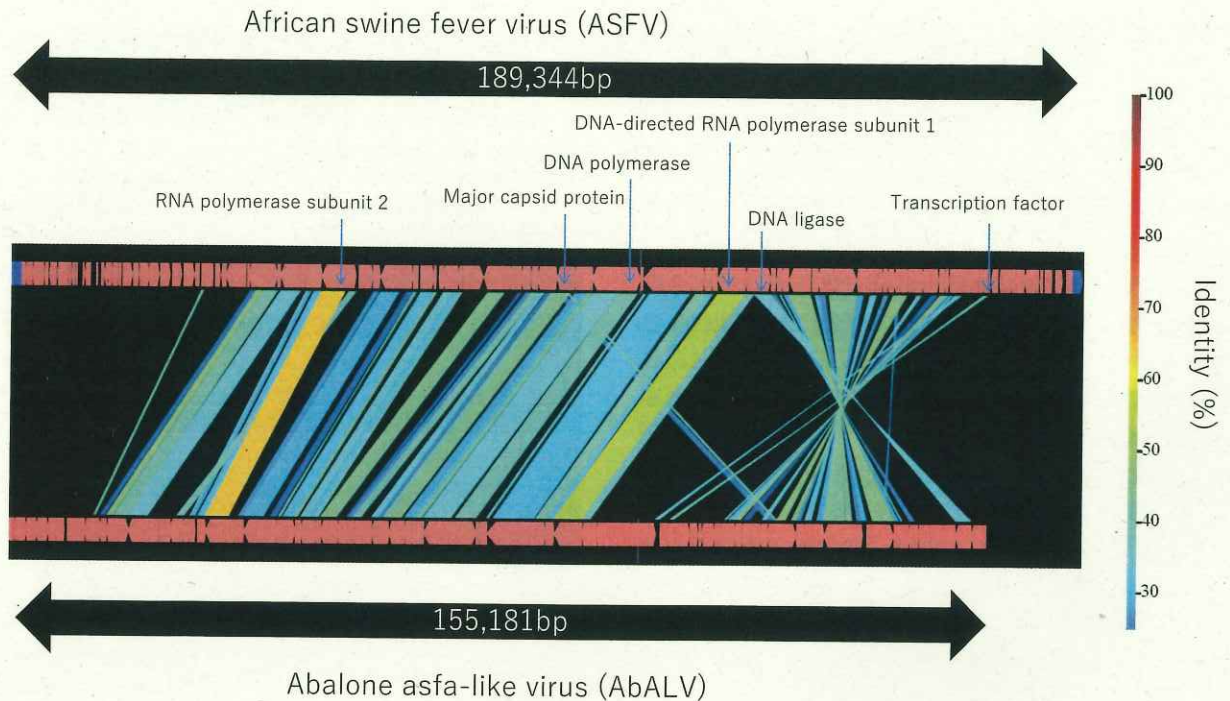


図6 Abalone asfa-like virus (AbALV) と African swine fever virus (ASFV) のゲノムシンテニー  
 上段は ASFV, 下段は本研究で得られた AbALV の部分ゲノム配列, 朱色で数珠つなぎに示された矢印はコーディング領域 (CDS) とゲノム上での方向を示す。ヌクレオチド同一性が30%を超える CDS を図右側のスケールバーに従って線で結びつけた。結合のない黒い領域はシンテニーがない。GenomeMatcher (Ohtsubo *et al.*, 2008) で描画。

### 2-3. AbALV の組織分布とウイルス粒子の観察

本ウイルスの major capsid protein (MCP) 遺伝子を標的に、クロアワビ病貝に対して *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、陽性シグナルは主に筋肉と消化管周辺の結合組織に観察された (Matsuyama *et al.*, 2020)。その後、組換え MCP に対して作成した抗血清を用いた免疫染色により、死亡が始まる頃に採取した個体では、陽性細胞は鰓に多く分布することが明らかとなり (図7)、鰓組織の電子顕微鏡観察で粒径約 200 nm の ASFV に類似したウイルス粒子が観察された (未発表)。本粒子サイズは、濾液を用いた感染試験により推定された病原体のサイズ (桃山, 2000) と矛盾はない。

### 2-4. 診断法の確立

病貝の各組織中のウイルス遺伝子量を定量 PCR により調査したところ、AbALV は頭部、鰓、腸管、腹足筋から多く検出された。体表粘液の拭い液から腹足筋と同等の感度で AbALV が検出されたが、糞や飼育槽壁面では検出率が低かった。AbALV の検出には軟体部の各種組織、あるいは体表粘液が適切と考えられた (松山ら, 2021)。本検査法は、診断や親貝の選抜に利用されている。

