

東水試出版物通刊 No. 292

調査研究要報 No. 142

昭和54年度 魚病対策技術開発研究報告書

マス類の伝染性病原体の消毒法に  
関する研究

昭和55年3月

東京都水産試験場

# 目 次

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| I はじめに .....                     | 1  |
| II 魚病細菌の石炭酸係数について .....          | 5  |
| 1. 石炭酸係数測定方法の検討 .....            | 5  |
| a 材料および方法 .....                  | 5  |
| b 結 果 .....                      | 7  |
| c 考 察 .....                      | 13 |
| 2. 石炭酸の魚病細菌に対する殺菌効果 .....        | 14 |
| a 材料および方法 .....                  | 14 |
| b 結果および考察 .....                  | 15 |
| 3. 魚病細菌に対する第四級アンモニウム塩の殺菌効果 ..... | 16 |
| a 材料および方法 .....                  | 16 |
| b 結果および考察 .....                  | 16 |
| III 参考文献 .....                   | 18 |



|           |   |
|-----------|---|
| 1. 実施機関   | 東京都水産試験場奥多摩分場   |
| 2. 指導・助言者 | 水産庁養殖研究所病理部<br>病原生物研究室長 原 武 史                                       |
| 3. 研究担当者  | 主任研究員 田 中 米 満(総 括)<br>主 事 井 上 潔(試験研究<br>取りまとめ)<br>主 事 工 藤 真 弘(試験研究) |

# I はじめに

養殖業の発展に伴って急激に増加してきた魚病被害は、養殖生産物の安定生産を左右する最大の要因の一つと成るに至っている。これらの魚病に対する対策として、最初に取り組みられたのは疾病の治療法の開発であった。そして、これらの開発研究の成果としてサルファ剤をはじめ種々の合成抗菌剤が水産薬として使用され、魚病被害の低減に寄与してきたことは周知のところである。

しかし、これらの化学療法剤の使用は、適正使用法の徹底が不十分であったことから、一方で“薬づけの養殖魚”といわれるような薬の乱用を引き起こし、耐性菌の出現および食品として安全性という大きな問題を招来する結果となっている。

このような現状をふまえ、魚病対策は新たな展開を要するに至り、治療という受動的対策もさることながら、より根本的な対策として疾病の予防・防疫対策の早期確立が必要とされるようになった。

魚病の予防・防疫方法に関しては、近年種々の分野で検討され、たとえば、診断技法の開発、ワクチンの実用化研究をはじめとして、耐病性品種の改良あるいは飼育施設の改良などが行われ、そのなかにはほとんど実用化されるに至っている技術もある。

本研究で取り上げる消毒剤については、たとえば、生石灰やサラシ粉のようにかなり古くから養殖池で使用されているものもあり、また、今日では主にサケ・マス類の養殖において魚卵、器具機材、池等の消毒によるウイルス性疾病の伝播防止が試みられ、比較的多くの消毒薬が養殖の現場で使用されている。現在、わが国のサケ・マス類の養殖場では、サラシ粉、次亜塩素酸ナトリウム等の塩素化合物、ヨードホルム、ポビドンヨード等のヨウ素化合物、クレゾール等のフェノール類、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム等の第四級アンモニウム塩を主体とした界面活性剤やその他マラカイトグリーン等の色素類が多く使用されているが、魚病病原体に対するこれらの消毒剤の効力評価に関する資料は少なく、人畜の病原体に関する資料や知見に基づいて使用されているものも多いと考えられる。

表-1には、魚病病原体に関する消毒剤の効果についての知見を整理した。これらの報告では、IPN、IHNのウイルスを主体に*A. salmonicida*や*V. anguillarum*等の魚病細菌について、ヨウ素化合物や逆性石けんなどの効力評価が、研究者によってそれぞれ異なった試験方法で検討され、それぞれの病原体に対する消毒剤の有効濃度と接触時間が報告されている。

ところで、消毒薬効力の評価には多くの定まった試験法があり、そのなかで消毒薬の検定あるいは殺菌力の比較に古くから用いられた評価法として石灰酸係数法がある。石灰酸係数はRidealとWalker(1903)によって提唱され、今日ではこの方法の変法としてChick-Martin法、AOAC法、FDA法、Lancet Commission法がある(古橋・1974)。わが国では1952年に厚生省が発表した消毒薬検査指針のなかの効力試験法としてこの石灰酸係数測定法が記載されている。石灰酸係数

の測定はヒトの場合、*Salmonella typhi* T-D 株を使用し、単に石炭酸係数という場合はこのチフス菌を使用した場合をさしている。また家畜の場合は、飯塚(1977)はウシ、ブタ、ニワトリを代表してそれぞれ一種以上の菌種での石炭酸係数が必要であるとしている。このように、人畜においては消毒剤を使用する場合の基本的な効力評価の基準として石炭酸係数が用いられている。しかし、魚病細菌に関する報告はほとんど無く、今後消毒剤を使用する場合の裏付けの資料として、代表的な養殖魚種についてそれぞれ一種以上の病原菌に対する石炭酸係数を求め、さらに、各種の評価法に基づく資料を蓄積し、魚病分野における消毒剤の使用基準を明らかにしていく必要がある。

