

ガザミ幼生に発生したビブリオ病

誌名	水産増殖 = The aquiculture
ISSN	03714217
著者	室賀, 清邦 鈴木, 康二 石橋, 矩久
巻/号	37巻2号
掲載ページ	p. 133-141
発行年月	1989年5月

ガザミ幼生に発生したビブリオ病

室賀清邦¹⁾・鈴木康二¹⁾・石橋矩久^{2)(*)}
野上欣也²⁾

(¹⁾広島大学生物生産学部・²⁾日本栽培漁業協会玉野事業場)

A Vibriosis Occurring in Zoeal Larvae of Swimming Crab *Portunus trituberculatus*

Kiyokuni MUROGA, Kouji SUZUKI, Norihisa ISHIBASHI,
and Kinya NOGAMI

Abstract

National and prefectural agencies in Japan are actively engaged in the hatchery propagation of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) to augment declining population in littoral waters. At Tamano Station of Japan Sea-Farming Association, one of the most advanced hatcheries for larval crab production, seed production of the crab had been successful for more than 10 years until 1985. In 1985, 1987 and 1988, however, mass mortalities occurred frequently in zoeal larvae reared at the station, and a new vibrio tentatively named *Vibrio* sp. Zoea was isolated from diseased zoeae. It was confirmed by addition of *Vibrio* sp. Zoea to the water or oral administration of the bacteria incorporated to rotifers that the isolate was capable of killing zoeal larvae.

現在、我が国で生産されているガザミ (*Portunus trituberculatus*) の種苗 (第1齡稚ガニ) は約5,500万尾 (昭和61年度) に達しているが、その生産技術は必ずしも確立されておらず、著しく低い歩留りに終る生産事例も決してめづらしくない。餌料や飼育環境などについてもまだ問題が残されているが、疾病も無視しえない減耗要因の1つになっている。ガザミの種苗生産が水産庁の指定研究に採り上げられてから既に25年が経過しようとしているが、疾病の発生の実態あるいは原因についてはほとんど明らかにされることなく現在に至っている。ガザミ種苗生産研究会による「ガ

ザミ種苗の量産技術」の「疾病と対策」¹⁾の項には、ガス病、白濁症、奇型および付着生物の4つの疾病ないし問題が挙げられているが、いずれの場合も飼育成績を左右するほど大きな問題になった例は少ないとされている。しかし、技術開発の段階から量産段階に移行するにつれ、疾病による被害は各地のガザミ種苗生産場において次第に大きな問題となってきている。

日本栽培漁業協会玉野事業場 (以下単に玉野事業場) においては1973年 (昭和48年) にガザミの種苗生産に着手し、その後1984年までは比較的安定した生産実績を残してきた。ところが1985年 (昭和60年) に疾病に

受領日: 1988 (S63) 年12月26日

索引語: ガザミ/ゾエア/ビブリオ病/分離菌の性状

連絡先: 〒724 東広島市西条町下見 広島大学生物生産学部 室賀清邦

Address: K. MUROGA, Fac. Appl. Biol. Sci., Hiroshima Univ., Higashi-Hiroshima 724, Japan

(*) 現所属: 日本栽培漁業協会八重山事業場

よると考えられるゾエア幼生の大量斃死が発生し多大の被害を蒙った。翌1986年には病害はほとんど発生しなかったが、1987年および1988年には再び疾病による被害が発生し、生産量は目標量を大幅に下回る結果に終わった。これらの3カ年に発生した疾病は1種類ではなく、本論文で報告する細菌感染症のほか真菌症や特には寄生体が認められず、幼生の棘や脚の先端などが壊死する病気、更にはフィラメント状細菌(filamentous bacteria)などの epibionts²⁾の付着といった異常が認められた。これらの疾病の中ではある種の *Vibrio* 属細菌による細菌性疾病が最も重要であると考えられ、本病の発生状況および原因菌の性状について検討を加えたので以下にその結果を報告する。

