

東水試出版物通刊 No. 273

調査研究要報 No. 130

昭和51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 52 年 8 月

東京都水産試験場

昭和51年度指定調査研究総合助成事業病害研究(ニジマス)

目 次

I はじめに	1頁
II IPNワクチンに関する研究	2
1. IPNワクチンの不活化	2
2. 中和抗体価の測定	3
3. 親魚へのワクチン接種	7
4. 奥多摩分場におけるIPN発生状況	7
5. 要 約	9
III せつそう病に関する研究	11
1. 経口ワクチン試験	11
2. 経皮ワクチン試験	15
3. 薬剤感受性試験	17
4. トリプリッセン(A-TP)投与試験	22
5. 蛍光抗体法の応用による診断技法の検討	24
6. 要 約	27
IV 都内養殖池に発生した疾病について	28



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
	主 事 村井 衛
	主 事 加藤 憲司

I は じ め に

昭和38年のヤマメの本格的池中養殖開始以来せっそう病による採卵用親魚の斃死率が高くなり、採卵事業計画に支障をきたしている。これに対処するため当场においては昭和42年より、サルファ剤、合成抗菌剤、抗生物質等による治療試験および昭和43年より予防対策としてワクチンの実用化研究を行っている。ワクチン研究は親魚に対するワクチンの接種および稚魚への経口投与を行ったが、経口ワクチンでは餌付け開始と同時に投与を開始し、連続21回ないし14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認められた。また、ヤマメのせっそう病と並んで重大な問題としては昭和44年よりみられはじめたニジマスのウイルス性疾病（IPN：伝染性すい臓腺死症）である。本疾病による養殖業者の被害は大きく時にふ化稚魚の6～8割を斃死させるなど、養殖経営に多大な被害を与えており、当场でもIPN対策として昭和46年度より抗糖尿病剤、抗プラスミン剤、抗炎症剤、糖代謝改善剤、PVP-Iの投与試験、カゼイン飼料試験を行ってきた。但し、効果的治療方法は見出し得ずワクチンの開発が急がれている。

昭和51年度は従来の実績をふまえ、せっそう病に関してはせっそう病研究部会会員各県（1都6県）との協同研究の一環として、せっそう病経口ワクチン試験、経皮ワクチン接種試験を中心に、フィールド治療試験やFA法の検討などのせっそう病防除研究を行った。特に経口ワクチンについては投与回数、プースターワクチンについての検討を行った。IPNに関しては親から仔への移行抗体によるIPN予防、いわゆる親仔免疫を検討した。その第一段階として当场でBPL不活化IPNウイルス液を作成した後ニジマス親魚に接種した。接種親魚については血中の中和抗体価の推移を観察した後、採卵を実施し卵への抗体の移行および稚魚のIPNに対する抵行性の検討に着手した。

II. IPNワクチンに関する研究

1. IPNウイルスの不活化

- 1) 供試ウイルス IPNウイルス (TCID₅₀/ml = 10^{-5.73})
- 2) 使用細胞 RTG-2 cell line (144~145代継代)
- 3) 使用不活剤および濃度
β-プロピオラクトン (β-Hydroxypropionic Acid Lactone : C₃H₄O₂ 以下βPLという。) 0.3%である。
- 4) 使用培地 細胞培養用培地 MEM₁₀ Tris
ウイルス培養用培地 MEM₂ Tris
- 5) 不活化の手順 IPNウイルス不活化手順を図1に示した。

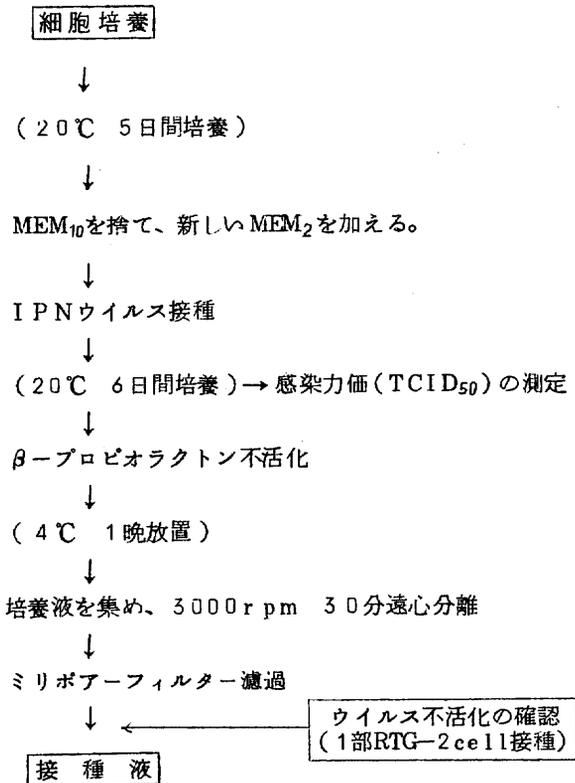


図1. IPNウイルス不活化手順

細胞およびウイルス培養にはファルコンのディスポーザブルフラスコ(75 cm^2 、培地20 ml)を使用した、 β PL不活化前にウイルスの力価をマイクロタイター法により測定した。その結果、ウイルスの感染力価は $TCID_{50}/ml = 10^{-5.73}$ であった。また、不活化後のウイルスの生残は認められなかった。

接種液の作製に際しては β PL不活化後4℃、1晩放置後フラスコを激しく振盪した後、培養液を集め遠心分離により細胞残渣を除き、無菌濾過し接種液とした。接種液はMEMに含まれる指示薬が黄色を呈することからPHはかなり低いと考えられる。

2. 中和抗体価の測定

前項の手順で作成した不活化IPNウイルス液をニジマス親魚に接種し、中和抗体価(ND_{50} : 50% Neutralization end point)の推移を観察した。

〔方法〕

- 1) 供試魚 ニジマス2年魚、30尾(平均体重660g)
- 2) 接種量 魚体重1kg当り1 ml を腹腔内に接種した。
- 3) 試験区 表1のとおりである。

表1 中和抗体価測定試験区

試験区	接種回数	接種月日			備考
		第1回	第2回	第3回	
A	1	1976. 8. 4	—	—	対照区
B	2	"	9. 1 4	—	
C	3	"	"	1 0. 4	
D	※1	"	—	—	

※ MEM₂のみ1回接種

- 4) 採血 供試魚はタグガンを使用し、背鰭基部に個体標識し、各区5尾ずつ個体別反復採血を1ヶ月毎に4回実施した。

採血はキュービエ氏管から行い、採血した血液は4℃で1晩放置後血清を分離し、密栓小試験管で-20℃に凍結保存した。

- 5) 中和抗体価の測定

血清は室温融解後56℃30分の加温を行った後MEM₂で30倍から3倍希釈を行った。測定は常法によりマイクロタイター法で中和抗体価を測定し

た。(図2参照)

