

東水試出版物通刊 No. 287

調査研究要報 No. 138

昭和53年度 指定調査研究総合助成事業

病害研究報告書

(ニジマス)

昭和54年2月

東京都水産試験場

目 次

指 定 課 題

| | |
|------------------------|---|
| I はじめに | 1 |
| II IHNワクチンに関する研究 | 2 |
| A 親魚への免疫賦与試験 | 2 |
| B 感染試験 | 8 |

関 連 研 究

| | |
|------------------------------|----|
| I IPNワクチンに関する研究 | 15 |
| A 親魚への免疫賦与 | 15 |
| B 稚魚におけるワクチン効果の判定 | 16 |
| II せつそう病ワクチンに関する研究 | 19 |
| A ワクチンの経口投与による免疫賦与試験 | 19 |
| B 感染試験 | 21 |
| C 経皮ワクチン試験 | 23 |
| D 浸漬ワクチン試験 | 28 |
| III そ の 他 | 30 |
| A せつそう病に対するSO合剤の野外治療試験 | 30 |



| | |
|--------|---------------|
| 研究実施機関 | 東京都水産試験場奥多摩分場 |
| 担 当 者 | 主任研究員 西 村 和 久 |
| | 主 事 井 上 潔 |
| | ” 工 藤 真 弘 |
| | ” 斉 藤 実 |

指 定 課 題

I はじめに

東京都においては、昭和52年度にIHN（伝染性造血器壊死症）の発病件数が増加したため、都単事業でIHN研究に取り組んだ。昭和52年度は防疫対策の一助とするために、“ニジマス親魚のIHNウイルス汚染状況調査”（昭和52年7・10月、昭和53年1月）および“IHN発生池でのニジマス稚魚感染試験”（昭和52年6月、40日間）を行なうと共に、従来のIPN（伝染性脾臓壊死症）ワクチン研究（指定研究）の手法をもちいて、IHNワクチン研究に着手した。その結果は52年度報告、関連研究の項に述べたとおりである。

本年度は、新たにIHNワクチン研究が指定研究にとりあげられた。従って本年度指定課題の報告は52年度の関連研究の項の継続研究である中和抗体価（53年1月10日採卵時）および攻撃試験の結果と53年度の途中経過を記述した。なお、53年5月23-24日に行なわれたマス類のウイルス病研究班による計画検討に基づいて53年度試験は行なわれているが、奥多摩分場におけるワクチン接種親魚の採卵が53年11月20日～12月19日であったため、稚魚の発育段階別攻撃試験については、本報告書には記載することが出来なかった。

Ⅱ IHNワクチンに関する研究

A 親魚への免疫賦与試験

ニジマス親魚に不活化したIHNウイルスを接種した。接種後経時的に採血しウイルス中和抗体価を測定して親魚における抗体産生の有無、抗体産生個体の出現率について観察した。なお、本報では昭和53年1月10日採卵群と昭和53年11月20日～12月19日採卵群とを、それぞれ試験Ⅰ、試験Ⅱとして扱った。

1. 方法および材料

a 試験Ⅰ

1) 供試ワクチン

IHNウイルス長野分離株(HV7601)をホルマリンで不活化し、接種抗原とした。ワクチンの調製は北里研究所で行い、アジュバンドを添加した。

2) 供試魚

供試魚のニジマスは奥多摩分場産で、IHN非汚染魚と考えられる群より選別した3年初産親魚30尾である。

3) 接種時期および回数

ワクチンは採卵予定期日の6・5・3週間前、つまり、昭和52年11月22日・12月1日・12月16日に合計3回接種した。ワクチンの接種時期は図1に飼育水温と共に示した。

4) ワクチン接種量および接種部位

供試魚の腹腔内に、魚体重1kgあたり1回目1ml、2回目2ml、3回目5mlずつ接種した。ワクチン接種に先立ち供試魚の個体別計測を行うとともにアンカータグによる個体標識を行った。

5) 血清採取

供試魚の中和抗体価を測定するため採卵時に供試魚尾柄部より採血し、4℃の冷蔵庫に1晩放置し血清を分離した。分離した血清は-20℃で凍結保存した。

6) 中和抗体価の測定

保存血清は室温融解後56℃30分で非動化し、MEM₂で30倍から3倍希釈を行った。なお、測定は常法によりマイクロタイター法で実施した。

b 試験Ⅱ

1) 供試ワクチン

試験Ⅰに準じ調製した。ワクチンのウイルス濃度は $10^{6.5}$ TCID₅₀/mlとし、ワクチンの調製は北里研究所で実施した。

2) 供試魚

供試魚は群馬県水産試験場川場養鱒場産ニジマス親魚(3年初産)を用いた。供試魚は昭和53年7月に奥多摩分場へ移送し飼育した。なお、本供試魚はIHN非汚染魚と考えられる魚群である。

3) 接種時期

ワクチンは採卵予定期日の11・8・4週間前つまり、昭和53年9月12日・10月3日・10月31日に合計3回接種した。ワクチンの接種時期は前出の図1に飼育水温と共に示した。

4) ワクチン接種量および接種部位

試験Ⅰと同じである。

5) 血清採取

供試魚の中和抗体価を測定するためにワクチン接種前、接種後3・7週間目および採卵時に

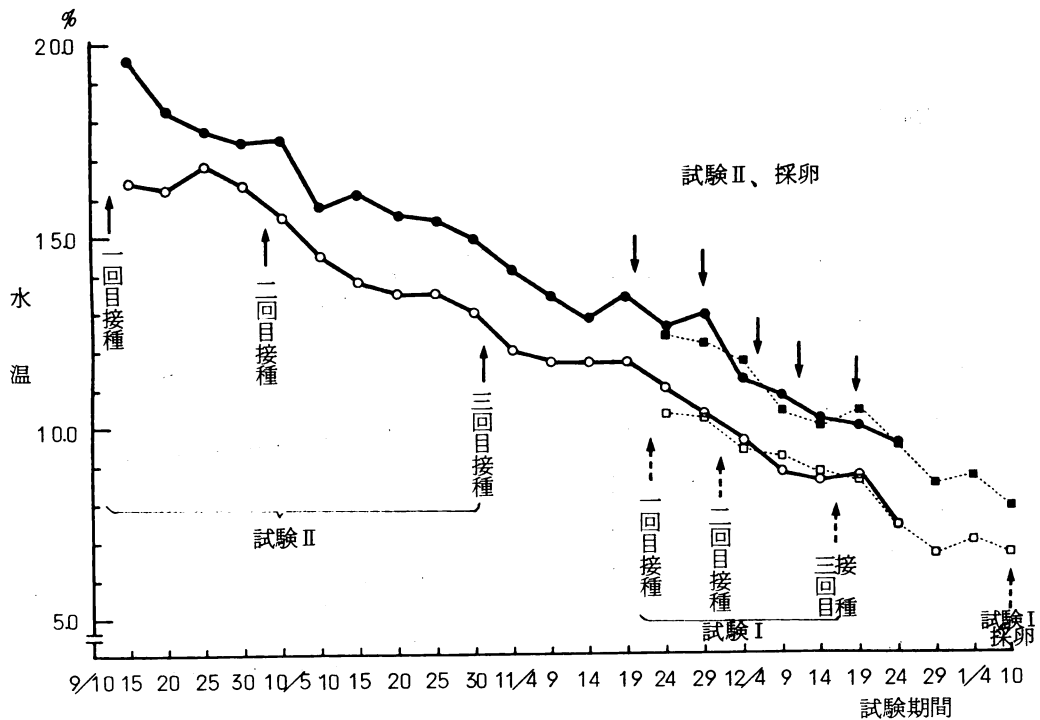


図1 IHNワクチン接種時期と飼育水温

---■--- 試験Ⅰ 最高水温 ●--- 試験Ⅱ 最高水温 ← 試験Ⅱ ワクチン接種・採卵時期
 ---□--- " 最低 " ○--- " 最低 " ←--- " I " " "

供試魚尾柄部より採血した。

血液は室温に1時間放置後4℃の冷蔵庫に1晩保存して凝固させ、2,500 rpm 15分遠心分離の後血清を分離した。分離した血清は-20℃に保存した。

6) 中和抗体価の測定

保存血清を室温融解後MEM₂で10倍希釈し、0.45μmのフィルターで無菌濾過し測定に供した。但し、56℃30分非動化は行わなかった。測定は常法によりマイクロタイター法で実施したが、実施に際しては cell line は RTG-2 cell line 168 継代株、また、接種用のウイルスは部会の申し合せにより長野水指より分与された IHN ウイルス (HV7601 株) を使用した。

RTG-2 cell line は使用前に MEM₁₀・Tris で 20℃ 6 日間培養後、細胞濃度を 200,000 個/ml に調製し使用した。一方、ウイルス液は HV7601 株を RTG-2 cell line で 20℃ 6 日間培養後、培養液を 0.45 μm のフィルターで無菌濾過し濾液を MEM₁₀ Tris で 30 倍に希釈したのち -20℃ に凍結保存した。

ウイルス液の使用に際しては、使用前に TCID₅₀/ml を測定し、ウイルス濃度を 100 TCID₅₀/ml に調整した。なお、保存ウイルス液については図2に示すような感染力価の低下が観察された。

