

主論文

トラフグの口白症病原体関連タンパク質を標的にした本症の血清学的診断法に関する研究

高見生雄

平成19年

## 目 次

主論文 .....	114
第1章 長崎県における口白症の発生状況	
目的 .....	117
材料および方法 .....	117
・トラフグ養殖の実態調査および口白症の発生状況調査	
・トラフグ養殖業者が口白症と診断した病魚を用いた再現実験	
・長崎県における養殖トラフグの魚病発生状況調査	
結果および考察 .....	119
・トラフグ養殖の実態調査および口白症の発生状況調査結果	
・トラフグ養殖業者が口白症と診断した病魚を用いた再現実験結果	
・長崎県における養殖トラフグの魚病発生状況調査結果	
第2章 各種魚種の口白症病原体に対する感受性	
目的 .....	127
材料および方法 .....	127
・供試魚	
・口白症病原体液	
・口白症トラフグの臓器別感染力価の測定	
・口白症病原体液に対する感受性試験	
結果および考察 .....	127
・口白症病原体液の調整	
・口白症トラフグの臓器別感染力価の測定	
・トラフグ近縁3魚種、イシダイおよびメジナの口白症感受性	
・ブリおよびマダイの口白症感受性	
・魚体サイズの異なるブリの口白症感受性	
第3章 口白症関連タンパク質 (kuchijirosho associated proteins, KAPs) の検出	
目的 .....	131
材料および方法 .....	131
・供試魚および供試魚血清	
・抗トラフグ IgM および抗ブリ IgM 家兎血清の作製	
・ストレプトアビジン-ビオチン(SAB)を用いた酵素抗体法	
・SDS-PAGE およびウエスタンブロット (WB)	
・口白症発症トラフグ脳磨砕液の超遠心分離上清分画・沈殿分画を用いた攻撃実験	
結 果 .....	133

- ・抗トラフグ IgM および抗ブリ IgM 家兎血清の作製
- ・ストレプトアビジン・ビオチンを用いた酵素抗体法による免疫組織染色の結果
- ・口白症感染耐過および健常トラフグ血清を用いた口白症関連タンパク質の検出
- ・口白症発症トラフグの脳、腎臓および脾臓からの KAPs 検出
- ・口白症発症トラフグの脳磨砕液の超遠心分離上清および沈殿分画からの KAPs 検出
- ・KAPs の病原性試験
- ・ブリおよびマダイの脳組織からの口白症関連タンパク質 (KAPs) の検出

考 察 ..... 136

第 4 章 口白症の診断とワクチン開発の試み

目 的 ..... 138

材料および方法 ..... 138

- ・供試魚
- ・口白症病原体液および実験魚
- ・病原体液のホルマリン処理および病原体攻撃試験

結 果 ..... 139

- ・口白症発症 (M), 感染耐過 (S), 健常 (H) および履歴不明 (U) トラフグの脳組織からの KAPs 検出
- ・口白症病原体のホルマリン感受性
- ・口白症病原体ホルマリン処理液攻撃生残存魚に対する再攻撃

考 察 ..... 140

総合考察 ..... 142

謝 辞 ..... 146

引用文献 ..... 146

## 主論文

# トラフグの口白症病原体関連タンパク質を標的にした本症の血清学的診断法に関する研究

平成19年3月

北海道大学大学院水産科学研究科 海洋生物防疫学研究室

高見 生雄

トラフグ *Takifugu rubripes* は、室蘭、函館から鹿児島までの太平洋と日本海、渤海、黄海、東シナ海に分布し、フグ料理の中でも最も高級な食材として珍重されるわが国の水産上重要な魚種の一つである。わが国におけるトラフグ漁業は主として延縄によるもので、近年のふぐ類の漁獲量は2000年の10,989 tをピークに減少傾向を示し、トラフグの価格は1 kg当たり2,000円以上の高価格で推移している(図1)。一方、トラフグの魚価が高いことや養殖技術が進歩したことから、近年、トラフグ養殖も盛んになり、その生産量・生産額も2003年には4,461 t・120億円に達している(図2)。わが国におけるトラフグ養殖は、1933年に山口県水産試験場がおこなった短期蓄養試験にはじまる。その方法は、8月～10月に漁獲された1～2 kgのトラフグを購入し、池中で1日に1～2回給餌しながら飼育し、価格の上昇する11月以降に随時出荷したものであった。1950年代になると、4～5月の産卵後のトラフグを用いて越夏養殖が行われるようになった(古川・岡本, 1966)。しかし、産卵後の魚を用いた養殖は、その数に限りがあり、生産量は減少した(藤田, 1988)。トラフグの種苗生産技術に関する研究は、1954年のトラフグの人工授精の試みに始まり(藤田・上野, 1956)、1959年には仔・稚魚の飼育実験が行われた(藤田, 1962)。山口県内海水産試験場では1960年から仔・稚魚の飼育試験に着手し、1964年には事業規模での種苗生産を開始している。その後、1973～

1974年には、主として放流用種苗生産を目的として、各地の水産試験場や栽培漁業センターによる種苗生産が始まり、1980年代には民間施設での生産も盛んになり、養殖トラフグの生産量は飛躍的に増加した。しかし、1983年から1984年にかけて生産量が一時的に減少した。この原因について、立石(1986)は1981年頃より発生が知られるようになった“口白症”の流行の影響によるものと推測している。この“口白症”は、1982年に長崎県内の養殖場で高水温時に発生した不明病として報告され(畑井ら, 1983)、その後、西日本全域のトラフグ養殖場に蔓延した。

本症による被害について水産庁が実施した魚病被害・水産用医薬品使用状況調査結果によれば、2003年にトラフグ(フグ類)に病気が発生した経営体数、病気による被害量及び被害金額(いずれも推計)は、それぞれ223経営体、471 t・17億円であり、このうち本症によるものは、それぞれ48経営体(21.5%)、36.8 t(7.8%)、1.4億円(8.1%)であった(図3)。口白症は0～1歳の小型魚を中心に被害をあたえるために(宮台, 2001)、被害の発生経営体数に比べて被害の割合が小さくなっている。しかし、本症がいったん発生するとその生贖の魚群が全滅することもあり(高見・井上, 1991)、本症がトラフグ養殖に与える被害は数字以上に大きく、本症は養殖トラフグの疾病の中でも重要な疾病である。本症は発症魚の口吻部に潰瘍患部が形成され、やがて死に至る。その過程で病魚が他の個体に噛み付く攻撃的な行動

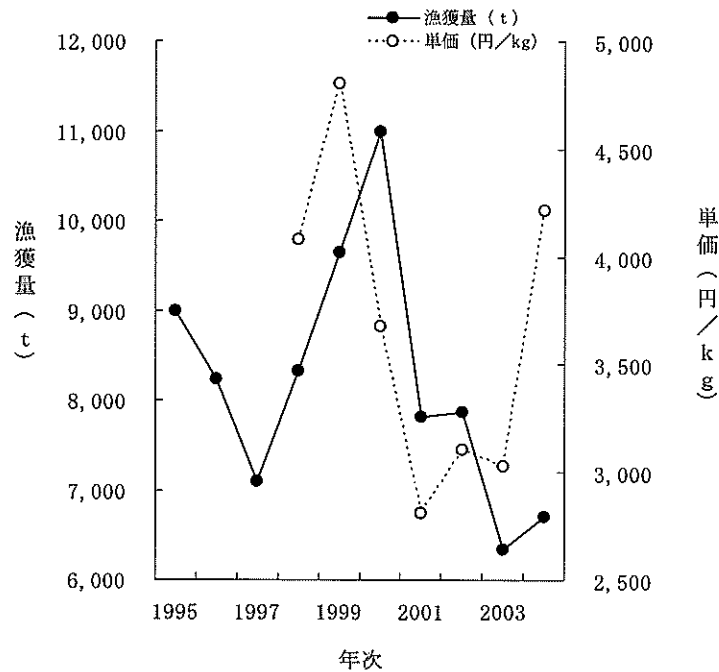


図1. フグ類の漁獲量とトラフグの単価の推移.  
 漁獲量は漁業・養殖業生産統計年報より作図.  
 単価は水産物流通統計年報より作図.

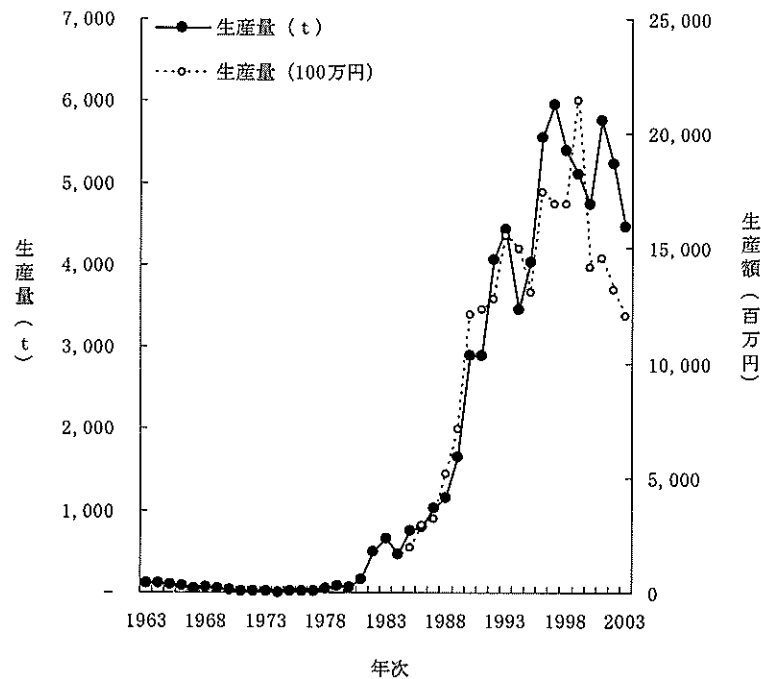
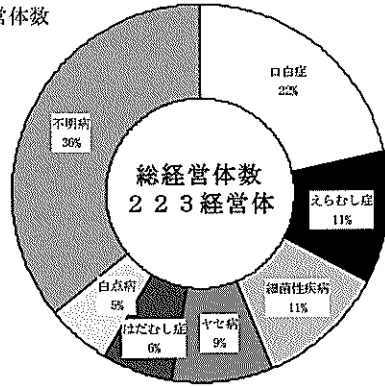


図2. 養殖トラフグの生産量と生産額の推移.  
 漁業・養殖業生産統計年報より作図.

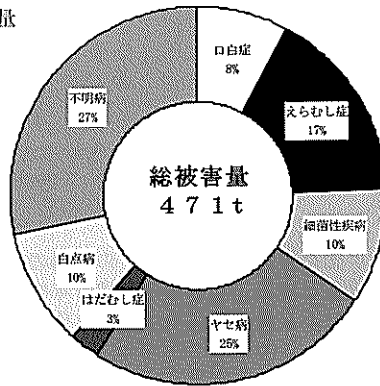
を示すようになる疾病である。本症の名称“口白症”は病魚の外観的特徴，すなわち口吻部の潰瘍患部が，水中で白く見えることにちなんで漁業者が用いた呼称に由来している。このほかに，夏場の高水温時に発生することから“夏期の不明病”，あるいは口が腐れることから“口ぐされ病”などと呼称されたこ

ともあった。本疾病の発生がはじめて報告された当時は水産用医薬品の使用に関して，トラフグに対しては罰則が適用されなかったため，各地の養殖場で各種の抗菌剤の経口投与，薬浴，餌料への栄養剤や強肝剤の添加，飼育密度の低下をはじめとする飼育環境の改善などの対策が講じられたが（畑井

魚病が発生した経営体数



魚病による被害量



魚病による被害額

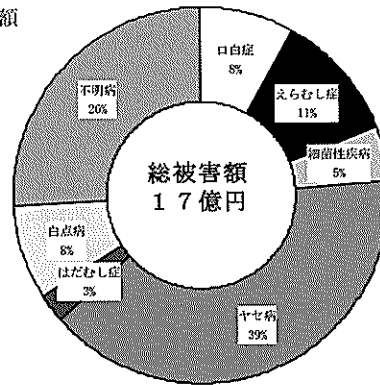


図3. 養殖トラフグの魚病別発生経営体数・被害量・被害額 (2004年).  
魚病被害・水産用医薬品使用状況調査結果より作図.

ら, 1983), 何れも効果は認められなかった。また, 本症は水温15℃では発症しないが, 20℃以上, 特に25℃での発症経過が早く, さらに死亡率も高い (井上ら, 1986)。トラフグのみならずクサフグ *T. niphobles*, コモンフグ *T. poecilonotus*, ヒガンフグ *T. pardalis*, さらにマダイ *Pagrus major* やクロソイ *Sebastes schlegeli* でも発症することが人為感染試験により確認されている (Miyadai *et al.*, 2001)。

本症の原因について, 中内ら (1985) や和田ら (1985) は罹病魚に関する病理組織学的研究を行い, 脳の試料中にウイルス感染症を推測させる病理変化

が観察されることを報告している。また, 罹病魚脳磨砕濾液を健常魚に接種することにより本病が再現されることから, 本病が濾過性病原体による感染症であることが明らかになっている (畑井ら, 1983; 井上ら, 1986)。さらに, Inouye *et al.* (1992) は, トラフグ生殖腺由来初代培養細胞 (PFG) を用い, 病魚脳および腎臓磨砕液から病原体の分離培養に成功し, 本病原体が大きさ50nm以下で, 有機溶剤および酸に感受性を有し, 37℃では安定であるが50℃で失活することを報告している。また, Miyadai *et al.* (2004) は, 本病原体の浮遊密度が1.096 g/cm<sup>3</sup>で,

紫外線、タンパク質分解酵素およびプロピオラクトンに感受性であることを報告している。

以上のことから、本症の病原体はウイルスとの考えが主流であるが、未だ病原体の分類学的位置付けはなされていないため、その診断法および防除対策も確立されていない。しかしながら、トラフグ養殖現場では本症の診断・防除のために何らかの対策が強く求められている。これまでは、被害を最小限に抑えた業者の事例を整理し、その防除手法に可能な限りの理論付けをおこなった上で、他の業者に紹介する方法がとられてきた（高見・井上，1991）。その防除手法は、本症の罹病魚、特に体色の黒化や“噛み合い”などの初期症状を呈する個体を、早期に見出し除去する方法である。さらに、本症の診断方法は社団法人日本水産資源保護協会（1993）の「トラフグの魚病」で初めて紹介されているが、その方法は、「簡易診断の基準として、病魚の行動と口吻部における潰瘍患部の形成、肝臓における線状の出血斑など」とし、「確定診断は、病魚組織の磨砕ろ液を正常魚に接種して発症の有無で判断するか、あるいは電子顕微鏡によって病魚組織中のウイルス粒子を確認する方法にたよる以外にない」としている。これ以降、防除手法および診断法についての進展はみられていない。

そこで本研究では、口白症の診断法および防除対策の開発を目的に、第1章では、長崎県下の口白症の発生状況を調査することにより口白症病原体の感染経路を推察し、第2章において、トラフグ近縁魚種ならびに長崎県下の養殖対象魚種計7魚種の口白症に対する感受性について検討した。さらに第3章では、口白症感染耐過トラフグ血清を用い、口白症病原体ならびに関連タンパク質（kuchijirosho associated proteins, KAPs）の特定を試み、第4章では、このKAPsを指標とした口白症の診断あるいは感染履歴把握の可能性について検討した。本論文では飼育現場で広く応用可能な、口白症感染耐過魚が保有するKAPsに対する抗体を用いたウエスタンブロット法による口白症の血清学的診断法について報告する。

## 第1章 長崎県における口白症の発生状況

### 目 的

口白症は、長崎県において1982年に初めて発生が認められたが（畑井ら，1983）、未だ確実な診断法が確立されていない。現状では、本症罹病魚が示す“噛み合い”という特異的な行動及び体色の黒化、口唇部に形成される潰瘍患部などの典型的な外観症状によって本症の発生を推定するとともに、本症の確認には瀕死魚の脳の組織標本によって、脳神経細胞の変性・壊死（中内ら，1985；和田ら，1985）を確認すると同時に脳の磨砕濾液を健康なトラフグの皮下に接種して本症の再現を調べる以外に方法がない。養殖現場では、養殖業者が上記の典型的な外観症状に基づいて本症の診断を行い、病魚の早期取り上げを実施している（高見・井上，1991）。このように、明確な診断基準が示されないまま、既に20年以上が経過したが、近年になり、宮台（2001）は本症の最も顕著な外観的な特徴である“口吻部の白化ないし潰瘍”（中内ら，1985）をほとんど呈さない“口白症”罹病個体がみられるようになってきていると報告しており、養殖業者が診断の基準としている典型的な外観症状に変化が生じている可能性がある。

そこで、漁業者が自ら診断するための基準としている外観的な症状を再確認し、次いで、その症状に基づいた本症の発生情報を整理すると同時に、本症病原体の感染経路の検討を行った。

### 材料および方法

#### トラフグ養殖の実態調査および口白症の発生状況調査

長崎県におけるトラフグ養殖の実態を把握するために、県下全域のトラフグ養殖業者に対して、2003年5月に面談によるトラフグ養殖の実態について聞

表1. 既往知見に基づいた外観的な症状

症状/提唱者	畑井ら (1983)	中内ら (1985)	井上 (1988)	宮台 (2001)
摂餌性の低下	△		○	
体色の黒色化		○	○	
狂奔	△		○	○
噛み合い	△	○	○	○
口吻部の糜爛・潰瘍(口ぐされ)	△	○	○	△
口吻部の(発赤, 黒色化)		○	○	
腹部の膨張		○	○	◎
肝臓の線状鬱血痕	◎	○	△	

(◎): 本症を特徴付けると判断される症状. (○): よく見られる症状.  
(△): とくとき見られる症状.

