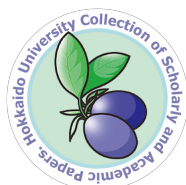




HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Rhabdovirus olivaceus (HRV) 人工感染に及ぼす水温の影響
Author(s)	大迫, 典久; 吉水, 守; 木村, 喬久
Citation	魚病研究, 23(2), 125-132
Issue Date	1988-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38327
Type	journal article
File Information	yoshimizu-63.pdf



Rhabdovirus olivaceus (HRV) 人工感染に及ぼす水温の影響

大迫典久^{*1}・吉水 守^{*1}・木村喬久^{*1}

(1987 年 12 月 25 日受付)

Effect of Water Temperature on Artificial Infection of *Rhabdovirus olivaceus* (hirame rhabdovirus: HRV) to Hirame (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*)

Norihisa OSEKO^{*1}, Mamoru YOSHIMIZU^{*1} and Takahisa KIMURA^{*1}

^{*1}Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato 3-1-1, Hakodate, Hokkaido 041, Japan

(Received December 25, 1987)

Hirame (Japanese flounder; *Paralichthys olivaceus*) which had been artificially infected (I. P. injection, $10^{5.30}$ TCID₅₀/fish) with *Rhabdovirus olivaceus* (hirame rhabdovirus; HRV) were reared at 5, 10, 15 and 20°C, and the cumulative mortality was observed. Moribund fish were employed for histopathological and hematological study.

Cumulative mortality of test groups reared at 5, 10, 15 and 20°C were 40, 60, 20, and 0%, respectively. Moribund fish showed typical signs of HRV infection. The highest virus titer was obtained from the fish of the 5°C test group, followed by the 10°C test group.

Histopathologically, the kidney of all fish reared at 5°C and moribund fish reared at 10°C indicated necrotic changes and hemorrhage in the hematopoietic tissue. Necrosis was most severe in the 5°C test group. The spleen of the 5°C test group showed necrosis and hemorrhage in the pulp. Similar necrosis was also observed in the spleen of the 10°C test group, but was less severe. Infiltration of macrophages into the spleen of the 15°C test group, and hyperplasia of meranomacrophage in the tissue of the 15 and 20°C test group were noted.

Hematologically, the antibody neutralizing activity against HRV of the sera was generally not very high, but the activity was comparatively higher in high water temperature test groups than that of low temperature groups. The increase of immature erythrocytes at 5°C, small lymphocyte-like cells at 10 and 15°C, neutrophils at 15°C and lymphocyte-like cells at 20°C were observed in the blood smears.

Rhabdovirus olivaceus (hirame rhabdovirus; HRV) は 1984 年に養殖ヒラメ病魚から分離されたラブドウウイルスであるが (五利江ら, 1985), その後各地のヒラメやアユ, クロダイ, メバル等からも分離され, 人工感染試験ではヒラメ, マダイ, クロダイ^{*1}をはじめサケ科魚類のノジマスにも強い病原性を有することが明かとなった

た (五利江ら, 1986; KIMURA *et al.*, 1986; 吉水ら, 1987)。各地のヒラメの発症水温は兵庫県下の 2 例の場合 6~18°C, 北海道の場合は 2~12°C, また香川県下の例でも 8~16°C でいずれも水温が 15°C 前後まで上昇すると自然終息する傾向がみられている。また人工感染実験でも 15°C 飼育群には死亡がみられず (五利江・中本, 1986), HRV 感染発症に水温が大きな影響を与えていることが推察されている。

本報ではヒラメを対象に HRV を人工的に感染させ, HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を累積死亡率および発症魚の病理組織の面から観察したので報告する。

^{*1} 北海道大学水産学部微生物学講座
(Correspondence: Professor T. KIMURA, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan.)