材料および方法

細菌分離 1985, 1987および1988年に玉野事業場において飼育されていたゾエア幼生のうち、大量斃死発生時の瀕死個体を材料に細菌の分離を行った。10ないし20個体からなる1材料を金属製の茶こしに収容し、0.1%塩化ベンザルコニウム溶液に30秒間浸漬してから水道水で30秒間洗浄し、体表に付着している細菌を不活化・除去した。なお、1985年には滅菌海水で洗浄しただけのゾエアを材料とした。それらの材料を滅菌生理食塩水1mlを加えてガラスホモジナイザーで磨りつぶし、生理食塩水を用いて適宜希釈した後、ZoBell 2216e 寒天培地³⁾に拡げ25℃もしくは室温(20~30℃)で培養した。

本方法により瀕死ゾエア幼生の体内から純培養状に分離された6菌株(1985年分離株:85Z-1, 85Z-3, 1987年分離株:87Z-1, 87Z-2, 1988年分離株:88Z-1, 88Z-2)を以下の各種実験に供した。

分離菌の性状検査 生化学的性状検査には汚過海水を用いて調製した市販の検査培地を使用し、培養温度は25℃とした。至適培養条件を調べた生理学的試験においては、下記の液体培地に85Z-1株を接種し経時的に分光光度計にて濁度を測定した。温度、塩分およびpHの試験に、5/6濃度の希釈海水で調製した普通ブイヨン(栄研)、所定の濃度になるように食塩を加えた1%ペプトン水、および所定のpHに調整した1%ペプトン海水(汚過滅菌)をそれぞれ用いた。

85Z-3株を除く5分離株および性状がよく似ていることから選んだサバヒー(milkfish, *Chanos chanos*)病魚由来の *Vibrio* sp.⁴⁾ 1株(O-3)の計6株について、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法によりDNAのGC含量を測定した。pH 9フェノー

ル緩衝液法⁵⁾によりDNAを抽出し、KUMAGAI *et al.*⁶⁾の方法に従い、ヌクレアーゼP1(ヤマサ醤油)でDNAを加水分解した。得られた試料をHPLC(島津製作所, LC-5A)で分析し(カラム:Cosmosil 5 C₁₈-P, 移動相:メタノール:0.02MKH₂PO₄=3:97, 流速:1.0ml/min, カラム温度:室温), GC含量を求めた。

血清学的試験においては、85Z-1および87Z-1株のホルマリン死菌で作製したそれぞれの家兎抗血清を20倍に希釈し、各供試菌株の生菌および加熱(100℃, 2.5時間)死菌とのスライド凝集試験を行った。

病原性試験 玉野事業場で飼育されていたゾエア幼生あるいは第1齡稚ガニのうち健全と思われるものを材料に用い、主として添加法による感染実験を実施した。ガラス製ビーカー数個に砂汚過海水を1ℓずつ入れ、それぞれにゾエア幼生100個体もしくは稚ガニ10個体を収容した。ZoBell 寒天培地にて25℃で1~2日培養した各供試菌株を所定の濃度になるようビーカー中の飼育水に添加し感染を計った。1時間後にそれぞれの区において半量の飼育水を新しい汚過海水と交換した。その後適宜ワムシを投与し、換水しながら1日ないし2日間観察を行った。実験水温は21.0~26.5℃の範囲にあった。

代表株85Z-1を用いて経口感染実験を行った。ここではMURUGA and YASUNOBU⁷⁾にならい、 6.9×10^6 および 6.9×10^8 CFU/mlの濃度の菌液にシオミズツボムシ(以下ワムシ)を30分浸漬し、そのワムシを0.05g(湿重量)各区に投与した。感染時およびそれ以後のゾエアの飼育方法は上記の添加法攻撃の場合と同じである。