き取り調査を実施した。調査項目は、種苗の入手先・入手時期、種苗の大きさ、月毎の魚体の大きさ、餌の種類、口白症発症の有無、出荷までにトラフグの歯を切った回数である。また、トラフグ養殖における口白症発症の実態把握とトラフグ養殖業者が口白症と判断する基準を把握するために、2004年9～10月に長崎県下のトラフグ養殖場において面談による聞き取り調査を実施した。調査項目を、口白症の診断者、診断の基準とする症状、口白症がはじめて発生した年、発生する月、発症する魚齢、発生した場合の被害率とした。なお、この時、養殖業者が口白症と診断したトラフグ132個体を水産試験場に持ち帰り、既往知見に基づき外観的な症状(表1)を確認した。

**トラフグ養殖業者が口白症と診断した病魚を用いた再現実験**

トラフグ養殖業者が自ら口白症と診断したトラフグが口白症に罹患しているか否かの確認と、発症時の症状を再確認するために、口白症の再現実験を行った。口白症発症魚として2005年6月3日に長崎県北松浦郡鹿町町のトラフグ養殖場で、養殖業者が口白症と診断したトラフグ活魚5尾(平均体重204.2g)とトラフグ鮮魚2尾(平均体重184.8g)を用いた。これらのトラフグを氷蔵して水産試験場に持ち帰り、外観的な症状を確認した上で、最も大きい個体(287.2g)の脳を取り出し、9倍量の Hanks' balanced salt solution (HBSS) と共に氷冷下におい

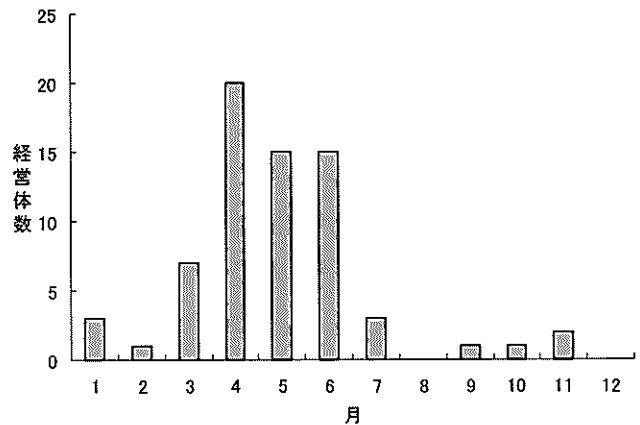


図4. 月別種苗導入経営体数.

てガラスホモジナイザーで磨砕し、3000rpm・30分の遠心分離の後、上清を0.45μmのメンブランフィルター (Millipore, MILLEX-HA) を用いてろ過除菌し、接種用原液とした。2004年に県内のトラフグ種苗生産業者によって生産され、稚魚期に水産試験場の陸上水槽に導入し、砂ろ過海水のかけ流しで予備飼育していた健全なトラフグ5尾(平均体重207.4g)の背鰭基部の皮下へ、接種用原液を0.2ml/尾接種し、1tパンライト水槽で25℃以上に加温して飼育した。なお、対照区としてトラフグ5尾にHBSSを0.2ml/尾接種した。

**長崎県における養殖トラフグの魚病発生状況調査**

近年の長崎県のトラフグ養殖における魚病の発生状況を把握するために、長崎県総合水産試験場(以後、水産試験場とする)が実施した2001年～2005年の魚病診断の記録を整理した。また、トラフグ養殖業者が認識している養殖トラフグにおける口白症の発症状況を確認するために、1994年～2004年までの



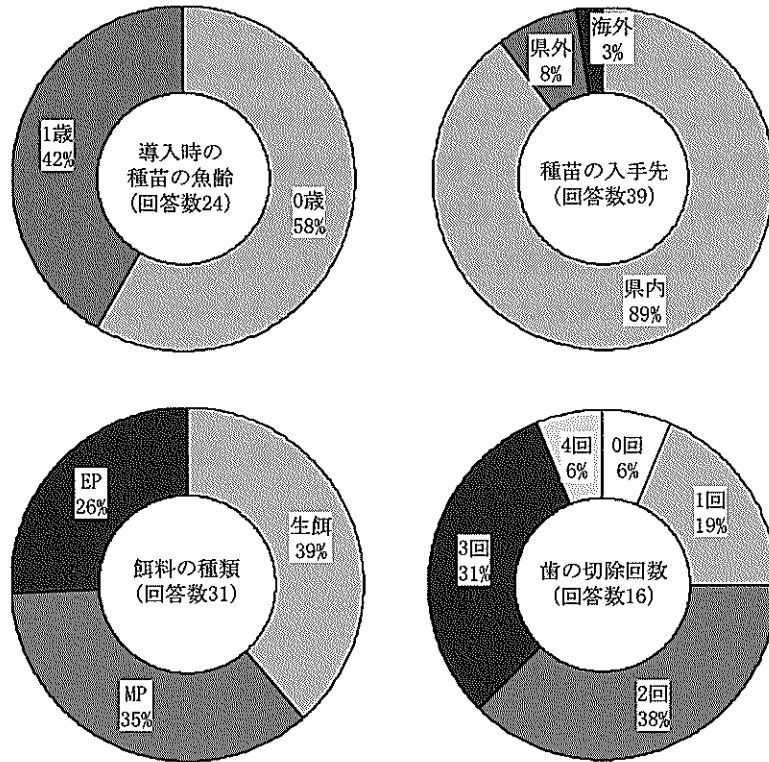


図5. 導入時の種苗の魚齢，入手先，餌料の種類，歯の切除回数。  
MP：モイストペレット，EP：エクストルーダーで処理したドライペレット。

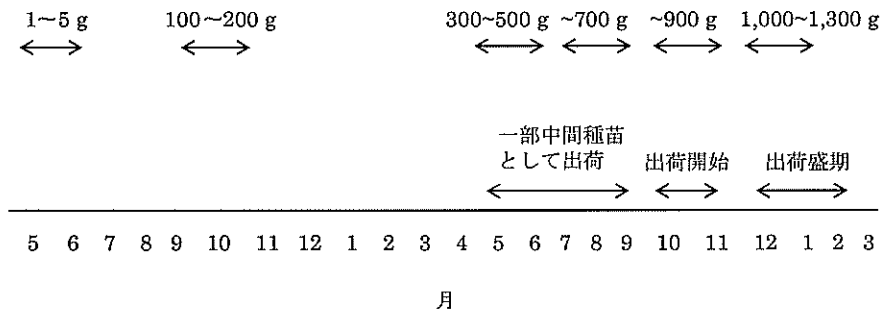


図6. トラフグの養殖時期と成長の関係。

魚病被害・水産用医薬品状況調査結果（日本水産資源保護協会）について整理した。

### 結果および考察

#### トラフグ養殖の実態調査および口白症の発生状況調査結果

トラフグ養殖の実態調査は、長崎県下のトラフグ養殖業者55業者に対して行った。はじめに月別の種苗導入時期（図4）をみると、8月と12月以外の全ての月で種苗が導入されており、4月から6月の3ヶ月間が盛期となっていた。導入される種苗の魚齢

は0歳魚が58%、1歳魚が42%であった（図5）。種苗の導入先は89%が県内の種苗生産業者から、8%が県外から、3%が海外からとなっていた（図5）。0歳魚を導入してから出荷までは20ヶ月程度を要するが、飼育を開始して10ヶ月程度経過した時点で中間種苗として出荷するケースもみられた（図5）。餌料の種類は、生餌が39%、モイストペレット（MP）が35%、エクストルーダーで処理したドライペレット（EP）が26%であったが（図5）、生餌やMPと答えた業者でも、稚魚期にはEPを与え、概ね100~200g以上になる10月頃からMP又は生餌を与える業者が3割程度あった（図6）。ちなみに、

養殖用トラフグの種苗のほぼ100%が陸上の水槽で生産された人工種苗であり、種苗生産時には、規格が定められているEPが餌料として使用されていた。このため、トラフグ養殖業者も稚魚期に、あえて餌料の種類を変えることはせず、そのままEPを使用しているものと考えられた。なお、この調査を実施している時点で口白症が発生していた業者は4経営

体あったが、これらの業者が使用していた餌料の種類は、EPのみを使用している業者が1経営体、MPのみを使用している業者が1経営体、残りの2経営体は稚魚期にはEPを与え10月頃からMPを与えていた。MPに用いられていた魚種は、ほぼ共通してアジ、イカナゴ、イサザアミであった。日高ら(2001)は、ヒラメのウイルス性出血性敗血症(VHS)が、養殖ヒラメ用の生餌として用いられるイカナゴから経口感染することを確認している。事例は少ないものの生餌、MP、EPのいずれを餌料として与えても

表2. 診断の基準とした症状

症状	回答者数
口白	22
体色黒化	20
腫れる	15
体側白化	8
嘴み合い	6
口赤	5
肝臓線状鬱血痕	3
口黒	3
体色黄化	2
大量死	1

表3. 診断の基準とした症状の数

症状の数	回答者数
1	9
2	7
3	10
4	4
5	3
合計	33

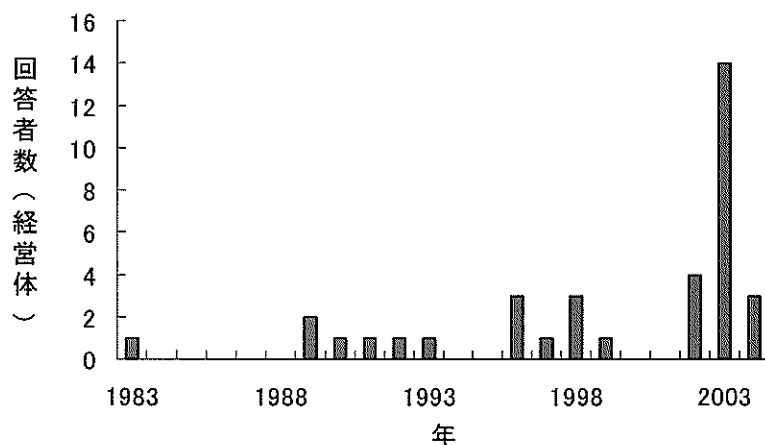


図7. 養殖業者が口白症が初めて発生したとした時期.

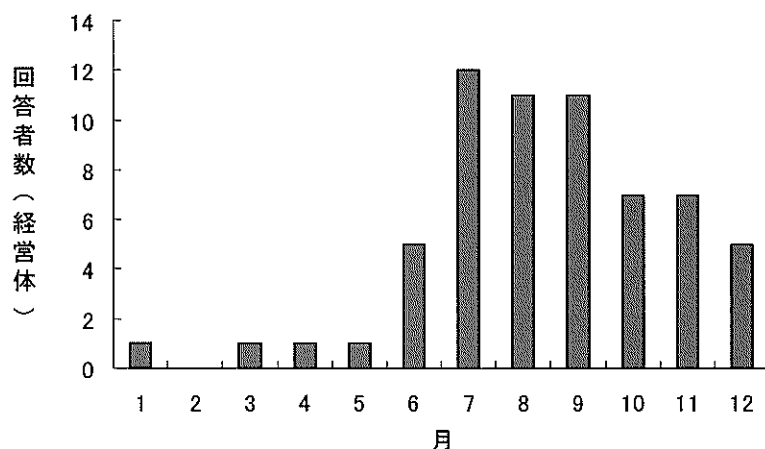
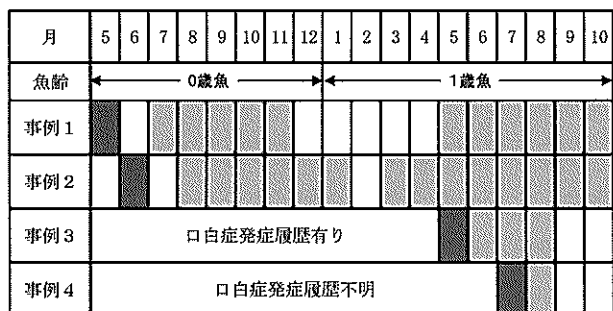


図8. 口白症が発生すると回答した月.

本症は発生しており、餌料の種類と本症の発生に因果関係がある可能性は低い。

トラフグ養殖業者が出荷までにトラフグの歯を切除する回数は2回(38%)と3回(31%)が多かった(図5)。本症が発生していた養殖トラフグを所有する養殖業者が歯を切除する回数は1回と3回が1業者ずつ、2回が2業者であった。外菌(1994)



■ : 種苗導入時期    ■ : 口白症発症期間  
図9. 口白症の発症時期.

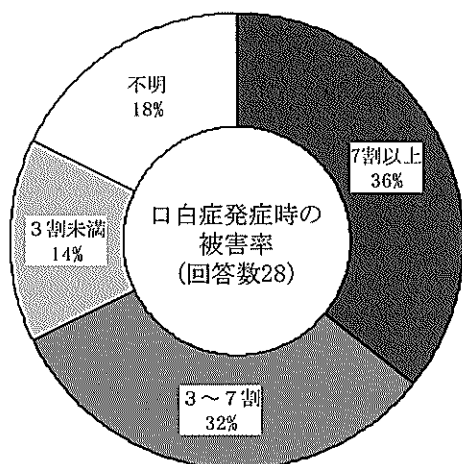
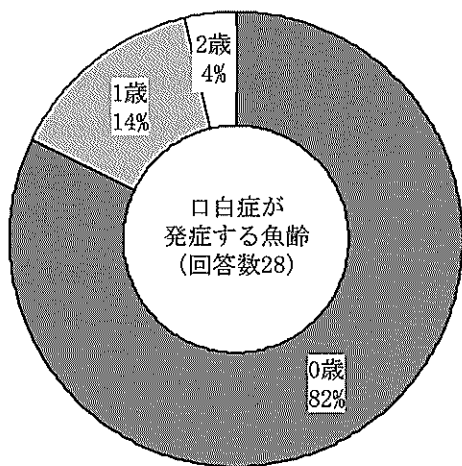


図10. 口白症が発症する魚齢と発症時の被害率.

