

ISSN 0563-8461

東水試出版物通刊 No.352

東水試調査研究要報 No.196

# 魚病対策技術開発試験 結果報告書

(昭和59年～61年度、3カ年のとりまとめ)

昭和63年4月

東京都水産試験場

# 目 次

I はじめに .....	1
II IHN被害低減化試験 .....	2
1. IHNワクチン開発基礎試験 .....	2
1) IHNウイルスの不活化法の検討 .....	2
2) 不活化IHNウイルス液の保存法の検討 .....	5
3) 浸漬免疫の検討 .....	8
2. 迅速診断技法開発試験 .....	11
1) 蛍光抗体法の応用 .....	11
2) ニジマス血清中の抗IHNウイルス抗体迅速測定法の開発 .....	26
3. ニジマス親魚体腔液のウイルス検査 .....	27
4. 夏季、比較的高水温環境下におけるIHNの発生例 .....	29
III 細菌性鰓病に関する試験 .....	35
1. <i>Flavobacterium</i> sp. の養魚環境における生態 .....	35
2. 細菌性鰓病人工感染試験 .....	40
3. 細菌性鰓病と水質の関係 .....	48
IV 水カビ病に関する試験 .....	50
1. ヤマメの水カビ病発生に及ぼす飼育密度の影響 .....	50
2. ヤマメの水カビ病発生に及ぼす絶食の影響 .....	54
3. ヤマメの水カビ病発生に及ぼす取り扱いの影響 .....	55
4. 内臓真菌症人工感染試験 .....	57
V せっそう病被害低減化試験 .....	60
1. <i>Aeromonas salmonicida</i> の毒素産生に及ぼす培養基の影響 .....	60
2. <i>Aeromonas salmonicida</i> の薬剤感受性試験 .....	61
VI BKD(細菌性腎臓病)に関する調査 .....	62

Ⅶ 消毒剤に関する試験 .....	63
1. アルコール系消毒剤の <i>Aeromonas salmonicida</i> に対する殺菌効果.....	63
2. 低温下における逆性石けんの IHN ウイルスに対する効果 .....	65
Ⅷ 摘 要 .....	67
Ⅸ 引用文献 .....	69

---

試験実施機関： 東京都水産試験場 奥多摩分場

試験担当者： 主 事 森 真 朗（試験研究、とりまとめ）  
                  主 事 小 松 俊 夫（   "       "       ）  
                  主 事 池 谷 文 夫（   "       "       ）

## I. はじめに

近年、外国漁業水域での我国の漁獲量は厳しい国際情勢を反映し、著しく低下している。そのため、我国領海内での漁業生産の飛躍的増大が望まれ、沿岸漁業の見直しや栽培漁業の展開といった各種施策が提唱され、実施に移されている。なかでも、海面、内水面の養殖業に対する期待は大きく、さまざまな新技術が開発され、養殖生産の拡大が図られている。

養殖業の発展に伴って、魚病による被害も年々増加し、その被害額は養殖生産額の1割に達すると推測されている。養殖業の将来を左右する大きな要因は魚病問題であり、魚病問題の克服は水産養殖業に携わる試験研究機関に課せられた重要な責務である。

東京都水産試験場は早くから魚病問題に積極的に取り組んできた。その歴史を東京都水産試験場調査研究要報に沿ってたどってみると、昭和35年の「ニジマスの貧血を伴う肝臓脂肪代謝障害について」（調査研究要報№25）が魚病関係の最初の報告と思われる。次いで、昭和41～42年にサルファ剤の魚類に関する試験（№53, 54, 55, 56）が行われている。その後、国庫補助事業の指定調査研究総合助成事業に魚病が取り上げられ、東京都でも昭和44年、「昭和43年度指定調査研究総合助成事業、養殖魚類の病害研究報告書」（№71）、昭和45年、「昭和44年度指定調査研究総合助成事業、病害研究報告書（キンギョ）」（№77）、「昭和44年度指定調査研究総合助成事業、養殖魚類の病害研究報告書（ニジマス）」（№81）として報告されている。指定調査研究はその後も継続して行われ、要報№87, 88, 94, 98, 99, 107, 113, 121, 122, 129, 130, 135, 137, 138, 142, 148, 156, 159, 173が結果報告書である。

昭和59年度から、魚病対策を一層充実させるため、都単事業として魚病対策技術開発試験を新たに開始した。本報告書は昭和59年度から昭和61年度の3ヵ年間に、魚病対策技術開発試験で得られた成果を取りまとめたものである。目次に示すように、この間取り組んだ項目はIHN（伝染性造血器壊死症）被害低減化試験、細菌性鰓病に関する試験、水カビ病に関する試験、せつそう病被害低減化試験、BKDに関する調査、消毒剤に関する試験と多方面にわたっている。現在、東京都内の養鱒場で問題となっている疾病はIHNと細菌性鰓病であり、これら2つについては特に重点的に取り組んだ。

魚病研究は魚類生理学、病理学、血液学、ウイルス学、細菌学、真菌学、寄生虫学、免疫学など数多くの学問を基礎として成り立っている。これらすべてに精通するのは容易なことではない。そこで、本試験ではそれぞれの分野の専門家の人々と共同研究という形で仕事を進めた。IHN被害低減化試験の1部は東京水産大学水族病理学講座と、細菌性鰓病に関する試験の1部は東京大学水産第2講座と、水カビ病に関する試験の1部は東京水産大学養殖学講座及び日本獣医畜産大学魚病学教室と共同

で行った。共同研究に携わった諸先生および学生諸氏に衷心より御礼申し上げるとともに、東京都の魚類防疫施策の一層の発展に向け、今後とも円滑な形で共同研究が実施できるよう関係各方面の御配慮をお願い申し上げます。

## Ⅱ. IHN被害低減化試験

### 1. IHNワクチン開発基礎試験

#### 1) IHNウイルスの不活化法の検討

IHNワクチンとしては、弱毒生ワクチンと不活化ワクチンの2種類が考えられるが、試験中の安全性等を考慮し、不活化ワクチンを検討の対象とした。

IHNウイルスの不活化法として、 $\beta$ ・プロピオラクトンを用いる方法<sup>1)</sup>が報告されている。しかし、この方法は発癌性などの点で好ましいとは言えない。そこで、ホルマリンを用いた不活化法に焦点を当て、試験を行った。

#### (1) ホルマリンによる不活化

##### a 材料および方法

ホルマリン不活化IHNウイルスの調製：IHNウイルスの不活化は東京水産大学水族病理学講座により行われた。ここにはその概要を記載する。

細胞およびウイルス株：IHNウイルス長野株(HV7601)<sup>\*\*</sup>を、1%または2%牛胎児血清加MEM培地を用いて培養したEPC細胞あるいはFHM細胞に、 $10^2$ 又は $10^3$  TCID<sub>50</sub>/cellのM.O.I.で接種した。15℃で6~10日間培養し、細胞にCPEが現われ培養器底から剥離した時、ウイルス浮游液を3,000×g、20分間遠心分離し、精製した。

ウイルスの濃縮：精製されたウイルス浮游液を6%ポリエチレングリコール6000(PEG)と0.5M NaClの添加による沈澱操作により濃縮した。この濃縮浮游液を4℃で2時間攪拌し、更に3,000×g、20分間遠心分離した。沈渣を0.01M トリス緩衝液、pH7.76(5℃)に最初の1/20量となるよう再浮游した(20倍濃縮)。

不活化：濃縮したウイルス浮游液に0.05%、0.1%、0.2%、0.4%、0.8%のホルマリンを加え、4℃で培養した。培養後、チオ硫酸ナトリウムで中和、0.01M トリス緩

---

\*：ワクチン開発基礎試験にはこのIHNウイルス株を統一的に使用した。

以下の攻撃試験にもすべてこの株を用いた。

衝液に対し1夜、透析した。

不活化の確認：ホルマリン作用1～13日後のウイルス浮游液を希釈し、450nmのフィルターで濾過あるいは抗生物質で処理後、EPC細胞に接種し、不活化の確認を行った。

有効性の検討：ホルマリンで不活化したウイルス液の免疫原としての有効性を調べるため、ニジマス稚魚に0.1%ホルマリン-13日間、0.2%ホルマリン-6日間、0.4%ホルマリン-2日間処理し不活化したウイルス浮游液を腹腔内注射(0.05ml/尾)した。注射後、26日間(免疫期間)飼育したのち、生ウイルス腹腔内注射(0.05ml/尾)により攻撃した。攻撃ウイルスの力価は $10^{1.2}$ 、 $10^{3.2}$ 、 $10^{5.2}$  TCID<sub>50</sub>/mlの3段階とした。攻撃後、斃死状況を18日間観察、累積斃死尾数、斃死率、有効率を算出した。なお、有効率は次式により求めた。

$$\text{有効率}(\%) = \left( 1 - \frac{\text{試験群の斃死率}}{\text{対照群の斃死率}} \right) \times 100$$

計12区の試験区を設定し、1区あたり30尾のニジマス稚魚(平均体重1.1g)を供試した。試験期間中の水温は10.1～12.5℃、平均11.6℃であった。

#### b 結果

IHNウイルスの不活化に要するホルマリン濃度と作用時間：試験結果を表1に示す。IHNウイルスはホルマリン濃度0.1%-13日間、0.2%-6日間、0.4%-2日間、0.8%-1日間で不活化された。

表1. IHNウイルスのホルマリンによる不活化時間

ホルマリン濃度	日 数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	13	
0.8%	-	-								
0.4%	+	-								
0.2%			+	-	+	-				
0.1%					+	+	+	+		-
0.05%					+	+	+	+		+

4℃

(-)：感染性ウイルスは検出されなかった。

(+)：感染性ウイルスが検出された。

有効性の検討：生ウイルスで攻撃後、18日間の各試験区の累積斃死尾数、斃死率、有効率をとりまとめ、表2に示す。対照区の攻撃後の斃死率は攻撃ウイルス力価 $10^{1.2}$  TCID<sub>50</sub>/mlの区で62.1%、 $10^{3.2}$  TCID<sub>50</sub>/mlの区で93.3%、 $10^{5.2}$  TCID<sub>50</sub>/mlの区で76.7%と濃度レスポンスに若干の問題はあるものの各区とも60%以上であった。これに対し、0.1%ホルマリン-13日間および0.2%ホルマリン-6日間の不活化ウイルス浮游液注射区は1尾の斃死も認められず、有効率は100%であった。0.4%ホルマリン-2日間の不活化ウイルス浮游液注射区も、攻撃ウイルス力価 $10^{1.2}$  TCID<sub>50</sub>/mlの区で1尾斃死が認められただけで、有効率は94.7%、100%、100%であった。

表2. IHNウイルスの不活化に要するホルマリン濃度と処理時間

試験区	水槽番号	供試尾数	攻撃ウイルス力価	累積斃死尾数	斃死率(%)	有効率(%)
0.1%ホルマリン 13日間不活化 ウイルス注射区	1	30	1.2	0	0	100
	2	30	3.2	0	0	100
	3	30	5.2	0	0	100
0.2%ホルマリン 6日間不活化 ウイルス注射区	4	29	1.2	0	0	100
	5	30	3.2	0	0	100
	6	30	5.2	0	0	100
0.4%ホルマリン 2日間不活化 ウイルス注射区	7	30	1.2	1	3.3	94.7
	8	29	3.2	0	0	100
	9	30	5.2	0	0	100
対照区*	2	10	29	1.2	18	62.1
		11	30	3.2	28	93.3
		12	30	5.2	23	76.6

\*1:  $\log$  TCID<sub>50</sub>/ml

\*2: 3.5%チオ硫酸ナトリウムによるホルマリン中和液を注射

### c 考 察

表1及び表2に示したように、IHNウイルスはホルマリン濃度0.1%-13日間、0.2%-6日間、0.4%-2日間で不活化され、免疫原性も保持されていた。従って腹腔内注射法に関する限り、本試験で用いた調製法により有効なIHNワクチンを開発することができる。しかし、養鱒業は何十万、何百万の群単位の魚を取り扱う産業であり、それらに1尾1

尾腹腔注射することは非現実的である。次の段階として、浸漬法によるワクチン投与を考  
える必要があり、そのためのワクチン開発を検討しなければならない。

## 2) 不活化 IHN ウイルス液の保存法の検討

ワクチンの開発において保存方法の検討は重要である。例えば、試作されたワクチンの有効性  
の検討を距離的に離れた数カ所の試験機関で同時に行う場合、どうしても作製後の日数の異なる  
ワクチンを使用せざるを得ない。そこで、保存期間の長短によりワクチンの効力に差の出ない保  
存方法を明らかにするため、2つの試験を行った。第1は不活化ウイルス液に各種保存処理を施  
し保存しようとする試験、第2は無処理で4℃の低温に保存した場合、いつまで効力が持続する  
かという試験である。

### (1) 保存処理方法の検討

#### a 材料及び方法

##### 不活化 IHN ウイルス液の調製

IHN ウイルスの不活化は東京水産大学水族病理学講座により、(1) a に記載した方法、す  
なわちホルマリン濃度 0.2 %、4℃、6 日間で行われた。

##### 保存処理

保存処理として次の4種類の方法を試みた。① 0.01 % チメロザール添加、② 5 % グルコ  
ースと 5 % デキストランを保護剤として凍結乾燥、③ 7.5 % ラクトースを保護剤として凍結  
乾燥、④ 保護剤なしで凍結乾燥である。これらの保存処理方法で、4℃、20 日間保存した  
のち有効性の検討を行った。

##### 有効性の検討

静岡県富士養鱒場産のニジマス稚魚(1 腹仔、平均体重 1.0 g) に各種保存処理した不活  
化ウイルス液を腹腔内注射(0.05 ml/尾)した。注射後、21 日間(免疫期間)飼育した  
のち、生ウイルス腹腔内注射(0.05 ml/尾)により攻撃した。攻撃ウイルスの力価は $10^{2.4}$   
 $10^{4.4}$ 、 $10^{6.4}$  TCID<sub>50</sub>/ml の3段階とした。攻撃後、斃死状況を18 日間観察、累積  
斃死尾数、斃死率、有効率を算出した。計18 区の試験区を設定し、1 区あたり30 尾のニ  
ジマスを供試した。対照として作製直後の不活化ウイルス液を腹腔内注射した区と35 % チ  
オ硫酸ナトリウムによるホルマリン中和液を腹腔内注射した区を設けた。

#### b 結 果

攻撃後、18 日間の各試験区の累積斃死尾数、斃死率、有効率を取りまとめ、表3 に示す。  
作製直後の不活化ウイルス液で免疫した試験区の有効率は96.4 ~ 100 % と高く、ワクチ  
ンとしての有効性を再確認することができた。不活化ウイルス液の代わりにホルマリン中和



液を注射した区（水槽番号16～18）の斃死率は13.3～96.7%で、濃度レスポンスも認められた。

保存処理を行った試験区の中では、0.01%チメロザール添加区の有効率が65.6～100%、7.5%ラクトースを保護剤として凍結乾燥した区の有効率が65.9～92.6%と高かった。5%グルコースと5%デキストランを保護剤として凍結乾燥した区及び保護剤なしで凍結乾燥した区では、 $10^{6.4} \text{TCID}_{50} / \text{ml}$ のウイルス力価で攻撃した場合の有効率が17.3%及び31.0%と低かった。

表3. 不活化IHNウイルス液の保存方法の検討

保存方法	試験区	供試尾数	攻撃ウイルス力価 ( $\log \text{TCID}_{50} / \text{ml}$ )	累積斃死尾数	斃死率 (%)	有効率 (%)
チメロザール 添加	1	24	2.4	0	0	100
	2	30	4.4	2	6.7	86.6
	3	30	6.4	10	33.3	65.5
凍結乾燥保護剤 1 * 1	4	30	2.4	2	6.7	49.6
	5	29	4.4	4	13.8	72.4
	6	30	6.4	24	80.0	17.3
凍結乾燥保護剤 2 * 3	7 * 2					
	8	27	4.4	1	3.7	92.6
	9	30	6.4	10	33.3	65.6
凍結乾燥保護剤 なし	10	30	2.4	0	0	100
	11	30	4.4	2	6.7	86.6
	12	30	6.4	20	66.7	31.0
調製直後	13	27	2.4	0	0	100
	14	28	4.4	0	0	100
	15	28	6.4	1	3.5	96.4
対照区 * 4	16	30	2.4	4	13.3	
	17	30	4.4	15	50.0	
	18	30	6.4	29	96.7	

\* 1 : 5%グルコース + 5%デキストラン

\* 2 : 操作上のトラブルのため実施しなかった。

\* 3 : 7.5%ラクトース

\* 4 : 35%チオ硫酸ナトリウムによるホルマリン中和液を注射。

(2) 4℃における保存性の検討

a 材料及び方法

不活化IHNウイルス液の調製

IHNウイルスの不活化は東京水産大学水族病理学講座により、(1)aに記載した方法とほぼ同様の方法で行われた。異なる点は、ウイルスを濃縮後、20キロサイクルの超音波発生装置を用いて、100ワットの出力で1ml当たり2秒間処理し、塊状のウイルスを分散させたのち、ホルマリン濃度0.2%、4℃、5日間不活化した点である。

保存方法

調製された不活化ウイルス液を4℃で低温保存し、調製1週間後、2週間後、3週間後に取り出し、有効性の検討を行った。

有効性の検討

4℃で低温保存した不活化ウイルス液を、奥多摩分場産ニジマス稚魚(平均体重1.5g)に腹腔内注射(0.05ml/尾)した。注射後、14日間(免疫期間)飼育したのち、生ウイルス腹腔内注射(0.05ml/尾)により攻撃した。攻撃ウイルスの力価は $10^{2.5}$ 及び $10^{3.5}$ TCID<sub>50</sub>/gの2段階とした。攻撃後、斃死状況を21日間観察、累積斃死尾数、斃死率、有効率を算出した。計12区の試験区を設定し、1区あたり25尾のニジマスを供試した。対照として3.5%チオ硫酸ナトリウムによるホルマリン中和液を腹腔内注射した区を設けた。飼育には3ℓ容のプラスチック製水槽を用い、循環方式で行った。

b 結果

攻撃後、21日間の各試験区の累積斃死尾数、斃死率、有効率を取りまとめ、表4に示す。4℃、1週間保存した時の有効率は80及び87.5%、2週間では45及び60%、3週間では50及び62%であった。

表4. IHN不活化ウイルス液の4℃における保存期間の検討

保存期間	試験区	攻撃ウイルス 力価(log TCID <sub>50</sub> /ml)	供試尾数	累積斃死 尾数	斃死率 (%)	有効率 (%)
1週間保存	ワクチン区	2.5	25	4	16	80.0
		3.5	25	2	8	87.5
	対照区	2.5	25	20	80	—
		3.5	25	16	64	—
2週間保存	ワクチン区	2.5	25	6	24	45.0
		3.5	25	8	32	60.0
	対照区	2.5	25	11	44	—
		3.5	25	20	80	—
3週間保存	ワクチン区	2.5	25	3	12	50.0
		3.5	25	3	12	62.0
	対照区	2.5	25	6	24	—
		3.5	25	8	32	—

### (3) 不活化 IHN ウイルス液の保存に関する考察

ワクチンの保存方法として理想的な方法は、作製直後の効力をそのまま保持していることである。各種保存処理を施した場合の結果(表3)を斃死率について見ると、作製直後の不活化ウイルス液で免疫し  $10^{6.4}$  TCID<sub>50</sub>/ml のウイルス力価で攻撃した場合(水槽番号15)、斃死率はわずか3.5%であるのに対し、保存処理を施した場合は33.3~80.0%と高くなった。従って、0.01%チメロザール添加や7.5%ラクトースを保護剤として凍結乾燥するなど、有効率から見て有望と思われる保存方法は見い出せたものの、保存処理方法については更に検討する必要があると考えられる。

保存処理を何ら施さず、4℃の低温で保存した場合、表4に示すように、1週間の保存では有効率80及び87.5%と高かったが、2週間及び3週間保存では45~62%に低下した。有効率80及び87.5%という数字は保存処理を行った場合の有効率の数字と比較しても見劣りしないものであった。したがって、現時点では不活化 IHN ウイルス液は作製後そのまま4℃で保存し、1週間以内に使用することが望ましいと言えよう。

## 3) 浸漬免疫の検討

1) で述べたように、不活化 IHN ウイルス液は腹腔内注射法により高いワクチン効果を示した。次の段階として、浸漬法によるワクチネーションの可否を検討する必要がある。浸漬法を検討する場合、注射法に比べ大量の不活化 IHN ウイルス液が必要となる。幸い、東京水産大学水族病理学講座で浸漬法を検討するに足る量の不活化 IHN ウイルス液が調製されたので、それを用いて浸漬免疫の検討を行った。

### (1) 材料及び方法

#### 不活化 IHN ウイルス液の調製

IHN ウイルスの不活化は東京水産大学水族病理学講座により、2)(2)に記載したとりの方法、すなわち、ウイルスを濃縮後、超音波処理し、その後ホルマリンで不活化するという方法で行われた。