マイクロタイター法の結果判定は、マイクロプレートを用いて 15℃ で培養し 5 日間毎日顕微鏡観察を行ない、5 日目にギムザ染色により最終判定を行った。

7) 採卵親魚のウイルス検査

採卵時に供試魚の体腔液についてウイルス検査を実施した。供試魚を麻酔した後、無菌の注射器で

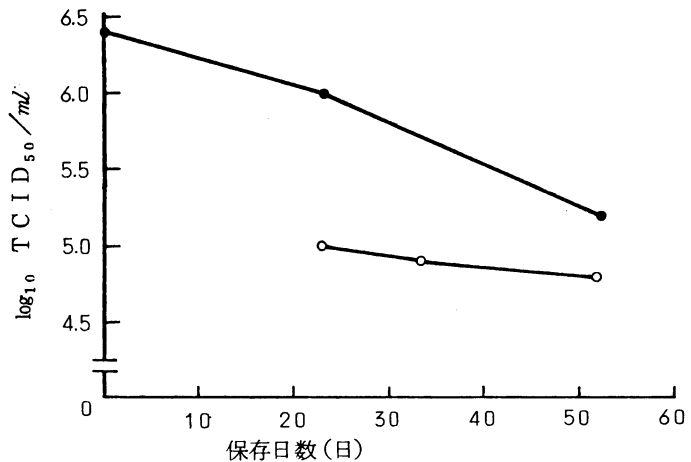


図2 -20℃凍結保存に伴う IHN ウイルスの感染力価の変動

● IHN ウイルスを RTG-2 cell line で培養し、培養液を遠心分離し、その上清を -20℃ に凍結保存した場合

○ 遠心分離後の上清を新しい MEM₁₀ で 30 倍に希釈し保存

腹腔内より体腔液を採取し、Hank's BSSで3倍に希釈、無菌濾過後RTG-2 cell lineに接種した。接種用の cell line は125×10 mmのローラーチューブで20℃・24時間培養後使用した。

接種した cell line は15℃と20℃で10日間培養し、途中でCPE が認められたチューブについては、5日目に培養液をHank's BSSで10倍希釈し cell line に再接種して観察した。

2. 結 果

試験Ⅰでは、採卵時期をそろえる目的で昭和53年1月10日に採卵を行い、その後の試験に供した。当日、採卵出来た個体はワクチン接種魚9尾、対照魚3尾の合計12尾であった。採卵時の個体別中和抗体価測定結果は表1に示すとおりである。ND₅₀で示したこれらの価をみると、ワクチン接種にともない抗体価の上昇が認められたのは9尾中3尾(H-2・-5・-9)で、抗体価の上昇した供試魚の出現割合は33.3%と低く、その価も≤138が最高値であった。一方、対照魚では3尾中1尾(H-12)に≤21という値が得られたが、供試魚群がIHN非汚染魚と考えられることから、その原因についての検討が必要と考えられる。

表1 ワクチン接種親魚の中和抗体価(試験Ⅰ)

| 個体番号 | 体重(g) | 抗体価(ND ₅₀) | 備 考 |
|------|-------|------------------------|----------|
| H-2 | 1,400 | ≤ 46 | ワクチン3回接種 |
| 4 | 1,085 | < 30 | |
| 5 | 1,045 | ≤ 21 | |
| 6 | 930 | < 30 | |
| 7 | 679 | < 30 | |
| 8 | 1,282 | < 30 | |
| 9 | 1,204 | ≤ 138 | |
| 10 | 1,018 | < 30 | |
| 11 | 880 | < 30 | |
| H-1 | 1,436 | < 30 | 対 照 魚 |
| 3 | 1,218 | < 30 | |
| 12 | 1,170 | ≤ 21 | |

試験Ⅱの中和抗体価測定結果を表2に示した。測定個体は合計23尾で、その内訳はワクチン接種雌魚18尾、ワクチン接種雄魚3尾、ワクチン未接種雌魚(対照魚)2尾である。対照魚についてはワクチン接種開始前と採卵時の2回について測定したが、ND₅₀はいずれも<30となり抗体価の上昇は認められなかった。

表2 ワクチン接種親魚の中和抗体価(試験-Ⅱ)

| 番号 | 体重(g) | 性別 | 抗体価(ND ₅₀) | | | | 採卵 月日 | ウイルス 検査 結果 | 備 考 |
|----|-------|----|------------------------|------|-------|-------|----------|------------------|--------|
| | | | 接種前(9/12) | 10/3 | 10/31 | 採卵時 | | | |
| 1 | 1,073 | ♀ | <30 | | 63 | ≤46 | 11/29 | - | |
| 2 | 862 | ♀ | <30 | | 128 | 1,170 | " | - | |
| 3 | 1,071 | ♀ | <30 | | - | 128 | " | - | |
| 4 | 1,174 | ♀ | <30 | | ≤21 | <30 | 12/6 | - | |
| 5 | 1,298 | ♂ | <30 | | ≤21 | <30 | 11/20 | | |
| 6 | 1,044 | ♂ | <30 | | <30 | - | 11/29 | | |
| 7 | - | ♂ | <30 | ≤90 | 90 | - | - | | |
| 8 | 1,175 | ♀ | | | | <30 | 11/20 | + | |
| 9 | 1,092 | ♀ | | | | <30 | " | - | |
| 10 | 1,142 | ♀ | | | | <30 | 11/29 | - | |
| 11 | 1,370 | ♀ | | | | <30 | " | + | |
| 12 | 1,350 | ♀ | | | | 416 | " | - | |
| 13 | 1,046 | ♀ | | | | ≤30 | " | + | |
| 14 | 1,302 | ♀ | | | | <30 | " | + | |
| 15 | 1,355 | ♀ | | | | <30 | 12/6 | - | |
| 16 | 1,335 | ♀ | | | | <30 | 12/11 | - | |
| 17 | 1,410 | ♀ | | | | <30 | " | - | |
| 18 | 1,160 | ♀ | | | | ≤30 | " | - | |
| 19 | 1,015 | ♀ | | | | <30 | " | - | |
| 20 | 1,143 | ♀ | | | | 346 | 12/19 | - | |
| 21 | 980 | ♀ | | | | ≤38 | " | - | |
| 22 | 1,571 | ♀ | <30 | | | <30 | 12/6 | - | 対照魚 |
| 23 | 990 | ♀ | <30 | | | <30 | 12/19 | - | " |

ワクチン接種雄魚については接種前、2・3回接種時および、一部は媒精時に測定した。抗体価は接種前<30、その後1個体(№7)のみ90の値を示したが、他の2尾についてはほとんど上昇は認められなかった。ワクチン接種雌魚については、接種前および採卵までの途中で抗体価を測定したのが4尾、残りの14尾については採卵時のみ測定した。抗体価は接種前はいずれも<30となり、血中の中和抗体の存在は確認されなかった。その後、3回目のワクチンを接種した時点(10月30日)で≤34~128と抗体価が若干上昇し、採卵時には8個体で≤30~1,170の範囲で上昇した。しかしながら、採卵時において抗体価の上昇しない個体も10尾と多かった。

ワクチン接種に伴ない抗体価の上昇が認められた雌の出現割合は44.4%、また、抗体の確認された個体についてもその50%は $\leq 21 \sim \leq 43$ という低い値であった。

中和抗体価の測定と同時に、採卵時に体腔液を採取しウイルス検査を実施したが、その結果、4尾の体腔液についてRTG-2 cell lineにCPEが発現した。(15℃培養) CPEの発現した培養管についてはさらに別の培養管へ継代接種したが、いずれも類似するCPEが発現した。一方、20℃培養ではCPEは観察されなかった。

3. 考 察

ニジマス親魚に不活化したIHNVウイルスを接種し、間接的に稚魚にIHNVに対する抵抗性を高揚する可能性を検討した。まず最初に親魚における抗体産生の観察を実施した。試験Iでは奥多摩分場産の親魚を使用した。当初、採卵期の4ヶ月前から1ヶ月毎に3回のワクチン接種を実施する予定であったが、ワクチン調製上の都合で採卵期の6週間前に接種を開始し、比較的短期間に3回のワクチンを接種した。

試験IIについては群馬県水試産の親魚を使用し、ワクチンの接種は採卵期の3ヶ月前から3回実施した。このような条件下で得られた結果を整理すると、試験I・IIに共通して抗体産生個体の出現率が低く、抗体価(ND_{50})も低いことが特徴的である。

抗体産生個体の出現率は奥多摩分場産ニジマス(試験I)が33.3%、群馬産(試験II)が42.1%であった。また、群馬産ニジマスは群馬水試のデータ(昭和53年度、マス類のウイルス病研究班計画検討会提出資料)からも出現率は38.6%と低く、今回の結果との差は認められなかった。このように、2つの試験に供試したニジマスの抗体産生個体出現率が低い現象について、ニジマスに一般的なものであるか、あるいはここに示す2つの系統に特異的な現象であるのか現時点での判断は困難であり、この解明には類似条件下での多くのデータの蓄積を待たねばならない。いずれにしろ、この問題はワクチンの有効性を左右する要因と考えられ、今後、詳細なる検討が必要であろう。

一方、抗体価(ND_{50})に関しては、奥多摩産ニジマスは全体的に値が低く、平均値61(最高値 ≤ 138)に対し、群馬産では平均値274(最高値1,170)と奥多摩産ニジマスより高くなる傾向であった。この両者の差の原因としては、ワクチン接種時期が試験Iでは11~12月、試験IIでは9~10月と異なり、このため飼育水温の差が大きくなったことが考えられる。

一般に魚類等の変温動物では、水温により抗体産生速度が変化する。したがって、今回のように水温下降期におけるワクチン接種では、接種時期が遅れる程抗体産生速度は遅くなることが推測される。今回の採卵時の抗体価の差も、試験I・IIにおける5週間の接種時期のずれに帰因すると考

えられる。

4. 要 約

- 1) 奥多摩分場と群馬水試産の2系統のニジマスにIHNワクチンを接種し、中和抗体価を測定した結果、両系統とも抗体産生個体の出現率が低かった。
- 2) 抗体価は奥多摩分場産よりも群馬産ニジマスが高くなる傾向であったが、この原因としてはワクチン接種時期のちがいが考えられる。

B 感 染 試 験

感染試験は試験-Iで述べたニジマス親魚から個体別に採卵ふ化させた稚魚について、発育段階に応じてIHNウイルス(HV-7601)により実施した。

1. 方法および材料

1) 供試魚

供試魚は採卵個体12尾のうち、採卵時の中和抗体価と発眼率を考慮し、ワクチン接種魚から3群、対照魚から1群の稚魚を用いた(表3参照)。なお、稚魚4群の親魚の中和抗体価および採卵結果は表3に示す。