は本症の予防法として歯の切除が効果的であるとしている。しかし、今回の調査結果からは、歯を切除することで本症の流行が抑えられているとは考え難い。確かに、噛み合うことにより本症の病原体が直接体内に運ばれて、本症の流行を助長すると考えれば、歯を切除することにより本症の流行は抑制されると考えられるが、今田(1985)は、一旦切除した歯は3ヶ月半で元通りに伸長するが、尾鰭の損傷軽減のためだけに再び歯を切除する必要は無いとしている。即ち、歯の切除を1回おこなうと噛み合いが軽減されると考えられる。そうであるならば、本調査結果は、本症が噛み合いにより感染するだけではなく、井上ら(1987)が言うように海水を介して水平伝播することを裏付けるものと考えられた。

口白症の実態調査では、面談数63に対して有効な回答が得られた数は40(63.5%)であった。そして、この40業者全員が口白症の診断を自分であると回答した。養殖業者が口白症と診断する場合に基準とする症状については表2に示すように、体色の黒化、口白(口吻部の発赤、黒色化、潰瘍化)、噛み合い、腹を膨らませて元に戻らない、体側が光って見えるとなっており、トラフグ養殖業者は、ほぼ既往知見に基づいた外観的な症状(表1)を基準として、本症を診断していることがわかった。また、「口白症」と診断する場合に、表2に示す症状のうちいくつかの症状が観察された場合に口白症と判断するかについて表3にまとめた。この結果は養殖業者が複数の外

表4. 自然発病魚の症状の発現状況

外観症状	尾数 (N=132)
体色黒色化	9
口唇発赤	28
口唇黒色化	57
口唇潰瘍	89
いずれかの口唇症状	122
噛み痕(噛み合いの痕)	19
腹部の膨張	18
肝臓の線状鬱血痕	61
平均体重(g)	165.5
最大体重(g)	663.5
最小体重(g)	46.1

観症状により口白症を診断していることを示しており、その中では3つの症状を元に診断するものが最も多く、次いで1つ、2つ、4つ、5つの順であった。

本症が初めて発生した年は1983年と回答したのは1経営体で、2003年と回答した経営体が最も多く(図7)、次いで2002年、2004年の順であった。本症が発生する月は2月を除いた全ての月であり、7月～9月の発生が盛期であった(図8)。塩満(1984)は、本症が3月を除くほぼ周年発生し、高水温期(6月～10月頃)に発生件数が増えるとしている。中内ら(1985)は、7月上旬(水温24～25℃)に発生し、高水温期(28℃前後)に一時治まり、10月頃(25～26℃)から各地に広がったと報告している。一方、井上ら(1985)は、水温が20℃より高くなる7月から12月にかけて、本症の発生が長崎県内各地で繰り返し観察され、30℃に比べて20℃での死亡率は低く、15℃では死亡が起きないと報告している。これらのことから、本症の発生時期は、本症がはじめて発生した当時と同様であることが確認された。本症の発症時期に関して、4つの事例について図9にまとめた。事例1では、5月導入の0歳魚に7月になって本症が発症し12月～4月に一旦治まり、翌年の5月ころから本症が再発し、最終的には90%以上が本症が原因で死亡した。事例2では6月に導入し

た0歳魚に8月になって本症が発生し殆んど終息することはなかったものの、累積の死亡率は1割程度であった。事例3では、0歳魚で口白症の発症履歴があることを知りながら1歳魚として5月に導入した。導入直後から本症が発生し、8月には全数とりあげとなった。事例4では、口白症の発症履歴が不明な1歳魚を7月に導入したが導入直後から本症を発症したためすぐに出荷した。これらの事例は、いずれも、本症が翌年再発した事例であり、本症に対してトラフグは免疫を獲得しないことを示唆するものと考えられた。

今回の調査結果から口白症による被害は0歳魚と回答したものが全体の8割以上を占め、次いで1歳魚、2歳魚の順であった。さらに、本症による被害の多くが50%～100%にあり、一旦発病すると被害が大きいたことが再確認された(図10)。

トラフグ養殖業者が口白症と診断したトラフグ132尾について、症状ごとの出現数をまとめた(表4)。これによると宮台(2001)の報告にあるように、必ずしも口唇部の潰瘍が発現しているとは限らなかった。しかし、発赤や黒色化をあわせた口唇部の症状としては92.4%にあたる122尾に発現していた。噛み合いの痕である噛み痕については、わずかに19尾に見られたが、これは、歯を切除することが多くなったために単に噛んだ痕が残らなくなった

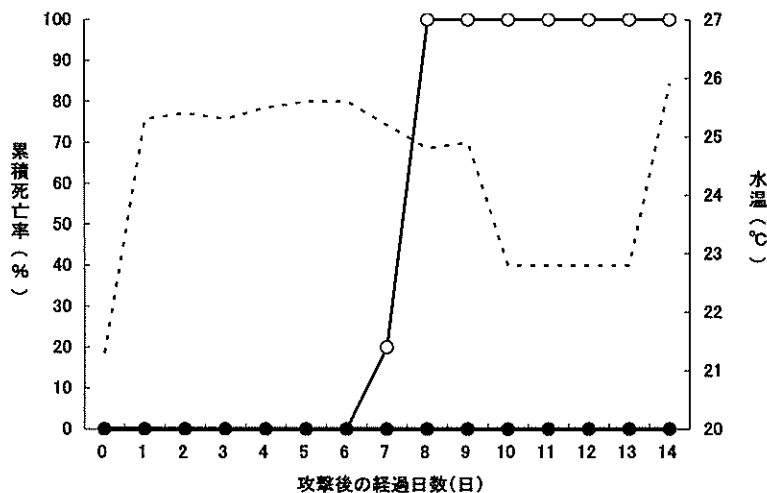


図11. トラフグ養殖業者から口白症と診断された発症魚の脳磨砕液を皮下接種した時のトラフグの累積死亡率の変化。  
 (●)：発症魚の脳磨砕液接種群。(○)：HBSS を接種した対照群。  
 ----：試験期間中の水温。



図12. 噛みあいをする口白症発症個体。  
まだ、体色の黒色化は顕著ではない。

めと考えられた。また、腹部の膨張は18尾にみられたが、これは、今回は検査魚が死亡した後に観察したために、多くの個体では、観察するまで症状が残っていなかったためと考えられた。肝臓の線状出血痕は半分に満たない61個体に認められた。肝臓の線状鬱血痕は、肝臓の表層部に限局的であり（中内ら, 1985）、ちょうど線状鬱血痕を生じる部分に後擬鎖骨が当たることから、「本症状は本症病原体の感染による直接的な症状ではなく、罹病魚の行動に伴う二次的の症状であり、かならずしも本症の特徴とは言えない（井上氏私信）。」ことを裏付ける結果である。これらのことから、養殖業者が本症の診断に用いている外観的な症状については、これまで報告された症状に変化あるいは新たな症状の発現が見られるようになったということではなく、本症が発生した初期の段階で外観的な症状が発現する前に罹病が疑われる個体を養殖業者が処分するようになったため、従来から報告されている症状の確認が困難となったと考えられた。

#### トラフグ養殖業者が口白症と診断した病魚を用いた再現実験結果

トラフグ養殖業者が本症と診断した自然発症魚の脳組織磨砕濾液を5尾のトラフグに接種したところ、8日間以内に接種魚全てが口白症を発症して死



図13-1. 口白症発症個体（水中）。  
水中の個体を見ると口唇部が全体に白い膜で覆われたように見えるが、良くみると上唇部が黒色化し、下唇部が発赤している。



図13-2. 口白症発症魚の死亡直後の個体。  
口吻部が黒色化し部分的にひび割れたようになっている。

亡した（図11）。脳磨砕濾液を接種されたトラフグは、接種後5日目に精力的に泳ぐようになり、他の個体を追尾するような行動を見せ始めた。6日目には、時として他の個体とかみ合うものの（図12）、静かに水槽の底にじっとしている時間が次第に多くなり、体色が黒色化していた。7日目には1尾が死亡し、8日目には残りの4尾が死亡した。死亡した5尾は全て体色黒化、口ぐされの症状を呈し（図13-1, 2）、4尾が腹部を膨張させて死亡していた（表5）。また、対照区は2週間経過しても全く死

表5. 口白症再現試験における症状の確認

番号	体重 (g)	体色黒化	口ぐされ			噛み痕	腹部膨張	肝線状出血
			口黒	口赤	口白			
No.1	159.6	+	+	+	+	+	+	+
No.2	230.5	+	+	-	+	+	+	-
No.3	220.8	+	+	-	+	+	+	-
No.4	192.3	+	+	-	+	+	-	-
No.5	233.7	+	-	+	+	+	+	+



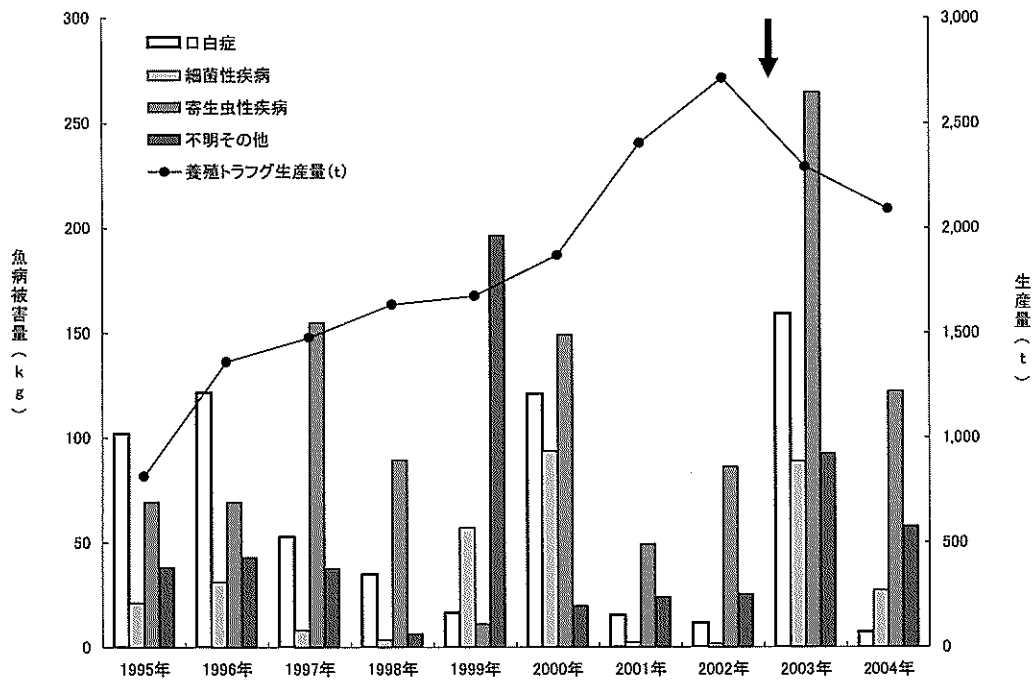


図15. 長崎県の養殖トラフグの生産量と魚病種類別推定被害量の推移。  
 魚病種類別推定被害量は魚病被害・水産用医薬品状況調査のアンケート回収率と農林水産統計年報のトラフグ生産量から推計したものである。また、矢印は長崎県のトラフグ養殖で外部寄生虫対策としてホルマリンの使用が問題となった年を示している。

大し、寄生虫がペクターとなり口白症の病原体を伝播させた可能性、あるいは寄生虫が体表を傷つけることで、病原体の侵入門戸を開いた可能性についても留意すべきであると考えられた。

本症の感染経路については、これまで本症の発生が隣り合った生簀でも発症しない場合があることや病原体汚染水による感染が成立しにくいことが知られており、病原体の主要な感染経路は噛み合い等による直接的な接触感染によると推測されてきた。今回の結果からは餌料生物からの感染を否定し得ること、感染耐過魚群に本症が再発することなどから、本症病原体のキャリアがトラフグ養殖場に存在し、水温上昇とともに発病して感染源となり、漁場全体に流行するものと推察される。

### 養殖フグ寄生虫駆除ホルマリン

## 長崎の業者、6割使用

県調査

全国1の養殖フグ生産県である長崎県では、寄生性原虫によるフグの寄生性原虫感染症（フグ病）が、近年増加傾向にある。このため、県では、フグ病の予防・駆除対策として、ホルマリンによるフグの消毒を推奨している。県が実施した調査によると、県内の養殖フグ業者のうち、ホルマリンを使用した業者は、全体の6割に達した。これは、全国的に見ても、最も高い割合である。ホルマリンは、フグ病の原因となる寄生性原虫を駆除する効果がある。また、フグの成長を促進する効果もある。ホルマリンを使用する際には、適切な濃度と使用方法を守ることが重要である。県では、ホルマリンの使用に関する講習会を開催し、業者への指導を行っている。また、ホルマリンの使用に関する資料も提供している。業者は、これらの資料を参考に、フグ病の予防・駆除対策を講じてほしい。県では、フグ病の予防・駆除対策を推進し、養殖フグの生産を安定させることを目指している。業者は、県と連携し、フグ病の予防・駆除対策に取り組んでほしい。

## フグ養殖に劇物使用

### 長崎の95業者 寄生虫駆除ホルマリン 県出荷中止を要請

長崎県水産試験場が、県内の養殖フグ業者95名を対象に、寄生性原虫感染症（フグ病）の予防・駆除対策として、ホルマリンの使用を推奨している。ホルマリンは、フグ病の原因となる寄生性原虫を駆除する効果がある。また、フグの成長を促進する効果もある。ホルマリンを使用する際には、適切な濃度と使用方法を守ることが重要である。県では、ホルマリンの使用に関する講習会を開催し、業者への指導を行っている。また、ホルマリンの使用に関する資料も提供している。業者は、これらの資料を参考に、フグ病の予防・駆除対策を講じてほしい。県では、フグ病の予防・駆除対策を推進し、養殖フグの生産を安定させることを目指している。業者は、県と連携し、フグ病の予防・駆除対策に取り組んでほしい。

長崎県水産試験場が、県内の養殖フグ業者95名を対象に、寄生性原虫感染症（フグ病）の予防・駆除対策として、ホルマリンの使用を推奨している。ホルマリンは、フグ病の原因となる寄生性原虫を駆除する効果がある。また、フグの成長を促進する効果もある。ホルマリンを使用する際には、適切な濃度と使用方法を守ることが重要である。県では、ホルマリンの使用に関する講習会を開催し、業者への指導を行っている。また、ホルマリンの使用に関する資料も提供している。業者は、これらの資料を参考に、フグ病の予防・駆除対策を講じてほしい。県では、フグ病の予防・駆除対策を推進し、養殖フグの生産を安定させることを目指している。業者は、県と連携し、フグ病の予防・駆除対策に取り組んでほしい。

## ブランド化へ痛手

### 病死魚投棄に続く不祥事

長崎県水産試験場が、県内の養殖フグ業者95名を対象に、寄生性原虫感染症（フグ病）の予防・駆除対策として、ホルマリンの使用を推奨している。ホルマリンは、フグ病の原因となる寄生性原虫を駆除する効果がある。また、フグの成長を促進する効果もある。ホルマリンを使用する際には、適切な濃度と使用方法を守ることが重要である。県では、ホルマリンの使用に関する講習会を開催し、業者への指導を行っている。また、ホルマリンの使用に関する資料も提供している。業者は、これらの資料を参考に、フグ病の予防・駆除対策を講じてほしい。県では、フグ病の予防・駆除対策を推進し、養殖フグの生産を安定させることを目指している。業者は、県と連携し、フグ病の予防・駆除対策に取り組んでほしい。

図16. ホルマリン使用を報じた新聞記事.