^{*2} 反町, 私信

実験方法と材料

供試魚

1985年11月にヒラメ1年魚(平均体重44.3g)50尾を北海道泊町の養殖場から北海道大学水産学部内の実験水槽中に設けた飼育水槽に移し、1群10尾の5群に分け、水温を5, 10, 15, 20°Cとして飼育した。対照群は10°Cとし、いずれも一週間予備飼育後実験に供した。飼育装置は循環水方式とし、50lの飼育水槽の上面に濾過装置を設置した。水温の調節はヒーターとクーラーを併用して、各温度とも $\pm 1^\circ\text{C}$ になるように設定した。

供試ウイルス

供試ウイルスとしては HRV 8401-H 株を用い、RTG-2 細胞で培養後バイアルチューブに分注し、実験に供すまで -80°C に保存した。なお細胞の培養には 10% 牛胎児血清 (Gibco), ペニシリン 100 I.U./ml, ストレプトマイシン 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加イーグルの MEM (Minimum Essential Medium; Gibco) (以降 MEM₁₀ と称す) を使用した。保存したウイルスの感染価は $10^{6.30}$ TCID₅₀/ml であった。

人工感染実験法

人工感染実験は腹腔内接種法によった。MS-222 (tricaine methane sulphonate; Sigma) 1:5000 で麻酔後、腹部を消毒し、あらかじめ調製してあったウイルス液を 0.1 ml 腹腔内に接種し ($10^{6.30}$ TCID₅₀/尾), 15 日間経過を観察した。対照群は MEM₁₀ で同様の処理を行った。

細菌およびウイルス検査法

供試魚を無菌的に開腹した後、腎臓組織を一白金耳量 2% NaCl 加 TSA (trypticase soy agar; Difco) 培地に接種し、25°C で 1 週間培養し細菌感染の有無を観察した。次いで腎臓、脾臓を摘出し、10 倍量の Hanks' BSS balanced salt solution (Hanks'; Gibco) を加えストマッカー (Colworth-Type 80) を用いてホモジナイズし、ミリポアフィルター HA (0.45 μm) で濾過し、ウイルス検査試料とした。ウイルス感染価は、RTG-2 細胞を用いた常法の 96 穴マイクロプレート 4 穴法により、測定した。分離ウイルスの同定は、HRV 8401-H に対する家兎抗血清による中和試験によった。

病理組織標本の作成法

各試験群の瀕死魚、観察終了時の生残魚の腎臓および脾臓を摘出し、前報 (大迫ら, 1988) と同様の方法によりパラフィン切片を作成し、ヘマトキシレン・エオシン染色を施した。

血中中和抗体価の測定法

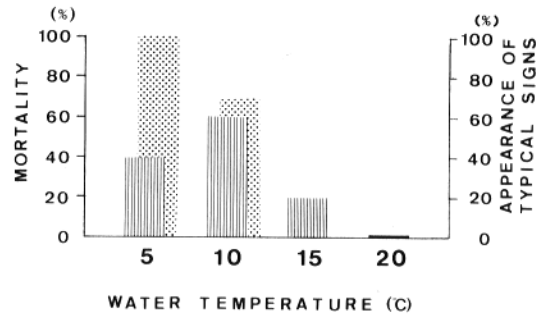


Fig. 1. Effect of the water temperature on cumulative mortality and appearance of the typical signs on the hiram after 15 days artificially infected with HRV; dose, I. P. $10^{5.30}$ TCID₅₀/fish.

■: Dead fish. □: Fish showing the typical sign.

供試魚血清の倍々希釈液列を Hanks' BSS で作成し、96 穴マイクロタイタープレートに 0.05 ml 宛 1 希釈につき 4 穴に分注後、100 TCID₅₀/0.05 ml/穴に調製した HRV を加え、15°C で 60 分間反応させた。対照には、血清のかわりに Hanks' BSS を 0.05 ml 加え混合した。次いで MEM₁₀-Tris で $2.0 \times 10^6/\text{ml}$ に調製した RTG-2 細胞を各穴に 0.1 ml ずつ分注し、15°C で 10 日間培養し、常法により ND₅₀ を求めた。

