

東水試出版物通刊 No.272

調査研究要報 No.129

指定調査研究総合助成事業

(昭和49~51年の三ヵ年のとりまとめ)

# 病害研究報告書

(温水性淡水魚の穴あき病)

昭和52年3月

東京都水産試験場

# 指定調査研究総合助成事業病害研究

( 温水性淡水魚の穴あき病 )

## 目 次

I 緒 言 .....	1
II 病魚の発生状況 .....	1
1. 東京都水試および都内養殖池における穴あき病の発生について(49~51年度) .....	1
2. 多摩川における皮膚潰瘍性疾病の発生について(50年度) .....	2
3. 皇居外濠における皮膚潰瘍性疾病の発生について(50年度) .....	4
4. 問題点と疑問点 .....	5
III 疾病の特徴 .....	5
1. 皮膚患部の位置について(49~50年度) .....	5
2. 皮膚患部の進行および治癒状況の観察(49年度) .....	7
3. 内臓の病変(51年度) .....	8
4. 病理組織像 .....	10
5. 血液性状(50~51年度) .....	12
6. 温度と自然治癒との関係(50年度) .....	13
7. 発生時期(49~51年度) .....	14
8. 問題点と疑問点 .....	14
IV 原因の追求 .....	15
1. 病魚を用いた感染実験 1.(伝染性の確認)(49年度) .....	15
2. 病魚を用いた感染実験 2.(確実に自然発病魚に近い感染方法の追求)(51年度) .....	15
3. 病魚からの細菌の分離 1. 皮膚患部からの細菌の分離と菌の生化学的性状ならびに復元 実験(49年度) .....	23
4. 病魚からの細菌の分離 2. 皮膚患部、血液、腎臓からの細菌の分離と菌の生化学的性状 ならびに復元実験(50年度) .....	23
5. 病魚からの細菌の分離 3. 皮膚患部から PPLO 培地、Yolk 培地を用いての細菌の分離 と復元実験(51年度) .....	24
6. ウイルスの可能性の検討(49年度) .....	27
7. ウイルスと <i>Aeromonas</i> 菌の可能性の検討(51年度) .....	28

8.	養魚池水中の運動性 <i>Aeromonas</i> 菌とその病原性 ( 51年度 )	30
9.	チヨウの関与度の検討 ( 51年度 )	32
10.	問題点と疑問点	32
V	予防法の追求	32
1.	ニフルブラジンの薬浴による予防 ( 50年度 )	32
2.	ニフルスチレン酸ソーダおよびニフルブラジンの薬浴による予防 ( 51年度 )	33
3.	ビタミンCと磷酸塩の投与による予防のための体質改善 ( 51年度 )	37
4.	問題点と疑問点	38
VI	治療法の追求	38
1.	薬浴による治療 ( 49～50年度 )	38
2.	経口投薬による治療 ( 49～51年度 )	38
3.	注射による治療 ( 49～50年度 )	39
4.	塗付による治療 ( 51年度 )	39
5.	問題点と疑問点	39

◎ 研究実施期間 : 東京都水産試験場温水魚研究部

◎ 研究担当者 : 主任研究員 高橋 耿之介

主 事 中村 多恵子

主 事 森 真朗

## I 緒 言

1971年の春から温水性の淡水魚、主としてキンギョ・フナ・イロゴイ等にいままでない新しい疾病がみられるようになった。それは潰瘍性の欠損部が魚の体表に生ずるもので、だれとはなしに「穴あき病」と呼ぶようになり、現在はこの名前が通用するようになってしまっている。穴あき病という名前は、外観の特徴に対してつけられた名前であるため、その定義づけは非常にむずかしく、どのようなものを穴あき病としたらよいか混乱を起している。特に1971～2年は病患部に真菌の寄生する真菌性肉芽腫症が、1971～2年、1974年には*Epistylis*の感染症がみられ、肉眼観察による外部症状からはそれらと穴あき病との明確な区別がされなかったケースも多々あったと考えられる。ところが、真菌症も*Epistylis*も1973年以降はほとんどみられなくなったことから、これらは今になってみるとそういうケースの疾病があったということになるが、これらをたまたま同時に出現した類似の別の疾病として扱ったほうがよいのか、または穴あき病との混合感染もしくは穴あき病から二次的に移行していったものとして考えたほうがよいのかは全くわからない。しかし、1971年からいわゆる穴あき病と称される疾病は毎年存在して流行しており、穴あき病が真菌性肉芽腫症や*Epistylis*症から移行したものでないことは確実に考えられる。

以上のような見解で穴あき病について調査研究を行ってきた。我々が取扱ってきた穴あき病の特徴は潰瘍性の欠損が皮膚にかぎって生ずる疾病で、患部にごくかるい充血またはうっ血および出血ともない、直接この疾病による死亡率のひくいもので、おそらく原因は外因性的のもので伝染しやすいと考えられる疾病である。

## II 病魚の発生状況

### 1. 水試および都内養殖地における穴あき病の発生について(49～51年度)

キンギョの穴あき病は1971年にはじめて病魚がみられて以来1972、1973年と毎年被害はひどくなったが、1974年はやや小康状態になった。しかし1975年にはその発生量は一段と大きくなり、養殖業者のなかには親キンギョの発病のため採卵が困難になったものも出るありさまであった。それが1976年になると病魚の発生は大巾に減少し、穴あき病出現以来最も被害は少なかったと思われる。ところが、多くの業者がすでに各種の抗菌剤を使用して予防措置をこうじるようになっており、更にそういった薬剤を使用しなかった場合には50%以上の高率で発病した例もある。

水試におけるワキン1年魚の1973年以降の発病状況を表1に示した。業者と同様に1975年が最も被害がひどく、1976年には発病率は大巾に低下している。しかしこの場合も1975年の秋よりスルフィソール等を経口的に投与して予防措置をこうじており、やはりその効果もあると思わ

れる。

表1 ワキンおよびジュブンキン1年魚の発病状況

調査月 (年令)	調査年	1973 調査尾数-病魚尾数 (発病率%)	1974 調査尾数-病魚尾数 (発病率%)	1975 調査尾数-病魚尾数 (発病率%)	1976 調査尾数-病魚尾数 (発病率%)
3 (1.9)			4333-76 (1.7)	4209-710 (16.9)	2069-33 (1.6)
7 (1.3)		4293-400 (9.3)	4522-511 (11.3)	2339-1698 (72.6)	2000-180 (9.0)
10 (1.5)				2527-45 (1.8)	

## 2. 多摩川における皮膚潰瘍性疾病の発生について(50年度)

1973年の秋期から1974年の冬期、春期、秋期の4回にわけて多摩川の魚類調査を行ったところ、穴あき病と思われる病魚が捕獲された。罹病率は低いものであるが、天然水域における調査例はあまりないのでとりまとめた。

調査地点は上流は日原川合流点から下流は大師橋までの25地点で、そのうち関戸、大丸堰上、大丸堰下、多摩川原橋、二ヶ領、砧、赤岩、丸子堰上、丸子堰下、ガス橋の10ヶ所に病魚がみられた。調査時期別の魚種別の捕獲尾数と病魚数を表2に示した。内湾性の魚を除いて34種(亜種を含む)の魚が捕獲され、9種の魚67尾に潰瘍患部を持った病魚がみられた。ほとんどの魚種の病魚の出現数は少なかったが、フナ類は若干多かった。フナ類のなかではゲンゴロウフナが最も出現率が高く、次いでギンブナ、キンブナの順になっている。これらの病魚が養魚池等でみられる穴あき病と同じ疾病であるかどうかは、いままでに観察されていない魚種の病魚が多いので不明であるが、少なくともフナ類の病魚は養魚池等でいままでに観察した多くのフナ類の穴あき病病魚と外観は同じと思われた。また、病魚のうちキンブナ1尾、ギンブナ13尾、キンギョ1尾、フナ7尾、モツゴ3尾の計25尾について組織標本を作製して真菌性肉芽腫症のものがあるかどうかを調べた。その結果真菌性肉芽腫と断定されるものはなかった。そのほか病魚の出現域は月平均水温が5℃を越える範囲にみられ、更にその範囲のなかでは *Ammonia-N* が 2.5 ppm 以上の地域に多くみられた。

表 2 多摩川における皮膚潰瘍性病魚の出現状況

	1973年 10～12月		1974年 2～3月		1974年 5～6月		1974年 9～11月		計	
	調査尾数 — 病魚尾数	出現率 (%)	調査尾数 — 病魚尾数	出現率 (%)	調査尾数 — 病魚尾数	出現率 (%)	調査尾数 — 病魚尾数	出現率 (%)	調査尾数 — 病魚尾数	出現率 (%)
キンブナ	690-0		717-5	0.7	326-0		394-14	3.6	2127-19	0.9
ギンブナ	155-0		179-0		163-8	4.9	134-11	8.2	631-19	3.0
ゲンゴロウブナ	52-0		87-3	3.4	25-1	4.0	30-5	16.7	194-9	4.6
キンギョ	0-0		0-0		1-1		1-1		2-2	100.0
フナ※	30-0		498-3	0.6	95-2	2.1	48-0		671-5	0.7
フナ類計	927-0		1481-11	0.7	610-12	2.0	607-31	5.1	3625-54	1.5
コイ	19-0		43-1	2.3	36-0		10-0		108-1	0.9
モッゴ	6656-0		11833-0		4491-7	0.2	3498-2	0.1	26478-9	0.0
タモロコ	52-1	1.9	160-0		3-0		58-0		273-1	0.4
チヂ	0-0		0-0		1-1		8-0		9-1	11.1
オイカワ	582-0		6163-1	0.0	338-0		9371-0		16454-1	0.0

※ 分類できなかつたもの

### 3. 皇居外濠における皮膚潰瘍性疾病の発生について（50年度）

1975年9月に皇居外濠の魚類相を調査したところ、穴あき病と思われる潰瘍を皮膚に有する魚を捕獲できた。多摩川同様天然水域における貴重な例と思われたのでとりまとめた。なおこの調査での捕獲魚は捕獲後直ちに計測し、再び放流しているので患部の組織学的追求や真菌性肉芽腫症であるかどうかの確認はできていない。

中・大型魚として9種（亜種を含む）が捕獲され、うち6種の皮膚に潰瘍がみられた。そのようすは表3に示した。

表3 皇居外濠における皮膚潰瘍性病魚の出現状況

	総捕獲尾数	病魚尾数 (%)	治癒こん跡魚尾数 (%)	健康魚尾数 (%)
ハクレン	31	18 (58)	3 (10)	10 (32)
コイ	74	6 (8)	8 (11)	60 (71)
イロゴイ	29	4 (14)	0	25 (86)
ゲンゴロウブナ	171	54 (32)	57 (33)	60 (35)
ギンブナ	31	6 (19)	4 (13)	21 (68)
キンブナ	10	0	0	10 (100)
ナマズ	8	0	1 (13)	7 (87)
カムルチー	3	1 (33)	0	2 (67)
オオクチバス	20	0	1 (5)	19 (95)

表からわかるように最も病魚の出現率が高かったのはハクレンで次いでゲンゴロウブナであった。ハクレンに潰瘍性の疾病がみられた例はいままで知られていない。

ハクレンは経約3~4cmの浅く凹んだように筋肉の露出した潰瘍性の患部が形成されている場合と径約1cmの小さくてやや深く穿孔状に患部が形成されている二通りがみられ、ともにその外観はいわゆる穴あき病といわれているもののそれとは多少異なるように思われた。しかし、ゲンゴロウブナの患部はいままで養魚池等で穴あき病といわれているものと同じと思われた。ハクレンとイロゴイには治癒魚は少なかったが、コイ・ゲンゴロウブナは治癒魚と病魚はほぼ同数みられ、全体としては病魚の患部は治癒に向いつつあるものが多かった。なお、それらの治癒患部のほとんどはまだ新しく、今年度罹病したものが主であると判断された。