アユに対する病原性を調べるため、85Z-1株を 7.5×10^6 CFU/mlとなるよう懸濁させた1%食塩水中にアユ(平均体重17.2g)を5分間浸漬するか、 7.5×10^4 , 7.5×10^5 もしくは 7.5×10^6 CFU/尾となるよう腹腔内接種した。その後1週間それらの魚を流水中(淡水, 水温:19.3~20.5℃)で飼育し観察した。

結 果

ビブリオ病発生状況 玉野事業場における過去4年間の種苗生産の歩留り、すなわち収容したゾエアI期幼生から第1齡稚ガニまでの生残率をTable 1に示した。同表には顕微鏡観察による瀕死ゾエア体内における運動性短桿菌の確認に基づくビブリオ病の発生の有無についても記載した。1985年の場合、生産回次1~5までの歩留りは低かったが、ビブリオ病の発生は確

認されずフィラメント状細菌を主体とした epibionts の着生が目についた。その後、生産回次8を除く6～10では順調に種苗が生産されたが、生産回次11以降はゾエアⅠ～Ⅲ期においていずれも大量斃死が発生した。この時の死亡個体あるいは瀕死個体の体内には無数の運動性短桿菌が観察され、そのような個体群から細菌の分離を行ったところ後節で説明するようなある種の *Vibrio* 属細菌が優勢もしくはほぼ純粋に分離され、これらの死亡はビブリオ病によるものと推測された。翌1986年には本病は発生しなかったが、1987年および1988年には最初の数回の生産が順調に行われただけで5ないし8回次以降はビブリオ病が多発し、殆どの生産は中止された。

ビブリオ病は現在までのところゾエア期にのみ発生

し、メガロパ期あるいは稚ガニにおいては発生していない。ゾエア期の中でもゾエアⅣ期における発生は稀であり、もっぱらⅠ～Ⅲ期に集中している。本病は、玉野事業場における飼育水温の範囲である22～26℃のいずれの温度でも発生しているが、特に23～25℃において多発している。

なお、玉野事業場においては200㎡の屋内コンクリート水槽（時に60㎡屋外水槽を使用）を用い、ふ化幼生の収容密度は約17,000～30,000個体/㎡、餌料としては微生物フロック⁹⁾、ワムシおよびアルテミア幼生をゾエアに、アルテミアおよびアミ・アサリミンチをメガロパにそれぞれ投与しながら種苗生産を行っている。飼育水の管理方式としてはクロレラの添加や流水量の調節など種々の検討を試みているが、今のところ

Table 1 Survival rate and occurrence of vibriosis in seed production of swimming crab (*Portunus trituberculatus*) at Tamano Station

Production trial	Survival rate (%) from hatched larvae to juvenile crab-I			
	1985	1986	1987	1988
1	6	0	38	51
2	4	41	59	69
3	0	30	1	38
4	0	41	4	7
5	0	26	0 +	0
6	46	24	0	0
7	40	31	0 +	0
8	2	29	0 +	0 +
9	50	25	0 +	20
10	21	41	0 +	0 +
11	0 +*	10	0 +	0 +
12	0 +	10	0 +	0 +
13	0 +	16	0 +	0
14	0 +		0	0 +
15	0 +		0 +	0 +
16	0 +		0	0 +
17			0	3
18			0	0
19			0 +	
20			0 +	
Total number of juvenile crab produced	804×10 ⁴	1,558×10 ⁴	441×10 ⁴	803×10 ⁴

* Occurrence of vibriosis + : moribund zoeae were confirmed to contain *Vibrio*-like motile short rods within body.