表-1 魚病病原体に対する各種消毒剤の効果

| 病 原 体   | 消 毒 剤       | 処 理 法                |       | 効 果 | 文 献                     |
|---------|-------------|----------------------|-------|-----|-------------------------|
|         |             | 濃 度                  | 時 間   |     |                         |
| IPNウイルス | Wescodyne   | 16ppmI <sub>2</sub>  | 5min  | +   | Amend and Pietch (1972) |
|         | Betadine    | 32ppmI <sub>2</sub>  | 5min  | +   | "                       |
|         | ホルマリン       | 1:1000               | 30min | +   | 山崎ら(1976)               |
|         | 次亜塩素酸ナトリウム  | 1:250                | "     | +   | "                       |
|         | クレゾール       | 1:1000               | "     | +   | "                       |
|         | オスバン        | 1:<125               | "     | +   | "                       |
|         | バコマ         | 1:<125               | "     | +   | "                       |
|         | エンピロン       | 1:<125               | "     | +   | "                       |
|         | イソジン        | 1:125                | "     | +   | "                       |
|         | クリンナップ      | 1:125                | "     | +   | "                       |
| IHNウイルス | Wescodyne   | 25ppmI <sub>2</sub>  | 15sec | +   | Amend and Pietch (1972) |
|         | Betadine    | 25ppmI <sub>2</sub>  | 15sec | +   | "                       |
|         | "           | 12ppmI <sub>2</sub>  | 30sec | +   | "                       |
|         | マラカイトグリーン   | 1:200,000            | 60min | -   | "                       |
|         | acriflavine | 1:2000               | 20min | -   | "                       |
|         | Thimerosal  | 1:500                | 10min | -   | "                       |
|         | 塩化ナトリウム     | 3%                   | 10min | -   | "                       |
|         | 次亜塩素酸ナトリウム  | 10ppmcl <sub>2</sub> | 10min | +   | "                       |
|         | "           | 1:2000               | 30min | +   | 山崎ら(1976)               |

| 病 原 体                        | 消 毒 剤                     | 処 置 法              |            | 効 果   | 文 献                     |
|------------------------------|---------------------------|--------------------|------------|-------|-------------------------|
|                              |                           | 濃 度                | 時 間        |       |                         |
| IHNウイルス                      | 塩化ベンザルコニウム                | 1:50,000           | 30min      | -     | Amend and Pietch (1972) |
|                              | ホルマリン                     | 1:500              | 60min      | -     | "                       |
|                              | "                         | 1:125              | 30min      | -     | 山崎ら(1976)               |
|                              | クレゾール                     | 1:250              | 30min      | +     | "                       |
|                              | オスバン                      | 1:500              | 30min      | +     | "                       |
|                              | パ コ マ                     | 1:500              | "          | +     | "                       |
|                              | ネオヨジン                     | 1:250              | "          | +     | "                       |
|                              | イソジン                      | 1:250              | "          | +     | "                       |
| VHSウイルス                      | Wescodyne                 | 8ppmI <sub>2</sub> | 5min       | +     | Amend and Pietch (1972) |
|                              | Betadine                  | 8ppmI <sub>2</sub> | 5min       | +     | "                       |
| <i>Aeromonas salmonicida</i> | Betadine (pH 7.0)         | 25ppm              | 300sec     | +     | Ross and Smith (1972)   |
|                              | イソジン (pH 5.0)             | 4ppmI <sub>2</sub> | 60sec      | +     | 原ら(1974)                |
|                              | ダイヤザン (pH 2.8)            | 2ppmI <sub>2</sub> | 30sec      | +     | "                       |
|                              | クリンナップ (pH 2.3)           | 2ppmI <sub>2</sub> | 15sec      | +     | "                       |
|                              | イソジン (pH7~8)              | 8ppmI <sub>2</sub> | 30sec      | +     | " (1975)                |
|                              | ダイヤザン (pH7~8)             | 8ppmI <sub>2</sub> | 15sec      | +     | "                       |
|                              | イソジン                      | 1:700              | 5min       | +     | 佐々木(1976)               |
|                              | ダイヤサン                     | 1:5000             | "          | +     | "                       |
|                              | クリンナップ                    | 1:1000             | "          | +     | "                       |
|                              | 石炭酸                       | 1:200              | "          | +     | "                       |
|                              | クレゾール                     | 1:500              | "          | +     | "                       |
|                              | マラカイトグリーン                 | 15ppm              | "          | +     | "                       |
|                              | ホルマリン                     | 1:1000             | "          | +     | "                       |
|                              | <i>Vibrio anguillarum</i> | マラカイトグリーン          | 1ppm       | 30min | +                       |
| Betadine (pH 7.0)            |                           | 25ppm              | 15sec less | +     | Ross and Smith (1972)   |
| イソジン (pH 5.0)                |                           | 4ppmI <sub>2</sub> | 15sec      | +     | 原ら(1974)                |
| ダイアザン (pH 2.8)               |                           | 2ppmI <sub>2</sub> | "          | +     | "                       |
| クリンナップ (pH 2.3)              |                           | 4ppmI <sub>2</sub> | "          | +     | "                       |
| イソジン (pH7~8)                 |                           | 8ppmI <sub>2</sub> | "          | +     | " (1975)                |

