

抗ウイルス鶏卵抗体（IgY）による受動免疫効果に関する研究-II キンギョにおける抗 GFHNV-IgY の受動免疫効果

矢田 裕美・磯村 慎亮・宮崎 照雄*

三重大学大学院生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻 水圏生物生産学講座 水族病理学研究室

Studies on Passive Immunization with Anti-viral IgY-II Passive Immunization with Anti GFHNV-IgY in Goldfish

Hiromi YATA, Shinsuke ISOMURA and Teruo MIYAZAKI*

Laboratory of Fish Pathology, Graduate School of Bioresources, Mie University

Abstract

Herpesviral hematopoietic necrosis of goldfish has caused mass mortalities in the USA, Australia and European countries as well as in Japan since 1993. Still we have no ways to treat this disease. We tried passive immunization by intramuscular injections with anti GFHNV-IgY (egg yolk antibody) in order to protect goldfish from GFHNV infection. Injected IgY containing anti GFHNV-IgY was absorbed into the blood serum at high concentration in the day 1 after three injections, which was maintained to the day 7. The immunized fish were challenged by immersion with GFHNV at 10^{-3} and 10^{-4} dilution in the day 1 post immunization and were protected from GFHNV infection at 40.0 % and 87.5 % RPS respectively. Histopathological observation revealed no signs of virus infection to hematopoietic cells in survivors, indicating neutralization of virus with IgY. Electron microscopy revealed apoptosis-like features of virus-infected cells, resulting in prevention of viral maturation and virion release out of the cell.

Key Words: passive immunization, goldfish, herpesviral hematopoietic necrosis of goldfish, anti GFHNV-IgY, apoptosis

緒 言

キンギョにはヘルペスウイルス性造血組織壊死症 (Herpesviral Hematopoietic Necrosis of Goldfish) が発生し¹⁻⁴⁾、日本のみならず欧米でも重要疾病となっているが、その防御対策は確立していない。同じヘルペスウイルスに属するコイヘルペスウイルスの感染防御について、実験段階ではあるが、鶏卵抗体 (IgY) を用いた受動免疫が効果的であった⁵⁾。本研究では、造血組織壊死症ヘルペスウイルス (Goldfish Hematopoietic Necrosis Herpesvirus: GFHNV)

特異鶏卵抗体 (抗 GFHNV-IgY) を作製し、筋肉内注射法により受動免疫を施したキンギョにおいて GFHNV 感染の防御が有効であることを実証した。

キンギョにおける鶏卵抗体 (IgY) の取り込みに関する検討

材料および方法

供試魚

本実験には、三重大学生物資源学部水族生理学研究室および三重県下養魚場から分与を受けたキ

2013年6月20日受理

〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

* for correspondence (miyazaki@bio.mie-u.ac.jp)

ンギョ *Carassius auratus auratus* のワキン、デメキン、ランチュウを供した。

GFHNV

抗 GFHNV-IgY の免疫効果を検討するために用いた GFHNV は、2010 年三重県下養魚場で発生したキンギョのヘルペスウイルス性造血組織壊死症病魚の腎臓および脾臓を摘出し、分離したものを供した。GFHNV の分離は、腎臓および脾臓の 10 倍量 (g/g) の MEM-5 (5% 仔牛血清, 7.5% NaHCO₃, 0.5% L-グルタミン添加 Eagle's minimum essential 培地) を加え、十分に摩砕した後、3000 xg・15 分間遠心分離後、上清をメンブレンフィルター 450 nm (Advantec) で濾過滅菌し、これを GFHNV 懸濁液とした。

抗 GFHNV-IgY

実験に使用した抗 GFHNV-IgY の作製は、株式会社ゲン・コーポレーションに依頼し、雌鶏に GFHNV を接種し、卵から得られた抗 GFHNV-IgY 含有全卵粉末 (Lot. 2010. 9. 21) (鶏全卵粉末 97%, 無水ケイ酸 3%) を実験に供した。全卵粉末中の IgY 純度は 42% であった。GFHNV は培養が困難なことから中和抗体価は測定しなかった。

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したワキンの血清中総 IgY 濃度の測定

平均体重 60 g のワキンをコンテナに 3 尾収容した。滅菌生理食塩水を用いて 2% IgY 水溶液を作製し、1 尾当たり 0.3 mL を 1 mL のシリンジ (テルモ) と 26 G の注射針 (テルモ) を用いて 3 日間筋肉内注射により投与した。3 日間で投与した IgY 量は 1 尾当たり 7.56 mg と算出された。投与後 1, 5, 7, 14 日後に尾静脈より 1 mL のシリンジと 21 G の注射針を用いて採血を行い 0.3 mL 採血した。

2% IgY 水溶液を再度筋肉内注射したワキンの血清中総 IgY 濃度の測定

IgY はタンパク質であり抗原となるので、キンギョが抗 IgY-IgM を産生すれば IgY は中和されることになり、IgY を繰り返し投与して受動免疫を行うことが不可能になる。こうしたことがおこる可能性があるのかを確認するため上述の実験後

2 ヶ月間飼育した平均体重 60 g のワキン 3 尾を用いて、2 回目の IgY 投与実験を行った。投与方法は上述の実験と同じである。

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したデメキンの血清中総 IgY 濃度の測定

平均体重 150 g のデメキンを 250 L パンライトに 5 尾収容した。滅菌生理食塩水を用いて 2% IgY 水溶液を作製し、1 尾当たり 0.75 mL を 1 mL のシリンジと 26 G の注射針を用いて 3 日間筋肉内注射により投与した。3 日間で投与した IgY 量は 1 尾当たり 18.9 mg と算出された。投与後 1, 5, 7, 14 日後に尾静脈より 1 mL のシリンジと 21 G の注射針を用いて採血を行い 0.3 mL 採血した。

