

サケ科魚類のせっそう病の防除に関する研究

森 川 進

Studies on Control of the Furunculosis in Salmonid Fishes

by

Susumu MORIKAWA

岐阜県淡水魚研究所研究報告 第48号 平成15年3月
岐阜県淡水魚研究所

REPORT No.48, March 2003

GIFU PREFECTURAL FRESH WATER FISH RESEARCH INSTITUTE
Hane, Hagiwara-cho, Mashita-gun, Gifu

岐阜県淡水魚研究所研究報告
第48号

目 次

サケ科魚類のせっそう病の防除に関する研究

.....森川 進 1

REPORT OF
GIFU PREFECTURAL FRESH WATER FISH
RESEARCH INSTITUTE
No.48

CONTENTS

MORIKAWA,Susumu

Studies on Control of the Furunculosis in Salmonid Fishes	1
---	---

目 次

緒 言	1
第Ⅰ章 <u>Aeromonas salmonicida</u> の病原性	6
第1節 各種サケ科魚類に対する病原性	6
実験1 背鰭下筋肉接種	6
実験2 腹腔内接種	8
実験3 菌浴接種	10
第2節 アマゴに対する新鮮分離株の病原性	18
第3節 アマゴに対する病原性の菌株保存に伴う変化	24
実験1 病原性の低下した菌株の魚体通過による病原性の変化	24
実験2 病原性を高めた菌株の高層穿刺培養保存および継代培養 保存による病原性の変化	29
実験3 実験感染致死魚体中の凍結保存による病原性の変化	33
小括	40
第Ⅱ章 <u>A. salmonicida</u> のアマゴに対する実験感染技法の検討	41
第1節 実験感染におよぼす接種ルートの影響	41
第2節 実験感染におよぼす水温の影響	48
第3節 実験感染におよぼす供試魚体重の影響	52
第4節 実験感染におよぼす供試魚の相の影響	55
小括	59
第Ⅲ章 <u>A. salmonicida</u> の魚体内における動態	61
第1節 実験感染における接種ルート別のアマゴの各臓器中の生菌 数の消長	61
第2節 実験感染アマゴ魚群からの飼育水中への接種菌の排菌	73
第3節 実験感染アマゴ魚群における不顕性感染魚の検出	79
実験1 実験感染生残魚群からの不顕性感染魚の検出	79
実験2 実験感染後抗菌剤によって治癒した魚群からの不顕性感 染魚の検出	82
第4節 自然発病経歴のない魚群からの不顕性感染魚の検出	86
小括	91

第IV章 実験感染系を用いたアマゴのせっそう病治療試験法の検討	93
第1節 投薬治療時の魚体内の <u>A. salmonicida</u> 菌数の変化	93
第2節 <u>A. salmonicida</u> の接種ルートと治療効果との関係	99
第3節 接種菌量と治療効果の関係	103
第4節 抗菌剤の投与開始時期と治療効果との関係	107
実験1 スルファモノメトキシンについて	107
実験2 ナリジクス酸について	116
第5節 ピリドンカルボン酸系薬剤の魚体内濃度について	127
実験1 ナリジクス酸について	127
実験2 ピロミド酸について	128
小括	133
 第V章 <u>A. salmonicida</u> の薬剤感受性とせっそう病の治療試験	135
第1節 <u>A. salmonicida</u> の薬剤感受性の年変化	135
第2節 実験感染魚群に対する治療試験	141
試験1 サルファ剤とピリミジン誘導体との合剤について	141
試験2 抗生物質について	143
試験3 ピリドンカルボン酸系薬剤について	145
第3節 自然発病魚群に対する治療試験	151
試験1 スルファモノメトキシンとオルメトプリムの合剤について	151
試験2 スルフィソゾールとトリメトプリムの合剤について	152
試験3 オキソリン酸について	154
試験4 ナリジクス酸について	156
小括	163
 第VI章 せっそう病に対する予防免疫の試み	164
第1節 ワクチン腹腔内注射	164
試験1 河川水使用池での実用規模におけるワクチン注射の効果 (1)	164
試験2 河川水使用池での実用規模におけるワクチン注射の効果 (2)	169
試験3 水温が一定な飼育池におけるワクチン注射の効果	177
試験4 飼育魚に継年ワクチン注射した場合の効果	181
第2節 経口免疫	191

試験 1 ホルマリン死菌および加熱死菌ワクチンの経口投与による予防免疫効果	191
試験 2 超音波処理菌体経口ワクチンの投与効果（1）	193
試験 3 超音波処理菌体経口ワクチンの投与効果（2）	197
第3節 浸漬免疫	208
試験 1 ブイヨン培地（ニッスイ）で培養した、 <u>A. salmonicida</u> ホルマリン不活化菌体の懸濁液による浸漬免疫の効果	208
試験 2 C Y B ブイヨンで培養した、 <u>A. salmonicida</u> ホルマリン不活化菌体の懸濁液による浸漬免疫の効果	212
小括	218
総括	220
謝辞	228
文献	229