#### 供試魚

奥多摩分場産ニジマス稚魚(1腹仔、感染実験室内でふ化、餌付、飼育したもの。浸漬免疫時の平均体重は1.2gであった)。

#### 浸漬免疫

調製された不活化ウイルス液を2倍および20倍に希釈し供試魚を浸漬した。

##### a 2倍希釈液による浸漬

不活化ウイルス液(原液)86.5mlを飼育水で2倍に希釈し173mlの浸漬液とした。

500 ml容ガラス製メスシリンダーに浸漬液を入れ、ウォーターバスで液温を13℃に保持した。これに供試魚130尾を入れ、通気しながら1分間浸漬した。浸漬時の魚の密度は0.9 g/mlであった。浸漬後、流水式ガラス水槽に魚を移し、5分間観察、異常のないことを確かめ、再度同一の浸漬液に1分間魚を入れ浸漬した。この操作を計5回繰り返した。2倍希釈の不活化ウイルス液に合計5分間魚を浸漬したことになる。作業終了後、魚を流水式ガラス水槽に移し、飼育した(免疫期間)。

b 20倍希釈液による浸漬

不活化ウイルス液(原液)8.65 mlを飼育水で20倍に希釈し1730 mlの浸漬液とした。3 l容のポリエチレン製標本瓶に5% NaCl液1 lを準備し、ウォーターバスで液温を13℃に保持した。そこに供試魚130尾を収容し、通気しながら2分間前処理した。3 l容ポリエチレン製標本瓶に20倍希釈した浸漬液を入れ、13℃に保持し、そこに前処理の終わった供試魚130尾を入れ、通気しながら3時間浸漬した。魚の密度は0.09 g/mlであった。浸漬終了後、魚を流水式ガラス水槽に移し、飼育した(免疫期間)。

c 追加免疫(ブースター)

第1回浸漬免疫の2週間後、追加免疫として、同様に調製した2倍希釈および20倍希釈浸漬液を用いて、同様の方法で供試魚を浸漬した。

有効性の検討

第1回浸漬免疫の1ヵ月後(追加免疫2週間後)、浸漬法により攻撃した。3 l容ポリエチレン製標本瓶に飼育水1 lを入れ、生ウイルス液を1 ml添加した。その溶液に供試魚20尾を収容し、通気しながら1時間浸漬した。液温はウォーターバスで13℃に調整した。攻撃ウイルスの力価は $10^{5.5}$ 、 $10^{4.5}$ 、 $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlの3段階とした。各攻撃ウイルス力価に対し2区の試験区を設定した。対照として不活化IHNウイルス液による浸漬処理を行わない区を設けた。攻撃後、斃死状況を21日間観察、累積斃死尾数、斃死率、有効率を算出した。攻撃後の飼育は、3 l容のプラスチック製水槽を用い、循環方式で行った。飼育水温は13±1℃に設定した。

(2) 結果

攻撃後21日間の各試験区の累積斃死尾数、斃死率、有効率をとりまとめ、表5に示す。対照区の斃死率は、攻撃ウイルス力価 $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlで55及び45%、 $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlで40及び45%、 $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlで25及び25%であった。これに対し、20倍希釈不活化ウイルス液浸漬区は、攻撃ウイルス力価 $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlで30及び5%、 $10^{4.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlで0及び0%、 $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlで0及び0%であり、また、2倍希釈不活化ウイルス液浸漬区は、攻撃ウイルス力価 $10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub>/mlで15及び5%、

10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mlで10及び10%、10<sup>3.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mlで5及び5%であった。

有効率をみると、20倍希釈液浸漬区は、攻撃ウイルス力価10<sup>5.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mlで45及び89%、10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mlで100及び100%、10<sup>3.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mlで100及び100%であり、2倍希釈液浸漬区は、10<sup>5.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mlで73及び89%、10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mlで75及び78%、10<sup>3.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mlで80及び80%であった。

### (3) 考 察

AMEND and FENDER (1976)<sup>2)</sup>により高張処理浸漬で雄牛血清アルブミンがニジマスに取り込まれることが報告されて以来、浸漬法による魚のワクチネーションが脚光を浴びようになり、ANTIPA and AMEND(1977)<sup>3)</sup>、CROY and AMEND<sup>4)</sup>(1977)、SONG and KOV(1981)<sup>5)</sup>、AOKIら(1984<sub>a</sub>)<sup>6)</sup>、(1984<sub>b</sub>)<sup>7)</sup>、KAWANOら(1984)<sup>8)</sup>により、細菌性疾病に対する対策の1つとして、浸漬法による魚のワクチネーションが試みられている。

表5. 不活化IHNVウイルス液を用いた浸漬免疫の検討

試 験 区	攻撃ウイルス 力価 (log TC ID <sub>50</sub> /ml)	供試尾数	累積斃死 尾 数	斃 死 率 (%)	有 効 率 (%)
20倍希釈不活化 IHNVウイルス液 浸 漬 区	3.5	20	0	0	100
	3.5	20	0	0	100
	4.5	20	0	0	100
	4.5	20	0	0	100
	5.5	20	6	30	45
	5.5	20	1	5	89
2倍希釈 不活化 IHNVウイルス液 浸 漬 区	3.5	20	1	5	80
	3.5	19	1	5	80
	4.5	20	2	10	75
	4.5	20	2	10	78
	5.5	20	3	15	73
	5.5	20	1	5	89
対 照 区	3.5	20	5	25	—
	3.5	20	5	25	—
	4.5	20	8	40	—
	4.5	20	9	45	—
	5.5	20	11	55	—
	5.5	20	9	45	—

城(1981)<sup>9)</sup>その他の研究により、アユのビブリオ病に対しては、ホルマリン不活化ワクチンが実用段階に入っている。

魚のウイルス性疾病に対しては有効な治療法がなく、ワクチンによる対応が最も望まれているにもかかわらず、研究開発はほとんど試みられなかった。魚病の治療の場合、ヒトの病気治療と異なり、経済効率が常に前提になり、経済的に有利でなければ、それがいくら優れた方法であろうと魚病対策のテーブルに乗ることはない。ウイルス性疾病に対するワクチンの開発研究の遅れも、経済性の点に問題があるためと思われる。効果の有無が不明な段階で、牛胎児血清等高価な消耗品を必要とするウイルスワクチンの開発に着手することは多分に困難性が伴うであろう。

今回の試験は、ウイルスワクチン開発のためのパイロット的試みとして実施した。表5に示すように、対照区の斃死率がやや低く問題はあつたものの、不活化ウイルス液原液の2倍あるいは20倍希釈液に魚を浸漬したところ、非常に高い有効率が得られ、生ウイルスで攻撃後3週間の観察期間中、1尾の斃死も認められない試験区もあつた。通常、有効率が60%以上あればそのワクチンは効果ありと判定される。今回の試験では12区の試験区のうち11区が有効率60%以上で、“劇的な”効果が認められたと言っても過言ではないであろう。

アユのビブリオ病のワクチン開発途上でもしばしば見られたが、試験場所によりワクチン効果のバラつくことがある。ラット、マウスなどの哺乳類を用いる場合と異なり、実験動物としての魚類が未だ確立されていないため、供試魚の系統によっても試験結果は変動する。したがって、1ヵ所の試験結果では結論的には断言できないが、今回の試験より少し遅れて、東京水産大学水族病理学講座及び山形県内水面水産試験場、埼玉県水産試験場の3ヵ所で、同一の調製法で作製された不活化IHNVウイルス液による同様の試験が行われた。それらの結果は今回の結果と合わせて、近い将来報告されることになっている。今回の結果と同程度の結果が得られれば、本格的にIHNVウイルスワクチンの開発に、関係団体、関係機関挙げて取り組む必要があるであろう。

## 2. 迅速診断技法開発試験

### 1) 蛍光抗体法の応用

養殖現場で用いられる魚病の診断技法は、正確、迅速、簡便かつ経済的でなければならない。IHNVの診断は、通常、ウイルス分離用検体(病魚内臓のホモジナイズ液など)を感受性のある細胞培養(EPC細胞など)に接種し、15℃で培養を続け、特徴的なCPE(細胞変性効果)の発現を観察するという方法で行われる。しかし、この方法では、病魚材料を採集後、診断を下すまでに最低4~5日間を要し、対策が遅れがちとなる。そこで診断の迅速化を目指し、蛍光抗

体法の導入を試みた。順序として、まず、実験室内で有効性を検討し、次いで野外調査に応用した。

(1) 有効性の検討

a) 材料および方法

a) チャンバースライドを用いる方法

供試株化細胞：CHSE 214（東京水産大学水族病理学講座より分与を受け、継代培養した Chinook salmon embryo 由来の株化細胞）。

供試抗血清：抗 IHN ウイルス・ウサギ血清（同上より分与を受け、供試するまで -80℃ に保存した。以下、抗 IHN V 血清）。

接種ウイルス材料：養魚池で自然発病したニジマス IHN 病魚の腎臓のホモジナイズ液。

チャンバースライド：ラボテック社製 8 チャンバースライド。

2 次抗体：FITC 標識プロテイン A（ファルマシア社製）。

反応行程：チャンバースライドを用いた蛍光抗体法の反応行程を図 1 に示す。すなわち、チャンバースライドに CHSE 214 細胞を培養、それにウイルス材料を接種、15℃ で 15～20 時間培養しウイルスを増殖させた。ついで細胞が剥がれ落ちないように注意しながら、Hanks' BSS (pH 7.4～7.6) で 5 分間ずつ 3 回、液を変えて洗浄した。ドライヤーの冷風で乾燥後、4℃ の冷アセトンで 30 分間前処理。風乾ののち、抗 IHN V 血清を 0.05 ml/チャンバーの割合で細胞上に盛り、湿潤箱に入れ、20℃ で 90 分間作用させた。作用終了後、リン酸緩衝食塩水で 5 分間ずつ 3 回、液を変えて洗浄した。つぎに、FITC 標識プロテイン A (10 μg/ml) を 0.05 ml/チャンバーの割合で細胞上に盛り、20℃ で 60 分間作用させた。作用終了後、リン酸緩衝食塩水で 5 分間ずつ 3 回、液を変えて洗浄、炭酸重炭酸緩衝無蛍光グリセリンで封入し、落射式蛍光顕微鏡 (NIKON) を用いて観察した。

細胞準備：CHSE 214、8 チャンバースライド (ラボテック) 15℃、24 時間

↓  
検査材料接種

↓  
培養：15℃、15～20 時間

↓  
洗浄：Hanks' BSS (pH 7.4～7.6)、5 分間ずつ 3 回

↓  
風乾

↓  
前処理：4℃、アセトン、30 分間

↓  
風乾

↓  
1 次反応：希釈抗 IHN V 血清 (×20)、0.05 ml/チャンパー、20℃、90 分間

↓  
洗浄：洗浄液 (0.01 M リン酸緩衝食塩水、pH 7.2)、5 分間ずつ 3 回

↓  
2 次反応：FITC 標識プロテイン A、10 μg/ml、0.05 ml/チャンパー、20℃、60 分間

↓  
洗浄：洗浄液、5 分間ずつ 3 回

↓  
封入・観察：炭酸重炭酸緩衝無蛍光グリセリン (pH 8.5)、落射式蛍光顕微鏡

図 1 チャンバースライドを用いた蛍光抗体法の反応行程

## b) 臓器塗抹標本を用いる方法

臓器塗抹標本の作製：養魚池で自然発病したニジマス IHN 病魚から腎臓及び脾臓を摘出し、断面を蛍光抗体法用無蛍光スライドグラスに塗抹した。

供試抗血清および 2 次抗体：いずれも a) と同一のものを使用した。

反応行程：臓器塗抹標本を用いた蛍光抗体法の反応行程を図 2 に示す。すなわち、腎臓、脾臓の塗抹標本を作製後、風乾。4℃の冷アセトンで 30 分間前処理した。風乾ののち、抗 IHN V 血清を 0.02 ml ずつ塗抹部分に盛り、湿潤箱に入れ、20℃で 90 分間作用させた。作用終了後、リン酸緩衝食塩水で 5 分間ずつ 3 回、液を変えて洗浄した。次に、FITC 標識プロテイン A (10 µg/ml) を 0.02 ml ずつ塗抹部分に盛り、20℃で 60 分間作用させた。作用終了後、リン酸緩衝食塩水で 5 分間ずつ 3 回、液を変えて洗浄、炭酸重炭酸緩衝無蛍光グリセリンで封入、落射式蛍光顕微鏡 (NIKON) を用いて観察した。

臓器塗抹標本作製：腎臓、脾臓

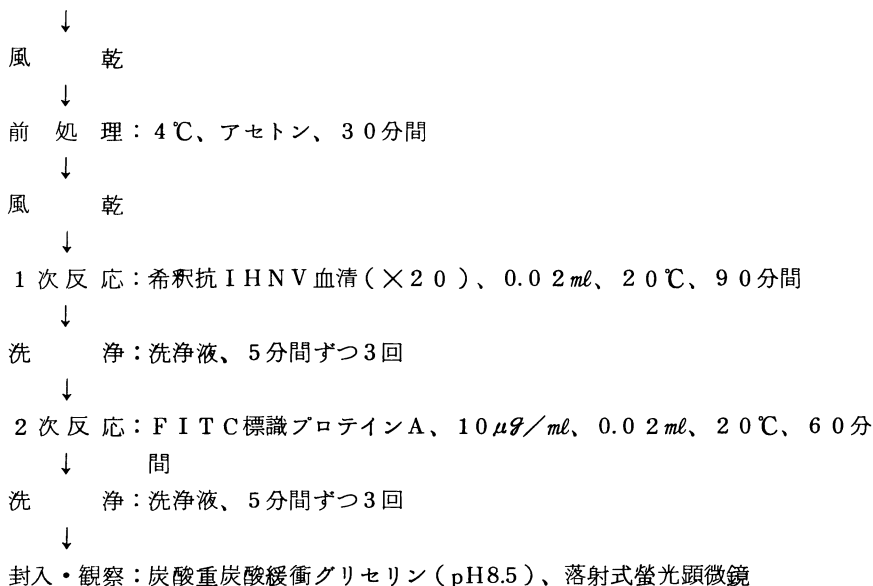


図 2 臓器塗抹標本を用いた蛍光抗体法の反応行程

## b 結 果

### a) チャンバースライドを用いる方法

チャンバースライドを用いて行った蛍光抗体法の IHN ウイルス陽性像を写真 1 に示す。黄緑色の特異蛍光を発する IHN ウイルスが CHSE 214 細胞の細胞質内に認められる。



チャンバースライドを用いた場合、細胞準備から観察終了まで3日間必要であった。

b) 臓器塗抹標本を用いる方法

IHN病魚の腎臓及び脾臓の塗抹標本を用いて行った蛍光抗体法のIHNウイルス陽性像を写真2及び写真3に示す。黄緑色の特異蛍光を発するIHNウイルスが所々に認められる。

臓器塗抹標本を用いた場合、塗抹標本作製から観察終了までに要する時間は数時間であった。

c) 考 察

蛍光抗体法は免疫組織化学的方法の1つであって、抗体のマーカに蛍光色素を用い、蛍光顕微鏡下に励起された蛍光を観察することによって抗原の所在を探る方法である。本法は免疫組織化学的方法の中で最も早く確立された方法で、1940年代の初頭、COONSらが開発に着手し、1950年代にほぼ確立し、今日では免疫組織化学の代表的方法の1つとなっている。<sup>10)</sup>

魚病診断の分野への蛍光抗体法の利用例としては、BULLOCK and STUCKEY<sup>11)</sup>が細菌性腎臓病に、KITAO and KIMURA<sup>12)</sup>及び森ら<sup>13)</sup>が養殖ハマチの類結節症に、楠田ら<sup>14)</sup>がブリの主要疾病に、渡辺ら<sup>15)</sup>がマス類のIHNに、<sup>16), 17), 18), 19), 20)</sup>佐野・西村がマス類のIPN及びIHNに、それぞれ応用している。

本研究では、蛍光抗体法をマス類のIHNの迅速診断に応用した。従来、IHNの診断は細胞培養を用い、病魚からIHNウイルスを分離するという方法で行われてきた。従来の方法では、感受性のある株化細胞の維持・継代、検査材料のホモジナイズ及び希釈など、複雑な作業を必要とし、IHNのCPE発現にも最低4～5日間必要であった。病気発生の場合、養鱒業者は一刻も早い診断と対策指導を水産試験場に期待している。今回検討した蛍光抗体法では、チャンバースライドを用いた場合は3日間、臓器塗抹標本を用いた場合はわずか数時間でIHNウイルスを検出することができた。どちらを用いても、従来の方法よりはるかに早く診断を下すことができる訳で、養鱒業者の期待に十分応えることができる。

チャンバースライドを用いる方法と臓器塗抹標本を用いる方法を比較すると、チャンバースライド法は手法がやや複雑で、洗浄操作などに注意を要し、診断に3日程度必要であるが、夾雑物に影響されず、比較的クリアな陽性像を得ることができる。臓器塗抹標本を用いる方法では、反応行程は数時間で終了するが、塗抹の仕方(厚薄)や夾雑物による非特異蛍光の存在など、判定に苦勞する場合がある。したがって、時と場合により、両者を上手に使い分けることが必要である。

蛍光抗体法を効果的に実施するには、染色力価の高い、精製された抗血清が不可欠である。

幸い、本研究では東京水産大学水族病理学講座により試作された、染色力価1280倍という高品質の抗血清を使用することができた。今後の問題として、今回用いたような高品質の抗血清を安定的に入手できるように供給体制の確立が必要である。