ワキンおよびデメキンから採取した血液は室温で 1 時間静置し、4 °C で 3 時間静置した後、3,000 xg, 15 分間遠心分離を行なって血清を得た。血清中総 IgY 濃度を ELISA 法により測定した。

2% 抗 GFHNV-IgY 水溶液を筋肉内注射したランチュウにおける受動免疫効果の検討

10³ 倍希釈 GFHNV ウイルス液浸漬による攻撃実験

抗 GFHNV-IgY 受動免疫区と非投与対照区を設け、平均体重 10 g のランチュウを各区 10 尾ずつ収容した。

抗 GFHNV-IgY 受動免疫区には、滅菌生理食塩水を用いて 2% IgY 水溶液を作製し、1 尾当たり魚体重の 0.5% となる 0.05 mL を 2 日間 1 mL のシリンジと 26 G の注射針を用いて筋肉内注射によって投与した。1 尾当たりの IgY 総投与量は 0.84 mg と算出された。非投与対照区には生理食塩水を注射した。IgY 投与翌日に GFHNV で攻撃実験を行った。攻撃は GFHNV ウイルス液を 10³ 倍希釈した GFHNV 懸濁液に 1 時間浸漬して行った。攻撃後はコンテナで飼育し実験終了時まで観察を行い、その間に瀕死に至った実験魚は適宜取り上げた。

10⁴ 倍希釈 GFHNV ウイルス液浸漬による攻撃実験

抗 GFHNV-IgY 受動免疫区と非投与対照区を設け、平均体重 8.5 g のランチュウを各区 10 尾ずつ

つ収容した。抗 GFHNV-IgY 受動免疫区には、滅菌生理食塩水を用いて 2% IgY 水溶液を作製し、1 尾当たり魚体重の 0.5% となる 0.043 mL を 2 日間筋肉内注射によって投与した。1 尾当たりの IgY 総投与量は 0.72 mg と算出された。非投与対照区には生理食塩水を注射した。IgY 投与翌日に GFHNV で攻撃実験を行った。攻撃は GFHNV ウイルス液を 10^4 倍希釈した GFHNV 懸濁液に 1 時間浸漬して行った。攻撃後はコンテナで飼育し実験終了時まで観察を行い、その間に瀕死に至った実験魚は適宜取り上げた。

取り上げた実験魚は、鰓、腎臓を切り出しブアン氏液で固定した。その後、定法に従ってパラフィンで包埋し、厚さ 3–4 μm の切片を作製した。切片はデラフィールドのヘマトキシリン・エオジン (H・E) 染色を施し、光学顕微鏡下で病理組織学的検討を行った。

また、ウイルス感染が最も顕微な腎臓造血組織については、組織片をカルノフスキー固定液で固定後、常法に従って、電子顕微鏡観察を行なった。

なお、抗 GFHNV-IgY による受動免疫の有効性については、有効率 (%) で評価した。

結 果

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したワキンの血清中総 IgY 濃度の推移

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したワキンの血液

中に取り込まれた総 IgY 濃度を測定した (図 1)。血清中総 IgY 濃度は、IgY 投与後 1 日目で 3.592~5.285 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 4.297 $\mu\text{g/mL}$ であった。IgY 投与後 3 日目では 1.365~2.879 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 1.997 $\mu\text{g/mL}$ となり 1 日目から 3 日目にかけて総 IgY 量が減少した。その後は IgY 投与後 5 日目で 1.167~1.620 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 1.328 $\mu\text{g/mL}$ となった。IgY 投与後 7 日目で 0.716~0.913 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.842 $\mu\text{g/mL}$ 、投与後 1 週間ほどで魚体内の IgY は極微量となり、2 週間後に測定した際には全ての個体で検出限界以下となった。

2% IgY 水溶液を再度筋肉内注射したワキンの血清中総 IgY 濃度の推移

全実験で使用したワキン 3 匹に改めて 2% IgY 水溶液を筋肉内注射し、ワキンの血液中に取り込まれた総 IgY 濃度を測定した (図 2)。血清中総 IgY 濃度は、IgY 投与後 1 日目で 2.699~6.410 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 4.479 $\mu\text{g/mL}$ であった。IgY 投与後 3 日目では 1.173~2.123 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 1.733 $\mu\text{g/mL}$ となり 1 日目から 3 日目にかけて総 IgY 濃度が減少した。その後は IgY 投与後 5 日目で 0.797~1.21 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.995 $\mu\text{g/mL}$ となった。IgY 投与後 7 日目で 0.039~0.0546 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.0468 $\mu\text{g/mL}$ 、投与後 1 週間ほどで魚体内の IgY は極微量となり、2 週間後に測定した際には全ての個体で検出限界以下となった。