#### 4. 問題点と疑問点

- 1) 春に発生しやすいとみられているが、正確に自然水温との関係は調べられていない。
- 2) 発生が起りはじめた昭和46年から47年へかけての各地での発生状況、伝播の様子の把握がされていない。
- 3) 天然水域での把握が不十分である。
- 4) 穴あき病の定義、特徴、穴あき病であるとする診断の決め手がはっきりしていないため、発生状況を調べても全く無意味になってしまう可能性がある。
- 5) 養魚池では予防的に薬剤経口投与をはじめたため発生状況がわかりにくくなった。
- 6) 魚種が異なっても同じ疾病かどうかははっきりしていない。
- 7) 昭和46年以降になぜ発生するようになったか、納得のいく解答はまだない。

### III 疾病の特徴

#### 1. 皮膚患部の位置について(49~50年度)

穴あき病の皮膚患部は魚の体表上特定の位置はなく、どこにでも発生するようにみえる。しかし、もし皮膚患部の位置に特定のかたよりがあれば、内的または栄養障害的要因がからんでくる可能性がある。そこでワキン病魚を用い、鱗をのぞく体表上の患部の位置を調べてみた。

用いたワキン病魚は水試で1974年6、7月と1975年7月に自然発生した1年魚の病魚で調査尾数は1,007尾である。それらはすべて同一の池で発生したもので発病率は1974年は11.3%で1975年は72.6%であった。なお、病魚のなかから任意に30尾とりだし、*Epistylis*および真菌類の寄生をチェックしたが、それらの寄生は全くなかった。発病部位は図1のようにわけてチェックした。また、それらの各部位の面積比( $a$ )は表4のとおりである。

調査尾数1007尾のうち、2ヶ所以上の患部を持つものは463尾(46%)で、残り544尾(54%)は1ヶ所であった。各部位の患部の占める率( $b$ )を算出し、 $b/a \times 100 =$ 患部出現率(%)とし、表5に示した。表中の数字が100の場合は丁度その面積に匹敵した患部数が存在することになり、100より小さければ少なく、逆に大きければ患部は多いことになる。表からわかるように、患部は全身に全く均一に存在しているわけではなく、多少かたよりがみられる。特に頭は少なく、軀幹部の後部は多い。しかし、それらはそう極端なものではなく、背鱗部のみに患部の出現するアユのチョウチン病やコイのイノシトール欠乏症のようにはっきりした特異性はないようにみえる。従って、本病の主因は内的または栄養障害的なものではないと考えられる。



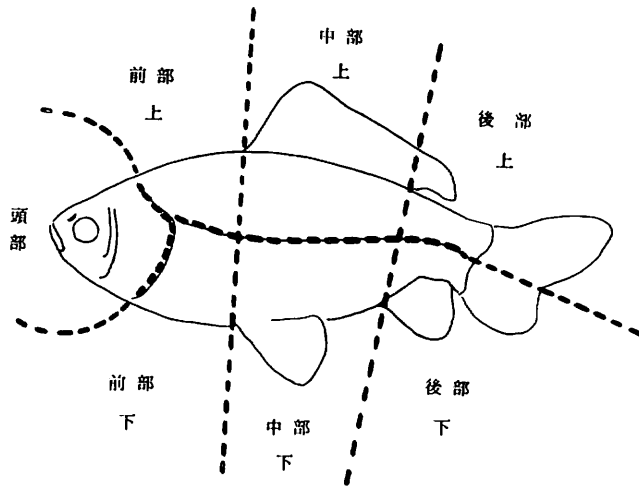


図 1 チェック部位のわけかた

表 4 各部位面積の全体表面積（鱗を除く）に対する比（％）

	頭部	軀 幹 部			
		前部	中部	後部	小計
上	17	13	21	6	40
下		15	22	6	43

表 5 各部位の患部の出現率（％）

		頭部	軀 幹 部			
			前部	中部	後部	小計
右側	上	30	109	103	152	113
	下		80	101	262	116
左側	上	36	79	107	162	106
	下		97	104	233	120
全身	上	33	95	105	157	110
	下		88	102	248	118
全身		33	91	103	203	114

## 2. 皮膚患部の進行および治癒状況の観察（49年度）

1971年よりみられるようになった穴あき病は1976年になっても相変わらず発生している。しかしながら穴あき病の被害があったといわれているもののなかには穴あき病とはいえないものもある。また真菌性肉芽腫や *Epistylis* 症も外観的には類似の様相を示す時期もあり混同しやすい。このような類似の疾病と穴あき病とを区別するために、また復元実験等を行うためにも穴あき病の症状つまり発生の初期から重症にいたるまでの過程のパターンや、逆に治癒していく時のパターンを正確に知っておく必要がある。そこで東京都水試での自然発病魚25尾についてその症状の観察を行った。

## (1) 病気の進行

肉眼観察で穴あき病に感染発病したとみられる時点から、筋肉が露出するまでの日数（水温約20℃）は10～15日であった。進行の過程は次の7段階にわけることができた。

① 最初に注目される外観上の変化は表皮上の点状の白濁粘質物の出現である。その出現位置は鱗の周縁部附近であることが多い。健康魚を病魚と一緒にした場合、ほぼ2日以内にこの変化が認められることが多い。

② ほぼ鱗一枚の範囲で表皮がやや白濁し、その周囲に粘液の異常分泌がみられるようになる。同時に主としてその鱗の外縁部附近に充血またはうっ血がみられる。一見表皮は鱗の後縁にそって白く肥厚したようにみえるが、異常はその鱗全体の範囲に起っている。なお、このときの白濁はあまりにごったかんじはせず、半透明がかったきれいな感じのものである。

③ 充血またはうっ血は鱗一枚の範囲にひろがり、鱗はやや浮き上って見えることがある。隣接する鱗上の表皮も白濁するようになる。

④ 鱗上部の真皮は壊死白濁する。その上の表皮はすでに失われていると考えられる。鱗の裏側のグアニンと色素が消失しはじめる。

⑤ 鱗の上部の壊死した真皮が剝離し鱗が露出する。その鱗の裏側のグアニンと色素の全くの消失により鱗は透明化し、消失したようにみえることがある。透明化した鱗下部の真皮も壊死白濁し、崩壊しはじめる。

⑥ 鱗が脱落し、壊死した真皮が露出する。脱落した鱗およびその隣接していた鱗の一部に腐蝕がおこっている。

⑦ 壊死した真皮が剝離し、筋肉が露出する。鱗の脱落と同時に真皮も剝離してしまう場合や鱗が脱落するまえに下部の真皮が崩壊して、透明な鱗を透して筋肉がみえるようになる場合もある。

一般に露出した筋肉は赤く充血しており、そのまわりに白く壊死した真皮があり、更にその外側に充血した真皮がみられ、その表面またはその周囲に白濁肥厚した表皮が存在するようになる。

患部は除々に拡大していく。それは外観的にはまず表皮の壊死が広がる。しかし、ほとんどの場合同時に真皮層もおかされており、真皮の充血のため、表皮の壊死して白濁した部分は非常に桃色がかって見える。これは始まりの時より顕著である。まわりの表皮が白濁してから5～6日以内にその部分の真皮・筋肉が崩壊して大きくひろがっていく。また、患部と隣接した鱗の周囲組織は逐次冒されていくが、始まりのときのようにそれぞれの鱗一枚の範囲全体にわたって病変が起ることは少なく、その一部分から病変がすすんでいく。従って、鱗周囲組織の約半分のみが病変を起している時期もみられるため、グアニンと色素の消失および鱗の腐蝕は始まりのときよりわかりやすい。

これらの病変部形成組織は初期・中期・終期と三段階にわけることが出来る。初期というのはほぼ

鱗一枚の範囲の表皮の白濁壊死と鱗の後縁部附近のかるい充血またはうっ血までで上述の①－②にあたる。中期は真皮の壊死鱗の脱落までで筋肉はまだ露出しておらず、③－⑥にあたる。終期は筋肉が露出してしまったもので⑦以降になる。

## (2) 病気の治癒

飼育水温を28℃にして自然治癒させて観察した。治癒の過程は次のとおりである。

⑧ 潰瘍周囲にやや白濁の範囲が急激にひろがる。この白濁はやや半透明のきれいなもので、充血またはうっ血をともなって、きれいな桃色になることが多い。

⑨ 表皮が白濁を起している部分までは潰瘍は拡大する。この進行は3～4日かかる。

⑩ 真皮の壊死・脱落の進行も止まり、一般に患部の尾柄に近い側から露出している筋肉の充血が少しずつ消えていく。

⑪ すでに壊死している筋肉組織は少しずつ剝離して、桃色の光沢を持った筋肉が出現し、その表面にグアニンが形成される（尾柄に近い側から）。

⑫ 筋肉の充血またはうっ血はほとんど消失し、グアニンの形成域はさらに拡がり、一部には真皮が形成されはじめ白くみえる。

⑬ 筋肉の充血は全くみられなくなり、グアニンのほかにオレンジ色の色素細胞も形成されるようになる。

⑭ 患部が大きかった場合には鱗は再生されないが、小さい場合は健康部より大型の鱗が不規則に形成される。

以上のようにして疾病は治癒の経過をたどるが、進行のときと同じく個体差や条件の相違によって遅速があり、⑧の治癒のきざしがみえてから⑬までは10～20日を要し、更に鱗の再生が始まってくるのは20日以上たってからである。また、すでに述べたように、患部の回復はほとんどの場合が体の後方側より始まって徐々に前方へ進んでいく。後部に表皮の再生が始まっても、前部はまだ病変が進行していることも珍しくなく、後部と前部では患部の修復に一週間以上の差がみられることが多い。これも穴あき病の特徴の一つといえる。

## 3. 内臓の病変（51年度）

若干の病魚について内臓の肉眼的観察を行った。後述の組織の項でもふれるように、健康魚と思われるキンギョでも組織学的にはかなりの病変部を有している。従って穴あき病の特徴としてのパターンをつかむには沢山の病魚および健康魚をチェックしてみなければ結論はだせないと思われる。

調査病魚は表6のとおりである。チェックした内臓諸器官は消化管、肝臓、腎臓、心臓、脾臓、甲状腺の6つとした。各組織は肉眼観察後ブアン液により固定した。

表 6 病魚の内臓所見

調査年月	入手先	供試魚			解剖所見
		魚種	年令	尾数	
50年 7月	水試	ワキン病魚	1	21	顕著な異常なし
同上	同上	ワキン健康魚	1	10	同上
51年 6月	茨城	リュウキン病魚	1	1	同上
同上	千葉	オランダバンガン病魚	1	1	同上
51年 7月	水試	ワキン病魚	1	10	尿管白濁肥大3尾
同上	同上	ワキン健康魚	1	10	尿管白濁肥大2尾
51年11月	同上	ワキン健康魚	0	30	尿管白濁肥大6尾、腎腫大症1尾、肝臓やや肥大1尾、甲状腺やや肥大7尾
同上	同上	ワキン治療魚	1	4	肝臓萎縮・腹水貯溜1尾、肝臓充血・尿管肥大1尾
51年 6月	同上	ゲンゴロウブナ病魚	不明	1	甲状腺やや肥大1尾
同上	同上	ギンブナ病魚	不明	4	顕著な異常なし
51年 4月	同上	イロゴイ病魚	1~2	5	甲状腺やや肥大1尾
51年 6月	埼玉	イロゴイ病魚	1~2	6	顕著な異常なし
51年 7月	奈良	イロゴイ病魚	1~2	4	同上
同上	新潟	イロゴイ病魚	1~2	3	同上

