HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	トラフグ口白症に対する感染防御誘導の試み
Author(s)	高見, 生雄; 西澤, 豊彦; 吉水, 守
Citation	魚病研究, 42(1), 67-69 https://doi.org/10.3147/jsfp.42.67
Issue Date	2007-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38377
Type	journal article
File Information	yoshimizu-264.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

魚病研究　**Fish Pathology, 42 (1), 67–69, 2007. 3**
© 2007 The Japanese Society of Fish Pathology

トラフグ口白症に対する感染防御誘導の試み

高見生雄[1,2]・西澤豊彦[1]・吉水　守[1*]

（2006年 8 月21日受付）

Experiments on Induction of Protection against Kuchijirosho of Tiger Puffer

Ikuo Takami[1,2], Toyohiko Nishizawa[1] and Mamoru Yoshimizu[1*]

[1]*Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Hakodate, 041-8611, Japan*
[2]*Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Nagasaki 851-2213, Japan*

（Received August 21, 2006）

ABSTRACT—Kuchijirosho (snout ulcer disease) is an infectious disease of tiger puffer *Takifugu rubripes*, but little is known about detailed characteristics of its causative agent. Homogenate of brain from naturally diseased fish containing the kuchijirosho agent was treated with 0.3% formalin for 7 days. Injection of the homogenate induced 79% mortality in tiger puffer rearing at 25°C, indicating that the kuchijirosho agent was not inactivated by the formalin treatment. However, no mortality was observed in fish injected with the formalin-treated homogenate rearing at 18–20°C. A challenge test at 25°C with the untreated homogenate showed that the formalin-treated homogenate did not induce protection against kuchijirosho in the survivors.

Key Words: kuchijirosho, *Takifugu rubripes*, tiger puffer, formalin inactivation, snout ulcer disease

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噛み合いなどの異常行動，ならびに口吻部の激しいびらんおよび潰瘍化を特徴とするトラフグ *Takifugu rubripes* の病気で[1–3]，1980～1990年代にかけて西日本のトラフグ養殖業に甚大な被害を与えた。その後，大きな被害は聞かれなくなったが，2003年頃から再び被害の報告が聞かれるようになってきた。本症罹病魚の脳組織磨砕濾液を健常魚に接種すると病気が再現されることから，本症が濾過性病原体による感染症であるとされているが[4–8]，本病原因体に関する詳細は未だ明らかでない。そこで本研究では，口白症原因体の性状の一つとしてホルマリン感受性について検討した。

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

材料および方法

口白症病原体液および実験魚

口白症発症個体（5 尾，平均体重 207 g）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 μm）で濾過したものを口白症病原体保存液とし，実験に使用するまで－80°Cで保存した。感染実験用トラフグ（平均体重 25 g）を用い，病原体保存液の半数致死量（LD_{50}）をBehrens-Kärber 法により求めたところ，$10^{4.7}$ LD_{50}/mLであった。

長崎県総合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 40 L 角形アクリル水槽あるいは 100 L 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°Cあるいは18～20°C，流水（換水率：20または50回転／日）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°Cで12時間不活化処理したものを 12 h 処理液，また 7 日間処理したものを 7d 処理液とした。12 h 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。12 h 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°C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°Cとした。

7d 処理液接種14日後，18～20°C飼育区のトラフグ（8 g）の生残魚を 3 区に分け，40 L 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°Cで10日間飼育し，死亡率の推移を観察した。なお，陽性対照区には，HBSSを接種し水温18～20°C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。

結果および考察

ホルマリン 12 h 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（Fig. 1）。従って，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。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膵臓壊死症ウイルス（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（高見ら，未発表），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。

口白症は水温が25°C以上で高率に発症するが[4]，水温20°C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（高見ら，未発表）。予想通り，トラフグの飼育水温を通常の感染試験より約 5 °C下げ18～20°Cにすると，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（Fig. 1）。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再攻撃試験に供した。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（Fig. 2）。このとき，対照区として設定した 7d 処理液接種–HBSS 攻撃区および HBSS 接種–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。本