血球染色

血液約 50 μl をスライドガラスに広げて風乾し血球の薄層塗抹標本を作成した。次ぎにこの標本にメイ・グリュンワールドギムザ染色を施した。

結 果

累積死亡率

HRV 腹腔内接種 15 日目の各水温における供試魚の累積死亡率を Fig. 1 に示した。なお、病理組織作成の為に取り上げた瀕死魚も死亡尾数に含めた。5°C 試験群は、他の試験群と比較し当初から動作が緩慢で、発症による遊泳動作の変化等の観察が困難であった。10 日目ごろに発症が観察され 11 日目に 3 尾が死亡した。さらに 13 日目に 1 尾が死亡し、累積死亡率は 40% に達した。生残魚にも発症がみられ、観察終了時の累積死亡率は変わらなかったものの残りの個体全てにも筋肉内出血、体色黒化、生殖腺の発赤、腹水貯留などの著しい症状が観察された。10°C 試験群では 4~5 日目に発症が認められ、背側、腹側の体側筋中に出血のある個体が観察された (Fig. 2)。発症個体は、体色が黒化し、動作が緩

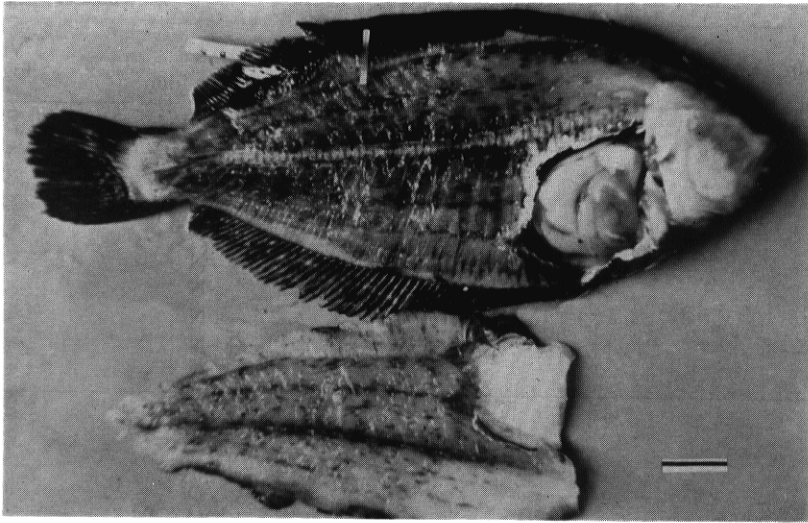


Fig. 2. Diseased hiram of test group reared at 10°C, showing hemorrhage of skeletal muscle, accumulation of ascitic fluid and congestion of gonad. (bar=10 mm)

慢となり、水底に静止したり水面近くをフラフラ遊泳するといった異常遊泳が観察された。6 日目に 1 尾, 8 日目に 3 尾さらに 10 日目に 2 尾死亡し累積死亡率は 60% に達した。実験最終日に生残した 1 尾にも発症がみられた。

15°C 試験群では 5 日目に 1 尾さらに 13 日目に 1 尾が死亡し、累積死亡率は 20% となったが、いずれの個体にも症状は認められなかった。20°C 試験群では、観察期間を通じ、いずれの個体にも変化はみられなかった。

魚体内ウイルス量

供試魚の魚体内ウイルス量の測定結果を Table 1 に示した。5°C 試験群では死亡魚、瀕死魚、生残魚のいずれにおいても $10^{7.30} \sim 10^{8.80}$ TCID₅₀/g 以上と極めて高い値を示した。このうち死亡魚は $10^{7.30} \sim 10^{8.80}$ TCID₅₀/g, 瀕死魚で $10^{7.30} \sim 10^{8.80}$ TCID₅₀/g 以上、さらに生残魚でも $10^{8.05} \sim 10^{8.80}$ TCID₅₀/g 以上であり、死亡魚、瀕死魚、生残魚いずれも魚体内ウイルス量に大差はみとめられなかった。15°C, 20°C 試験群ではウイルスは分離されなかった。10°C 試験群では瀕死魚の場合 $10^{5.80}$ TCID₅₀/g, 死亡魚では $10^{6.05} \sim 10^{7.80}$ TCID₅₀/g と高い値を示したが、生残魚では発症した個体で $10^{5.30}$ TCID₅₀/g であったのに対し、無症状の個体からはウイルスは分離されなかった。5°C 試験群および 10°C 試験群の各 1 尾の腎臓より分離したウイルスを対象に、抗 HRV 家兎血清により中和試験を行ったが、供試した 2 株および