## 第2章 各種魚種の口白症病原体に対する感受性

### 目 的

口白症は濾過性病原体による感染症であるとされているが<sup>8</sup> (井上ら, 1986; Inouye *et al.*, 1992; Miyadai *et al.*, 2001; 高見ら, 2007a, b, c), 本症病原体に関する詳細は未だ明らかでなく, 本病の診断法および防除対策も確立されていない。本章では, まず口白症病原体の臓器別分布について検討すると共に, 口白症病原体標準液を作出した。また, 長崎県下のトラフグ養殖場では, 生簀の周囲でクサフグ (*Takifugu niphobles*), とヒガンフグ (*T. pardalis*), ハコフグ (*Ostracion immaculatus*) 等の遊泳が見られる。また, トラフグの養殖場がブリ (*Seriola quinqueradiata*), マダイ (*Pagrus major*), イシダイ (*Oplegnathus fasciatus*) 等の養殖場と隣接していることから, これらの魚種の口白症に対する感受性を把握することは, 口白症の防疫対策上重要であると考え, トラフグ近縁魚種に長崎県下の養殖対象魚種を加えた, 計7魚種の口白症に対する感受性について検討した。

### 材料および方法

#### 供試魚

供試魚として, 水産試験場産トラフグ (平均体重15 g および92 g : 各20尾), ブリ (12 g : 200尾, 218 g : 20尾, 530 g : 20尾) およびマダイ (18 g : 15尾) を, また長崎県西彼杵郡の地先で捕獲したクサフグ (112 g : 5尾), ヒガンフグ (210 g : 2尾) ハコフグ (31 g : 2尾), イシダイ (23 g : 5尾) およびメジナ (*Girella punctata*, 31 g : 5尾) を各々実験に供した。

供試魚は, 水産試験場の隔離実験施設で, 40L あるいは100L容のパンライト水槽に収容し, 無給餌, 25℃, 流水 (流水率: 20-50回転/日) で2週間

飼育し, 発症・死亡の推移を観察した。

#### 口白症病原体液

第1章のトラフグ養殖業者が本症と診断した発症魚の脳磨砕濾液を用いた再現実験で死亡したトラフグ5尾 (平均体重207.4 g) の脳組織を摘出し, 第1章と同様の手順で病原体液を作製し (病原体保存液), 実験に使用するまで小分けして-80℃で保存した。

また, 病原体液の半数致死量 (LD<sub>50</sub>) は Behrens-Kärber 法により求めた。

#### 口白症トラフグの臓器別感染力価の測定

2005年8月30日に, 長崎県下の養殖場で自然発症した養殖トラフグ (体重379 g) の脳, 腎臓および脾臓組織を摘出し, 前述と同様の方法で磨砕濾液を調整した。HBSS で各臓器磨砕濾液の10<sup>-2</sup>から10<sup>-6</sup>まで10倍希釈列を作製し, 各々を感染実験用トラフグ (平均体重25 g) 10尾に0.1mL/fish ずつ背鰭基部付近に皮下接種し, 飼育2週間後の累積死亡率から臓器別の病原体量を半数致死量 (LD<sub>50</sub>) として求めた。なお, 対照区の魚には HBSS を同量接種した。

#### 口白症病原体液に対する感受性試験

口白症病原体液を HBSS で10倍に希釈し, トラフグ, クサフグおよびヒガンフグの背鰭部付近の皮下に0.5mL/fish ずつ, ハコフグの尾柄部皮下に0.5mL/fish ずつ, イシダイ, メジナ, ブリおよびマダイの体側皮下に0.1mL/fish ずつ接種し, 発症および死亡の推移を12~22日間観察した。なお, ブリおよびマダイの飼育水温は24~27℃, その他の魚種では28~30℃とし, 餌としてモイストベレットを与えた。

### 結果および考察

#### 口白症病原体液の調整

自然発症魚の脳組織磨砕濾液を5尾のトラフグに接種したところ, 8日間以内に接種魚全てが口白症を発症して死亡した。これら発症死亡魚の脳組織か

ら磨碎濾液を再調整した病原体保存液の病原性は  $10^{4.7}LD_{50}/mL$  であった。(表6)。

#### 口白症トラフグの臓器別感染力価の測定

口白症発症魚の脳、腎臓および脾臓組織の磨碎濾液の希釈列を調整し、トラフグを用いた感染試験により各臓器内の病原体量について比較検討した結果を(表7)に示した。脳、腎臓および脾臓組織の病原体量は、各々  $10^{5.4}$ 、 $10^{5.2}$  および  $10^{5.1}LD_{50}/g$  となり、脳組織の病原体量は腎臓あるいは脾臓組織より多く存在することが明らかになった。トラフグの頭骨は厚く、脳組織の摘出に苦勞するが、口白症病原体の直接検出法が確立された場合には、摘出の容易な腎臓あるいは脾臓も検査対象組織として利用可能であると考えられた。

#### トラフグ近縁3魚種、イシダイおよびメジナの口白症感受性

トラフグ脳磨碎濾液をトラフグ(15g)、クサフグ、ヒガンフグ、ハコフグ、イシダイ、およびメジナに接種した時の17日目までの累積死亡率を表8に示した。トラフグでは接種9日目から死亡が始まり、12日目までに全ての個体が発症、死亡した。クサフグ、ヒガンフグおよびハコフグでは、接種後14、13および16日目から死亡が認められ始め、17日目までには全個体が発症、死亡した。これに対し、イシダイおよびメジナでは、実験期間中に発症および死亡せず、口白症非感染性であると判断した。Miyadai *et al.*(2001) はトラフグ以外にクサフグ、コモンフグおよびヒガンフグが口白症に感受性があることを報告している。本実験結果では、トラフグ以外は何れ

表6. 病原体保存液を皮下接種したときの各希釈倍率の死亡状況

希釈倍率	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
死亡尾数/全尾数 (累積死亡率)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)	7/10 (70%)	5/10 (50%)	3/10 (30%)

表7. 口白症を発症したトラフグに由来する臓器(脳、腎臓と脾臓)の磨碎濾液を皮下接種したときの臓器別の希釈倍率毎の死亡状況

組織名	/希釈倍率	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
脳	死亡尾数/全尾数 (死亡率)	10/10 (100%)	7/10 (70%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	0/10 (0%)
腎臓	死亡尾数/全尾数 (死亡率)	9/10 (90%)	3/10 (30%)	5/10 (50%)	0/10 (0%)	NT
脾臓	死亡尾数/全尾数 (死亡率)	8/10 (80%)	4/10 (40%)	4/10 (40%)	0/10 (0%)	NT

表8. トラフグ近縁3魚種、イシダイ及びメジナの口白症感受性

魚種	n	累積死亡率	死に始め
トラフグ <i>Takifugu rubripes</i>	10	100%	9日目
クサフグ <i>T. niphobles</i>	5	100%	14日目
ヒガンフグ <i>T. pardalis</i>	2	100%	13日目
ハコフグ <i>Ostracion immaculatus</i>	2	100%	16日目
イシダイ <i>Oplegnathus fasciatus</i>	5	0%	
メジナ <i>Girella punctata</i>	5	0%	

表9. ブリとマダイの口白症感受性

魚種	攻撃区	対照区
	死亡尾数/接種尾数	死亡尾数/接種尾数
ブリ <i>Seriola quinqueradiata</i>	10/10	0/10
マダイ <i>Pagrus major</i>	0/10	0/10
トラフグ <i>Takifugu rubripes</i>	10/10	0/5

も地先で捕獲した天然魚であることから供試尾数が5尾ないし2尾と少なかったが、ハコフグが新たに口白症感受性であることが示された。

#### ブリおよびマダイの口白症感受性

トラフグ脳磨碎濾液をトラフグ(92g)、ブリ(218g)、およびマダイに接種した時の22日目における累積死亡尾数を表9に示した。トラフグでは、接種後13日目から死亡がはじまり、18日目には全個体が発症、死亡した。また、ブリでは接種後の10日目から死亡が認められ始め、15日目までに全個体が発症し、死亡した一方、マダイでは発症、死亡は全く認められなかった。また、実験対照区の何れの魚においても発症および死亡は認められなかった。本実験結果から新たにブリが口白症に対し感受性を有することが明らかになった。Miyadai *et al.*(2001)は、クロソイが本症感受性であること、また魚体重2gのマダイは感受性を示すが、46g以上になるとほとんど感受性を示さないことを報告している。本実験供試マダイの平均体重は18gであったが、口白症感受性は認められなかった。

#### 魚体サイズの異なるブリの口白症感受性

サイズの異なるブリ(12gおよび530g)を用いた感受性試験の結果を(図17)に示した。大型ブリ(530g、各区10尾)に病原液体(トラフグに対し $10^{4.0}LD_{50}/mL$ )を0.1mL/尾ずつ接種したところ、10日目から死亡が認められ始め、14日目までに60%が死亡した。(図17-A)。なお、死亡魚には、口吻部のびらん、潰瘍、狂奔などの口白症に特有の症状を含め、共通した症状が認められなかった。一方、異

なる病原体量( $10^{3.0}-10^6LD_{50}/0.1mL/尾$ )で小型ブリ(12g、各区20尾)を攻撃したところ、病原体の接種量に関わらず6日目から発症、死亡が始まり(図17-B, C)。死亡した小型ブリでは、痙攣および脊柱の彎曲が共通して認められ(図18-A)、一部の死亡魚で口吻部にびらんが認められた。(図18-B)が、トラフグで認められる口白症の症状とは明らかに異なっていた。なお、部検した死亡魚の脊柱に損傷は認められず、脊柱の彎曲は筋肉の痙攣に起因すると考えられた。トラフグ由来口白症病原体の接種により死亡した大型ブリに特徴的な症状が認められなかったため、死亡ブリの脳磨碎濾液を調整し、HBSSで希釈列を作製し小型ブリ(12g、各区20尾)に接種したところ、接種8日目から脊柱の彎曲および痙攣を伴う死亡が認められ、接種12日までの各接種区の累積死亡率は、原液区:88%、10倍希釈液区で60%、100倍希釈液区で25%および1,000倍希釈液区で15%であった(図17-C)。前述の如く、トラフグ由来の病原体を接種した大型ブリでは口白症に特徴的な症状が認められなかったが、大型ブリ死亡魚の脳磨碎濾液を小型ブリに接種することで特徴的な症状が再現されたことから、大型のブリの死亡も口白症病原体による感染に起因することが示された。なお、大型ブリ死亡魚の脳組織における病原体量は、 $10^{2.5}LD_{50}/g$ と算出され、トラフグ脳組織内の病原体存在量( $10^{5.1}LD_{50}/g$ )に比べ大幅に少なかった。これは、大型ブリの口白症病原体に対する増殖許容性がトラフグに比べ明らかに低いことを示唆する結果であった。

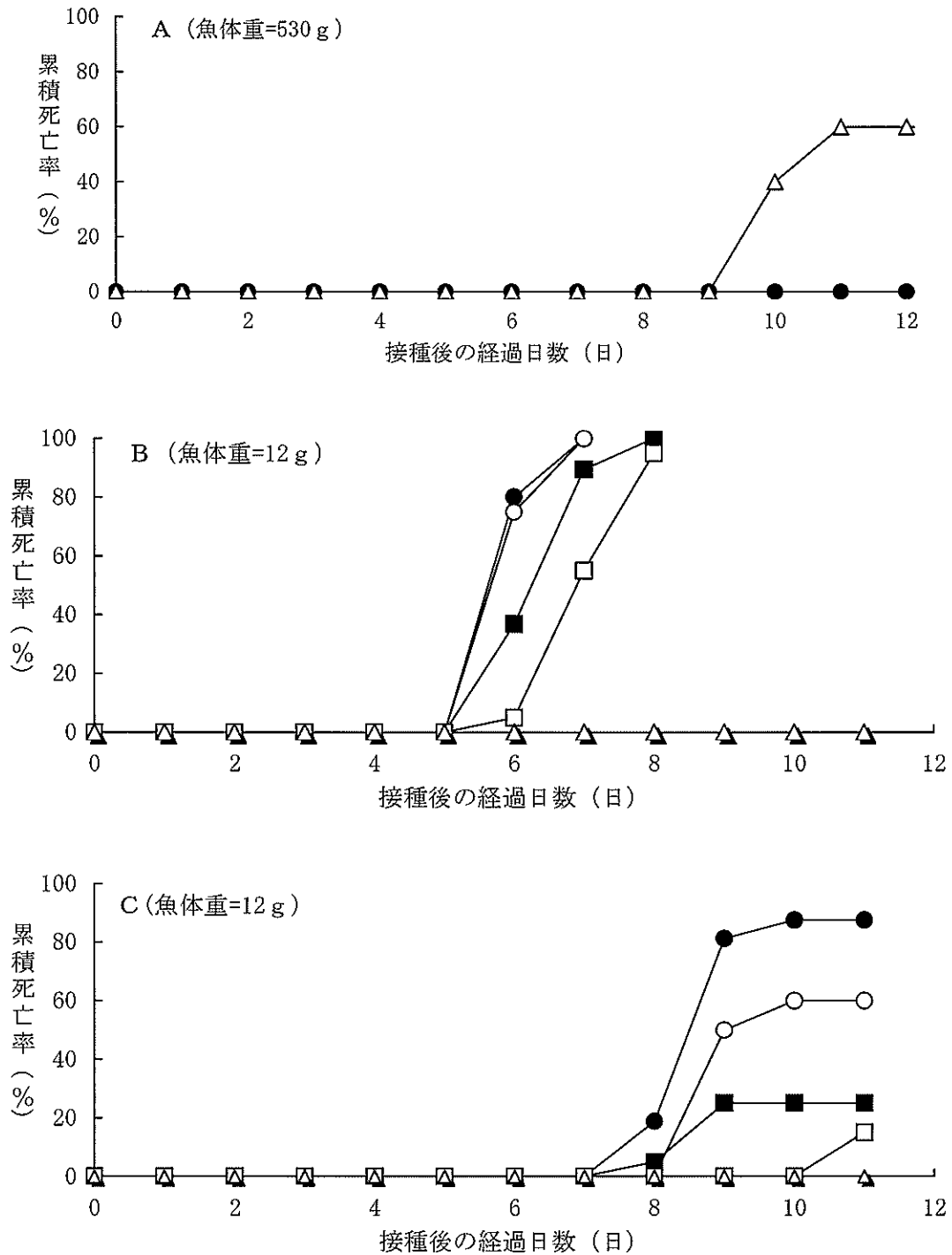


図17. 口白症に対するサイズの異なるプリを用いた感受性試験。  
 (●) : 10<sup>3</sup>LD50/0.1mL/尾で攻撃, (○) : 10<sup>4</sup>LD50/0.1mL/尾で攻撃,  
 (■) : 10<sup>5</sup>LD50/0.1mL/尾で攻撃, (□) : 10<sup>6</sup>LD50/0.1mL/尾で攻撃,  
 (△) : 陰性対象としてHBSSを0.1mL/尾接種.



A 発病したブリは極度の痙攣と脊椎の彎曲が共通して認められた。しかし、トラフグの口白症に特徴的な症状は認められなかった。



B 口吻部にびらんが認められる。

図18. 口白症病原液体を接種後8日目に死亡したブリ（魚体重12g）。

### 第3章 口白症関連タンパク質 (kuchijirosho associated proteins, KAPs)の検出

#### 目 的

口白症は、濾過性病原体による感染症であるが(井上ら, 1986), 本病原体に関する詳細は現在も明らかにされていない。本章では、口白症に人為的に感染させ、生残したトラフグあるいはブリの血清を用い、発症魚の脳組織に存在する病原体あるいは病原体関連タンパク質 (kuchijirosho associate proteins, KAPs) の検出を試みた。

#### 材料および方法

##### 供試魚および供試魚血清

長崎県水産試験場の口白症人為感染死トラフグ (Nag-M), 感染耐過トラフグ (Nag-S) および高知県下の健常トラフグ (Koh-H) (1歳魚, 体重100~250g) の脳, 腎臓, 脾臓組織および血清を実験に供した。また, 前章で感染実験に供したブリおよびマダイの発病魚および対照魚の脳組織および血清を本実験に供した。なお, 口白症感染耐過魚血清は, 発症3~4週後に採血した。実験に供した血清および各組織は何れも使用するまで-80℃で保存した。また, 高知県下のトラフグは渡辺研一博士(独)水産総合研究センター養殖研究所) より分与を受けた。

##### 抗トラフグ IgM および抗ブリ IgM 家兔血清の作製

*Edwardsiella trada* で感作したトラフグまたはブリの血清を20mM Tris-HCl (pH8.0) で透析した後, DEAE-Sepharose カラムに添加し, NaCl 濃度勾配 (0-300mM) で溶出し, 得られた各分画の280nm における吸光度を測定すると共に凝集抗体価を測定した。凝集抗体価の認められた分画をプールし, 80%飽和硫酸アンモニウムで濃縮した。10mM PRS (-) で透析した試料を Sephacryl S-300カラムに

添加し、10mM PBS (-) で溶出し、得られた各分画の280nmにおける吸光度を測定すると共に凝集抗体価を測定した。凝集抗体価の認められた分画をプールし、60%飽和硫酸アンモニウムで濃縮した。20mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-600mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH7.0) で透析した試料を Phenyl-Sepharose カラムに添加し、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>濃度勾配 (600-0 mM) で溶出後、さらに蒸留水で溶出した。(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>濃度勾配で溶出した分画をトラフグ1およびブリ1とし、蒸留水を溶出した分画をトラフグ2およびブリ2として、凝集抗体価の認められた分画をそれぞれプールし、60%飽和硫酸アンモニウムで濃縮したものを精製 IgM とした。このようにして精製された精製 IgM のタンパク量を Lowry 法を用いて求めた。さらに精製 IgM の精製度を算出するために、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (PAGE) を Laemmli (1970) の方法に従って行った。ゲル濃度は、10%とし、泳動後にクマシーブリリアントブルー R-250でタンパク染色を行い、染色像をデンストメーター (デンストグラフ AE-6920; アトー株式会社) で画像ファイルとして取り込み、画像解析ソフト (レーン&スポットアナライザー Ver. 6; アトー株式会社) を使って精製度を算出した。

本精製 IgM を10mM PBS (-) で10希釈して希釈 IgM とした後、完全フロイントアジュバント (Sigma) と乳化させ、ウサギの背部皮下に接種した。初回接種より2週間後に同様の手順で乳化させた IgM を再接種し、さらに2週間後に希釈 IgM をウサギの腹腔内に接種した。最終免疫から25日後に全採血し、分離した血清を抗トラフグ IgM および抗ブリ IgM 家兎血清とした。