Table 2 Characteristics of *Vibrio* sp. Zoea isolated from diseased zoeae of swimming crab

Character	<i>Vibrio</i> sp. Zoea (6 strains)
Gram stain	-
Motility	+
Flagella	SP
Oxidase	+
Catalase	+
OF test	F
Gas from glucose	-
Indole production	+
Nitrate reduction	+
Gelatin liquefaction	+
Methyl red test	+
Voges-Proskauer test	-
Hydrogen sulphide	+W
Arginine decomposition	-
Lysine decarboxylation	+
Ornithine	+
Leucine	-
Serine	-
Tyrosine	-
Citrate	+
Tween 80	+
β -galactosidase	+ -
Gluconate	-
Growth at	
4°C	-
35°C	+
42°C	-
NaCl tolerance	
0%	-
0.5%	+
3%	+
6%	+
8%	-
10%	-
Sensitivity to 0/129	+
Acid from	
Xylose	-
Arabinose	-
Mannose	+
Galactose	+
Sucrose	+
Trehalose	+
Cellobiose	+
Melibiose	-
Lactose	-
Salicin	+ -
Mannitol	+
Sorbitol	-
Inositol	-
Rhamnose	-
Glycerol	+
Fructose	+
Maltose	+
Erythritol	-
Inulin	-
Glycogen	+
Rhaffinose	-
Dextrin	+
Adonitol	-
Dulcitol	+ -
Glucose	+

SP : Single Polar F : Fermentative
+W : Weakly positive

Table 3 DNA base composition (G+C content) determined by HPLC method

Species and Strain	GC mol%
<i>Vibrio</i> sp. Zoea	
85Z-1	47.3
87Z-1	46.9
87Z-2	47.6
88Z-1	46.3
88Z-2	47.7
<i>Vibrio</i> sp. from milkfish*	
O-3	46.5

* MUROGA *et al.*, 1984⁹⁾

ビブリオ病の発生と飼育方式の間に特に関連性は認められない。

分離菌の性状 分離株6株の形態学的、生理学的および生化学的性状をTable 2に、代表株5株およびサバヒー由来の*Vibrio* sp. O-3株のGC含量をTable 3に、それぞれ示した。Table 2に示されたように、 β -ガラクトシダーゼおよびサリシンとズルシトール分解能において菌株間に差が認められるだけであり、その他の性状においては供試6株は同一の反応を示した。また調べた5株のGC含量は 47.2 ± 0.9 mol%であり、*Vibrio* sp. O-3株の値は46.5mol%であった。

Fig. 1, 2 および3に85Z-1株の増殖に及ぼす温度、食塩濃度、およびpHの影響を調べた実験結果を示した。それらの図に見られるように、本菌の増殖至適温度は30~35°C、至適塩分は2%前後、至適pHは7~8であった。

Table 4に抗85Z-1および抗87Z-1家兎血清と6分離株とのスライド凝集反応の結果を示した。抗85Z-1血清とはホモ株85Z-1のみならず85Z-3および88Z-1株が凝集したが、抗87Z-1血清とはホモ株のみが凝集陽性を示した。なお反応陽性の組み合わせについては、加熱抗原を用いて再度試験を行ってみたがやはり陽性であり、これらの凝集反応は主としてO抗原の反応に基づくものと判断された。なおサバヒー由来のO-3に再分離された(抗血清にて確認)。本実験の結果から添加および経口のいずれの攻撃方法によっても感染が成立することが判ったが、以後の実験ではより簡便な添加法を用いることとした。

(2) 菌株による毒力の差: 1985, 1987および1988年に

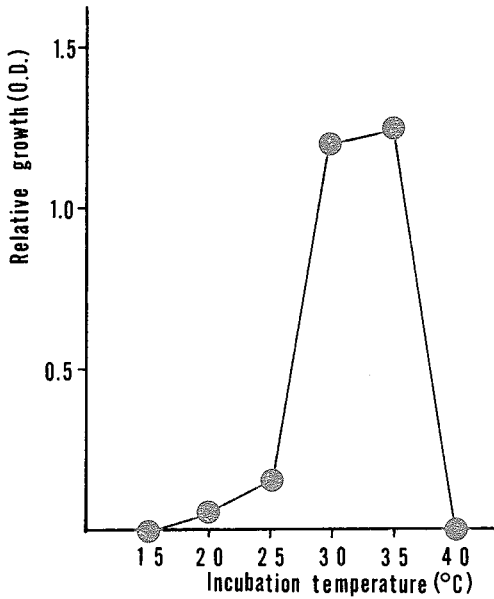


Fig. 1 Effect of temperature on the growth of *Vibrio* sp. Zoea (85Z-1)
 Medium: Nutrient broth (Eiken) in diluted sea water
 Incubation: shaking culture, 9 h