HRV 8401H はいずれも中和され、分離ウイルスが HRV であることが確認された。

細菌検査

TSA 培地を用いた細菌検査の結果、対照群, 5, 10, 15, 20°C 試験群いずれの腎臓からも細菌は分離されなかった。

病理組織学的検討結果

腎臓

5°C 試験群の発症魚の腎臓の病理組織像を Fig. 3 に示した。HRV 感染症の特徴である造血組織各所での血管の充出血や細網細胞の核濃縮を伴う壊死が瀕死魚、生残魚全てに観察され、静脈周囲の組織に著しい核濃縮のみられる個体も存在した。瀕死魚では腎臓の造血組織全域にわたり明らかな核の膨化が引き起こされていた。

10°C 群の瀕死魚の腎臓の病理組織像を Fig. 4 に示した。10°C 試験群の瀕死魚は、5°C 試験群に比べ壊死部が小規模であり、血管の充血も比較的少なく、組織全体におよぶ壊死は認められなかった。ウイルスが分離され軽度の症状が認められた個体では組織内に若干の出血がみられるものの造血組織に変化は認められなかった。生残魚のうち発症が認められずウイルスも分離されなかった個体では、対照群と比較しても特異的な病変は観察されなかった。

15°C, 20°C 試験群では、対照群と比較して変化は認められなかった。なお、20°C 試験群では全個体に黒色大食細胞の増加が観察された (Fig. 5)。

Table 1. Results of virus reisolation from HRV injected hirame

Exp. group	Water temp. (°C)	Fish		Virus titer log TCID ₅₀ /g
		No.	Condition	
Control	10	1	N* ¹	<1.80
		2	N	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80
		6	N	<1.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	N	<1.80
Test	5	1	D* ²	≥8.80
		2	M* ³	≥8.80
		3	M	7.30
		4	D	7.30
		5	S* ⁴	≥8.80
		6	S	8.30
		7	S	8.05
		8	S	≥8.80
		9	S	≥8.80
		10	S	8.30
Test	10	1	D	7.05
		2	D	6.80
		3	D	7.80
		4	M	5.80
		5	D	6.05
		6	M	5.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	S	5.30
Test	15	1	D	<1.80
		2	D	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80
		6	N	<1.80
		7	N	<1.80
		8	N	<1.80
		9	N	<1.80
		10	N	<1.80
Test	20	1	N	<1.80
		2	N	<1.80
		3	N	<1.80
		4	N	<1.80
		5	N	<1.80

*¹ N: Normal fish. *² D: Dead fish. *³ M: Moribund fish. *⁴ S: Diseased fish (survived).

Table 2. Neutralizing antibody titres in HRV injected hiramе sera

Exp. group	Water temp. (°C)	Fish No.*1	Neutralizing antibody titer*2
Control	10	6	<1: 8
		7	<1: 8
		8	<1: 8
		9	<1: 8
		10	<1: 8
Test	5	8	1: 16
		9	1: 23
		10	1: 10
Test	10	7	1: 45
		8	1: 45
		9	<1: 8
		10	1: 32
Test	15	5	1: 14
		6	1: 45
		7	1: 45
		8	<1: 16
		9	1: 38
Test	20	1	1: 32
		2	1: 91
		3	1: 45
		4	1: 45
		5	<1: 16

*1 See Table 1.