表3 供試魚群の親魚の抗体価および採卵結果

| 試験区 | 親魚 No | 体重(g) | 体長(cm) | 採卵数(粒) | 発眼率(%) | 抗体価(ND ₅₀) |
|-----|-------|-------|--------|--------|--------|------------------------|
| V-1 | H-9 | 1,204 | 38.3 | 2,428 | 69.4 | ≤ 138 |
| -2 | H-2 | 1,400 | 36.7 | 1,865 | 84.1 | ≤ 46 |
| -3 | H-5 | 1,045 | 40.1 | 2,346 | 89.6 | ≤ 21 |
| C-1 | H-12 | 1,170 | 38.0 | 2,029 | 86.3 | ≤ 21 |

2) 感染方法

高張液を利用した二浴法によった。手順は供試魚を5.32%のNaCl溶液1ℓ中に2分間浸漬した後、ただちに所定濃度に調製した同量のウイルス懸濁液(MEM₁₀を含む)に移し3分間浸漬した。

3) 感染ウイルス濃度および感染時期

感染試験は供試魚がふ化した直後と浮上時の2回実施した。

感染に供したIHNウイルスの濃度はふ化直後の場合 $10^{2.5} \cdot 10^{3.5} \cdot 10^{4.5}$ TCID₅₀/ml

の3濃度、浮上時では $10^{2.5} \cdot 10^{3.5}$ TCID₅₀/mlの2濃度を設定した。供試ウイルス液は、RTG-2 cell lineで15℃・6日間培養後、培養液を遠心分離し、その上澄みを飼育用水で希釈して所定濃度に調製した。

4) 観察時の飼育条件

各試験区分とも供試尾数を1区20尾とし、図3に示す塩化ビニール製の水槽で飼育した。

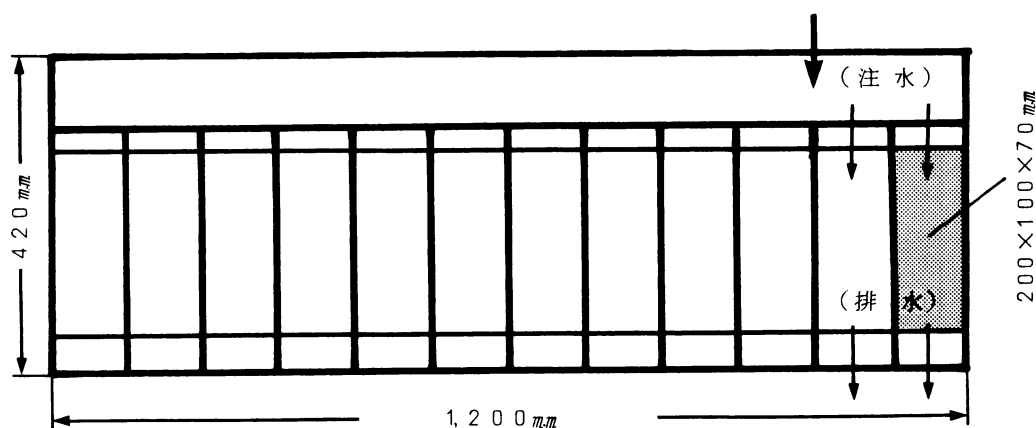


図3 感染試験用水槽

試験実施期間はふ化直後の感染が昭和53年2月23日から3月17日で、水温は7.1～9.2℃であり、浮上時の感染が4月8日から4月30日で、水温は6.1～9.6℃であった。飼育用水は河川からの浸透水をポンプで揚水して使用し、各水槽の換水率が1回/分になるように注水量を15ml/秒に調節した。

浮上時の感染では観察期間中給餌した。

5) ウイルス検査

試験期間中の斃死魚については斃死開始の時点でRTG-2 cell lineによりウイルス検査を実施した。結果の判定はCPEの観察でおこない、抗血清によるウイルス同定は行わなかった。

2. 結果

供試魚のふ化直後に実施した感染試験の結果を表4に示した。感染後4週間の観察ではウイルス濃度 $10^{4.5}$ TCID₅₀/mlの場合4試験区とも2週間で累積斃死率は100%となり、また、 $10^{3.5}$ TCID₅₀/ml感染では各区とも2～3週間で斃死率100%となり、いずれもIHNウイルスに

表4 フ化直後におけるIHN感染試験結果

| No | 感染ウイルス濃度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) | 累積死亡率(%) | | | | * MDD | ウイルス 検査結果 |
|-----|--|----------|-----|-----|------|-------|--------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4(週) | | |
| V-1 | 2.5 | 0 | 25 | 80 | 80 | 17.3 | ** + |
| | 3.5 | 0 | 90 | 100 | | 9.8 | + |
| | 4.5 | 0 | 100 | | | 8.3 | *** NT |
| V-2 | 2.5 | 0 | 50 | 90 | 90 | 14.8 | + |
| | 3.5 | 0 | 80 | 100 | | 9.4 | + |
| | 4.5 | 0 | 100 | | | 8.0 | NT |
| V-3 | 2.5 | 0 | 90 | 100 | | 11.2 | + |
| | 3.5 | 0 | 95 | 100 | | 9.1 | + |
| | 4.5 | 0 | 100 | | | 8.0 | NT |
| C-1 | 2.5 | 0 | 45 | 95 | 100 | 16.9 | + |
| | 3.5 | 0 | 100 | | | 9.9 | + |
| | 4.5 | 0 | 100 | | | 8.0 | NT |

* …… MDD平均死亡日数、計算は次式によった。

$$MDD = \frac{\text{斃死までの日数} \times \text{斃死尾数}}{\text{総斃死尾数}}$$

** …… RTG-2 cell line で15℃培養によりCPEが発現し、IHNに特徴的な細胞変性が認められた場合を(+)とした。

*** …… ウイルス検査を実施せず。

対する抵抗性は認められなかった。

感染ウイルス濃度が10^{2.5} TCID₅₀/mlでは2週間でV-1区と他の3区との間に死亡率の差が認められた。すなわち、感染2週間目にV-1区の累積死亡率は25%であったが、他の3区はそれぞれV-2区50%、V-3区90%、C-1区45%とV-1区より高い値を示した。さらに、3・4週間後の死亡率についてもV-1区と他の3区との間に若干の差が認められた。これらの結果から平均死亡日数を求めるとV-1区17.3日、V-2区14.8日、V-3区11.2日、C-1区16.9日となり、他の3区に比べV-1区の稚魚はIHN抵抗性が高くなった。

供試魚の浮上時に感染させ、その後3週間の観察結果を表5に示した。

感染ウイルス濃度はふ化時の感染試験結果を加味し10^{2.5}・10^{3.5} TCID₅₀/mlの2濃度とし

表5 浮上時におけるIHN感染試験結果

| No | 感染ウイルス濃度 (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml) | 累積死亡率(%) | | | MDD | ウイルス 検査結果 |
|-----|--|----------|----|------|------|--------------|
| | | 1 | 2 | 3(週) | | |
| V-1 | 2.5 | 5 | 25 | 25 | 12.5 | + |
| | 3.5 | 5 | 60 | 65 | 10.1 | |
| V-2 | 2.5 | 0 | 70 | 70 | 11.0 | + |
| | 3.5 | 0 | 55 | 80 | 11.5 | |
| V-3 | 2.5 | 0 | 85 | 85 | 10.4 | + |
| | 3.5 | 0 | 85 | 90 | 9.6 | |
| C-1 | 2.5 | 0 | 70 | 70 | 11.9 | + |
| | 3.5 | 5 | 80 | 85 | 9.5 | |

た。10^{3.5}TCID₅₀/ml感染では2週間の累積死亡率がV-1区60%、V-2区55%に対し、V-3区・C-1区はそれぞれ85%、80%と高くなった。また、3週間の死亡率はV-1区が65%であったのに対し、他の3区(V-2・V-3・C-1区)はそれぞれ80・90・85%と、V-1区に比べ死亡率がやや高くなる傾向が認められた。

一方、10^{2.5}TCID₅₀/ml感染では死亡魚の出現傾向が各区とも類似しており、2週間後に累積死亡率は最大となり3週間では死亡魚の増加はみられなかった。各区の死亡率をみると、V-1区では2週間後に25%に達しその後変動せず、試験終了時には75%が生残したが、V-2・V-3・C-1区の死亡率は2週間でそれぞれ70・85・70%に達し、試験終了時には25~30%の生残魚が観察されたにとどまり、V-1区と他の3区との間にはIHN抵抗性の差が明確であった。

各区の平均死亡日数についても、10^{3.5}TCID₅₀/ml感染の場合V-1区・V-2区・V-3区・C-1区でそれぞれ10.1・11.5・9.6・9.5日、10^{2.5}TCID₅₀/ml感染でそれぞれ12.5・11.0・10.4・11.9日となり平均死亡日数からもIHNに対する抵抗性に明らかな差が認められた。以上述べた結果についてχ²検定を行い、ふ化直後と浮上時の2回の試験について10^{2.5}TCID₅₀/ml感染の場合にV-1区と対照区との間で有意差が認められた。

なお、試験期間中の死亡魚についてはウイルス検査を実施し死亡原因の確認を行った。

3. 考 察

感染試験に用いた供試魚の親魚の抗体価はV-1区が≤138であるのに対し、V-2・V-3区では≤46、≤21と低く、対照区であるC-1区の≤21とはほとんど差がみられなかった。

C-1区で ≤ 34 の抗体価が得られたことは、本供試魚群がIHN非汚染魚と考えられているところから興味深い結果であるが、一方、測定誤作の可能性も考えられる。

ふ化時の感染試験結果では、感染濃度 $10^{2.5} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ で感染させ2週間後の累積斃死率を求めると、V-1区が25%に対し、V-2・V-3・C-1区はそれぞれ50・90・45%となりV-1区の生残率が高かった。また、浮上時の攻撃試験結果では、同じく $10^{2.5} \text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ 2週間後の累積斃死率を求めると、V-1区25%に対し、V-2・V-3・C-1区はそれぞれ70・85・70%となり、ふ化時の結果と同じくIHNに対する抵抗性が認められた。感染試験に用いた稚魚の親魚の中和抗体価はV-1区が ≤ 138 に対し、V-2・V-3・C-1区がそれぞれ ≤ 46 ・ ≤ 21 ・ ≤ 21 であり、中和抗体価の高かったV-1区の稚魚がIHNの抵抗性が高いという結果を得た。