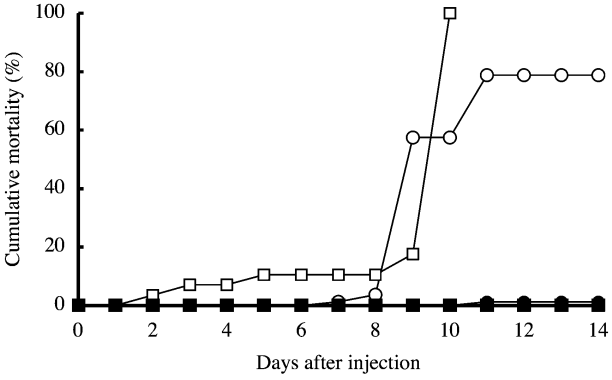

Fig. 1. Cumulative mortalities of tiger puffer by injection of kuchijirosho agent with 0.3% formalin treatment. After treated with 0.3% formalin for 12 h or 7 days, the inoculums containing the causative agent ($10^{3.7}$ LD_{50}/0.1 mL/fish) were injected into muscle of tiger puffer for pathogenicity test. □: formalin treatment at 4°C for 12 h (water temperature for fish rearing: 25°C), ○: formalin treatment at 4°C for 7 days (rearing temperature: 25°C), ●: formalin treatment at 4°C for 7 days (rearing temperature: 18–20°C), ■: HBSS injection (negative controls, rearing temperature: 25°C or 18–20°C).

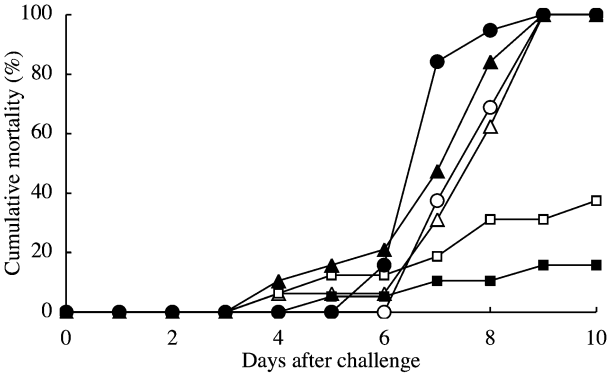

Fig. 2. Cumulative mortality of survived tiger puffer in a re-challenge test with kuchijirosho agent. The survived fish was injected with formalin-treated kuchijirosho agent ($10^{3.7}$ LD_{50}/0.1 mL/fish) and reared at 18–20°C in Fig. 1.
After 14 days from injection of formalin-treated inoculum, the survived fish were re-challenged with two different doses (10^2 and 10^3 LD_{50}/0.1 mL/fish) of kuchijirosho agent by intramuscular injection. ○, △ and □: survived fish groups, ●, ▲ and ■: HBSS-injected groups, ○ and ●: re-challenged with the agent of 10^3 LD_{50}/0.1 mL/fish, △ and ▲: with $10^{2.0}$ LD_{50}/0.1 mL/fish, □, ■: with HBSS (control).

実験でのホルマリン処理病原体液の接種量は，$10^{3.7}$ LD_{50}/0.1 mL/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。さらに攻撃量も $10^{2.0}$ LD_{50}/0.2 mL/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全個体が死亡したことから，ホルマリン処理病原体液接種はトラフグに口白症に対する感染防御能を誘導しなかったと考えられた。著者らは，感染耐過魚の血清には口白症病原体を認識する抗体がないことを見いだしており[7]，今回の実験結果を併せ，口白症病原体の抗原性は極めて低いと考えられた。

一方，本実験により，飼育水温を18～20°Cにすることで口白症が発症しづらくなることが改めて確認された。飼育水温の低下に伴いトラフグの免疫能が低下する可能性は十分に考えられる。しかしながら，飼育水温を下げることで発症・死亡が大幅に低下したこと，その生残魚を再び25°Cで飼育しても口白症が発症しなかったことは，18～20°Cでトラフグの感染防御能がある程度機能していた，あるいは口白症病原体の病原性が大幅に低下した可能性を示唆するものである。

何れにせよ，口白症の病原体がホルマリンに対し比較的耐性である点，さらに抗原性が極めて低いと考えられる点で，本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ると考えられた。

文　献

1）中内良介・宮崎照雄・塩満捷夫（1985）：魚病研究，**20**，475−479. 2）和田新平・藤巻由紀夫・畑井喜司雄・窪田三郎・磯田政恵（1985）：魚病研究，**20**，495−500. 3）和田新平・畑井喜司雄・窪田三郎・井上　潔・安永統男（1986）：魚病研究，**21**，101−104. 4）井上　潔・安元　進・安永統男・高見生雄（1986）：魚病研究，**21**，129−130. 5）Inouye, K., K. Yoshikoshi and I. Takami（1992）: *Fish Pathol.*, **27**, 97−102. 6）Miyadai, T., S.-I. Kitamura, H. Uwaoku and D. Tahara（2001）: *Dis. Aquat. Org.*, **47**, 193−199. 7）高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水　守（2007a）：魚病研究，**42**，29−34. 8）高見生雄・粉川愉記・西澤豊彦・吉水　守（2007b）：魚病研究，**42**，35−39.