*2 ND₅₀ vs 10^{2.00} TCID₅₀/well

脾 臓

5°C 試験群の瀕死魚の脾臓の病理組織像を Fig. 6 に示した。脾臓にも著しい出血像が観察され血海を呈していた。特に脾髄細胞では核濃縮、核崩壊を伴う壊死巣が形成され、さらに出血部位の辺縁部では水腫、繊維素の沈着も認められた。また英動脈や英組織も壊死に陥り、核が消失し細胞膜が融解した変性細胞の小塊が脾髄組織中に散在した。また腎臓の造血組織と同様に核の膨潤が部分的に観察された。生残魚においても同様の所見が見られたが脾髄組織中の一部分に正常と考えられる組織を残している個体もみられた。

10°C 試験群の瀕死魚の脾臓では英動脈の血管壁の融解、脾髄組織の壊死が起こっているものの 5°C 試験群に比べさほど顕著ではなかった (Fig. 7)。生存魚のうち発症しなかった個体では血管壁の融解が若干見られたものの脾髄組織には顕著な変性は認められず、マクロファージの浸潤像が観察された (Fig. 8)。

15°C, 20°C 試験群では、対照群と比較して変化はみ

られなかったが、15°C, 20°C 試験群には前述の腎臓同様に黒色大食細胞の増加が観察された。

血中中和抗体価

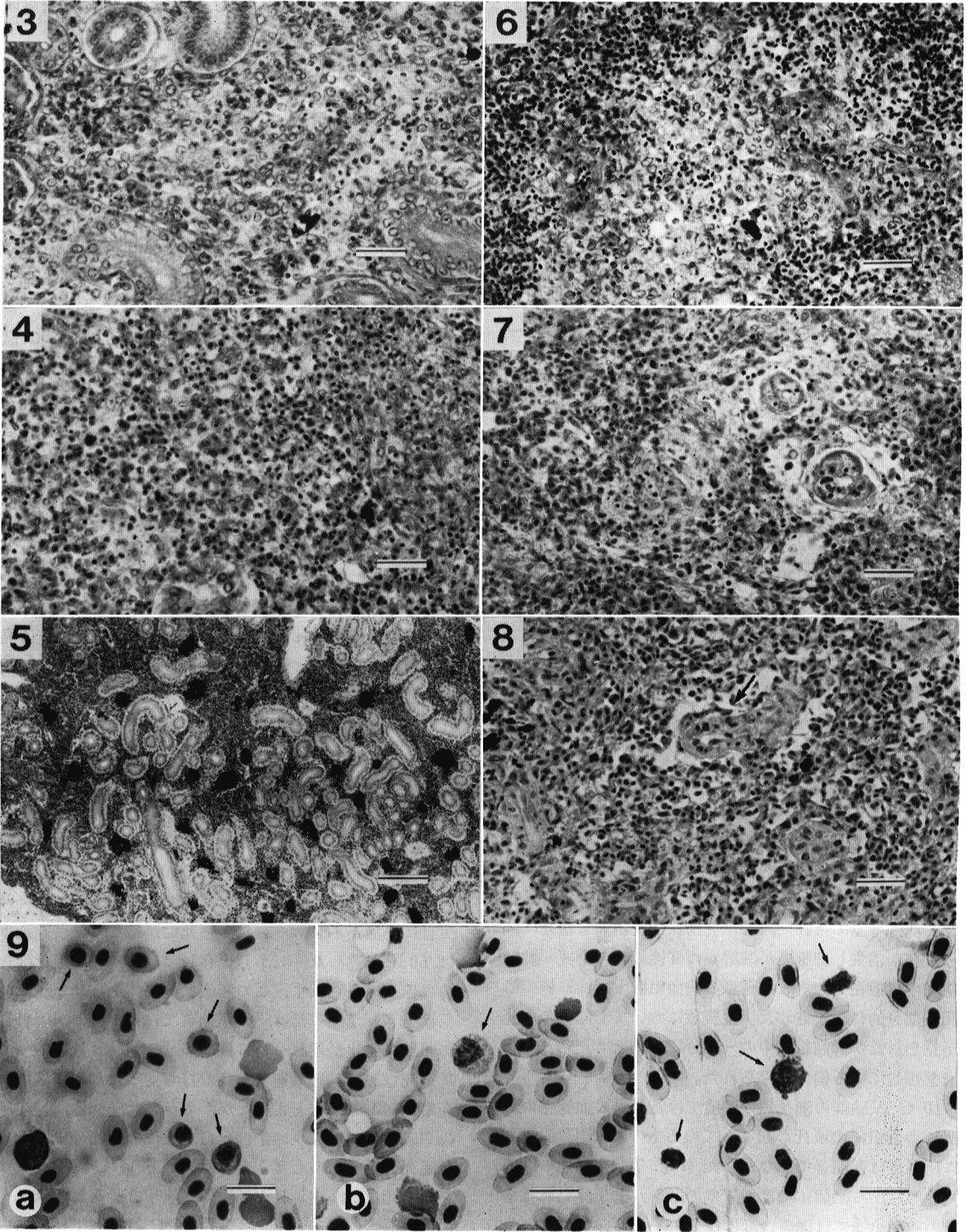
各試験群の観察終了時に測定した抗 HRV 血中中和抗体価 (ND₅₀) を Table 2 に示した。5°C 試験群の生残魚で 1:10~1:23, 10°C 試験群で 1 尾を除き 1:32~1:45, 15°C 試験群では 1:14~1:45, 20°C 試験群では 1 尾を除き 1:32~1:90 であり全般的にはさほど高い値は得られなかったが水温の高い試験群でより高い値を示す傾向が観察された。