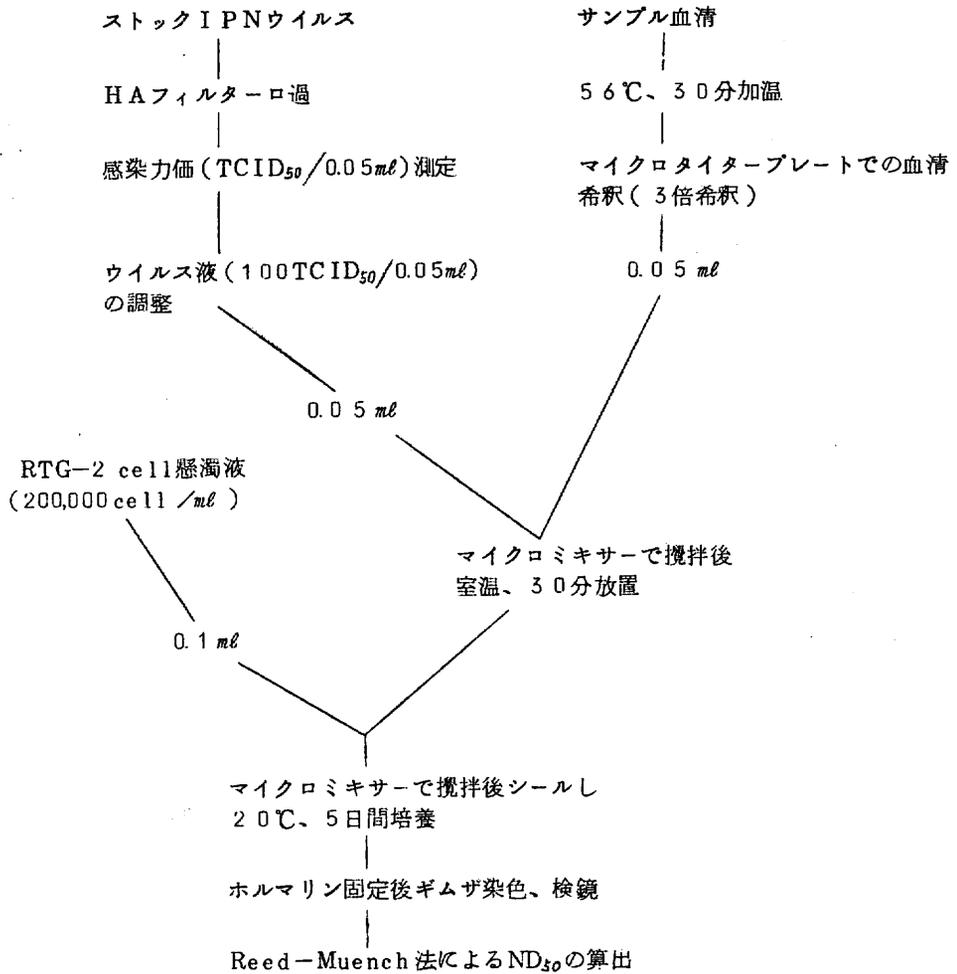


図2 マイクロタイター法操作手順

〔結果〕

各区の最終ワクチン接種から1ヶ月毎の中和抗体価を表2に、また、試験期間中の飼育水温を図3に示した。

表 2 IPNウイルス中和抗体価の推移

試験区	尾	最終ワクチン接種後の経過時間（月）			
		1	2	3	4
A	1	<30	56	270	270
	2	≤21	53	390	*-
	3	270	53	53	40
	4	<30	<30	<30	<30
	5	<30	<30	53	-
B	1	1,200	1,700	10,000	**
	2	810	3,500	1,100	
	3	560	1,400	1,100	
	4	190	180	-	
	5	≤21	≤21	<30	
C	1	180	810		
	2	1,100	1,600		
	3	390	1,400		
	4	810	470		
	5	40	44		
D	1	44	63	39	130
	2	<30	<30	<30	<30
	3	<30	270	53	63
	4	<30	<30	≤21	-
	5	<30	90	53	-

*……標識不明瞭の為採血出来なかったもの

**……現在分析中を示す。

各区の中和抗体価はA区では5尾中4尾について、≤21～390の範囲で抗体価の上昇が認められ、3ヶ月目にピークとなる傾向がうかがえたが、まったく上昇しない個体も1尾観察された。B区では4ヶ月目の採血予定日およびC区では3ヶ月目の採血予定日が採卵期と重複し、定期サンプリングを実施せず、採卵時に採血を行った関係で、データは不十分であるが全体的にA、D区に比べB、C区では高い抗体価を示し、B区では2回目のワクチン接種後3ヶ月で10,000の値を示す個体もみられた。逆に、B区では5尾中2尾、C区で5尾中1尾は他の個体に比べ極端に近い値を示し、抗体価の上昇には明らかな個体差がみられた。

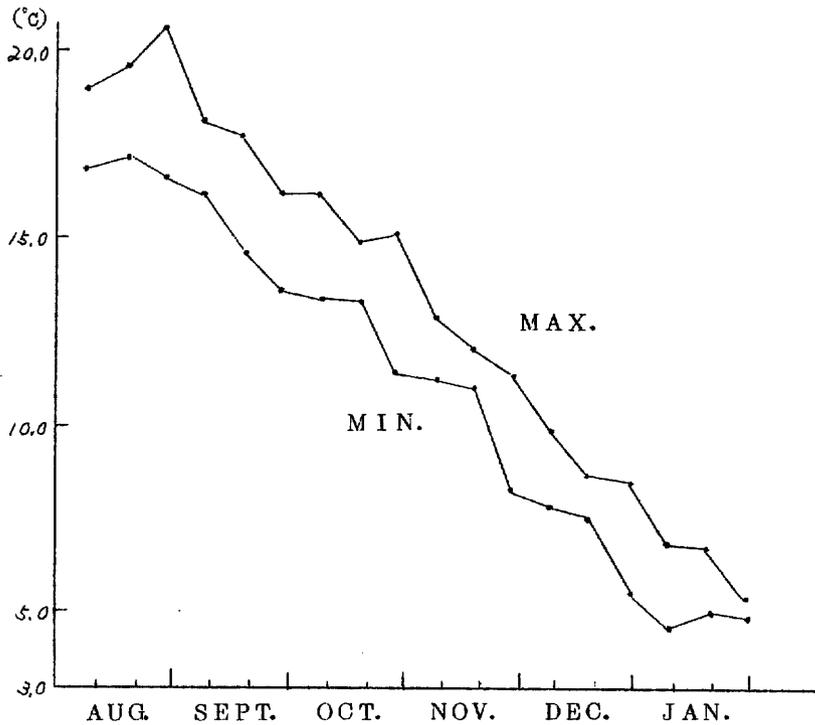


図3 IPNワクチン接種魚の飼育水温
(飼育期間中の旬別最高最低水温)

〔考 察〕

ワクチン接種後の血中の中和抗体価の推移を知ることは親仔免疫ワクチン接種を行う場合に、接種回数、時期を決定するための基礎として重要と考えられる。今回の試験では、*Aeromonas salmonicida* の凝集価の推移に関するKranz et al (1964)、岐阜水試(1967)、東京水試(1975)、などの知見を参考に、第1回目の接種時期を採卵期の3~4ヶ月前になるように設定し、接種回数については1、2、3回接種について検討した。今回の結果についてみると、A区は対照区(D区)に比べ若干抗体価は高くなり、接種後ほぼ3ヶ月目に最高となる傾向が認められたが、Wolf(1969)、Jørgensen(1973)の生ウイルス接種結果に比べれば、本試験の値ははるかに低いと言える。今回、A区で高い値いが得られなかった理由としては抗原性の問題が考えられ、今後の検討が必要である。一方、B、C区については60~80%の個体で比較的高い抗体価が得られたことから、βPL不活化抗原を使用した場合には多回反覆接種が必要と考えられる。

また、対照区（D区）についても抗体価が若干検出される個体が出現したが、これは供試魚がIPN罹病魚群由来であり、成魚期にも同一環境でIPNのくり返し発生を経験していることから、自然獲得免疫による抗体価の上昇とも考えられるが、現段階では推測の域を出ない。

次に抗体価の上昇しない個体についてであるが、本試験で抗体価の上昇しない個体や他に比べて著るしく値の低い個体が20～40%の割合で存在した。この点については今後の知見の集積を待たねばならないが、Wolf（1963）はニジマスについてウイルス保菌魚では抗体価が著るしく低く、逆に抗体価の高い個体ではウイルスの保菌のまったく、あるいはほとんどないことを報告している。また、他の実験用動物については、不顕性感染個体では相同する抗原に対する抗体価の上昇が遅延することが知られている。今回の供試魚についてもウイルスの保菌の可能性も考えられることから、今後、ワクチンの効果を検討するうえで注目すべきことと考えられると共に、ウイルスフリー親魚探索の方向を示唆していると言えよう。

3. 親魚へのワクチン接種

- 1) の方法により作製した不活化ウイルス液を採卵親魚（雌のみ）に次のように接種した。
- 1) 当场におけるニジマス採卵盛期は1月中、下旬であるので、その3ヶ月前に相当する10月中旬にワクチン接種（1回目）を行った。
- 2) 接種尾数は採卵を主目的とする群30尾、中和抗体価測定を主目的とする群30尾の計60尾である。
- 3) 中和抗体価測定を実施した。
- 4) 個体別採卵を実施した。