観察の結果は表6のとおりである。表からわかるように、腎腫大症の1種と思われる尿管の白濁肥大が目についたほかは顕著な変化はほとんどなかった。

このように穴あき病は内臓には肉眼的にわかる顕著な病変は起きないと思われるが、今回は調査尾数も少なく、また、皮膚患部の症状の程度、大きさ等によって魚の受ける負担も当然変わってくるであろうから、今後もキンギョを主体に更に続ける予定である。なお組織標本についてはまだ作業が終了していない。

#### 4. 病理組織像

50年度に血液性状を調べるために採血したワキン1年魚の外観上の健康魚10尾と病魚21尾の皮膚患部、鰓、腎臓及びその他の病魚患部の組織標本を作製した。それらのうち、腎臓の組織像を主体に報告する。

腎臓の組織の検鏡の結果を表7に示した。また比較のため昭和48年8月に腎腫大症の感染実験の対照に用いたワキン1年魚の腎臓の所見についても記載した。

表7 腎臓の病変(ワキン1年魚)

供 試 魚 調 査 尾 数 と 項 目		外 見 上 健 康 魚		病 魚 ( 5 0 年 7 月 )		
		4 8 年 8 月 尾 数 ( % )	5 0 年 7 月 尾 数 ( % )	計 尾 数 ( % )	中 期 ・ 終 期 の 進 行 患 部 の み 尾 数 ( % )	治 癒 患 部 あ る 尾 数 ( % )
調 査 尾 数		5 4	1 0	2 1	1 1	1 0
造 血 組 織	結 節 の あ る も の	3 4 ( 6 3 )	7 ( 7 0 )	1 5 ( 7 1 )	9 ( 8 2 )	6 ( 6 0 )
	小 細 胞 集 塊 の あ る も の ※		1 0 ( 1 0 0 )	2 1 ( 1 0 0 )	1 1 ( 1 0 0 )	1 0 ( 1 0 )
	蛋 白 液 の 貯 溜 の あ る も の		8 ( 8 0 )	1 7 ( 8 1 )	8 ( 7 3 )	9 ( 9 0 )
	血 管 拡 張 ま た は 出 血 の あ る も の		5 ( 5 0 )	1 3 ( 6 2 )	6 ( 6 4 )	7 ( 7 0 )
細 尿 管	扁 平 拡 大 が あ る も の	1 4 ( 2 6 )	0	3 ( 1 4 )	1 ( 9 )	2 ( 2 0 )
	細 胞 の わ ず か な 腫 張 の あ る も の		2 ( 2 0 )	2 ( 1 0 )	1 ( 9 )	1 ( 1 0 )
集 合 管 に 潰 瘍 が あ る も の		4 ( 7 )	0	2 ( 1 0 )	1 ( 9 )	1 ( 1 0 )
ボウマン囊のわずかな拡大のあるもの			0	3 ( 1 4 )	1 ( 9 )	2 ( 2 0 )
糸球体の内皮のわずかな肥厚のあるもの			2 ( 2 0 )	1 1 ( 5 2 )	3 ( 2 7 )	8 ( 8 0 )
腎腫大症の病変のあるもの		8 ( 1 5 )	0	3 ( 1 4 )	1 ( 9 )	2 ( 2 0 )
その他の胞子虫の寄生がみられるもの		4 ( 7 )	0	1 ( 5 )	0	1 ( 1 0 )

※ リボフスチン担細胞とセロイド担細胞と思われる。

表からわかるように、病魚、健康魚ともに造血組織にあきらかな病変がみられる。特に結節の形成と小細胞集塊の形成および蛋白液の貯溜は顕著である。結節以外の病変が穴あき病にもなっておきたものであるかどうかは、この表からははっきりしない。穴あき病とは関係ない別の疾病によるものとも考えられるし、穴あき病の病変の一つで外見上の健康魚は実際には皮膚に患部が形成されなかったにすぎないとも考えられる。しかしながら結節は48年8月の実験魚にも同じようにみいだされている。これは、同じく腎腫大症の0年の実験魚では約1,000尾の調査で約30%が結節を有しているのをみており、穴あき病とは無関係と考えられる。細尿管および糸球体等の変化は質的にも量的にもわずかで、排泄機能は健全であったといえる。健康魚と病魚との間ではっきり相違がみられるものは糸球体内皮のわずかな肥厚の有無で、病魚でのそれは健康魚のその2.6倍みられ、治癒患部のみられる病魚は更に多く、健康魚の4倍となっている。

このように腎臓は組織学的には病変が認められるが、それは対照にもみられており、穴あき病の特徴なのかどうかかわからないものが多い。従って、病理組織的な比較は健康魚の撰びかたが重要となり、更にはより多くの例を調べてから論ずる必要がある。

皮膚患部についてはまだ観察が充分ではないので簡単な記載にとどめておく。病患部にみられる大きな特徴はまず表皮組織の肥厚と粘液細胞の減少である。健全な部位の表皮の厚みは約50~100 $\mu$ であるのが患部のそれは200~350 $\mu$ にも達する。肉眼観察でみられる鱗の後縁の半透明の白濁というのは表皮の肥厚のためと思われる。粘液を有している粘液細胞は健康部の場合1~3層で、0.5mmに15~40個存在する。病患部ではほとんど一層となり、同じく0~12個ぐらいである。なお、すでに破壊された皮膚での表皮の回復は非常に早く、肉眼的にはまだ病変が進行中で真皮が大きく露出していると思われるような部位でも患部後方から表皮がおおいはじめてきているところが多い。

真皮も同じように肥厚して多くのセンイ芽細胞で占められ、血管の拡張とうっ血および出血、更に細胞しんじゅんが顕著にみられる。重なっている鱗間の真皮層の厚さは正常部位の場合約10~30 $\mu$ であるのが病患部は約70~200 $\mu$ となる。鱗に接して破骨細胞と思われる多核巨細胞が顕著にみられる。この破骨細胞は患部の大きさが鱗1~3枚程度で、まだ表皮が存在(初期)するときすでに顕著にみられる。病患部の鱗の腐蝕したような欠損は細菌によるものではなく、破骨細胞によるものと考えられる。この破骨細胞または骨組織の腐蝕したような欠損はキンギョの場合、患部の鱗にのみみられ、患部に最も近い肋骨にはみられていない。しかし、多摩川でとれたフナの病魚のなかに、患部に近い肋骨に腐蝕したような欠損が2例みられている。そのほか破骨細胞は *Aeromonas* 菌の接種により潰瘍を生じた場合にもわずかではあるがみられている。患部の発生のどの時点からこの破骨細胞が出現するのかはまだわかっておらず、破骨細胞がなにを意味しているのかも不明である。

患部の筋肉組織の変化はまちまちである。わずかな細胞しんじゅんのみである場合から、凝固壊死をおこし、筋センイが網状になっている場合もみられる。

筋肉の壊死は必ず病変した皮膚に近いほうが顕著となっている。

## 5. 血液性状

穴あき病の特徴の1つは、その患部の損傷の大きい割には死亡率の低いことである。当然病魚は浸透圧の調節が円滑にいかないと考えられ、血液性状が変化していると考えられる。またもし穴あき病として血液性状に特異的な変化のパターンがあれば、特徴の一つとして定義づけの一助となろうし、原因追求の一つの手がかりとなることもありえる。そこで水試で発生したワキン一年魚の病魚を用い血液性状について調べてみた。

使用した魚は50年度は外観上健康と思われるワキン1.3年魚10尾と1.5年魚10尾、0.8年魚10尾および穴あき病病魚1.3年魚50尾で、微量毛細管法によりヘマトクリットを、シアンメトモグロビン法によりヘモグロビン量を、更に血球算定盤により赤血球数を調べた。51年度は外観上健康と思われる1.3年魚10尾と穴あき病病魚10尾を用い、血清中のCa、Mg、 $PO_4-P$ 、アルカリ性フォスファターゼを分析した。分析はワコーキットを使用した。採血はともに尾柄部切断により行い、血清の分離は1時間以内に行い、さらに分析は2日以内に行なった。

その結果、ヘマトクリット、ヘモグロビン量、赤血球数ともに病魚のほうがばらつきが大きかったが、健康魚との間に有意の差はみられなかった。Ca、Mg、 $PO_4-P$ 、P、アルカリ性フォスファターゼの値は図2に示した。図からわかるように各分析値とも健康魚と病魚の間に大きな差異はなかった。従って、穴あき病と関連してこれらの成分に変化が起るとしてもそれらはわずかなものと考えられる。逆

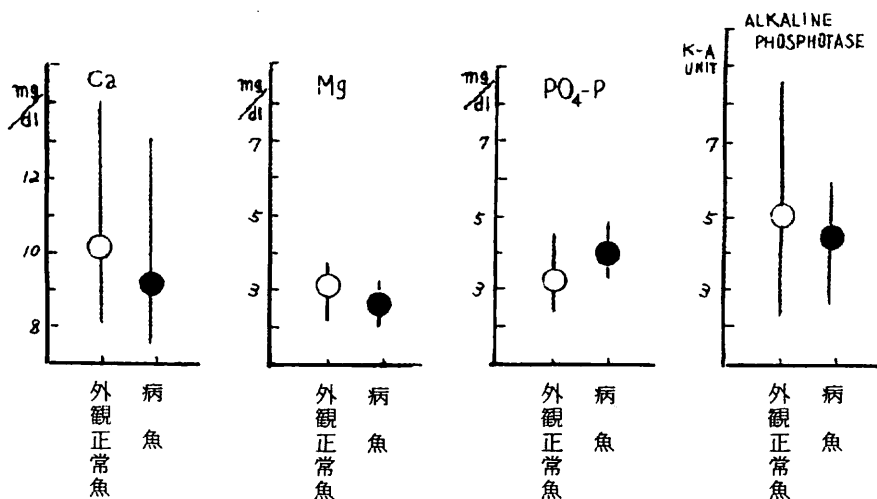


図2 血液性状

に健康魚と比較して有意の差がみられるほど変化したときは魚が死亡するときだとする考えかたもある。

### 6. 温度と自然治癒との関係（50年度）

水温を上げることによって穴あき病は治癒しやすいことが知られている。その治療効果のある温度域を正確に知ることは本疾病の疫学的輪郭を知るうえにも、また治療対策を確立させるためにも大事なことと考えられたので、いろいろと温度、飼育条件等を変えてその治療効果を追求した。

供試病魚は水試で7月に自然発生したワキンの1.3年魚で、実験水槽は100ℓのステンレスガラス水槽を用い、サーモスタットと投込みヒーターおよび空調によりそれぞれ所定の水温にした。各水温区の使用病魚は10尾とし、設定方法は表8のようにした。なお、水は水道水を活性炭カラムを通して脱塩素して用い、実験中は通気し、餌は与えなかった。

表 8 温度別治癒の設定方法

実験区分	飼育水	使用病魚	設定水温
実験 A	止水	初期	20.0、22.5、25.0、27.5、30.0
実験 B	循環	中期・終期	20.0、22.5、25.0、27.5、30.0
実験 C	止水	中期・終期	20.0、25.0、27.5、30.0
実験 D	循環	初期	30.0

その結果、実験終了時に死亡した病魚はなく、水温の上昇とともに確実に治癒魚が増加していくのがわかった。すなわち、20.0～27.5℃の範囲では、水温の上昇とともに患部の進行が早くなり治癒も早い。また、初期患部と中・終期患部では中・終期患部のほうが治癒が早い。22℃以下と30℃附近は循環水槽と止水水槽との間に治癒率に差はないが、25℃前後の場合は循環水槽のほうが治癒率がよく、水温以外の水質条件の影響が大きくなる場合もあることを示している。本実験の結果と治療実験の対照区のみでの治癒率をプロットしてみると図3のようになり、水温と自然治癒の関係はほぼ回帰直線に近くな