| 病原体                                      | 消毒剤               | 処置法                |                   | 効果 | 文献                    |
|--|-------------------|--------------------|-------------------|----|-----------------------|
|  |                   | 濃度                 | 時間                |    |                       |
| <i>Aeromonas liquefaciens</i>            | ダイアザン (pH 7~8)    | 4ppmI <sub>2</sub> | 15 sec            | +  | 原ら (1975)             |
|  | Sulfomerthiolate  | 0.04%              | 25min             | -  | McCFadden (1969)      |
|  | Merthiolate       | "                  | "                 | -  | "                     |
|  | アクリフラビン           | 0.02%              | "                 | +  | "                     |
|  | "                 | 0.04%              | 10min             | +  | "                     |
|  | Bridine           | 0.5 %              | "                 | +  | "                     |
|  | Betadine          | "                  | "                 | +  | "                     |
| Redmouth disease bacteria                | Betadine (pH 7.0) | 25ppm              | 120sec            | +  | Ross and Smith (1972) |
| Fluorecent <i>Pseudomonads</i>           | "                 | "                  | 15sec less        | +  | "                     |
| non-fluorecent <i>Ps</i>                 | "                 | "                  | " 120 sec or more | +  | "                     |
| <i>Flexibacter columnalis</i>            | "                 | "                  | "                 | +  | "                     |
| <i>Cytophaga psychrophila</i>            | "                 | "                  | 30sec             | +  | "                     |
| Kidney disease bacteria                  | "                 | "                  | 60sec             | +  | "                     |
| <i>Saprolegnia parasitica</i> (mycelium) | "                 | "                  | 300sec            | +  | "                     |
|  | "                 | "                  | 300sec            | -  | "                     |

## II 魚病細菌の石炭酸係数について

### 1. 石炭酸係数測定方法の検討

1952年に厚生省より発表された消毒剤の効力試験法（消毒薬検査指針）にそって、魚病細菌の石炭酸係数測定方法について検討した。

#### a 材料および方法

##### 1) 供試菌株

サケ科魚の代表的細菌性疾病の病原体である *Aeromonas salmonicida* と *Vibrio anguillarum* を供試した。*A. salmonicida* は当場でヤマメ病魚より分離した保存株（TO 7804）および色素を産生しない NCMB 2020 (*A. salmonicida* subsp *masoucida*) の2株、*V. anguillarum* は、ニジマスより分離した N 7802 株とアユより分離した TO 7901 株の2株である。なお、*V. anguillarum* の2株は、宮崎大学北尾教授より分与を受けた抗血清によると血清型はいずれも Type A に属するものである。また、以上の魚病細菌の他に、*E. coli* (K-12株) および *Staph. aureus* (ATCC 6538p 株) を供試した。

##### 2) 使用培地の検討

消毒薬検査指針（以下指針という）では消毒薬検査用ブイオン培地として表-2の組成の培地を指定している。しかし、指針が発表されたのは1952年と古く、現在では市販の合成培

表-2 消毒薬検査用ブイオン培地の組成

|      |       |
|------|-------|
| 肉エキス | 5g    |
| 食塩   | 5g    |
| ペプトン | 10g   |
| DW   | 1000g |
| PH   | 6.8   |

地が普及していることから、指針で指定した培地のかわりにこれらの市販合成培地が使用されることが多い（飯塚1977）。そこで、魚病細菌に関しても指定培地および市販合成培地における発育を比較し、石炭酸係数に適した培地の検討を行った。

供試した培地は表-2に示す指定培地のほかに市販合成培地としてハートインフュージョンブイオン培地；ニッサン（HIB）とトリプトソーヤブイオン培地；ニッサン（TSB）および

3%のNaClを添加した普通ブイヨン培地；エイケン（3% NaCl NB）の三種を供試した。

なお、これらの培地のpHはH I B - pH 7.2 ± 0.1、T S B - pH 7.3 ± 0.1 3% NaCl NB - pH 7.0である。

実験に際しては *A. salmonicida* (TO 7804, NCMB 2020) と *V. anguillarum* (N7802, TO 7901) を普通寒天平板培地で22℃で24時間培養し、0.85%生理食塩水でそれぞれ表-3に示す濃度の懸濁液を調製し、その1.0mlを300mlずつ分注した培地に接種した。細菌接種後は20℃および25℃で培養し、接種後3、6、12、24、48、72時間後に分光光度計（日立101型、波長650nm）で吸光度を測定した。

表-3 被検培地に接種した菌懸濁液の濃度 (CFU/ml)

| 菌 種                   | 菌 株       | 濃 度 (CFU/ml)      |
|-----------------------|-----------|-------------------|
| <i>A. salmonicida</i> | TO 7804   | $3.2 \times 10^7$ |
|                       | NCMB 2020 | $2.9 \times 10^7$ |
| <i>V. anguillarum</i> | N 7802    | $1.9 \times 10^8$ |
|                       | TO 7901   | $1.2 \times 10^8$ |

### 3) 培養温度の検討

消毒薬検査等を実施するにあたっては *A. salmonicida* と *V. anguillarum* の二種の細菌の培養温度を統一することが望ましいため、両細菌の至適培養温度範囲で20℃と25℃に温度を設定して菌の発育を観察した。なお、実験手順は前項(2.)と同様である。