緒　　言

我が国における、ニジマス (Salmo gairdneri) を主体としたマス類の養殖は、第二次世界大戦以前には、最も生産量の多かった1943年でも約 500トンで、それ程大きな事業ではなかったが、戦後、冷凍ニジマスの対米輸出の開始を契機として、生産量が飛躍的に伸び、1952年の生産量は 166トンであったのに対して、1956年には 1,566トンに増加し、1969年には10,000トンを突破した（鎌田ら 1974、全国湖沼河川養殖研究会養鱈部会 1976）。近年は17,000トン前後の生産をあげている（表-1）。一方、アマゴ (Oncorhynchus rhodurus) およびヤマメ (O. masou)を主体とする在来マス類（統計資料には＜その他のマス類＞と表示）の池中養殖技術が1970年頃に確立され、その生産量は表-1に示したように、1973年には 715トンであったものが、1975年には 1,000トンを突破し、近年は 3,000トン前後となっている。

養殖生産量の増加に伴い、対象魚類の疾病による被害も増加しているが、表-2に示したように、近年の魚病被害は、ニジマスで養殖生産量（額）の5%前後、その他のマス類で10%前後となっている。このように、ニジマスとその他のマス類との魚病被害に2倍もの差がみられるのは、その他のマス類がニジマスに比較して、せっそう病や水カビ病をはじめとする各種疾病に罹りやすいためであると考えられている。特に、せっそう病による被害は、ニジマスでは魚病被害の1%前後と僅少であるが、その他のマス類では30%前後と大きな比重を占めており、アマゴやヤマメの養殖にとって、せっそう病は最も重要な疾病であると言える。全国各地の水産試験場等での魚病診断件数およびそのうちせっそう病と診断された件数を表-3に示した。せっそう病と診断された件数の割合は、ニジマスの稚魚で1%前後、成魚で3%前後であったのに対し、その他のマス類の稚魚で15%

表－1 養殖マス類の生産量（額）の推移

年	ニジマス	その他のマス類	ギンザケ
1973	15,707トン	715トン	
1974	16,684	947	
1975	15,557	1,168	
1976	15,332	1,505	
1977	16,033	1,584	
1978	17,166	1,863	72トン
1979	16,714	1,750	370
1980	17,698	14,030百万円	2,274 3,606百万円 1,855
1981	17,819	10,905	2,415 3,260 1,150
1982	18,230	11,891	2,459 2,403 2,122
1983	17,817	9,262	2,896 2,281 2,760
1984	16,773	10,215	3,047 1,856 5,049
1985	16,324	10,547	2,973 1,921 6,990

(農林水産省統計情報部：漁業・養殖業生産統計年報より)

表-2 農業マス類の魚病被害量(額)およびせっそう病被害量(額)の推移

年	ニジマス					その他のマス類						
	魚病被害量 A	せっそう病 被害量 B	B/A	魚病被害額 A	せっそう病 被害額 B	B/A	魚病被害量 A	せっそう病 被害量 B	B/A	魚病被害額 A	せっそう病 被害額 B	B/A
1980	543.6	9.0	1.7	百万円 554.2	4.7	0.8	百万円 210.2	95.6	45.5	百万円 285.6	86.8	30.4
1981	584.7	3.8	0.6	百万円 568.0	2.5	0.5	百万円 241.4	107.5	44.5	百万円 390.0	143.8	36.9
1982	817.8	7.1	0.9	百万円 874.1	5.8	0.7	百万円 216.0	66.9	31.0	百万円 339.3	88.7	26.1
1983	761.7			565.4			182.1	73.1	40.1	203.1	64.9	32.0
1984	774.0	13.5	1.7	718.6	9.4	1.3	200.7	85.3	42.5	150.3	49.7	33.1
1985	668.9	5.8	0.9	584.3	5.6	1.0	147.4	53.6	36.4	260.4	80.8	31.0

(水産庁研究部研究課：魚病被害、水産用医薬品使用状況の実態調査結果より)

表-3 公的機関における養殖マス類の魚病診断件数およびせつそう病診断件数の推移

年	ニジマス						その他マス類					
	種魚 魚病診断 件数 A	せつそう病 診断件数 B	B/A	魚病診断 件数 A	せつそう病 診断件数 B	B/A	種魚 魚病診断 件数 A	せつそう病 診断件数 B	B/A	魚病診断 件数 A	せつそう病 診断件数 B	B/A
1970	276件	0件	0%	0件	0件	0%	139	40	28.8	—	—	—
1971	301	0	0	—	—	—	228	60	26.3	—	—	—
1972	209	0	0	—	—	—	392	76	19.4	—	—	—
1973	273	3	1.1	—	—	—	293	57	19.5	103	49	47.6
1974	328	6	1.8	—	—	—	290	67	23.1	77	31	40.3
1975	650	9	1.4	—	—	—	152	20	13.2	157	57	36.3
1976	519	8	1.5	86	2	2.3	199	25	12.6	206	105	51.0
1977	545	2	0.4	69	2	2.9	225	20	8.9	185	68	36.8
1978	356	1	0.3	115	3	2.6	171	16	8.0	202	78	38.6
1979	471	0	0	106	6	5.7	199	25	12.6	206	105	51.0
1980	375	0	0	165	2	1.2	225	20	8.9	185	68	36.8
1981	420	1	0.2	171	3	1.8	199	16	8.0	202	78	38.6
1982	407	5	1.2	116	6	5.2	218	34	15.6	147	53	36.1
1983	253	1	0.4	189	2	1.1	213	30	14.1	221	82	37.1
1984	259	0	0	156	6	3.8	222	23	10.4	252	76	30.2
1985	260	3	1.2	159	3	1.9	214	24	11.2	229	83	36.2