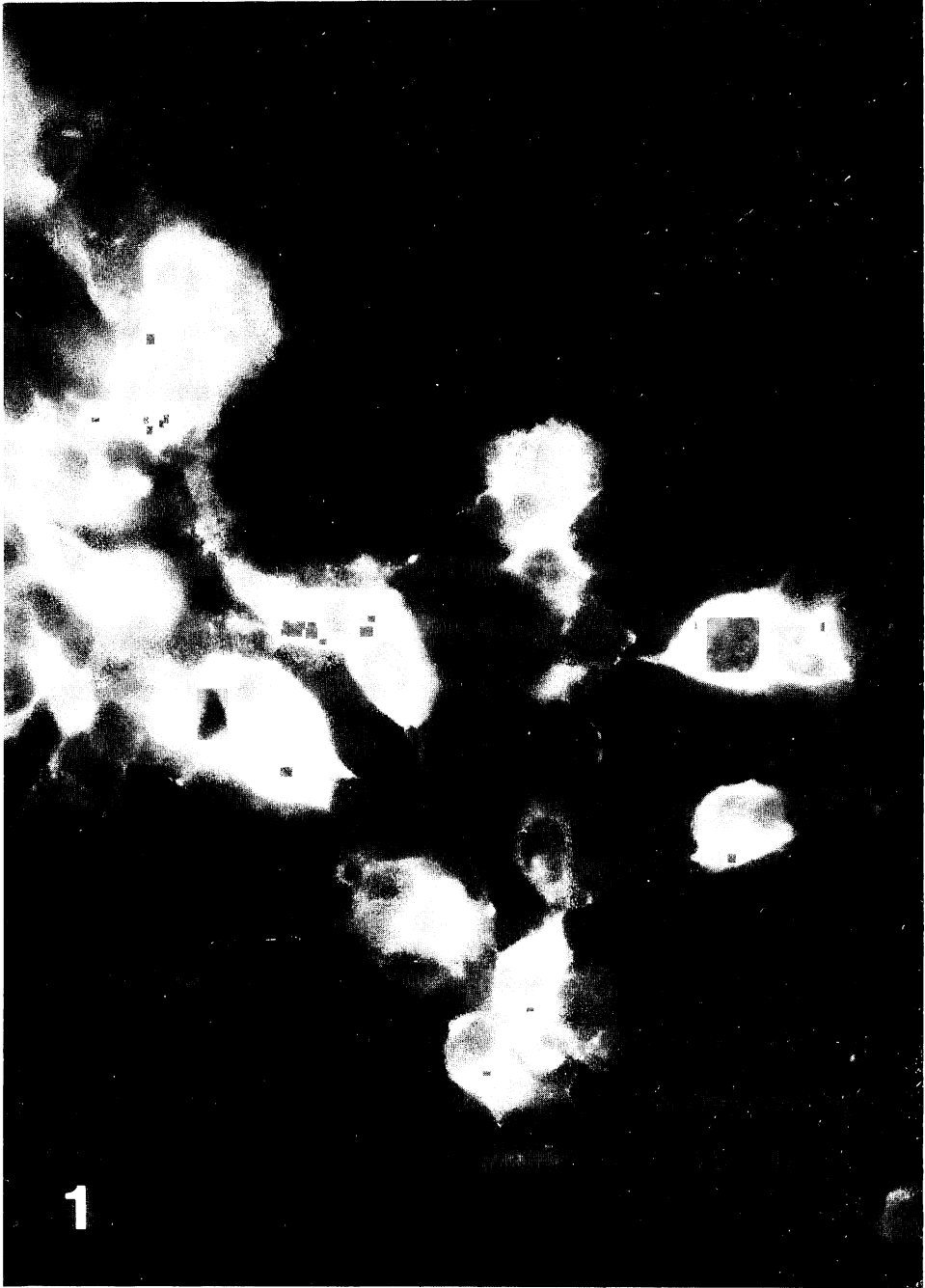


写真1 チャンバースライドを用いて行った蛍光抗体法のIHNウイルス陽性像

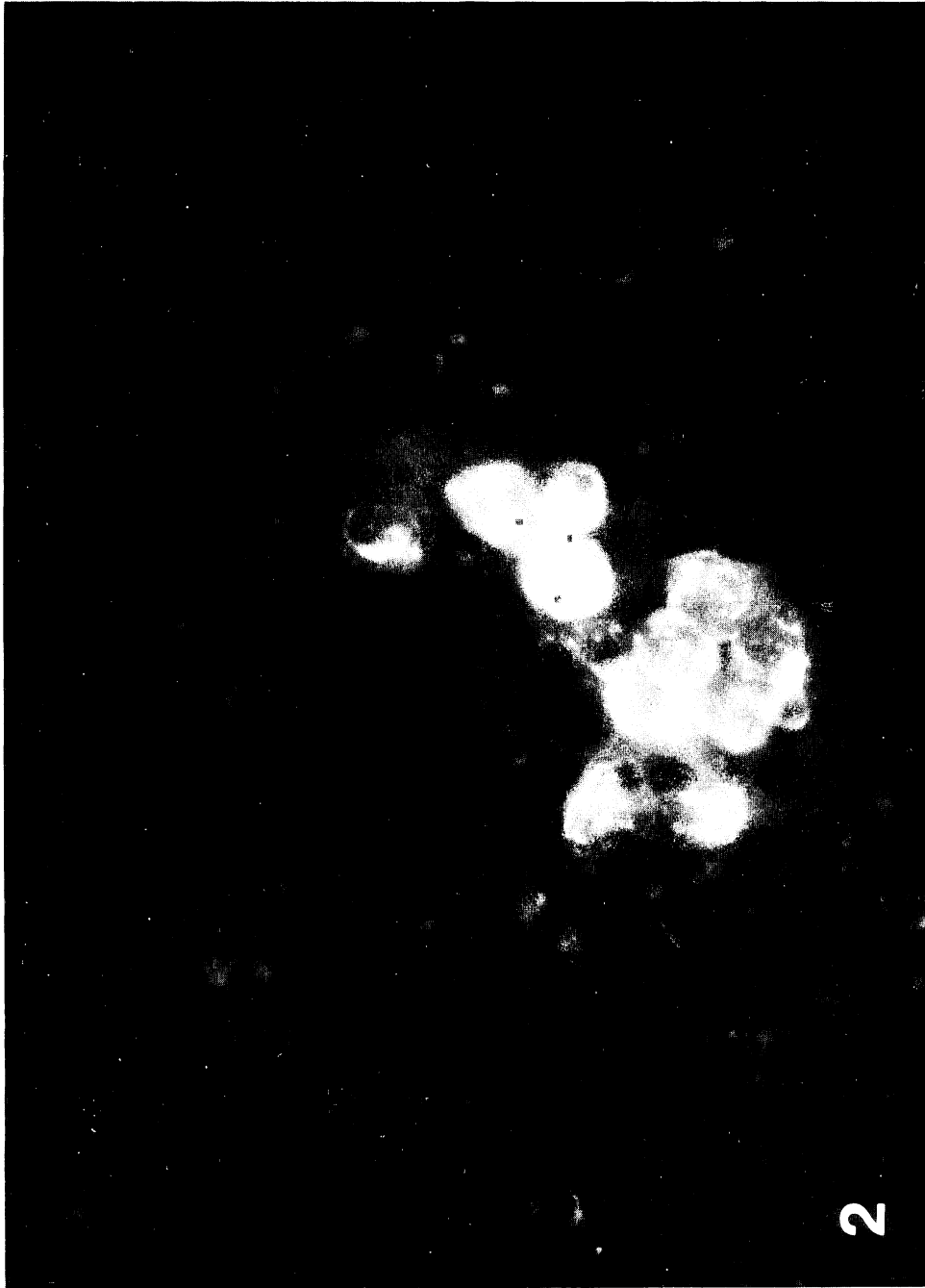


写真2 腎臓塗沫標本に対して行った蛍光抗体法のIHNウイルス陽性像

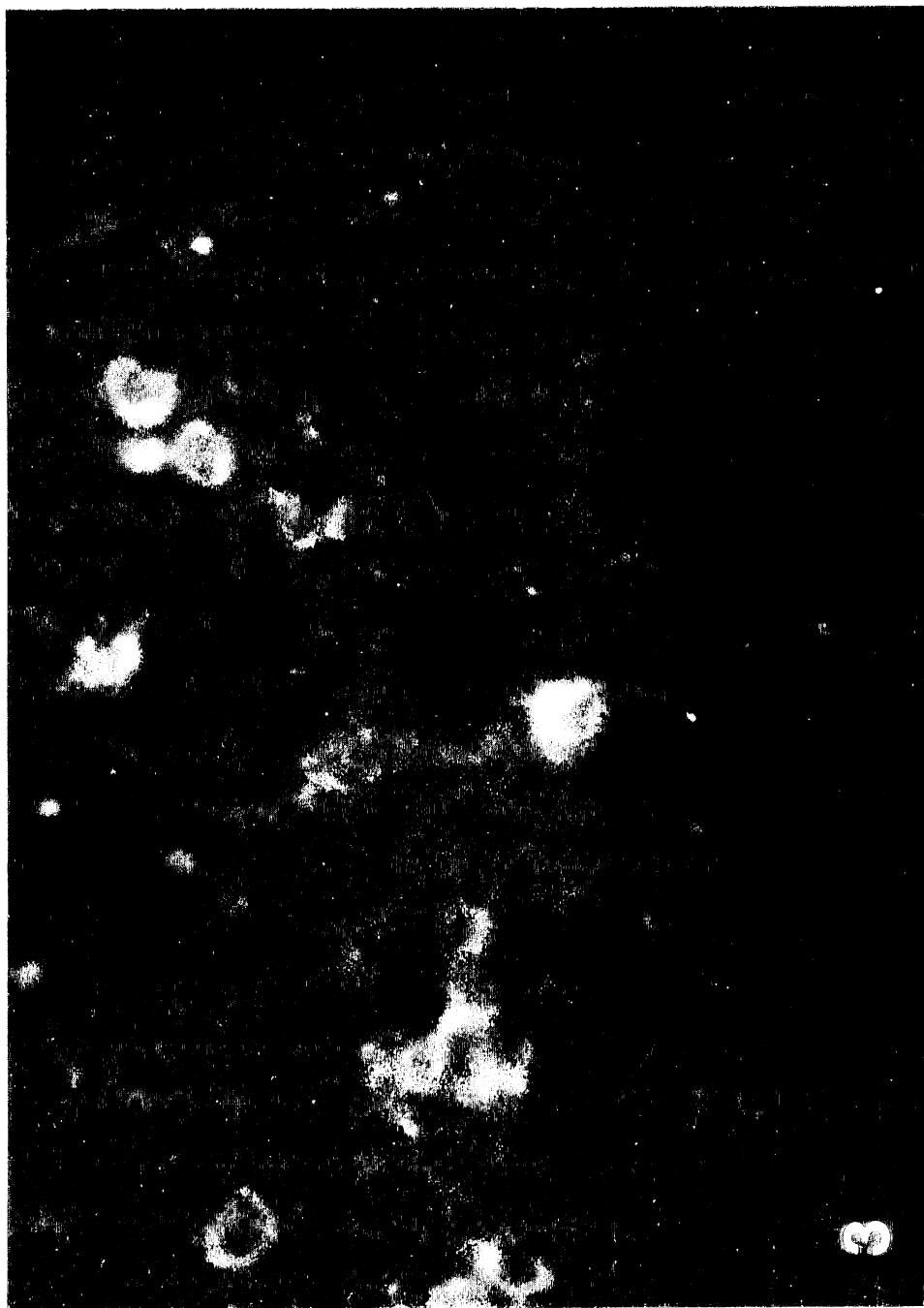


写真3 脾臓塗沫標本に対して行った蛍光抗体法のIHNウイルス陽性像

(2) 野外調査での応用

実験室内で行った検討結果から、蛍光抗体法は I H N の迅速診断法として利用価値の高いことが判明した。今後、I H N の迅速診断法として蛍光抗体法を普及していくには養殖現場で実際に診断に利用し、例数を積み重ねる必要がある。そこで、東京都内の養鱒場で、I H N による斃死の疑いのあるニジマス、ヤマメを採集し、それらを検査材料として蛍光抗体法による迅速診断を試みた。同時に、細胞培養を用いた従来の I H N ウイルス分離法による診断も実施し、両者の結果を比較検討した。

a 材料及び方法

供試魚の採集：東京の多摩地域に分布する養鱒場を図 3 に示す。本研究に用いた供試魚は、この図に示す養鱒場へ魚病診断に向いて採集した。採集月日、場所、魚種、検査尾数は表 6 に示すとおりである。

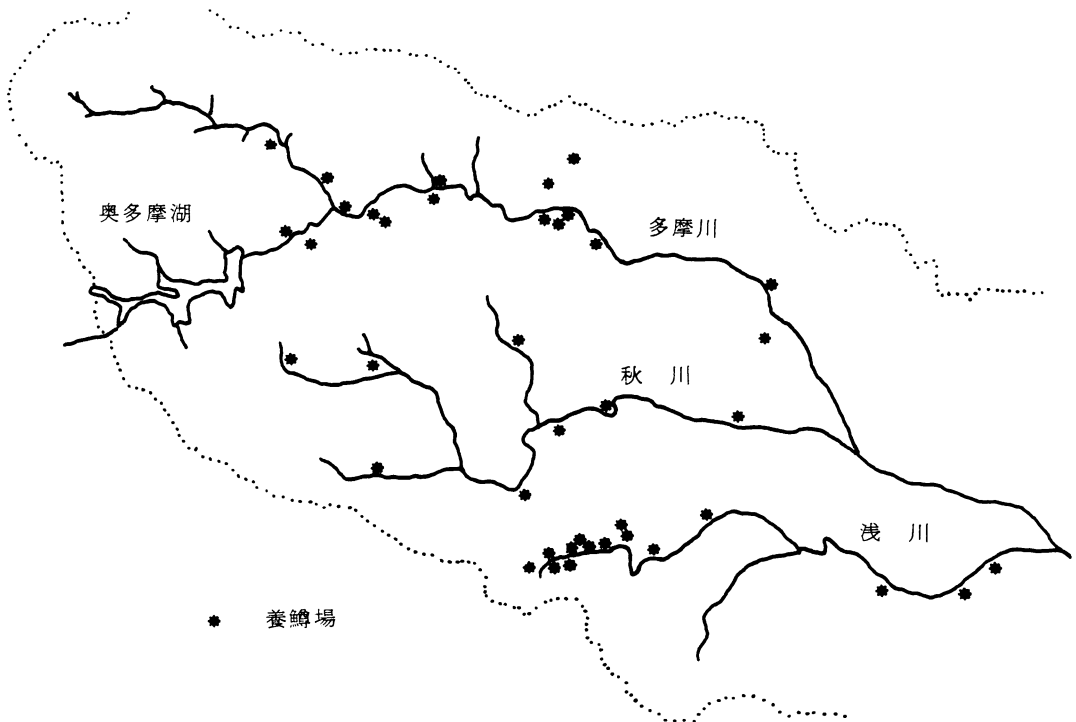


図 3. 多摩地域の養鱒場の位置図

表 6. 供試魚の採集月日、場所、魚種、検査尾数

採集月日	採集場所	魚種	検査尾数
5月29日	A 養鱒場	ニジマス	10
5月29日	B 養鱒場	ニジマス	10
7月10日	C 養鱒場	ヤマメ	10
9月13日	D 養鱒場	ニジマス	9
10月2日	E 養鱒場	ニジマス	4
10月3日	F 養鱒場	ニジマス	5
11月28日	G 養鱒場	ニジマス	7

蛍光抗体法：本研究では臓器塗抹標本を用いて蛍光抗体法を実施した。養鱒場で採集した検査対象魚を氷冷して実験室に持ち帰り、小型魚の場合は内臓全体を用いて、大型魚の場合は腎臓、脾臓、肝臓の臓器別に、蛍光顕微鏡用リングマーク付スライドグラス（マツナミ製）上に臓器を塗抹し、臓器塗抹標本を作製した。風乾ののち、4℃の冷アセトンで30分間前処理し、図2の反応行程に従い、蛍光抗体法を実施した。

細胞培養法によるIHNウイルスの分離と定量：検査材料からのウイルス分離はEPC細胞を用い、マイクロプレート法により行った。ウイルスの定量は50%感染終末点（TCID<sub>50</sub>）法により行った。なお、ウイルスの定量限界は10<sup>2.8</sup> TCID<sub>50</sub>/gであった。

#### b 結果

A 養鱒場で採集したニジマス稚魚について行った診断結果を表7に示す。魚体番号529-1、529-5、529-6、529-7はウイルス分離法ではIHNウイルスが検出されたが、蛍光抗体法による判定は陰性であった。魚体番号529-1及び529-5のウイルス力価は、それぞれ $\leq 10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub>/g、 $\leq 10^{3.3}$  TCID<sub>50</sub>/gと少なかった。魚体番号529-8、529-9、529-10はウイルス分離結果と蛍光抗体法の判定結果がともに陽性で一致した。

魚体重の範囲は0.7～1.5g、採集時の水温は11.0℃であった。

表7. A養鱒場で採集したニジマスのIHNウイルス分離法による  
診断結果と蛍光抗体法による診断結果の比較

魚体番号	魚種	体重(g)	ウイルス分離法		蛍光抗体法
			分離	力価	
0529-1	ニジマス	1.1	+*1	$\leq 3.1 * 2$	-
0529-2	"	1.1	-	<2.8	-
0529-3	"	1.5	-	<2.8	-
0529-4	"	0.7	-	<2.8	-
0529-5	"	1.3	+	$\leq 3.3$	-
0529-6	"	0.8	+	5.8	-
0529-7	"	1.0	+	5.3	-
0529-8	"	0.8	+	5.5	+
0529-9	"	0.8	+	6.3	+
0529-10	"	0.7	+	6.3	+

\*1: IHNウイルスの典型的CPEが認められた。

\*2:  $\log TCID_{50} / g$

採集時の水温: 11.0℃

B養鱒場で採集したニジマス稚魚の診断結果を表8に示す。検査した10尾すべてからIHNウイルスが検出され、蛍光抗体法による判定もすべて陽性であった。ウイルス力価は  $10^{5.3} \sim 10^{7.6} TCID_{50} / g$ 、採集時の水温は12.0℃であった。

C養鱒場で採集したヤマメ稚魚の診断結果を表9に示す。検査した10尾のうち6尾からIHNウイルスが検出され、ウイルス力価は  $10^{3.8} \sim 10^{6.8} TCID_{50} / g$ であった。腎臓及び脾臓の臓器塗抹標本に対して行った蛍光抗体法の判定結果は、魚体番号710-1、710-2、710-3、710-4、710-8は腎臓、脾臓とも陽性でウイルス分離結果と一致したが、魚体番号710-7は腎臓、脾臓とも陰性であった。採集時の水温は15.0℃であった。

D養鱒場で採集したニジマスの診断結果を表10に示す。検査した9尾のうち7尾からIHNウイルスが検出され、ウイルス力価は  $10^{3.1} \sim 10^{8.8} TCID_{50} / g$ であった。蛍光抗体法による判定結果もIHNウイルスが検出された7尾はすべて陽性であった。魚体番号913-5～-9の魚体重は37.1～81.1gで、IHN感染魚としては大型であった。



表 8. B 養鱒場で採集したニジマスの IHN ウイルス分離法による診断結果と蛍光抗体法による診断結果の比較

魚 体 番 号	魚 種	体 重 (g)	ウイルス分離法		蛍光抗体法
			分 離	力 価	
0529-11	ニジマス	2.3	+*1	7.6*2	+
0529-12	"	2.7	+	6.8	+
0529-13	"	1.3	+	6.8	+
0529-14	"	3.5	+	6.1	+
0529-15	"	3.2	+	7.1	+
0529-16	"	3.1	+	5.6	+
0529-17	"	2.5	+	7.3	+
0529-18	"	2.0	+	6.8	+
0529-19	"	2.8	+	6.8	+
0529-20	"	3.3	+	5.3	+

\*1: IHN ウイルスの典型的 CPE が認められた。

\*2:  $\log TCID_{50}/g$

採集時の水温: 12.0℃

表 9. C 養鱒場で採集したヤマメの IHN ウイルス分離法による診断結果と蛍光抗体法による診断結果の比較

魚 体 番 号	魚 種	体 重 (g)	ウイルス分離法		蛍光抗体法	
			分 離	力 価	腎 臓	脾 臓
0710-1	ヤマメ	23.3	+*1	6.1*2	+	+
0710-2	"	14.4	+	5.6	+	+
0710-3	"	5.4	+	5.1	+	+
0710-4	"	15.6	+	5.6	+	+
0710-5	"	3.6	-	<2.8	-	-
0710-6	"	8.9	-	<2.8	-	-
0710-7	"	9.8	+	3.8	-	-
0710-8	"	13.7	+	6.8	+	+
0710-9	"	10.0	-	<2.8	-	-
0710-10	"	6.0	-	<2.8	-	-

\*1: IHN ウイルスの典型的 CPE が認められた。

\*2:  $\log TCID_{50}/g$

採集時の水温: 15.0℃

表 1 0. D 養鱒場で採集したニジマスの I H N ウイルス分離法による診断結果と  
 蛍光抗体法による診断結果の比較

魚 体 番 号	魚 種	体 重 (g)	ウイ ル ス 分 離 法		蛍 光 抗 体 法	
			分 離 力	価	腎 臓	脾 臓
0 9 1 3 - 1	ニジマス	3.8	-	< 2.8	-	-
0 9 1 3 - 2	"	1 2.0	+ * 1	6.1 * 2	+	+
0 9 1 3 - 3	"	7.2	+	6.6	+	+
0 9 1 3 - 4	"	3.5	-	< 2.8	-	-
0 9 1 3 - 5	"	5 0.4	+	6.8	+	+
0 9 1 3 - 6	"	4 6.5	+	3.1	+	+
0 9 1 3 - 7	"	7 0.8	+	8.8	+	+
0 9 1 3 - 8	"	8 1.7	+	5.5	+	×
0 9 1 3 - 9	"	3 7.1	+	7.1	+	+

\* 1 : I H N ウイルスの典型的 C P E が認められた。

\* 2 :  $\log T C I D_{50} / g$

採集時の水温 : 1 6.0 °C

E 養鱒場で採集したニジマスの診断結果を表 1 1 に示す。検査した 5 尾すべてから I H N ウイルスが検出され、腎臓、脾臓、肝臓の塗抹標本に対して行った蛍光抗体法の判定結果もすべて陽性であった。

F 養鱒場で採集したニジマスの診断結果を表 1 2 に示す。検査した 4 尾すべてから I H N ウイルスが検出され、蛍光抗体法による判定もすべて陽性で、診断結果は一致した。

G 養鱒場で採集したニジマス 7 尾の診断結果を表 1 3 に示す。検査した 7 尾すべてから I H N ウイルスが検出され、ウイルス力価は  $10^{6.1} \sim 10^{7.1} T C I D_{50} / g$  であった。蛍光抗体法は魚体番号 1 1 2 8 - 5 ~ - 7 の 3 尾について実施した。その結果、魚体番号 1 1 2 8 - 5 と - 7 は陽性であったが、1 1 2 8 - 6 は陰性であった。

表 1 1. E 養鱒場で採集したニジマスの I H N ウイルス分離法による診断結果と  
 蛍光抗体法による診断結果の比較

魚 体 番 号	魚 種	体 重 (g)	ウイ ル ス 分 離 法		蛍 光 抗 体 法		
			分 離 力	価	腎 臓	脾 臓	肝 臓
1 0 0 2 - 1	ニジマス	5 3.8	+ * 1	N D * 2	+	+	+
1 0 0 2 - 2	"	5 0.4	+	N D	+	+	+
1 0 0 2 - 3	"	4 1.5	+	N D	+	+	+
1 0 0 2 - 4	"	3 7.4	+	N D	+	+	+
1 0 0 2 - 5	"	5 1.0	+	N D	+	+	+

\* 1 : I H N ウイルスの典型的 C P E が認められた。

\* 2 : 測定しなかった。

採集時の水温 : 1 6.7 °C

表 1 2. F 養鱒場で採集したニジマスの I H N ウイルス分離法による診断結果と  
 蛍光抗体法による診断結果の比較

魚 体 番 号	魚 種	体 重 (g)	ウイ ル ス 分 離 法		蛍 光 抗 体 法
			分 離 力	価	腎 臓
1 0 0 3 - 1	ニジマス	9.0	+ * 1	N D * 2	+
1 0 0 3 - 2	"	5.2	+	N D	+
1 0 0 3 - 3	"	2 1.1	+	N D	+
1 0 0 3 - 4	"	2 8.4	+	N D	+