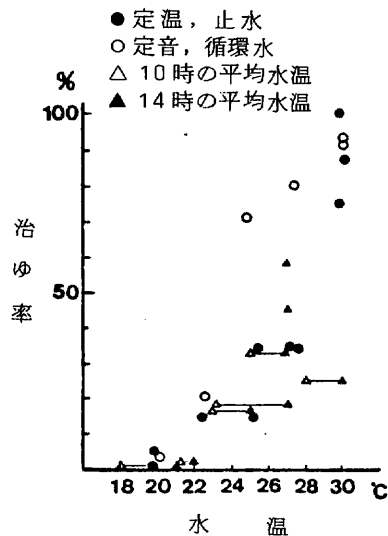


図 3 水温と自然治癒の関係



ることを示している。

## 7. 発生時期（冬期における病魚の発生状況）（50～51年度）

穴あき病魚の発生は春期産卵後の親魚に多くみられ、なにか内的要因の存在の可能性や水温等の環境要因が関与していることが想像される。しかしながら病魚は3月の産卵前にすでにわずかながらみられる。それらの病魚が春になって発生したものか、すでに秋から存在して冬越しをしたものであるかは、冬期に池より魚をとりあげることがないのでいままでわからなかった。実験的には11月に池でみつかった自然発病魚を水槽で3月まで飼育することは可能であった。この早春の病魚がいつ発生したものであるかを正確に知ることは予防対策の確立上大事なことと思われるので、冬期における発生状況のチェックを行った。

50年度は12月に都水試で育成した外観上健康と思われる0.8年魚のワキン200尾を用い、肉眼によりイカリムシ、ウオジラミをとりのぞき、ニフルブラジン1ppmで約1時間薬浴させたのち、100尾ずつ2面の泥池に収容し、以後1月と2月に各1面の魚をとりあげて発病の有無を調べた。その結果、1月、2月ともに病魚は1尾もみられなかった。

51年度は10月に池に健康魚を収容し、12月、1月、2月とチェックしたが病魚の発生はみられなかった。この実験はもう少し続け、3月と4月にもチェックしてみる予定である。

## 8. 問題点と疑問点

- 1) 患部症状の把握がまだ充分でない。特に初期病変があいまい。
- 2) 病変部が皮膚にかざられるのかどうかわかっていない。
- 3) キンギョの場合、潜在的に他の疾病をもっているものが多く、内臓病変の有無の調査は、対照のとりかたが大変むずかしくなる。
- 4) 血液性状については健康魚としての標準が確立されていないため、その判定が不可能である。
- 5) 感染温度範囲、感染適温の把握が不充分である。
- 6) 発生時期の把握が不充分である。
- 7) 発病と年齢の関係、性別の関係等まったくわかっていない。
- 8) 感染または発病しやすい要因が不明
- 9) 魚種によって症状が異なっているようにみえることもあるが、実際に魚種の相違なのか疾病の種類が異なるのかわかっていない。
- 10) 冬でも摂餌するフナは冬でも発病するようにみえる。なにを意味するのか。
- 11) 皮膚患部には必ず破骨細胞が出現しており、少なくとも鱗の腐蝕欠損は破骨細胞のせいであ

る。したがって病気の進行には破骨細胞が一役買っているように見える。

12) 温度をあげると症状の進行は早くなり、早くなる。この場合の破骨細胞の役割は？

13) 穴あき病の定義があいまいであり、特徴の把握も不足している。しかし、学問的にげんみつに定義をすると業者の呼称している穴あき病とは異なってしまい可能性もある。ともあれ、穴あき病として研究者がとりこんでいる病魚はどんなものをさすのか、その定義づけは大事である。

#### IV 原因の追求

##### 1. 病魚を用いた感染実験（伝染性の確認）（49年度）

穴あき魚は池から魚をとりあげて撰別等をしたあとの蓄養した魚や、採卵したあとの親魚等に爆発的に発生することが知られている。それらのことは魚の体表になんらかのこまかい傷ができたためにあとでそこからの感染発病を意味しているように見えるし、魚の疲労等も関与しているようにも見える。穴あき病の原因として感染性のものであるかどうかを知っておくことは極めて大事なことになるので、それについて一連の実験を行った。

実験は、1.病魚と健康魚をイクスで仕切った同一水槽に別々に収容する、2.健康魚の皮膚に傷をつけ、病魚患部組織を接種する、3.病魚患部をホモゲナイズしそれを健康魚に接種する、の3通りについて行った。健康魚は水試で育成したワキン1年魚で外観上健康と思われたものを10 ppmのクロラムフェニコールで30～50分間薬浴してから用い、病魚は同じく水試の池で自然発生したもので、真菌性肉芽腫症でもエビイステリス症でもない判断されたものを用いた。

その結果、すべての実験で2週間以内に穴あき症状を示すものが発生し、穴あき病は水を介して、または接触により感染することがわかった。従ってなんらかの原因生物が存在すると考えられる。しかしながら、多くの実験魚のなかには死亡するものもみられたり、また、全く発病しなかった個体もあり、なにか原因微生物が存在するとしても、混合感染を起しやすいことや、発病になにか条件が必要でありそうに見える。

##### 2. 病魚を用いた感染実験（確実に自然発病魚に近い感染方法の追求）

穴あき病の人工感染方法を確立するため穴あき病患部の鱗を用いて感染方法を検討した。

###### 実験 I

病患部の鱗を用いて穴あき病の感染が成立するかどうか検討した。

〔材料および方法〕

(1) 供試病魚

都内養殖池にて発病した琉金の病魚を使用した。その患部は筋肉部が露出し、周囲には充血がみられた。

(2) 供試健康魚

水試で育成したワキン0年魚を用いた。

(3) 感染方法

健康魚の左体側前上部の1枚の鱗の後縁にそって表皮をピンセットで切っておく。次に病魚の筋肉露出患部周囲の充血がみられる部位の鱗をぬく。それを1枚のまゝ、または半分に切って、その鱗をさきほどの健康魚の表皮の切り口から、鱗の下側に挿入する。その様子を図4に示した。挿入した鱗は3日後にピンセットで取り除いた。

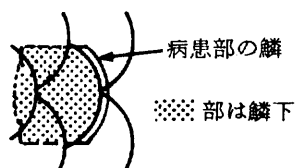


図4 鱗の接種法

表9 試験区分の設定方法

試験区分	人工感染に用いた鱗の種類
1	— (無処置)
2	健康魚の鱗
3	病魚Ⅰの患部の反対側の体側の異常のみられない部位の鱗
4	病魚Ⅱ 同 上
5	病魚Ⅲ 同 上
6	病魚Ⅰの患部の筋肉露出部周囲の充血のみられる部位の鱗
7	病魚Ⅱ 同 上
8	病魚Ⅲ 同 上

(4) 試験の設定

試験の設定方法を表9に示した。表から分る様に病魚は3尾用いた。3、4、5区の感染には、病魚の患部のない方の体側の正常な部分の鱗を用いた。6、7、8区は病患部の鱗を用いた。2区は対照として健康魚の鱗を用いた。水槽はガラス水槽を用い、水量を120ℓとし、投込みヒーターとサーモスタットにより水温を調節した。試験開始から10日目と14日目とに換水を行なった。なお期間中に白点病発生のため、開始から9日目にマラカイトグリーン0.1ppmで24時間薬浴した。

(5) 実験期間

昭和51年11月8日から30日までの22日間。

(6) 期間中の水温

17.7~20.4℃。ただし17.7℃になったのは1日以内で、他の期間は19℃以上に保った。

表 10 斃死率および発病率

試験区分	供試尾数	実験終了時の症状 (%)			斃死率 (%)	斃死時の症状 (%)	発病率* (%)
		中期症状	終期症状	異常なし			
1	10	0	0	50	50	50 白点虫及び薬浴による	0
2	10	0	0	100	0		0
3	10	0	0	80	20	20 餓死	0
4	10	0	0	50	50	20 中期症状 30 餓死	20
5	10	0	0	100	0		0
6	10	10	20	50	20	10 中期症状 10 終期症状	50
7	10	0	30	0	70	30 中期症状 40 終期症状	100
8	10	10	30	20	40	20 中期症状 20 終期症状	80

\* 発病率は実験終了時に中期・終期症状を示していた尾数と、斃死時に中期・終期症状を示していた尾数の合計の割合

〔結果〕

病患部の鱗を用いた6、7、8区において高率に発病がみられた。これらの発病魚の人工感染部位は自然発病の穴あき病患部と、ほぼ同じ外観症状を呈した。28ページの写真は、人工感染魚と自然発病魚の症状の比較である。自然発病魚の患部は初め鱗1枚程度であるが、次第に隣接部位に広がっていく(写真1)。始まりの1枚の鱗が脱落した後、その鱗の患部を中心に筋内部が露出し始める(写真2)。その後、筋肉の露出部はさらに大きくなっていく(写真3、4)。人工感染魚もほぼ同様の外観症状を示し、患部はいわゆる“穴あき”症状を呈した(写真5~8)。発病率と斃死率および斃死時の症状を表10に示した。中期・終期症状の区分は49年度報告に従った表中の発病率とは実験終了時に中期・終期症状であった尾数と、中期・終期症状を呈し期間中に斃死した尾数の合計の供試尾数に対する割合である。初期症状は鱗を挿入してあったため明らかでない。病患部の鱗を挿入した6、7、8区において、発病率はそれぞれ50、100、80%であった。それに対し病魚の正常な部分の鱗を挿入した3、4、5区においては、4区のみ20%が発病し、他の区は発病がみられなかった。対照として健康魚の鱗を挿入した2区では、3日後の鱗を抜く時に発赤のみられた魚もあったが、その後1~2日の間に発赤が消失し、以後異常は無かった。なお発病魚の症状の進行は、鱗挿入後4日目(鱗を抜いてから1日後)には中期症状を示し、9日~21日後に終期症状に到達した。斃死率は1、3、4区でそれぞれ50、20、50%であり、6、7、8区では20、70、40%であった。

そのうち、4区の20%の斃死魚と6、7、8区のすべての斃死魚は中期または終期症状であった。

#### 〔 考 察 〕

穴あき病患部の鱗を、健康魚の鱗下に3日間挿入する方法によって、50～100%の高い割合で感染が成立し、発病がみられた。従ってこの方法は人工感染方法として有効である。病魚の鱗でも、正常な部位の鱗を挿入した場合にはほとんど発病がみられなかった。この事は病患部に病原生物が多数存在するという従来の考えを裏付けている。この感染方法は簡便である。また健康魚の鱗のある部分ならば、目的の処に患部を形成させる事が可能だと考えられる。今回の試験では斃死率が20～70%と高かったが、これは実験に用いた魚が0才魚で自然発病魚より小さかった事、また絶食状態で冬期に水温を20℃に上昇させた事などが原因として考えられる。

#### 実 験 Ⅱ

次に、感染に必要な鱗の挿入期間を検討した。

#### 〔 材料および方法 〕

##### 1) 供試病魚

実験Ⅰと同一の池で発病した琉金病魚を用いた。病魚の患部は中期または終期症状である。

##### 2) 供試健康魚

実験Ⅰと同じ群のワキン0年魚を用いた。

##### 3) 感染方法

実験Ⅰと同じ方法であるが、鱗の挿入期間は試験区分により異なる。

##### 4) 試験の設定

各試験区分における、用いた鱗の種類と挿入期間を表11に示した。病患部の鱗の挿入期間を1分、1時間、4時間、1日、3日の5通り(4～8区)設定した。人工感染には10尾の病魚を用いた。病魚1尾から各々5尾の健康魚に感染させ、その5尾を1尾ずつ4区～8区に振り分けて1区10尾とした。これらの魚はその模様によって個体識別し、水温調節と通気を施した120ℓ水槽に入れて症状を観察した。試験開始から8日後と14日後に換水した。なお期間中に白点病が発生したため、開始から8日後にマラカイトグリーン薬浴を行なった。