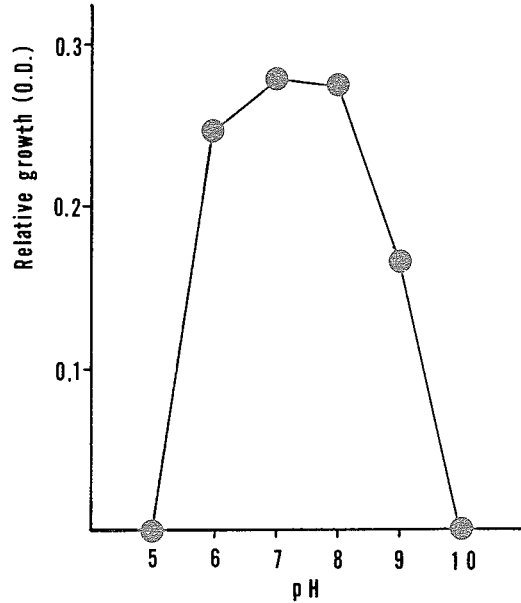


Fig. 3 Effect of pH on the growth of *Vibrio* sp. Zoea (85Z-1)
 Medium: Difco Bacto-Peptone in sea water
 Incubation: shaking culture, 30°C, 6 h

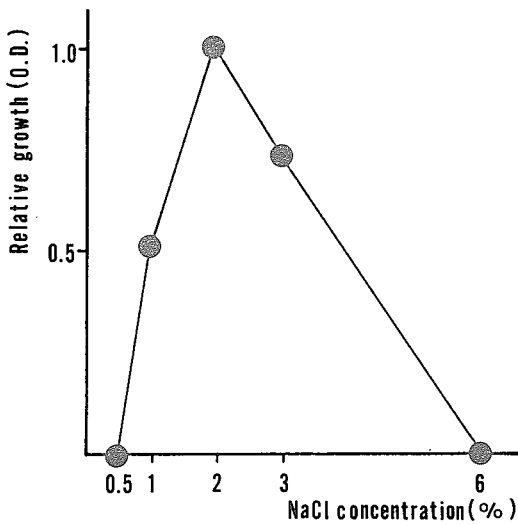


Fig. 2 Effect of NaCl concentration on the growth of *Vibrio* sp. Zoea (85Z-1)
 Medium: Difco Bacto-Peptone (pH 7.0)
 Incubation: shaking culture, 30°C, 9 h

Table 4 Slide agglutination test of 6 strains of *Vibrio* sp. Zoea using 2 rabbit antisera

Strain	Antiserum against	
	85Z-1	87Z-1
85Z-1	+	-
85Z-3	+	-
87Z-1	-	+
87Z-2	-	-
88Z-1	+	-
88Z-2	-	-

株は抗 85Z-1 および抗 87Z-1 血清のいずれにも凝集しなかった。

病原性試験

(1) 感染方法: Table 5 に 85Z-1 株を用いて行った添加感染および経口感染の実験結果を示した。同表にみられるように 6.9×10^8 CFU/ml の菌液に浸漬したワムシを投与した区の死亡率が 38% と若干低かったが、他の攻撃区ではほとんどのゾエアが死亡し、またそれらの死亡個体群からは 85Z-1 株が優勢もしくはほぼ純粋

Table 5 Results of addition and oral challenge tests of swimming crab larvae (zoea-I) with *Vibrio* sp. Zoea (85Z-1)