なお、中和抗価値測定を主目的とした群より得られた稚魚については個体別飼育、採卵を主目的とした群よりの稚魚についてはワクチン接種回数に基づいて3群に分け、1群10,000～20,000尾の群飼育を行い、同時に卵の抗体価の測定、ふ化稚魚のIPN攻撃試験、IPN発生状況（生残率）等の検討を行う予定である。

4. 奥多摩分場におけるIPNの発生状況

当场における本年度のIPNによる斃死状況は図4に示すとおりである。

各区の日間斃死数が飼育尾数の1%を越えた日はA：5月19日、B：5月2日、C：5月21日であった。終息時期については、症状は6月下旬まで続いたが細菌性鰓病、コストイ

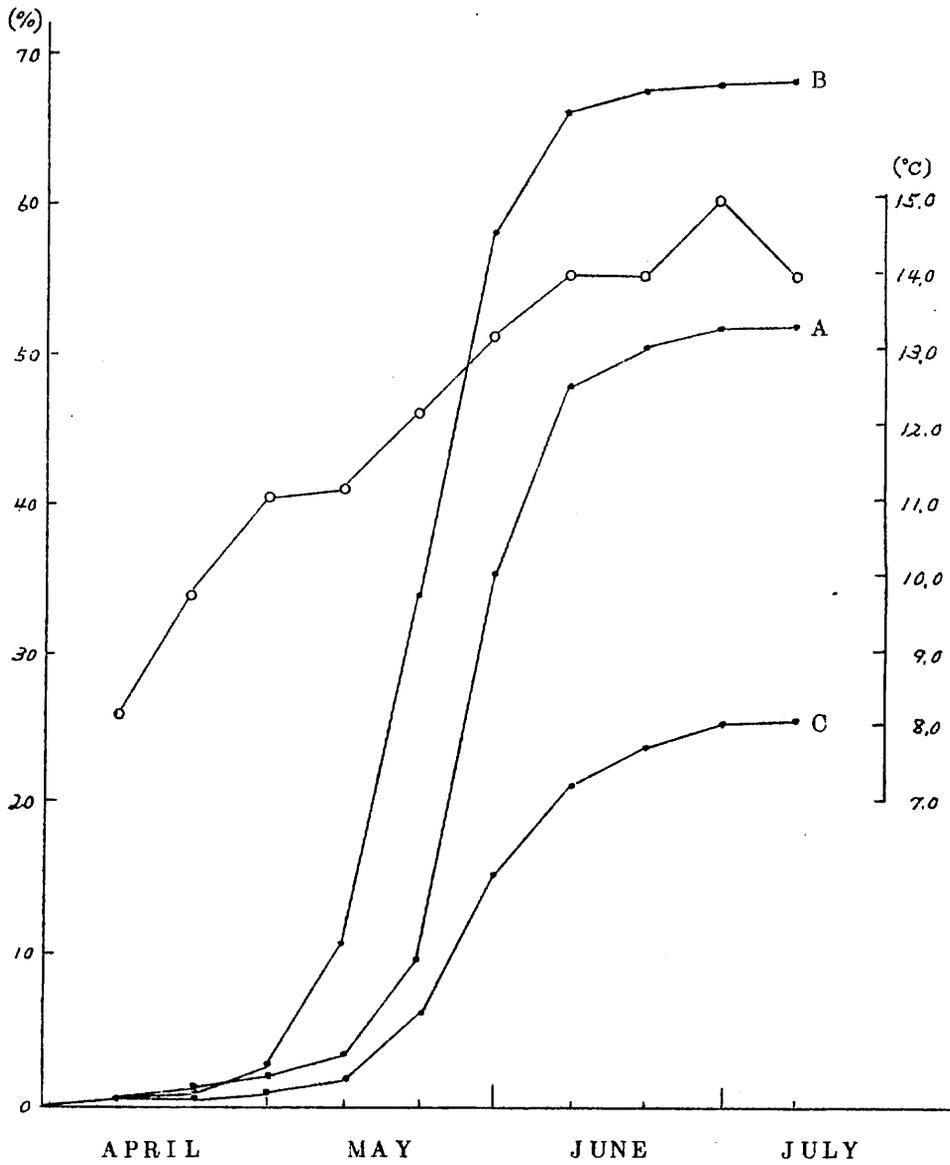


図4 ニジマス稚魚のIPNによる死亡率(入川試験池)

- ・ たて軸は旬別累積死亡率を示す。
- ・ —○— …… 飼育期間中の平均水温
- ・ A : 2年魚より採卵した稚魚
- ・ B : 3年魚より採卵した稚魚
- ・ C : 4年魚より採卵した稚魚

ア病の併発がみられたため正確な把握は出来なかった。

海沢試験池では、6月下旬のIPN終息時までの累積斃死率は平均24.0% (22.8-25.2)であった。

当场におけるIPNの発病は昭和44年より観察され、50~76%の斃死率を示していたが、本年度は特に海沢試験池の斃死率は24%前後となり、近年若干ではあるが斃死率が低下する傾向がみられる。

なお、本年も都内では業者を含めてIHNの発生はみられなかった。

5. 要 約

1. β -プロピオラクトン不活化ワクチンを作成した。
2. 上記ワクチンを接種し、中和抗体価の測定を行った。
 - 1) ワクチン1回接種により抗体価が上昇し、接種後3ヶ月目にピークとなる傾向となったが、値はあまり高くなかった。
 - 2) 多回接種により明らかな抗体価の上昇がみられ、最高10,000となった。
 - 3) 抗体価の上昇には明らかな個体差がみられた。
 - 4) 対照区でも抗体価の高い個体が観察された。
3. ワクチン接種親魚より採卵を行い、親仔免疫の検討に着手した。

参考文献

- 1) 岐阜水試 1967 指定調査研究総合助成事業 病害研究報告書
- 2) 東京水試 1975 同 上
- 3) Krantz, G.E., J.M.Reddecliff, and C.E.Heist. 1964. Immune response of trout to *Aeromonas salmonicida*. Part I. Development of agglutinating antibodies and protective immunity. *Progressive Fish-Culturist* 26: 3-10
- 4) Jørgensen, P.E.Vestergard. 1973 The nature and biological activity of IPN virus neutralizing antibodies in normal and Immunized rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Archiv für die gesamte Virusforschung* 42, 9-20
- 5) Wolf, K., M.C.Quimby, and A.D.Bradford. 1963 Egg - associated transmission of IPN virus of trout *Virology* 21:317-321

- 6) Wolf, K., and M.C. Quimby. 1969. Infectious pancreatic necrosis
: Clinical and immune response of adult trouts to inoculation
with live virus. J. Fish. Res. Bd Canada 26 : 2511 - 2516

Ⅲ. せっそう病に関する研究

1. 経口ワクチン試験

昨年度の試験で遅延効果の認められた21回連続投与について、更にブースターワクチン接種を試みた。

〔方法〕

- 1) 供試魚 ヤマメ0年魚(平均体重0.14g)、1区5,000尾とし、6区もうけた。
- 2) 試験区 試験区分については表3に示すとおりである。

表3 せっそう病経口ワクチン試験区

試験区	項目	ワクチン投与量	投与回数	ブースターワクチン(回数)	備考
Fo-1		1日、1尾 0.15mg	餌付より21回連続投与	接種(1)	
2		"	"	"(2)	
3		"	"	接種せず	
4		"	餌付より14回連続投与	"	
5		—	—	—	対照区

- 3) 供試ワクチン A. salmonicida を超音波破壊し、その遠心上清を凍結乾燥したものである。
- 4) 投与方法 0.85%生理食塩水に溶解後クランブルに浸透させた。
- 5) 投与期間 昭和51年2月2日より14回および21回連続投与
- 6) ブースターワクチン接種

試験区Fo-1、2区より各区1,500尾にホルマリン不活化ワクチン(化血研製)を1尾あたり0.05ml接種し、更に1,500尾を対照区とした。なお平均体重は6.3g、1回目のワクチン接種は7月9日に実施した。

〔結果〕

ワクチン投与後の生残率を表4、図5に示した。

せっそう病の発生は表5に示すとおり各試験区とも認められ、生残率も表4に示したとおりFo-3区24.9%、4区27.9%、5区29.1%と低い値を示した。試験区別のせっそう病発生時期はFo-4、3、5の順であった。