#### ストレプトアビジン-ビオチン (SAB) を用いた酵素抗体法

口白症発症トラフグ (21.3 g) の脳組織を摘出し、冷却した10%中性緩衝ホルマリンで24時間固定した後、パラフィン包埋した。包埋切片を5 $\mu$ mに薄切し、スライドガラスに付着した。スライドをキシレンに3~5分間浸し、次いで、別のキシレンに3~5分

間浸して脱パラフィンを行った。次に100%エタノールに3分間浸し、次いで別の100%エタノールに3分間浸し、さらに95%エタノールで3分間浸し、次いで別の90%エタノールで3分間浸し、80%エタノールに3分間浸した後、余分な液をよく切り PBS (-) に5分間浸した。次いで、内因性ペルオキシダーゼを失活させるため3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に浸して常温で10分間反応させ、水洗いし、PBS (-) で5分間浸し、一次血清として口白症発症ブリ血清または健常ブリ血清を25℃で60分間反応させ、PBS (-) で3回洗浄し、二次血清として抗ブリ IgM 家兎血清を37℃で30分間反応させ、PBS (-) で3回洗浄した。次いで三次血清としてヒストファイン SAB-PO (R) キット (株式会社ニチレイバイオサイエンス) のビチオン標識抗ウサギ IgG 抗体を常温で10分間反応させ、PBS (-) で3回洗浄した。そして、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを適下し常温で5分間反応させ PBS (-) で3回洗浄し、ヒストファイン SAB-PO (R) キットの基質溶液を適下し常温で20分間反応させ、精製水で3回洗浄した。対比染色としてヒストファイン マイヤーヘマトキシリン溶液 (株式会社ニチレイバイオサイエンス) にスライドガラスを10秒間浸した後、流水洗して、脱水、キシレンで透徹し、非水溶性封入剤で封入して検鏡に供した。

#### SDS-PAGE およびウエスタンブロット (WB)

トラフグの脳、腎臓および脾臓を9倍量の HBSS で磨砕した後、遠心分離 (20,000 $\times$ g, 5min) により得た上清に等量の SDS-変性緩衝液 (0.17M Tris-HCl pH6.8, 5.3% SDS, 13%  $\beta$ -mercaptoethanol) を加え3分間煮沸し、1/10量のローディング液 (0.05% bromophenol blue, 70% glycerol) を加え、SDS-PAGE 用試料とした。SDS-PAGE は7.5%分離ゲルを用い、Laemmli (1970) の方法に準じて行った。ウエスタンブロット (WB) は、Towbin *et al.* (1979) の方法に準じ、転写用緩衝液 (50mM Tris-HCl, 200mM glycine) を用い10V/cm で20分間の通電によりアクリルアミドゲル中に展開したタンパク

質をニトロセルロース (NC) 膜 (Advantec) に転写した。NC 膜を 5% スキムミルク - TS 緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH7.4) で 30 分間ブロッキングした後、感染耐過、健常あるいは履歴不明トラフグ血清を 1 次血清、抗トラフグ IgM 家兎血清を 2 次血清、さらにはアルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗ウサギ Ig ブタ血清 (Dako) を 3 次血清とし、免疫染色を行った。発色には、NBT-X-リン酸液 (0.34 mg/mL nitroblue-tetrazolium, 0.17 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate-toluidinium, 100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5) を用いた。

#### 口白症発症トラフグ脳磨砕液の超遠心分離上清分画・沈殿分画を用いた攻撃実験

水産試験場で飼育していた SPF トラフグ (平均体重 20 g) を各試験区当たり 20 尾ずつ 100 L 容のカゴに入れて 1 t パンライト水槽に収容し、計 4 試験区を設定した (図19)。試験区 1 には、人為感染発症魚の脳組織磨砕液を、試験区 2 には同磨砕液の超遠心分離 (100,000×g, 60min) 上清分画を、試験区 3 には同超遠心分離沈殿分画懸濁液を各々 0.1 mL / 尾ずつ背部に筋肉内接種した。また陰性対照区 (試験区 4) には、HBSS を接種した。試験魚は、無給餌で 2 週間流水飼育し (5 回転/日, 23.6~26.3℃),



図19. 口白症発症トラフグ脳磨砕液の超遠心分離上清分画・沈殿分画を用いた攻撃実験の試験区を設定した写真。  
カゴは、ネットロン製であり、用量は各カゴが約 100 L になるようにしている。

累積死亡率を算出した。

## 結 果

#### 抗トラフグ IgM および抗ブリ IgM 家兎血清の作製

精製トラフグ IgM と精製ブリ IgM のタンパク量はそれぞれ 2.2 mg/ml と 2.8 mg/ml であった。精製 IgM の SDS-PAGE (10%ゲル) 像図20に示した。この像からより明確に H 鎖が認められるトラフグ 1 とブリ 1 を精製 IgM として使用することを決め、精製度を確認した結果、精製トラフグ IgM が 80.7%、精製ブリ IgM が 83.3% であった。

#### ストレプトアビジン-ビオチンを用いた酵素抗体法による免疫組織染色の結果

口白症発症トラフグの脳細胞切片を作成し、口白症発症ブリおよび健常ブリの血清を用いて免疫染色したが、延髄に存在する脳神経核の大型神経細胞の核内およびその周辺には陽性反応は認められなかった (図21)。

#### 口白症感染耐過および健常トラフグ血清を用いた口白症関連タンパク質の検出

口白症発症トラフグおよび健常トラフグの脳組織

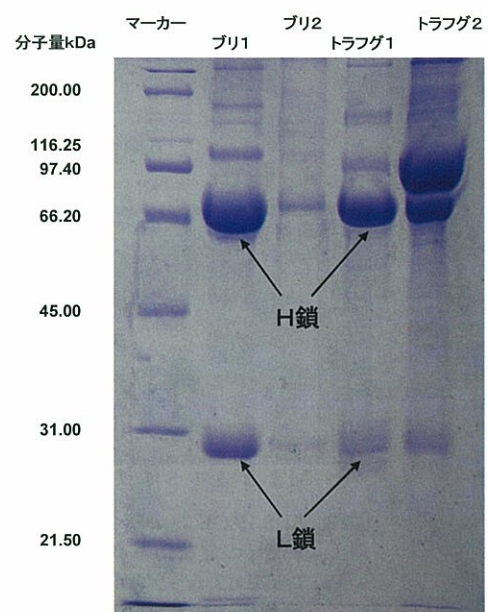


図20. トラフグおよびブリの精製 IgM の SDS-PAGE (10%ゲル) 像。

タンパク質の SDS-PAGE (7.5%ゲル) 像を図22-Aに、また口白症感染耐過トラフグ (Nag-S) および健常トラフグ (Koh-H) の血清による染色像を図22-Bおよび-Cに各々示した。感染耐過魚血清では、分子量100~120k のタンパク質が発症魚脳組織から検出されたが、各個体間でそれらの分子量に若干の差異が認められた (図22, 1-9列)。また、同血清を用いた免疫染色で健常魚の脳タンパク質からも分子量100~120k のタンパク質が検出された (図22, 10, 11列)。以降、本研究では、感染耐過魚血清で検出されたこれらのタンパク質を kuchijirosyo associated proteins (KAPs) と称することとした。しかしながら、健常魚の血清を用いた免疫染色では、分子量100~120k の KAPs は何れの発症魚および健常魚の脳細胞からも検出されなかった (図22-C)。

**口白症発症トラフグの脳、腎臓および脾臓からの KAPs 検出**

口白症発症トラフグおよび健常トラフグ (Nag-M, Wak-H) 各々 2 尾の脳、腎臓および脾臓を SDS-PAGE に供し、感染耐過魚 (Nag-S) の血清による免疫染色像を図23に示した。先に示した如く、発症魚および健常魚の脳組織タンパク質から100~120k の KAPs が検出されたが、供試魚何れの腎臓および脾臓組織からも KAPs は検出されなかった。

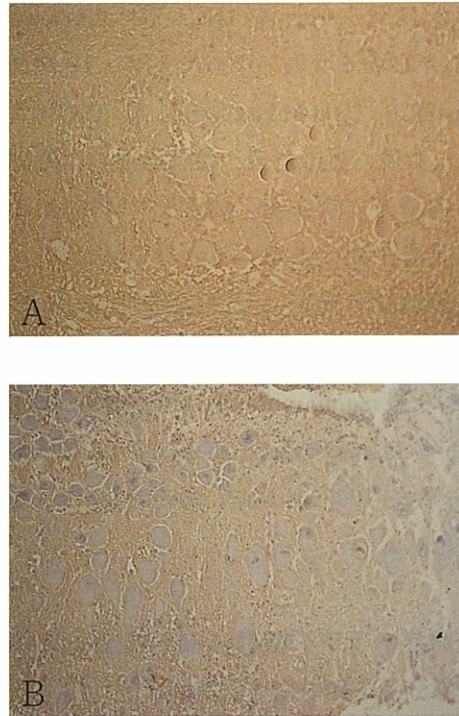


図21. 口白症発症トラフグの延髄の脳神経核の大型神経細胞の SAB (Streptavidin-Biotin) 染色像。  
A：一次抗体として口白症を発症したブリの血清を使用した。B：健康なブリの血清を使用した。Bの方がヘマトキシリンの染色性が良いが、どちらにも抗原部位を特異的に染色している像は認められない。

**口白症発症トラフグの脳磨砕液の超遠心分離上清および沈殿分画からの KAPs 検出**

口白症発症トラフグ (Nag-M) の脳磨砕液の超遠心分離上清および沈殿分画を SDS-PAGE に供し、感染耐過魚 (Nag-S) の血清で免疫染色した結果を

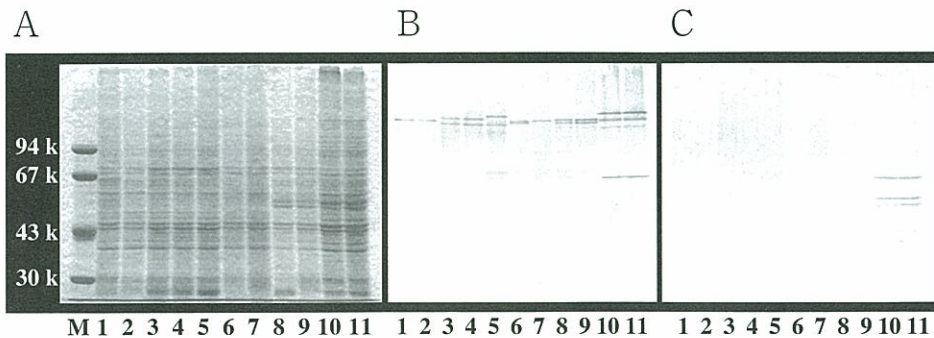


図22. SDS-PAGE およびウエスタンブロット法を用いたトラフグの脳組織から発見された KAPs の分析。写真A：口白症発症および健常トラフグの脳組織タンパク質の SDS-PAGE (7.5%ゲル) 像。写真B：口白症感染耐過トラフグ (Nag-S) 血清による免疫染色像。写真C：健常トラフグ (Koh-H) 血清による免疫染色像  
M：分子マーカー。1~9レーン：口白症を発症した瀕死トラフグの脳組織タンパク。10・11レーン：健康なトラフグの脳組織タンパク。



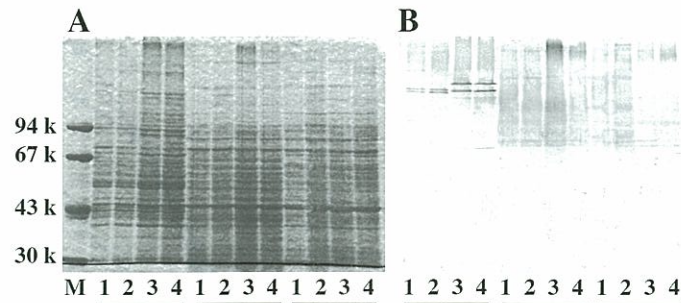


図23. 口白症発症および健常トラフグ (Nag-M, Wak-H) 各々2尾の脳、腎臓および脾臓を SDS-PAGE に供し、感染耐過魚 (Nag-S) 血清による免疫染色像。  
A：脳組織タンパク質、腎臓、脾臓の SDS-PAGE (7.5% ゲル) Coomassie Brilliant Blue 染色像。  
B：口白症感染耐過魚 (Nag-S) 血清による免疫染色像。  
M：分子マーカー。1 レーン・2 レーン：口白症を発症した瀕死魚。3 レーン・4 レーン：見かけ上健康な魚。

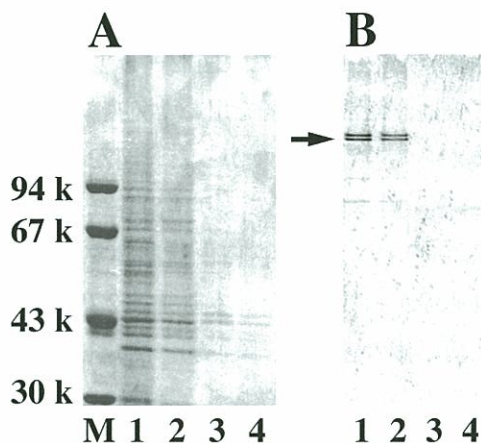


図24. 口白症トラフグ (Nag-M) の脳磨砕液の超遠心分離上清および沈殿分画を SDS-PAGE に供し、感染耐過魚 (Nag-S) 血清で免疫染色した結果。  
A：口白症を発症した瀕死魚の脳タンパク質を用いた SDS-PAGE (7.5%) 像。B：口白症感染耐過魚 (Nag-S) 血清による免疫染色像。  
M：分子マーカー。1 レーン・2 レーン：脳磨砕液の超遠心分離 (100,000xg, 60min 沈殿分画。3 レーン・4 レーン：上清分画。矢印：上清分画中の KAPs。

図24に示した。分子量100~120kのKAPsは、上清分画で検出されたが、沈殿分画からは検出されなかった。

#### KAPsの病原性試験

口白症発症トラフグの脳組織磨砕液の超遠心分離上清分画 (KAPs 含) および沈殿分画 (KAPs 不含) をトラフグ筋肉内に接種し、その病原性について検討した結果を (図-25) に示した。なお、陽性対照

区には発生魚脳組織磨砕液を、陰性対照区には HBSS を各々接種した。陽性対照区では、接種後8日目から死亡がはじまり、接種後14日目には全検体が発症死亡した。また、KAPs 不含超遠心沈殿分画接種区においても、接種8日目から死亡が認められ始め、累積死亡率の推移は陽性対照区と同様であった (累積死亡率100%)。一方 KAPs 含超遠心分離上清分画を接種した区では、接種後9日目から発症死亡が認められ、接種後14日目には累積死亡率が100%に達したが、陽性対照区あるいは沈殿分画接種区に比べ、累積死亡の曲線の明らかな遅れが認められた。なお、実験対照区で死亡したトラフグは何れも口白症を発症していなかった。

#### ブリおよびマダイ脳組織からの口白症関連タンパク質 (KAPs) の検出

ブリおよびマダイの脳組織からの KAPs の検出結果を (図26) に示した。口白症感染耐過ブリの血清を用いたウエスタンブロットで口白症罹病ブリおよび健常ブリならびに健常マダイの脳組織から分子量100~120kのKAPsが検出された。しかし、健常ブリの血清では口白症罹病ブリおよび健常ブリならびに健常マダイの脳組織から KAPs は検出されなかった。

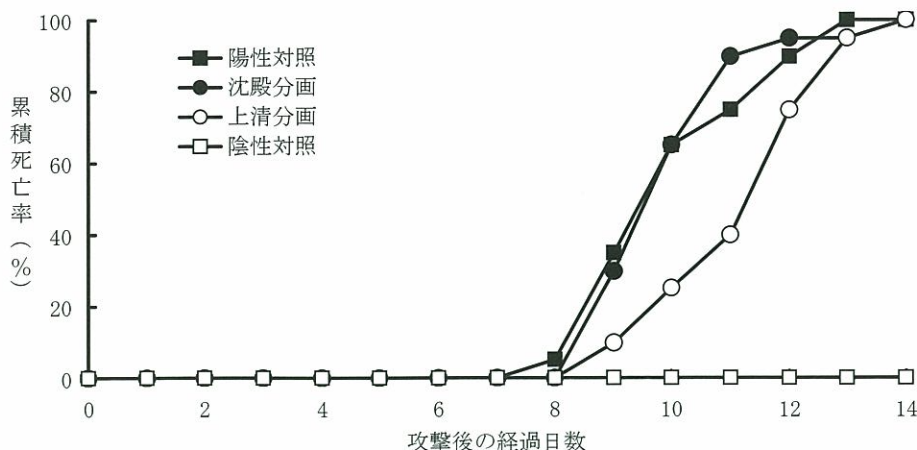


図25. 口白症トラフグの脳組織磨砕液の超遠心分離上清分画および沈殿分画の病原性試験。  
 (■)：脳組織磨砕液 (陽性対照). (●)：超遠心分離沈殿分画で KAPs を含まない。  
 (○)：超遠心分離上清分画で KAPs を含む. (□)：HBSS (陰性対照)