##### 5) 実験期間

昭和51年12月8日～12月28日の21日間。

##### 6) 期間中の水温

19.3～20.7℃

表 1 1 試験区分の設定

試験区分	感染に用いた鱗の種類	鱗の挿入期間	試験区分	感染に用いた鱗の種類	鱗の挿入期間
1	— (無処置)	—	5	病患部の鱗	1 時間
2	健康魚の鱗	1 分間	6	病患部の鱗	4 時間
3	健康魚の鱗	3 日間	7	病患部の鱗	1 日
4	病患部の鱗	1 分間	8	病患部の鱗	3 日

表 1 2 斃死率および発病率

試験区分	供試尾数	実験終了時の症状 (%)			斃死率 (%)	斃死時の症状 (%)	発病率* (%)
		中期症状	終期症状	異常なし			
1	10	0	0	90	10	全身的な立鱗治癒後斃死	0
2	10	0	0	100	0		0
3	10	0	0	100	0		0
4	10	0	60	20	20	20 中期症状	80
5	10	10	20	10	60	50 中期症状 10 終期症状	90
6	10	10	10	0	80	20 中期症状 60 終期症状	100
7	10	10	30	0	60	30 中期症状 30 終期症状	100
8	10	0	30	0	70	40 中期症状 30 終期症状	100

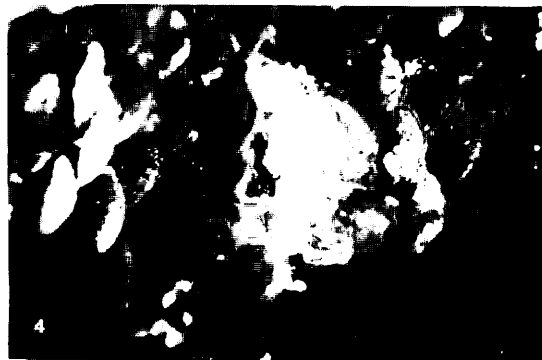
\* 発病率は実験終了時に中期または終期症状を示していた尾数と、斃死時に中期または終期症状を示していた尾数の合計

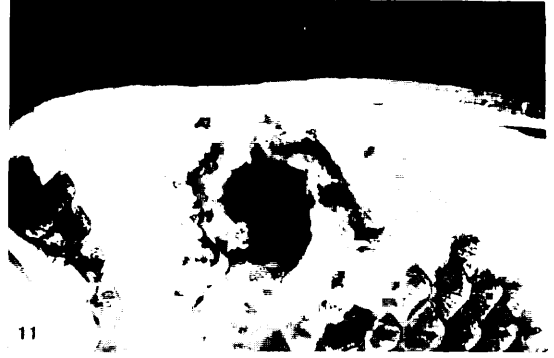
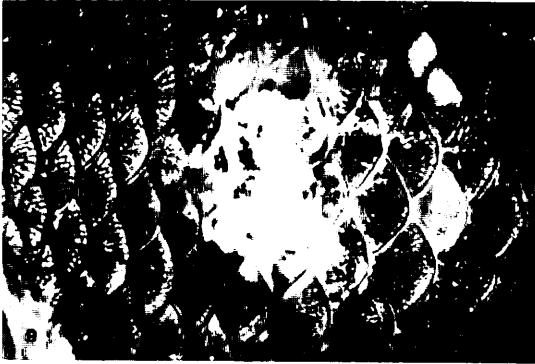
〔 結 果 〕

発病率と斃死率を表 1 2 に示した。感染に病魚の鱗を用いた 4～8 区で発病がみられた。発病率は 4、6、7、8 区でそれぞれ 80、90、100、100%であった。実験開始から 8～20 日目に終期症状に到達した。斃死率は対照の 1 区で 10%、4～8 区で 20～80%であった。

〔 考 察 〕

病患部の鱗を挿入した 4～8 区では 80～100%発病がみられた。人工感染は病患部の鱗を 1 分間挿入する事によって充分成立すると考えられる。この感染方法は穴あき病に対する薬剤効果の判定等を容易にするであろう。今回の実験結果を基礎として、穴あき病の人工感染方法の今後の検討が望まれる。





< 写真説明 >

写真1～4 自然発病魚の症状

写真1 体表のごくわずかな白濁が認められてから6日後(側線上の患部)。

写真2 同じく10日後。筋肉部が露出し始める。

写真3 同じく12日後。患部はさらに広がる。

写真3 同じく14日後。

写真5～12 人工感染魚の症状

写真5 実験Ⅰ7区の発病魚。感染操作の8日後。

写真6 写真5と同じ発病魚。感染操作の11日後。

写真7 実験Ⅰ7区の写真5と異なる発病魚。感染操作の19日後。

写真8 実験Ⅰ6区の発病魚。感染操作の21日後。

写真9 実験Ⅱ8区の発病魚。感染操作の20日後。

写真10 実験Ⅱ8区の発病魚。感染操作の20日後。

写真11 実験Ⅱ4区の発病魚。感染操作の29日後。

写真12 実験Ⅱ6区、7区の発病魚。感染操作の14日後。



### 3. 病魚からの細菌の分離 1・皮膚患部からの細菌の分離と菌の生化学的性状ならびに復元実験 (49年度)

穴あき病は伝染することがわかったので病原菌の分離を試みた。培地はブレイハートイフェーション寒天培地(BHI)、トリプトソイ寒天培地(TS)、ユーゴン寒天培地(U)、ミューラーヒントン培地、チトファーガ改変寒天培地(C)の5種を用い、病魚は水試の養魚池で自然発生したものを用了。病魚はその症状によって、初期、中期、終期にわけ、おのおの10尾ずつの計30尾より菌の分離を行った。分離培養された菌はそのコロニーの性状から仕分け、その代表株の生化学的性状を調べ、更に皮下注射によってその毒性の有無を調べた。

その結果、C培地に生えた菌群以外は、初期から中期へと症状が進むにつれて仕分けられる菌群数が増加するが、終期になると逆に少し減少するのがみられた。C培地の菌群のみは初期病魚が最も多く症状の進行とともに減少するのがわかった。また、生化学的性状検査の結果、*Pseudomonas*、*Moraxella*、*Acinetobacter*、*Flexibacter columnaris*、*Aeromonas hydrophila*が検出され、それぞれ、初期、初期と中期、終期、初期と中期、中期と終期に主として出現することがわかった。復元実験の結果、U培地から分離された *Aeromonas hydrophila* (U-4株)は致死性が低く、腫れ、充血も軽くて接種部によく潰瘍を起すことが認められた。従って、*Aeromonas hydrophila*は患部の筋肉の壊死融解の主役をなしていると考えられたが、その復元実験での症状が自然発病魚とは多少異なることと、潰瘍部の拡大がなくなりやすいこと等から、最初からの一次原因菌と断定するにはいたらなかった。

### 4. 病魚からの細菌の分離 2・皮膚患部、血液、腎臓からの細菌の分離と菌の生化学的性状ならびに復元実験(50年度)

1974年に病魚の患部から菌の分離を行い、復元実験により致死性は低く、潰瘍形成能の高い *Aeromonas hydrophila* (U4株)を分離できた。しかしながら、この菌株の接種では自然感染魚にみられるような前方への患部の進行は全くみられず、発病には他に先行菌の存在の可能性かほか他の要因の存在が考えられた。そこで再度培地をかえて菌の分離と復元実験を試みた。なお、*Aeromonas hydrophila*は血行性の菌と考えられているので血液、腎臓からの分離も試みた。

使用培地はユーゴン寒天培地、ユーゴンチョコレート寒天培地(UB)、ブレインハートイフェーション寒天培地(B)、YCC寒天培地、アネロブ培地、改変チトファーガ寒天培地、改変チトファーガパラフィン培地、1%小川培地の8種のうちUBはろうそく培養によった。病魚は水試で自然発生したワキン1年魚で、初期病魚10尾、中期病魚10尾を使用し、うち中期病魚のみ血液と腎臓から菌の分離を試みた。

その結果、初期病魚の患部からは培地によっては菌が検出されないものが1～4尾あったが、すべての培地で全く菌が分離培養されなかった個体はなかった。中期病魚の患部からはすべての個体がすべての培地に菌が分離培養できた。血液からの菌の分離培養は培地によっては4～6尾が検出されなかった。すべての培地で全く菌が検出されなかったのは3尾であった。同様に腎臓は各培地で6～8尾が検出されず、うち4尾はすべての培地で全く菌が検出されなかった。

8種類の培地と20尾の病魚を用いて分離できた多くの菌株を培地上のコロニーの性状により類別し、各代表株を2～4株えらび復元実験に供した。用いた菌株は86株でそのうち32株に毒性がみられ、14株が接種部に潰瘍を起した。そのようすは表13に示した。また潰瘍を起した14株のうちB培地に生えた4株をのぞいた10株について生化学的性状を調べた結果、血液(1株)、腎臓(3株)からの菌は*A. hydrophila*で、皮膚からの菌は5株が*A. hydrophila*で1株は*Pseudomonas*と思われた。

表 13 接種菌株数とその毒性

	接種菌株数	毒性を有した菌株数	潰瘍を起した菌
皮膚患部	61	24	10
血液	8	4	2
腎臓	17	4	2
計	86	32	14

#### 5. 病魚からの細菌の分離3・皮膚患部からPPL0培地、Yolk培地等を用いて細菌の分離と復元実験(51年度)

49、50年度と患部および血液、腎臓より菌の分離を試み、接種部に潰瘍を起す菌を分離できた。しかしながら、その潰瘍は良性で自然発病魚のように体の前方へ進行していくことがなく、原因菌と断定するにはいたらなかった。そしてそれらの菌はほとんど*Aeromonas hydrophila*であった。*Aeromonas hydrophila*は池水に常在する菌といわれ、その菌が穴あき病のような特異な疾病を昭和46年に急に起すようになり、且それがそれ以来毎年起るというのも納得のいかないことである。そこで*Aeromonas*以前のなんらかの原因菌があると考え、培地を変えて再度菌の分離を試みた。

[材料および方法]

##### 1) 使用培地

(1) PPL0培地をベースとしたもので、次の材料を用いる。①市販のPPL0培地(Difco)、4.8g/140ml滅菌蒸留水、②ペニシリン 10万単位/1ml、③2.5%酢酸タリウム水溶液、④コイ肉汁、2倍量の滅菌蒸留水を加えてホモゲナイズし、No.4の濾紙で吸引濾過し、更に0.45μのミリポ

アフィルターで濾過する。⑤コイ血液、コイの尾柄をアルコール滅菌し、尾柄切断により採血し、2倍量の滅菌蒸留水を加えて溶血させ、4000RPMで10分間遠心沈澱させ、更に0.45μのミリポアフィルターで濾過したもの。⑥乾燥イースト、3倍量の滅菌蒸留水を加えて10分間ホモゲナイズし、water bathで10分間加熱沸とうさせる。1日冷蔵庫内で放置し、No.4の濾紙で濾過し、更に0.45μのミリポアフィルターで濾過する。①を121℃15分高圧滅菌後、約70℃に冷却してから残りの材料を加えて混合し、シャーレーに分注する。次の4種類を作った。

- a. MA培地 ① + ② 1 ml + ⑥ 30 ml + ④ 15 ml + ③ 2 ml
- b. MB培地 ① + ② 1 ml + ⑥ 30 ml + ④ 15 ml
- c. MC培地 ① + ② 1 ml + ⑥ 30 ml + ⑤ 17 ml + ③ 2 ml
- d. MD培地 ① + ② 1 ml + ⑥ 30 ml + ⑤ 17 ml