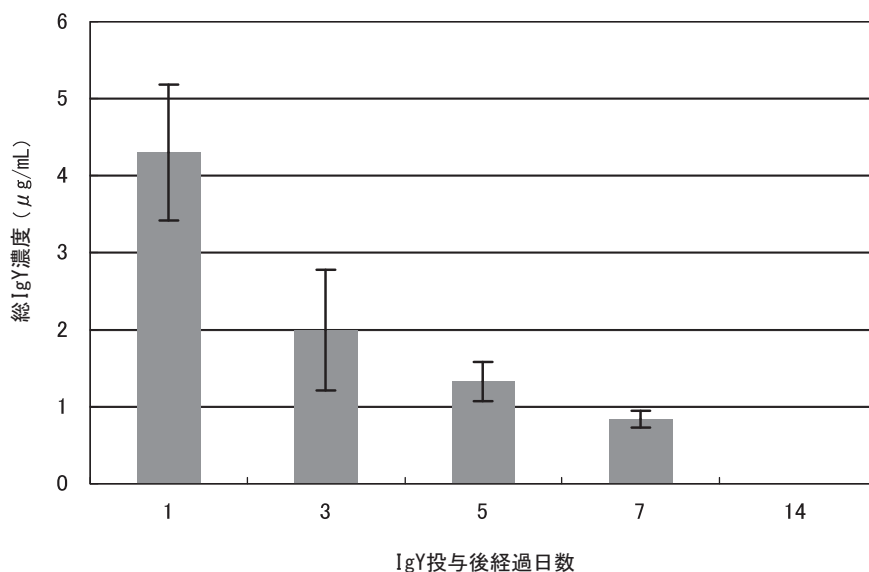


図 1. 2% IgY 水溶液の筋肉内注射によるワキン血清中総 IgY 濃度 (平均±標準偏差)

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したデメキンの血清中総 IgY 濃度の推移

2% IgY 水溶液を筋肉内注射したデメキンの血液中に取り込まれた総 IgY 濃度を測定した (図3)。血清中総 IgY 濃度は、IgY 投与後 1 日目で 4.469~12.17 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 9.302 $\mu\text{g/mL}$ であった。IgY 投与後 3 日目では 1.117~3.693 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 2.475 $\mu\text{g/mL}$ となり 1 日目から 3 日目にかけて総 IgY 濃度が減少した。その後は IgY 投与後 5 日目で 0.374~1.016 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.7916 $\mu\text{g/mL}$ となった。IgY 投与後 7 日目で 0.0195~0.0422 $\mu\text{g/mL}$ 、平均 0.0303 $\mu\text{g/mL}$ 、投与後 1 週間ほどで魚体内の IgY は極微量となり、2 週間後に測定した際には全ての個体で検出限界以下となった。

2% 抗 GFHNV-IgY 水溶液を筋肉内注射したランチュウにおける受動免疫効果

10³ 倍希釈 GFHNV ウイルス液浸漬による攻撃実験

感染防御実験の結果、非 IgY 投与対照区では 6 日目に 1 尾、7 日目に 5 尾、8 日目に 2 尾、9 日目、10 日目にそれぞれ 1 尾が死亡し、14 日目には合計 10 尾が死亡に至った。攻撃後 14 日目の生存率は 0% となった。

他方、IgY 受動免疫区では 10 日目に 2 尾、11 日目に 1 尾、12 日目に 2 尾、13 日目に 1 尾が死亡し、14 日目には合計 6 尾が死亡に至った。攻撃後 14 日目の生存率は 40% となった。IgY 受動免疫区のキンギョの累積死亡率は 60% となり、

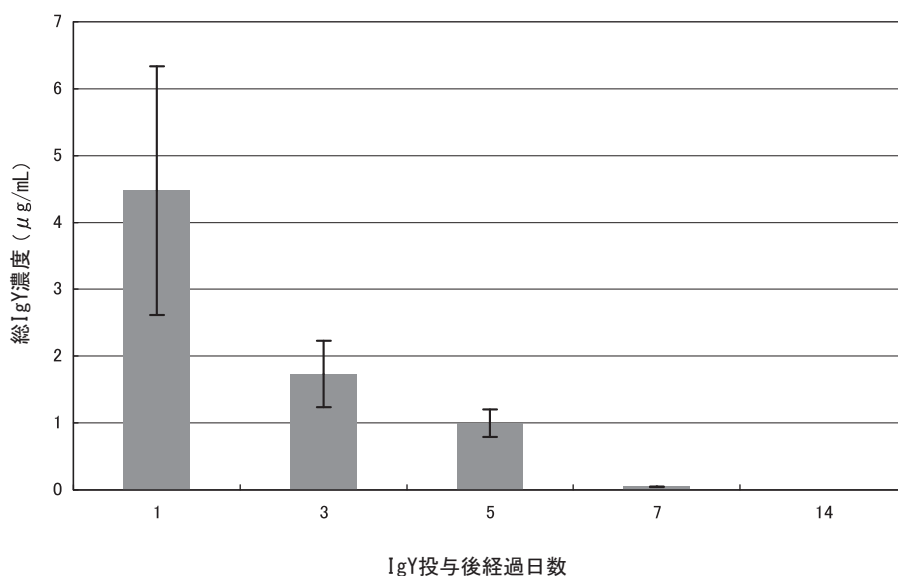


図2. 2% IgY 水溶液の筋肉内注射によるワキン血清中総 IgY 濃度(平均±標準偏差)

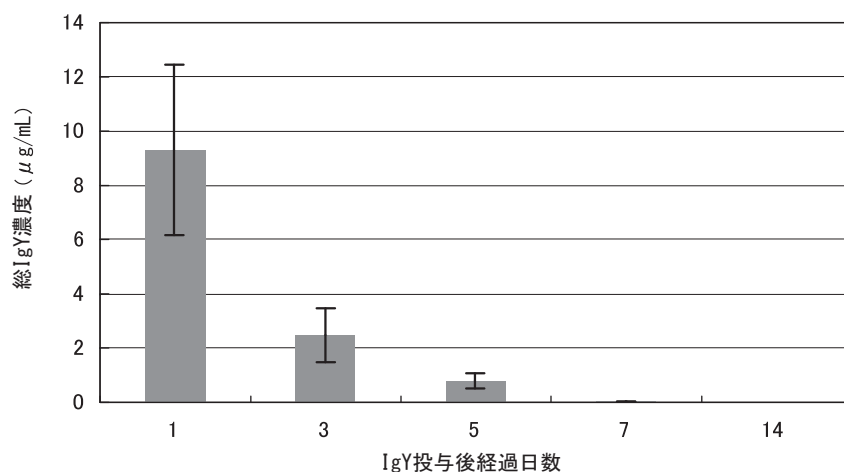


図3. 2% IgY 水溶液の筋肉内注射によるデメキン血清中総 IgY 濃度(平均±標準偏差)