以上のように、親魚への免疫賦与により稚魚のIHN抵抗性を高揚させるという研究目的からすれば、一応、将来の可能性を示唆する結果とも考えられるが、一方、Amendら(1977)は、ベニザケ稚魚について親魚の系統により先天的にIHN感受性が異なると報告している。あるいは、今回の抵抗価における ≤ 46 と ≤ 138 の値の差の有意性に関する疑問等、今回の結果に関しては解決すべき疑問点も多く、本感染試験結果をワクチン効果と短絡し論議するにはデータ不足の感がある。また、感染試験結果がワクチンの効果によるものであるとしても、ワクチン接種後の抗体価の上昇に関する不均一性(抗体産生個体の出現率の低さ)は、ワクチンの有効性を左右する重要な要因となると考えられる。このように、検討すべき事項が山積する現状であり、今後、今回の結果を足掛りに、IHNワクチンの開発に向けて資料の蓄積を行なう必要がある。

4. 要 約

- 1) 採卵時の抗体価が高かった親魚に由来する稚魚では、ふ化時と浮上時の2回の感染試験で対照区よりも高い生残率を示した。
- 2) 採卵時の抗体価が対照区とかわらない親魚からの稚魚では、感染試験結果も対照区と差がなかった。
- 3) 今回の結果は一応将来の可能性を示唆しているが、解決すべき疑問も多く、ただちにワクチンの効果と判定することは出来ない。
- 4) ワクチン接種後の抗体産生個体の出現割合の低さもワクチンの有効性に関連する重要な問題である。
- 5) 今回の結果を足掛りとして更に資料を蓄積する必要がある。

5. 参 考 文 献

Amend, D. F., and J. R. Nelson, 1977, Variation in the susceptibility of sockeye salmon *Oncorhynchus nerka* to infectious haemopoietic necrosis virus J. Fish Biol. 11, 567-573

関 連 研 究

I I P N ワクチンに関する研究

はじめに

I P N (伝染性脾臓壊死症) ワクチン実用化研究は昭和51年度より指定研究として着手した。初年度は親魚への I P N 不活化ワクチン接種をしたところ中和抗体価が上昇することから、I P N ウイルスは抗原性が高い事を明らかにした。昭和52年度は移行免疫の検討を行い、I P N 自然発病による稚魚の減耗を観察した。その結果、ワクチン接種魚由来の稚魚の生残率が対照区より高くなる傾向がみられ、ワクチン接種回数 — 血中の中和抗体価 — 稚魚の生残率の間に一連の関係が推定出来る事を報告した。

本年は指定研究からはずれたため、関連研究として、52年度に引継ぎ、親魚への免疫賦与による稚魚の耐病性について検討した。

A 親魚への免疫賦与

昭和51・52年度につづいて不活化した I P N ウイルスをニジマス親魚に接種し、中和抗体価を測定するとともに、得られた稚魚について親魚の個体別に I P N の発病状況を観察した。

1. 方法および材料

1) 供試ワクチン

栃木水試で分離した I P N ウイルス株を使用し、北里研究所において調製したアジュバンド添加ワクチンを供試した。

2) 供試魚

供試魚は奥多摩分場産のニジマス3年初産魚30尾を用いた。なお、供試魚は稚魚時に I P N に感染し耐過した魚群である。

3) 接種時期および回数

前記 I H N ワクチンの試験—Iと同じスケジュールでワクチン接種を行った。最初のワクチン接種から採卵までの期間の水温は前出の図1に示すとおりである。

4) ワクチン接種量および接種部位

I H N ワクチンに関する研究、試験—Iと同じである。

5) 中和抗体価の測定

血清の採取や抗体価の測定は、前記 I H N ワクチンに関する試験—Iと同じ方法によったが、ウイルス接種後のプレートの培養温度は20℃とし、6日間培養後ギムザ染色を行った。

2. 結果および考察

昭和53年1月10日に採卵した11尾中、発眼率の高い5尾について採卵時における中和抗体価を表6に示した。

この5尾(P-1・2・3・4・5)では、ワクチン3回接種により全個体が抗体価の上昇を示し、平均値628(130~1,800)という結果であった。

不活化したIPNウイルスをニジマスに接種したときの抗体価の変動については、すでに昭和51年度に報告した。51年の場合の3回目接種後1ヶ月と今回の採卵時の採血と

が、ワクチン接種終了から採血までの飼育期間が一致することから、両者の抗体価を比較すると、51年度では504(4~1,100、N=5)に対し今年度は628(130~1,800、N=5)となり類似した結果が得られた。

51年度とは接種のスケジュールに若干の違いはあるが、両試験ともワクチン接種により抗体価の上昇が認められIPNウイルスの抗原性の高さがあらためて証明される結果であった。一方、上昇の程度についてみると、前年度の抗体価は最終回(3回)のワクチン接種後1ヶ月よりも2~3ヶ月経過時の方が高く、抗体価のピークは接種後2~3ヶ月にあると考えられる。したがって、今年度の最終ワクチン接種から採卵までの期間(4週間)では、十分な抗体価の上昇を期待することは出来なかったと考えられる。

図1に明らかなように、当场では毎年8~9月以後飼育水温の急激な低下がおこる。このことは、魚体内において抗体が産生される重要な時期が低水温期となるため、抗体産生の速度が遅くなることが考えられる。したがって、今後ワクチン接種計画の段階でワクチン接種開始時期や最終ワクチン接種から採卵までの期間などについての再検討が必要と考えられる。

B 稚魚におけるワクチン効果の判定

1. 方法および材料

1) 供試魚および試験区

マス類のウイルス病研究班(指定県を中心に組織)の申し合わせにより、ワクチン接種親魚よ

表6 IPNワクチン接種親魚の採卵時の抗体価

| № | 体重(g) | 抗体価(ND ₅₀) | 備考 |
|-----|-------|------------------------|-----|
| P-1 | 1,276 | 1,800 | |
| 2 | 1,164 | 850 | |
| 3 | 928 | 230 | |
| 4 | 1,063 | 130 | |
| 5 | 1,269 | 130 | |
| C-1 | 1,328 | <30 | 対照魚 |

り個体別採卵を昭和53年1月10日に行い、当日採卵した11尾のうち発眼率の高い5尾分についてワクチンの効果を検討した。試験区および採卵結果は表7に示す。なおC-1区は対照区である。

2) 試験水槽

供試魚は容量90ℓのポリエチレンコンテナ製の水槽を用い流水で飼育した。給餌は供試魚の大きさにより1日4～8回オリエンタル酵母KK製の餌付用飼料を与えた。

3) 試験水温

餌付開始日の昭和53年4月14日から試験終了時までの水温を自動観測装置により測定し、図4に旬別の最高・最低水温で示した。

4) 効果の判定

上記の条件で供試魚を飼育し、IPNの自然発病を観察するとともに、前年度と同様にIPN発病地に感染用生簀を設置し、試験を行った。

2. 結果および考察

本年度は、同一採卵日の稚魚を供試し餌付は4月14日に同時に開始した。餌付開始後の各区の累積斃死率を図5に示した。

試験開始後、4月下旬から5月にかけて各区とも斃死魚が増加し、特に、P-3・C-1区では30%以

表7 供試魚群の採卵結果

| 試験区 | 親魚の体重(g) | 採卵数(粒) | 発眼率(%) |
|-----|----------|--------|--------|
| P-1 | 1,276 | 1,474 | 95.3 |
| 2 | 1,164 | 1,733 | 95.7 |
| 3 | 928 | 2,035 | 91.0 |
| 4 | 1,063 | 1,854 | 95.9 |
| 5 | 1,269 | 2,344 | 91.9 |
| C-1 | 1,328 | 2,322 | 97.4 |

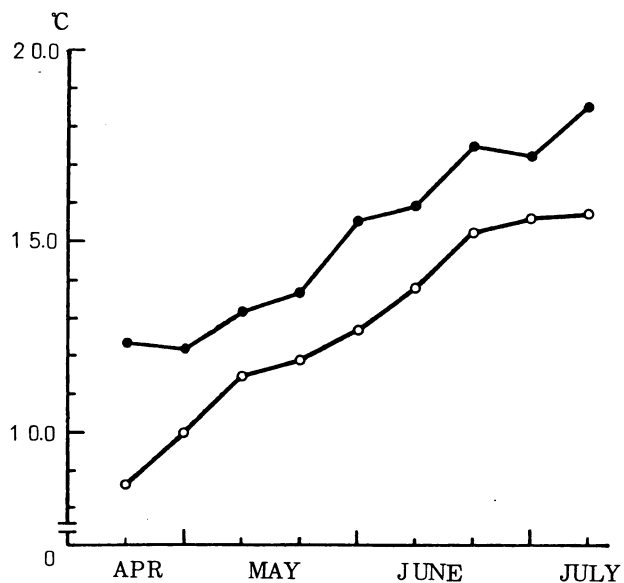


図4 餌付から試験終了までの飼育水温

●—最高水温 ○—最低水温

上の斃死率となったが、斃死魚のウイルス検査ではIPNウイルスは分離されなかった。その後、6月中旬にP-4区においてIPNと推定される斃死が観察された。しかしながら、これらの斃死魚では鰓の粘液細菌の重篤感染も観察され、斃死原因を特定するには問題があった。他の区でも6月下旬から7月上旬にかけて同様な症状を呈する斃死魚の増加があった。