### 4) 魚病細菌の蒸留水中での生残

各菌株をH I B培地で20℃、24時間培養後 (*Staph aureus* は37℃、24時間培養)、培養液1mlを蒸留水10mlに加え20℃の水浴中に放置し、所定時間(15、30、60分)経過後に常法により生菌数 (colony forming Unit/ml) を測定した。各菌株のH I B 培地、24時間培養後の生菌数は *A. salmonicida* (TO 7804) が  $4.9 \times 10^8$  CFU/ml、*V. anguillarum* (N7802) が  $6.6 \times 10^8$  CFU/ml、*Staph. aureus* (ATCC 6538p) が  $3.3 \times 10^8$  CFU/ml であった。



b 結 果

1) 使用培地の検討

*A. salmonicida* の TO 7804 株と NCMB 2020 株を 20℃ で培養したときの増殖曲線をそれぞれ図-1, 2 に示した。

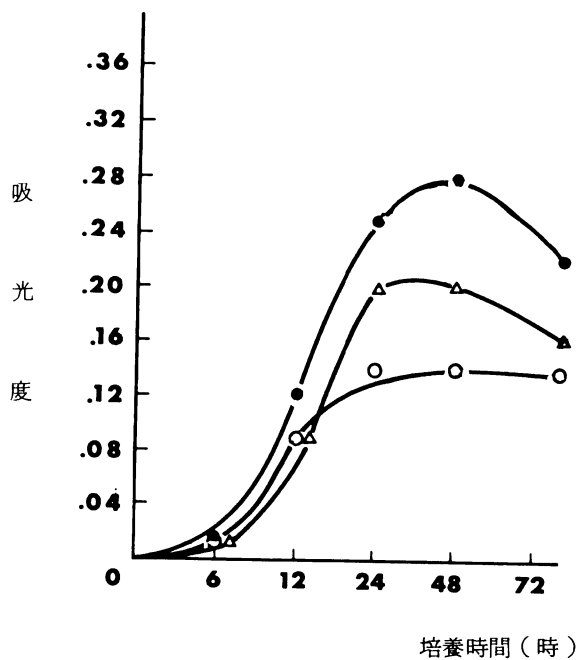


図-1 *A. salmonicida* TO 7804 株の被検培地における増殖曲線, 培養温度は 20℃,

- ハートインフュージョンペプトン培地
- △—トリプトリーヤペプトン培地
- 消毒薬検査用ペプトン培地

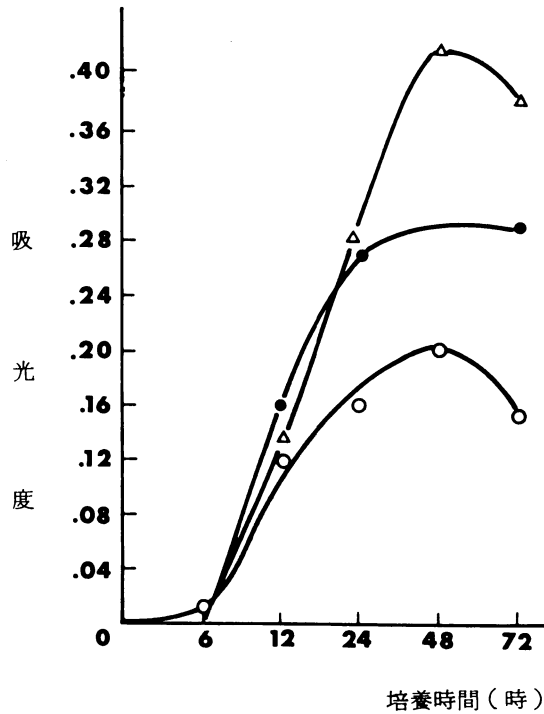


図-2 *A. salmonicida* NCMB 2020株の被検培地における増殖曲線，培養温度は20℃

- ハートインフュージョンブイヨン培地
- △—トリプトソヤブイヨン培地
- 消毒薬検査用ブイヨン培地

TO7804株はそれぞれの培地において培養後6時間頃より肉眼的に菌の増殖が認められ菌の濃度はHIB培地では48時間、TSB培地では24～48時間で最大となった。また、指針培地では24時間で最大となり78時間まで濃度は変化しなかった。各培地の最高濃度の吸光度はHIB培地0.28、TSB培地0.20、指針培地0.14～0.15となり、TO7804株はHIB培地で最も良く発育し、ついでTSB培地、指針培地の順であった。

NCMB 2020株については図-2に示すとおり、各地ともほぼ48時間の培養で最大濃度に達し、吸光度はHIB培地0.24、TSB培地0.42、指針培地0.20となり、TSB培

地で最も良く発育した。

*V. anguillarum* の増殖曲線に関しては、ニジマスより分離した株 (N7802) について 25℃ と 20℃、アユより分離した株 (TO7901) は 25℃ で培養し観察した。その結果、N7802 株の 25℃ における増殖は図-3 に示すとおり H I B 培地、3% NaCl NB 培地、指針培地とも大きな差は認められず、H I B 培地において菌の濃度が比較的高い結果であった。