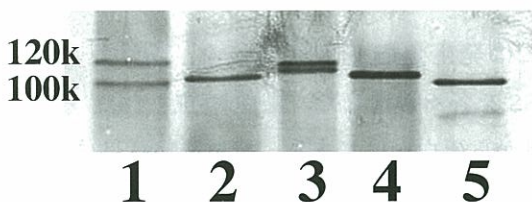


図26. ブリおよびマダイ脳組織からの口白症関連タンパク質 (KAPs) の検出。  
 1 レーン：口白症罹病トラフグ。  
 2 レーン：口白症罹病ブリ。  
 3 レーン：見かけ上健康なトラフグ。  
 4 レーン：見かけ上健康なブリ。  
 5 レーン：見かけ上健康なマダイ。

## 考 察

口白症は、濾過性病原体による感染症であるが (Inouye *et al.*, 1992, Miyadai *et al.*, 2001), 病原体の詳細は未だ明らかにされていない。そこで本章では、口白症の診断法の確立を目的に、まず、口白症感染耐過ブリの血清を用いた酵素抗体法により、口白症トラフグの脳組織に存在する本症病原体の検出を試みたが、和田ら (1985) が本症原因ウイルスが存在すると報告している延髄の脳神経核の大型神経細胞の核内および核膜に本症病原体特異抗原を見いだすことはできなかった (図21)。次に、口白症感染耐過トラフグの血清を用い、口白症トラフグ組織より本症病原体あるいは関連タンパク質 (kuchijirosho associated proteins, KAPs) の検出を試みた。口白症感染耐過トラフグの血清を用いた免疫

染色において、検体間で分子量に若干の差は認められるものの、分子量100~120kのタンパク質が全ての脳組織から検出された (図22-B)。一方、同タンパク質は、健常魚血清を用いた免疫染色では何れの検体からも検出されなかった (図22-C)。したがって、感染耐過魚血清により検出された分子量100~120kのタンパク質は、口白症関連タンパク質である可能性が示唆された。本研究第2章において、口白症病原体の感染価を臓器別に測定し、口白症病原体が脳のみならず腎臓あるいは脾臓にも脳と同程度存在することを確認している。しかし、分子量100~120kの KAPs は脳組織からのみ検出され、腎臓や脾臓組織からは検出されなかった (図23)。これは、KAPs が口白症関連タンパク質であることを裏付ける結果であると考えられる。

口白症発症トラフグの脳組織磨砕液の超遠心分離分画で、KAPs は沈殿分画には存在せず、上清分画のみから検出された (図24)。さらに、各遠心分画の病原性について検討したところ、沈殿分画に強い病原性が確認された (図25)。本実験で用いた遠心分画条件 (100,000×g, 60min) は、比較的浮遊密度の低いラブドウイルス (p: 1.17-1.20) 等でも十分に沈殿回収できる条件である (Nishizawa *et al.*, 1991)。したがって、上清分画に含まれる KAPs の浮遊密度は、ウイルス粒子に比べ大幅に低いと考えられた。また、KAPs の分子量 (100~120k) が一般的なウイルスの構造タンパク質としては大き

ざること、SDS-PAGEによる染色性から推察されるKAPsの脳組織内存在量は1-10mg/g tissue以下で、発症魚の患部組織中に存在する感染体の量としては極めて低いこと、さらに検体間でKAPsの分子量に差異が認められることを考えると(図22-B), KAPsは口白症病原体の構造タンパク質ではなく、口白症罹病魚の組織内で誘導されたタンパク質であると考えられる。一方、Miyadai *et al.*(2004)は、本症病原体の浮遊密度が1.096 g/cm<sup>3</sup>と報告している。本実験においても超遠心分画を用いた病原性試験において沈殿分画に強い病原性が認められた(図25)。さらに、沈殿分画中に感染耐過魚血清が認識するタンパク質が検出されなかったこと(図24-B, 3-4レーン)、また酵素抗体法でも検出されなかったことから、口白症病原体はウイルス粒子程度の密度を有するものの、その抗原性は極めて低いと考えられ

た。興味深いことに、KAPsは感染耐過魚血清を用いた免疫染色で健常魚脳組織からも検出され、さらに健常魚の脳組織中におけるKAPs量に大きな差異は認められなかった(図22, 10-11レーン, 図24, 3-4レーン)。

これらのことから、KAPsは魚体内で新たに合成されたタンパク質ではなく、脳組織内に元々存在するタンパク質の抗原性が口白症病原体の何らかの作用により部分的に変化することによって、元々存在するタンパク質がKAPsとして新たに抗原認識されるようになったものではないかと考えられる(図27)。

ところで、前章において、ブリが口白症に感染性があることが明らかになった。また、本研究では感受性を示さなかったが、Miyadai *et al.*(2001)はマダイも本症に感受性があることを報告している。そこで、ブリおよびマダイにおいても脳組織から

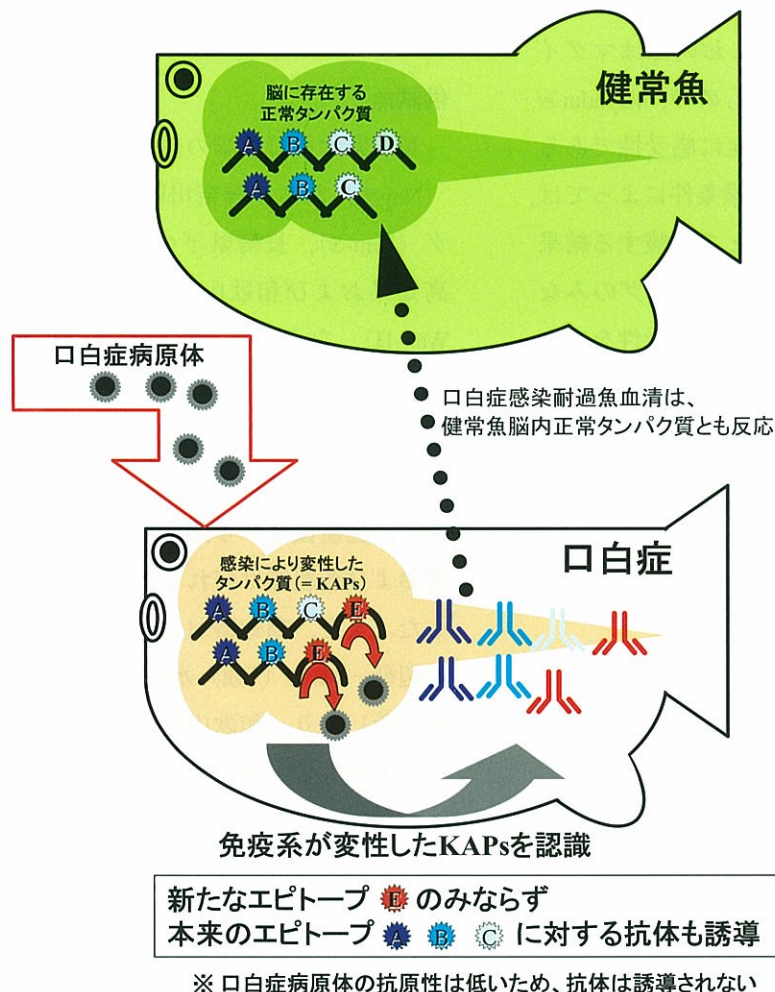


図27. 口白症病原体とKAPs概念仮説.

KAPsの検出を試みたところ、口白症罹病ブリならびに健常ブリおよび健常マダイの脳組織から分子量100~120kのKAPsが検出された(図26)。なお、図には示さなかったが、これらのKAPsは、健常トラフグ血清、健常ブリ血清および罹病ブリ血清では全く染色されなかった。先にも示した如く、トラフグのKAPsが感染耐過魚のみならず健常魚の脳組織にも存在することを明らかにしたが、この特徴はブリおよびマダイのKAPsにおいても共通していた(図26)。しかし、ブリのKAPsが感染ブリ血清で染色されなかった点は、トラフグとは異なった。これは、発症ブリが攻撃後8日以内に全数が死亡したため、ブリ体内でKAPsに対する抗体が十分に誘導されなかったためと推察され、罹病トラフグの脳磨砕濾液の接種により発症、死亡したブリ脳組織におけるKAPs量が、他の供試検体に比べ極端に少なかった点については、原因を明らかにできなかった。一方、健常マダイの脳組織からもKAPsが検出されたが(図26, 5レーン)、本実験においてはマダイが口白症に感受性を示さなかったものの、Miyadai *et al.*(2001)は小型のマダイが口白症に感受性であることを報告していることから、攻撃条件によっては、マダイも口白症に感受性を示すことを示唆する結果である。以上の結果から、KAPsがトラフグのみならず、ブリやマダイ等口白症病原体に感受性を有する魚種に共通するタンパク質であると考えられる。

## 第4章 口白症診断とワクチン開発の試み

### 目 的

口白症は、濾過性病原体による感染症であるが、病原体についての詳細は明らかになっていない。前章までに、口白症感染耐過魚血清が、脳組織内にある口白症関連タンパク質(kuchijirosho associated proteins, KAPs)を認識することを明らかにした。そこで本章では、KAPsに対する抗体の有無により口白症診断あるいは感染履歴の把握について検討した。さらに、口白症対策の一環として、口白症トラフグ脳磨砕濾液から調製した本症病原体のホルマリン不活化ワクチン開発の可能性についても検討した。

### 材料および方法

#### 供試魚

長崎県水産試験場の口白症人為感染耐過トラフグ(Nag-S)および神奈川県下の自然発症耐過トラフグ(Kan-S)、長崎県下の口白症トラフグ(Nag-M)、高知県および和歌山県下の健常トラフグ(Koh-H, Wak-H)、ならびに長崎県および佐賀県下の口白症発症歴不明トラフグ(Nag-U, Sag-U)計23尾(1歳魚、体重100~250g)の脳、腎臓、脾臓組織および血清を実験に供した。なお、口白症感染耐過魚血清は、発症後3~4週に採血した。実験に供した血清および各組織は何れも使用するまで-80℃で保存した。また、高知県および神奈川県下のトラフグは渡辺研一博士((独)水産総合研究センター 養殖研究所)より、和歌山県下のトラフグは石丸克也博士(近畿大学水産研究所)より分与を受けた。

#### 口白症病原体液および実験魚

口白症病原体液は、第2章で調製し、-80℃に保存してあったものを実験に供した。なお、本病原体保存液の半数致死量(LD<sub>50</sub>)をBehrens-Kärber法に

より求めたところ、 $10^{4.7}LD_{50}/mL$ であった。

水産試験場の陸上水槽で飼育していたトラフグ（平均体重 8 g, 17 g および 28 g）を実験に供した。実験魚は 40L 角形アクリル水槽あるいは 100L 容パンライト水槽に収容し、Extruded Pellet (EP) (日清丸紅飼料) を適時給餌、25℃あるいは 18~20℃、流水（換水率：20 または 50 回転/日）の条件で 2 週間飼育し、発症死亡の推移を観察した。

#### 病原体液のホルマリン処理および病原体攻撃試験

病原体保存液 ( $10^{4.7}LD_{50}/mL$ ) に終濃度 0.3% となるようホルマリンを添加し、4℃で 12 時間不活化処理したものを 12h 処理液、また 7 日間処理したものを 7d 処理液とした。12h 処理液を平均体重 17 g (80 尾) の健常トラフグに、また 7d 処理液を平均体重 28 g (85 尾) および 8 g (65 尾) の健常トラフグに、各々 0.1 mL/尾 ずつ背部筋肉内に接種した。また、実験対照区として、HBSS を同様の手順で各実験区と同数の健常トラフグに接種した。12h 処理液あるいは、7d 処理液を接種した 17 g (80 尾)、28 g (85 尾) および各実験対照区のトラフグの飼育水温は 25℃とし、また 7d 処理液を接種した 8 g (65 尾) のトラフグの飼育水温は 18~20℃とした。

7 日処理液接種 14 日後、18~20℃飼育区のトラフグ (8 g) の生残魚を 3 区に分け、40L 水槽に 20 尾 ずつ収容し、口白症病原体液を HBSS で 10 倍および 100 倍に希釈したもの、あるいは HBSS (攻撃陰性対照) を 0.2 mL/尾 ずつ接種 (病原体攻撃量： $10^{3.0}$  および  $10^{2.0}LD_{50}/尾$ ) した。その後、飼育水温を 25℃にして 10 日間飼育し、発症と死亡の推移を観察し

た。なお、陽性対照区には、HBSS を接種し水温 18~20℃で飼育していたトラフグ (8 g) を、同様の手順で病原体攻撃試験に供した。

## 結 果

### 口白症発症 (M)、感染耐過 (S)、健常 (H) および履歴不明 (U) トラフグの脳組織からの KAPs 検出

長崎県下の口白症発症トラフグ (Nag-M) 7 尾、神奈川県下の感染耐過魚 (Kan-S) 3 尾、長崎県下の発症履歴不明魚 (Nag-U) 6 尾および和歌山県下の健常魚 (Wak-H) 3 尾の脳組織タンパク質を電気泳動し、長崎県の感染耐過魚 (Nag-S) 血清 (2 ロット)、高知県および和歌山県下の健常魚 (Koh-H, Wak-H) 血清 (4 ロット)、長崎県および佐賀県下の発症履歴不明魚 (Nag-U, Sag-U) 血清 (3 ロット) を用いた免疫染色を行い、KAPs の検出を試みた (表 10)。感染耐過魚血清で免疫感染した場合、実験供試魚全ての脳組織から分子量 100~120k の 2 本の KAPs が検出されたが、検体間で検出された KAPs の分子量に若干に差異が認められた。また、健常魚血清で免疫染色した場合、KAPs は発症魚および健常魚にかかわらず何れの脳組織検体からも検出されなかった。一方、発症履歴不明魚血清を用いて KAPs の検出を試みた結果、長崎県下のトラフグ血清 2 ロットでは分子量 100~120k の 2 本の KAPs が発症魚および健常魚の脳組織から検出されたが、佐賀県下のトラフグ血清では KAPs は何れの検体からも検出されなかった。

表 10. 口白症感染耐過・健常・履歴不明トラフグ脳からの KAPs 検出

抗原 (脳)	n	脳組織からの KAPs 検出率 (陽性数/供試数)								
		感染耐過魚血清		感染履歴不明魚血清			健常魚血清 (感染履歴なし)			
		Nag-D 1	Nag-D 2	Nag-U 1	Nag-U 2	Sag-U	Koh-H	Wak-H 1	Wak-H 2	Wak-H 3
Nag-D	7	7/7	7/7	7/7	7/7	0/7	0/7	0/7	0/7	0/7
Kan-D	3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Nag-U	6	6/6	6/6	6/6	6/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Wak-H	3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Nag: 長崎県. Kan: 神奈川県. Sag: 佐賀県. Koh: 高知県. Wak: 和歌山県. M: 口白症が原因の瀕死魚.  
S: 口白症の耐過魚. U: 口白症の感染履歴不明魚. H: 口白症の感染履歴が無い.