一方、生産事業用のニジマス稚魚では5月下旬～6月中旬にIPNの発生が観察されたので、6月10日に飼育池排水口付近に木製金網張りの生簀を設置し、各試験区から50尾づつ放養して感染試験を行ったが、試験区の斃死魚よりのIPNウイルス分離率が低く、また、斃死魚の原因調査から事業用ニジマス稚魚に

おけるIPNが、途中で重篤な細菌性鰓病との混合感染へ移行し、IPNによる減耗割合が低いと推測され、感染試験において十分なIPN感染が成立しなかったものと考えられる。感染試験における各試験区の累積斃死率は、対照区(C-1)の6～8%に対しワクチン接種区では12～2%となった。

従って、本年度の結果では親魚における抗体価の上昇は確認されたが、稚魚でのIPN抵抗性については、供試魚の混合感染症発病のため52年度に報告したような明確な結果は得られなかった。

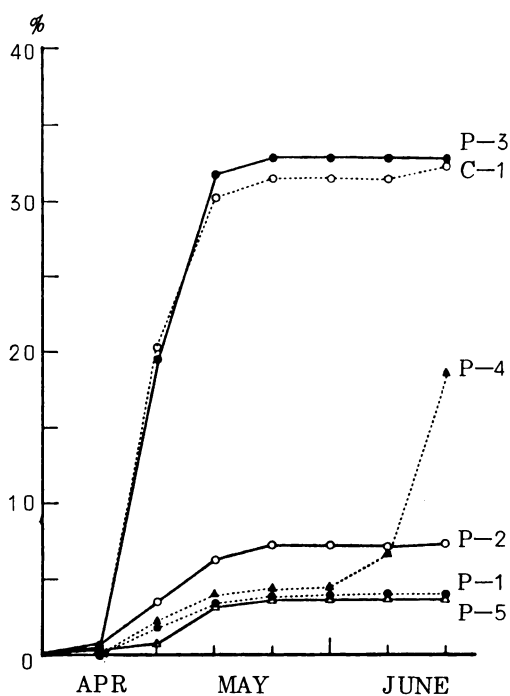


図5 ニジマス稚魚の累積斃死率の推移

Ⅱ せっそう病ワクチンに関する研究

はじめに

ヤマメのせっそう病については、指定研究として昭和43年よりワクチンの実用化研究に着手した。昭和50年度に経口ワクチンの場合、餌付け開始と同時に投与を開始し、連続14ないし21回投与した後に間歇投与する方法でせっそう病の予防効果が期待出来そうであることを報告した。しかし、ヤマメはニジマスに比べ魚体の取扱いが困難であることや、*A. salmonicida* の病原性に関する諸問題などから、ワクチン効果を確認する攻撃試験が困難であり、有効な攻撃技法の開発が急務となった。昭和51年度より攻撃技法に高張液利用の二浴法を検討した。本年度は指定研究からはずれたため、関連研究として、52年度に引き続き経口、経皮ワクチン研究および二浴法を応用した浸漬ワクチンを検討したので報告する。

A ワクチンの経口投与による免疫賦与試験

1. 方法および材料

1) 供試魚

昭和52年10月に採卵したヤマメ稚魚(平均体重0.16g)を用いた。供試尾数は1区5,000尾とし、7区合計、35,000尾である。各区の餌付(経口ワクチン投与)は昭和53年1月28日に開始した。

2) 試験区

試験区は表7に示した7区を設定した。

3) 投与方法

経口ワクチン1日投与量を2mlの0.85%生理食塩水に溶解後、餌付用飼料に混和、浸透させ1日8回に分けて投与した。

4) 投与期間

昭和53年1月28日の餌付開始と同時にワクチンの投与を開始し、21日間

表8 経口ワクチン試験区分

| 試験区 | ワクチンの種類 | 投与回数 | 備考 |
|--------|----------|------|-----|
| Fo - 1 | — | — | 対照区 |
| 2 | *1 全菌体抗原 | 21回 | 対照区 |
| 3 | *2 可溶性抗原 | 21回 | |
| 4 | *3 非溶性抗原 | 21回 | |
| 5 | — | — | |
| 6 | 全菌体抗原 | 21回 | 対照区 |
| 7 | 可溶性抗原 | 21回 | |

*1 *A. salmonicida* を超音波破壊し凍結乾燥した抗原

*2 超音波破壊菌体の遠心分離上澄を凍結乾燥した抗原

*3 " 残渣を凍結乾燥した抗原

連続投与した。投与終了日は2月17日である。

5) 飼育水温

飼育期間中の水温は旬別の最高・最低水温を図6に示した。

2. 結果および考察

経口ワクチン投与後の各区の生残率を図7に示した。

経口ワクチン21回投与終了直後の2月下旬から3月にかけて、各試験区とも斃死率60~80%に達する異常斃死が発生した。これらの斃死魚の外観所見では尾鱗、背鱗、胸鱗を主体に鱗の癒着、変形、欠損が観察され、一部浮腫症状を示す個体も観察された。常法に基づく細菌およびウイルス検査の結果では、斃死魚から細菌、ウイルス等の病原体は検出されず、斃死原因を明らかにすることは

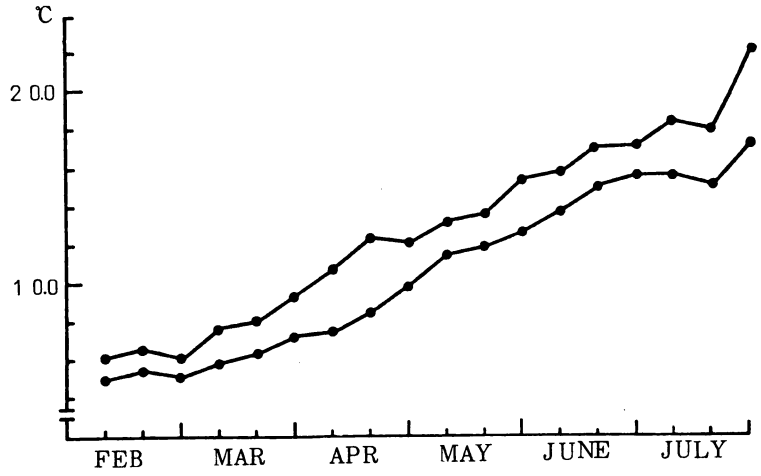


図6 経口ワクチン試験供試魚の飼育水温
● 最高水温 ○ 最低水温

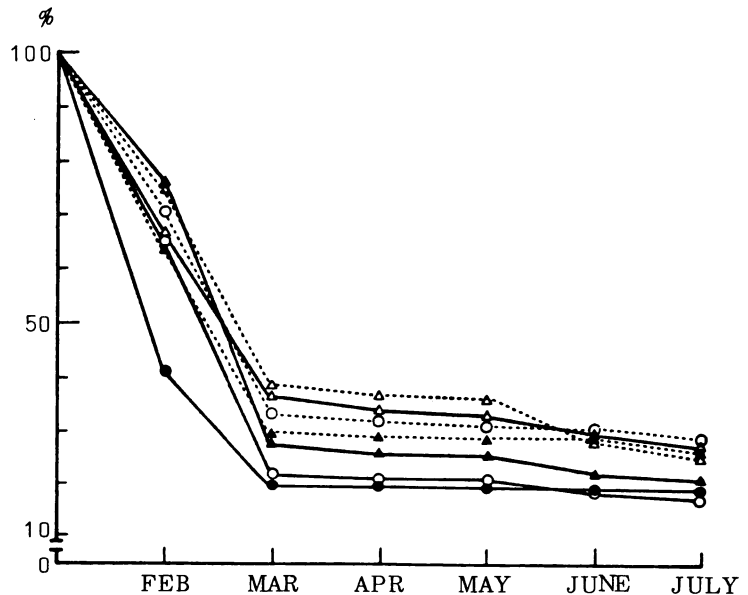


図7 経口ワクチン試験区の生残率の推移

▲ Fo-1区 ○ Fo-2区 ▲ Fo-3区 ● Fo-4区
◆ Fo-5区 ○ Fo-6区 ▲ Fo-7区

出来なかった。異常斃死は4月にはいり終息し、その後7月末日までに細菌性鰓病による減耗がみられたが、せっそう病は発生せず、ワクチン効果の検討は実施出来なかった。

試験終了時の各区の生残率はFo-1区27.1%・Fo-2区17.3%・Fo-3区21.2%・Fo-4区19.1%・Fo-5区25.5%・Fo-6区29.4%・Fo-7区27.0%であった。

B 感染試験

1. 方法および材料

1) 供試魚

餌付時より経口ワクチンを投与したFo-2・3・4区と対照区(Fo-1区)のヤマメ稚魚を用いた。

2) 供試菌株

昭和53年4月、奥多摩分場産ブラウンマスより分離した*A. salmonicida*を用いた。培養はトリプトソーヤブイヨン(ニツスイ)によった。

3) 感染方法

高張液を利用した二浴法と生菌の筋肉内接種の2つの方法を検討した。

二浴法については5.32%NaCl溶液に供試魚を2分間浸漬後、ただちに菌懸濁液($10^6 \sim 10^8$ cells/ml)へ移し、さらに2分間浸漬後ガラス水槽に放養した。また、筋肉内接種については魚体1尾あたり $10^2 \sim 10^4$ cellsになるよう菌液を調製し接種した。

4) 感染時期

経口ワクチン投与終了後30・90・150日経過時に感染試験を実施した。

2. 結果

感染試験結果を表⁹・¹⁰に累積斃死率で示した。観察期間は2週間とし、斃死魚数は細菌検査で*A. salmonicida*が分離された個体、および外観的に明らかなせっそう病患部がみられる個体のみを計数し斃死率を算出した。その結果表⁹の二浴法では感染菌量の少ない 0.001 mg/mlと最も多い 0.1 mg/ml(10^8 cells/ml)の場合には、試験区間の斃死率の差は認められなかったが、 0.01 mg/ml(10^7 cells/ml)感染では対照区(Fo-1区)に比べ全菌体抗原を投与したFo-2区の斃死率が低くなって。この傾向は30日、90日目の感染において顕著であった。しかしながら、可溶性抗原あるいは非溶性抗原を投与した区(Fo-3、4区)と対照区では斃死率の差は認められなかった。