非投与対照区の累積死亡率 100 %と比較して生残率が高くなった。また、死亡時期の遅延効果も認められた。有効率は 40 %であった (図 4)。

10⁴ 倍希釈 GFHNV ウイルス液浸漬による攻撃実験

感染防御実験の結果、非 IgY 投与対照区では非投与対照区では 12 日目に 2 尾、16 日目に 2 尾、18 日目に 4 尾死亡し、18 日目には合計 8 尾が死亡に至った。攻撃後 14 日目の生存率は 20 %となった。

他方、IgY 受動免疫区では攻撃後 14 日間は死亡せず、15 日目、16 日目、18 日目に 1 尾ずつが死亡に至ったが、残りの 7 尾は生存し、最終的な

生存率は 70 %となった。IgY 受動免疫区のキンギョの累積死亡率は 30 %となり、非投与対照区の累積死亡率 80%と比較して生残率が高くなった。また、死亡時期の遅延効果も認められた。有効率は 87.5%であった (図 5)。

受動免疫魚の病理組織学的研究

非 IgY 投与対照区および IgY 受動免疫区ともに、GFHNV ウイルス液の 10³ 倍希釈および 10⁴ 倍希釈液の浸漬法による攻撃のあと、斃死あるいは瀕死になった魚の腎臓造血組織では、広範囲の造血細胞がウイルス感染を受けて、核膜過染、核膨化などの核変性を示して壊死を起し、細胞崩壊に至る像が顕著に観察された (図 6 A, 7 A)。

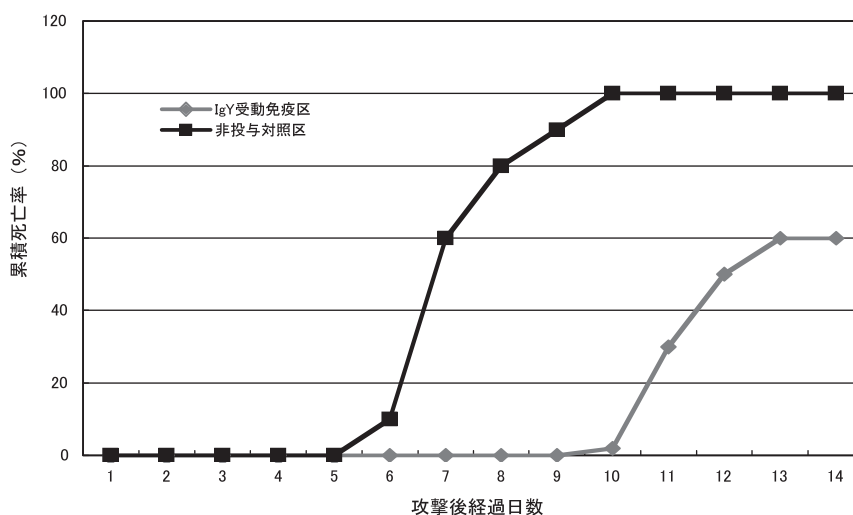


図 4. 2 % IgY 水溶液の筋肉内注射による受動免疫効果。10³ 希釈 GFHNV 攻撃実験における累積死亡率

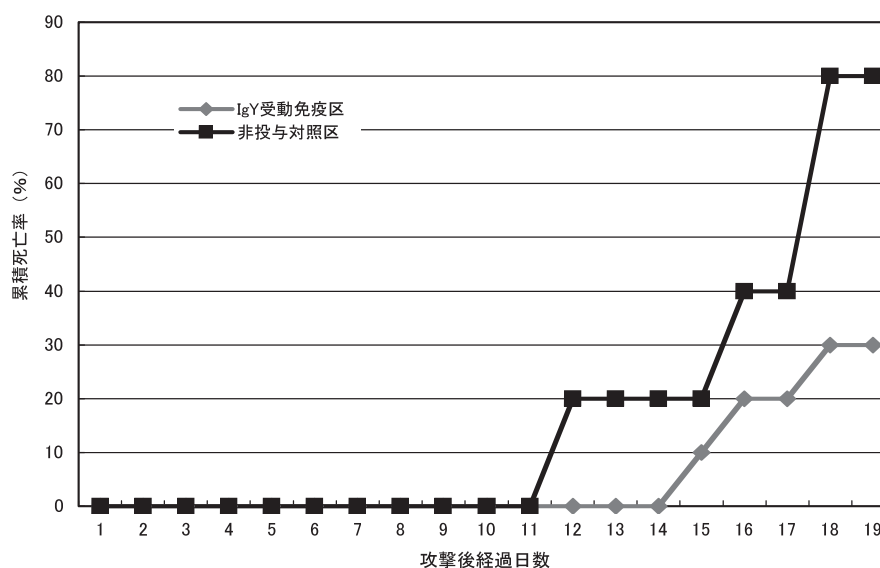


図 5. 2 % IgY 水溶液の筋肉内注射による受動免疫効果。10⁴ 希釈 GFHNV 攻撃実験における累積死亡率

また脾臓では、脾髄、莢動脈の莢組織に核変性を示して壊死した細胞が顕著に観察された（図 6 B, 7 B）。

非投与対照区で、GFHNV ウイルス液の 10^3 倍希釈および 10^4 倍希釈液の浸漬法による攻撃の後、生残した魚の腎臓造血組織では、造血細胞の減少が見られ、類洞の拡張も顕著で、造血組織の数的萎縮を示していた。その脾臓では、脾髄に血液貯留がほとんど確認できず、萎縮しており、造血組織の造血障害を反映していた。