表4 経口ワクチン投与魚の生残率(%)

試験区	月	2	3	4	5	6	7	8
F ₀ -1		97.1	95.1	93.8	89.1	87.7	(87.5)*	—
	2	93.1	91.3	90.1	87.5	86.2	86.2	—
	3	93.8	91.3	89.7	83.3	81.8	27.3	24.9
	4	95.3	93.9	92.0	88.2	43.3	28.8	27.9
	5	93.7	91.3	90.1	88.4	87.1	30.3	29.1

* ()は7月1日より7月10日までの値

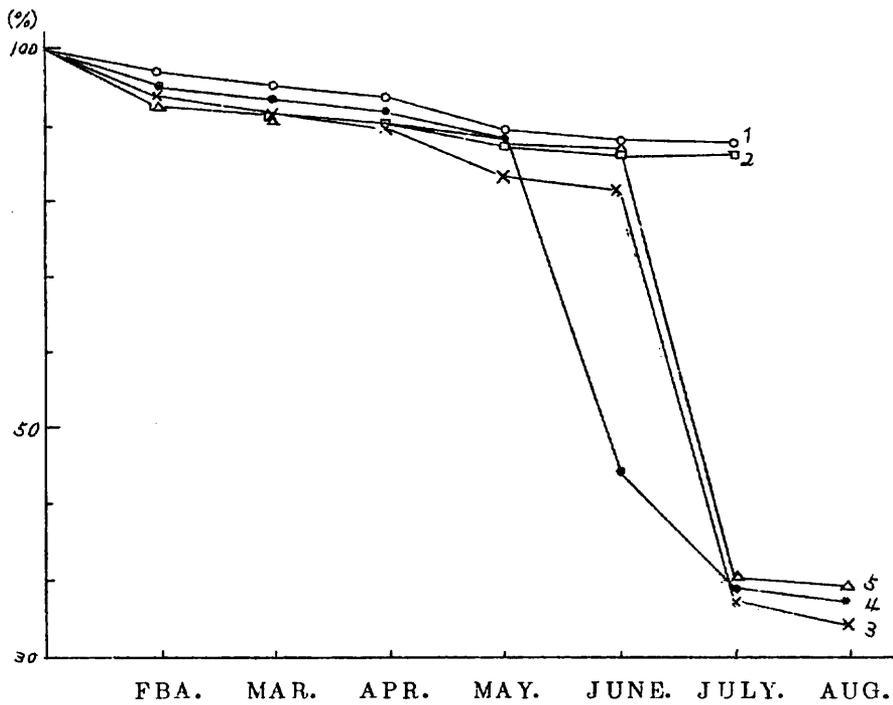


図5. 経口ワクチン投与魚の生残率の推移

表5 経口ワクチン試験区のせっそう病発生状況

試験区	せっそう病発生時期			備考
	A※1	B※2	C※3	
Fo-3	7月3日	7月6日～25日	7月下旬	
-4	6月12日	6月16日～7月9日	7月中旬	
-5	7月5日	7月7日～22日	7月下旬	
※4-6	7月30日	8月3日～14日	8月中旬	ブースター1回接種区
-7	8月8日	8月17日～26日	8月下旬	ブースター2回接種区
-8	7月20日	7月28日～8月12日	8月中旬	対照区

※1 A:せっそう病によると推定されるへい死魚が認められた時点

※2 B:細菌分離によりせっそう病が確認された時点から大量へい死が終息した時点まで

※3 C:せっそう病によるへい死魚が認められなくなった時点

※4 Fo-6:7はそれぞれFo-1、2区より1,500尾抽出した区、Fo-8はFo-1、2区の混合群より1,500抽出した区

ブースターワクチン接種試験区(Fo-6～8)では、各区ともワクチン接種後1ヶ月以内にせっそう病の発生がみられ、各区の8月下旬の生残率は4.6～12.1%と低い結果となった。(表6参照)

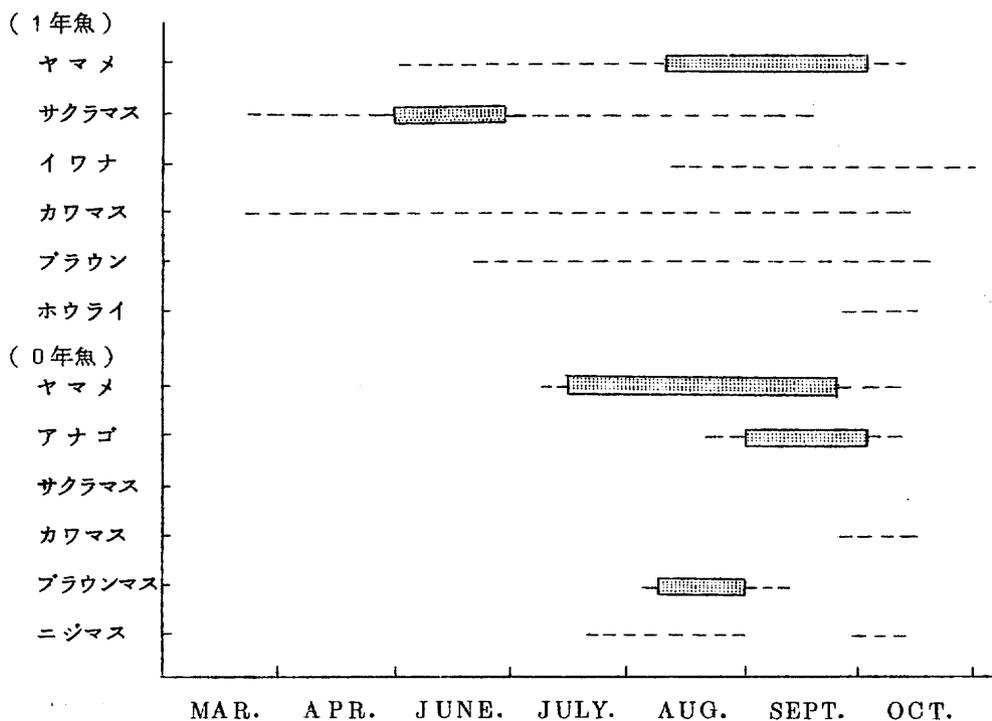
表6 ブースターワクチン接種区の生残率(%)

試験区	7月		8月		
	中旬	下旬	上旬	中旬	下旬
Fo-6	96.6	91.3	29.1	10.0	9.8
7	98.1	95.3	88.9	64.2	12.1
8	98.1	90.1	7.1	4.7	4.6

〔考察〕

本年のせっそう病発生時期は7月上旬から中旬にかけてであった。これは昨年度の結果と類似しており、経口ワクチンの有効期間を示唆しているとも考えられる。

ブースターワクチンの接種については当初5月を予定していたが、供試魚が小さく接種作業が困難であり5ヶ月以上になるまで延期したため、第1回接種は7月になった。せっそう病はその後約1ヶ月間に各区で発生したが、対照区に比べブースターワクチン接種区の



----- セッコウ病の散発的発生期間

■ セッコウ病による大量斃死の観察された期間

図6 奥多摩分場におけるセッコウ病の流行時期と発病魚種

発病が10～20日遅れたことから遅速効果とも考えられる。しかし、ワクチン接種から発病まで1ヶ月しかなかったことは、凝集価が有効レベルに達する前の罹病とも考えられ、今後、小さい魚体へのワクチン接種方法および接種時期について並行した検討が必要である。

また、本年は当场で飼育しているマス類の多くに早い時期から散発的にセッコウ病が発生し、3月下旬にはカワマス、サクラマス1年魚に斃死魚がみられるなど、例年になくセッコウ病被害の大きい年であった。(図6参照) ワクチンの効果が病原体と宿主のバランスの上に成立するとすれば、上述の飼育環境が経口ワクチン試験魚の生残率を低下させた要因の1つと考えられ、また、*A. salmonicida*の毒力の高い株の出現によることも考えられるため、来年度のワクチン作成用菌株の選択の際に検討する必要がある。