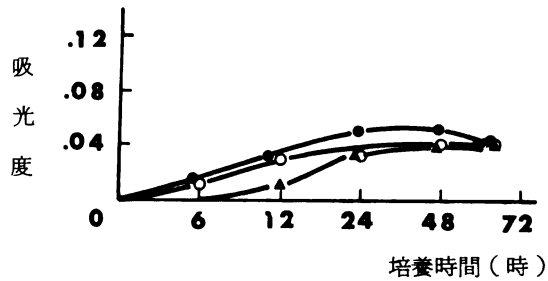


図-3 *V. anguillarum* N7802 株の培養温度 25℃ での被検培地における増殖曲線

- ハートインフュージョンペプトン培地
- ▲— 3% NaCl 添加普通ペプトン培地
- 消毒薬検査用ペプトン培地

同様の 20℃ における培養では菌の増殖は図-4 に示すとおり指針培地と 3% NaCl NB 培地間の差は認められなかったが、H I B 培地では他の培地に比べ、増殖速度が速くなる傾向が認められた。

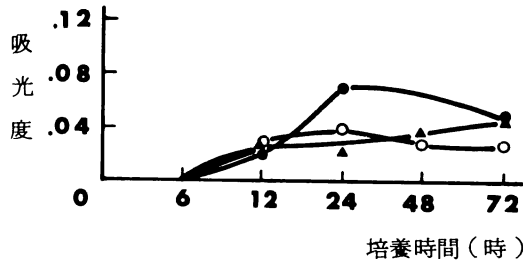


図-4 *V. anguillarum* N7802 株の培養温度 20℃ での被検培地における増殖曲線, (図中の記号は図-3 参照)

TO7901株の培養結果は図-5に示した。TO7901株はN7802株に比べ、全般的に発育は良好でHIB培地におよび指針培地における発育状況は類似した傾向を示した。一方3%NaClNB培地では他の二種の培地に比べ増殖速度は遅かった。

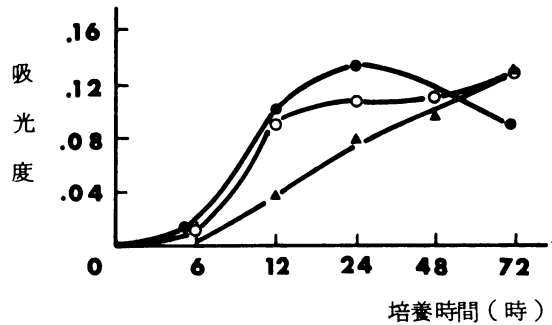


図-5 *V. anguillarum* TO7901株の被検培地における増殖曲線  
(図中の記号は図-3参照)

## 2) 培養温度の検討

供試培地の検討と同時に *A. salmonicida* と *V. anguillarum* についてHIB培地での発育状況を20℃と25℃の培養温度で比較した。

*A. salmonicida* TO7804株については図-6に示すように20℃の方が25℃に比べ増殖速度、発育菌量とも良好な結果であった。また、NCMB2020株については図-7に示すとおり増殖速度、菌量に差は認められなかった。

*V. anguillarum* に関する結果はN7802株について図-8、TO7901株について図-9に示した。両菌株とも20℃、25℃培養における増殖速度および発育菌量に明確な差は認められなかった。