\* 1 : I H N ウイルスの典型的 C P E が認められた。

\* 2 : 測定しなかった。

採集時の水温 : 1 6 ~ 1 7 °C

表 1 3. G 養鱒場で採集したニジマスの I H N ウイルス分離法による診断結果  
と蛍光抗体法による診断結果の比較

魚 体 番 号	魚 種	体 重 (g)	ウイ ル ス 分 離 法		蛍 光 抗 体 法	
			分 離	力 価	腎 臓	脾 臓
1 1 2 8 - 1	ニジマス	N D * 1	+ * 2	6.1 * 3	N T * 4	N T
1 1 2 8 - 2	"	N D	+	≥ 6.8	N T	N T
1 1 2 8 - 3	"	N D	+	≥ 6.8	N T	N T
1 1 2 8 - 4	"	N D	+	≥ 6.8	N T	N T
1 1 2 8 - 5	"	2 9.1	+	7.1	+	+
1 1 2 8 - 6	"	2 1.1	+	6.1	-	-
1 1 2 8 - 7	"	1 7.5	+	6.6	+	+

\* 1 : 測定しなかった。

\* 2 : I H N ウイルスの典型的 C P E が認められた。

\* 3 :  $\log T C I D_{50} / g$

\* 4 : テストしなかった。

採集時の水温 : 5.6℃

### c 考 察

今回の調査では計 50 検体を従来のウイルス分離法と蛍光抗体法の両方法で検査した。その結果、診断が一致したのは 44 検体で、一致率は 88% であった。診断結果が一致しなかったのは 6 検体で、これらはいずれも従来のウイルス分離法で陽性、蛍光抗体法で陰性であった。6 例を詳細に検討すると、4 例 (魚体番号 529-1、529-5、529-6、529-7) は魚体重 0.8~1.0g の稚魚であり、塗抹標本の作製に問題があったとも考えられる。また、3 例 (魚体番号 529-1、529-5、710-7) はウイルス力価が  $10^{3.1} \sim 10^{3.8} T C I D_{50} / g$  と低く、そのため、蛍光抗体法で陽性像を見落した可能性も考えられる。これらの点については今後更に診断例数を増やし、検討する必要がある。

I H N の好適発生水温域は 10~12℃ で、15℃ を越えると発病しにくくなると言われており、<sup>21)</sup> 昇温による I H N 防除策も検討されている<sup>22)</sup>。今回の調査結果では、I H N の発生水温は 5.6~16.7℃ と広い範囲にわたっていた。発病サイズについても、従来は稚魚に限られていたものが、本調査で明らかのように、70~80g といった魚にも発病が認められ、大型化していた。これらのことから、今後、I H N の発生水温域の拡大化と発病サイ

ズの大型化に注意する必要がある。

## 2) ニジマス血清中の抗IHNウイルス抗体迅速測定法の開発

ニジマス血清中の抗IHNウイルス(以下、IHNV)抗体を迅速に測定する方法の開発を目的として、抗原固相法のELISAを実施するため、抗ニジマスIgウサギ血清の作製を試みた。

### (1) 材料及び方法

#### 供試魚

ニジマス1年魚。魚体重200~400g。

#### 抗ウサギ赤血球ニジマス血清の調製

供試魚6尾の腹腔内にあらかじめ調製した洗浄ウサギ赤血球を $10^{10}$  cells/尾の割合で注射した。注射は10日間隔で4回実施し、最終注射より7日後に尾部血管より採血した。採血後、常法により血清を分離した。6尾のうち1尾は免疫期間中に斃死したため、5尾分の血清をプールし、以下の試験に用いた。対照として、外観上正常なニジマス8尾より同様の方法で採血し、血清を分離したのち、8尾分をプールした。

#### 赤血球凝集試験

抗ウサギ赤血球ニジマス血清のウサギ赤血球凝集試験を芦原ら(1980)の方法<sup>23)</sup>に従いマイクロタイター法で実施した。すなわち、ニジマス血清を44℃で20分間処理し非働化したのち、<sup>24)</sup>0.1%BSAおよび0.01%ゼラチンを含むペロナル緩衝液で2倍から1024倍まで2倍段階希釈した。この希釈液を96穴U字型マイクロプレートに0.05ml/穴の割合で注入した。更にウサギ赤血球浮遊液を0.05ml/穴の割合で加え、マイクロミキサーでプレートを攪拌し、20℃に2時間置き、更に4℃に1夜置いたのち、凝集素価を測定した。

#### 抗ニジマスIgウサギ血清の調製

抗ウサギ赤血球ニジマス血清4mlとウサギ赤血球 $10^9$  cellsをEDTAの存在下で4℃、24時間反応させた。反応終了後、凝集したウサギ赤血球をペロナル緩衝液で4回洗浄し、それをウサギの耳静脈に注射した。注射は10日間隔で4回行い、最終注射より7日後に採血し、血清を分離し、抗ニジマスIgウサギ血清とした。対照として、正常ニジマス血清をウサギの耳静脈に注射し、12日後に採血し、血清を分離した。

#### 抗ニジマスIgウサギ血清の検定

免疫電気泳動用ペロナル緩衝液を蒸留水で2倍に希釈し、精製寒天(Difco Noble)1.0~1.2%と $\text{NaN}_3$ 0.1%を加え、ガラス板に流し、厚さ1mmの免疫電気泳動用寒天平板を作製した。この免疫電気泳動用寒天平板を用い、松橋ら(1985)<sup>25)</sup>の方法に従い免疫電気泳動法により抗ニジマスIgウサギ血清の検定を行った。

### (2) 結果

抗ウサギ赤血球ニジマス血清のウサギ赤血球凝集素価は1 : 32であり、正常ニジマス血清のウサギ赤血球凝集素価は1 : 16であった。

免疫電気泳動法により、抗ニジマスIg ウサギ血清とニジマス血清の間には4本の沈降線が、抗ニジマス血清ウサギ血清とニジマス血清の間には多数の沈降線が形成された。

### (3) 考 察

抗ニジマスIg ウサギ血清中には、ニジマス血清中の少なくとも4つの成分に対する抗体が形成されていたと考えられる。したがって、得られた「抗ニジマスIg ウサギ血清」は本来の目的のものではなかった。

この原因として、凝集抗体価が低かったこと、血球に凝集素以外の蛋白質が付着してしまったことなどが考えられる。今後はもっと多数のニジマスをウサギ赤血球で免疫し、その中で高い凝集素価を示す個体の血清のみを使って試験を実施する必要がある。

## 3. ニジマス親魚体腔液のウイルス検査

IHNは病魚及び不顕性感染魚（健康保菌魚）が主たる伝染源と考えられている。また、感染耐過した親魚はウイルスフリーとはならず、成熟期に体腔液中にウイルスを排出することから、それらの生殖産物や汚染卵も重要な伝染源になると言われている。<sup>26)</sup>

そこで、奥多摩分場で採卵に用いる雌親魚の体腔液についてウイルス検査を行い、汚染状況の把握を試みた。

### 1) 材料および方法

#### 供試魚

奥多摩分場産3年魚雌魚。昭和58年3月に孵化した群。

#### 体腔液の採取

体腔液の採取はYOSHIMIZU and KIMURA<sup>27)</sup>の方法に従って行った。すなわち、自動式ピペット（Gilson社製）に1.0 ml用のプラスチック製チップを取り付け、麻酔した雌親魚の生殖孔に挿入し、体腔液を吸い上げた。吸い上げた体腔液はS1スクリーバイアル瓶に移し、検査に供するまで-20℃で保存した。

1986年1月に70尾、2月に40尾、計110尾より体腔液を採取した。

#### ウイルス検査

保存体腔液を解凍し、抗生物質入りMEM-2（ペニシリン、800 IU/ml、ストレプトマイシン、800 μg/mlを添加したMEM-2）で1 : 10（V/V）に希釈し、4℃で1夜反応させ接種材料とした。あらかじめ96穴マイクロプレートに準備したEPC細胞に常法に従い接種材料を接種した。接種後、15℃で培養し、14日間細胞を観察した。

## 2) 結 果

親魚体腔液からのウイルス検出状況を、他県で行われた同様の検査結果と合わせて、表14に示す。検査した110尾の雌親魚体腔液のうち、IHNウイルス特有のCPEが認められたのは16尾であり、ウイルス保有率は14.5%であった。

表14. ニジマス親魚体腔液および精液のウイルス検査結果

実施県	検査月日	検査尾数	ウイルス検出尾数
東 京	1986、1～2	110（雌）	16
岐 阜 <sup>*</sup>	1985、1～3	60（雌）	3
静 岡 <sup>*</sup>	1984、12	57（雌28、雄29）	35（雌28／28） （雄 7／29）
長 野 <sup>*</sup>	1985、12	30（雌26、雄 4）	6（雌 6／26）

※ 昭和60年度、魚病対策技術開発研究成果報告書（第4分冊）  
（社）日本水産資源保護協会 による

## 3) 考 察

花田<sup>28)</sup>らは静岡水試富士養鱒場の雌親魚77尾のウイルス保有状況を調べ、9尾（8.8%）にIHNウイルスの保有を認めている。また、アメリカにおいても、MULCAHY<sup>29)</sup>らが1977年から1980年にかけて、北アメリカ太平洋岸の7ヵ所のサケ・マスふ化場においてSockeye salmonおよびChinook salmon計919尾の雌親魚体腔液を採卵時に採取し、IHNウイルスの保有状況を調べ、保有率が39～100%であったと報告している。

1984年と1985年に、岐阜、静岡、長野の各県が行ったニジマス親魚体腔液及び精液のウイルス検査でも、表14に示すように、保有率に差はあるものの、各県のニジマス親魚にウイルスの保有が認められている。

奥多摩分場の雌親魚にも、表14に示すように、14.5%のIHNウイルス保有が認められた。

ウイルス性疾病に対する有効な治療法が明らかになっていない現時点では、雌親魚はIHNウイルスを保有しているということを念頭に置き、卵に対するヨード剤消毒を徹底し、防疫に努めなければならない。

#### 4. 夏季、比較的高水温環境下における IHN の発生例

IHN は本邦各地の養鱒場のニジマス、ヤマメに発生し、大きな被害を与えているウイルス性疾病の 1 つである。<sup>30)</sup> 本疾病の発生は水温に大きく影響され、水温 10℃前後が好適で、自然の状態では 15℃を越えると発生しなくなると考えられてきた。<sup>31)</sup> しかし、我々は 1984 年夏季に行った魚病発生状況調査において、15℃を越える飼育環境下で IHN の発生を認めたので若干の検討を加えた。

##### 1) 材料および方法

###### 調査方法

1984 年 7 月から 9 月の夏季に、原因不明の斃死が認められる 4 ヶ所の養鱒場へ出向き、発病状況の聞き取り、現場観察を行い、病魚を採集し氷冷して試験場へ持ち帰り、検査に供した。採集及び検査の概要を表 15 に示す。

表 15. 採集及び検査の概要

養鱒場	魚種	採集月日	採集時水温(℃)	飼育用水	検査尾数(尾)
H	ヤマメ	7月10日	16.0	河川水	10
I	ニジマス	7月10日	15.0	河川水	10
J	ニジマス	8月7日	18.5	河川水	4
K	ニジマス	9月1, 13日	16.0	河川水	13

###### ウイルス検査

検査材料はウイルス検査に供するまで -20℃で保存した。解凍後、小型の魚体(魚体重 0.5 ~ 2.0g) は頭部と尾部を切除した残りを、大型の魚体は腎臓、脾臓を中心とした内臓を、それぞれ個別に氷冷しながら乳鉢で磨砕し、均一な乳剤になったところで、検査材料の重量の 9 倍の MEM-2 (Gibco 社製牛胎児血清を 2% になるように添加した日水製薬 MEM 培地) を加え、均一な 10% 浮遊液を調製した。この浮遊液を一定時間静置したのち、注射器で上清を吸い上げ、それを無菌室内で 0.45 μm 孔径の HA フィルターで濾過し、接種材料を調製した。

ウイルス分離のための培養細胞として、IHN ウイルスに高い感受性を有する EPC 細胞を用いた。<sup>32)</sup> 96 穴マイクロプレートに EPC 細胞を準備し、常法に従い階段希釈した接種材料を 0.05 ml/穴接種した。接種後、15℃で培養し、CPE 発現の有無を 14 日間観察した。

##### 2) 結果

H 養鱒場において採集したヤマメ 10 尾のウイルス検査結果を表 16 に示す。10 尾のうち 6 尾から IHN ウイルスが検出された。ウイルス力価は  $10^{3.8} \sim 10^{6.8}$  TCID<sub>50</sub>/g であった。



調査は7月10日に実施したが、6月下旬から死魚が増加しだしたということであった。

表 1 6. H養鱒場で採集したヤマメのウイルス検査結果

魚 体 番 号	魚 種	体 重 (g)	ウイルス分離	ウイルス力価*1
0710-1	ヤマメ	23.3	+*2	6.1
0710-2	"	14.4	+	5.6
0710-3	"	5.4	+	5.1
0710-4	"	15.6	+	5.6
0710-5	"	3.6	-	<2.8
0710-6	"	8.9	-	<2.8
0710-7	"	9.8	+	3.8
0710-8	"	13.7	+	6.8
0710-9	"	10.0	-	<2.8
0710-10	"	6.0	-	<2.8

\*1:  $\log_{10} TCID_{50} / g$

\*2: IHNVウイルスの典型的CPEが認められた。

採集時の水温: 16.0℃

I養鱒場で採集したニジマス10尾のウイルス検査結果を表17に示す。10尾のうち6尾からIHNVウイルスが検出された。それらのウイルス力価は $10^{4.6} \sim 10^{5.8} TCID_{50} / g$ であった。H養鱒場とは水系を異にしているが、H養鱒場と同様、6月下旬から死魚が増加したということであった。

J養鱒場で採集したニジマス4尾のウイルス検査結果を表18に示す。4尾のうち3尾からIHNVウイルスが検出された。J養鱒場では7月25日にニジマス稚魚5,000尾を購入し飼育したところ、8月4日頃より死魚が増加したということであった。8月1日から19日までの日間死魚数と水温変動の様子を図4に示す。日間死魚数は8月9日に221尾と最高となり、以後減少に転じ、8月19日頃には死魚はほとんど認められなくなった。8月1日から18日までの累積死魚数は1357尾で、放養尾数の27%に達した。

表17. I養鱒場で採集したニジマスのウイルス検査結果

魚体番号	魚種	体重(♂)	ウイルス分離	ウイルス力価*1
0710-11	ニジマス	1.1	-	<2.8
0710-12	"	0.5	+*2	4.6
0710-13	"	0.5	-	<2.8
0710-14	"	0.8	+	5.3
0710-15	"	1.6	+	5.1
0710-16	"	1.1	-	<2.8
0710-17	"	2.0	-	<2.8
0710-18	"	0.6	+	5.8
0710-19	"	1.2	+	5.1
0710-20	"	0.9	+	4.8

\*1:  $\log T C I D_{50} / \text{g}$

\*2: IHNウイルスの典型的CPEが認められた。

採集時の水温: 15.0℃

表18. J養鱒場で採集したニジマスのウイルス検査結果

魚体番号	魚種	体重(♂)	ウイルス分離	ウイルス力価*1
0807-1	ニジマス	ND*2	+*3	ND
0807-2	"	ND	+	ND
0807-3	"	ND	+	ND
0807-4	"	ND	-	ND

\*1:  $\log T C I D_{50} / \text{g}$

\*2: 測定しなかった。

\*3: IHNウイルスの典型的CPEが認められた。

採集時の水温: 16.0℃

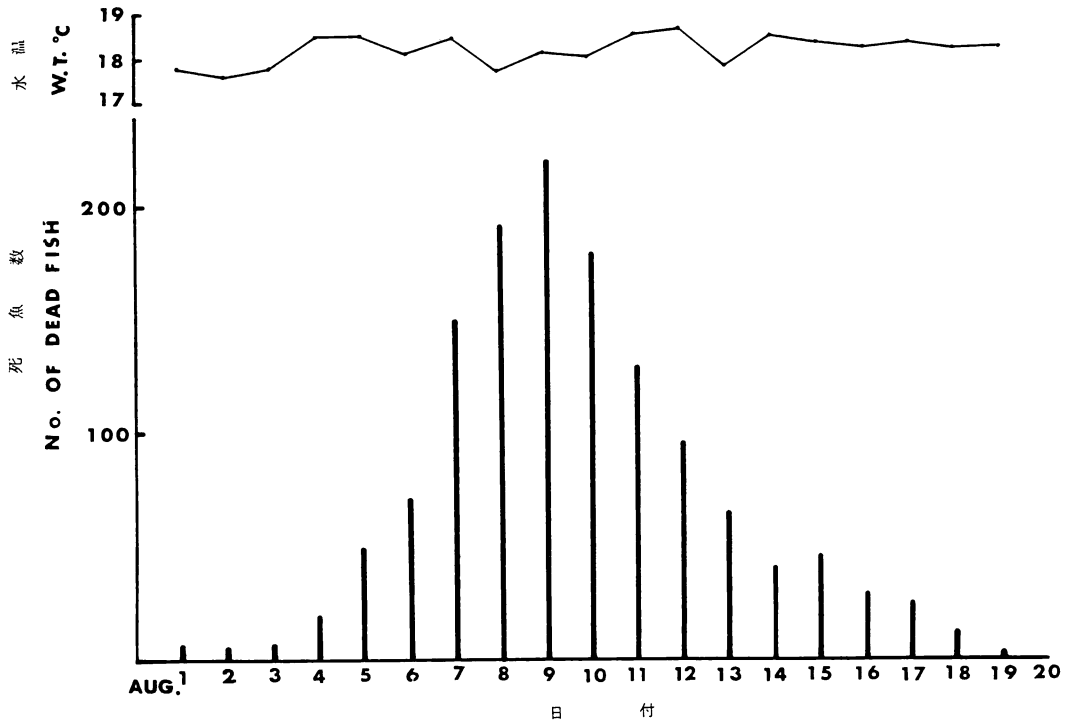


図4. J養鱒場における日間死魚数の推移

K養鱒場で9月1日、13日の2回にわたり採集した計13尾のニジマスのウイルス検査結果を表19に示す。1日に採集した5尾のうち3尾、13日に採集した8尾のうち6尾からIHNVウイルスが検出された。それらのウイルス力価は $10^{3.1} \sim 10^{8.8} \text{TCID}_{50} / \text{g}$ であった。I養鱒場では7月下旬、ニジマス稚魚15,000尾を購入し飼育したところ、8月25日頃から70～80尾/日の死魚が認められるようになり、その後、稚魚飼育池の下流に位置する50～100gサイズのニジマス飼育池でも死魚が増加した。

表 19. K 養鱒場で採集したニジマスのウイルス検査結果

魚 体 番 号	魚 種	体 重 (g)	ウイルス分離	ウイルス力価*1
0901-1	ニジマス	ND*2	+*3	ND
0901-2	"	ND	+	ND
0901-3	"	ND	+	ND
0901-4	"	ND	-	ND
0901-5	"		-	ND
0913-1	"	12.0	+	6.1
0913-2	"	7.2	+	6.6
0913-3	"	3.5	-	<2.8
0913-4	"	50.4	+	6.8
0913-5	"	46.5	+	3.1
0913-6	"	70.8	+	>8.8
0913-7	"	81.7	+	5.5
0913-8	"	37.1	+	7.1

\*1 :  $\log \text{TCID}_{50} / \text{g}$

\*2 : 測定しなかった。

\*3 : IHNウイルスの典型的CPEが認められた。

9月13日の採集時の水温：16.0℃

### 3) 考 察

IHNの発生と環境水温の関係については、高水温(17℃以上)で魚を飼育すればIHNによる被害を防ぐことができるという報告と、15℃及び18℃の環境水温下でも、ニジマス稚魚は容易にIHNに感染し死ぬという報告があり一致していない。このことについては、実験に用いた魚の大きさと攻撃ウイルス量の違いによるためではないか、という意見もある。<sup>37)</sup>

今回の野外調査結果から考えると、ヤマメ・ニジマスとも、16～18℃といった環境水温下で、IHNに自然感染発症することは明らかである。

IHNは10℃の環境水温下では、感染後4～6日で死が始まり、死は8～14日で最高に達するが、数週間継続することもあるといわれ、<sup>38)</sup>10℃以下では症状の進行は遅くなり、それ以上では早まるとされている。<sup>39)</sup>J養鱒場における調査時に、IHNの高水温環境下における潜伏期間を知るため、IHN未感染と推定されるニジマス稚魚(平均体重10g)にリボン式標識を

施し、発病池に放養したところ(8月10日)、6日後から標識魚の死が始まり、死魚からIHNVウイルスが検出された。したがって、環境水温18℃、魚体重10gでのIHNVの潜伏期間は6日間程度と考えられた。また、図4に示すように、高水温環境下では、魚群の死は感染後10～12日で最高に達するが、3週間程度しか継続しないと考えられる。

春の低水温期に、ニジマス稚魚にIHNVが発生すると、累積死亡率は90%以上になることが多い。これに対し、J養鱒場の累積死亡率は27%であり、その他の発生例についてもその後の聞き取り調査から同様の傾向が認められた。このことは、魚体の大きさの影響もあると思われるが、IHNVによる死亡率は高水温の方が低くなるという実験結果<sup>33)</sup>を裏付けるものである。