一方、原虫寄生および細菌性鰓病による稚魚期の初期減耗が、近年、増加する傾向にあり、そのため経口ワクチン試験も昨年までは3～5月に20～30%の斃死がみられたが、

本年はこれらの被害は軽微であった。

2. 経皮ワクチン試験

本年度は従来の接種試験のほかに稚魚期に経口ワクチン投与を行ったヤマメの経皮ワクチン接種を行った。また、ワクチン接種時に供試魚の細菌検査をFA法により実施した。

〔方法〕

- 1) 供試魚 ヤマメ親魚、各区1,000尾（平均体重45g）
- 2) 試験区分 供試尾数、ワクチンおよび稚魚期の経口ワクチン投与の有無は表7に示すとおりである。

表7 セッセイ病経皮ワクチン試験区

区分	項目	供試尾数	供試ワクチン	稚魚期における経口ワクチン投与
I		1,000	化血研製ワクチン	経 験 区
II		1,000	北里研製ワクチン	経 験 区
III		1,000	自家製ワクチン	未 経 験 区
IV		1,000	北里研製ワクチン	未 経 験 区
V(対照区)		200	—	未 経 験 区

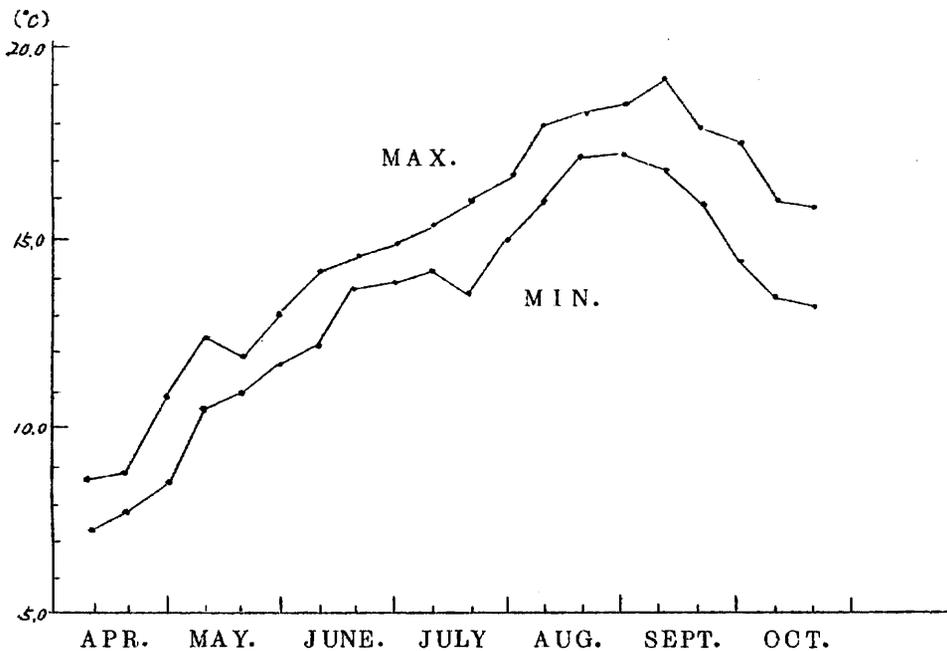


図7 経皮ワクチン接種魚飼育水温（旬別最高最低水温）

3) 接種時の細菌検査

接種時に各区10尾ずつ任意抽出した供試魚の腎臓よりの塗抹標本についてFA法(直接法)により細菌検査を行った。

4) 飼育水温 飼育期間中の旬別最高最低水温は図7に示すとおりである。

5) 斃死魚の検討

試験期間中の斃死魚については3)と同様の手法により細菌検査を実施し、死因がせつそう病によるか否かを判定した。

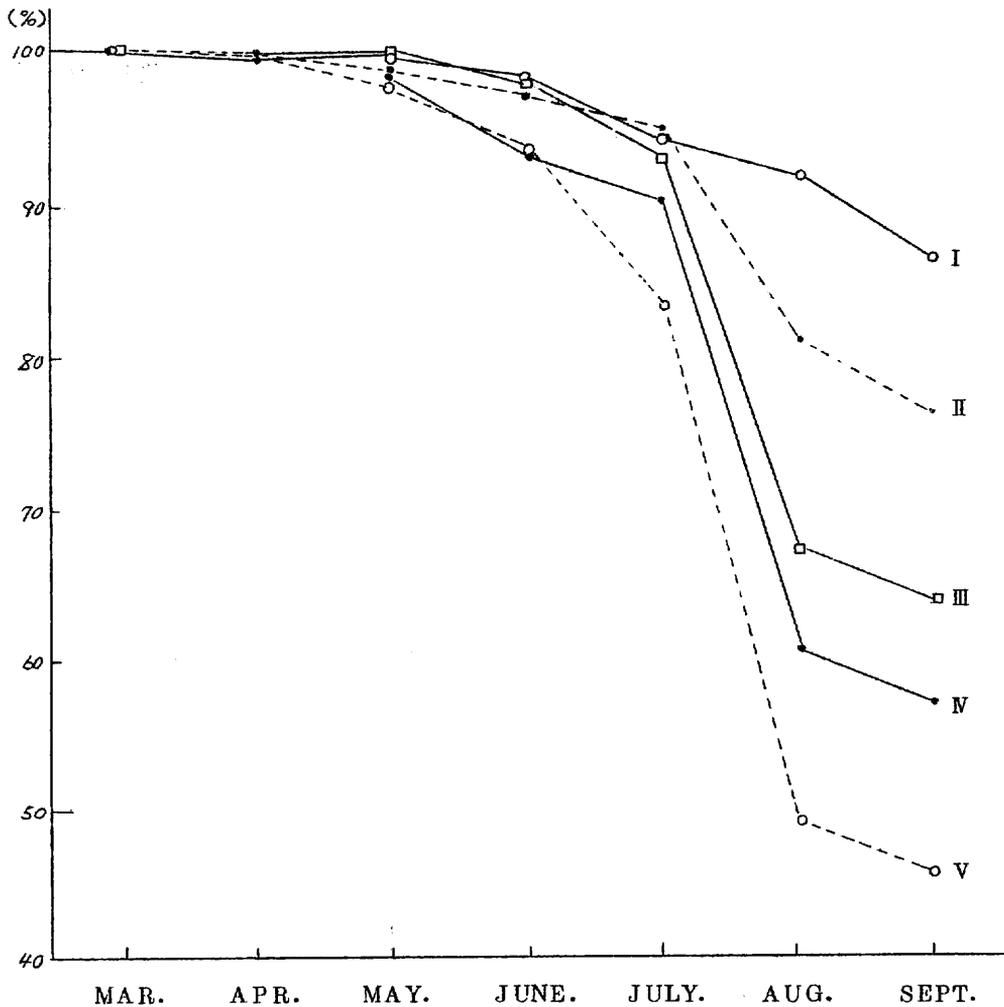


図8 経皮ワクチン接種魚の生残率

〔結果〕

ワクチン接種前に実施した細菌検査では経口ワクチン経験群および未経験群とも10尾中4尾に*A. salmonicida*の保菌が疑われる結果となった。

各試験区の生残率を図8に示した。

各区とも7月までは生残率が90%と高くなったが、8月にはいりせう病の発生により斃死魚が急増した。

飼育期間中の試験区の全斃死の死亡原因をせう病によるものとその他のほかのものに分けて表8に示した。

表8 経皮ワクチン接種魚の原因別斃死率

月 区分	3	4	5	6	7	8
I	*0 ***(0.2)	0 (0.4)	0 (0.5)	0 (2.1)	0.2 (5.5)	4.1 (14.3)
II	0 (0)	0 (0.1)	0.6 (1.0)	0.8 (2.6)	0.9 (4.4)	5.7 (13.6)
III	0 (0.1)	0 (0.3)	0 (0.3)	0.1 (2.6)	1.2 (5.8)	11.0 (22.0)
IV	0 (0)	0.1 (0.4)	1.0 (1.4)	2.3 (4.8)	2.7 (7.2)	12.1 (27.8)
V	0 (0)	0 (0)	1.0 (1.5)	3.0 (4.0)	7.5 (9.5)	19.0 (33.0)