他方、抗 GFHNV-IgY 受動免疫区では、GFHNV ウイルス液の 10^3 倍希釈および 10^4 倍希釈液の浸漬法による攻撃の後、生残した魚の腎臓造血組織では、造血細胞の減少は無く、GFHNV の感染病変は見られなかった（図 6 C, 7 C）。脾臓でも、GFHNV 感染の病変は見られず、脾髄に血液貯蔵が明瞭であり、造血障害が全くなかったことを表していた（図 6 D, 7 D）。

電子顕微鏡観察

GFHNV ウイルス液の 10^3 倍希釈および 10^4 倍希釈液浸漬法による攻撃実験において、免疫効果を示す変化を検討するには、生残魚は病変が無く不適であったため、瀕死魚の腎臓造血細胞について観察を行った。IgY 非投与対照区の瀕死魚の GFHNV 感染腎臓造血細胞では、核が膨化し、核内には多数のヘルペスウイルスのヌクレオカプシドが形成されていた（図 8 A）。その細胞質には、テグメントを形成した未熟ウイルス粒子、膜状構造物内で成熟するウイルス粒子、エンベロープを纏った成熟ウイルス粒子（virion）が存在し、ウイルスの成熟が確認できた（図 8 B）。

他方、抗 GFHNV-IgY 受動免疫区の瀕死魚の GFHNV 感染腎臓造血細胞では、核内にヘルペスウイルスのヌクレオカプシドが確認できたが、核が激しく崩壊し、アポトーシスの様相を呈していた（図 8 C）。その細胞の細胞質では、裸のヌクレオカプシド、テグメントを形成した未熟ウイルス粒子は確認できたが、成熟ウイルス粒子は存在せず、ウイルスの成熟は確認できなかった（図 8 D）。

考 察

キンギョのヘルペスウイルス性造血組織壊死症は、GFHNV が経口的に取り込まれ、腎臓造血細胞、腸管粘膜下織の顆粒細胞、脾臓脾細胞と莢細胞、心筋細胞に感染するのが特徴である²⁾。GFHNV は培養が困難なため、GFHNV 不活化ワクチンを用いた能動免疫は不可能である。本病の予防対策を考えるため、抗 GFHNV-IgY 投与による受動免疫の可能性を検討した。まず、ワキンとデメキンで、IgY の筋肉内注射により IgY が血液中にどの程度吸収され、どの程度魚体内に残存するのかについて調べた。その結果、ワキンでは IgY 投与 1 日目の血液中総 IgY 濃度は、総投与量 12.6 mg/100 g 魚体重で投与した場合平均 $4.297 \mu\text{g/mL}$ となり、その後一週間は血液中総 IgY 濃度の経時的減少が見られたが、以降は検出限界以下の値となることが確認された。また、デメキンで同様の実験を行った。IgY 投与 1 日目の血液中総 IgY 濃度は、総投与量 12.6 mg/100 g 魚体重で投与した場合平均 $9.302 \mu\text{g/mL}$ となり、その後一週間は血液中総 IgY 濃度の経時的減少が見られたが、以降は検出限界以下の値となり、デメキンでもワキンと同様の結果が得られた。IgY の取り込みにキンギョの系統差を考える必要はないようである。ただし、検出された値がコイの例³⁾よりも著しく低かった。

以上の投与実験から、筋肉内注射法により IgY が、コイより濃度は低いですが、血液中に取り込まれることが実証された。そこでキンギョの重要疾病であるキンギョのヘルペスウイルス性造血組織壊死症対策に抗 GFHNV-IgY を用いた受動免疫が効果的かどうかを検討するため、抗 GFHNV-IgY の筋肉内注射で受動免疫を施したランチュウに対して、GFHNV 懸濁液に浸漬する方法で攻撃を行い、免疫効果を検討した。攻撃は 10^3 倍希釈と 10^4 倍希釈したウイルス液に 1 時間浸漬して行なった。その結果、 10^3 倍希釈のウイルス液を使用した攻撃では IgY 受動免疫区のキンギョの累積死亡率は 60 % となり、IgY 非投与対照区の累積死亡率 100 % と比較して生残率が高くなった（有効率 40.0 %）。また、 10^4 倍希釈のウイルス液を使用した攻撃では IgY 受動免疫区のキンギョの累積死亡率は 30 % となり、IgY 非投与対照区の