今回検出したIHNVウイルスのウイルス力価は、 $10^{3.1} \sim 10^{8.8}$  TCID<sub>50</sub>/gと広い範囲にわたっていた。このことは、IHNVの発症適温とされる10℃前後では各個体が一律に高いウイルス力価を有するのに対し、15℃を越えるような高水温環境下では各個体のウイルス力価に幅が出るという実験結果<sup>39)</sup>を裏付けるものと考えられる。

IHNVは主として稚魚が冒される疾病であるが、Sockeye salmonについては10～14ヵ月令、体長100～112mmの魚での発症が認められており、<sup>40)</sup>実験的には14ヵ月令、魚体重65.0gのニジマス成魚にも強い病原性が認められている。<sup>41)</sup>表19に示したように、K養鱒場では、70～80gといった大型ニジマスも、16.0℃という高水温環境下でIHNVに自然感染・発病し、死亡した。今後、15℃を越える高水温環境下の大型ニジマスの死亡原因の一つとしてIHNVも疑う必要がある。

今回検査対象としたH～K養鱒場の死魚に共通する肉眼的所見として、鰓の極度の貧血を挙げることができる。細菌性鰓病やカラムナリス病と異なり、鰓表面に細菌等の寄生体は認められなかったが、貧血のため、鰓は白色を呈していた。

本研究で示したように、IHNVが高水温環境下でも発生するようになったこと、大型魚にも発生するようになったことの原因が、寄生体としてのウイルスの側の何らかの変化によるものか、あるいは宿主としての魚の側の変化によるものか等について、今後更に検討する必要がある。

## Ⅲ 細菌性鰓病に関する試験

### 1. *Flavobacterium* sp. の養魚環境における生態

サケ科魚類の細菌性鰓病の原因菌、*Flavobacterium* sp. (以下、鰓病菌)の養魚環境における生態はほとんど明らかになっていない。そこで、奥多摩分場で飼育中のニジマス・ヤマメの鰓および体表面の鰓病菌の付着状況および飼育池水中の出現状況を調べ、生態解明の一助とした。

#### 1) 材料及び方法

供試魚及び検査月日

奥多摩分場で飼育養成中のニジマス・ヤマメ0年魚を検査対象として用いた。検査月日は表20に示すとおりである。

表20. 検査月日および検査尾数

検査月日	検査尾数	検査月日	検査尾数
4月10日	10	7月5日	10
4月24日	10	7月10日	10
5月6日	10	7月10日	10
5月20日	10	7月15日	10
6月5日	10	8月2日	10
6月19日	10	8月18日	10
7月1日	10	9月1日	10
7月3日	10		

#### 鰓病菌の検出方法

鰓：養魚池より供試魚を取り上げ、鰓を摘出し、1部はスライドグラスにのせ光学顕微鏡により直接観察し、1部はスライドグラスに塗抹し蛍光抗体法により観察した。

体表：供試魚の体表面の粘液を綿棒で掻き取り、それをスライドグラスに塗抹し蛍光抗体法により観察した。

池水：池水300mlを無菌的に採水した後、孔径0.45μmのメンブレンフィルター（ミリポア社、HAフィルター）でろ過し、フィルター上の残渣を綿棒で掻き取り、それをスライドグラスに塗抹し蛍光抗体法で観察した。

## 鰓病菌の定量方法

鰓病菌数の定量は平板塗抹培養法と蛍光抗体法の2つの方法で実施した。供試魚より摘出した鰓を秤量し、ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、滅菌蒸留水で10倍階段希釈した。平板塗抹培養法はサイトファーガ寒天培地を用い、階段希釈した希釈液を平板に一定量滴下しコンラージ棒で平板全面に拡げ培養するという通常の方法で行った。蛍光抗体法は階段希釈液0.01mlをスライドガラス上に滴下し、風乾したのち、蛍光抗体染色を施し、蛍光顕微鏡で菌数を数えた。

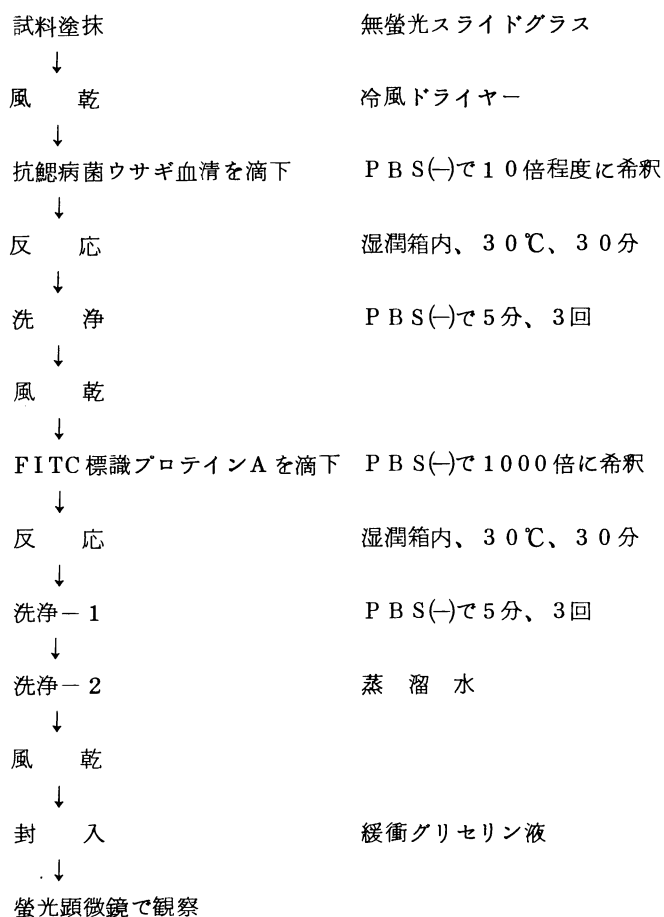


図5. 蛍光抗体法の手順

## 2) 結 果

### 鰓及び体表からの鰓病菌の検出

鰓及び体表からの鰓病菌の検出状況を表21に示す。鰓について行った光学顕微鏡観察では、

7月1日に実施した検査で10尾中9尾に鰓病菌の付着が最初に認められた。蛍光抗体法による観察では、鰓で6月19日、体表で6月5日に実施した検査で鰓病菌が最初に認められた。鰓病菌は6月5日～8月2日の約2ヵ月間、水温13.7～19.7℃の範囲で検出された。なお、7月2日と13日に治療を目的に5% NaCl溶液に2分間、飼育魚を浸漬した。

表2.1. 供試魚の鰓と体表面からの鰓病菌の検出率

検査№	検査月日	光学顕微鏡観察(%)	蛍光抗体法(%)		水温(℃)
			鰓	体表面	
1	86. 4. 10	0	0	0	10.3
2	4. 24	0	0	0	11.9
3	5. 6	0	0	0	12.8
4	5. 20	0	0	0	12.6
5	6. 5	0	0	40	13.7
6	6. 19	0	30	40	16.2
7	7. 1	90	100	90	16.0
8	7. 3	30	50	20	16.0
9	7. 5	0	0	0	15.8
10	7. 10	0	10	0	15.2
11	7. 12	50	70	50	15.6
12	7. 15	10	20	0	15.8
13	8. 2	10	20	0	19.7
14	8. 18	0	0	0	18.0
15	9. 1	0	0	0	18.9

#### 飼育池水からの鰓病菌の検出

飼育池水からの鰓病菌の検出状況を表2.2に示す。蛍光抗体法では総計15回の検査のうち、6月19日から8月2日にかけて実施した8回の検査で鰓病菌が検出された。塗抹培養法では7月1日、3日、10日、12日に実施した4回の検査で鰓病菌が検出された。



表 2.2. 池水からの鯉病菌の検出状況

検査 №	検査 月 日	蛍光抗体法	平板培養塗抹法
1	86. 4. 10	—	—
2	4. 24	—	—
3	5. 6	—	—
4	5. 20	—	—
5	6. 5	—	—
6	6. 19	+	—
7	7. 1	+	+
8	7. 3	+	+
9	7. 5	+	—
10	7. 10	+	+
11	7. 12	+	+
12	7. 15	+	—
13	8. 2	+	—
14	8. 18	—	—
15	9. 1	—	—

鯉病菌の定量

供試魚鯉の鯉病菌数の測定結果を表 2.3 に示す。塗抹培養法では 7 月 1 日に実施した検査で  $3.25 \times 10^7$  cfu/g、7 月 12 日に実施した検査で  $2.94 \times 10^5$  cfu/g であり、この 2 回の他はいずれも検出限界以下であった。蛍光抗体法では 6 月 19 日から 7 月 15 日までに実施した検査で  $10^4 \sim 10^7$  cells/g の菌数が認められた。

表 2.3. 供試魚鯉の鯉病菌数測定結果

検査 №	検査 月 日	平板培養法 cfu/g (平均値)	蛍光抗体法 cells/g (平均値)
1	86. 4. 10	検出限界以下	検出限界以下
2	4. 24	"	"
3	5. 6	"	"
4	5. 20	"	"
5	6. 5	"	"
6	6. 19	"	$4.02 \times 10^4$
7	7. 1	$3.25 \times 10^7$	$6.05 \times 10^7$
8	7. 3	検出限界以下	$1.36 \times 10^5$
9	7. 5	"	検出限界以下
10	7. 10	"	$2.78 \times 10^5$
11	7. 12	$2.94 \times 10^5$	$4.76 \times 10^7$
12	7. 15	検出限界以下	$7.72 \times 10^4$
13	8. 2	"	検出限界以下
14	8. 18	"	"
15	9. 1	"	"

\* 検出限界： $1.00 \times 10^3$  cfu/g (平板培養法)  
 $1.00 \times 10^4$  cells/g (蛍光抗体法)

### 3) 考 察

鰓病菌の発育可能温度は10～25℃であるが、5℃あるいは30℃で発育する菌株もあると言われている。<sup>26)</sup>今回、養魚池水中から鰓病菌の検出を試みた結果、表22に示したとおり、6月下旬から8月上旬にかけて、水温16.2～19.7℃の範囲の時に検出することができた。したがって、野外養魚池では水温16～20℃が鰓病菌の発育に適していると考えられる。

養魚池水からの検出状況と供試魚の鰓および体表からの検出状況を総合して考えると、池水から鰓病菌が検出された時は、7月5日に実施した検査を除き、供試魚からも必ず鰓病菌が検出されている。このことは本菌が魚体に付着しやすい性質を有するというを示唆するものと思われる。また、表21に示したように、鰓と体表面を比較すると、体表からの方が先に鰓病菌が検出されている。これは、流行初期には本菌はまず体表面に付着し繁殖するというを示唆している。

7月1日に実施した検査の際、供試魚を採集した魚群は典型的な細菌性鰓病の徴候を示していた。すなわち、魚が池壁あるいは排水部に集まり、鰓蓋を開き、遊泳が不活発であった。この時の供試魚の鰓の鰓病菌菌数は、表23に示したように、平板培養法で $3.25 \times 10^7$  cfu/g、蛍光抗体法で $6.05 \times 10^7$  Cells/gであった。このことから、外観所見で明らかに細菌性鰓病と判断できる状態の魚では、 $10^7$  cfu/g程度の鰓病菌が鰓に付着していると考えられる。

今回用いた鰓病菌の検出方法を比較すると、表21及び表22に示したように、光学顕微鏡による生標本観察や平板塗抹培養法よりも蛍光抗体法の方が検出回数、検出率とも高かった。したがって、蛍光抗体法は野外養魚池等で細菌性鰓病の診断や生態調査をする際の菌体検出法として実用性の高い方法とすることができる。

細菌性鰓病の治療を目的に7月2日に5% NaCl溶液に2分間魚を浸漬した。その効果をみると、表21に示したように、鰓の蛍光抗体法観察で、7月1日の浸漬前には100%の魚に鰓病菌が認められていたが、7月3日には50%、7月5日には0%と低下している。また、表23に示したように、菌数も7月1日には $10^7$  cfu/gあったものが7月5日には検出限界以下に低下している。すなわち、塩水浴後3日間程度で鰓病菌は魚体表面から駆逐されると考えられる。しかし、7月12日に実施した検査結果を見ると、鰓病菌が再び鰓や体表に付着している。したがって、5% NaCl溶液に2分間魚を浸漬することで、鰓病菌を一時的に魚体から除去することは可能であるが、池水中に鰓病菌が生息し、水質その他の発病条件が揃っている限り、浸漬処理後10日程度で魚は再び細菌性鰓病の症状を呈するようになると言えよう。細菌性鰓病対策として塩水浴は必ずしも十分な方法とは言えず、今後更に予防・治療法を検討していく必要がある。

## 2. 細菌性鰓病人工感染試験

細菌性鰓病の予防・治療を検討する上で人工感染技法を確立しておくことは重要である。そこで、奥多摩分場の養魚池で発生した細菌性鰓病病魚より *Flavobacterium* sp. (以下、鰓病菌) を分離し、それを用いて人工感染試験を試み、感染魚の鰓における鰓病菌の動態を光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡 (以下、SEM) を用い観察した。

### 1) 材料及び方法

#### 供試魚

奥多摩分場産ニジマス稚魚、体重 4.4～9.9 g。

#### 供試菌株

*Flavobacterium* sp. OD-1 株。本菌株は 1986 年 7 月、奥多摩分場の細菌性鰓病病魚の鰓より分離し、供試するまで -80℃ で凍結保存したものである。なお、本菌は日本及び外国で分離された鰓病菌と共通抗原をもつことが明らかになっている。<sup>42)</sup>

#### 感染方法

15ℓ 容ガラス水槽に飼育用水 5ℓ を入れ、OD-1 株のサイトファーガ液体培養液 (20℃ で 3 日間振とう培養、菌数約  $5 \times 10^7$  cfu/ml) 160 ml を添加し、浸漬用菌液を調製した。供試魚 40 尾を浸漬用菌液に収容し、通気しながら感染させた。浸漬開始時の水温は 13.4℃ であった。酸素の補給を考え、浸漬開始 2 時間後及び 24 時間後に 5ℓ ずつ新鮮な飼育用水を加えた。

#### 光学顕微鏡及び走査型電子顕微鏡による観察

魚を浸漬後、1, 2, 3 日目に 2 尾ずつ取り上げ観察に供した。まず、鰓を摘出し、1 部はスライドグラスに載せ直接、光学顕微鏡で生標本の観察を行った。1 部は 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗浄後、2.5% グルタルアルデヒド溶液で 1 晩固定した。固定後、病理組織標本及び SEM 観察用標本を作製した。病理組織標本の作製は固定試料を 0.1 M リン酸緩衝液で再度洗浄し、以下常法に従い実施した。SEM 標本の作製は固定試料を洗浄後、50%、70%、80%、90%、95%、100% エタノールを通し脱水、100% 酢酸イソアミルで置換し、臨界点乾燥装置 (JCPD-5) を用いて乾燥後、イオンスパッタリング装置 (JFC1100) を用いて金コーティングし、SEM (JSM, T100) で観察した。

## 2) 結果

### 1 日後

菌液浸漬 1 日後の生標本の観察結果を写真 4 に示す。鰓弁先端部表面に多数の長桿菌の付着が認められる。ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色を施した病理組織標本の観察結果を写真 5, 6 に示す。糸状の長桿菌が主に鰓薄板の先端部に認められる。鰓薄板上皮細胞にはほと

んど変化は認められず、菌体の組織内への侵入も認められない。SEMによる鰓表面の観察結果を写真7, 8に示す。鰓薄板表面を長桿菌が覆っている。鰓弁表面にはあまり菌体は認められず、長桿菌以外の菌の付着もない。

#### 2日後

菌液浸漬2日後の生標本の観察結果を写真9に示す。1日後と同様、鰓弁先端部を中心に鰓表面に多数の長桿菌の繁殖が認められる。病理組織標本の観察結果を写真10, 11に示す。長桿菌が鰓薄板先端部のみでなく、鰓薄板と鰓薄板の間隙にも認められる。上皮細胞の変化や菌の組織内への侵入は認められない。SEMによる観察結果を写真12, 13に示す。鰓薄板表面は多数の長桿菌で覆われ、菌体が相互にからみ合っている。鰓弁の表面にも部分的に長桿菌が認められる。

#### 3日後

菌液浸漬3日後の生標本の観察結果を写真14に示す。鰓表面に多数の長桿菌の付着繁殖が認められる。2日後と比べ、大きな差異はない。病理組織標本の観察結果を写真15, 16に示す。長桿菌が全面的に鰓表面を覆っている。鰓薄板と鰓薄板の間隙にも多数の長桿菌の繁殖が認められる。SEMによる観察結果を写真17, 18に示す。おびただしい数の長桿菌が鰓薄板に密にからみつぎ、鰓薄板表面は完全に菌体で覆われてしまっている。鰓弁表面も長桿菌に密に覆われている。

#### 鰓病菌の付着の様式

鰓病菌の鰓表面への付着様式を調べるため、付着部分をSEMを用いて観察した結果を写真19に示す。鰓病菌は菌体周囲に線毛状の構造体を多数持ち、それにより鰓表面に付着し、あるいは菌体同志つながり合っているような所見が得られた。

### 3) 考 察

木村ら<sup>43)</sup>は人為感染試験により細菌性鰓病の病原菌の探索を行い、*Flavobacterium* sp. が細菌性鰓病の原因菌の1つであることを明らかにした。その中で、種々の条件で行った人為感染試験の結果から、菌液に魚を浸漬したのち止水槽に移した時及び菌を止水式飼育槽の中に加えた時は感染が容易に成立するが、菌液に魚を浸漬したのち流水槽に移した時は感染させるのが困難であったと報告している。

今回も予備試験として供試魚を菌液に2時間浸漬し、その後流水槽に魚を移したところ、感染は成立しなかった。したがって、細菌性鰓病の人工感染試験を確実に行うには止水条件で実施するのが望ましいと言える。このことはまた、細菌性鰓病の対策を立てる上のヒントになると思われる。

細菌性鰓病の自然感染魚の病理組織学的研究はWOOD and YASUTAKE(1975)<sup>44)</sup>により

アメリカ各地の病魚について行われている。それによると、鰓上皮の異常増殖、フィラメント状の菌の付着、“ブラック”の存在などが認められている。木村ら<sup>43)</sup>も、人為感染魚について病理組織学的検討を行い、鰓薄板や鰓弁の癒合、上皮細胞の異常増殖を認めているが、“ブラック”は確認できなかったとしている。今回の試験では菌液浸漬1, 2, 3日後の鰓について検討を加えたが、鰓薄板や鰓弁の癒合、上皮細胞の異常増殖、“ブラック”の存在のいずれも認められなかった。したがって菌液浸漬3日程度では鰓組織自体はほとんど影響を受けないと考えられた。

鰓病菌の鰓への付着様式をSEMを用いて観察したところ、鰓病菌の菌体周囲には線毛状の多数の構造体が存在し、それにより鰓表面に付着しているらしいことがわかった。宿主と寄生体との関係において、「付着」の意義は非常に重要である。「付着」の様式を明らかにし、機構を解明することで細菌性鰓病の予防・治療対策は大きく進展すると思われ、この方面の研究の発展が望まれる。

写真の説明

- 写真4. 菌液浸漬1日後の魚の鰓。鰓弁先端部に *Flavobacterium* sp. の付着・繁殖が認められる。生標本。×200。
- 写真5. 菌液浸漬1日後の魚の病理組織標本。 *Flavobacterium* sp. が主に鰓薄板の先端部に認められる。HE染色。×400。
- 写真6. 同上。HE染色。×1000。
- 写真7. 菌液浸漬1日後の魚の鰓の走査型電子顕微鏡像。鰓薄板を *Flavobacterium* sp. が覆っている。×500、5 kv。
- 写真8. 同上。鰓弁表面にはあまり菌体は認められない。×2000、5 kv。
- 写真9. 菌液浸漬2日後の魚の鰓。1日後と同様、鰓弁先端部を中心に鰓表面に多数の *Flavobacterium* sp. の付着・繁殖が認められる。生標本。×200。
- 写真10. 菌液浸漬2日後の魚の鰓の病理組織標本。鰓薄板と鰓薄板の間隙にも *Flavobacterium* sp. の付着・繁殖が認められる。HF染色。×400。
- 写真11. 同上。HE染色。×1000。
- 写真12. 菌液浸漬2日後の魚の鰓の走査型電子顕微鏡像。鰓薄板を *Flavobacterium* sp. が覆っている。×500、5 kv。
- 写真13. 同上。 *Flavobacterium* sp. の菌体が相互に絡み合っている。鰓薄板基部の鰓弁表面にも菌体が認められる。×1500、5 kv。
- 写真14. 菌液浸漬3日後の魚の鰓。鰓表面に多数の *Flavobacterium* sp. の付着・繁殖が認められる。生標本。×200。
- 写真15. 菌液浸漬3日後の魚の鰓の病理組織標本。鰓薄板全域を *Flavobacterium* sp. が覆っている。HF染色。×400。
- 写真16. 同上。HE染色。×1000。
- 写真17. 菌液浸漬3日後の魚の鰓の走査型電子顕微鏡像。おびただしい数の *Flavobacterium* sp. が鰓全面を覆っている。×500、5 kv。
- 写真18. 同上。鰓弁表面も *Flavobacterium* sp. により全面的に覆われている。×2000、5 kv。
- 写真19. 鰓に付着した *Flavobacterium* sp. の走査型電子顕微鏡像。菌体周囲の線毛状の構造体により鰓表面に付着している。菌体同士もお互いの線毛状の構造体で結び付いている。×35000、15 kv。



