



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	口白症トラフグ脳磨碎濾液を用いた人為感染試験によるブリでの発症
Author(s)	高見, 生雄; 粉川, 愉記; 西澤, 豊彦 他
Citation	魚病研究, 42(1), 35-39 https://doi.org/10.3147/jsfp.42.35
Issue Date	2007-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38374
Type	journal article
File Information	yoshimizu-263.pdf



口白症トラフグ脳磨碎濾液を用いた 人為感染試験によるブリでの発症

高見生雄^{1,2}・粉川愉記¹・西澤豊彦¹・吉水 守^{1*}

(2006年 8 月21日受付)

Induction of Kuchijirosho in Yellowtail by Injection with the Brain Homogenate of Affected Tiger Puffer

Ikuo Takami^{1,2}, Yuki Kokawa¹, Toyohiko Nishizawa¹ and Mamoru Yoshimizu^{1*}

¹Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate 041-8611, Japan

²Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Nagasaki 851-2213, Japan

(Received August 21, 2006)

ABSTRACT—The causative agent of kuchijirosho (snout ulcer disease), an infectious disease of tiger puffer *Takifugu rubripes*, is filterable, detailed characteristics of the agent have not been clear. Here, susceptibility of eight fish species against kuchijirosho was studied by injection with the kuchijirosho agent. A hundred percent mortality with typical signs of kuchijirosho was observed in tiger puffer, grass puffer *T. niphobles*, panther puffer *T. pardalis* and blue-spotted boxfish *Ostracion immaculatus*, while no mortality occurred in Japanese parrotfish *Oplegnathus fasciatus*, largescale blackfish *Girella punctata* and red seabream *Pagrus major*. Moreover, yellowtail *Seriola quinqueradiata* was demonstrated to be susceptible to this disease, because cumulative mortalities of 100% and 60% were recorded in young (average 12 g in body weight) and adult (average 530 g in body weight) yellowtail, respectively. Affected young yellowtail exhibited convulsion with the curvature of the spine (scoliosis), although no typical disease sign was observed in the dead adult yellowtail. In experimental infection with the brain homogenate of the dead adult yellowtail, scoliosis was produced in young yellowtail.

Key words: kuchijirosho, *Takifugu rubripes*, *Seriola quinqueradiata*, kuchijirosho associated protein, snout ulcer disease, tiger puffer

口白症は、中枢神経系、特に運動中枢障害に起因する狂奔および嘔み合いなどの異常行動、口吻部の深部までおよぶ激しいびらんおよび潰瘍を特徴とする。罹病魚の脳、延髄および脊髄の神経細胞は変性・壊死し、特に大型神経細胞の顕著な萎縮像が認められる（中内ら、1985；和田ら、1985, 1986）。本症は、1981年より九州地方の養殖トラフグ *Takifugu rubripes* で発生し、1980

年代中頃までに中国・四国地方、さらには近畿地方にまでその発症地域が拡大し、わが国のトラフグ養殖業に甚大な被害を与えている。本症は、水温15°Cでは発症しないが、20°C以上、特に25°Cでの発症経過が速く、死亡率も高い（井上ら、1986）。また、罹病魚脳磨碎濾液を健康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（井上ら、1986）。本症は、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*、さらにはマダイ *Pagrus major* やメバル *Sebastes inermis* でも発症することが人為感染試

* Corresponding author
E-mail: yosimizu@fish.hokudai.ac.jp

¹ 北海道大学大学院 水産科学研究院

² 長崎県総合水産試験場

験により確認されている (Miyadai *et al.*, 2001)。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 50 nm 以下で、有機溶剤および酸に感受性を有し、37°C では安定であるが 50°C で失活することを報告している。一方で、本病原体がホルマリンに対し比較的耐性であること (高見ら, 2007b)、さらに罹病トラフグの脳組織内に 100~120 kDa の口白症関連タンパク質 (kuchijirosho associated proteins, KAPs) が見出されることを報告している (高見ら, 2007a)。また、Miyadai *et al.* (2004) は、本病原体の浮遊密度が 1.096 g/cm³ 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。しかし、本病原体に関する詳細は明らかでなく、本病の防除対策も未だ確立されていない現状にある。

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 *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、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きわめて重要である。そこで本研究では、トラフグ近縁魚種に長崎県下の養殖対象魚種を加え、計 7 魚種の口白症に対する感受性について検討し、さらに感受性を示した魚種の脳組織内における KAPs の検出を試みた。

材料および方法

供試魚および口白症病原体液

供試魚 (体重は全て平均体重で示した) として、長崎県総合水産試験場産トラフグ (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。

本症発症トラフグの脳組織を摘出し、9 倍量の Hanks' balanced salt solution (HBSS) で磨砕後、HA フィルター (Millipore, 0.45 μ m) で濾過したものを口白症病原体として供試した。なお、本病原体液は小分けし、使用するまで -80°C で保存した。