Method	Challenge dose (CFU/ml)	Mortality in 21 h (%)	Re-isolation of 85Z-1
Addition	6.9×10^7	100	+
	$\times 10^6$	99	+
Oral administration*	6.9×10^8	100	+
	$\times 10^6$	38	+
Control		6	-

* Rotifers immersed in bacterial suspension (85Z-1) of given concentrations for 30 min were administered.
Water temperature: 22.3-24.0°C

Table 6 Results of addition challenge tests of crab larvae (zoea-I) with 5 strains of *Vibrio* sp. Zoea

Experiment (year)*	Strain	Dose (CFU/ml)	Mortality (%) in 18-48 h	
1 (1986)	85Z-1	6.6×10^7	(22 h) 100	
		$\times 10^5$	49	
		$\times 10^3$	34	
	Water temperature 22.8-23.4°C	85Z-3	5.3×10^7	100
			$\times 10^5$	55
	Control	$\times 10^3$	22	
			10	
2 (1987)	85Z-1	1.1×10^8	(18 h) 100	
		$\times 10^6$	64	
		$\times 10^4$	4	
	21.0-26.5°C	87Z-1	1.8×10^8	94
			$\times 10^6$	26
	Control	$\times 10^4$	2	
			6	
3 (1988)	87Z-2	5.3×10^7	(48 h) 49	
		$\times 10^5$	10	
		$\times 10^3$	2	
	22.8-23.0°C	88Z-1	3.0×10^7	(24 h) 100
			$\times 10^5$	83
	Control	$\times 10^3$	19	
			2	

* Year when each experiment was carried out.

分離された5株を用いた添加法による感染実験の結果をTable 6にまとめた。1986年に実施した実験1によれば1985年に分離された2株の間には毒力の差はなかったが、1987年および1988年に実施した実験2および3によれば、87Z-1株は85Z-1株より、87Z-2株は88Z-1株よりそれぞれ毒力は弱かった。85Z-1、85Z-3あるいは88Z-1といった毒力の強い株では 10^5 CFU/mlの濃度

で50%ないしそれ以上のゾエアI期幼生を、 10^7 CFU/mlの濃度ですべてのゾエアI期幼生を、それぞれ24時間以内に死亡させることが判った。

(3) 幼生の発育段階による感受性の違い: いろいろな発育段階の幼生に対して85Z-1株を用いて添加攻撃した実験結果をTable 7に示した。実験1の結果にみられるように、ゾエアIII期幼生はゾエアI期幼生に比較

Table 7 Comparison in susceptibility to *Vibrio* sp. Zoea (85Z-1) among different larval stages of crab by addition challenge

Experiment (year)	Stage of larvae	Challenge dose (CFU/ml)	Mortality (%) in 18 or 48 h
1 (1987)	Zoea-I	1.1×10^8	(18 h) 100
		$\times 10^6$	64
		$\times 10^4$	4
		Control	6
21.0-26.5°C	Zoea-III	1.1×10^8	67
		$\times 10^6$	16
		$\times 10^4$	1
		Control	3
2 (1988)	Zoea-I	4.7×10^5	(48 h) 100
		$\times 10^3$	97
		Control	12
		24.2-25.1°C	Zoea-IV
$\times 10^3$	8		
Control	9		
Juvenile crab-I	4.7×10^5		0
	$\times 10^3$	0	
	Control	0	

して感受性が低かった。また実験2に示されたようにゾエアIV期ではかなり感受性が低くなり、第1齡稚ガニでは感受性は認められなかった。

なお、これらの分離株は半流動ZoBell培地（寒天0.5%）を用いて20°C下で保存しているが、85Z-1株の実験結果からわかるように少なくとも3年間の保存期間の間には毒力の低下はみられなかった。