(2) 改変チトファーガ寒天培地をベースとするもので、次の材料を用いる。①改変チトファーガ寒天培地の処法、500ml分の量に300mlの滅菌蒸留水を加える(1NのNaOH15滴を加えてから寒天7.5gを加える)。②乾燥イースト、5gに滅菌蒸留水を適量加え、5分間ホモゲナイズし、遠心沈澱させ、さらに0.45μのミリポアフィルターを通す。③コイの皮膚筋肉約20gを5分間ホモゲナイズし、遠心沈澱させ、さらに0.45μのミリポアフィルターを通す。④コイの血液、約2倍量の滅菌蒸留水を加えて溶血させ、3日間冷蔵庫に保存し、のち遠心沈澱させ更に0.45μのミリポアフィルターを通す。⑤滅菌蒸留水。

①を121℃15分高圧滅菌後、約70℃に冷却し残りの材料を加えて混合し、シャーレーに分注する。次の2種類を作った。

- e. CM培地 ① + ② + ③ + ⑤ ⑤を加えて全量で500mlとする。
- f. CB培地 ① + ④ + ⑤ ⑤を加えて全量で500mlとする。

(3) 卵黄を主体とするもので、下記の材料を用いる。作りかたは卵黄を除いて121℃15分高圧滅菌し、冷却後卵黄を加えて混合しシャーレーに分注し、90℃で1時間煮沸する。同じく2種類作った。

g. YK培地 バクトトリプトン0.6g、イーストex. 0.15g、ビーフex. 0.06g、酢酸ソーダ0.06g、塩化カルシウム0.06g、グリセリン6ml、1N NaOH7滴、滅菌蒸留水100ml、卵黄200ml

h. YG培地 YK培地の処方にグルタミン酸0.48gを加え、1N NaOHの滴下を21滴とする。

## 2) 使用病魚

水試または都内の養殖地で自然発生したワキンおよびリュウキンの初期、中期、終期病魚を用いた。

### 3) 菌分離の方法

- (1) *MA* 培地：ワキン初期病魚 1 尾、中期病魚 2 尾の患部を一緒にホモゲナイズして培地に塗沫。
- (2) *MB* 培地：上記 3 尾の病魚患部を各々エーゼでこすり、のち培地に塗沫。
- (3) *MC* 培地：*MA* 培地と同じ。
- (4) *MD* 培地：*MB* 培地と同じ。
- (5) *CH<sub>e</sub>* 培地：①水温 7℃で飼育しておいたワキン終期病魚 5 尾の、各々患部の前縁の鱗の下にエーゼをつっこみ各々培地に塗沫。  
：② ①と同じ病魚を 5 日間 20℃で飼育してから同様に塗沫。
- (6) *CB* 培地：① *CM<sub>e</sub>* 培地①と同じ。  
：② *CM<sub>e</sub>* 培地②と同じ。
- (7) *YK* 培地：① リュウキン終期病魚 2 尾を用い（7℃で飼育）患部の前縁の鱗を 3 枚ぬいて培地上にのせ、2 時間後その鱗を更に約 2cm ずらせることによって塗沫。  
：② ①と同じ群の病魚を 3 尾用い、20℃で 7 日間飼育してのち同様に塗沫した。
- (8) *YG* 培地：① *YK* 培地①と同じ。  
：② *YK* 培地②と同じ。

上述の方法で塗沫して約 20℃で培養した。なお、*MB*、*MD*、*CM<sub>e</sub>*、*CB* 培地はろうそく培養によった。

### 4) 復元実験の方法

各培地で分離培養された菌株をそのコロニーの性状により類別する。多くの菌株のうち各培地での生えかたが悪かった菌株と、類別できた菌の各代表株 2～4 株を普通寒天培地または *BHI* 寒天培地に塗沫し、20℃5 日間で全く生えてこなかった菌および生えが悪かった菌を主体にして撰びだし、昨年と同じ方法によりワキン 0 年魚に接種してその毒性を調べた。

#### 〔結果および考察〕

各培地上にそのコロニーの性別から類別された菌株数を表 14、15、16 に示した。*PPLO* をベースとした 4 種の培地に生えた菌はすべて *BHI* 寒天培地によく生えたので、*MC* 培地に生えた菌以外は復元実験に供さなかった。*MC* 培地に生えた菌株 (*MC-4*) は紫褐色のコロニーを形成し特異的であったので、復元実験に供した。その結果、毒性強く 1mg/100g 魚体重では 3 日ですべてが死亡したが、0.1mg/100g 魚体重では 30% の魚が穴あき症状になった。更にこの菌の生化学的性状を調べたところ *Aeromonas* と判断された。

改変チトファーガ寒天培地をベースとした培地ではC B培地に多くの菌が検出された。CMe培地に生えた菌のすべてとC B培地に生えた菌の約半分ものはBHI寒天培地によく生えた。C B培地に生えた菌のうち、7℃の環境にいた病魚からの菌5株と20℃の環境にいた病魚からの菌9株について復元実験を試みたが、潰瘍を起す菌は全くなかった。ただ、20℃の9株のなかに接種部の鱗の後縁に白濁肥厚を起させ、しかもそれを5日以上継続させた菌(CB-13-1、CB-13-1')がみられた。

表14 コロニー性状から類別した菌数(1)

病魚 培地	ワキン初期 病魚	ワキン中期 病魚	ワキン中期 病魚
MA	0		
MB	4	2	2
MC	1 (MC4)		
MD	4	3	4

卵黄をベースとした培地から分離された菌のうち、YK培地からの菌にBHI寒天培地にも改変チトファーガ寒天培地にも生えない菌が2株(YK-2-1株、YK-2-2株)分離された。ともに復元実験により接種部の鱗の後端の白濁肥厚が5日以上みられたが、潰瘍を起すにはいたらなかった。

このように単独で穴あき病に近い潰瘍症状を起す菌は分離できなかったが、CB-13-1、CB-13-1'、YK-2-1、YK-2-2株のように、穴あき病の初期症状に近い症状を起す菌が分離された。これらは穴あき病の一次原因の菌という可能性もある。すなわち、これらの菌が先行して炎症を起し、そこにAeromonasが感染して穴あき病をひきおこすということも考えられる。今後、これらの菌とAeromonasと組合せた復元実験についてためしてみる予定である。

## 6. ウイルスの可能性の検討(49年度)

穴あき病は感染発病することがわかっている。一応原因生物としては細菌である可能性が強いが、ウイルスであるかどうかは確認しておく必要があるためそれについて実験を行った。

実験は上述のM、1の病魚を用いた感染実験のうち、実験3の病魚患部のホモゲナイズ液の接種のなかにくみこんで、ホモゲナイズ液を0.45μmのミリポラフィルターを通して接種することを試みた。

表15 コロニー性状から類別した菌数(2)

培地	終期病魚 飼育水温	1	2	3	4	5
CMe	7℃	4	5	3	3	4
	20℃	2	2	2	3	3
CB	7℃	3	5	3	4	5
	20℃	9	9	8	7	7

表16 コロニー性状から類別した菌数(3)

培地	終期病魚	1 (7℃)	2 (7℃)	3 (20℃)	4 (20℃)	5 (20℃)
YK		8	4	4	8	4
YG		3	2	3	2	2

その結果、ミリポアフィルターを通した区には発病はみられず、ウイルス単独では穴あき病はひきおこさないことがわかった。

なお、水試で自然発生したワキンおよびリュウキンの病魚からのウイルスの分離を東京大学江草研究室に依頼したが、RTG2、FHM、EPC細胞での試みでは検出されなかったと解答を得ている。

#### 7. ウイルスと *Aeromonas* 菌の関与による発病の可能性の検討（51年度）

都水試および多くの研究機関によって穴あき病患部から体表に潰瘍形成能の強い *Aeromonas* 菌が分離されて原因菌としての疑いをもたれている。しかし、この菌のみによって発病すると考えるにはいくつかの問題点がある。それは主にこの *Aeromonas* 菌接種患部と自然発病魚の患部の外観的な症状の違いと、その進行性の違いによる。 *Aeromonas* 菌と穴あき病患部より分離された他の菌との混合接種によっても自然発病魚の様な進行性の症状を起こさせる事はできなかった。

この試験は、*Aeromonas* 菌とウイルスという2つの原因による発病の可能性を検討するため行なった。

##### 〔材料および方法〕

供試健康魚：ワキン1年魚で魚体重の平均は20～25g

供試病魚：初期～中期症状の患部をもつ穴あき病魚

供試菌：*Aeromonas hydrophila* — U-4株、C-1-18株

試験区の設定：*Aeromonas* 菌とウイルスの2つの原因による発病を調べるために、*Aeromonas* 菌と穴あき病患部ホモゲナイズ液の0.45μミリポアフィルターろ過液を同時に接種した。試験区の設定を表17に示した。実験は120ℓのガラス水槽で行ない、室温調整により水温を調節した。換水は水のごれ具合をみて適宜行なった。期間中の水温は18.8～22.8℃であった。

##### 〔結果および考察〕

各区の接種後の斃死率と症状を表18に示した。患部のミリポアフィルターろ液と *Aeromonas* 菌を同時に接種しても、49年度 *Aeromonas* 菌単独に接種した場合とほとんど変わらない潰瘍が体表に形成されて、自然発病魚の様な進行性の症状はみられなかった。また穴あき病患部のホモゲナイズ液をリンゲル液で5～10倍に希釈して健康魚に接種しても1～2割の魚が穴あき初期、中期症状を示すだけで9～10割が接種後2日～8日の間に斃死した。斃死時の症状は外観的には表皮が全身的に壊死し、接種部位の筋肉部の変色が体表を通し透けて見える。組織を固定後輪切りにしてみると接種部位の筋肉層が瘻になり空洞化していた。今回の試験の結果から、穴あき病魚を用いて人工感染させる場合、注射等により真皮下の筋肉部にまで直接々種を行なう事はその斃死率、症状等からして好ましくないと考えられる。今回の試験の目的である *Aeromonas* 菌とウイルス（0.45μより小さい培

養されない生物)の2つの原因による穴あき病発病の可能性は、その接種患部の症状から一応否定されたが、こういった試験を行なう前に、穴あき病魚を用いた確実な感染方法を確立させておく事が必要である。

表 17 接種内容および接種法

区 分	接 種 内 容 (接種液量 0.05 ml/尾)	接種方法
対 照 1	リングル液	皮下注射
対 照 2	健康魚、皮フおよび筋肉部ホモゲナイズ液をリングル液にて5倍と10倍に希釈	皮下注射
病 患 部 液	病患部皮フおよび筋肉部ホモゲナイズ液をリングル液にて5倍と10倍に希釈	皮下注射 穿 刺
病患部フィルター通過液	病患部液を0.45μミリポアフィルター通過	皮下注射
病患部フィルター通過液 + <i>Aeromonas</i> 菌	I 病患部フィルター通過液に <i>Aeromonas</i> 菌 (0.1mg/100g BW) 混ぜる	皮下注射 穿 刺
	II 病患部フィルター通過液を接種後、飼育水中に <i>Aeromonas</i> 菌を懸濁させる	穿 刺 と 水中懸濁
<i>Aeromonas</i> 菌	<i>Aeromonas</i> 菌 (0.1mg/100g BW) C-1-18 株	皮下注射

表 18 接種による症状および斃死率

区 分	供 試 尾 数	斃 死 尾 数	症 状
対 照 1	30	0	異常なし
対 照 2	20	0	異常なし
病 患 部 液	60	59	表皮の壊死・剝離、数尾 初期～中期様の症状を呈す
病患部フィルター通過液	15	1	1尾立鱗、2尾表皮の壊死
病患部フィルター通過液 + <i>Aeromonas</i> 菌	I 40	4	3尾 初期様症状でそのまま治癒 12尾 筋肉部に潰瘍
	II 10	0	2尾 初期様症状でそのまま治癒
<i>Aeromonas</i> 菌	20	7	6尾筋肉部に潰瘍