5



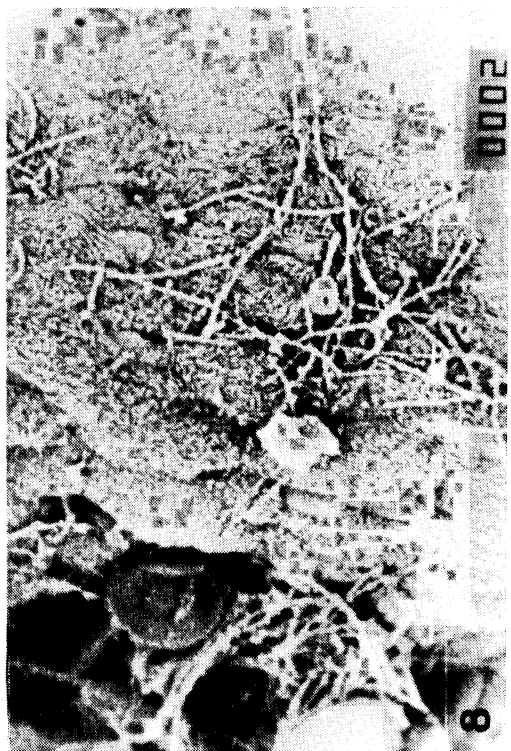
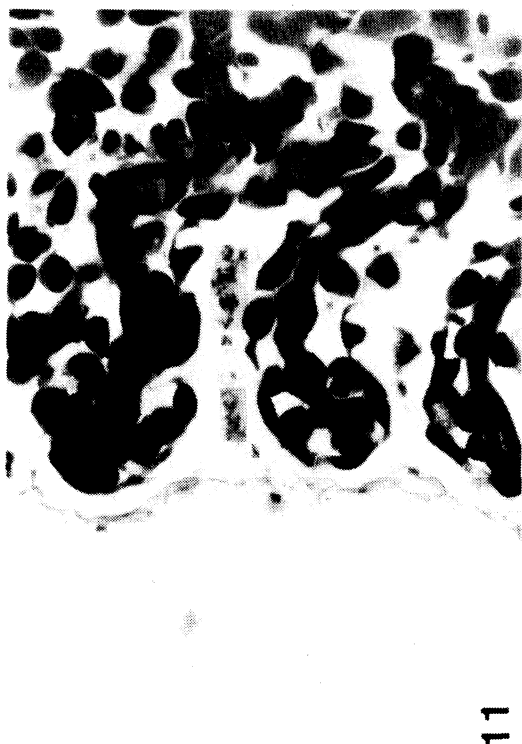
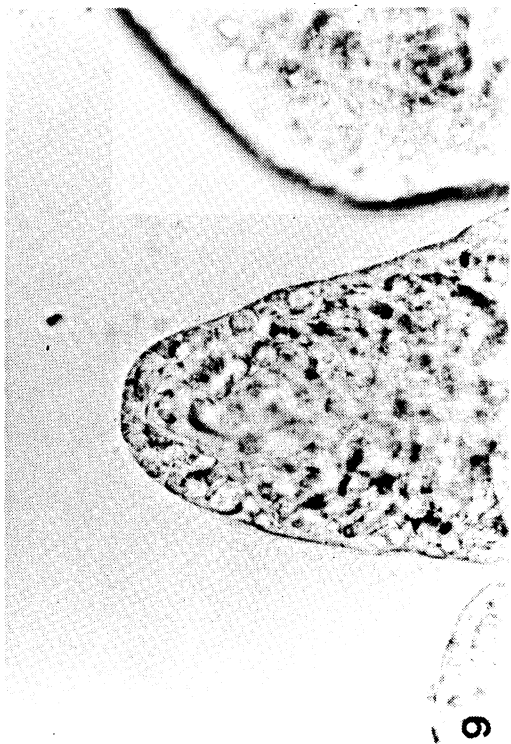
7



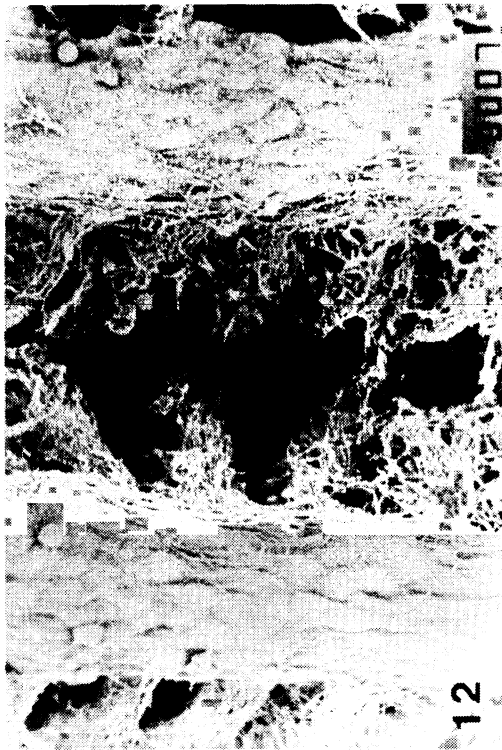
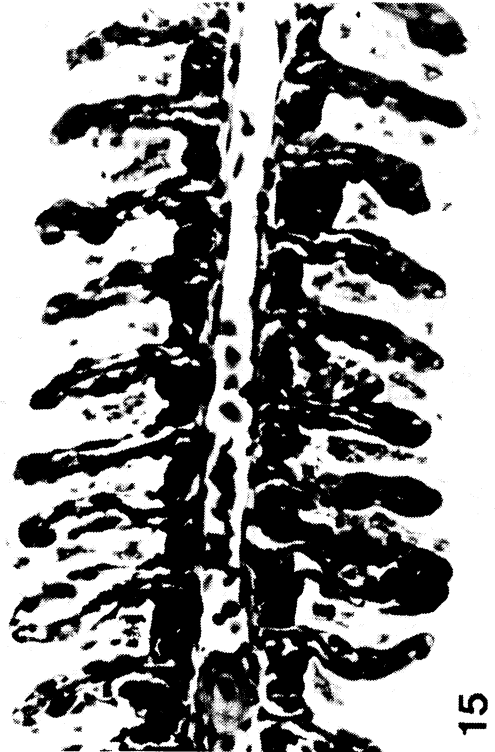
4

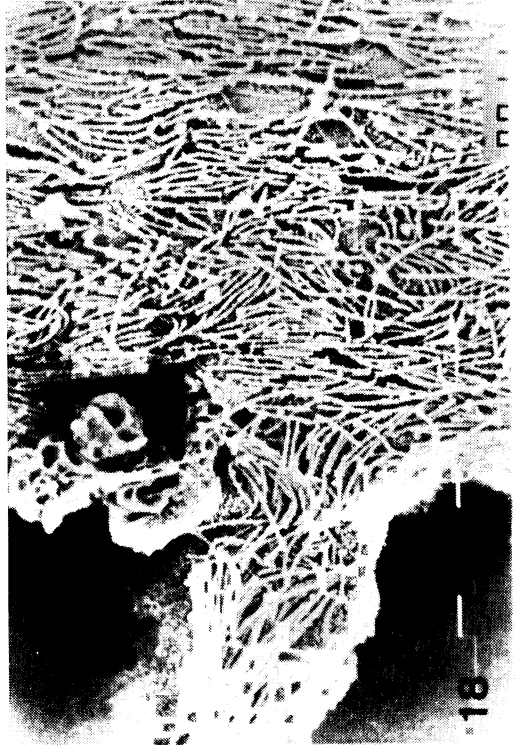
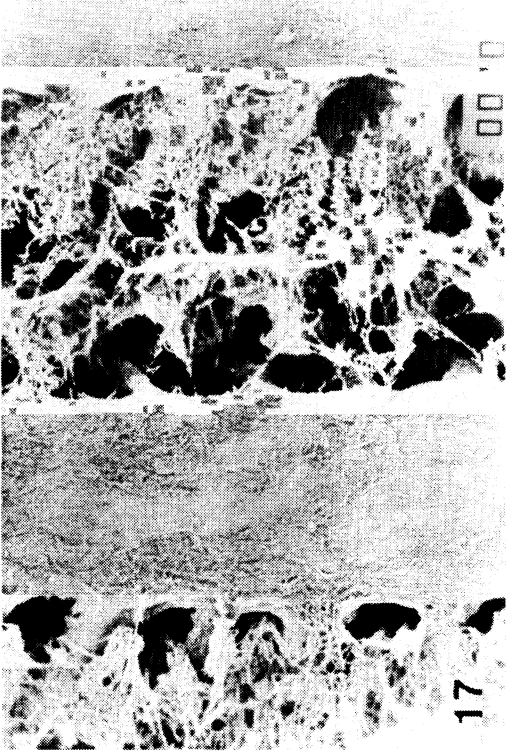


6









### 3. 細菌性鰓病と水質の関係

細菌性鰓病発生と水質との関係を明らかにするため試験を行った。

#### 1) 材料及び方法

奥多摩分場内の養魚池を1つ選定し、池の注水部と排水部で、水温、水量、DO、 $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{NO}_2^-$ を測定するとともに、その池に収容されているニジマス稚魚を対象に、魚群の行動及び鰓の生標本の顕微鏡観察から細菌性鰓病発症の有無を調査した。

##### a 調査対象池

場内の稚魚飼育池1面(面積1.6 m<sup>2</sup>、水深3.2 cm)を調査対象池とした。

##### b 水温

棒状水銀温度計で測定した。

##### c 水量

池の水深を1.0 cm上昇させるのに要する時間を測定し、毎秒当りの注水量を求めた。

##### d DO

DOメーター(飯島精密工業製)を用いて測定した。

##### e $\text{NH}_4^+$

分光光度計(日立製)を用い、ネスラー試薬による比色法で測定した。

##### f $\text{NO}_2^-$

分光光度計(日立製)を用い、グロースロイミン試薬による比色法で測定した。

##### g 発症の有無

調査期間中毎日、魚群の摂餌状態、遊泳状態を観察するとともに、月1~2回、稚魚5尾を無作為に採集し、鰓の圧平標本を作製し、光学顕微鏡を用い観察した。

##### h 調査期間

調査は6~10月の5ヵ月間行い、水質調査についてはこの間、延75回行った。採水は午前10時頃、池掃除をする前に行った。

#### 2) 結果

水質調査結果を各月の旬ごとに整理し表2.4に示した。水温は13.6~19.4℃、水量は2.9~6.0 l/S、DOは注水部で8.9~10.4 ppm、排水部で6.8~8.4 ppm、 $\text{NH}_4^+$ は注水部で0.00~0.16 ppm、排水部で0.00~0.26 ppm、 $\text{NO}_2^-$ は8月中旬の排水部の0.002 ppmを除き検出限界以下であった。鰓の生標本の顕微鏡観察は、6月13日、7月3日、24日、8月6日、25日、9月8日、10月3日に行ったが、いずれの場合も鰓表面に細菌性鰓病の原因菌と考えられている長桿菌の繁殖は認められず、魚群行動の観察からも細菌性鰓病発症の徴候は調査期間を通じて認められなかった。

表24. 旬別水質観測表

月	水温 (℃)	水量 (ℓ/s)	DO (ppm)			NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ppm)			NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (ppm)			観測 日数
			注水	排水	消費量	注水	排水	増加量	注水	排水	増加量	
6月上旬	14.9		9.3	7.9	1.4	0.00	0.00	0.00				2
6月中旬	15.9		9.5	6.8	1.7	0.06	0.08	0.02				6
6月下旬	15.4		9.9	8.4	1.5	0.09	0.10	0.01				4
7月上旬	16.4		9.9	8.2	1.7	0.06	0.06	0.00				6
7月中旬	17.2		9.2	7.7	1.5	0.16	0.19	0.03	0.000	0.000	0.000	6
7月下旬	16.8		9.0	8.3	0.7	0.04	0.04	0.00	0.000	0.000	0.000	3
8月上旬	18.6	6.0	9.3	8.1	1.2	0.05	0.06	0.01	0.000	0.000	0.000	3
8月中旬	19.4	5.7	9.2	7.5	1.7	0.06	0.07	0.01	0.000	0.002	0.002	7
8月下旬	18.9	4.7	9.1	7.5	1.6	0.07	0.09	0.02	0.000	0.000	0.000	9
9月上旬	18.6	5.0	9.3	8.1	0.8	0.05	0.08	0.03	0.000	0.000	0.000	3
9月中旬	17.7	5.2	9.3	8.2	1.1	0.04	0.06	0.02	0.000	0.000	0.000	5
9月下旬	17.0	4.0	9.2	7.7	1.5	0.05	0.06	0.01	0.000	0.000	0.000	7
10月上旬	16.3	2.9	9.1	7.2	1.9	0.09	0.22	0.13	0.000	0.000	0.000	5
10月中旬	14.7	5.2	9.8	8.3	1.5	0.10	0.16	0.06	0.000	0.000	0.000	6
10月下旬	13.6	4.1	10.4	8.2	2.2	0.09	0.26	0.17	0.000	0.000	0.000	3

### 3) 考 察

細菌性鰓病の発症には、水温の上昇、DOの減少、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の増加など、水質要因が複雑に関与していると考えられている。今回の調査では、調査池において、細菌性鰓病の自然発症が認められなかったため、当初予定した水質と発症との関係を明確にすることはできなかった。今後は、自然発症に依らず、人為的感染手法を用いて水質と発症との関係を明らかにする必要がある。

## IV 水カビ病に関する試験

### 1. ヤマメの水カビ病発生に及ぼす飼育密度の影響

ヤマメ雄魚は採精可能となった時期から真菌症に罹りやすくなる。その原因としては性成熟期における雄魚のステロイド分泌との関連性も疑われるが、成熟時におけるストレスによる可能性も否定できない。

特に、ヤマメの採卵場においては、産卵期に雌雄判別、熟度鑑別を行うなど、いわゆる取り扱いによるストレスが加わる。また、作業の便宜上、高密度で蓄養する。ここでは、これらストレス要因のうち、まず密度の影響について究明した。

ヤマメ雄魚は雌雄判別後、採卵まで、取り上げ作業を容易にするため小型池に収容し、この間は高密度下のもとで蓄養される。これら高密度での収容はストレス要因の一つとされ、<sup>45)</sup> その影響も大きい可能性がある。更に、密度の影響が性成熟度によって異なる可能性が考えられるため、ここでは未成熟期と成熟期における密度の影響について検討した。

#### 1) 未成熟期

##### (1) 材料および方法

供試魚は、東京都水産試験場奥多摩分場において1982年に採卵した未成熟の2年魚で、これらを1984年5月7日より同年7月9日までの間、次の条件下で飼育した。飼育池は低密度区用 $3.7 \times 2.2 \times 0.7$  m (水容積 $5.9 m^3$ )、高密度区用 $0.8 \times 2.2 \times 0.7$  m (同 $1.3 m^3$ )で、流量は各池とも $200$  l/分とし、期間中の水温変化は $10.9 \sim 16.4$  °Cであった。

なお、採卵、採精用親魚を蓄養する際の通常の飼育密度は $20$  尾/ $m^2$  ( $0.9 \sim 1.9$  kg/ $m^2$ ) であり、<sup>46)</sup> 今回の実験では高密度区で $70$  尾/ $m^2$  ( $7.3$  kg/ $m^2$ )、低密度区で $6$  尾/ $m^2$  ( $0.6$  kg/ $m^2$ ) とした。

各飼育池には実験の2週間前に供試魚を入れて馴致した。馴致期間中及び実験期間中はニジマス配合飼料をライトリッツ給餌表の80%量、給与した。飼育期間中は、目視又は触診によって水カビ病発生状況を観察した。また、終了時には10尾前後を採取し、2-フェノキシエタノール(500 ppm)で麻醉後、尾部血管より採血した。次いで、標準体長、体重を計測後、精巢を摘出し測定した。採取血液は冷却遠心分離後、ラジオイムノアッセイ法によりコルチゾール量を測定した。ラジオイムノアッセイにはスパック社のコルチゾールキットを利用した。

##### (2) 結果

実験期間中、水カビ感染魚は高密度区、低密度区ともにまったく認められなかった。標準体長は実験開始時、 $18.8 \pm 1.5$  cm ( $n = 10$ ) であったが、終了時には、高密度区で $21.5 \pm$

1.3 cm (n = 10)、低密度区で21.6 ± 2.3 (n = 10)、体重は実験開始時103.2 ± 22.1 g (n = 10)であったが、終了時には、高密度区で151.6 ± 30.7 g (n = 10)、低密度区で175.0 ± 38.3 g (n = 10)で、ともにほぼ順調に成長した。

なお、血中コルチゾール量は、終了時、高密度区で42.0 ± 20.8 ng (n = 10)、低密度区で182.7 ± 196.9 ng (n = 9)であったが、有意差 (P < 0.05) は認められなかった (表25)。

表25. 異なる密度で飼育した未成熟魚の体長、体重、GSI、真菌症感染率、血中コルチゾール量

	密度 (尾/m <sup>2</sup> )	測定尾数 (尾)	体長 (cm)	体重 (g)	G S I (%)	真菌感染率 (%)	血中コルチゾール量 (ng/ml)
高密度	70	10	21.5 (±1.3)*	151.6 (±30.7)	0.21 (±0.06)	0	42.0 (±20.8)
低密度	6	10	21.6 (±2.3)	175.0 (±38.3)	0.16 (±0.04)	0	182.7 (±196.9)

\* (平均値±標準偏差)

## 2) 成熟期

### (1) 材料および方法

成熟期供試魚としては、東京都水産試験場奥多摩分場において、1982年に採卵した成熟進行中の2年魚で、これらを同分場において1984年8月29日より10月23日まで、次の条件下で飼育した。実験区として低密度区、中密度区、高密度区の3区を設定し、低密度区は3.7 × 2.2 × 0.7 m (水容積5.7 m<sup>3</sup>)、中密度区と高密度区は0.8 × 2.2 × 0.7 m (水容積1.3 m<sup>3</sup>)の流水池とし、流量は各池ともほぼ200 ℓ/分とした。期間中の水温は19.6 ~ 12.0 °Cで水カビの生息可能範囲内であった。

密度及び面積当りの重量は、低密度区が10尾/m<sup>2</sup> (2.2 kg/m<sup>2</sup>)、中密度区50尾/m<sup>2</sup> (10.8 kg/m<sup>2</sup>)、高密度区100尾/m<sup>2</sup> (21.9 kg/m<sup>2</sup>)とした。飼料はニマス用配合飼料をライトリッツ給餌表の80%量与えたが、摂餌しなくなった時点で給餌を中止した。実験終了時にすべての魚の水カビ感染度を調べ、更に各区より雄5尾を採取し、標準体長、体重を測定後、精巢を摘出して秤量し、ブアン液で固定した。

なお、水カビ感染度は肉眼によって判定し、皮膚にピロート状に繁殖している状態を(++)、皮膚が白くなっているがピロート状になるまでに至っていないもの(+)、未感染を(-)とした。また、同時に雌魚の感染度も参考に調べた。

## (2) 結果

体重は実験開始時  $247.8 \pm 90.1$  g であったが、終了時高密度区  $259.8 \pm 74.7$  g、中密度区  $277.8 \pm 44.3$  g、低密度区  $319.5 \pm 62.7$  g であり、いずれにも有意な差は認められなかった。GSI は実験開始時  $1.91 \pm 0.49$  % であったが、終了時高密度区  $1.58 \pm 0.35$  %、中密度区  $1.65 \pm 0.29$  %、低密度区  $1.96 \pm 0.52$  % で、これらにも有意差は見られなかった。開始時にはすべての雄魚が排精していなかったのに対し、終了時にはすべての個体から採精可能であった。

感染魚は、高密度区 80 尾中 24 尾 (30.0%)、中密度区 46 尾中 18 尾 (39.1%)、低密度区 31 尾中 9 尾 (29.0%) であった。なお、雌では、高密度区で 89 尾中 3 尾 (3.4%)、中密度区で 33 尾中 2 尾 (5.7%)、低密度区で 49 尾中 2 尾 (4.1%) に感染が認められた(表 26)。

## 3) 飼育密度の影響に関する考察

未成熟魚では、通常親魚飼育密度より少し高い密度でも水カビ病の発症は認められず、更に血中コルチゾール量にも有意な差は認められなかった。また、成熟魚を対象とした実験でも密度に関係なく、水カビ病が発生した。これらの点から考えると、現行程度の親魚の高密度蓄養がストレスとして作用し、水カビ病の原因となった可能性は低いと考えられる。

ROTH (1972)<sup>47)</sup> や NEISH (1980)<sup>48)</sup> は水カビ病の要因としてストレスを挙げており、NEISH<sup>48)</sup> はストレスが加わることにより、血中コルチコステロイドが増加し、糖新生やたんぱく質分解作用を促進するため、たんぱく質の不足を招くこと、血中コルチコステロイドの増加はアスコルビン酸、すなわちビタミンCの不足も招くなどの結果、皮膚の構成物質であるコラーゲンが不足し、傷の回復力が弱くなることによって、水カビ病にかかりやすくなるのであろう、と述べている。実際に、ヒドロコルチゾン、コルチゾル、酢酸コルチゾルなどのコルチコステロイドの投与により、水カビ病を実験的に発生させうることを報告している。