(4) アユに対する病原性：85Z-1株による浸漬攻撃あるいは注射攻撃を受けたアユにはまったく異常は認められなかった。

考 察

前述の如くガザミの種苗生産の成績は一般的に不安定であり、特にゾエアIV期からメガロバ期への移行期が1つのcritical periodになっており、また生産された稚ガニを中間育成場に移した後にもしばしば大量斃死が起こるとされている⁹⁾。本報で扱ったヒブリオ病はそれらとは違ってゾエア期、それも特にゾエアI～III期に発生するものであり、かつその発生のしかたは非常に急激である。例えばある日正常細菌叢を調べる目的で検査した池のゾエアからは特定の菌種が優勢に分離されず、それらのゾエアは一応正常と判断されたにもかかわらず、その翌日には緩慢な遊泳をする個

体が出現し、その日のうちにあるいは翌日にかけてほぼ全滅するといった事例がしばしば見られた。そしてそのような瀕死状態の個体からはある種の *Vibrio* 属細菌が純培養状に分離されるのである。症状としては、行動の不活発さとそのような衰弱個体の体腔内、特に背棘などの甲棘の内側に活発に運動する短桿菌が多数認められることが挙げられる。なお、同じような異常、すなわち大量斃死前の活力の弱ったゾエア幼生の体内に多くの運動性細菌が見られるといった現象は、1985年に徳島県栽培漁業センターにおいても認められている¹⁰⁾。

検査した6分離株は同一種に分類しうるものであり、その形態、0/129感受性、グルコースの発酵的分解、グルコースからのガス非産生、塩分耐性などの諸性状ならびにGC含量から *Vibrio* 属に分類された。

本菌の性状を Bergey's Manual¹¹⁾に記載された *Vibrio* 属細菌に加えて *V. damsela*¹²⁾、*V. carchariae*¹³⁾、および *V. salmonicida*¹⁴⁾と比較してみたが、それらのいずれにも一致しなかった。そこで過去に魚類あるいはクルマエビの病原菌として報告された種名不明の *Vibrio* 属細菌^{4,15-17)}と比較したところ、フィリピンの子バヒー病魚から分離された *Vibrio* sp.⁹⁾によく似ていることが判った。

サバヒー由来株と、本菌との間には β -ガラクトシダーゼ、0/129感受性、サリシンおよびズルシトールの各項目において差異が認められるにすぎず、Table 3に示したGC含量においてもよく一致していた。以上の結果を踏まえ、罹病ゾエアから分離した細菌を *Vibrio* sp. Zoea と仮称することにした。

スライド凝集試験の結果から、本菌には少なくとも3つ以上のO血清型が存在すると考えられた。なお、感染実験の結果から比較的強い毒力を有すると判断された85Z-1, 85Z-3, および88Z-1の3株が同一血清型に属していることが注目されるが、血清型と毒力の関係については更に多くの菌株を集めた上で検討されるべきであろう。

本病原菌は飼育水あるいはワムシなどの餌料生物に由来するか、もしくは発病前から幼生自身が保菌していると考えられるが、存在量が少ないためか今までのところそれらから本菌は検出されていない。実験的には添加法および経口法のいずれによっても感染は成立したが、本菌の感染源および感染経路については今後の検討課題である。

本菌感染症は23~25°Cの時に多発しているが、本菌の増殖至適温度が30~35°Cであることからすれば水温が高いほど本感染症が発生しやすいように思われる。しかしながら実験的には20°Cでも本感染症が発生していることが確められており(鈴木ら、未発表)、温度制御により本病の発生を防ぐことは困難なように思われる。幼生の発達段階が進む程本菌に対する感受性は低下し、第1齡稚ガニはもはや感受性を示さなかったが、この実験結果は本病がゾエア期にのみ発生しているという事実とよく一致し、本病はゾエア幼生期に特有の病気と考えられる。*Vibrio* sp. Zoea はアユに対してまったく病原性を示さなかったが、ガザミのゾエア幼生に対しては3年間に亘り繰返し大量斃死をもたらしており、本菌は甲殻類に対する特有の病原因子あるいは親和性を有しているものとも考えられる。今後はこれらの点を考慮しながら本菌の生態およびゾエア幼生への侵入機構について検討を進めていく必要がある。