### 2-5. 対策と今後の課題

全国各地から不明病診断の目的で持ち込まれるアワビ

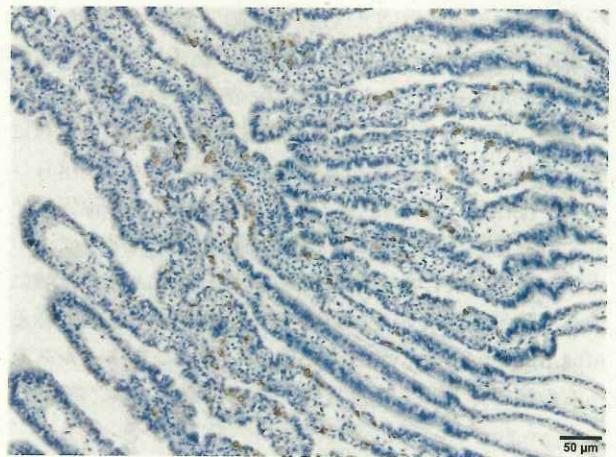


図7 組換え Major capsid protein (MCP) に対して作成した抗血清による病貝の免疫染色  
 感染試験で作出したマダカアワビ病貝の鰓を、組換え MCP 抗原に対するマウス抗血清と、ペルオキシダーゼ標識二次抗体を用いて染色した。茶色に見えるのが陽性細胞。

の多くから AbALV 遺伝子が検出され、免疫染色でも陽性細胞が観察されることから、本ウイルスは国内の広い範囲に分布することは明らかである。したがって、感染のリスクはどの地域でもありうる。放流が行われたことがない海域で採卵用親貝として採捕されたクロアワビが、筋萎縮症の病原体を保有していたことが報告されており (中津川ら, 2000)、自然海域には病原体が広く分布して

いる可能性がある。また、感染試験と生産現場における検査から、既報のクロアワビ、エゾアワビ、マダカアワビだけではなく、異常細胞塊が観察されないことなどから本病に感受性がないとされていたメガイアワビも（桃山ら, 1999）、特に若齢群では本ウイルスに感染し、クロアワビと同様に大量死することが明らかとなった（Matsuyama *et al.*, 2021）。なお、トコブシは感染試験の結果から、本ウイルスに対する感受性がなく、ウイルスも保持しないと考えられる（Matsuyama *et al.*, 2021）。放流用種苗の多くは、天然資源の遺伝的多様性を保全するために、野生個体を採捕し養成した親貝から生産される（原, 2008）。しかし、天然採捕したアワビ類は本ウイルスを保有している可能性があり、殺菌していない自然海水を飼育水に用いることと共に、感染のリスクとなりうると考えて対策を取る必要がある。

重要なこととして、種苗生産における本感染症の発生は、天然資源減少へのリスクともなる可能性が考えられる。天然資源と本病を関連付けた研究は行われていないが、本ウイルスの病原性の高さから本病の資源への影響が危惧される。飼育施設からの排水や放流種苗を介して病原体を自然界へ放出させないためには、種苗生産における感染症の発生を防ぐのが最善であろう。種苗生産施設においては注水の紫外線殺菌（柴田ら, 2002）と受精卵の洗浄（岡田ら, 2000; 柴田ら, 2002）により防除が可能である。少なくとも本病に感受性が高い当歳貝を生産飼育する施設には、取水へ殺菌装置を設置していただきたい。万が一に備えて排水も殺菌処理できれば万全と思われる。

本病もアコヤガイの赤変病と同じく、原因がわからない状況下で対策が講じられてきた。本研究で特定した病原ウイルスの特性を明らかにし、被害軽減に向けた新たな対策を生産現場へ還元していきたい。

## 謝 辞

本総説の研究は多数の共同研究者による成果である。共同研究者の皆様、予算獲得とマネジメントに尽力いただいた方々、試験研究機関ならびに養殖業者の皆様、実験補助の皆様へ感謝申し上げます。