しかし、ヤマメの場合、現行の密度の範囲であれば、ストレスはもとより、水カビ感染も招かないようである。

表 2 6. 成熟期における収容密度の真菌症に対する影響

区	性	検査尾数 (尾)	感染度 (%)		体 重 (g)	G S I (%)
			[ + ]	[ ++ ]		
高 密 度	雄	80	28.8	1.3	259.8 (±74.7)*	1.58 (±0.35)
	雌	89	3.4	0	203.7 (±15.8)	20.07 (±3.06)
中 密 度	雄	46	39.1	0	277.8 (±44.3)	1.65 (±0.29)
	雌	35	5.7	0	184.1 (±46.1)	16.85 (±3.80)
低 密 度	雄	31	29.0	0	319.5 (±62.7)	1.96 (±0.52)
	雌	49	4.1	0	184.0 (±31.0)	17.89 (±3.34)
実験開始時	雄	365	0	0	247.8 (±90.1)	1.91 (±0.49)
	雌				190.6 (±43.7)	8.20 (±1.96)

\* (平均値±標準偏差)



## 2. ヤマメの水カビ病発生に及ぼす絶食の影響

ヤマメでは性成熟進行につれて摂餌活動が低下するため、親魚養殖においては給餌を少なくしたり、給餌を止める。この間、魚は少食あるいは絶食状態となり、外部からの栄養補給がほとんどなくなる。絶食が魚類の成長や成熟に対して大きく影響することは明らかであるが、それらはすべて栄養的な要因による影響だと考えられている。しかし、DONALDSON (1981)<sup>45)</sup>は養殖環境下での飼料不足がストレスとして働くことを指摘している。その結果、血中コルチコステロイドを増加させ、更に真菌症を発生させている可能性がある。そこで、ヤマメにおいても、絶食状態がストレスとして作用して水カビ病感染を引き起こしているのかどうか、未成熟魚を用い検討した。

### 1) 材料および方法

供試魚は、東京都水産試験場奥多摩分場において1982年に採卵した未成熟の2年魚で、これらを2区に分け、1984年5月7日より7月9日までの2ヵ月間、次の条件下で飼育した。すなわち、第1区は給餌、第2区は無給餌とし、飼育池はともに $3.7 \times 2.2 \times 0.7$  m (水容積 $5.9$  m<sup>3</sup>)、 $200$  ℓ/分の流水式で飼育した。期間中の水温変化は $10.9 - 16.4$  °Cで水カビの生息範囲内であった。

両区の密度および面積当りの重量は $6$  尾/m<sup>2</sup> ( $0.6$  kg/m<sup>2</sup>)とした。実験開始後2週間はニジマス配合飼料をライトリッツ給餌表の80%量を給与し、その後給餌区は毎日1回ニジマス用配合飼料をライトリッツ給餌表の80%量給与し、無給餌区へはまったく給与しなかった。

飼育期間中には目視または触診によって水カビ病発生状況を観察した。終了時には10尾前後を採取し、2-フェノキシエタノール(500 ppm)で麻酔後、尾部血管より採血した。次いで、標準体長、体重を計測後、精巢を摘出して秤量した。採取血液は冷却遠心分離後、血清中のコルチゾール量をラジオイムノアッセイ法により測定した。ラジオイムノアッセイにはスバック社のコルチゾールキットを利用した。

### 2) 結 果

実験期間中、目視による水カビ病感染魚は給餌区、無給餌区ともにまったく認められなかった。

標準体長は、実験開始時 $18.8 \pm 1.5$  cm ( $n = 10$ )であったが、終了時には給餌区で $21.6 \pm 2.3$  cm ( $n = 10$ )、無給餌区で $19.4 \pm 1.3$  cm ( $n = 12$ )であり、給餌区の方が成長した。

体重は、実験開始時 $104.2 \pm 22.1$  g ( $n = 10$ )であったが、終了時には給餌区で $175.0 \pm 38.3$  g ( $n = 10$ )、無給餌区で $104.9 \pm 20.1$  g ( $n = 12$ )で、明らかに差があり ( $P < 0.001$ ) 無給餌区ではまったく体重増加が認められなかった。

GSIは実験開始時 $0.15 \pm 0.03$  % ( $n = 10$ )であったが、終了時には給餌区 $0.17 \pm 0.04$  % ( $n = 10$ )、無給餌区 $0.13 \pm 0.05$  % ( $n = 12$ )であり、給餌区では若干増大し

た ( $P < 0.05$ )。

血中コルチゾール量は、終了時に給餌区で  $182.7 \pm 196.9 \text{ ng/ml}$  ( $n = 9$ )、無給餌区で  $108.7 \pm 64.6 \text{ ng/ml}$  ( $n = 12$ ) で両者間に有意差 ( $P < 0.05$ ) は認められなかった (表 27)。

表 27. 2 か月間絶食させた未成雄熟魚の体長、体重、G S I、血中コルチゾール量

区	測定尾数 (尾)	体長 (cm)	体重 (g)	G S I (%)	真菌感染率	血中コルチゾール 量 (ng/ml)
無給餌	10	19.4 ( $\pm 1.3$ ) <sup>*</sup>	104.91 ( $\pm 20.1$ )	0.13 ( $\pm 0.05$ )	0	108.7 ( $\pm 64.6$ )
給餌	12	21.6 ( $\pm 2.3$ )	175.0 ( $\pm 38.3$ )	0.17 ( $\pm 0.04$ )	0	182.7 ( $\pm 196.9$ )

\* (平均値  $\pm$  標準偏差)

### 3) 考 察

魚類は絶食状態では成長率が低下し、生殖腺の発達が不良となる。<sup>49)</sup> 今回の実験でも無給餌区では成長が悪く、G S I が小さい傾向が認められた。このように、今回の実験で無給餌区は十分に絶食の影響下にあったと考えられるにもかかわらず、給餌区、無給餌区のいずれにも水カビ病は発生しなかった。更に、血中コルチゾール量も給餌区、無給餌区では差が認められなかった。これらの結果は、絶食状態がストレスとならなかったことを示している。したがって、成熟期における給餌量の減少は、単独では水カビ病の原因になっているとは考えにくい。しかし、NEISH (1980)<sup>48)</sup> が述べているように、他のストレスの作用により、血中コルチコステロイドが増加し、たんぱく質やビタミンCがコラーゲン形式のために不足状態になると、絶食や少食は、外部からのたんぱく質やビタミンCの供給ができない状態にしているため、水カビ病が発生しやすくなっていることは考えられるが、この点については更に検討が必要であろう。

### 3. ヤマメの水カビ病発生に及ぼす取り扱いの影響

ヤマメの種苗生産過程では、成熟期を迎えると雌雄鑑別を行う。更に、雌魚は全部の個体が一斉に完熟することはなく、5~10日位の間隔で熟度鑑別を行う。同時に、採精作業のために雄魚も5~10日位の間隔で取り上げられる。取り扱いによって血中コルチコステロイドが上昇すること

がBrown trout<sup>50)</sup>、マスノスケ<sup>51)</sup>、ニジマス<sup>52)</sup>などで知られており、PLCKERING<sup>50)</sup>等の知見からすると、そのために水カビ病に感染しやすくなる可能性が考えられる。

そこでここでは、取り扱いの水カビ病に対する影響を検討した。

## 1) 材料および方法

供試魚は、東京都水産試験場奥多摩分場において1982年に採卵した未成熟の2年魚で、これらを1984年5月7日より同年7月9日までの間、取り扱いによるストレスを与えた区(以下ストレス区)、あるいはストレスを与えず静置した区(静置区)のいずれかで飼育した。飼育池はともに $3.7 \times 2.2 \times 0.7$  m(水容積 $5.9$  m<sup>3</sup>)で、流量は両池とも200 ℓ/分とした。期間中の水温変化は $10.9 \sim 16.4$  °Cで、水カビの生息範囲内であった。

実験期間中、ストレス区では1日1回午前9時に、池掃除や曳網作業を模して、約1分間、デッキブラシで池をかき回した。静置区は実験期間中ずっと静置し、できるだけ刺激を与えないようにした。飼育密度および面積当たりの重量は6尾/m<sup>2</sup>(0.6 kg/m<sup>2</sup>)とした。各飼育池には実験の2週間前にヤマメを入れ馴致させた。馴致期間中及び実験期間中はニジマス配合飼料をライトリッツ給餌表の80%量ほど給与した。

飼育期間中は、目視によって水カビ病発生状況を観察した。また、終了時には10尾前後を採取し、2-フェノキシエタノール(500 ppm)で麻酔後、尾部血管より採血した。次いで、標準体長、体重を計測後、精巣を摘出し測定した。採取血液は血清を冷却遠心分離後、コルチゾール量をラジオイムノアッセイ法により測定した。ラジオイムノアッセイにはスパック社のコルチゾールキットを利用した。

## 2) 結果

実験期間中、ストレス区、静置区ともに目視によって水カビ病感染魚はまったく認められなかった。標準体長は、実験開始時、 $18.8 \pm 1.5$  cm( $n = 10$ )であったが、終了時には、ストレス区で $20.4 \pm 1.9$  cm( $n = 10$ )、静置区で $21.6 \pm 2.3$  cm( $n = 10$ )、体重は実験開始時 $104.2 \pm 22.1$  g( $n = 10$ )であったが、終了時にはストレス区で $144.0 \pm 36.5$  g( $n = 10$ )、静置区で $175.0 \pm 38.3$  g( $n = 10$ )で、ともに成長が認められた。

GSIは実験開始時に、 $0.15 \pm 0.03$  %( $n = 10$ )、終了時にはストレス区で $0.20 \pm 0.05$  %( $n = 10$ )、静置区で $0.17 \pm 0.04$  %( $n = 10$ )であり、実験期間中は両区とも未成熟であった。

血中コルチゾール量は、終了時のストレス区で $161.5 \pm 121.9$  ng/ml( $n = 10$ )、静置区で $182.7 \pm 196.9$  ng/ml( $n = 9$ )であったが、有意差は認められなかった(表28)。

表 28. 未成熟魚の体長、体重、G S I、血中コルチゾールに  
対する取り扱いストレスの影響

ストレス	測定尾数 (尾)	体 長 (cm)	体 重 <sup>* 2</sup> (g)	G S I	真菌感染率 (%)	血中コルチゾー ル量 (ng/ml)
+	10	20.4 *1 (±1.9)	144.0 (±36.5)	0.20 (±0.05)	0	161.5 (±121.9)
-	10	21.6 (±2.3)	175.0 (±38.3)	0.17 (±0.04)	0	182.7 (±196.9)

\* 1 (平均値±標準偏差)

\* 2 有意差なし (P<0.05)

### 3) 考 察

今回の未成熟魚を対象とした実験では、両区とも真菌症発生が認められず、血中コルチゾール量にも有意差が認められなかった。この結果からすると、1日1回1分間程度池をかき回す程度の取り扱いではストレスサーとはならず、かつ、ヤマメに対して水カビ病を引き起こす可能性は低いと考えられる。

取り扱いによる影響がストレスサーとなるかどうかは、刺激の与え方によって違ってくる。たとえば、PICKERING等(1982)<sup>50)</sup>は、短時間の取扱いはBrown troutで一時的に血中コルチゾールを上昇させるが、4時間後には元に戻ると報告している。一方、STRANGE(1977)<sup>53)</sup>は、マスノスケ稚魚を網ですくい上げた後、狭い所に収容すると血中コルチゾール量は増加し、その後2日経過してもなお高い値を示すと報告している。

したがって、親魚の熱度鑑別に際しては、今回適用した刺激量程度を目安にして、作業を行うことが望ましい。

### 4. 内臓真菌症人工感染試験

内臓真菌症は餌付け後、1～2週令のサケ科魚類稚魚に発生する疾病である。日本では1974年に岐阜県の養鱒場のアマゴに初めて発見された<sup>54)</sup>。東京都では1976年頃から発生が認められ始め、以後毎年発生している。全国的にも各地で発生が報告されている。<sup>55)</sup>

本症は、体色の黒化、腹部の膨満、腹部内における多量の菌糸の存在等により特徴づけられる。

経口的に取り込まれた真菌の孢子あるいは菌糸が、胃腔内の飼料の滞留により排出されず、発芽ないし伸長してしまうことが原因と考えられている。原因となる真菌として、ミズカビ属の *Saprolegnia diclina* と未同定の不完全菌の2種類が知られている。発症した場合、通常のへい死率は10～20%であり、約20日間で終息に向かう。予防・治療法として有効な方策は現在のところ知られていない。

本症に対して有効な対策を確立するには、必要な時に必要なだけの病魚を得られるように、人工感染技法を明確にすることが不可欠であると考え、若干の試験を行った。

## 1) 材料および方法

### 供試魚

分場産の1腹仔のニジマス稚魚を用いた。平均体重は1.2gであった。試験に供するまで適量の餌を与え、流水式で飼育した。

### 感染方法

G Y寒天培地上に滅菌した市販の配合飼料を置き、同培地であらかじめ培養した *Saprolegnia diclina* (NJ0010株、1986年2月14日に分場で発生した内臓真菌症のヤマメ稚魚から分離した株) を接種し、飼料中に菌糸が入り込むようにした。直径90mmのシャーレに菌糸が十分に広がったところで寒天培地を飼料ごとにはがし、計量した後、メスで約1mm角に細断した。この菌糸つき配合飼料を1日2～3回供試魚に自由摂餌により経口投与した。

### 試験区の設定

試験区と対照区の2区を設定した。供試魚50尾ずつを容量20ℓのガラス水槽に収容し、注水量約13ml/秒で飼育した。試験区の魚には上記の方法で準備した菌糸つき配合飼料を1日2～3回、飽食量与えた。対照区の魚には市販の配合飼料を適量与えた。

### 試験期間および水温

試験は1986年7月2日から19日までの18日間行い、7月2日から11日までの10日間餌を投与し、以後は無給餌とした。試験期間中の水温は14.4～16.2℃であった。

### 採材

試験期間中7回、1回につき試験区5尾、対照区3尾の魚を取り上げ、10%ホルマリン水で固定し病理組織学的検査に供した。

### 糞の検査

糞からの真菌の分離を目的に試験区及び対照区から新鮮な糞を採取し、滅菌蒸留水中で軽く洗った後、抗生物質処理したサブロー寒天培地(日水)に乗せ20℃で培養した。検査は7月10日に行った。

### 内臓からの真菌の分離

感染を確かめるため、試験区5尾、対照区3尾の魚の脾臓、腎臓、胃を摘出し、抗生物質処理したコーンミールアガール(日水)上に乗せ、20℃で培養し、真菌の分離を試みた。分離の試みは7月19日に行った。

## 2) 結 果

試験区、対照区とも斃死は全く認められなかった。病理組織学的検査では試験区の魚の胃の中に菌糸が認められたものの、他の臓器への菌糸の伸長はなかった。試験区、対照区とも、糞から真菌が分離された。内臓からは真菌は全く分離されなかった。

## 3) 考 察

予想に反し、今回の試験では内臓真菌症を発生させることはできなかった。

内臓真菌症は稚魚が *S. diclina* の菌糸や胞子を飲み込むことから始まり、飲み込まれた菌糸や胞子が胃の中に滞留している飼料によりうまく排泄されず、発芽、伸長してしまいその結果、菌糸が胃壁を貫通し発病に至ると言われている。<sup>56), 57)</sup>

今回の試験では、菌糸付きの飼料が吐き出された形跡のないこと、また、病理組織学的に胃の中に菌糸が認められたことから、菌糸が魚に取り込まれたことは確実である。それにもかかわらず真菌症が発生しなかった原因として、菌糸の感染力の問題を挙げることができる。菌糸には感染力がないか、あっても弱いということも考えられ、発病には胞子を取り込まれる必要があるのかもしれない。*S. diclina* は富栄養状態では生殖器を形成しないため、今回作製した感染用飼料に胞子が混ざっていた可能性は低く、今後、胞子を用いた感染試験を試みる必要がある。

もう1つの原因として、胃の中に取り込まれた菌糸が伸長する間もなく排泄されたということが考えられる。事実、感染用飼料投餌1日後の糞には *S. diclina* とされる菌糸塊が混入していた。したがって、胃の中に取り込まれた菌糸が一定期間滞留するような工夫も必要と思われる。

今回の試験では内臓真菌症の発病には宿主側の要因が大きく影響するということが改めて示唆されたと言えよう。

## V セっそう病被害低減化試験

### 1. *Aeromonas salmonicida* の毒素産生に及ぼす培養基の影響

せっそう病に対する生物学的製剤開発の基礎資料を得ることを目的とし、培養基の違いにより *Aeromonas salmonicida* の産生する毒素力に差が生じるかどうか検討する。

#### 1) 材料及び方法

##### 供試魚

せっそう病歴、投薬歴ともに無い、奥多摩分場産ヤマメ0年魚(平均体重11.0g)を用いた。

##### 供試菌株及び供試培養基

*Aeromonas salmonicida* AYS-2株及びTO-8310株の2菌株を供試した。培養基はブレインハートインフュージョン・ブイヨン培地(栄研、以下BHIB)とカゼインイーストビーフ・ブイヨン培地(以下CYBB)の2種類を用い、比較検討した。

##### 攻撃用菌液の調製

背部筋肉内注射によりヤマメの魚体を2回通過させた供試菌をBHIBおよびCYBB各100mlに接種し、20℃、24時間静置培養した。培養終了後、菌数を算定し、飼育水を用いて階段希釈を行い、攻撃用菌液を調製した。

##### 試験区の設定及び攻撃試験方法

表29に示すように、計16区の試験区を設定した。攻撃試験は二浴法で行った。1区当たり25尾の供試魚を5.32%NaCl溶液4ℓ中に2分間、続いて攻撃用菌液1ℓ中に3分間浸漬した。浸漬終了後、20ℓ容のガラス水槽に收容し、斃死状況を2週間観察、プロビット法によりLD<sub>50</sub>値を算出し、培養基の違いにより毒力に差が生じるかどうか、比較検討した。

#### 2) 結果及び考察

各試験区の斃死状況及びLD<sub>50</sub>値を表29に示す。TO-8310株ではBHIBで培養した場合のLD<sub>50</sub>値は $6.8 \times 10^6$  cfu/ml、CYBBで培養した場合のそれは $2.6 \times 10^5$  cfu/mlで、CYBBで培養した方が毒力は強かった。一方、AYS-2株では培養基の違いによる毒力の差は判然としなかった。用いる菌株にもよるが、培養基の違いにより毒力産生に差が生じるという知見は、せっそう病に対する生物学的製剤開発の基礎資料として意味あるものと考えられる。

表 2.9. *Aeromonas salmonicida* の毒素産生に及ぼす培養基の影響

攻撃菌株	使用培地	供試尾数 (尾)	攻撃菌数 (cfu/ml)	への死率 (%)	平均死亡 日数(日)	LD <sub>50</sub> (cfu/ml)
AYS-2	BHIB	25	$\times 10^4$	0	—	$2.2 \times 10^7$
		25	$\times 10^5$	0	—	
		25	$5.9 \times 10^6$	19.0	4.5	
		25	$\times 10^7$	73.9	5.6	
AYS-2	CYBB	25	$\times 10^4$	0	—	$1.2 \times 10^7$
		25	$\times 10^5$	4.2	5.0	
		25	$2.8 \times 10^6$	0	—	
		25	$\times 10^7$	65.4	5.1	
TO-8310	BHIB	25	$\times 10^4$	9.5	6.5	$6.8 \times 10^6$
		25	$\times 10^5$	27.3	7.1	
		25	$6.5 \times 10^6$	25.0	5.6	
		25	$\times 10^7$	90.5	4.3	
TO-8310	CYBB	25	$\times 10^4$	26.1	8.0	$2.6 \times 10^5$
		25	$\times 10^5$	40.0	5.7	
		25	$2.6 \times 10^6$	82.6	4.5	
		25	$\times 10^7$	100.9	4.0	

## 2. *Aeromonas salmonicida* の薬剤感受性試験

*Aeromonas salmonicida* の薬剤感受性を調べ、抗菌剤投与時の参考とするため試験を行った。

### 1) 材料および方法

ヤマメのせつそう病病魚の腎臓より *Aeromonas salmonicida* を分離し、スルファメノメトキシシン (mp)、スルファジメトキシシン (x)、オキシテトラサイクリン (o)、クロラムフェニコール (c)、ナリジクス酸 (Nd) の5種類の薬剤について、ディスク法により薬剤感受性を調べた。

### 2) 結果

今回供試した *A. salmonicida* 10株の薬剤感受性を表30に示す。オキシテトラサイクリン、クロラムフェニコール、ナリジクス酸に対しては10株とも高い感受性を示したが、スルファメノメトキシシン、スルファジメトキシシンに対しては10株中5株が感受性を示さなかった。