謝 辞

本研究に要した研究費の一部は水産庁よりの「健苗育成技術開発委託事業」によって賄われたことを記して謝意を表す。また本研究を実施するにあたり種々の御協力をいただいた日本栽培漁業協会の職員の方々に感謝します。

文 献

- 1) 丹下勝義(1983): 疾病と対策。「ガザミ種苗の量産技術」(水産増養殖叢書32), ガザミ種苗生産研究会, 日本水産資源保護協会, 石崎書店, 東京, pp. 118-123.
- 2) JOHNSON, P.T. (1983): Diseases by viruses, rickettsiae, bacteria and fungi. In "The Biology of Crustacea, Vol. 6 Pathobiology", Ed. PROVENZANO, A. J. JR., Academic Press, New York, pp. 1-78.
- 3) AARONSON, S. (1970): Procedures for the enrichment and/or isolation of microorganisms. In "Experimental Microbiol Ecology", Academic Press, New York, pp. 65-228.
- 4) MUROGA, K., G. LIU-PO, C. PROGO, and R. IMADA (1984): *Vibrio* sp. isolated from milkfish (*Chanos chanos*) with opaque eyes. *Fish Pathol.*, **19**, 81-87.
- 5) 斎藤日向(1966): 細菌およびファージDNAの調製。蛋白質・核酸・酵素, **11**, 446-450.
- 6) KUMAGAI, M., M. FUJIMOTO, and A. KUNINAKA (1988): Determination of base composition of DNA by high performance liquid chromatography of its nuclease P₁ hydrolysate. *Nucleic Acid Research, Symposium Series*, No 19, 65-68.
- 7) MUROGA, K. and H. YASUNOBU (1987): Uptake of bacteria by rotifer. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 2091.
- 8) 尾田 正(1983): 餌料と給餌。「ガザミ種苗の量産技術」(水産増養殖叢書32), ガザミ種苗生産研究会, 日本水産資源保護協会, 石崎書店, 東京, pp. 97-117.
- 9) NAGATA, W.D. and H. HIRATA (1986): Mariculture in Japan: Past, present and future perspectives. *Mini Rev. Date File Fish. Res.*, **4**, 1-38.
- 10) 東條秀雄(1986): ガザミ種苗生産。昭和60年度徳島県栽培漁業センター事業報告書, 33-36.
- 11) KRIEG, N.R. and J.G. HOLT (1984): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. I*, Williams & Wilkins, Baltimore, 964 pp.
- 12) LOVE, M., D. TEEBKEN-FISHER, J.E. HOSE, J.J. FARMER III, F.W. HICKMAN, and G.R. FANNING (1981): *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science*, **214**, 1139-1140.
- 13) GRIMES, D.J., J. STEMMLER, H. HADA, E.B. MAY, D. MANEVAL, F.M. HETRICK, R.T. JONES, M. STO-

- SKOPF, and R.R. COLWELL (1984): *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microb. Ecol.*, **10**, 271-282.
- 14) EGIUS, E., R. WILK, K. ANDERSEN, K.A. HOFF, and B. HJELTNES (1986): *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 518-520.
- 15) 楠田理一 (1965): 海産魚の潰瘍病に関する研究. 京都府水産試験場業績, 第25号, 1-116.
- 16) 畑井喜司雄・安元 進・安永統男 (1981): 養殖マアジから分離されたビブリオ菌について. 魚病研究, **16**, 111-118.
- 17) 高橋幸則・下山泰正・桃山和夫 (1985): 養殖クルマエビから分離された *Vibrio* 属細菌の病原性ならびに性状. 日水誌, **51**, 721-730.