なお、生菌接種については表¹⁰に示すとおり、各区とも90~100%の斃死率となりワクチン効果の検討は行えなかった。

表 9 経口ワクチン供試魚への二浴法による感染結果

| 感染菌量 | 試験区 | 供試尾数(尾) | 累積斃死率(%) | | |
|--|--------|---------|----------|------|-------|
| | | | 30日目 | 90日目 | 150日目 |
| 0.001 mg/ml | Fo - 1 | 20 | 0 | | |
| | 2 | " | 5 | | |
| | 3 | " | 5 | | |
| | 4 | " | 0 | | |
| 0.01 mg/ml (10 ⁷ cells/ml) | Fo - 1 | 20 | 15 | 20 | 80 |
| | 2 | " | 0 | 0 | 60 |
| | 3 | " | 20 | 10 | 90 |
| | 4 | " | 5 | 30 | 90 |
| 0.1 mg/ml (10 ⁸ cells/ml) | Fo - 1 | 20 | 5 | 30 | |
| | 2 | " | 60 | 40 | |
| | 3 | " | 10 | 70 | |
| | 4 | " | 20 | 20 | |

表 10 経口ワクチン供試魚への生菌接種結果

| 接種菌量 (cells/fish) | 試験区 | 供試尾数(尾) | 累積斃死率(%) | |
|----------------------|--------|---------|----------|-------|
| | | | 90日目 | 150日目 |
| 10 ² | Fo - 1 | 10 | 90 | 100 |
| | 2 | " | 100 | 100 |
| | 3 | " | 100 | 100 |
| | 4 | " | 100 | 100 |

3. 考 察

本年度の経口ワクチン試験については、初期に昨年度と同様の異常斃死が発生し、以後の試験は20~40%程度の生残魚を使用せざるを得ない状況であった。これらの生残魚については脊椎骨の異常を呈する個体も観察されることから、試験魚として最適の状態とはいいがたく、これらの条

件がワクチンの効果判定におよぼす影響は無視出来ないと考えられる。一方、感染試験についても感染魚の大きさ、飼育水温と感染菌量との関連などについての検討不足によりデータのバラツキが生じ、明確な結論を導き出すことは困難であった。しかしながら、 10^7 cells/mlの菌液での二浴法感染結果において対照区と全菌体抗原投与区（Fo-2区）との間に斃死率の差が認められた。このことは、従来使用していた可溶性抗原の代わりに全菌体抗原を投与することにより、経口ワクチンの効果を高められる可能性を示しており、抗原の種類を検討することにより有効な経口ワクチン開発の可能性を示唆していると考えられる。

C 経皮ワクチン試験

1. 方法および材料

1) 供試魚

奥多摩分場産ヤマメ1年魚（昭和51年11月採卵群）を用いた。供試魚は、稚魚の時点で経口ワクチンおよび経皮ワクチン（経口ワクチンのブースターとして）により免疫の賦与を試みた群と、稚魚期にはVaccinationをまったく実施していない2群より構成した。

2) 試験区

ワクチン接種から採卵期までの期間でせう病の自然発病状況を観察しワクチンの効果を検討するための試験区4区と、接種抗原の検討を兼ねて人為感染によりワクチンの効果判定を行う試験区5区の合計、9区を設定した。これらの試験区は表11に示すとおりである。

3) 斃死魚の細菌検査

FP-1から4の4試験区については試験期間中斃死魚の外部所見を記録するとともに、腎臓よりの細菌分離により *A. salmonicida* の確認を行った。

4) 感染試験

FP-5から9の5試験区について筋肉内接種による感染試験を行った。感染に供した菌株は、昭和53年4月に奥多摩分場で分離した菌株でトリプトソイブイオンで培養後、供試魚1尾あたり 10^2 、 10 cellsになるよう接種菌量を調整し、試験の実施時期をワクチン接種後60・90・120日経過時に設定して各区10尾あて接種した。試験実施時期はそれぞれ昭和53年5月16日、6月17日、7月17日で、その際の供試魚の平均体重および試験水温（カッコ内）はそれぞれ117.5g（12.7～15.5℃）、139.1g（15.6～17.3℃）、146.3g（16.5～20.2℃）であった。

5) 凝集価測定

感染試験実施時期にあわせ各区（FP-1～9）5尾ずつについて凝集価の測定を行った。

表 1 1 せっそう病経皮ワクチン試験における試験区分

| 試験区 | 供試尾数 (尾) | 接種時平均体重 (g) | 抗原の種類 | 感染試験 | 稚魚期の ワクチン賦与 | 備考 |
|------|-------------|----------------|---------------|------|----------------|-----|
| FP-1 | 1050 | 153 | *1 洗浄多価 | - | - | 対照区 |
| -2 | 1050 | " | - | - | - | |
| -3 | 1100 | 69 | 洗浄多価 | - | *5 + | |
| -4 | 1100 | " | " | - | *5 + | |
| -5 | 200 | " | " | + | *6 + | 対照区 |
| -6 | 200 | " | - | + | - | |
| -7 | 200 | " | *2 洗浄多価 | + | - | |
| -8 | 200 | " | *3 菌の代謝成分 | + | - | |
| -9 | 200 | " | *4 菌体+代謝成分 | + | - | |

- * 1 ホルマリン不活化した菌体を生理食塩水で洗浄した抗原で調製はワクチンメーカーに依頼したものである。
- * 2 * 1 と同じ方法で調製した抗原で、調製は奥多摩分場で実施
- * 3 菌を培養した液体培地にホルマリンを加え不活化した後、菌体を除いたもの
- * 4 * 3 で菌体を含むもの
- * 5 稚魚期にワクチンを賦与した個体の混養割合は40%である。
- * 6 全供試魚が稚魚期にワクチンを賦与されている。

2. 結果

1) せっそう病発生状況

FP-1～4区の飼育期間中の月別の生残率とせっそう病による月別の斃死率をそれぞれ表12と図8に示した。

本年度のせっそう病の発生は5月上旬から観察され、7月になって一応終息したが、その後も散

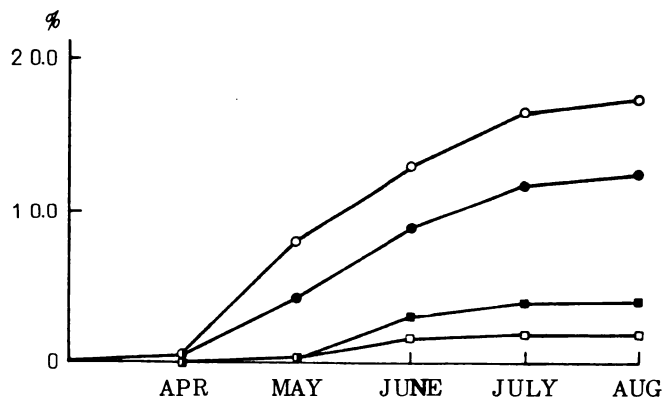


図 8 せっそう病による斃死率の推移

● 1区 ○ 2区 ■ 3区 □ 4区

表 1 2 試験期間中の月別生残率

| 試験区 \ 月 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---------|-------|------|------|------|------|------|
| FP-1 | 99.1 | 94.3 | 87.2 | 80.2 | 77.5 | 70.6 |
| 2 | 98.7 | 90.4 | 81.3 | 74.3 | 71.9 | 69.1 |
| 3 | 99.1 | 99.6 | 85.6 | 81.7 | 81.0 | 76.8 |
| 4 | 100.0 | 99.3 | 92.0 | 89.9 | 89.3 | 87.7 |

発的に罹病魚が認められた。FP-1~4区のせつそう病による累積斃死率はFP-1区12.4%、FP-2区17.3%、FP-3区4.0%、FP-4区1.9%となり対照区(FP-2区)に比べワクチン接種区の累積斃死率が低い結果となり、 χ^2 検定においても対照区と接種区(FP-1・3・4)との間に危険率1%で有意差が認められた。

さらに、稚魚期にワクチンを賦与した個体を混養したFP-3・4区の斃死率がFP-1区に比べ低いという結果が得られた。

2) 感染試験結果

FP-5~9区の感染試験はワクチン接種後60・90・120日目に行い、各区の斃死率を算出し表13に示した。

表 1 3 感染試験結果(累積斃死率%)

| 試験区 | 接種菌量 (cells/fish) | 累積斃死率(%) | | | 備考 |
|------|----------------------|----------|------|-------|-----|
| | | 60日後 | 90日後 | 120日後 | |
| FP-5 | 10 | 60 | 50 | 10 | 対照区 |
| | 10 ² | 90 | 60 | 60 | |
| -6 | 10 | 70 | 30 | 30 | |
| | 10 ² | 100 | 80 | 20 | |
| -7 | 10 | 50 | 20 | 40 | |
| | 10 ² | 80 | 40 | 20 | |
| -8 | 10 | 30 | 20 | 80 | |
| | 10 ² | 50 | 70 | — | |
| -9 | 10 | 30 | 10 | 0 | |
| | 10 ² | 100 | 60 | 20 | |

各区の斃死率を比較すると、対照区（FP-6区）の斃死率は60日後の感染で70%（100%、カッコ内は 10^2 cells/fish 感染結果）、90日後で30%（80%）・120日後で30%（20%）であった。これに対し洗浄菌体を1回接種したFP-7区ではそれぞれ50%（80%）・20%（40%）・40%（20%）となり、60、90日後の感染では対照区よりも斃死率が低くなった。しかしながら、120日後では斃死率の差は認められなかった。この傾向は細菌の代謝成分を抗原としたFP-8・FP-9区と対照区との間でも認められ、特に、FP-9区（代謝成分+不活化菌体接種区）との間で顕著であった。一方、稚魚期に経口・経皮によるVaccinationを行い、さらに経皮ワクチンを接種したFP-5区では、90日後の 10^2 cells/fish による感染結果が対照区より高い斃死率を示したものの、全体的には他の試験区に類似した傾向が認められた。