血球塗抹標本の観察

血球塗抹標本の観察結果を Fig. 9 に示した。5°C 試験群では発症した生残魚を対象としたが幼若赤血球が他の群と比較し非常に高い割合で出現した (Fig. 9a)。この幼若赤血球の増加は 5°C 群の標本を作成した全個体に観察され、小型のリンパ球様細胞の相対量も比較的多かった。10°C 試験群の瀕死魚では小型のリンパ球様細胞、好中球が比較的多く (Fig. 9b), 発症魚では大型のリンパ球様細胞が多数出現していた。15°C 試験群でも 10°C 試験群同様に個体差はあるものの小型のリンパ球様細胞と好中球数が著しく増加する傾向を示したが、大型リンパ球様細胞は見られなかった。20°C 試験群では全く発症が認められなかったのにもかかわらず他の試験群に比しリンパ球様細胞 (Fig. 9c) の顕著な増量が認められ、好中球は全個体ともに若干の増量が観察された。

考 察

HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を HRV 人工感染ヒラメの累積死亡率および発症魚の病理組織像より観察した。HRV を腹腔内に接種し 5, 10, 15, 20°C と異なった水温下で飼育したところ、まず 10°C 試験群で 4~5 日目に発症がみられ 6 日目から死亡が始まり累積死亡率は 60% に達した。しかし生存した個体には 1 尾を除き特異症状は見られず、この無症状の個体からはウイルスも検出されなかった。5°C 試験群ではやや遅れ 10 日目になって症状が現れ 11 日目に 3 尾、13 日目にさらに 1 尾死亡した。観察を 15 日で打ち切ったために累積死亡率は 40% にとどまったが、生存した全個体に発症がみられ魚体内ウイルス量は死亡魚とほぼ同様の値を示し早晚死亡するものと考えられた。一方 15°C 試験群では 2 尾の死亡が観察されたが特異な症状は見られずウイルスも分離されなかった。さらに 20°C 試験群ではすべて症状も認められずウイルスはもちろん分離されなかった。なお、分離されたウイルスは HRV に対する家兎抗



血清により中和され接種ウイルスであることが確認された。

魚体内のウイルス量は 5°C 試験群の死亡魚および瀕死魚の場合 $10^{7.3}$ TCID₅₀/g 以上、生残魚の場合も $10^{8.05}$ TCID₅₀/g 以上と高い値を示したが、10°C 試験群の場合は死亡魚の場合でも $10^{6.05} \sim 10^{7.80}$ TCID₅₀/g 程度を示すにすぎなかった。HRV の *in vitro* での至適発育温度は 15°C~20°C であるのに反し、魚体内での 5°C での高い増殖および 10°C での速い増殖は、生体内での HRV の増殖を考えるうえで、免疫系の関与等多くの要因を考慮しなければならないことを示唆する結果であった。