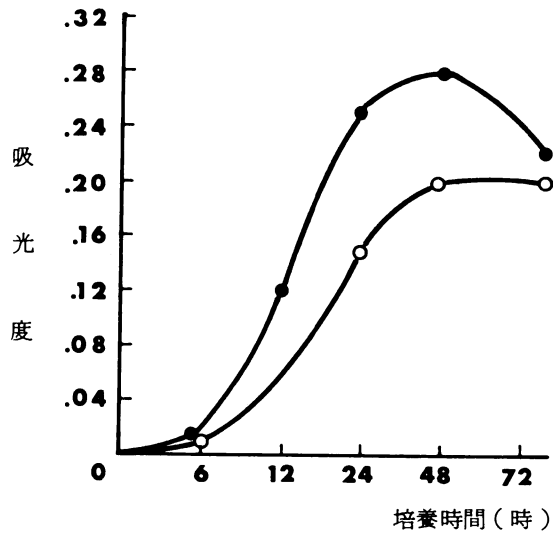


図-6 *A. salmonicida* TO 7804 株のH I B培地での発育に対する温度の影響

—●— 20°C培養      —○— 25°C培養

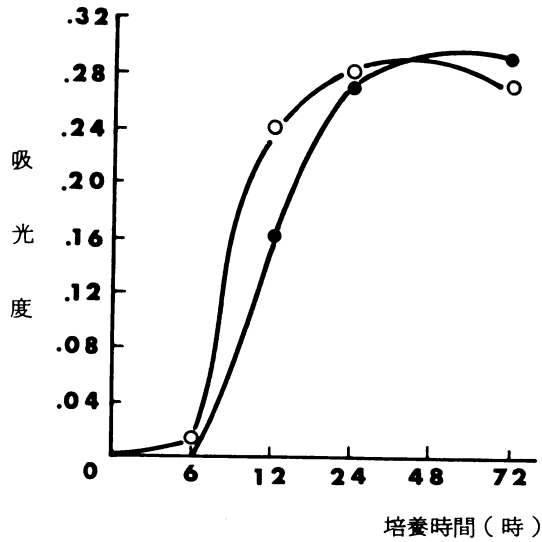


図-7 *A. salmonicida* NCMB 2020 株のH I B培地での発育に対する温度の影響

—●— 20°C培養      —○— 25°C培養

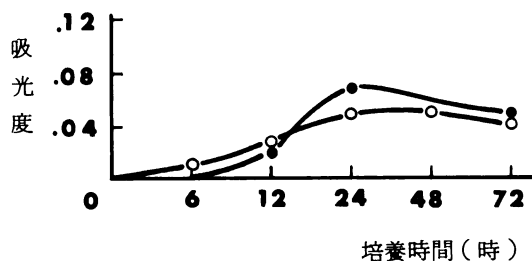


図-8 *V. anguillarum* N7802株のHIB培地での発育に対する温度の影響  
 ●— 20°C培養    ○— 25°C培養

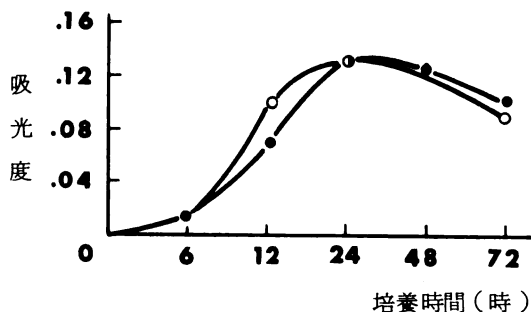


図-9 *V. anguillarum* T07901株のHIB培地での発育に対する温度の影響  
 ●— 20°C培養    ○— 25°C培養

### 3) 魚病細菌の蒸留水中での生残

各菌株の蒸留水中の生菌数の変化を図-10に示した。60分間の観察終了時において、*A. salmonicida* T07804株の生菌数は $5.7 \times 10^7$  CFU/mlであり、実験開始時の生菌数( $3.8 \times 10^7$  CFU/ml)に比べて生菌数の減少は認められなかった。また、*Staph aureus* についても生菌数は実験開始時 $1.6 \times 10^7$  CFU/ml 終了時 $1.7 \times 10^7$  CFU/mlとなり生菌数は減少しなかった。しかし、*V. anguillarum* N7802株では実験開始後30分におけるサンプリングで急激な生菌数の減少が認められ、60分後にはさらに減少し、開始時の生菌数

( $1.2 \times 10^7$  CFU/ml) に対して60分後では $1.2 \times 10^6$  CFU/mlとなり生菌数は $\frac{1}{10}$ となった。

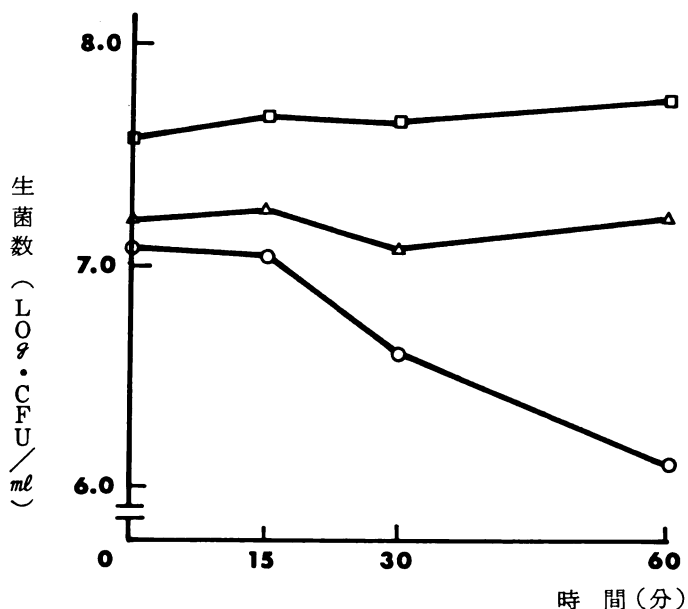


図-10 20°Cにおける蒸留中の生菌数の変化

- *Staph aureus* ATCC 6538 p 株
- △— *A. salmonicida* TO7804 株
- *V. anguillarum* N7802 株

### c 考 察

一般に *A. salmonicida* は、トリプトソイ寒天培地が発育に適しているとされている。したがって、検査用培地の検討には指針培地のほかにトリプトソイブイヨン培地と、さらに飯塚ら(1977)が使用しているハートインフュージョンブイヨン培地の三種を供試した。その結果、*A. salmonicida* TO7804株(色素産生株)はHIB培地において最も発育がよく、指針培地は三種中最も発育が悪くなった。また、NCMB2020株(色素非産生株、*A. salmonicida* subsp *masoucida*)は、TSB培地で最も発育がよく、ついでHIB培地、指針培地の順であった。このように、*A. salmonicida* についてはHIB培地、TSB培地のいずれの場合も指針培地より発育が良好で