本研究の一部は、生研支援センター「先導プロジェクト」ならびにJSPS 科研費24580291, 18H02282によって行われた。

## 文 献

- 原 素之 (2008): アワビ野生集団の遺伝的管理. 動物遺伝育種研究, **36**, 105–115.
- Karki, S., M. Moniruzzaman and F. O. Aylward (2021): Comparative Genomics and Environmental Distribution of Large dsDNA viruses in the family Asfarviridae. *Front. Microbiol.*, **12**, 514.
- 黒川忠英・鈴木 徹・岡内正典・三輪 理・永井清仁・中村弘二・本城凡夫・中島員洋・芦田勝朗・船越将二 (1999): 外套膜片移植および同居飼育によるアコヤガイ *Pinctada fucata martensii* の閉殻筋の赤変化を伴う疾病の人為的感染. 日本水産学会誌, **65**, 241–251.
- Matsuyama, T., M. Yasuike, A. Fujiwara, Y. Nakamura, T. Takano, T. Takeuchi, N. Satoh, Y. Adachi, Y. Tsuchihashi, H. Aoki, K. Odawara, S. Iwanaga, J. Kurita, T. Kamaishi and C. Nakayasu (2017): A Spirochaete is suggested as the causative agent of Akoya oyster disease by metagenomic analysis. *PLoS One*, **12**, e0182280.
- Matsuyama, T., Y. Matsuura, M. Inada, T. Takano, C. Nakayasu, T. Sakai, S. Terashima, M. Yasuike, A. Fujiwara, Y. Nakamura, Y. Tsuchihashi, K. Odawara, S. Iwanaga and T. Masaoka (2018): An epidemiological study of akoya oyster disease using polymerase chain reaction targeting Spirochaetes genes. *Fish Pathol.*, **53**, 63–70.
- Matsuyama, T., T. Takano, C. Nakayasu, K. Odawara, Y. Tsuchihashi, S. Tanaka, M. Yasuike, A. Fujiwara, Y. Nakamura and M. Masaoka (2019): Spatiotemporal dynamics of Spirochaeta, the putative etiologic agent of Akoya oyster disease in pearl oysters, as determined by quantitative PCR. *Aquacult.*, **433**, 734433.
- Matsuyama, T., T. Takano, I. Nishiki, A. Fujiwara, I. Kiryu, M. Inada, T. Sakai, S. Terashima, Y. Matsuura, K. Isowa and C. Nakayasu (2020): A novel Asfarvirus-like virus identified as a potential cause of mass mortality of abalone. *Sci. Rep.*, **10**, 1–12.
- 松山知正・桐生都也・稲田真理・中易千早 (2021): PCRによる Abalone asfa-like virus の検出に適した検体採取部位の検証. 魚病研究, **56**, 18–21.
- Matsuyama, T., I. Kiryu, M. Inada, T. Takano and T. Kamaishi (2021): Susceptibility of four abalone species, *Haliotis gigantea*, *Haliotis discus discus*, *Haliotis discus hannai* and *Haliotis diversicolor*, to Abalone asfa-like virus. *Viruses*, (accept).
- Matsuyama, T., S. Miwa, T. Mekata, Y. Matsuura, T. Takano and C. Nakayasu (2021): Mass mortality of pearl oyster (*Pinctada fucata* (Gould)) in Japan in 2019 and 2020 is caused by an unidentified infectious agent. *Peer J*
- 桃山和夫 (2000): アワビの筋萎縮症原因体の性状に関する検討. 魚病研究, **35**, 179–184.
- 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.
- 森実庸男・滝本真一・西川 智・松山紀彦・蝶野一徳・植村作治郎・藤田慶之・山下浩史・川上秀昌・小泉喜嗣・内村祐之 (2001): 愛媛県宇和海における軟体部の赤変化を伴うアコヤガイの大量へい死. 魚病研究, **36**, 207–216.
- 永井清仁・岡田昌樹・郷 譲治 (2004): 低水温漁場を用いたアコヤガイの病害被害軽減方策. 日本水産学会誌, **70**, 674–677.
- Nagai, K., J. Go, S. Segawa and T. Honjo (2007): A measure to prevent relapse of reddening adductor disease in pearl oysters (*Pinctada fucata martensii*) by low-water-temperature culture management in wintering fisheries. *Aquaculture*, **262**, 192–201.
- 中島員洋 (1999): アコヤガイの大量死における伝染性病原体の関与について. 魚病研究, **34**, 227.
- 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・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.
- 中津川俊雄・岡部三雄・室賀清邦 (2000): クロアワビ筋萎縮症の水平感染. 魚病研究, **35**, 11-14.
- Nakayasu, C., H. Aoki, M. Nakanishi, H. Yamashita, M. Okauchi, N. Oseko and A. Kumagai (2004): Tissue distribution of the agent of akoya oyster disease in Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. *Fish pathol.*, **39**, 203-208.
- 小田原和史・山下浩史・曾根謙一・青木秀夫・森 京子・岩永俊介・中易千早・伊東尚史・栗田 潤・飯田貴次 (2011): 天然アコヤガイを用いたアコヤガイ赤変病の病勢調査. 魚病研究, **46**, 101-107.
- Ohtsubo, Y., W. Ikeda-Ohtsubo, Y. Nagata and M. Tsuda (2008): GenomeMatcher: a graphical user interface for DNA sequence comparison. *BMC bioinformatics*, **9**, 376.
- 岡田一宏・西村守央・河村 剛 (2000): クロアワビ当歳貝の隔離飼育による筋萎縮症の予防. 水産増殖, **48**, 657-663.
- 柴田利治・筑紫康博・中本 崇・渡辺健二・永島孝之 (2002): 給水の紫外線消毒によるクロアワビ筋萎縮症の予防. 水産増殖, **50**, 227-232.
- 和田浩爾 (1999): 貝柱褐色化アコヤガイの大量へい死に関する疫学的調査研究結果. 真珠の雑誌, **40**, 1-25.
- 山下浩史・小田原和史 (2016): アコヤガイ赤変病. 魚病研究, **52**, 11-14.
- 良永知義・花見 梢 (2018): アコヤガイ赤変病: 20年間の真珠産業への影響. 魚病研究, **53**, 136-138.