*……供試尾数に対するせう病によるへい死魚の累積へい死率

**……供試尾数に対するせう病以外の原因によるへい死魚の累積へい死率

〔考察〕

本年度の経皮ワクチン試験の結果は生残率でみるとI、II区がほぼ同じ値いとなり、ついでIII区、IV区、対照区の順で低下している。I、II両区とIII、IV区が生残率の差については次の事が考えられる。

- ① I区の下にIII区、II区の下にIV区の飼育池を設定したことによる環境の差
- ② I区とII区は経口ワクチン経験群であり、III区とIV区は未経験群である。
- ③ I、II区は稚魚期にせう病の流行を経験しているが、III、IV区は未経験である。

以上のことは今後稚魚から親魚までを通してのワクチンの計画的接種法を考える上で検討すべき問題であろう。

3. 薬剤感受性試験

本年度当场および業者の飼育池より分離した*Aeromonas salmonicida*の薬剤感受性試験をディスク法により実施した。

〔方法〕方法はせつそう病研究会の申し合せに準じた。

- 1) 使用培池：感受性ディスク用培池「ニッサン」
- 2) 方法：常法により感受性ディスク培池の平板上に、被検菌の懸濁液 (10^{10} cell/ml) を 0.01 ml 塗抹した後、ディスク 3~4 個を置き、直ちに 20℃ の恒温器に移し、24 時間と 48 時間経過後の阻止円の直径を測定し、感性度グラフにより +- 等で感受性の程度を判定した。
- 3) 使用ディスク：昭和ディスクの次のものを使用した。スルファジメトキシシン (x)、フルイソメゾール (Z)、スルファモノメトキシシン (mp)、クロラムフェニコール (C)、ストレプトマイシン (S)、チアンフェニコール (tp)、ピロミド酸 (DA)、ナリジスク酸 (Nd)、オキシテトラサイクリン (O)、テトラサイクリン (T)、フラゾリドン (f)

注) () 内は略号である。

- 4) 供試菌株：供試菌株の由来は表 9 に示すとおりである。

表 9 供試菌株の由来

菌株番号	分離年月日	分 離 魚		
		魚 種	体 重	場 所
To-7601	S51 4. 22	アマゴ	21.7 g	当场稚魚池
-7602	" "	"	22.7	"
-7603	" "	"	24.2	"
-7604	4. 14	ヤマメ	-	当场 7号
-7605	5. 9	"	56.7	3
-7606	5. 11	"	76.0	1-B ₄
-7608	6. 24	"	292.0	3
-7609	6. 29	"	189.0	7
-7610	" "	"	221.0	7
-7611	7. 1	"	217.0	6
-7612	7. 2	"	156.0	1-B ₄
-7614	7. 9	"	221.0	6
-7616	" "	"	97.0	2
-7617	7. 12	"	288.0	7

菌株番号	分離年月日	分 離 魚		
		魚 種	体 重	場 所
To-7618	S51	ヤマメ		F 養魚場
-7621		"		当场ふ化槽
-7622	9. 4	"		S 養魚場
-7623	"	"		"
-7624	"	"		"
-7625	9. 7	"		F 養魚場
-7626		"		"
-7627		"		"
-7628		"		"

〔結果と考察〕

感性度グラフによる判定結果を表10に示した。

今回試験した菌株のうち昭和51年4月から7月までに分離した菌株では、いずれの株もサルファ剤、抗生物質、その他の合成抗菌剤に高い感受性を示した。しかしながら、9月以後に業者の飼育池で再びせつそう病の発生が認められ始め、これらの魚病から分離した菌株については、いずれもサルファ剤に対して耐性を示し、抗生物質にも一途耐性を示すものが見られた。

これらの業者では、以前のサルファ剤の不適正使用の疑いがあり、耐性菌の出現との関係が推定される。

表 10 *A. salmonicida* の薬剤感受性試験判定結果

菌株	薬剤	スロア モノメトキシ	スロア モノメトキシ	スロア モノメトキシ	スロア インメゾール	クロラム フェニコール	ストレプト マイシン	ピロシド酸	ナリジク酸	テトラ サイクリン	オキシ テトラサイクリン	フラジリドン
T0-7601		≡ (33)	≡ (33)	≡ (33)	≡ (35)	≡ (30)	≡ (20)	≡ (40)	≡ (53)	≡ (35)	≡ (35)	≡ (17)
7602		≡ (27)	≡ (34)	≡ (34)	≡ (34)	≡ (29)	≡ (23)	≡ (33)	≡ (41)	≡ (44)	≡ (56)	≡ (19)
7603		≡ (32)	≡ (30)	≡ (30)	≡ (30)	≡ (38)	≡ (19)	≡ (37)	≡ (42)	≡ (35)	≡ (38)	≡ (14)
7604		≡ (29)	≡ (26)	≡ (26)	≡ (32)	≡ (24)	≡ (19)	≡ (31)	≡ (43)	≡ (49)	≡ (59)	≡ (18)
7605		≡ (28)	≡ (27)	≡ (27)	≡ (27)	NT	≡ (19)	≡ (33)	≡ (39)	≡ (27)	≡ (33)	≡ (20)
7606		≡ (34)	≡ (29)	≡ (29)	≡ (30)	≡ (26)	≡ (21)	≡ (35)	≡ (44)	≡ (36)	≡ (28)	≡ (16)
7608		≡ (42)	≡ (36)	≡ (36)	≡ (39)	≡ (34)	≡ (22)	≡ (40)	≡ (46)	≡ (31)	≡ (32)	≡ (16)
7609		≡ (32)	≡ (31)	≡ (31)	≡ (27)	≡ (33)	≡ (22)	≡ (39)	≡ (46)	NT	NT	≡ (17)
7610		≡ (34)	≡ (35)	≡ (35)	≡ (30)	≡ (38)	≡ (24)	≡ (35)	≡ (45)	NT	NT	≡ (16)
7611		≡ (35)	≡ (35)	≡ (35)	≡ (32)	≡ (33)	≡ (22)	≡ (37)	≡ (47)	≡ (53)	≡ (51)	≡ (19)
7612		≡ (35)	≡ (28)	≡ (28)	≡ (20)	NT	≡ (22)	≡ (37)	≡ (45)	≡ (49)	≡ (50)	≡ (16)
7614		≡ (31)	≡ (31)	≡ (31)	≡ (36)	NT	NT	≡ (40)	≡ (46)	≡ (30)	≡ (26)	≡ (17)
7616		≡ (35)	≡ (32)	≡ (32)	≡ (35)	≡ (39)	≡ (18)	≡ (39)	≡ (47)	≡ (52)	≡ (60)	≡ (16)
7618		≡ (36)	≡ (31)	≡ (31)	≡ (34)	NT	≡ (21)	≡ (37)	≡ (51)	NT	NT	≡ (16)
7621		≡ (34)	≡ (34)	≡ (34)	≡ (34)	≡ (32)	≡ (19)	≡ (40)	≡ (45)	NT	NT	≡ (16)
7622		—	—	—	—	≡ (41)	≡ (26)	≡ (35)	≡ (44)	≡ (26)	≡ (46)	≡ (15)
7623		—	—	—	—	≡ (45)	≡ (23)	≡ (35)	≡ (45)	≡ (42)	≡ (29)	≡ (19)
7624		—	—	—	—	≡ (44)	≡ (24)	≡ (35)	≡ (47)	≡ (47)	≡ (43)	≡ (19)
7625		—	—	—	—	≡ (47)	≡ (25)	NT	≡ (45)	≡ (36)	≡ (38)	≡ (19)
7626		—	—	—	—	≡ (31)	≡ (20)	≡ (30)	≡ (43)	≡ (37)	≡ (38)	≡ (20)
7627		—	—	—	—	≡ (36)	≡ (28)	≡ (45)	≡ (41)	≡ (39)	≡ (39)	≡ (18)
7628		—	—	—	—	≡ (39)	≡ (22)	≡ (32)	≡ (37)	≡ (44)	≡ (44)	≡ (15)

() 内は阻止円直径 mm

4. トリブリッセン (A-TP) 投与試験

トリメトプリム (2・4 - di amino - 5 - (3・4・5 trimethoxybenzyl pyrimidine)) とスルファダイアジン 1 : 5 の割合であるトリブリッセンによる治療試験をおこなった。