事実、生残個体を対象に血中中和抗体価の測定を試みたが、各飼育群の血中中和抗体価は水温の高い方がより高い値を示す傾向が観察され、飼育温度の相違による免疫応答の差が上述の魚体内でのウイルスの感染増殖に関与している可能性が示唆された。

病理組織学的には対照群には何らの病変も観察されなかったが、5°C 群では、前報 (大迫ら; 1988) 同様 HRV 感染症の特徴である腎臓の造血組織各所での血管の充出血、細網細胞の核濃縮を伴う壊死、および脾臓での著しい出血や壊死が瀕死魚、生残魚全てに観察され、腎臓の静脈周囲の組織に著しい核濃縮のみられる個体も存在した。10°C 試験群の瀕死魚では 5°C 試験群に比べ壊死の程度は軽く、発症した生残魚ではその程度は瀕死魚よりさらに軽度であった。10°C 試験群の非発症魚、15°C 試験群、20°C 試験群では腎臓および脾臓組織に変化は認められなかった。また 10°C 試験群の生残個体に

は脾臓組織中にマクロファージの浸潤像が見られ、20°C 試験群の腎臓および 15, 20°C 試験群の脾臓に黒色大食細胞の増殖と考えられる像がみとめられた。さらに血球塗抹標本の観察で、5°C 試験群の個体に明らかな幼若赤血球の増加が観察されたのは、発病個体が体の各所に生じた出血や造血組織の壊死により極度の貧血に対応した補修作用であると考えられた。また小型のリンパ球様細胞が水温の高い群で顕著で、15°C 試験群の個体には好中球数が著しく多い個体も認められた。このように病理組織学的には、HRV 感染症はウイルスの増殖による腎臓、脾臓などの組織の破壊が主要な病変であることが明らかとなったが、この組織破壊の程度はリンパ系の細胞性免疫の働きによりある程度左右されているものと考えられ、飼育水温が高い場合、血中中和抗体の産生、マクロファージによる貪食さらに破壊された組織の再生等の活性が高まり発症および死亡にまで至らないのではないかと推察された。

以上 HRV に感染したヒラメの発症におよぼす水温の影響を観察したが、魚類ラブドウイルス IHNV と VHSV の人工感染試験における水温の影響について、AMEND (1970) は IHN の場合 12 および 16°C で飼育したベニサケは高い死亡率を示したが、10°C 以下では病状の進行が遅れ、また 18, 20°C と飼育水温が高くなるにつれ死亡率は減少すると報告している。一方 VHS に関しては、一般的に死亡を引き起こす水温の上限が 15°C 付近とされ (GHITTINO, 1965; CASTRIC and de KINKELIN, 1984), また JØRGENSEN (1982) はニジマスで

Fig. 3. Kidney of a moribund fish infected with HRV, reared at 5°C. Necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage are found in the interstitial lymphoid tissue. H & E stain. (bar=100 μ m)

Fig. 4. Kidney of a moribund fish infected with HRV, reared at 10°C. Necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage are recognized in the interstitial lymphoid tissue. H & E stain. (bar=100 μ m)

Fig. 5. Kidney of an asymptomatic fish infected with HRV, reared at 20°C. Hyperplasia of melanomacrophage is found in hematopoietic tissue. H & E stain. (bar=25 μ m)

Fig. 6. Spleen of a moribund fish infected with HRV, reared at 5°C. Necrosis of ellipsoid and hemorrhage are found in the tissue H & E stain. (bar=100 μ m)

Fig. 7. Spleen of a moribund fish infected with HRV, reared at 10°C, showing necrosis of pulp and degeneration of sheathed artery. H & E stain. (bar=100 μ m)

Fig. 8. Spleen of an asymptomatic fish infected with HRV, reared at 10°C, showing degeneration of blood vessel (arrow). H & E stain. (bar=100 μ m)