口白症病原体のホルマリン感受性

病原体保存液をホルマリンで12時間あるいは7日間処理したものをトラフグに接種し、各々の死亡・発症の推移を観察した結果を図28に示した。実験対照区には HBSS を同様の手順で各実験区と同数の健常トラフグに接種した。ホルマリン12h 処理病原体液を接種した区では、接種後5日目から口白症の発症が認められ始め、接種後11日目までに全個体が発症死亡した。また、ホルマリン7d 処理病原体液を接種した区においても同様に発症が認められ、接種14日目までの累積死亡率は79%となった。したがって、口白症病原体は、0.3%ホルマリンで7日間処理しても完全には不活化されないことが明らかになった。

口白症病原体ホルマリン処理液攻撃生残存魚に対する再攻撃

次に、トラフグの飼育水温を通常の感染試験より約5℃下げ18～20℃とし、7d 処理液を接種後発症死亡が全く認められなかった生残存魚を用い、口白症病原体液による攻撃試験を行った結果を図29に示した。その結果、攻撃病原体量に関わらず、攻撃後4日目から発症死亡が認められ始め、9日目には全てが死亡した。このとき、7d 処理液接種-HBSS 攻

撃区および HBSS-HBSS 攻撃区の累積死亡率は各々38%および16%であったが、これらの死亡魚では口白症の発症は一切認められなかった。

考 察

前章までに、口白症感染耐過魚の血清は、脳組織内にある口白症関連タンパク質 (KAPs) を認識していることが明らかになった。そこで本章では、KAPs に対する抗体の有無により口白症診断あるいは感染履歴の把握が可能ではないかと考え、口白症感染耐過魚、健常魚ならびに発症歴不明トラフグの脳組織および血清を用い、KAPs の検出を試みた。その結果、全ての感染耐過魚血清は KAPs を認識していたが、何れの健常魚血清も KAPs との反応は認められなかった。これに対し、発症歴不明トラフグ血清を用いて分子量100～120k の脳組織内 KAPs との反応性について検討したところ、長崎県下のトラフグ血清2ロットが KAPs 反応陽性であり、逆に佐賀県下のトラフグ血清は KAPs 反応陰性であった (表10)。このことから、トラフグの脳組織を使用することで、被検魚の血清さえ採取すれば、血清の KAPs との反応により口白症における感染履歴の把握が可能となると考えられる。なお、この場合、被

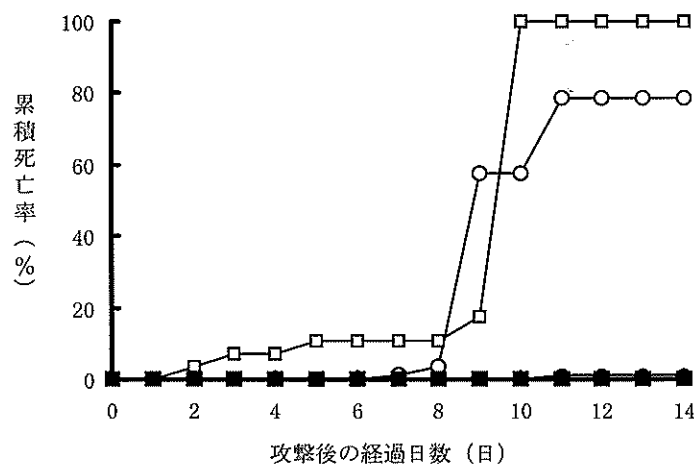


図28. ホルマリン処理された口白症病原体を接種されたトラフグの累積死亡率。病原体保存液 (10<sup>4.7</sup>LD<sub>50</sub>/mL)に終濃度0.3%となるようホルマリンを添加し、4℃で12時間不活化処理したものを12h 処理液、また7日間処理したものを7d 処理液とした。  
 (□)：12時間ホルマリン処理病原体液を接種した後に25℃で飼育した群。  
 (○)：7日間ホルマリン処理病原体液を接種した後に25℃で飼育した群。  
 (●)：7日間ホルマリン処理病原体液を接種した後に18-20℃で飼育した群。  
 (■)：として HBSS を接種した後に25℃または18-20℃で飼育した陰性対照群。

検魚からは少量の採血をすればよいから、被検魚を殺すことなく検査が可能となる利点が生じる。さらに口白症を確実に発症したトラフグの脳は、攻撃試験をすることで容易に得ることができ、大量に準備しておくことも可能である。

次に、口白症に対する積極的な防除対策の一つとしてホルマリン不活化ワクチン開発の可能性について検討するために、口白症病原体のホルマリン感受性について検討した。ホルマリン12h および7d 処理病原体液を接種した区は、何れも接種後5日目から口白症の発症が認められ始め、79%以上の累積死亡が認められ（図28）、口白症病原体が0.3%ホルマリンで7日間処理しても完全には不活化されないことが明らかになった。既知の魚類病原ウイルスの中でもホルマリン処理に比較的抵抗性の高い伝染性肺臓壊死症ウイルス（IPNV）は、0.3%ホルマリンで1日間の処理により十分不活化されることから（data not shown）、口白症病原体が既知の魚類病原ウイルスに比べ、ホルマリンに対し強い耐性を有すると考えられた。

井上ら（1986）は、口白症が水温25℃以上で高率に発症するが、水温20℃以下ではほとんど発症しないと報告している。また、第1章の口白症実態調査

でも2月から4月の低水温期には本症が発症しなかった。そこで、トラフグの飼育水温を通常の感染試験より約5℃下げ18~20℃とし、7d 処理液を接種したところ、予想通り7d 処理病原体液接種群での発症死亡は全く認められなかった（図28）。そこで、これら7d 処理病原体液を接種した生残魚に対して口白症病原体液による攻撃試験を行ったところ、攻撃病原体量に関わらず、攻撃後4日目から発症死亡が認められ始め、9日目には全てが死亡した（図29）。先に示した如く、口白症病原体は、7日間のホルマリン処理でも完全には不活化しないため、本実験における生残魚に対する口白症病原体攻撃は、結果的に不活化されていない病原体を用いた生ワクチンの効果について検討したことになると考えられるが、その効果は期待できるものではなかった。

ところで、本実験でのホルマリン処理病原体の接種量は、 $10^{3.7}LD_{50}/0.1mL/尾$ で、既知魚類病原ウイルスにおけるホルマリン不活化ワクチンと比べても十分量が接種されていたと考えられる。また攻撃量も $10^{2.0}LD_{50}/0.2mL/尾$ であり、既知魚類病原ウイルスの感染実験で一般的に用いられる攻撃量と比べ、むしろ低濃度な条件であった。それにもかかわらず、ホルマリン処理病原体による防御効果が全く認め

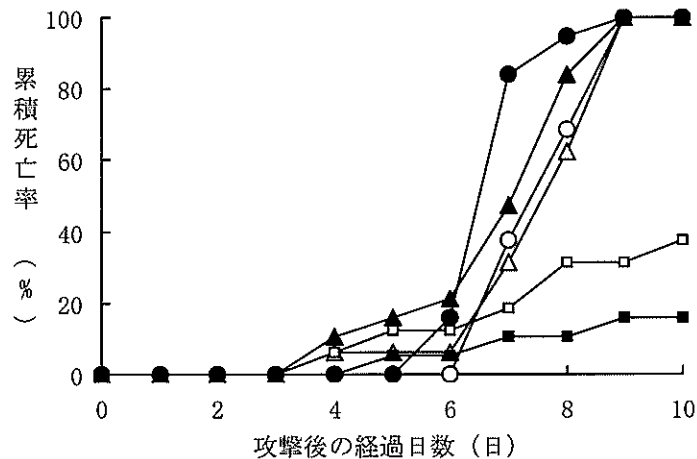


図29. ホルマリン処理された口白症病原体を接種されて生き残ったトラフグへの口白症病原体による再攻撃後の累積死亡率。

7日間ホルマリン処理病原体液 ( $10^{3.7}LD_{50}/0.1mL/fish$ ) を接種されてから18~20℃で14日間飼育された後、2つの異なる濃度の口白症病原体液 ( $10^2$  and  $10^3 LD_{50}/0.1mL/fish$ ) を皮下に接種した。

(○, △, □) : ホルマリン処理病原体液を接種されて生き残った群。

(●, ▲, ■) : HBSS を接種された群。(○, ●) : 病原体液 ( $10^3 LD_{50}/0.1mL/fish$ ) を接種された群。(△, ▲) : 病原体液 ( $10^2 LD_{50}/0.1mL/fish$ ) を接種された群。

(□, ■) : 対照として HBSS が接種された群。

られなかったことから、本ホルマリン処理病原体液接種による口白症に対する予防免疫の誘導は困難であると考えられた。第2章において、感染耐過魚の血清を用いた免疫染色で、脳組織から口白症関連タンパク質 (kuchijiro-sho associate proteins, KAPs) を検出しているが、脳組織中の口白症病原体は検出されなかった。また、口白症病原体が含まれる超遠心分離沈殿分画中のタンパク質は耐過魚血清に全く認識されていなかったことから、口白症病原体の抗原性が極めて低いことが示唆された。また、本章において、ホルマリン処理病原体の予防効果が全く認められなかったが、これは口白症罹病魚の血中に病原体に対する抗体が誘導されないことと何らかの関連があると考えられる。口白症の病原体は、ホルマリンに対し比較的耐性である点、ホルマリン処理によるワクチンとしての効果が認められない点、さらに抗原性が極めて低いと考えられる点で、濾過性病原体ではあるが既存の魚類ウイルスとは大きく性質の異なるものであると推察される。

## 総合考察

口白症は、罹病魚脳磨砕濾液を健常魚に接種することにより再現されることから、濾過性病原体による感染症であることが明らかになっている (畑井ら, 1983; 井上ら, 1986)。和田ら (1985) は延髄の脳神経核の大型神経細胞の核内に形成された塊状物に隣接する部分に本症の病原体と考えられるウイルス様粒子を確認している。さらに、Inouye *et al*, (1992) は、本病原体が大きさ50nm以下で、有機溶剤および酸に感受性を有し、37℃では安定であるが50℃で失活することを、また Miyadai *et al*, (2004) は、本病原体の浮遊密度が1.096 g/cm<sup>3</sup>で、紫外線、タンパク質分解酵素およびプロピオラクトンに感受性であることを報告している。また、本病原体を分離するための細胞の樹立や探索が行われている (Inouye *et al*, 1992; 野沢・宮台, 1998; 宮台ら, 1998; 橋本・宮台, 2002; Hashimoto *et al*, 2006)

が、未だにウイルスの分離・大量培養には成功していない。本症に関する詳細は未だ明らかでなく、本病の診断法および防除対策も未だ確立されていない現状にある。そこで本研究では、口白症の診断法および防除対策を目的に、第1章では、長崎県下の口白症の発生状況を調査することにより養殖現場における口白症の診断基準を確認するとともに、口白症病原体の感染経路を推察し、第2章において、トラフグ近縁魚種ならびに長崎県下の養殖対象魚種計7魚種の口白症に対する感受性について検討した。さらに第3章では、口白症感染耐過トラフグ血清を用い、口白症病原体ならびに関連タンパク質 (kuchijirosho associated proteins, KAPs) の特定を試み、第4章では、KAPsを指標とした口白症診断あるいは感染履歴把握の可能性について検討し、さらには口白症トラフグ脳磨砕濾液を用いたホルマリン不活化ワクチンの可能性について検討した。

本症の症状について、口吻部の発赤・黒色化・潰瘍・糜爛などが特徴であるとの報告がある (畑井ら, 1983; 中内ら, 1985)。しかし、宮台 (2001) は、刺激に対して過剰に反応し、狂奔遊泳や噛み付きなどの行動を示し、腹部を膨らませて容易に元の状態に戻らないのが本症の特徴であり、口吻部の症状は強度の口ぐされを示す個体もあれば、このような症状をほとんど呈さない個体もあるとし、口白症の症状は変化してきたのではないかとの疑いが持たれる。そこで、長崎県下のトラフグ養殖業者に対して延べ63経営体との面談による聞き取り調査を実施した。その結果、現在トラフグ養殖業者が口白症と診断する基準は、従来から知られている外観症状(表1)を基としており、口白症の症状が変化してきたという事実はつかめなかった。また、ほとんどのトラフグ養殖業者が本症の診断を自分でおこなっていることから推論すると、口白症の症状が近年になって変化して来たのではなく、トラフグ養殖業者が本症の症状を熟知するようになり、本症に罹病したトラフグに完全に症状が出る前に、トラフグが異常行動を起こしはじめた早い時点で、処分するようになったために本症による被害が軽減したものと考え



られた。その結果、発症初期に処分する対策がトラフグ養殖業者の間に普及し定着したと考えられた。したがって、この時点で処分されたトラフグを観察しても口唇部の症状は明確に現われてはいないと考えられた。一方、トラフグは親魚や種苗生産者の違いによって、性質が凶暴になることがあり、本症の流行初期には口唇部の症状がはっきりするまでの口白症発生との区別が困難な場合もある。このように考えられると近年、口唇部の症状が認められない口白症があることに矛盾はない。

次に、トラフグ養殖の実態を把握することに重点を置いた聞き取り調査を実施した。本症の感染経路を明らかにするためには、トラフグ養殖の実態を詳しく把握することが重要である。本研究にとって幸いなことに、この調査の実施中に口白症を発症しているトラフグ養殖場が4カ所見つかった。ところで、日高ら(2001)はヒラメのVHSの感染源が生餌のイカナゴであることを確かめている。また、森ら(2006)は海産魚のウイルス性神経壊死症(VNN)が天然魚の生餌から感染する可能性を指摘している。本症の感染源についても生餌の可能性が考えられたが、トラフグ養殖における稚魚期の餌料はEPのみを使用するケースがほぼ半分を占め、今回の事例でも4業者の内3業者は本症が発症した時点では餌料としてEPを使用していた。これらのことから、本症の感染源が天然魚の生餌にある可能性は低いと考えられた。

塩満(1984)は、本症が噛み合いによる接触感染の可能性が強いと推定している。また、外菌(1994)は本症の予防法として歯の切除が効果的であると述べている。一方で94%のトラフグ養殖業者が少なくとも1回は歯を切除している(図5)。今田(1985)は、1回でも歯を切除することは噛み合い防止に関して有効であると報告している。今回の調査から本県のトラフグ養殖業者の間では、歯の切除は本症を予防する目的で広く実施されていると考えられた。しかし、2003年にホルマリンの使用禁止が徹底されたため、口白症のみならず、寄生虫性疾患、細菌性疾患など全ての疾患による被害が急増した(図15)。

ブリの連鎖球菌症を治療する場合に、ハダムシ(*Benedenia seriokas*)の治療を先に行った方が効果的であった事例が何例も確認されており(高見:未発表)、魚類の外部寄生虫が感染症のベクターとなったり、病原体の侵入門戸を開く可能性が推測される。井上(1987)は、本症発症魚の飼育排水から本症が感染することを実験的に証明している。このことから、トラフグに寄生するヘテロボツリウムやギロダクチルスなどの外部寄生虫による傷が口白症病原体の侵入門戸となり、そこから口白症病原体が侵入して感染し、本症が流行する可能性が考えられた。したがって、今回のホルマリン禁止が徹底された後、口白症の被害が大きくなった事例から、歯の切除が口白症の予防に繋がってはならず、ホルマリンによる外部寄生虫の駆除が口白症の予防として有効であったと考えられた。いずれにしろ、本症はトラフグ養殖場内で水平感染しており、これに外部寄生虫が関与している可能性が考えられた。

次に、本症の発症時期に関して、4カ所の事例について検討したが、いずれも本症が前年にも発生し、再発した事例であり、本症に対してトラフグは免疫を獲得できないことを示唆するものと考えられた。従って、一見本症に罹病したトラフグはキャリアとなり、本症の感染源となり得ると考えられた。

本症の感染源として、餌の可能性が否定され得ること、トラフグ養殖場内では外部寄生虫が関与している水平感染が起きていること、本症発症魚がキャリアとなることなどから、トラフグ養殖場での本症の感染経路については、本症の感染耐過魚が感染源となり、外部寄生虫が関与して水平感染を助長していることが考えられた。

ところで、長崎県下のトラフグ養殖場では、生簀の周囲でクサフグ、ヒガンフグ、ハコフグ等の遊泳が見られる。また、トラフグの養殖場がブリ、マダイ、イシダイ等の養殖場と隣接していることから、これらの魚種の口白症に対する感受性を把握することは、本症感染耐過トラフグが感染源となる可能性が示唆されたことから、口白症の防疫対策上きわめて重要である。そこで、クサフグ、ヒガンフグ、ハ