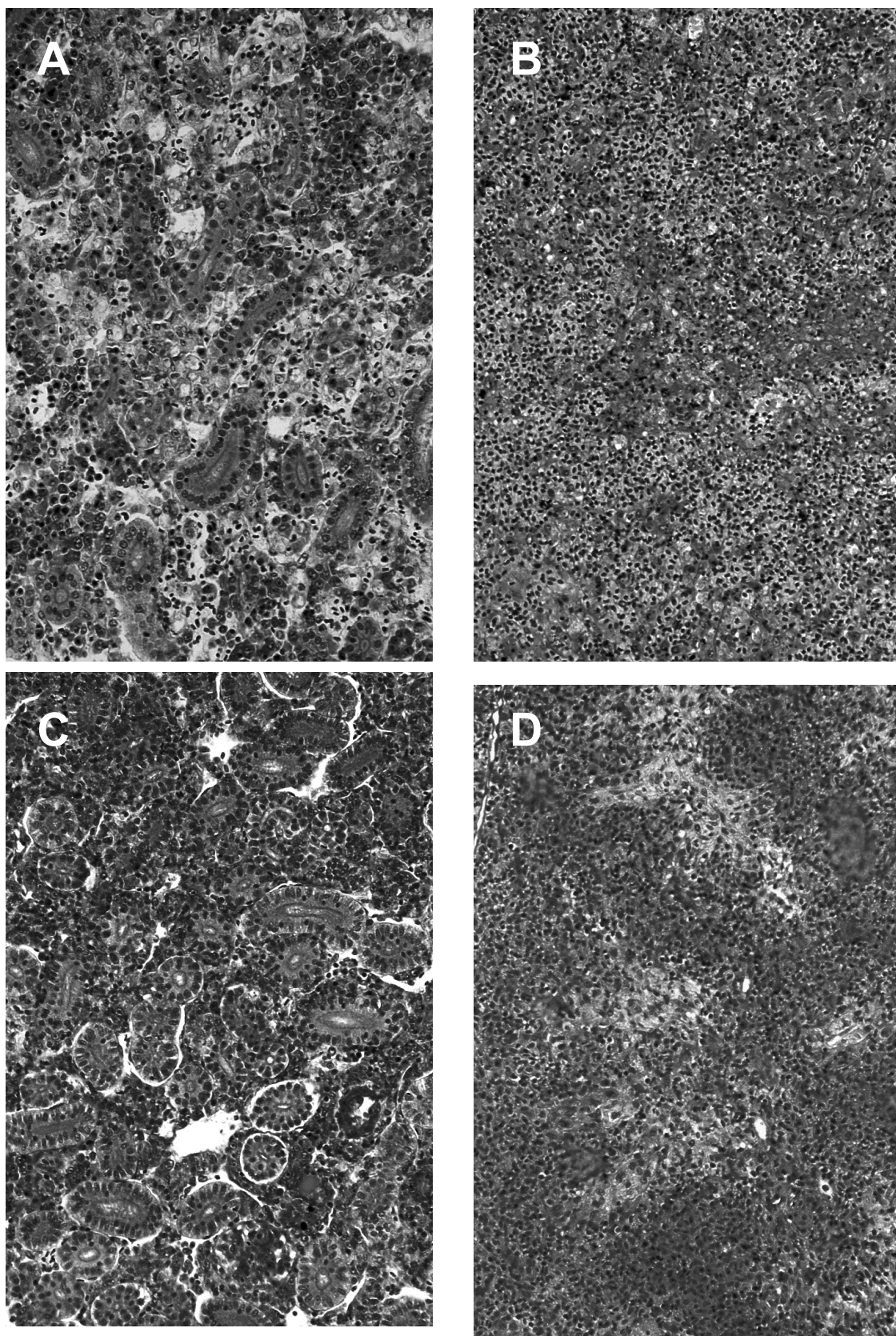


図 6

抗 GFHNV-IgY 受動免疫区, 10^3 倍希釈ウイルス液浸漬攻撃。(A) 瀕死魚の腎臓では, 造血細胞が核膜過染などの核変性を示して壊死している。H-E 染色, X 160 (B) 瀕死魚の脾臓では, 脾髄と莢組織の壊死, 脾髄の出血が激しい H-E 染色, X 160 (C) 生残魚の腎臓に造血組織に壊死像は見られない。H-E 染色, X 160 (D) 生残魚の脾髄と莢組織に病変は見られない。H-E 染色, X 160

