

せっそう病に関する研究—XVI

実験感染アマゴ魚群からの飼育水中への排菌

森川 進

Studies on the Furunculosis in Salmonoid Fishes—XVI

On the Excretion of *Aeromonas salmonicida* from Amago Salmon Infected Furunculosis Artificially

Susumu MORIKAWA

伝染性疾病の防疫技術を検討する際には、原因菌の動態を把握する必要がある。本報ではアマゴに *A. salmonicida* の強毒株を筋肉内接種、腹腔内接種および菌浴接種によって実験感染させ、斃死状況と飼育水中への *A. salmonicida* の排菌を調べた。

方法

供試菌株 1976年に養殖ヤマメのせっそう病自然発病魚の腎臓から分離された、*A. salmonicida* AYS-2を、普通寒天培地（ニッスイ）の

高層せんし培養によって保存し、実験開始前に、アマゴを用いた筋肉内接種による4回の魚体通過を行って病原性を一定にしたものを用いた。

供試魚 岐阜水試で飼育中で、せっそう病の発病歴および抗菌剤の投与歴がない平均体重81.3gのアマゴ1年魚を、各接種法毎に10尾ずつ用いた。

菌懸濁液の調整 供試菌株を heart infusion broth（栄研）で、20℃・一夜培養し、滅菌生理食塩水で10倍段階希釈して所定の生菌数を含むように調整した。

生菌数の測定 滅菌生理食塩水を用いて、供試菌懸濁液の10倍段階希釈系列を作り、各希釈

段階の0.1mlを普通寒天培地(ニッスイ)平板上に、コンラージ棒で均一に塗抹し、20℃・3日間培養後に出現した、供試菌の定型的集落数を計数し、供試菌懸濁液1ml当りのCFU(colony forming unit)を算出した。

接種方法 筋肉内接種ではMS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、 4.4×10^3 CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液を、1尾当り0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。腹腔内接種では、同様に麻酔した供試魚に、 4.4×10^6 CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液を、1尾当り0.1mlずつ腹腔内に接種した。菌浴接種では、供試魚を5.32%食塩水に2分間浸漬後、 4.4×10^5 CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液に3分間浸漬し、清水に戻した。

実験水温 9.9~12.0℃であった。

接種後の観察 各接種区毎に15ℓ容ガラス水槽に供試魚を収容し、地下水を一槽当り約0.5ℓ/min注入して、無給餌、流水条件下で接種後4週間観察した。

死因の判定 せつそう病の肉眼的症状の有無によって判定した。

飼育水中の生菌数の測定 第2表に示した測定日に、各接種区共通の給水および各接種区の水槽の排水部より無菌的に採水し、滅菌生理食塩水を用いて10倍段階希釈系列を作って、各希釈段階の0.1mlを普通寒天培地(ニッスイ)平板上に、コンラージ棒で均一に塗抹し、20℃で培養した。7日後に出現した集落数を計数し総菌数とした。また集落のうち、円形、半透明、クリーム色、周縁無構造、表面隆起、褐色色素産

生のものを、*A. salmonicida*として計数し、試料1ml当りのCFUを算出した。なお、疑わしい集落については純培養を行い、運動性および色素産生性を参考にして判定した。検出限界は 1.0×10^1 CFU/mlである。

結 果

各接種区における斃死状況を第1表に示した。筋肉内接種では、接種後7日目に斃死が始まり12日目に全数が斃死した。腹腔内接種では、同5日目に斃死が始まり10日目に全数が斃死した。菌浴接種では、同11日目および13日目に1尾ずつ斃死したのみで、累積斃死率は20%であった。

各試料の生菌数を第2表に示した。各接種区共通の給水においては、総菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/ml(以下単位省略)で、*A. salmonicida*は検出されなかった。筋肉内接種区の排水では、総菌数は $10^2 \sim 10^4$ で、*A. salmonicida*は接種後6日目から12日目までと14日目に $10^2 \sim 10^4$ 検出された。腹腔内接種区の排水では、総菌数は $10^2 \sim 10^4$ で、*A. salmonicida*は接種後5日目から11日目に $10^2 \sim 10^4$ 検出された。菌浴接種区の排水では、総菌数は $10^2 \sim 10^4$ で、*A. salmonicida*は接種後6日目から15日目までと18, 19および22日目に $10^1 \sim 10^3$ 検出された。