〔方法〕

- 1) 供試魚 奥多摩分場飼育池の A 池 50,000 尾、B 池 37,000 尾の計 87,000 尾および K 養魚場の C 池 80,000 尾、D 池 15,000 尾の計 95,000 尾について治療試験をおこなった。

供試魚はヤマメ 0 年魚で各池ともに病魚は体側に小豆大の膨腫患部あるいは鰭基部に出血患部が認められ、腎臓から菌の分離を行ったところ *Aeromonas salmonicida* が分離された。

魚体の大きさは、分場産が 6.5 ~ 8.7 g、業者池産が 2.5 ~ 4.5 g であった。

- 2) 供試薬剤と投与量

トリブリッセンを製剤で 1 日量として魚体重 (kg) あたり 30mg の割合で投与した。

- 3) 投与方法

投与方法はトリブリッセンをフィードオイル (飼料の外割 10% 量) に懸濁後市販飼料に混合し、給飼量は魚体重の 1.5% とした。

- 4) 試験期間 奥多摩分場 A 池 昭和 51 年 6 月 14 日 ~ 24 日
B 池 6 月 22 日 ~ 7 月 5 日
K 業者 C・D 池 6 月 15 日 ~ 7 月 4 日

- 5) 試験期間中の水温

分場池 13.4 ~ 16.2 °C
K 業者池 12 ~ 14 °C

〔結果と考察〕

各池の日間への死魚数の推移を図 9、10 に示した。

A 池では、試験開始時のへの死魚数は 300 尾以上であったが、投薬 2 日目から、への死魚数は急激に減少し、5 日目には 60 尾になり、実験終了時には 10 尾程度となった。B 池においても、斃死魚が増加する傾向がみられた時点で投薬をおこない、A 池と同様の減少傾向が認められた。C、D 池については、病気がかなり進行した状態で、投薬を開始したためか投薬開始 3 日目まで、斃死魚数の顕著な減少は認められなかったが、4 日目以降急

激に減少し、実験終了時には $\frac{1}{10} \sim \frac{1}{15}$ 程度の斃死魚数となった。

なおいずれの場合も、薬剤の添加に伴なり摂餌の低下は認められなかった。

本実験の斃死魚数の推移を比較すると、治療効果は、病気の早期発見による早期投与が効果的で、投薬回数は5～6回でよいように考えられる。

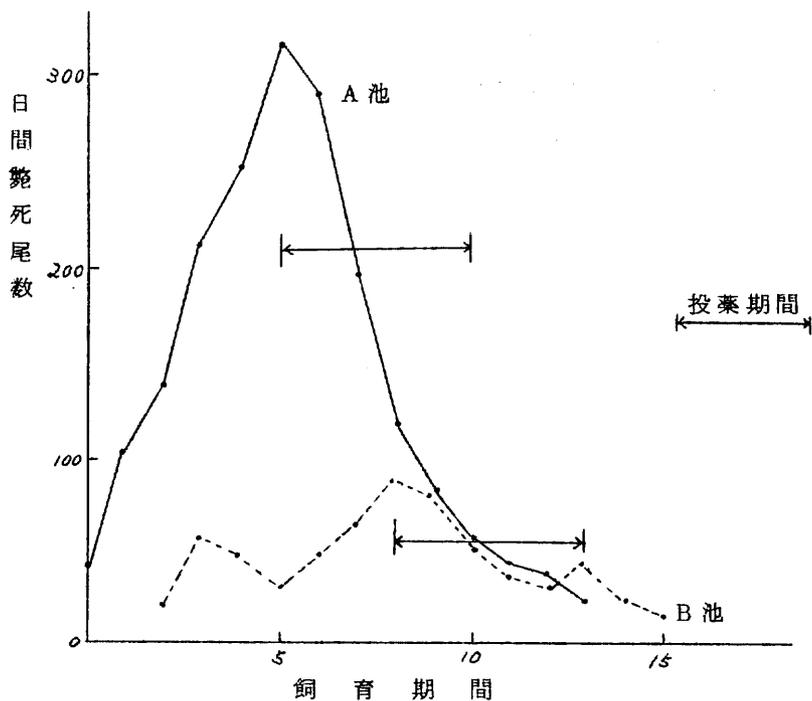


図9 奥多摩分場における日間斃死魚数の推移

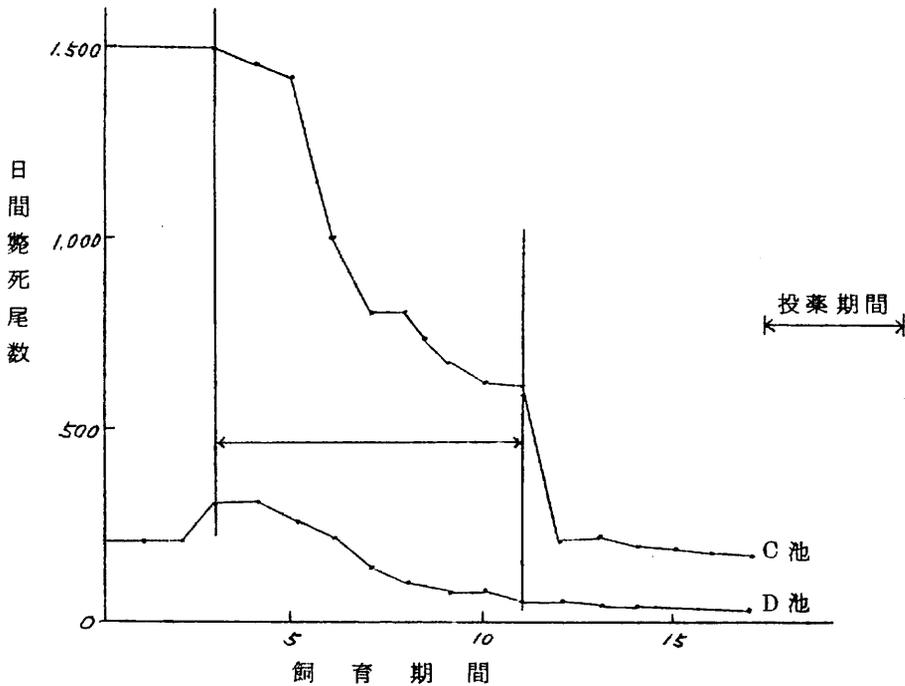


図 10 K養魚における日間斃死魚数の推移

5. セッソウ病診断への蛍光抗体法の応用

蛍光抗体法(以下FA法と言う)によるセッソウ病の診断は培養法に較べ、迅速であること、および病魚からの直接塗抹標本でも、非特異反応がみられない事を報告した(昭和50年度報告)が、本年は更に両法の比較の追試を行なうとともに、本法の診断が迅速である事は、現場の適応性に富んでいることに着眼し、現場で活用する場合に生じる問題点の1つとして抗原の安定性と塗抹経過時間について検討した。

1) FA法と培養法との比較(追試)

(材料ならびに方法)

(1) 抗 *Aeromonas salmonicida* 蛍光抗体

宮崎大学北尾忠利教授の御好意により、分与された凍結保存原液を使用時に融解し、PBS (PH 7.2) で40倍に希釈し、小試験管に分注後冷暗所(4℃)にて保存したものをを用いた。

(2) 供試魚

せつそう病が疑われるヤマメ斃死魚14尾を用いた。なお内訳は当场試験池より7月4日3尾、8月10日3尾の6尾、都下F養魚場より6月28日8尾の計14尾である。

(3) 方法

供試魚の腎臓より白金耳にて無蛍光スライドグラスに塗抹し、同時に普通寒天培地にて48時間培養した。蛍光抗体染色は前年と同様直接法によった。なお、FA法の検鏡は、ニコンFT型蛍光顕微鏡を用いた。

[結果と考察]

結果はまとめて表11に示した。14検体中12検体についてはFA法、培養法とも結果が一致したが、2検体についてはFA法で(+)、培養法で(-)を示した。

なお、診断までの時間はFA法が約2時間、培養法は48時間である。

今回の結果でもFA法と培養法との結果は良く一致しており、しかも診断に要する時間はFA法を用いた場合、培養法の数十分の一で済み、蛍光抗体液と蛍光顕微鏡を用意すれば極めて簡易に検査を行なえることから現場での早期診断法としての検討を進める必要があるとともに、培養法で検出されない場合でもFA法では検出されることから、診断技法として所要時間のみならず精度面でもすぐれているといえよう。