ある。一方、*V. anguillarum* の場合は指針培地、H I B培地の他に3%のNaClを添加した普通ブイオン培地(3%NaCl NB培地)を供試した。その結果、分離魚種の異なる二株の*V. anguillarum* の発育には三種の培地間の発育の差は明確ではなく、H I B培地における発育が比較的良い傾向であった。このような二種の魚病細菌の発育状況から、これらの細菌の石炭酸係数測定には市販のハートインフュージョンブイオン培地の使用が適すると考えられる。

検査時の培養温度については、*A. salmonicida* NCMB 2020株と*V. anguillarum* TO 7901株の場合、20℃と25℃における発育の差は認められなかったが、*A. salmonicida* TO 7804株および*V. anguillarum* N7802株では25℃よりも20℃における発育の方が良く、石炭酸係数測定の場合の培養温度は20℃に統一するのが適当であろう。

消毒薬検査指針の石炭酸係数測定方法によれば、被検消毒剤は蒸留水で希釈し供試されることになるが、魚病細菌については蒸留水中での生残能が菌種によって低いことが知られており、測定の際に菌の死滅や生菌数の減少が起り、消毒剤の殺菌効果判定に影響することも考えられる。

したがって、*A. salmonicida* と *V. anguillarum* の蒸留水中での生残能を観察した結果、*A. salmonicida* (TO 7804株) では比較のために供試した *Staph aureus* (ATCC 6538p) と同様に、蒸留水中で20℃、60分の観察において生菌数の減少は認められなかったが、*V. anguillarum* (N7802) では蒸留水中30分の観察において急激な生菌数の減少が認められた。

このように、*V. anguillarum* の生菌数の減少については、石炭酸係数測定時の感作時間が15分以内であることや、実験の結果、15分以内であれば生菌数の減少がほとんど認められなかったことから、実際上は無視出来るものと考えられる。

## 2. 石炭酸の魚病細菌に対する殺菌効果

### a 材料および方法

#### 1) 供試菌株

魚病細菌として *A. salmonicida* と *V. anguillarum* の二種を供試した。*A. salmonicida* については、TO 7804, NCMB 2020, AYS 2株、*V. anguillarum* についてはN7802 TO 7901株の合計5株である。その他に *Staph. aureus* ATCC 6538p株も同時に供試した。なお、AYS 2株以外の菌株については前項1に記載のとおりであり、AYS 2株は、*A. salmonicida* のR型の菌株である。

#### 2) 石炭酸溶液

指針にいう標準石炭酸溶液(融解点40℃以上の純粋な石炭酸を用いて正確に5.0%水溶液を作り、密栓して暗所に保存)を作り、これを滅菌蒸留水で希釈し所定濃度の溶液を調製した。



### 3) 実施方法

石炭酸の希釈液を中試験管に10mlずつ正確に取り、20℃の水浴中に設置し、一方、供試菌のブイヨン培養液（HIB培地使用）も同様に20℃の水浴中に放置した後、その1mlを石炭酸希釈液に注入する。注入後2.5分、5分、10分、15分後に白金耳で釣菌し、後培養用のブイヨンに接種し、接種した後培養用試験管は20℃で培養し24時間、48時間後に菌の発育を観察した。

このようにして得られた結果から作用時間5分では菌は死滅せず、10分では死滅する石炭酸の最大希釈倍数を求めた。なお、実験は反覆して2回実施した。

#### b 結果および考察

石炭酸の魚病細菌に対する殺菌濃度を表-4に示した。

後培養結果の判定は24時間と48時間後に二度実施した。その結果、*Staph. aureus* については24時間および48時間の判定において同じ結果であったが、魚病細菌に関しては24時間と48時間における判定の結果が異なり、48時間の判定結果に比べ24時間の判定では殺菌濃度が低くなった。

表-4 石炭酸の殺菌作用

| 微 生 物                            | 24 hr          | 48 hr          |
|----------------------------------|----------------|----------------|
| <i>Staph. aureus</i> ATCC 6538 p | ①1:75 ②1:75    | ①1:75 ②1:75    |
| <i>A. salmonicida</i> TO 7804    | ①1:200 ②1:180< | ①1:160 ②1:170  |
| " " AYS 2                        | ①1:180 ②1:160  | ①1:135 ②1:150  |
| " " NCMB 2020                    | ①1:200 ②1:170  | ①1:140 ②1:140  |
| <i>V. anguillarum</i> N 7802     | ①1:350< ②1:283 | ①1:350< ②1:213 |
| " " TO 7901                      | ①1:300 ②1:300  | ①1:225 ②1:250  |

5分処理で生存、10分処理で死滅が起こる濃度

また、*V. anguillarum* では 24 時間では判定が極めて困難な例もあり、魚病細菌のついでの後培養結果の判定には 48 時間を要し、さらに 72 時間後までの観察が必要と考えられる。

2 回の実験における石炭酸の殺菌濃度は *Staph. aureus* は 1 : 75、*A. salmonicida* については TO7804 株 1 : 160、1 : 170、NCMB2020 株 1 : 140、AYS 2 株 1 : 135・1 : 150 となり、*V. anguillarum* については N7802 株 1 : 213・1 : 350<、TO7901 株 1 : 225・1 : 250 であった。このように、*Staph. aureus* に比べ魚病細菌の石炭酸に対する感受性は高く、さらに、*V. anguillarum* は *A. salmonicida* よりも高い感受性を示した。