感染実験

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部皮下に 0.5 mL/fish ずつ、ハコフグの尾柄部皮下に 0.5 mL/fish ずつ、イシダ

イ、メジナ、ブリおよびマダイの体側皮下に 0.1 mL/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°C、その他の魚種では 28~30°C とし、餌としてモイストペレットを与えた。

脳組織からの KAPs 検出

供試魚の脳組織からの KAPs 検出は、高見ら (2007a) に従って行った。すなわち、発症魚の脳組織を HBSS で磨砕した後、遠心分離 (20,000×g, 5 分) により得た上清を SDS-PAGE に供し、ウエスタンブロット (WB) により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。なお、SDS-PAGE は 7.5% 分離ゲルを用い、Laemmli (1970) の方法に準じ、また WB は Towbin *et al.* (1979) の方法に準じて行った。転写したタンパク質は、口白症感染耐過トラフグ血清、抗トラフグ IgM 家兎血清およびアルカリフォスファターゼ (AP) 標識抗ウサギ IgG 抗体で免疫染色を行い、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 MgCl₂, pH 9.5) で発色させた。

結果 および 考察

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

トラフグ脳磨砕濾液をトラフグ (15 g)、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 Table 1 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。

Table 1. Cumulative mortalities of tiger puffer and other fishes by injection with the brain homogenate derived from affected tiger puffer with kuchijirosho

Fish	n	Cumulative mortality	
		at 17th day after injection	Death started at
Tiger puffer	10	100%	9th day
<i>Takifugu rubripes</i>			
Grass puffer	5	100%	14th day
<i>T. niphobles</i>			
Panther puffer	2	100%	13th day
<i>T. pardalis</i>			
Blue-spotted boxfish	2	100%	16th day
<i>Ostracion immaculatus</i>			
Japanese parrotfish	5	0%	
<i>Oplegnathus fasciatus</i>			
Largescale blackfish	5	0%	
<i>Girella punctata</i>			

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、口白症非感受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 (92 g)、ブリ (218 g) およびマダイに接種した時の22日目における累積死亡数を Table 2 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、メバルが本症感受性であること、また魚体重 2 g のマダイは感受性を示すが、46 g 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 18 g であったが、口白症感受性は認められなかった。

Table 2. Cumulative mortalities of tiger puffer, red seabream and yellowtail by injection with the brain homogenate derived from affected tiger puffer with kuchijirosho

Fish species	Cumulative mortality (dead / total fish number)	
	Injected group	Control group
Tiger puffer <i>Takifugu rubripes</i>	10 / 10	0 / 10
Yellowtail <i>Seriola quinqueradiata</i>	10 / 10	0 / 10
Red seabream <i>Pagrus major</i>	0 / 10	0 / 5

魚体サイズの異なるブリの口白症感受性

先の実験で、ブリが口白症病原体に感受性を有したため、サイズの異なるブリ (12 g および 530 g) を用いた感受性試験を行った (Fig. 1)。大型ブリ (530 g、各区10尾) に病原液体 (トラフグに対し $10^{4.0}$ LD₅₀/mL) を 0.1 mL/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 (Fig. 1A)。なお、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、異なる病原体量 ($10^{3.0}$ – 10^0 LD₅₀/0.1 mL/尾)