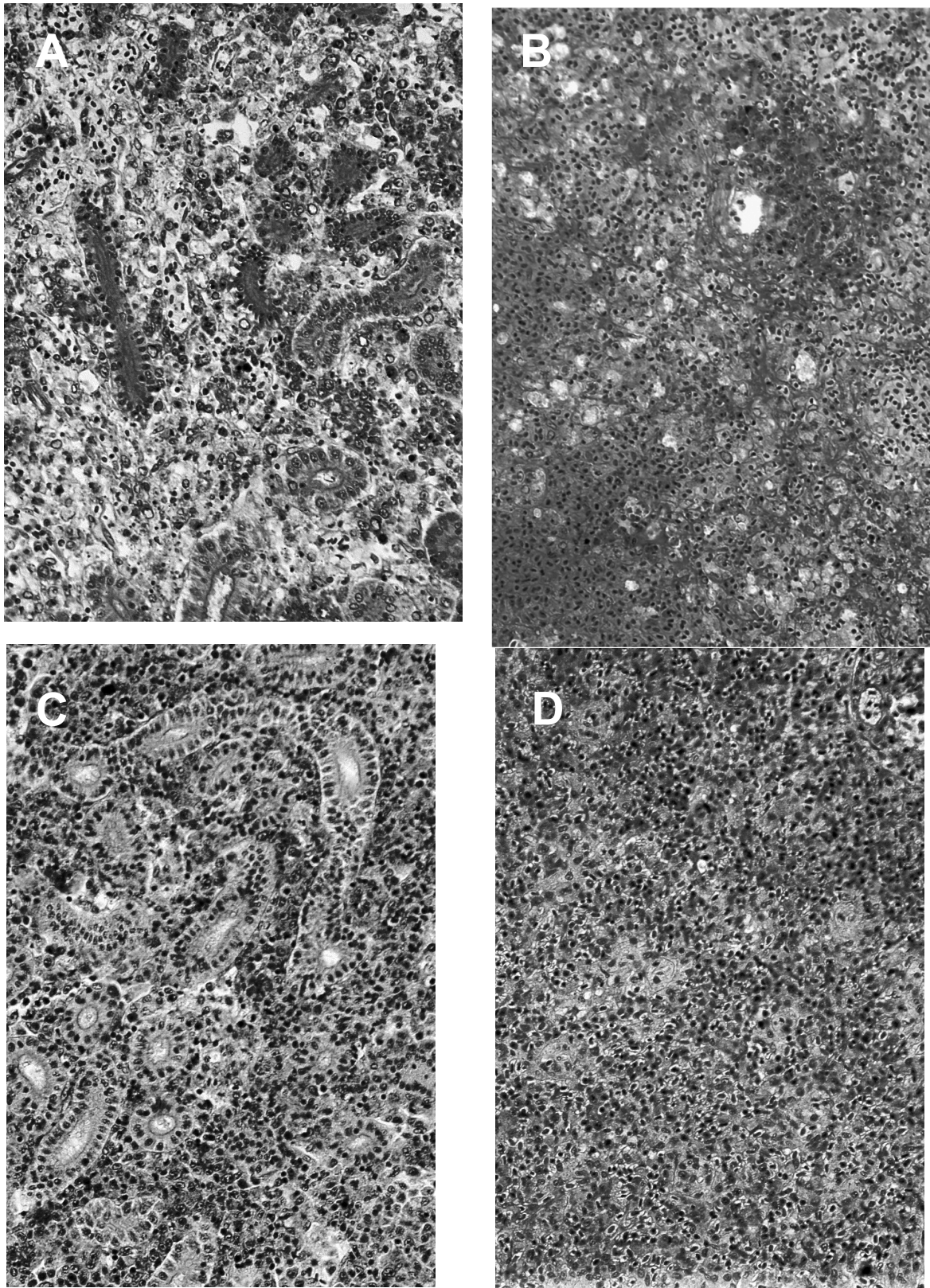


図 7

抗 GFHNV-IgY 受動免疫区, 10^4 倍希釈ウイルス液浸漬攻撃。(A) 瀕死魚の腎臓では, 造血細胞が核膜過染などの核変性を示して壊死している。H-E 染色, X 160 (B) 瀕死魚の脾臓では, 脾髄と莖組織の壊死, 脾髄の出血が激しい H-E 染色, X 160 (C) 生残魚の腎臓に造血組織に壊死像は見られない。H-E 染色, X 160 (D) 生残魚の脾髄と莖組織に病変は見られない。H-E 染色, X 160