3回行なった試験をまとめて表示

## 8. 養魚池水中の運動性 *Aeromonas* 菌とその病原性 (51年度)

温水性淡水魚類に発生する諸種の細菌性疾病の代表的原因菌として、運動性 *Aeromonas* 菌をあげることができる。本菌は池水中の常在菌と言われ、血清学的にも多様性に富み、病原性についても菌株間で差異のあることが知られている。いわゆるコイ、フナ、キンギョの穴あき病に関する研究でも本菌の強い関与が疑われている。しかしながら、現在のところ、養魚池水中の本菌の生態や感染・発病にいたる機序などについては未知の点が数多く残されている。

51年度は、本菌の養魚池水中における生態、病原性等について若干の検討を行なった。

### [材料および方法]

昭和51年5月から、ほぼ毎月一度、試験場場内の養魚池二面から滅菌試験管を用いて、池壁近くの表面水を採水した。採水後ただちに常法に従い、10倍階段希釈後、普通寒天培地(栄研)を用い平板混濁法により生菌数の算定を行なった。培養は25℃、4～5日間行ない、発育したコロニーから無作為に各池約30株ずつ、計約60株を釣菌し、性状検査を行なった。性状検査の結果、グラム染色性(ハッカー氏変法)陰性、運動性(懸滴標本の観察)陽性、チトクローム・オキシダーゼ試験(日水試験紙)陽性、ヒュー・レイフソン試験(栄研)醗酵型、O/129感受性試験(第一製薬)陰性、の諸性状を示す菌をエロモナス菌とした。

病原性試験は、ワキン0年魚(10～15g)を用い、池水中から分離されたエロモナス菌を1mg/100g魚体重の割合で筋肉内接種し、生死および接種部の病変を観察した。供試菌株は15株とし、1株に対し5尾のワキンを用いた。なお、供試菌株は液体窒素で凍結保存し、使用に際し普通寒天培地で25℃、24時間培養したものをを用いた。試験水温は約20℃とした。

### [結果]

対象とした二面の池の生菌数の消長を表19に示した。菌数は調査期間を通じて $10^2 \sim 10^4$  Cells/mlであった。表20に分離菌株中に占めるエロモナス菌の割合を示した。すくなくとも一池(C-2)においては、毎回本菌が分離され、常在菌であると考えられた。

表21に病原性試験の結果を示した。供試した15株のうち、斃死が認められたものは1株にすぎなかった。しかし、程度に差はあるものの、接種部の筋組織が壊死・融解し、肉眼的に穴あき症状を呈するような“病原性”のある菌株が15株中、9株認められた。

### [考察]

運動性エロモナス菌は池水中の常在菌であり、環境条件が整った時に魚類に病原性を示す、いわゆる条件病原菌であると言われている。今回の調査でも、池水中からほぼ常時検出することができた。よた、池水中から分離されたエロモナス菌の病原性を調べた結果では、1mg/100g魚体重程度の菌量を筋肉内に接種すると、斃死にはいたらないまでも、接種部の筋組織を壊死・融解させるような、



“病原性株”が池水中に存在することが判った。“穴あき”病魚の病患部からも同様の“病原性”を示すエロモナス菌が分離されている。今後、池水中に存在するエロモナス菌“病原性株”と穴あき病との関係についてさらに追求していく必要があると思われる。また、“病原性株”と“非病原性株”の分類およびそれらの池水中での動態などについても研究していく必要がある。養魚池水中の全生菌数や魚病細菌の季節的消長については、養殖魚類の健康管理の面からも、単年度の結果からだけでなく、長期にわたる研究結果から考察していくべきであろう。

表 19 生菌数の変動

池番号	5月	6月	7月	9月	10月	12月
A-5	$1.6 \times 10^4$	$8.0 \times 10^2$	$7.2 \times 10^2$	$7.4 \times 10^2$	$3.1 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$
C-2	$1.9 \times 10^3$	$1.4 \times 10^4$	$2.6 \times 10^3$	$2.0 \times 10^3$	$6.1 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$

単位：Cells/ml

表 20 性状検査に供した菌株中に占める運動性エロモナス菌の割合

池番号	5月	6月	7月	9月	10月	12月
A-5	0/28	11/29	0/30	4/30	0/33	2/14
C-2	23/29	9/29	4/28	12/30	4/27	5/24

分子：運動性エロモナス菌株数

分母：供試菌株数

表 21 池水中から分離された運動性エロモナス菌の“病原性”

	菌 株 番 号														
	5C7	5C11	5C27	6C9	6C15	6C26	7C5	7C12	7C30	9A13	9A18	9C7	10C17	10C25	10C30
斃死数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
筋肉の壊死・融解	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+

## 9. 穴あき病の伝播に及ぼすチョウの影響の検討（51年度）

チョウは寄生時、魚の体表に傷をつける事から穴あき病の伝播を促進するのではないかと考え、同一水槽に健康魚と穴あき病魚とチョウを入れて健康魚の発病率を比較した。しかしながら実験中に白点虫の寄生が著しく、斃死率が高くなったため、9日目に実験を中止した。その間対照には1割の発病がみられたが、チョウを寄生させた区では発病がみられなかった。今回の試験では余病を併発し、明らかな結果を得られなかった為今後検討する予定である。

## 10. 問題点と疑問点

- 1) 病魚患部のホモゲナイズ液の接種では死亡しやすい。なぜか
- 2) 人工感染では初期症状をつくらせるのは不可能である。
- 3) 鱗の挿入法はかなり信頼性が高い感染方法と考えられる。高率に感染発病するが感染実験中他の部位に疾病が転移しないのはなぜか。
  - 4) 鱗の挿入で確実に穴あき病魚をつくることができるとすると、鱗のスタンプ標本の中に原因微生物がいることになる。
  - 5) 鱗の挿入後薬浴すると、初期に似た症状になってからなおってしまう。なぜか。
  - 6) *Aeromonas* 以前の一次原因菌がいる可能性はある。
  - 7) *Aeromonas* が患部の拡大に一役買っているとしてもその証明法は。
  - 8) *Aeromonas* は患部から100%分離される。関与しているということにむすびつけてよいか。
  - 9) ウイルスと *Aeromonas* 以外の細菌との共同作用の可能性は残っている。
  - 10) 復元実験の時、発病したときめる基準があいまいである。
  - 11) 池水中に病原性のある *Aeromonas* が常在している。穴あき病の原因だとしてもその証明法は。
  - 12) 体表の傷やチョウ、イカリムシの寄生は穴あき病の誘因になると考えられるが、その証明がまだされていない。
  - 13) ヨーロッパのCEとの関連がまったくわかっていない。

## V 予防方法の追求

### 1. ニフルブラジンの薬浴による予防 I（50年度）

とりあげ時などになるべく短時間の薬浴で有効な適正濃度を求める事を目的としてニフルブラジンの

薬浴による予防実験を試みた。

供試魚は外観上異常のみられないワキン1年魚で、取り上げた池の穴あき病発病率が高かったため（73%）、取り上げ操作で充分感染したと考え、人工感染操作は行わずそのまま薬浴した。その結果は表22に示した。1週間後の判定で薬浴しなかった区では52%の発病がみられたのに対して、ニフルプラジン薬浴区の発病率は8～15%に低下した。0.5 ppm～2 ppmの範囲で1時間、4時間の薬浴を行なったが、濃度、時間の違いによる傾向的な差は認められず、0.5 ppm 1時間の薬浴で効果は充分期待できる。なお、薬浴区では対照に較べ症状の進行に遅れがみられた。これも予防効果の一つと考えられる。

表 2 2 穴あき病予防実験結果

使用薬剤	濃度 ppm	薬浴時間	供試尾数	発病魚尾(%)	出現患部数		10時の水温 (範囲)
					初期	中期	
対照区	0	0	40	21 (52)	12	14	21.6～24.6
ニフルプラジン	2	1	40	4 (10)	4	0	21.5～24.2
ニフルプラジン	1	1	40	4 (10)	4	0	21.5～24.1
ニフルプラジン	0.5	1	40	3 (8)	3	0	21.5～24.4
ニフルプラジン	2	4	40	4 (10)	4	0	21.5～24.5
ニフルプラジン	1	4	40	6 (15)	6	0	21.5～24.5
ニフルプラジン	0.5	4	40	3 (8)	3	0	21.2～24.1

## 2. ニフルスチレン酸ソーダおよびニフルプラジンの薬浴による予防(51年度)

穴あき病の予防または治療法の追求はかなりたちおくと考えられる。その理由は実験の設定が困難なことにある。予防実験を行うには健康魚を確実に病魚にする技術が確立されていないとその効果の判定はむずかしい。一方、治療実験は自然発病魚の症状の進行が非常に多様なため、同一程度の病魚をそろえることがむずかしく、同じく効果の判定が困難となっている。これらはともに穴あき病の原因菌が補そくできれば解決する問題と考えられるが、その点もまたたちおくとおり、なにか別の方法の確立がいそがれている。そこで健康魚を確実により自然発病魚に近い病魚にする方法として、病魚の鱗を健康魚の皮膚に挿入することを試み、外観所見では自然発病魚と区別をつけられない中期・終期病魚をつくることができた。その結果はすでにIV、2で述べた。

早速、この方法で人工感染操作を行った際の薬剤の薬浴による予防を試みた。薬剤による予防については51年9月の穴あき病研究部会で連絡試験としてとりあげられ、ニフルスチレン酸ソーダ、スルフィソゾールソーダ、クロラムフェニコールの三種を各タイロゴイ、キンギョ、フナについて試験

することがとりきめられている。東京都はキンギョを用いてニフルスチレン酸ソーダで試験することになったのでそれを行った。実験は2回行った。

〔材料および方法〕

#### 1) 実験 I

##### (1) 使用病魚

都内養殖池に自然発生したリュウキン1年魚の穴あき病病魚で、病患部はいずれも筋肉部が露出し、周囲の鱗のある部分に充血がみられ、特に前部は顕著であった。

##### (2) 供試健康魚

水試で育成したワキン0年魚で外観上健康と思われるものをマラカイトグリーン0.1 ppmで約20時間薬浴させた後、実験水温の20℃に1週間順化させてから用いた。

##### (3) 人工感染の方法

Ⅳ、2.と同じ方法で行い、挿入時間を1分間とした。病魚は5尾用い、1尾の病魚から各々20尾の健康魚に感染操作を行なった後、各区に2尾ずつ振り分け、1区10尾とした。

##### (4) 使用薬剤と薬浴法

薬浴は穴あき病研究会(51年3月、9月)でとり定められた方法に従った。すなわち、薬剤はニフルスチレン酸ソーダ(10倍散・上野)を用い、薬浴時間24時間区では薬剤成分として2・1・0.5 ppm、4時間および1時間区では1・0.5・0.25 ppmの各々三段階の濃度で行った。薬浴はポリエチレンコンテナで行なった。水量は35ℓで水温を19.0～20.0℃に維持し、通気を行った。薬浴は感染操作終了後30分から開始した。

##### (5) 効果の判定

薬浴終了後、水温調整(17.5～20.8℃)、通気を施した水量120ℓのステンレスガラス水槽に供試魚を移し、52年1月18日に薬浴し、14日後まで観察した。薬浴の効果は人工感染部位の症状(中期症状以降を発病とみなす)により判定した。

#### 2) 実験 II

実験 I では思ったより効果が低かったのでさらに高濃度で24時間薬浴を試みた。また50年度に自然感染魚で効果のあったニフルプラジンについても比較としてためしてみた。