3) 凝集価測定

凝集価の測定結果を図9-1・2に示した。FP-1～4についてはワクチン接種後2ヶ月目の5月から6・7月まで

毎月採血し凝集価の測定を行った。図9-1から明らかなように、FP-1、3、4区は対照区（FP-2）に比べ凝集価は高くなり、さらに、FP-1区よりも3・4区が高くなる傾向を示した。この結果はせつそう病による斃死率の違いと一致した。また、各区の凝集価は接種後2ヶ月目の5月が最も高く、その後低下した。

FP-5～9区についてはワクチン接種後3、4ヶ月経過した6

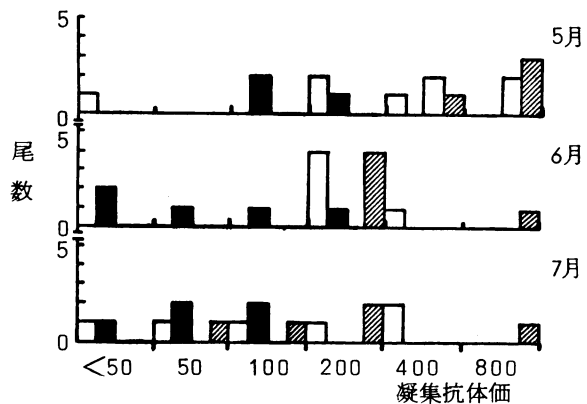


図9-1 ヤマメ親魚の血中凝集抗体価（FP-1～4区）

□ 1区 ■ 2区 ▨ 3区 ▩ 4区

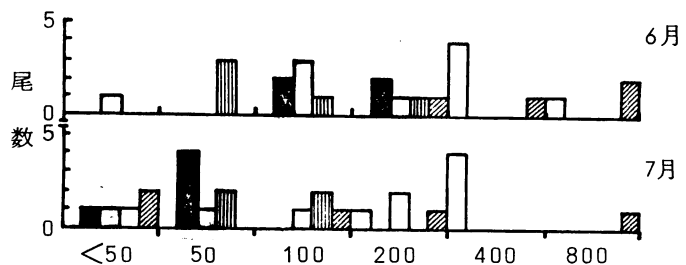


図9-2 ヤマメ親魚の血中凝集抗体価（FP-5～9区）

□ 5区 ■ 6区 ▨ 7区 ▨ 8区 ▩ 9区

月と7月の2回、凝集価を測定した。その結果は表9-2に示すとおりである。各試験区とも6月から7月にかけて凝集価の低下する傾向が認められ、凝集価の変動パターンはFP-1~4区と一致することが推測された。6月の凝集価はFP-5・FP-9区が他の3区に比べ明らかに高く、7月においても同様の結果であった。一方、対照区(FP-6区)とFP-7・FP-8区では6月には凝集価もそれほど高くはならず、3試験区間の差も少なかったが、7月にはFP-7>FP-8>FP-6の順で凝集価に差が認められた。

3. 考 察

FP-1~4区については、対照区(FP-2区)に比べFP-1・3・4区のせつそう病死亡率が低く、さらに、凝集抗体価も死亡率と一致する傾向があり、明らかなワクチン接種効果が認められた。また、ワクチン接種区間を比較するとFP-1区よりFP-3・4区の死亡率が低い結果であった。この点に関しては、飼育池の配置はFP-1・2区の下流に3・4区が位置しており、例年3・4区の歩留まりが1・2区のそれを下回る傾向があったが、本年度のように3・4区の死亡率が低かった事はせつそう病抵抗性に1・2区と差があったことが推測される。FP-3・4区については稚魚期にVaccinationを行った個体が40%含まれており、凝集価もFP-1区より高くなっている(図9-1参照)。また、稚魚期にワクチネーションを行った個体100%からなるFP-5区の凝集価も高いことから、多回ワクチン接種魚はせつそう病の抵抗性が高いと考えられる。

FP-5~9区については、対照区とワクチン接種区の死亡率に差が認められたものの、接種抗原の種類や接種回数と死亡率との関係は明らかではなかった。しかしながら、凝集抗体価については、稚魚期に経口、経皮ワクチンを与えた供試魚にさらに経皮ワクチンを接種した群(FP-5区)と不活化菌体に菌の代謝産物を加えて接種した群(FP-9区)の抗体価が他の試験区(FP-6・7・8)より高くなった。

また、洗浄菌体のみを1回接種した群(FP-7区)と菌の代謝産物のみを接種した群(FP-8区)についても、対照区より高い凝集価が認められた。

以上のことから、経皮ワクチンに関しては多回接種の方が予防効果が大きいと考えられる。また、接種抗原に関しては、*A. salmonicida*の代謝産物(外毒素と考えられる)が有効な抗原となる可能性が示唆されよう。

D 浸漬ワクチン試験

1. 方法および材料

1) 供試魚

ヤマメ0年魚を用い、供試尾数は1試験区あたり500尾、3区、合計1,500尾である。

2) 試験区

試験区は表14に示すとおりである。

表14 せつそう病浸漬ワクチン試験区分

| 試験区 | 供試尾数(尾) | 平均体重(g) | 抗原の種類 | 浸漬月日 | 備考 |
|-----|---------|---------|------------------------|-------|--------------------|
| I | 500 | 3.2 | * ¹ 可溶性抗原 | 6月13日 | |
| II | 500 | 3.1 | * ² 菌体+代謝成分 | " | |
| III | 500 | 3.1 | | | * ³ 対照区 |

* 1、2 経ワクチン試験の抗原の種類を参照

* 3 食塩水2分間浸漬のみ実施

3) ワクチン処理

浸漬方法は5.32%食塩水に2分、ワクチン液3分の二浴法によった。ワクチンの濃度はI区が 10^6 cells/ml (換算値)およびII区が 10^8 cells/mlである。

4) 感染試験

ワクチン処理後30・60・104日目に二浴法および生菌接種による感染試験を実施した。二浴法における感染菌量は 10^8 cells/ml、生菌接種の場合の菌量は 10^2 cells/mlとし、30日目には1区10尾ずつ、その他は1区20尾を感染に供した。各試験の実施月日は30・60・104日目がそれぞれ昭和53年7月15日・8月15日・9月28日で、その時の試験水温は17.0~19.6℃・18.8~20.3℃・13.3~17.0℃である。

2. 結果および考察

感染試験の結果は表15に示した。

30・60・104日目の感染試験時における供試魚の平均体重はそれぞれ7.6g・14.2g・24.4gであった。

感染試験の結果をみると、生菌接種ではほとんどが100%の斃死率となっており、接種菌量が多過ぎたことが考えられ、今後生菌接種を行う場合2~3段階の菌量を設定する必要がある。ま

表 1 5 浸漬ワクチン処理魚の感染試験結果 (*¹ 累積斃死率%)

| 試験区 | 二浴法による累積斃死率(%) | | | 生菌接種による累積斃死率(%) | | |
|-----|----------------|------|-------|-----------------|------|-------|
| | 30日目 | 60日目 | 104日目 | 30日目 | 60日目 | 104日目 |
| I | 100 | 10 | 90 | 100 | 100 | 100 |
| II | 100 | 5 | 65 | 100 | 100 | 85 |
| III | 100 | 5 | 45 | 100 | 100 | 85 |

* 1 観察期間は2週間とし斃死率を算出した。

た、二浴法については、感染に供した菌株の濃度をほぼ一定に調製したにもかかわらず、斃死率に大きな差異が生じた。この原因としては飼育条件の違いが考えられる。このように感染方法自体に問題があったことなどから、ワクチン処理と斃死率との関係は明確でなく、ワクチン効果の判定には至らなかった。

しかしながら、浸漬ワクチンは操作が簡単であり大量処理には最も有効な方法と考えられ、今後、抗原の種類、ワクチン処理法、感染試験方法等の検討を行いデータを蓄積する必要がある。

Ⅲ そ の 他

A せつそう病に対するSO合剤の野外治療試験

昭和53年4月下旬、当場で飼育中のブラウンマスにせつそう病が発生したので、SO合剤（スルファモノメトキシン（SMM）：オルメトプリム（OMP）＝3：1、治験番号DG-5459）による治療試験を行った。

1. 方法および材料

1) 供試魚

ブラウンマス (*Salmo trutta*) 1年魚、平均体重19.8gを用いた。

2) 供試薬剤

DG-5459 (1g中SMM300mg+OMP100mgの倍散剤)を投与した。

3) 薬剤投与量

魚体重1kgあたり1日量として50mgを7日間投与した。薬剤は給餌量（給餌率1.0%）の外割7%で添加するスケソウ肝油に懸濁後、飼料に混合して投与した。

4) 試験方法

罹病魚群1,035尾を2分し、3.5×1.5×0.5mの飼育池2面に放養し、投薬区と対照区の2区を設定した。投薬区では放置後5日目より7日間連続投与を行ない、さらに、投薬終了後4日間斃死魚を観察した。試験期間中の斃死個体については外観的にせつそう病患部の有無を調べるとともに、腎臓より細菌の分離を行った。

一方、投薬区については、薬餌投与直後に供試魚10尾をサンプリングし個体別にサルファ剤の濃度を定量するとともに、投薬終了後6・24・48時間経過時に供試魚の内臓・鰓および筋肉内のサルファ剤濃度を定量して薬剤の摂取状況、残留濃度を調査した。