表 3 0. *Aeromonas salmonicida* の薬剤感受性

菌株番号	mp	x	o	c	Nd
TO- 8301	+ (36)	+ (39)	+ (35)	+ (53)	+ (50)
TO- 8302	+ (31)	+ (34)	+ (40)	+ (53)	+ (48)
TO- 8311	+ (39)	+ (32)	+ (42)	+ (49)	+ (34)
TO- 8314	+ (40)	+ (32)	+ (45)	+ (55)	+ (47)
TO- 8316	-	-	+ (36)	+ (45)	+ (40)
TO- 8317	-	-	+ (46)	+ (51)	+ (50)
TO- 8319	-	-	+ (37)	+ (42)	+ (49)
TO- 8320	-	-	+ (38)	+ (39)	+ (40)
TO- 8321	+ (50)	+ (43)	+ (53)	+ (48)	+ (41)
TO- 8322	-	-	+ (39)	+ (44)	+ (31)

\* +感受性    -耐性    ( )内は阻止円の直径mm

## VI BKD (細菌性腎臓病)に関する調査

サケ科魚類の細菌性腎臓病 (Bacterial Kidney Disease) は 1930年代にスコットランド及びアメリカで発見された疾病である。日本においては、木村ら<sup>58)</sup>により北海道のサケ科魚類に初めて発見され、その後、短期間で静岡、新潟、栃木、宮城、岩手、群馬、長野、富山、山梨、石川、福島等、各県に広がった。<sup>59)</sup>

東京都においても、他県からの成魚の移入が盛んに行われており、いつBKDが発生してもおかしくない情勢にある。そこで、現時点で東京都にBKDが侵入しているかどうかを明らかにするため、BKDに感受性が高いと言われるヤマメについてBKDの調査を行った。

### 1. 材料及び方法

検査対象魚 東京都におけるヤマメの主要な種苗生産場所である奥多摩分場のヤマメ雌親魚を検査対象魚に選んだ。1986年10月21日、64尾、10月28日、269尾を検査した。

検査方法 採卵時に開腹したヤマメ雌親魚の腎臓を肉眼的に観察し、BKD特有の白色の筋または結節様病変の有無を調べた。

### 2. 結果及び考察

検査結果を表31に示す。10月21日に検査した64尾、10月28日に検査した269尾、すべてBKD特有の腎臓の白色の筋または結節様病変は認められなかった。

表 3 1. ヤマメ雌親魚のBKD検査結果

検査年月日	検査尾数	BKD陽性尾数
1986年10月21日	64	0
10月28日	269	0

BKDの診断法には、分離培養法<sup>60)</sup>、臓器塗抹標本のグラム染色、蛍光抗体法<sup>61)</sup>、共同凝集試験<sup>62)</sup>がある。将来、肉眼的観察でBKD様の病変が認められた場合は、これらの診断法を駆使し、BKDの精密な分布調査を行い、汚染の拡大防止に努める必要も生じるであろう。

## VII 消毒剤に関する試験

### 1. アルコール系消毒剤の *Aeromonas salmonicida* に対する殺菌効果

アルコール系消毒剤はサケ・マス類養殖現場で、手や指の消毒によく使用されているが、魚類病原体に対する殺菌効果については不明の部分が多い。そこで、アルコール系消毒剤の *Aeromonas salmonicida* (せつそう病の原因菌) に対する *in vitro* での殺菌効果を調べ、養殖現場における防疫技術確立の基礎資料とした。

#### 1) 材料及び方法

供試菌として *A. salmonicida* ATCC 14174 株を用いた。アルコール系消毒剤はエチルアルコール、メチルアルコール、イソプロピルアルコール(いずれも試薬特級)の3種類を供試した。各種アルコールを所定の濃度(50%、60%、70%、80%、90%)に蒸留水を用いて希釈し、希釈液を中試験管に10mlずつ分注した。供試菌をハートインフュージョン・ブイヨン培地(日水)で20℃、24時間静置培養し、培養菌液を各種アルコール希釈液に1mlずつ注入、菌液とアルコール希釈液を作用させた。作用時間は15秒、1分、25分、5分、10分の5通りとし、作用時の温度はエチルアルコールについては0℃と20℃、メチルアルコール、イソプロピルアルコールについては20℃とした。所定時間作用させたのち、菌の生死を調べるため、1白金耳量(内径4mm)を後培養のハートインフュージョンブイヨン培地に接種した。接種後、培地の混濁の有無を72時間目まで肉眼的に観察し、殺菌効果を判定した。以上の試験方法は飯塚らの方法を参考に行った。

#### 2) 結果

アルコール系消毒剤の *A. salmonicida* に対する殺菌効果を表32、33、34に示す。

供試したアルコール系消毒剤は *A. salmonicida* に対し、いずれも高い殺菌効果を有していた。

50%メチルアルコールが作用時間15秒で効果がなかった他は、いずれも濃度50~90%、作用時間15秒で有効であった。

エチルアルコールは0℃においても殺菌効果は高く、濃度50~90%、作用時間15秒で有効であった。

### 3) 考 察

アルコール系消毒剤は蒸発が早いため、短時間で殺菌効果が認められる必要があるが、今回の試験では作用時間15秒で有効であり、実用に十分適するものと思われる。現場での使用頻度の高いエチルアルコールとイソプロピルアルコールは、今回の濃度範囲内ではいずれも有効で、両者間に差は認められなかった。エチルアルコールは使用感はソフトであるが价格的に割高であり、イソプロピルアルコールは価格は安い特有の臭気とプラスチック製品を白濁させる性質がある。したがって、目的に応じて使い分ける必要があろう。

冬季における殺菌効果の低下傾向を調べるため、0℃における検討をエチルアルコールについてのみ行ったが、表3.2に示したように20℃の場合と同等の殺菌効果が認められた。サク・マス類の養殖現場では冬季の気温が-10~-20℃位に低下することも多く、逆性石ケンなどは凍結し使用不能になるが、エチルアルコールの共晶点は-117.3℃なので十分に使用に耐える。

表3.2. エチルアルコールの *A. salmonicida* に対する殺菌効果

濃度 (%)	作 用 時 間				
	15秒	1分	2.5秒	5分	10分
50	+	+	+	+	+
	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
60	+	+	+	+	+
	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
70	+	+	+	+	
	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
80	+	+	+	+	
	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
90	+	+			
	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

+ : 有効    - : 無効

作用温度 上段20℃ 下段 ( )内0℃

表 3 3. メチルアルコールの *A. salmonicida* に対する殺菌効果

濃度 (%)	作 用 時 間				
	1 5 秒	1 分	2.5 分	5 分	1 0 分
5 0	—	+	+	+	+
6 0	+	+	+	+	+
7 0	+	+	+	+	+
8 0	+	+	+	+	+
9 0	+	+	+	+	+

+ : 有効      - : 無効

作用温度    2 0 °C

表 3 4. イソプロピルアルコールの *A. salmonicida* に対する殺菌効果

濃度 (%)	作 用 時 間				
	1 5 秒	1 分	2.5 分	5 分	1 0 分
5 0	+	+	+	+	+
6 0	+	+	+	+	+
7 0	+	+	+	+	+
8 0	+	+	+	+	+
9 0	+	+	+	+	+

+ : 有効      - : 無効

作用温度    2 0 °C

更に検討する必要はあるものの、アルコール系消毒剤は低温時にも効力を発揮するものと思われる。

既報のように、IHNウイルスに関しても、エチルアルコールで濃度40%、イソプロピルアルコールで濃度30%、作用時間15秒でいずれも殺ウイルス効果が認められていることから、両アルコールはサケ・マス類養殖現場で、手や指の消毒に効果的に使用し得るものと考えられる。

## 2. 低温下における逆性石けんのIHNウイルスに対する効果

サケ・マス類養殖現場で、手や指、器具・機材等の消毒剤として使用頻度の高い逆性石けんの

IHNウイルスに対する殺ウイルス効果を冬季の使用を考慮して、低温下で検討した。

### 1) 材料及び方法

消毒剤として、塩化ベンザルコニウム(8%)、ポリオクチルポリアミノエチルグリシン(1.8%)、ポリオキシエチレンアルキルフェノールエーテル(1.2%)の合剤(商品名:北研セット)を供試した。消毒剤原液をPBS(-)で希釈し、有機物として牛胎児血清を添加し、所定濃度(1:50、1:100、1:200、1:300)の供試液を作製した。0℃及び5℃の条件下で供試液にウイルス液(IHNウイルスHV7601株)を所定時間(5、10、15、20、30分間)作用させ、既報の評価方法に基づき、消毒剤の殺ウイルス効果を調べた。評価方法の概略は、細胞毒性対照及びウイルス対照を設け、細胞が消毒剤の影響を受けず、しかもウイルス感染力価の減少が認められない希釈倍率をまず求め、この希釈倍率におけるマイクロプレート観察において、CPEが認められた場合を無効(-)、CPEが認められなかった場合(+)とした。

### 2) 結 果

0℃および5℃における逆性石けんの殺IHNウイルス効果を表35及び表36に示す。

0℃においては、希釈倍率1:100、作用時間5分で殺ウイルス効果が認められた。5℃においては、希釈倍率1:100、作用時間5分、希釈倍率1:200、作用時間30分で殺ウイルス効果が認められた。

表35. 0℃における逆性石けんのIHNウイルスに対する殺ウイルス効果

濃 度 (希釈倍率)	作 用 時 間 (分)				
	5	10	15	20	30
1 : 50	+	+	+	+	+
1 : 100	+	+	+	+	+
1 : 200	-	-	-	-	-
1 : 300	-	-	-	-	-

+ : 有効      - : 無効

表 3 6. 5℃における逆性石けんの I H N ウイルスに対する殺ウイルス効果

濃 度 (希釈倍率)	作 用 用 時 間 (分)				
	5	10	15	20	30
1 : 50	+	+	+	+	+
1 : 100	+	+	+	+	+
1 : 200	-	-	-	-	+
1 : 300	-	-	-	-	-

+ : 有効      - : 無効

### 3) 考 察

0℃、5℃の条件下でも、逆性石けんの殺 I H N ウイルス効果は認められたが、15℃で行った同様の試験結果と比較すると、低温になるにつれ、効果が低下する傾向にあり、冬季の使用に際しては消毒剤の濃度を高める必要があると考えられる。

## VII 摘 要

昭和 59 年度から 61 年度の 3 カ年間に実施した魚病対策技術開発試験の結果をとりまとめた。得られた成果は次のとおりである。

### 1. I H N 被害低減化試験

- 1) I H N ワクチン開発基礎試験を行い、I H N ウイルスの不活化法としてホルマリン処理が有効であることを明らかにした。
- 2) ホルマリンで不活化した I H N ウイルス液の保存法について検討し、無処理でも 4℃で低温保存すれば、調製後 1 週間は効力に変化の無いことを明らかにした。
- 3) 浸漬免疫について検討し、有効性を確認した。
- 4) 診断の迅速化を目指し、蛍光抗体法の導入を試みた。蛍光抗体法を用いれば従来のウイルス分離法に比べ格段に早く診断できることを明らかにした。
- 5) 奥多摩分場で採卵に用いるニジマス雌親魚の体腔液についてウイルス検査を行い、14.5%の魚が I H N ウイルスを保有していることを明らかにした。
- 6) 高水温環境下における I H N の発生例について記載した。

## 2. 細菌性鰓病に関する試験

- 1) 細菌性鰓病の原因菌、*Flavobacterium* sp.の奥多摩分場の養魚池における生態を調べ、6月下旬から8月上旬、水温16～20℃の時に池水中や魚の体表面、鰓から検出できること、検出方法として蛍光抗体法が優れていることを明らかにした。
- 2) 細菌性鰓病の人工感染試験を行い、感染魚の鰓における原因菌の動態を光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。
- 3) 細菌性鰓病と水質の関係を調査したが、両者の関連性を明確にすることはできなかった。

## 3. 水カビ病に関する試験

- 1) ヤマメの水カビ病発生に及ぼす飼育密度の影響を調べ飼育密度の影響は少ないと推定した。
- 2) ヤマメの水カビ病発生に及ぼす絶食の影響を調べ、絶食の影響は少ないと推定した。
- 3) ヤマメの水カビ病発生に及ぼす取り扱いの影響を調べ、取り扱いの影響は少ないと推定した。
- 4) 内臓真菌症の人工感染試験を試み、内臓真菌症の発病には宿主側の要因が大きく影響することを明らかにした。

## 4. せっそう病被害低減化試験

- 1) *Aeromonas salmonicida* の毒素産生に及ぼす培養基の影響を調べ、培養基の違いにより毒力産生に差が生じることを明らかにした。
- 2) *Aeromonas salmonicida* の薬剤感受性を調べた。

## 5. BKDに関する試験

- 1) 奥多摩分場のヤマメ雌親魚の腎臓を採卵時に肉眼的に調べ、BKDの有無を検査した。計333尾について調べたがBKDの症状は全く認められなかった。

## 6. 消毒剤に関する試験

- 1) アルコール系消毒剤の*Aeromonas salmonicida*に対する殺菌効果を調べ、短時間で殺菌効果のあることを明らかにした。
- 2) 低温下における逆性石けんのIHNVウイルスに対する効果を調べ、低温になるほど効果が低下する傾向を明らかにした。

## Ⅹ 文 献

- 1) D. F. AMEND : *J. Fish. Res. Board Can.*, 33, 1059 - 1066 (1976)。
- 2) D, F, AMEND and D, C, FENDER : *Sicence*, 192, 793 - 794 (1976)。
- 3) R, ANITIPA and D. F. AMEND : *J. Fish. Res. Board Can.*, 34, 203 - 208 (1977)。
- 4) T. R. CROY and D. F. AMEND : *Aquaculture*, 12, 317 - 325 (1977)。
- 5) Y. SONG and G. KOU : *Fish Pathology*, 15, 249 - 255 (1981)。
- 6) T. AOKI, T. KITAO, M. FUKUDOME, S. TAKAHASHI and S. EGUSA : *J. Fish Diseases*, 7, 149 - 156 (1984)。
- 7) T. AOKI, M. SAKAI and S. TAKAHASHI : *Fish Pathology*, 19, 181 - 185 (1984)。
- 8) K. KAWANO, T. AOKI and T. KITAO : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50, 771 - 774 (1984)。
- 9) 城 泰彦 : 四国医学雑誌、37、(1981)。
- 10) 川生 明 : 図説 螢光抗体法、ソフトサイエンス社、東京、4 - 5 (1983)。
- 11) G. L. BULLOCK and H. M. STUKEY : *Fish Health News*, 4 (2), (1975)。
- 12) T. KITAO and M. KIMURA : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 40 (9), 889 - 893 (1974)。
- 13) 森 真朗 北尾忠利、木村正雄 : 魚病研究、11 (1), 11 - 16 (1976)
- 14) 楠田理一、河原栄二郎、J. S. NELSON : 昭和59年度日本水産学会春季大会講演要旨集、318 (1984)。
- 15) 渡辺 翼、佐野正安、高橋恵子 : 昭和53年度日本水産学会春季大会講演要旨集、229 (1978)
- 16) 佐野徳夫、西村定一 : 魚病対策技術開発研究報告書、(1980)。
- 17) 佐野徳夫、西村定一 : 魚病対策技術開発研究報告書、(1981)。
- 18) 佐野徳夫、西村定一 : 魚病対策技術開発研究報告書、(1982)。
- 19) 佐野徳夫、西村定一 : 魚病対策技術開発研究報告書、(1983)。
- 20) 佐野徳夫、西村定一 : 魚病対策技術開発研究報告書、(1984)。
- 21) 江草周三 : 魚の感染症、恒星社厚生閣、東京、(1978)
- 22) D. F. AMEND : *J. Fish. Res. Board Can.*, 27, 265 - 270 (1970)。
- 23) 原 義守、松本一朗 : ウイルス検査法の実際、近代出版、東京、180 - 185 (1980)。
- 24) D. K. SAKAI : *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 47, 565 - 571 (1981)。
- 25) 松橋 直、成内秀雄、白井美津子 : 免疫学実験入門 (生物化学実験法、15)、学会出版センター



- 東京、77-84 (1985)。
- 26) 江草周三 編：魚病学(感染症・寄生虫病篇)、9-10、恒星社厚生閣、東京、(1983)。
- 27) M. YOSHIMIZU and T. KIMURA: *Prog. Fish-Cult.*, 47, 199-200 (1985)。
- 28) 花田 博、植松久男、平野正義：昭和51年度静岡県水産試験場富士養鱒場事業報告、27-28 (1976)。
- 29) D. MULCAHY R. J. PASCHO and C. K. JENES: *J. Fish. Diseases*, 6, 183-188 (1983)。
- 30) T. SANO, T. NISHIMURA, N. OKAMOTO, T. YAMAZAKI and H. HANADA: *Jour. Tokyo Univ. Fish.*, 63, 81-85 (1977)。
- 31) D. F. AMEND, W. T. YASUTAKE, J. L. FRYER, K. S. PUICHER and W. H. WINGFIELD: FAO, EIFAC Tech. Pap. No. 17, Suppl. 2 (1973)。
- 32) 荒井 真、田代文男、岡本信明、西村定一、佐野徳夫：昭和57年度日本魚病学会講演要旨集、(1982)。
- 33) D. F. AMEND: *J. Fish. Res. Board Can.*, 27, 265-270 (1970)。
- 34) D. F. AMEND: U. S. Fish Wildl. Serv., Fish Diseases Leaf., No. 39, 6 (1974)。
- 35) D. F. AMEND: *J. Fish. Res. Board Can.*, 33, 1059-1066 (1976)。
- 36) F. M. HETRICK, M D. KNITTEL and J. L. FRYER: *J. Fish. Diseases*, 2, 253-257 (1979)。
- 37) B. L. NICHOLSON: Antigenes of fish pathogens, Development and production for vaccines and serodiagnostics, 63-79 (1982)。
- 38) 江草周三：魚の感染症、恒星社厚生閣、東京、(1978)。
- 39) 荒井 真、田代文男：岐阜水試研究報告、22, 131-135 (1977)。
- 40) W. T. YASUTAKE: *Fish Pathology*, 14, 59-64 (1978)。
- 41) 花田 博、平野正義、佐野宜八郎、植松久男、稲葉繁雄、渡辺佳一郎：静岡県富士養鱒場研究報告、2, 59-84 (1978)。
- 42) 許 康俊：東京大学農学部修士論文、(1986)。
- 43) 木村紀彦、若林久嗣、工藤重治：魚病研究、12(4), 233-242 (1978)。
- 44) E. M. WOOD and W. T. YASUTAKE: *Prog. Fish-Cult.*, 9, 7-17 (1975)。
- 45) E. M. DONALDSON: Stress and Fish, Ed. A. D. PICKERING, Academic Press, 11-47 (1981)。
- 46) 原 武史：養魚学講座8巻、ヤマメ、アマゴ、緑書房、35-68 (1973)。

- 47) R. R. ROTH : *J. Wildlife Dis.*, 8, 24-28 (1972)。
- 48) G. A. NEISH and G. C. HUGHES : Fugal Diseases in Fish, T. F. H. Publication Inc., Ltd., New Jersey, (1980)。
- 49) T. B. BAGENNAL *J. Fish Biol.*, 1, 349-353 (1969)。
- 50) A. D. PICERING : *J. Fish Biol.*, 20, 229-244 (1982)。
- 51) R. J. STRANGE and C. B. SCHRECK : *J. Fish. Res. Board Can.*, 35, 345-349 (1978)。
- 52) E. M. DONALDSON and J. R. MCBRIDE : *Gen. comp. Endocr.*, 9, 93-101 (1967)。
- 53) R. J. STRANGE and C. B. SCHRECK : *Tran. Ame. Fish. Soc.*, 10, 561-566 (1977)。
- 54) 田代文男、森川 進、荒井 真 : 魚病研究、11, 213-215 (1977)。
- 55) 長野県水産試験場 : 第10回全国養鱒技術協議会資料、(1986)。
- 56) 宮崎照雄、窪田三郎、田代文男 : 魚病研究、11, 183-186 (1977)。
- 57) 畑井喜司雄、江草周三 : 魚病研究、11, 187-193 (1977)。
- 58) 木村喬久、栗倉輝彦 : 日水誌、43, 143-150 (1977)。
- 59) 木村喬久 : 昭和59年度魚病対策技術研修魚病専修コース専門コース(さけ・ます類)研修資料、(1984)。
- 60) T. P. T. EVELYN : *Bull. Off. int. Epiz.*, 87, 511-513 (1977)。
- 61) G. L. BULLOCK and H. M. STUCKEY : *J. Fish. Res. Board Can.*, 31, 1939-1940 (1975)。
- 62) 木村喬久、吉水 守 : 日水誌、47, 1173-1183 (1981)。

Publication of The Tokyo Metropolitan

Fisheries Experiment Station № 352

Memoir of The Tokyo Metropolitan

Fisheries Experiment Station №194

昭和63年4月 発行

印刷物規格表第2類  
印刷番号(63) 1

魚病対策技術開発試験結果報告書

(昭和59～61年度、3カ年のとりまとめ)

編集・発行 東京都水産試験場技術管理部  
〒125 東京都葛飾区水元公園1-1  
電話 03-600-2873

印刷会社名 原口印刷株式会社  
〒101 東京都千代田区猿樂町1-5-19  
電話 03-291-8819