##### (1) 使用病魚

実験 I と同池で発生したリュウキン病魚4尾と人工感染により発病した中期・終期症状のワキン病魚6尾の計10尾用いた。

## (2) 供試健康魚

実験Ⅰと同じ、ただし水温20℃への順化は5日間とした。

## (3) 人工感染の方法

感染操作は実験Ⅰと同じ、ただし、1尾の病魚から各々10尾の健康魚に感染操作を行なった後、各区に1尾ずつふり分け1区10尾とした。

## (4) 使用薬剤と薬浴法

ニフルステレン酸ソーダは薬剤成分として4・2・1・0.5・0.25ppm、ニフルブラジン(15倍散)は同じく2・1・0.5・0.25ppmとし24時間薬浴させた。薬浴操作は実験Ⅰと同じ。薬浴時の水温は18.0～20.8℃であった。

## (5) 効果の判定

実験Ⅰと同様の方法で行った。52年2月8日に薬浴し、14日後の22日まで観察した。水温は19.5～21.0℃の範囲であった。

### 〔結果および考察〕

実験Ⅰ、Ⅱの結果を表23と図5に示した。ニフルステレン酸ソーダについて、各区の発病率を比較すると実験Ⅰでは対照区は80%であったのが、1時間薬浴区40～70%、4時間薬浴区30～60%、24時間薬浴区20～40%と薬浴区は発病率が低かった。実験Ⅱでも対照区が100%発病したのに対し、薬浴区は70%以下であり、ニフルステレン酸ソーダは薬浴により予防効果を有することがわかった。実験Ⅰでは同じ薬浴時間では濃度が高い程発病率は低く、同じ薬浴濃度では薬浴時間の長い程発病率が低下している。しかし実験Ⅱでは0.5ppmの区で発病率がとびぬけて高かった。ニフルブラジン(実験Ⅱ)はいずれの区も発病魚がなく、薬浴はより効果的であった。

今回の試験の結果から、水温20℃前後でニフルステレン酸ソーダの薬浴により穴あき病の予防を行なう場合、1日程度の薬浴ならば、0.25ppm以上で効果がみられ、2ppmではほぼ完全に発病阻止ができると考えられる。数時間の薬浴ではさらにそれ以上の濃度が必要であろう。

表 2 3 ニフルスチレン酸ソーダの薬浴による予防効果

(症状の区分は昭和49年度指定研究報告による)

	試験区	薬浴時間 (時間)	薬浴濃度 (ppm)	供試尾数	終了時生存魚の接種部の症状			終了時までの斃死魚		発病率 (%)
					中期症状	終期症状	異常なし	斃死尾数	症状	
実 験 I	対照区	0	0	10	尾数 4	尾数 2	尾数 2	2	中期症状	80
	ニフルスチレン酸 ソーダ薬浴区	24	1	10	2	0	8	0		20
		24	0.5	10	4	0	6	0		40
		24	0.25	10	2	2	6	0		40
		4	2	10	3	0	7	0		30
		4	1	10	5	0	5	0		50
		4	0.5	10	3	3	4	0		60
		1	2	10	4	0	6	0		40
	1	1	10	2	4	4	0		60	
	1	0.5	10	2	4	3	1	終期症状	70	
実 験 II	対照区	0	0	10	2	4	0	4	2中期症状 2終期症状	100
	ニフルスチレン酸 ソーダ薬浴区	24	4	10	0	0	9	1	体全体 立 鱗	0
		24	2	10	0	0	10	0		0
		24	1	10	1	0	9	0		10
		24	0.5	10	3	4	6	0		70
		24	0.25	10	3	1	5	1	中期症状	50
	ニフルプラジ ン薬浴区	24	2	10	0	0	10	0		0
		24	1	10	0	0	10	0		0
		24	0.5	10	0	0	10	0		0
		24	0.25	10	0	0	10	0		0

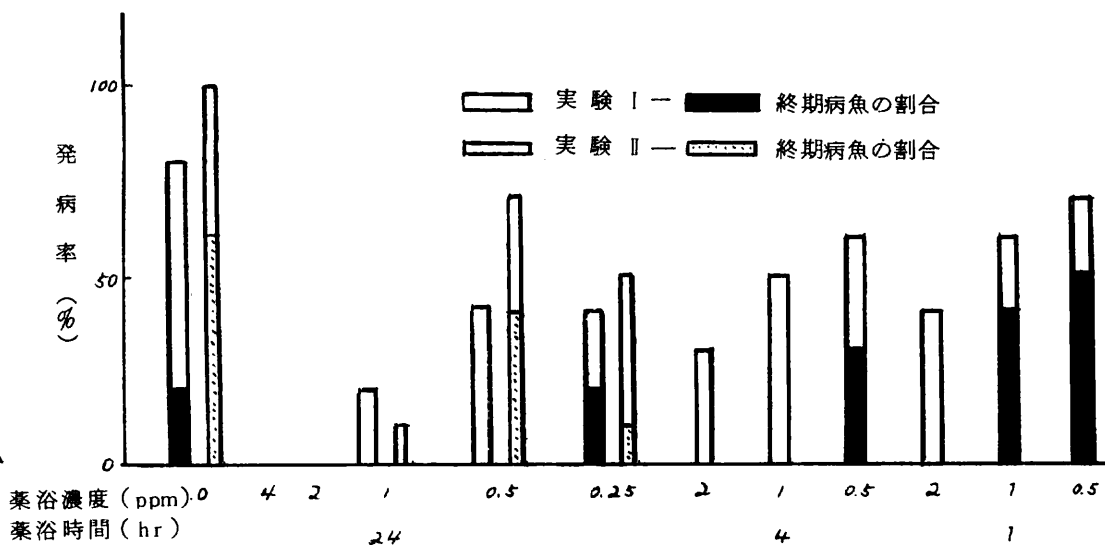


図5 ニフルスチレン酸ソーダの薬浴による予防効果

### 3. ビタミン剤と磷酸塩の投与による予防(昭和50~51年度)

栄養面からの有効な予防対策の追求を目的として、魚の体表の防禦力を高めると考えられるビタミンCを中心とした総合ビタミン剤(HS-5、武田)、および磷酸塩を投与してその効果を検討した。試験は面積約200m<sup>2</sup>の泥池を用い、魚体重1日当り、0.01%のビタミン剤、0.03%の第一磷酸ソーダを秋期(11月)20日間、春期(3月)20日間投与し、4月に取り上げて発病率を比較した。その結果を表24に示した。ワキンは4年魚の場合、ビタミン剤および磷酸塩を投与した区との間にほとんど差はなく、0年魚の場合にはむしろ投与区のほうが発病率が若干高かった。リュウキンは0年魚の投与区では対照区より発病率がやや低かったが、4年魚の投与区ではほとんど差はなかった。従って全体としてはビタミン剤等の投与は効果はなかったと考えられる。

表24 ビタミン剤、磷酸塩投与による予防効果

	キンギョの種類	年令	性別	尾数(尾)	総重量(kg)	生残率(%)	穴あき病発病率*(%)	その他の疾病*(%)
ビタミン剤 磷酸塩 投与区	ワキン	4年魚	♂	89	21.8	100	3.4	9.0
		0年魚		200	5.8	66	6.0	0.1
対 照 区	ワキン	4年魚	♀	106	45.0	98	2.9	2.9
		0年魚		200	5.2	62	0	0
対 照 区	リュウキン	4年魚	♂	74	12.1	88	12.3	0
		0年魚		167	3.8	62	1.9	3.9
ビタミン剤 磷酸塩 投与区	リュウキン	4年魚	♀	36	10.4	75	11.1	11.1
		0年魚		203	15.9	49	9.0	0.2

\* 生残数に対する発病率

#### 4. 問題点と疑問点

(1) フラン剤の薬浴による穴あき病の予防が有効である事が分り、24時間薬浴ではほぼ完全に発病を阻止できる濃度がわかったが、短時間薬浴で完全に阻止できる濃度を明らかにしておく必要がある。

(2) 業者の間ではすでに抗菌剤の経口投与による予防が行なわれている。にもかかわらず、実験的な証明がなされていない。

(3) 栄養面からの予防については、長期的に検討する必要がある。

## VI 治療

### 1. 薬浴による治療(49年度)

都水試にて発病した穴あき病魚ワキン、朱文金、ヘラブナを用い、ニフルブラジン、フラゾリドン、アルキルベンゼンスルホネイト混合物、フェノール誘導体混合物、アルキルベンジルアンモニウムクロライド、アルキルアミノエタノール、マラカイトグリーン、メチルバイオレットの8種の薬剤の薬浴による治療効果を調べた。このうちニフルブラジンは0.07~0.3 ppmの濃度範囲でかなりの治療効果がみられ、アルキルベンジルアンモニウムクロライドの0.3 ppmの反復薬浴も効果がみられた。しかし、昇温の治療に及ぼす効果が大きいため、薬剤使用と同時に昇温させる事が好ましいと考えられた。

### 2. 薬剤の経口投与による治療(49、51年度)

ワキンおよび朱文金の穴あき病魚を用いて薬剤の経口投与による治療を試みた。その結果クロラムフェニコール10~30 mg(9~13日間)、オキシテトラサイクリン50 mg(13日間)、オキシリン酸20 mg(13日間)、ナリジクス酸30 mg(10日間)、ニフルブラジン20~80 mg(11日間)、フラゾリドン80 mg(11日間)、スルフィソゾール200 mg(9~10日間)、ニフルステレン酸50~200 mg(6日間)、おのおのkg魚体重当りの投与で効果がみられた。しかし水温が26~31℃と高い場合には、薬剤の効果の判定がつかない程治療が速い。薬剤の経口投与の場合にも、水温を上昇させる事が同時にできれば、治療効果は大きいと言えよう。また薬剤の経口投与だけでは、治療中に新しい患部の発生する事があり、それはアルキルベンジルアンモニウムクロライドで薬浴を併用する事である程度予防出来た。



### 3. 薬剤の筋肉内注射による治療（50年度）

イロゴイや親キンギョ等の高価な魚の低水温時の治療方法として抗生物質の筋肉注射による治療を試みた。カナマイシン100～400mg、オキシテトラサイクリン20～40mg、クロラムフェニコール40mgの各々kg魚体重当りの1回接種で効果がみられた。しかし患部のカビ寄生率が対照に比べて2倍からそれ以上に増えており、それは薬剤濃度が高い程著しかった。低水温の場合は、抗生物質の接種と同時にマラカイトグリーン薬浴を行ない、カビの寄生を防止する事が好ましいと考えられる。

### 4. ヨード剤の塗布による治療（51年度）

個体治療法として穴あき病患部へのヨード剤の塗布を試みた。ヨード剤としてはイソジンを使い、原液と20倍、200倍、2000倍の溶液を各々20尾の琉金の中期～終期患部に1回だけ塗布したが効果はみられなかった。これは実験水温が6.8～13.7℃と低温で、病魚の組織の回復力が低下していると思われること、塗布回数が少なかったことが原因と考えられる。この方法についてはさらに検討の必要があろう。

### 5. 問題点と疑問点

1) 抗菌剤が有効であるということは穴あき病の一次原因がなにもないとしても、細菌感染症としての比重がほとんどであることを示す。と考えてよいか。

2) 低水温時での薬剤の効果が少ない。魚の活力が弱いためか、組織内濃度があがらないためか

?

3) 温度別の薬剤の効果を正確に知っておく必要がある。

4) 観賞魚の場合、特に治療より予防のほうが大事である。

5) 高価な魚の治療は注射が確実であるが、組織内濃度の低下が早い。遅延剤の工夫が必要。

昭和51年度指定調査研究総合  
助成事業「病害研究報告書」  
(温水性魚類の穴あき病)

昭和52年3月1日発行

東京都総務局総務部文書課登録  
印刷物規格表 第2類  
印刷物番号 511823  
刊行物番号 (K)76

編集 東京都水産試験場 技術管理部  
電話 (600) 2873

発行 東京都水産試験場  
(〒125)東京都葛飾区水元小合町3374番地  
電話 (03)(600)2871~3

印刷 株式会社 東 邦