2) 抗原の安定性と塗抹経過時間について

(材料ならびに方法)

(1) 抗*Aeromonas salmonicida* 蛍光抗体

実験1に同じ

(2) 供試菌株 To-7603 (表9参照)

(3) 方法

普通寒天培地にて培養した*Aeromonas salmonicida* (To-7603) を滅菌生理食塩水で希釈(濃度は、寒天平板を使い希釈法により算定したところ、 2.52×10^{10} 個/mlであった) し使用した。塗抹にあたっては、あらかじめガラス鉛筆で丸印を書いた無蛍光スライドグラスを用意し、その丸印内に均一になるように注意した。

試験区の設定および検鏡時間(保存時間-アセトン固定後の放置時間)は表12に示すとおりである。なお、対照として塗抹後直ちに染色をおこなった区を作成し検鏡した。検鏡には「ニコンF型検鏡」を用い、FA法の手順は直接法によった。

なお観察は、検鏡と同時に写真撮影（ネオパンSS ASA100、400倍、開放3分間露光）をし、客観的判定の一助とした。

表11 FA培養法（48時間）による *A. salmonicida* の検出結果

魚種	収集場所 年 月 日	体重 (g)	肉眼的所見	FAの結果	培養法(48時間) の結果
ヤマメ	奥多摩分場 1976.7.4.	119	胸鰭、腹鰭基部に水カビ、尾柄部びらん	-	-
同上	同上	201	頭部、臀鰭基部、尾柄部に水カビ	-	-
同上	同上	227	下顎部、腹鰭、臀鰭周辺に水カビ	-	-
同上	奥多摩分場 1976.8.10	169	尾柄上部に水カビ、腹鰭基部より出血、体表面にチョウ寄生	+	+
同上	同上	295	胸鰭に水カビ、体表面にチョウ寄生	+	-
同上	同上	356	外傷なし、体表面にチョウ寄生	-	-
同上	二見養魚場 1976.6.28		頭部、尾柄部に水カビ、内臓異常なし	+	+
同上	同上		胸鰭基部に水カビ、内臓異常なし	+	+
同上	同上	平均体重	臀鰭基部にセソウ様患部あり	+	+
同上	同上	6.5	外観的に異常なし、胃袋、腸管に水様物、体表面にチョウ寄生	+	+
同上	同上		背鰭欠損	+	+
同上	同上		外観的には異常なし	+	+
同上	同上		頭部、尾柄部に水カビ	-	-
同上	同上		胸鰭基部に出血、鰓蓋後部にセソウ様患部あり	+	-

表12 塗抹後スライドガラスの保存条件

試験区 (保存温度)	保存時間				
	6 ^h	12 ^h	24 ^h	72 ^h	168 ^h
1 (4℃)	冷蔵庫に保存 (日立 477 K 型)				
2 (20℃)	インキュベーターに保存 (SANYO、SRK-100M型)				
3 (30℃)	" (")				

[結果と考察]

表 1 3 検 鏡 結 果

試験区 (保存温度)	保存時間	6 h	12 h	24 h	72 h	168 h
1 (4 ℃)		+	+	+	+	+
2 (20 ℃)		+	+	+	+	+
3 (30 ℃)		+	+	+	+	+

(+) 判定可能

検鏡結果は表 1 3 に示すとおり、168 時間 (1 週間) でも判定をくだすことができた。蛍光の強さは 4 ℃、20 ℃、30 ℃とも保存時間 72 時間まではほとんど変わらなかったが、168 時間になると明らかに衰える結果となった。

このように、保存時間 72 時間まではいずれの保存温度でも、蛍光の強さはほとんど変わらないので、現場での作業としては病魚からスライドグラスへ塗抹しアセトン固定を行えばその後の処理は試験場へ持ち帰ってからでも可能である。また、その際の保存温度も 4 ℃でなければならないという必要性もないと考えられる。ただし、今回の実験では保存期間中の温度は常に一定に保たれており、温度変化はほとんど無いものと考えられる。しかし、野外での持ち運びの際には温度変化は十分考えられることから、できるだけ断熱材等を用いた、しかも密閉可能な容器で運搬するのが望ましいと考えられる。

今後更に、蛍光消滅時間、菌濃度と蛍光の強さ等、将来検討すべき事項が多いが、今回の試験により現場適用への 1 つの目安を得ることができた。

6. 要 約

- 1) 経口ワクチン 2 1 回投与区に 1 回および 2 回のブースター・ワクチンを接種したところ、遅速効果が認められるようであった。
- 2) 対照区に比べ、経皮ワクチン接種区の方がせつそう病による斃死率が低く、ワクチンの効果が認められた。
- 3) 経皮ワクチン試験では、稚魚期における経口ワクチン投与区でしかもせつそう病経験区が良い結果を得た。このことは、稚魚から親魚までを通してのワクチンの計画的接種法を考える上で検討すべき問題である。
- 4) 経皮ワクチン試験供試魚では、ワクチン接種時に保菌の疑われる個体のみられた。

- 5) 薬剤感受性試験結果では一部業者池よりの分離株でサルファ剤耐性がみられたが、大部分は感受性菌であった。
- 6) トリブリンによる治療は病気の早期発見、早期投与、および5～6回の投与回数が効果的である。
- 7) 蛍光抗体法の作業を分解すると、現場でアセトン固定をおこなえば4℃～30℃の温度範囲では72時間後まで診断が可能であった。

Ⅳ 都内養殖池に発生した疾病について

昭和51年度に奥多摩分場および都下の養殖池に発生した魚病の概要を表14に示す。

本年度の魚病の発生状況は下記のとおりである。

- 1) 本年度はIHNの発生は認められず、IPNについては当該に関するかぎりでは被害が若干減少した。
- 2) 稚魚期における原虫類寄生および細菌性鰓病の発生が早くなり、被害も増大する傾向がみられる。
- 3) 本年度は例年に比べせつそう病による被害が大きかった。
- 4) 春と秋にニジマス0、1年魚で2件のイクチオフォヌス病の発生がみられ、大きな被害を引き起こした。なお、本病は都下ではじめて発生したものである。
- 5) 水カビ病は周年観察され、在来マス類では被害は減少したが採卵後のニジマス親魚の被害は増加する傾向がみられる。

表 1 4 昭和 5 1 年都内養殖池に発生した疾病について

病 名	発病時期	魚 種	年 令	水 温	体 重	処 置
伝染性臓器壊死 (IPN)	4 ~ 6 月	ニジマス	0 年魚	10 ~ 17℃	0.3 ~ 2g	
細菌性鰓病	2 ~ 4 月	ヤマメ ニジマス	0 年魚	5 ~ 17℃	0.2 ~ 5g	ニフルピリノール 0.3 mmp 1 ~ 2hr 薬浴
せっせう病	3 ~ 10 月	ニジマス 在来マス	0 年魚 0.1 年魚	7 ~ 18℃	10 ~ 500g	サルファ剤 オキシリン酸投与
ビブリオオ病	4 ~ 9 月	ア	ユ	14 ~ 16℃	0.5 ~ 40g	オキシリン酸
カラムナリム病	6 月	ウナギ	ギ	20 ~ 21℃	40g 前後	フラン剤薬浴
キロドネラ病	2 ~ 5 月	ヤマメ ニジマス	0 年魚	6 ~ 15℃	0.5 ~ 3g	NaCl 浸漬法
白点病	1 ~ 7 月	ヤマメ ニジマス	0 年魚	10 ~ 18℃	0.5 ~ 4g	"
コステイア病	2 ~ 4 月	ヤマメ ニジマス	0 年魚	10 ~ 14℃	0.7 ~ 1.5g	"
イクサオファオスス病	3 ~ 11 月	ニジマス	0.1 年魚	11 ~ 19℃	40 ~ 200g	殺処 分
水カビ病	周年	ニジマス 在来マス ア	ユ	4 ~ 18℃	60 ~ 3,000g	マラカイトグリーン

昭和51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(52)401
刊行物番号(K)76

昭和52年8月1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)600-2873

印刷所 株式会社 東 邦