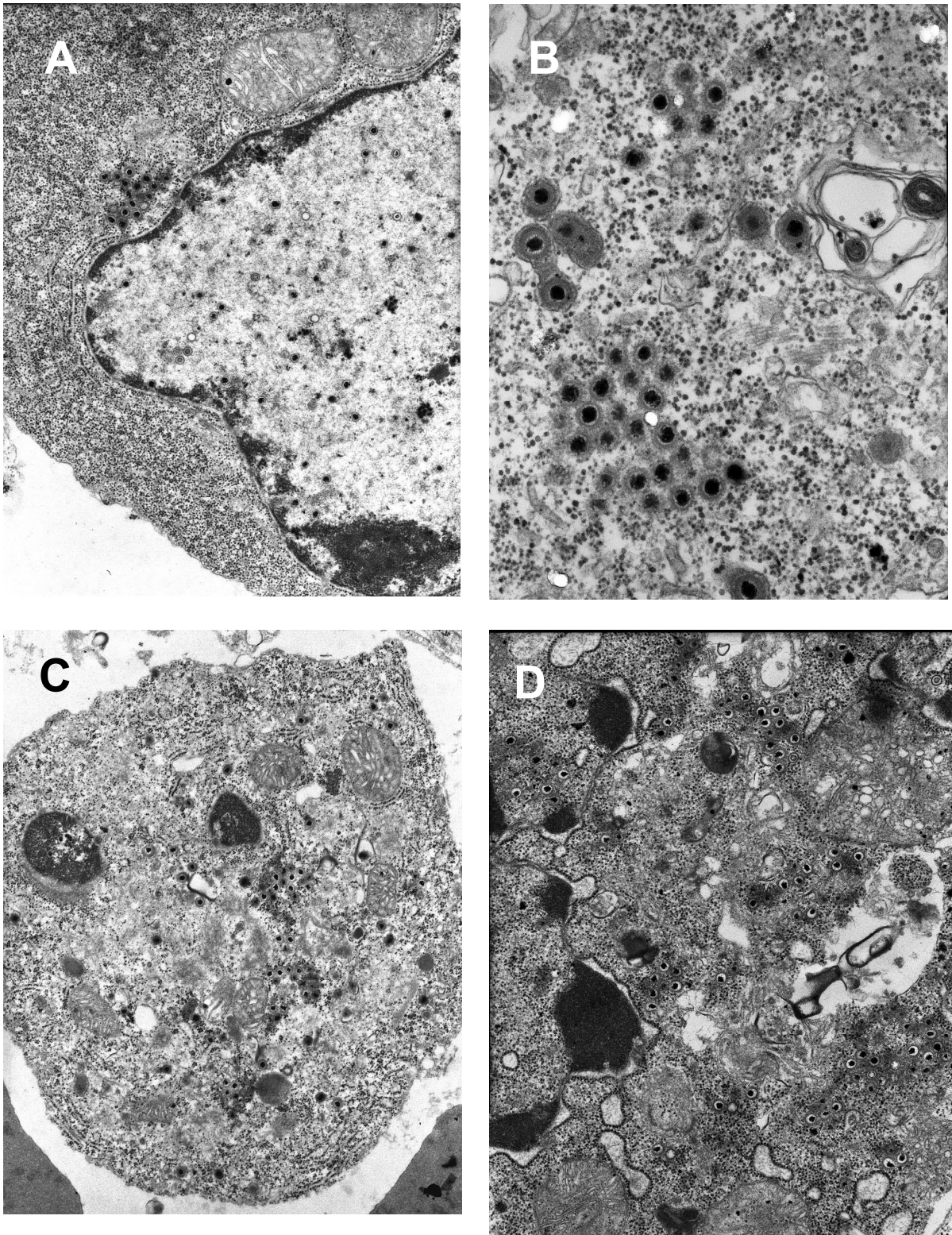


図 8

(A) 抗 GFHNV-IgY 非投与対照区の瀬死魚の腎臓造血細胞の電子顕微鏡像。ウイルス感染細胞には、核内に多数のヌクレオカプシドの形成、細胞質内にテグメントを形成するウイルス粒子がみられる。X 12000 (B) 同拡大図。細胞質内で、テグメントを形成するウイルス粒子やテグメントの周囲にエンベロープを形成した成熟ウイルス粒子 (virion) が多数みられる。X 30000 (C) 抗 GFHNV-IgY 受動免疫区の瀬死魚の腎臓造血細胞の電子顕微鏡像。核が崩壊し、細胞質内に多数のヌクレオカプシドが存在する。テグメントを形成するウイルス粒子は見られるが、virion は見られない。X 9000 (D) 同拡大図。細胞質内に多数の裸のヌクレオカプシドが存在するが、テグメントを形成するウイルス粒子も virion も見られない。X 15000

累積死亡率 80 %と比較して生残率が高くなった (有効率 87.5 %)。このように、抗 GFHNV-IgY を用いた受動免疫は GFHNV 感染防御に有効なことが実証された。

感染防御法を解明するため、病理組織学検討と電子顕微鏡観察を行った。 10^3 倍希釈および 10^4 倍希釈のウイルス液で攻撃した場合、抗 GFHNV-IgY 受動免疫区では、生残魚は腎臓造血組織と脾臓の脾髄にウイルス感染壊死病変は全く示さなかった。これは、体内に侵入した GFHNV が血液中の抗 GFHNV-IgY と抗原抗体反応をおこし、GFHNV が中和されたか、抗体と反応した GFHNV が細胞への感染を阻害されたため、結果として細胞が GFHNV の感染から免れたためと判断された。さらに、瀕死魚の腎臓造血組織を電子顕微鏡観察した結果、受動免疫した魚において特筆すべき変化が観察された。GFHNV 感染造血細胞は非免疫対照区と同様自然感染魚でも、GFHNV が細胞質内で virion が多数形成されるに至っても、核は崩壊を起こすことはない²⁾。他方、免疫した魚では、GFHNV 感染造血細胞はアポトーシス様変化 (以下アポトーシスと略記) を起こし、その細胞質内のウイルス粒子に virion は存在しなかった。この変化は、アポトーシスを起こした細胞は、ウイルス粒子の成熟を許しておらず、従って、virion が細胞外へ放出されることがないため、他の細胞へのウイルス伝播は起こりえない。ウイルス感染初期にこの現象が起これば、細胞間でのウイルス伝播が阻害され、結果的に免疫魚が生残したと判断された。コイヘルペスウイルスや GFHNV などヘルペスウイルスの感染細胞におけるウイルスの成熟過程は非常に複雑である。その過程は、核内でのウイルス DNA の増幅→ウイルス DNA を入れたヌクレオカプシドの形成→ヌクレオカプシドの核から細胞質への脱出→細胞質内でヌクレオカプシド周囲へのテグメント形成→テグメント周囲へのエンベロープ形成=成熟→細胞外への virion 放出²⁾ となる。そのため、宿主細胞がアポトーシスを起こして死んでしまえば、ヘルペスウイルスは成熟できなくなる。自然感染魚で宿主細胞がアポトーシスを起こさないのは、ヘルペスウイルスがアポトーシス阻害遺伝子を持ち、アポトーシス阻害タンパク質を感染細胞に作らせている可能性が否定できない。GFHNV

がこの遺伝子をもつかどうかは、今のところ全く未解明であるが、IgY で受動免疫した魚にアポトーシスが起これたという事実は、抗 GFHNV-IgY がアポトーシス阻害タンパク質を中和したことが推察される。

今回の研究で、IgY を用いた受動免疫では、IgY がウイルス粒子を中和するだけでなく、ウイルス遺伝子が作らせたタンパク質 (アポトーシス阻害タンパク質) も中和している可能性が解明できた。

文 献

1. JUNG S.-J., and MIYAZAKI T. (1995) Herpesviral hematopoietic necrosis of goldfish, *Carassius auratus* (L.) J. Fish Dis. **18** : 211-220
2. 宮崎照雄 (2007) 魚病アトラス・下巻 水産新潮社, 東京
3. STEPHENS F. J., RAIDAL S. R., and JONES B. (2004) Hematopoietic necrosis in a goldfish (*Carassius auratus*) associated with an agent morphologically similar to herpesvirus. Australian Vet. J. **82** : 167-169
4. GOODWIN A. E., SADLER J., MERRY, G. E., and MARECAUX E. N. (2009) Herpesviral haematopoietic necrosis virus (CyHV-2) infection : case studies from commercial goldfish farms. J. Fish Dis. **32** : 271-278
5. 安田雅大 (2008) コイヘルペスウイルス病に対する抗 KHV-IgY の受動免疫効果. 三重大学修士論文