コフグに加えイシダイ、マダイおよびメジナの口白症感受性について検討したところ、供試トラフグ近縁3魚種のみならずブリも発症・死亡した(表8)。Miyadai *et al.*, (2001) はトラフグ以外にクサフグ、コモンフグおよびヒガンフグが口白症に感受性があることを報告しているが、ハコフグおよびブリが新たに口白症に対し感受性であることが明らかになった。ブリは長崎県下の重要養殖対象魚種の一つであり、ブリが口白症に対し感受性を示したことは、トラフグ口白症の防疫対策上極めて重要な課題となった。そこで、サイズの異なるブリを用いた口白症感受性試験を行ったところ(図17)、大型ブリでは60%の累積死亡が認められた(図17-A)。しかし、これらの死亡魚には、口吻部のびらん、潰瘍、狂奔など口白症に特有の症状を含め、共通した症状は認められなかった。一方、小型ブリでは、累積死亡率が100%に達し、死亡魚には、痙攣および脊柱の湾曲が共通して認められ(図18-A)、一部の死亡魚で口吻部にびらんも認められた。しかし、ブリの症状はトラフグで認められる口白症の症状とは明らかに異なっていた。なお、剖検では死亡魚の脊柱に損傷は認められず、脊柱の湾曲は筋肉の痙攣に起因すると考えられた。人為感染実験で死亡した大型ブリに特徴的な症状が認められなかったため、人為感染死亡ブリの脳磨砕濾液を調製し、小型ブリに接種したところ、脊柱の湾曲および痙攣を伴う死亡が認められ、累積死亡は88%以上に達したことから(図17-C)、大型ブリの死亡も口白症病原体による感染に起因することが明らかになった。なお、大型ブリ死亡魚の脳組織における病原体量は、 $10^{2.5}LD_{50}/g$ と算出され、トラフグ脳組織内の病原体存在量( $10^5 LD_{50}/g$ )に比べ大幅に少なかった。これは、大型ブリの口白症病原体に対する増殖許容性がトラフグに比べ低いことを示唆する結果である。

次に、口白症の診断法の確立を目的に、口白症感染耐過トラフグの血清を用い、口白症トラフグ組織より本症病原体あるいは関連タンパク質の検出を試みた。口白症感染耐過トラフグの血清を用いた免疫染色において、分子量100~120kのタンパク質が供

試した全ての個体の脳組織から検出された(図22-B)。また、同タンパク質は、健常魚の血清を用いた免疫染色では検出されないことから(図22-C)、感染耐過魚の血清により検出された分子量100~120kのタンパク質は、口白症関連タンパク質(kuchijirosho associated proteins, KAPs)である可能性が示唆された。口白症病原体は脳のみならず腎臓あるいは脾臓にも存在したが(表7)、KAPsは脳組織のみから検出された(図23)。KAPsは脳組織磨砕液超遠心分離分画が上清分画からも検出されたが(図24)、沈殿分画に強い病原性が認められたこと(図25)、KAPsの分子量が一般的なウイルスの構造タンパク質としては大きすぎること、SDS-PAGEによる染色性から推察されるKAPsの脳組織内存在量は1~10mg/g tissue以下と、発症魚の患部組織中に存在する感染体の量としては極めて少ないこと、さらに検体間でKAPsの分子量に差異が認められること(図22-B)から、KAPsは口白症病原体ではなく、口白症関連タンパク質であると考えられた。興味深いことに、KAPsは感染耐過魚の血清を用いた免疫染色で健常魚の脳組織からも検出され、さらに健常魚と発症魚の脳組織中におけるKAPs量に大きな差異は認められなかった(図22, 10-11レーン, 図23, 3-4レーン)。これらのことから、KAPsは魚体内で新たに合成されたタンパク質ではなく、脳組織内に元々存在するタンパク質の抗原性が口白症病原体の何らかの作用により部分的に変化することによって、元々存在するタンパク質がKAPsとして新たに抗原認識されるようになったものではないかと考える(図27)。先に示した如く、ブリが口白症に感受性があることが明らかになった。また、Miyadai *et al.*, (2001) はマダイも本症に感受性があることを報告している。そこで、ブリおよびマダイの脳組織からKAPsの検出を試みたところ、分子量100~120kのKAPsが検出された(図26)。トラフグのKAPsは感染耐過魚のみならず健常魚の脳組織にも存在し、その大きさはブリおよびマダイのKAPsにおいても同様であった(図26)。これは、KAPsが口白症病原体に感受性を有する魚種に共通

するタンパク質である可能性を示唆するものである。

次に、KAPs に対する抗体の有無により口白症診断あるいは感染履歴の把握が可能ではないかと考え、口白症感染耐過魚、健常魚ならびに発症歴不明トラフグの脳組織およびそれぞれの血清を用い、KAPs の検出を試みた。その結果、供試した感染耐過魚の血清全てが KAPs を認識しており、逆に供試健常魚の血清は何れも KAPs とは反応しなかった。さらに、発症歴不明トラフグ血清と脳組織内 KAPs との反応性について検討したところ、長崎県下トラフグ血清 2 ロットが KAPs 反応陽性であり、逆に佐賀県下のトラフグ血清は KAPs 反応陰性となった (表10)。したがって、口白症感染耐過魚と健常魚の血清と KAPs との反応性により、少なくとも口白症の感染履歴の把握が可能であることが示された。

従って、KAPs をプロットしたタンザクスリットを準備し、トラフグから採血を行い、血清を分離して KAPs との反応性を見ることで、トラフグを生かしたまま養殖現場で口白症の診断ができると考える。但し、口白症に感染したトラフグの脳内に何時 KAPs が誘導されるか、その時期についてはまだ明らかになっていないため更なる検討が必要であると考える。

口白症に対する積極的な防除対策の一つとして、本研究ではホルマリン不活化ワクチン開発の可能性についても検討した。まず、ホルマリン12h および 7d 処理病原体液をトラフグに接種したところ、何れも接種区でも 79% 以上の累積死亡が認められ (図 28)、口白症病原体が 0.3%ホルマリンで 7日間処理しても完全には不活化されないことが明らかになった。口白症は、水温が 25℃以上で高率に発症するが (井上ら, 1986)、第 1 章の結果から水温 20℃以下ではほとんど発症しないことが経験的に知られている。そこで、トラフグの飼育水温を通常の感染試験より約 5℃下げ 18~20℃とし、7d 処理液を接種したところ、予想通り 7d 処理病原体液接種群での発症死亡は全く認められなかった (図28)。そこで、これら 7d 処理病原体液を接種した生残魚を口白症病原体液による攻撃試験に供したが、攻撃病原体量に

関わらず、攻撃後10日以内に全てが死亡した (図29)。本実験でのホルマリン処理病原体の接種量は、 $10^{3.7}$  LD<sub>50</sub>/0.1mL/尾で、既知魚類病原ウイルスにおけるホルマリン不活化ワクチンと比べても十分量が接種されていたと考えられる。また攻撃量も  $10^{2.0}$  LD<sub>50</sub>/0.2mL/尾であり、既知魚類病原ウイルスの感染実験で一般的に用いられる攻撃量と比べ、むしろ低濃度な条件であったにもかかわらず、ホルマリン処理病原体による防御効果が全く認められなかったことから、本ホルマリン処理病原体液接種による口白症に対する予防免疫の誘導は困難であると考えられた。河原ら (2004) は本症発症トラフグの磨砕ろ液をホルマリン処理することで本症の感染防御効果があるとしているが、本研究においては、トラフグ養殖場において一旦発症した本症が低水温期に治まり水温上昇と共に再発することが、ホルマリン処理病原体による防御効果が認められなかった。

最後に、本研究により口白症の病原体に関する新たな知見が幾つか見えてきたと考える。まず、口白症病原体が 0.3%ホルマリンで 7日間処理しても完全には不活化されなかったことである。既知の魚類病原ウイルスの中でもホルマリン処理に比較的抵抗性の高い伝染性脳臓壊死症ウイルス (IPNV) ですら、同濃度ホルマリンで 1日処理すれば十分不活化されることから、口白症病原体が既知の魚類病原ウイルスに比べ、強いホルマリン耐性を有すると考えられた。Miyadai *et al.*, (2004) は、本症病原体の浮遊密度が 1.096 g/cm<sup>3</sup> と報告しているが、本実験でも超遠心沈殿分画に強い病原性が認められた (図25)。しかしながら、感染耐過魚の血清は脳組織内の KAPs を認識していたが、口白症病原体が含まれる超遠心分離沈殿分画中のタンパク質は全く認識していなかった。このことから、口白症病原体がウイルス粒子程度の密度を有するが、その抗原性は極めて低いものであるという重要な知見が得られた。口白症病原体の抗原性が低いとすれば、罹病魚血中に病原体に対する抗体が誘導されづらいことは容易に推察でき、トラフグ養殖場で本症が再発する事例が複数あることや、ホルマリン処理した病原体の予防効

果が全く認められなかったことが十分に理解できる。口白症病原体のこれから新しい性状を既知の性状と考え合わせると、口白症病原体は濾過性病原体ではあるが、既存の魚類ウイルスとは大きく性質の異なるものであり、今後の研究展開において、濾過性病原体と知られるプリオンあるいはウイロイド等の特徴まで視野に入れた比較・検討が必要かもしれない。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご指導、ご助言を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院教授古水 守博士、同教授田島研一博士、同助教授 西澤豊彦博士および独立行政法人水産総合研究センター西海区水産研究所 所長 井上 潔博士に謹んで深謝の意を表します。

本研究に際し、血清タンパクの濃縮・精製のご指導を戴きました長崎大学水産学部教授 金井欣也博士ならびに本論文の校閲を賜りました北海道大学大学院水産科学研究院助手笠井久会博士に厚くお礼申し上げます。

実験上のご援助を賜りました独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所 上浦栽培技術開発センター古満目分場主任研究員渡辺研一博士、近畿大学水産研究所助手石丸克也博士ならびに北海道大学大学院水産科学院粉川愉記氏にはその御厚意にたいし深謝の意を表します。

調査を進めるにあたり労を惜しまずご協力を頂いた県下の関係漁業協同組合および県下の水産業普及指導センターの職員の皆様、供試魚を提供していただいた長崎県漁業公社および株式会社萬坊の皆様に心から厚くお礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂くと共に終始ご指導を下された長崎県総合水産試験場 濱口博彦 場長、同小坂安廣 前場長、同環境養殖技術開発センター

安元進 所長、同養殖技術科 高田純司 科長、研究を進めるにあたりご協力を頂いた横山文彦主任研究員、現科学技術振興局 塚原淳一郎 課長補佐、現対馬水産業普及指導センター 杉原志貴 主任技師に深く感謝いたします。

海洋生物防疫学領域研究室の皆様には、遠いところからの連絡や問い合わせに快く対応していただきました。心から感謝いたします。

## 引用文献

- 藤田矢郎 (1962) : 日本産主要フグ類の生活史と養殖に関する研究. 長崎県水産試験場論文集 第2集, 121p.
- 藤田矢郎 (1988) : 日本近海のフグ類 (日本水産資源保護協会). 水産研究叢書, 39 : 138p.
- 藤田矢郎・上野雅正 (1956) : トラフグの卵発生と仔魚前期. 九州大学農学部学芸雑誌, 15 : 519-524.
- 古川厚・岡本亮 (1966) : フグの養殖 (日本水産資源保護協会). 水産増養殖叢書, 13 : 75p.
- 橋本恵美・宮台俊明 (2002) : トラフグ口白症ウイルスの SSN-1 細胞感受性試験ならびに血管造影剤を用いた密度勾配遠心分離. 平成14年度日本魚病学会大会プログラムおよび講演要旨, p34.
- Hashimoto, E., T. Miyadai (2006) : Proliferation of kuchijirosho causative agent in fugu-derived cell line. Abstract In "VNN 2006, the first international symposium on viral nervous necrosis of fish", p.50.
- 畑井喜司雄・安永統男・安元 進 (1983) : 養殖トラフグの不明病. 長崎県水産試験場研究報告. 9 : 59-61.
- 日高悦久・福田穰・朝井隆元 (2001) : ヒラメのウイルス性出血性敗血症 (VHS) に関する研究. 魚病対策技術開発研究成果報告書, 2001 ; 93-97.
- 今田良造 (1985) : 歯切除がトラフグ養成に及ぼす

- 効果－Ⅱ．昭和58年度福井県水産試験場事業報告書，82－88.
- 井上 潔・安元 進・塚原淳一郎（1985）：養殖トラフグの口白症（仮称）について．昭和59年度魚病対策技術開発研究成果報告書（第2分冊）新しい養殖魚種の病害に関する研究，16－17.
- 井上 潔・安元 進・安永統男・高見生雄（1986）：養殖トラフグ口白症の病原体分離と復元実験．魚病研究，21；129－130.
- 井上 潔・塚原淳一郎・吉越一馬（1987）：養殖トラフグの“口白症”に関する研究．昭和61年度魚病対策技術開発研究成果報告書（第2分冊）新しい養殖魚種の病害に関する研究，18p.
- Inouye, K., K. Yoshikoshi and I. Takami (1992): Isolation of causative virus from cultured tiger puffer (*Takifugu rubripes*) affected by kuchijirosho (snout ulcer disease). *Fish Pathol.*, 27: 97-102.
- 石井日出郎（1989）：ギロダクチルス駆除法の検討．栃木県水産試験場業務報告書，34：51－53.
- 河原栄二郎・福岡利広・北吉直子・楠田理一（2004）：トラフグ口白症に対するホルマリン不活化病魚磨砕ろ液の感染防御効果．平成16年度日本魚病学会大会プログラムおよび講演要旨，p.37.
- Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 227: 680-685.
- 宮台俊明・有門延道・野沢直樹・北村真一（1998）：トラフグ中枢神経細胞初代培養からの口白症ウイルスの分離．平成10年度日本魚病学会大会プログラムおよび講演要旨，秋季，p.3.
- 宮台俊明（2001）：トラフグの口白症．養殖，38（11）：21－22.
- Miyadai, T. , S. Kitamura, H. Uwaoku and D. Tahara (2001): Experimental infection of several fish species with the causative agent of kuchijirosho (snout ulcer disease) derived from the tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Dis. Aquat. Org.*, 47: 193-199.
- Miyadai, T., E. Hashimoto, K. Hashimoto, T. Watari, M. Ohtani and D. Tahara (2004): Partial purification of kuchijirosho causative agent by sodium iotalamate density gradient centrifugation. *Fish Pathol.*, 39:213-214.
- 森広一郎・虫明敬一（2006）：栽培漁業技術開発の最前線－Ⅰ 親魚管理による種苗期疾病の防除．日本水産学会誌，72：246－249.
- 中内良介・宮崎照雄・塩満捷夫（1985）：トラフグの口白症の病理組織学的研究．魚病研究，20：475－479.
- Nishizawa, T., M. Yoshimizu and T. Kimura (1991): Buoyant density of hirame rhabdovirus (HRV) in cesium chloride and sucrose. *Fish Pathol.*, 26: 47-48.
- 野沢直樹・宮台俊明（1998）：トラフグ脳細胞の培養法の検討とMTTassayによる口白症ウイルスの定量．平成10年度日本水産学会大会講演要旨集，春季，p.207.
- 塩満捷夫（1984）：養殖トラフグの口白症（仮称），養殖，21（10）：72－73.
- 外園博人（1994）：魚種別重要疾病の予防と治療トラフグ，養殖，31（2）：166－168.
- 社団法人日本水産資源保護協会（1993）：トラフグの魚病．魚類防疫技術書シリーズXI，p.53.
- 高見生雄・井上 潔（1991）：罹病魚取り上げによる被害軽減対策．海産魚の防疫事例集，148－150. 高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水守（2007 a）：口白症感染耐過トラフグ血清を用いた口白症関連タンパク質の検出．魚病研究，42：印刷中.
- 高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水 守（2007 b）：口白症トラフグ脳磨砕濾液を用いた人為感染試験によるブリでの発症．魚病研究，42：印刷中.
- 高見生雄・西澤豊彦・吉水 守（2007 c）：トラフグ口白症原因体のホルマリンに対する感受性．魚病研究，42：印刷中.
- 立石 健（1986）：トラフグに関する既往の知見の概要（種苗生産技術，養殖技術）．昭和60年度

トラフグ放流技術開発事業報告, 56-66.

Towbin, H. , T. Stasholin and J. Gordon (1979):

Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 4350-4354.

津田平蔵・青木秀夫・田中真二 (1994) :不明病の研究 海産魚の白点病に関する研究. 平成5年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 137-144.

和田新平・藤巻由紀夫・畑井喜司雄・窪田三朗・磯田政恵 (1985) : 養殖トラフグの“口白症”自然発生例の病理組織学的所見. 魚病研究, 20: 495-500.

Yoshinaga, T. , M. Yasuzaki and K. Ogawa (2006): Fate of oncomiracidia of *Heterobothrium okamotoi* (Monogenea) Attaching to the body surface of tiger puffer *Takifugu rubripes*. *Fish Pathol.*, 41: 113-115.