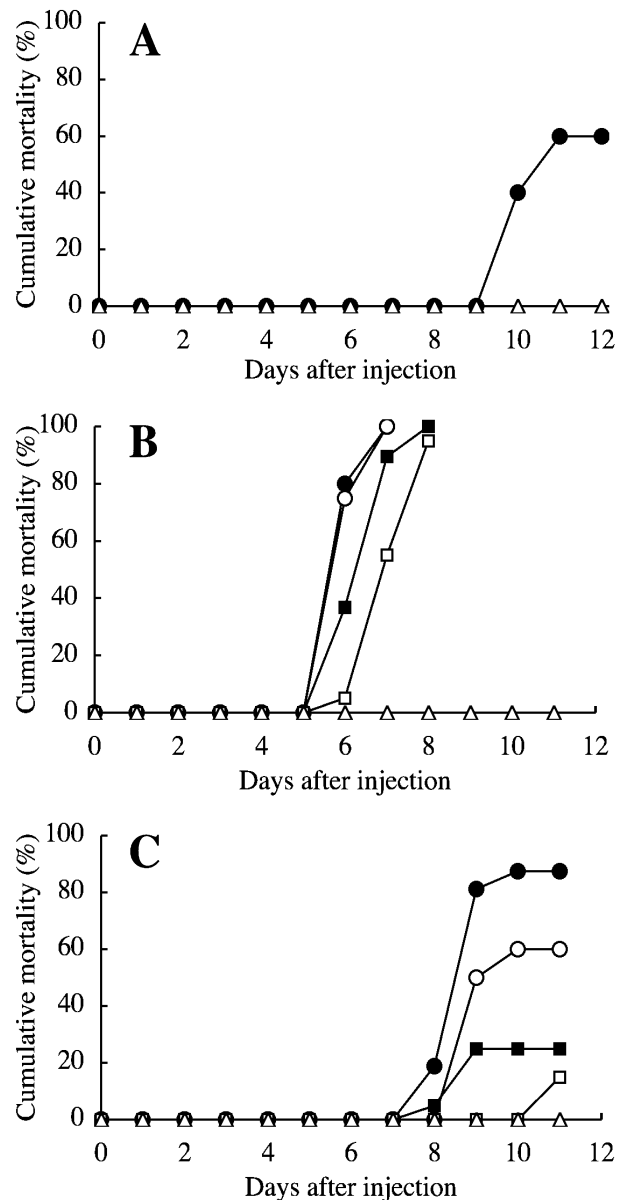


Fig. 1. Susceptibility of yellowtail *Seriola quinqueradiata* against the causative agent of kuchijirosho. The inoculums containing different doses of the kuchijirosho agent were intramuscularly injected to yellowtail with average body weights (BW) 530 g and 12 g. A: yellowtail with BW 530 g, B: BW 12 g, C: BW 12 g, ●: injection dose of the agent was $10^{3.0}$ LD₅₀/0.1 mL/fish, ○: $10^{2.0}$ LD₅₀/0.1 mL/fish, ■: $10^{1.0}$ LD₅₀/0.1 mL/fish, □: 10^0 LD₅₀/0.1 mL/fish, △: HBSS (negative control). The inoculum for experiment A and B was made from affected tiger puffer brain, while the inoculum for experiment C was made from affected yellowtail brain.

で小型ブリ (12 g、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、8日目までに累積死亡率が100%に達した。死亡した小型ブリでは、痙攣および脊柱の湾曲が共通して認められた (Fig. 2)、一部の死亡魚で口吻部にびらんが認められた



Fig. 2. A photograph of experimentally infected yellowtail (BW 12 g) with the kuchijirosho agent. The affected yellowtail exhibited strong convulsion and curvature of spine, but no typical signs of kuchijirosho in puffer fishes, including snout ulcer, were observed in the affected yellowtail.

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、剖検で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。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、死亡ブリの脳磨砕濾液を調製し、HBSSで希釈列を作製し小型ブリ(12 g, 各区20尾)に接種したところ、接種8日目から脊柱の湾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 (Fig. 1C)。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砕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、 $10^{2.5}$ LD₅₀/gと算出され、トラフグ脳組織内の病原体存在量 ($10^{5.1}$ LD₅₀/g, 高見ら, 未公表) 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る。

脳組織からの口白症関連タンパク質 (KAPs) の検出

高見ら (2007a) は、口白症耐過トラフグ血清を用いた免疫染色で、トラフグ脳組織から 100~120 kDa の KAPs を検出している。そこで、感染耐過トラフグ血清を用い、ブリおよびマダイにおいても脳組織から KAPs の検出を試みた。その結果、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 100~120 kDa の KAPs が検出された (Fig. 3)。なお、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 (高見ら, 未公表)。高見ら (2007a) は、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報告しているが、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 (Fig. 3)。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、

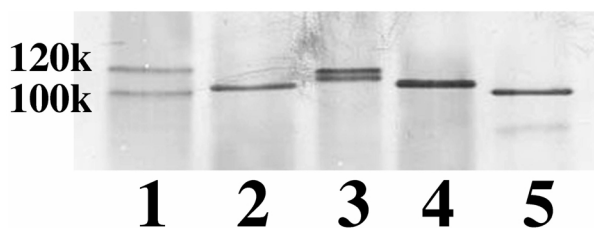


Fig. 3. Detection of kuchijirosho associated proteins (KAPs) from brain tissues of yellowtail, tiger puffer and red seabream by western blot with serum of affected tiger puffer with kuchijirosho. Lanes 1: affected tiger puffer, Lane 2: affected yellowtail, Lane 3: apparently healthy tiger puffer, Lane 4: apparently healthy yellowtail, Lane 5: apparently healthy red seabream.

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 (Fig. 3, Lane 5)、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た。

文 献

- 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.
- 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.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.

- 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. Hoshimoto, T. Watari, M. Ohtani and D. Tahara (2004): Partial purification of Kuchijirosho causative agent by sodium iotalamate density gradient centrifugation. *Fish Pathology*, **39**, 213–214.
- 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.
- 高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水 守 (2007a): 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**, 29–34.
- 高見生雄・西澤豊彦・吉水 守 (2007b): トラフグ口白症に対する感染防御誘導の試み. 魚病研究, **42**, 67–69.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979): Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **6**, 4350–4354.
- 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.
- 和田新平・畑井喜司雄・窪田三朗・井上 潔・安永統男 (1986): 養殖トラフグの口白症の病理組織学的所見. 魚病研究, **21**, 101–104.