Fig. 9. Blood smears of HRV-infected hiramé reared at various water temperatures. (a): Many immature erythrocytes (arrows) are found among the mature erythrocytes at 5°C group. (b): Neutrophile (arrow) are found among the erythrocytes at 10°C group. (c): Many lymphocyte-like cells (arrows) are found among the erythrocytes at 20°C group. May-Giemsa stain. (bar=10 μ m)

用いた人工感染試験で、5~20°C の範囲では飼育水温が低いほど魚体内のウイルス残存期間が長くなり、かつ死亡個体からのウイルス分離率が高いとし、15, 20°C 飼育の個体からはウイルスは分離されなかったと報告している。前述の HRV 感染症に及ぼす水温の影響は VHSV の発病パターンに類似している。今後ニジマスを含めたサケ科魚類に対する HRV の病原性についても詳しく検討する必要があると考える。

要 約

HRV 感染発症に及ぼす水温の影響を HRV 人工感染ヒラメの累積死亡率および病理組織像より観察し、以下の如き結論を得た。

累積死亡率は、5, 10, 15, 20°C 試験群でそれぞれ 40, 60, 20, 0% を示し、発症個体には、体色黒化、緩慢な動作、異常遊泳、筋肉中の出血および充血、生殖腺の発赤、腹水貯留が観察された。魚体内ウイルス量は 5°C 試験群で最も高い値を示し、次いで 10°C 試験群の死亡魚であった。

病理組織学的には、5°C 試験群の瀕死魚、生残魚全てに腎臓の造血組織の充出血や壊死が観察され、10°C 試験群の瀕死魚の充出血や壊死の程度は 5°C 群に比べ軽度であった。20°C 試験群に黒色大食細胞の増加が観察された。一方脾臓では 5°C 試験群で出血や壊死巣が観察されたが、10°C 試験群での変化は軽度であった。マクロファージの浸潤像が 15°C 試験群で、黒色大食細胞と考えられる細胞の増加が 15°C, 20°C 試験群で観察された。

HRV に対する血中中和抗体価は、一般に低かったものの飼育水温の高い方がより高い値を示す傾向が観察され、5°C 試験群の発症魚血中に幼若赤血球が非常に高い割合で出現し、10, 15, 20°C 試験群ではリンパ球様細胞

の顕著な増量が認められた。

参 考 文 献

- AMEND, D. F. (1970): Control of infections hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. *J. Fish Res. Board Can.*, **27**, 265-270.
- CASTRIC, J. and P. de KINKELIN (1984): Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) to viral haemorrhagic septicemia. *Aquaculture*, **41**, 203-212.
- GHITTINO, P. (1965): Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in the rainbow trout in Italy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126** (Art. 1), 468-478.
- 五利江重昭・中本幸一 (1986): ヒラメより分離されたウイルスの病原性. 魚病研究, **21**, 177-180.
- 五利江重昭・中本幸一・片嶋一男 (1985): ヒラメの病害について—I: 海面小割養殖 ヒラメのウイルス感染に起因すると考えられる斃死. 兵庫県水試研報, **23**, 63-68.
- 五利江重昭・中本幸一・木村喬久 (1986): 1985 年兵庫県立水産試験場に発生したヒラメのウイルス病について. 兵庫県水試研報, **24**, 43-47.
- JØRGENSEN, P. E. V. (1982): Egtved virus: temperature-depenent immune response of trout to infection with low-virulence virus. *J. Fish Dis.*, **5**, 47-55.
- KIMURA, T., M. YOSHIMIZU, and S. GORIE (1986): A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Dis. Aquat. Org.*, **1**, 209-217.
- 大迫典久・吉水 守・五利江重昭・木村喬久 (1988): HRV (Hirame rhabdovirus; *Rhabdovirus olivaceus*) 感染ヒラメの病理組織学的検討. 魚病研究, **23**, 117-123.
- 吉水 守・西沢豊彦・大迫典久・木村喬久 (1987): ヒラメのラブドウイルス病. 魚病研究, **22**, 54-55.