### 3. 魚病細菌に対する第四級アンモニウム塩の殺菌効果

逆性石けんの *A. salmonicida* に対する効果を検討するため、まず第四級アンモニウム塩の *A. salmonicida* に対する効果を測定し、せっそう病菌石炭酸係数を求めた。

なお、本実験は現在継続中のため、ここではその中間経過の報告にとどめた。

#### a 材料および方法

##### 1) 供試菌株

*A. salmonicida* TO7804 株および *Staph. aureus* ATCC6538p 株の 2 株を供試した。

##### 2) 供試薬剤

塩化ベンザルコニウムおよび塩化ベンゼトニウムの二薬剤を供試した。

##### 3) 実施方法

消毒薬検査指針に記載された方法を基本に、前項の検討結果から培地、培養温度を変えて石炭酸係数を測定した。

#### b 結果および考察

*A. salmonicida* に対する第四級アンモニウム塩の殺菌効果を表-5に示した。

表-5 第四級アンモニウム塩の殺菌作用

| 化 合 物                 | 微 生 物                 | フェノール係数 | * 殺菌濃度    |
|-----------------------|-----------------------|---------|-----------|
| Benzalkonium chloride | <i>Staph aureus</i>   | 200     | 1 : 15000 |
|                       | <i>A. salmonicida</i> | 353     | 1 : 60000 |
| Benzethonium chloride | <i>Staph aureus</i>   | 266     | 1 : 20000 |
|                       | <i>A. salmonicida</i> | 235     | 1 : 40000 |

\* 5分処理で生存，10分処理で死滅が起こる濃度

*A. salmonicida* に対しては、塩化ベンザルコニウムは殺菌濃度 1:60,000、石炭酸係数 353 となり塩化ベンゼトニウムは殺菌濃度 1:40,000、石炭酸係数 235 であった。*Staph. aureus* に対しては塩化ベンザルコニウムは殺菌濃度 1:15,000、石炭酸係数 200 となり塩化ベンゼトニウムは殺菌濃度 1:20,000、石炭酸係数 235 という結果であった。

一般に第四級アンモニウム塩はグラム陽性菌に対して有効であり、グラム陰性菌に対しては効果が劣るとされているが、*A. salmonicida* の場合はグラム陰性菌でありながらグラム陽性菌である *Staph. aureus* よりもこれらの薬剤の効果が高い結果となった。この傾向が *A. salmonicida* に特徴的な現象であるのか、あるいは魚病細菌全般に認められるのか、興味深い問題であり、今後、他の魚病細菌に関する検討を行う必要がある。

### Ⅲ 参 考 文 献

Amend, D. F., and J. P. Pietsch (1972): Virucidal activity of two iodophors to salmonid viruses. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 29, 61-65.

江草周三 (1979): 魚の感染, 恒星社厚生閣, 東京. 554 pp.

古橋正吉・宮前卓之 (1976): 消毒薬の殺菌作用とその使用法. p103~146, 綿貫詰・実川佐太郎・榎原欣作編 滅菌法・消毒法第3集, 文光堂. 東京. 248 pp.

原 武史・井上潔・村井衛 (1974): 魚病細菌に対するヨード剤の *in vitro* の効果について. 昭和48年度東京都水産試験場病害研究報告書. 25 pp.

原 武史・井上潔・村井衛 (1975): ヨード剤の pH 調整と魚病細菌に対する *in vitro* の効果について. 昭和49年度東京都水産試験場病害研究報告書. 69 pp.

飯塚三喜・伊藤治 (1977): 消毒効力試験法. p236~264, 小華和忠・吐山豊秋・米村寿男編 動物用医薬品・飼料添加物・新飼料の有用性評価法, フジ・テクノシステム. 東京. 500 pp

McFadden, T. W. (1969): Effective disinfectant of trout eggs to prevent eggs transmission of *Aeromonas liquefacience*. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 26, 2311~2318.

Ross, A. J., and C. A. Smith (1972): Effect of two iodophors on Bacterial and fungal fish Pathogens. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 29, 1359-1361

佐々木治雄・本西晃・三城勇・山崎正幸・山崎隆義 (1976): ニジマスの IHN について. 長野水指研報 魚病, 45-58

佐々木治雄 (1976): せつそう病菌に対する各種薬剤の殺菌効果について. 長野水指研報 魚病, 81.

綿貫詰・実川佐太郎・榎原欣作編 (1974): 滅菌法・消毒法 第1集, 文光堂. 東京. 238 pp.

山崎隆義・佐々木治雄・田代文男 (1976): ニジマスの IPN について. 長野水指研報 魚病, 28-44.

Publication of The Tokyo Metropolitan

Fisheries Experiment Station №292

Memoir of The Tokyo Metropolitan

Fisheries Experiment Station №142

昭和54年度

魚病対策技術開発研究報告書

マス類の伝染性病原体の消毒法に関する研究

昭和55年3月 発行

編集・発行

東京都水産試験場 技術管理部

〒125 東京都葛飾区水元小合町3374番地

電話 03(600)2373

印刷所

株式会社 東

邦

印刷物規格表第2類  
印刷番号 541653  
刊行物番号(1)137