サルファ剤の定量は第一製薬KKに依頼し、Bratton-Marschallの変法（津田の変法）により実施した。

5) 試験期間

昭和53年4月28日～5月12日

6) 試験水温

試験期間中の水温は10.9～13.9℃である。

2. 結 果

1) SO合剤の治療効果

DG-5459投与結果は図10に示す。供試魚群では昭和53年4月20日頃より斃死魚が出現した。4月21日に斃死魚2尾について細菌検査を行ったところ、*A. salmonicida* が分離されたのでせつそう病と診断した。その後、斃死魚が漸増傾向を示したため、4月27日に罹病群を2等分しDG-5459による治療試験を行った。試験区設定後5日目から投薬を開始したが、その間に試験区設定時の取扱いの影響と考えられる斃死魚の増加が認められた。この傾向は投薬区において顕著で、投薬2日目まで斃死魚は増加したが、その後漸減し投薬開始後7日目以後の斃死魚は認められなかった。無投薬区（対照区）では当初は投薬区に比べ斃死魚は少なかったが、その後急増し、投薬区において5日目の投薬を実施した時点では日間斃死尾数が投薬区の約5倍に達した。対照区ではその後も1日に6～16尾の斃死魚が観察された。

試験終了時の累積斃死率は対照区の2.41%に対し投薬区は1.45%であり、対照区に比べ明らかに低い結果であった。

投薬開始後の斃死魚については個体別に細菌の分離を行った。その結果、対照区については試験終了時までほぼ100%の割合で*A. salmonicida* が分離されたが、投薬区では投薬開始後

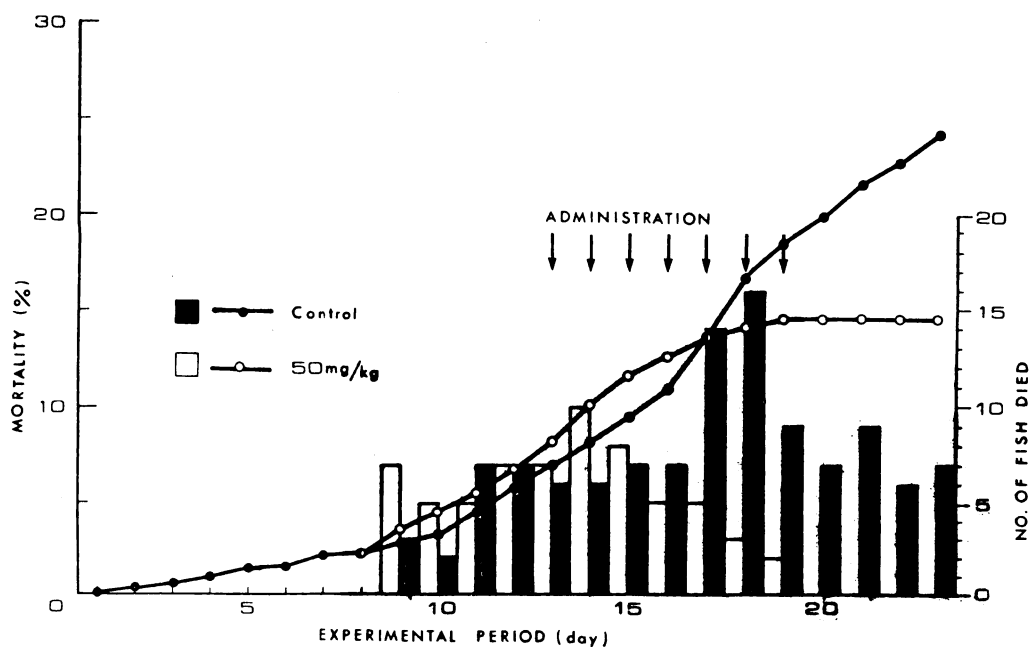


図10 ブラウンマスのせつそう病に対するDG-5459の治療効果

5日目で3尾中2尾、6日目で2尾中1尾について分離され、菌の検出率が低下する傾向を示した。

2) サルファ剤の組織内濃度定量結果

初回の投薬直後における供試魚の薬餌摂取状況を表16にサルファ剤の組織内濃度およびアセチル化率(AC%)で示した。

表16 投薬直後におけるサルファ剤の組織内濃度

| No | 体重(g) | 体長(cm) | 組織内濃度 (mg/kg) | | AC(%) |
|----|-------|--------|---------------|----------|-------|
| | | | *1 Free | *2 Total | |
| 1 | 22.1 | 11.2 | 11 | 11 | 0.0 |
| 2 | 17.3 | 10.2 | 6 | 7 | — |
| 3 | 22.0 | 11.2 | 19 | 20 | 5.0 |
| 4 | 9.2 | 8.5 | 25 | 27 | 7.4 |
| 5 | 15.9 | 10.2 | 12 | 13 | 7.7 |
| 6 | 13.8 | 9.6 | 17 | 17 | 0.0 |
| 7 | 14.9 | 10.0 | 36 | 37 | 2.7 |
| 8 | 18.3 | 10.0 | 18 | 19 | 5.3 |
| 9 | 24.3 | 12.0 | 0 | 0 | — |
| 10 | 37.9 | 13.7 | 10 | 11 | 9.1 |
| 平均 | | | 15±10 | 16±10 | 4.7 |

*1 遊離のサルファ剤濃度

*2 遊離のサルファ剤+アセチル化体濃度

定量に供した10尾中、摂餌していないと考えられる個体が1尾観察され、他9尾については若干の濃度のバラツキが認められた。これらの個体のサルファ剤濃度については、遊離のサルファ剤濃度を例にとると最低6mg/kgに対し最高値はその6倍の36mg/kgを示し、平均値は15±10mg/kgという結果であった。総量としては16±10kg、投薬量から算出した摂取率は106.7±66.7%であった。

投薬終了後6・24・48時間経過後のサルファ剤濃度については表17に示した。投薬終了後6時間経過時の組織内濃度は内臓と鰓を混合した資料中で7~19mg/kgBW (Free量)を示し、また、筋肉内の濃度は0.4~0.8mg%とほぼ同水準の値となり個体差はほとんど問題にならない結果を示した。各組織内のサルファ剤濃度は48時間経過後にはほとんど0に近い値を示した。

表 1 7 薬剤投与後のサルファ剤の組織内濃度

| 投与終了後の 経過時間 | No | 体重(g) | 内臓・内濃度 (mg/kg) | | | 筋肉内濃度 (mg%) | | |
|----------------|----|-------|----------------|--------|------|-------------|---------|-----|
| | | | Free | Total | AC% | Free | Total | AC% |
| 6 | 1 | 18.0 | 12 | 22 | 45.5 | 0.5 | 0.6 | — |
| | 2 | 21.8 | 16 | 24 | 33.3 | 0.6 | 0.6 | — |
| | 3 | 21.7 | 19 | 24 | 20.8 | 0.5 | 0.6 | — |
| | 4 | 20.6 | 7 | 23 | 69.6 | 0.4 | 0.4 | — |
| | 5 | 19.6 | 16 | 24 | 33.3 | 0.8 | 0.8 | — |
| 平均 | | | 14±4 | 23±0.8 | 40.5 | 0.6±0.1 | 0.6±0.1 | |
| 24 | 1 | 28.2 | 4 | 11 | 63.6 | 0.4 | 0.4 | — |
| | 2 | 18.8 | 6 | 5 | 60.0 | 0.6 | 0.6 | — |
| | 3 | 19.4 | 4 | 11 | 63.6 | 0.2 | 0.3 | — |
| | 4 | 16.1 | 10 | 18 | 44.4 | 0.7 | 0.9 | — |
| | 5 | 14.5 | 6 | 13 | 53.8 | 0.5 | 0.6 | — |
| 平均 | | | 6±2 | 14±3 | 57.1 | 0.5±0.2 | 0.6±0.2 | |
| 48 | 1 | 22.2 | 7 | 13 | 46.2 | 0.2 | 0.2 | — |
| | 2 | 20.2 | 3 | 8 | — | 0 | 0.1 | — |
| | 3 | 18.6 | 3 | 9 | — | 0 | 0 | — |
| | 4 | 17.3 | 4 | 11 | 63.6 | 0 | 0 | — |
| | 5 | 16.2 | 3 | 9 | — | 0 | 0 | — |
| 平均 | | | 4±2 | 10±2 | — | 0 | 0.1 | — |

3. 考 察

ブラウンマスに発生したせつそう病に対してDG-5459を1日量として魚体重1kgあたり50mg、7日間連続投与することにより治療効果が認められた。

投薬区について薬餌投与直後にサンプリングしサルファ剤濃度を定量して、薬剤の摂取状況を調べたが、まったく摂餌していないと考えられる個体が1尾あった。この個体はせつそう病による衰弱個体であったと推測される。一方、摂餌した個体間における濃度差については、投薬を自由摂餌により行なったことから、この程度の差はさげられないものであろう。

しかし、7日間投与後については濃度差が少ないことから、全個体の組織内濃度が有効水準に達するには連続投与が必要と考えられる。したがって、有効濃度に達するための投与回数についての検討が必要であり、その結果によっては投薬期間を短縮することも可能であろう。

当场においては1966・1967年にニジマスの人工感染によるせつそう病に対してサルファ

剤(SMM)を経口投与し、その有効量は1日量として魚体重1kgあたり100mgであることを報告した。また、SMMのせうそう病に対する治療効果については一般に、魚体重1kgあたり100～200mgを3～7日間投与する方法が有効とされている。しかしながら、今回の結果からSMMをオルメトブリムと混合して使用することにより、SMM量としては魚体重1kgあたり15mgを7日間投与することにより十分な治療効果が得られたことから、オルメトブリムを使用することにより、サルファ剤の使用量を少なくすることが可能と考えられる。

また、オルメトブリムはサルファ剤耐性菌にも有効であるといわれ、その意味で、今後の魚病治療薬としての興味は大であるが、耐性菌に対しては、新しい薬剤による対応以前に、従来ある薬剤の使用法からの対応が先決であり、オルメトブリム等の新しい薬剤への安易な依存は厳に慎むべきではなからうか。

Publication of The Tokyo Metropolitan
Fisheries Experiment Station №287

Memoir of The Tokyo Metropolitan
Fisheries Experiment Station №138

昭和53年度
指定調査研究総合助成事業
病害研究報告書(ニジマス)

印刷物規格表第2類
印刷番号531709
刊行物番号(I)137

昭和54年2月20日発行

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