考 案

本実験には開放式の貯水槽を経由する地下水

を用いたが、各接種区共通の給水の総菌数は、実験期間を通じてほぼ一定であり、出現した集落の肉眼所見も変化が見られなかったことから、この給水の細菌数および叢は安定したものと思われた。

各接種区の排水に *A. salmonicida* が初めて検出された時期を見ると、各区とも接種後 5～6 日目とほぼ一致していた。しかし斃死魚の出現

時期との関連では、筋肉内接種および腹腔内接種ではその 1 日前であったが、菌浴接種では同 6 日前であった。これは各区の累積斃死率が前二者では 100% であったのに対し、後者は 20% と感染強度が異なり、感染から斃死までの状況が異なったためであると思われた。

排出された *A. salmonicida* の菌量は、各接種区とも $10^3 \sim 10^4$ CFU/ml に達した。菌浴接種に

第 1 表 *Aeromonas salmonicida* を筋肉内接種、腹腔内接種および菌浴接種
によって実験感染させたアマゴの斃死状況

接種後日数	筋肉内接種		腹腔内接種		菌浴接種	
	斃死尾数	累積斃死率	斃死尾数	累積斃死率	斃死尾数	累積斃死率
1	0	0%	0	0%	0	0%
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	2	20	0	0
6	0	0	2	40	0	0
7	1	10	2	60	0	0
8	3	40	2	80	0	0
9	2	60	1	90	0	0
10	2	80	1	100	0	0
11	1	90			1	10
12	1	100			0	10
13					1	20
14					0	20
・					・	・
・					・	・
・					・	・
28					0	20

よる実験感染の半数致死菌量はアマゴでは $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml であり、排出された菌量では直ちに感染・発病する確証は無いが、自然状態では実験感染時より病原体に曝される時間も長く、病魚から排出された *A. salmonicida* によって、発病が拡大していくものと思われた。

以上のように、せつそう病の実験感染において、斃死魚が出現する以前に飼育水中に *A. salmonicida* が検出されることが明らかになり、飼育水中の細菌検査等によって本病の早期発見の可能性が示唆された。また斃死魚が見られる時期は、飼育水中に多量の *A. salmonicida* が排出

第2表 給水および飼育排水の総生菌数および *Aeromonas salmonicida* 生菌数

接種後日数	給水		筋肉内接種区 排水		腹腔内接種区 排水		菌浴接種区 排水	
	総生菌数	<i>A. salmonicida</i>	総生菌数	<i>A. salmonicida</i>	総生菌数	<i>A. salmonicida</i>	総生菌数	<i>A. salmonicida</i>
0	9.0×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	4.7×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	4.0×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	2.8×10^2	$< 1.0 \times 10^1$
1	3.9×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	4.4×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	5.7×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	5.4×10^2	$< 1.0 \times 10^1$
2	5.9×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	1.1×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	3.5×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	2.6×10^2	$< 1.0 \times 10^1$
3	3.6×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	4.8×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	2.0×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	3.0×10^2	$< 1.0 \times 10^1$
4	4.6×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	7.4×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	8.5×10^2	4.6×10^2	6.2×10^2	$< 1.0 \times 10^1$
5	3.1×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	4.9×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	6.0×10^2	1.0×10^1	5.7×10^2	1.0×10^1
6	3.5×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	7.5×10^2	1.0×10^1	3.2×10^3	2.6×10^3	8.2×10^2	7.1×10^2
7	1.7×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	3.9×10^3	3.5×10^3	2.4×10^3	1.9×10^3	3.6×10^2	1.0×10^1
8	9.0×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	1.6×10^4	1.5×10^4	1.5×10^3	1.1×10^3	2.9×10^2	7.0×10^1
9	3.6×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	3.3×10^4	3.3×10^4	3.3×10^4	3.2×10^4	1.6×10^4	1.5×10^3
10	2.1×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	6.4×10^3	6.0×10^3	3.1×10^2	1.0×10^1	6.8×10^2	4.9×10^2
11	1.5×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	9.6×10^3	9.2×10^3	5.1×10^2	2.0×10^1	5.1×10^3	4.8×10^3
12	1.4×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	4.5×10^3	4.0×10^3	4.3×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	3.0×10^3	2.2×10^3
13	1.9×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	4.8×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	3.4×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	7.2×10^3	6.5×10^3
14	3.1×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	1.6×10^3	1.0×10^2	1.3×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	2.2×10^3	1.0×10^2
15	1.8×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	6.0×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	7.0×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	1.8×10^3	3.0×10^2
16	NT **	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
17	3.2×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	6.3×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	NT	NT	5.5×10^2	$< 1.0 \times 10^1$
18	1.0×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	NT	NT	NT	NT	9.0×10^2	1.0×10^2
19	1.2×10^3	$< 1.0 \times 10^1$	NT	NT	NT	NT	1.0×10^3	1.0×10^2
20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
21	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
22	6.0×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	NT	NT	NT	NT	2.0×10^2	1.0×10^1
23	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
24	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
25	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
26	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
27	2.2×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	NT	NT	NT	NT	2.5×10^2	$< 1.0 \times 10^1$
28	2.7×10^2	$< 1.0 \times 10^1$	NT	NT	NT	NT	3.5×10^2	$< 1.0 \times 10^1$

* CFU/ml ** 測定せず 斜線部は斃死魚の見られた期間を表す

されることや、長野水指がニジマスを用いて筋肉内接種によって同様な実験を行い、斃死魚が腐敗すると多量の *A. salmonicida* を排出することを指摘していることから、発病の拡大を防ぐために斃死魚の早期撤去が必要であると思われる。

文 献

- 1) 長野県水産指導所, 1980; 昭和54年度魚病対策技術開発研究報告書(冷水性魚類の防疫方法についての研究), 12pp.

On First Observation of Bacterial Kidney Disease in Gifu Prefecture

Akiyuki ARAI, Yoshinaga RAWASE, Susumu HIRIKAWA

本報告は、本邦初観測された細菌性腎臓病(BKD)の発生を、ニジマス(サケ科の大西洋サケ *Salmo gairdneri*)、オホニジマス(アメリカのカワマス *Salvelinus gairdneri*)で発生、感染された魚類から検出された細菌の特性を報告する。本邦では、本村・東田が、1973年から1974年にかけて北海道のマス(サケ科 *Oncorhynchus tshawytscha*)、ヒメマス(サケ科 *Oncorhynchus masou*)での腎臓病を報告しているのが最初で、以後、北海道のオホニジマス(*O. tshawytscha*)、マス(サケ科 *Oncorhynchus tshawytscha*)、オホニジマス(サケ科 *Oncorhynchus tshawytscha*)、ヒメマス(サケ科 *Oncorhynchus masou*)、イナガワ(イナガワマス *Oncorhynchus masou*)の交雑種、および本邦の存在が報告されている。本報告は、長野県水産指導所

本邦初観測された細菌性腎臓病(BKD)の発生を、ニジマス(サケ科の大西洋サケ *Salmo gairdneri*)、オホニジマス(アメリカのカワマス *Salvelinus gairdneri*)で発生、感染された魚類から検出された細菌の特性を報告する。本邦では、本村・東田が、1973年から1974年にかけて北海道のマス(サケ科 *Oncorhynchus tshawytscha*)、ヒメマス(サケ科 *Oncorhynchus masou*)での腎臓病を報告しているのが最初で、以後、北海道のオホニジマス(*O. tshawytscha*)、マス(サケ科 *Oncorhynchus tshawytscha*)、オホニジマス(サケ科 *Oncorhynchus tshawytscha*)、ヒメマス(サケ科 *Oncorhynchus masou*)、イナガワ(イナガワマス *Oncorhynchus masou*)の交雑種、および本邦の存在が報告されている。本報告は、長野県水産指導所