(全国養鶏技術協議会資料より)

前後、成魚で40%前後であり、やはり、アマゴやヤマメの養殖におけるせっそう病の重要性を示している。

前述したように、アマゴおよびヤマメを主体とする在来マス類の池中養殖生産量は、池中養殖技術が確立されてから1976年頃までは順調に伸びてきた。これは、在来マス類の市場価格がニジマスのそれに比較して2～3倍高く、新規開業者やニジマス養殖業者の転業あるいは兼業生産業者の生産意欲が高かったためである。しかし、養殖生産量の増加に伴い、せっそう病による被害が増加し、1977年以降は生産量の伸びが鈍化し、生産業者の廃業やニジマス養殖へ転業する例もみられている。

せっそう病は、ドイツにおいてEMMERISCH and WEIBEL(1890)によって最初に記載された、Aeromonas salmonicida を原因菌とするサケ科魚類の細菌性疾病である。我が国では、1929年頃、長野県明科魚類増殖場のニジマスで発病がみられたとされており（江草 1978）、近年では水産庁研究部研究課の魚病分布調査によると44都道府県においてその発生がみられ、全国的に蔓延している。本病はサケ科魚類の疾病のなかでも、最も古くから知られ、最も広範囲な研究がなされてきており（江草 1978）、既往の研究については、McCRAW(1952)、HERMAN(1968)およびSNIESZKO and BULLOCK(1975)等の総説があるが、マス類の養殖現場に即した実用的な見地からの研究は少ない。

本研究は以上のような背景のもとに、1969年から在来マス類、とりわけアマゴの池中養殖におけるせっそう病の防除対策を確立する目的で、実用的な見地に立って、A. salmonicidaのサケ科魚類に対する病原性、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法、A. salmonicidaの感染魚体内における動態、実験感染系を用いたアマゴのせっそう病の治療実験、A. salmonicidaの薬剤感受性と薬剤治療試験およびせっそう病に対する予防免疫について検討したものである。

第Ⅰ章 Aeromonas salmonicida の病原性

A. salmonicidaを原因菌とするサケ科魚類のせっそう病の防除対策を考えるうえで、A. salmonicidaの病原性を明らかにすることは、最も基本的かつ重要なことである。そこで本章では、A. salmonicidaの各種サケ科魚類に対する病原性、新鮮分離株のアマゴに対する病原性、アマゴに対する病原性の菌株保存に伴う変化について検討した。

第1節 各種サケ科魚類に対する病原性

A. salmonicidaはサケ科魚類のせっそう病の病原体として知られており、池中養殖過程における各種サケ科魚類に大きな被害を与えている。その被害状況は飼育環境の影響を強く受けるために千差万別であるが、我が国の代表的な池中養殖サケ科魚類であるニジマスは、アマゴおよびヤマメ等に比較して養殖経営体数および生産量が圧倒的に多いにもかかわらず、せっそう病の発生件数および被害量が少ないことが知られており（江草 1978、長野水試 1987）、各種サケ科魚類に対するA. salmonicidaの病原性が魚種によって異なるものと思われる。そこで本節では、A. salmonicidaの各種サケ科魚類に対する病原性の差異を明らかにするために、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によるそれぞれの魚種の半数致死菌量（以下本章ではLD₅₀とする）について検討した。

実験1 背鰭下筋肉接種

実験方法

供試菌株 1976年に熊本県の養魚場において、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 株を、普通寒天培地（ニッスイ）の高層穿刺培養によって室温で保存し、実験開始前に、アマゴを用いた背鰭下筋肉接種による4回の魚体通過を行って病原性を高めたものを用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康なアマゴ（平均体重 8.6g、以下同様）、ヤマメ（8.6g）、サクラマス（O. masou）（7.9g）、イワナ（Salvelinus pluvius）（6.1g）およびニジマス（6.5g）の0年魚を各接種菌量毎に30尾ずつ用いた。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（ 10^8 CFU <colony forming unit>/ml になる）、滅菌生理食塩水で 10^{-5} ～ 10^{-8} まで10倍段階希釈した。なお、A. salmonicidaの菌懸濁液は0°Cでは4時間以内は生菌数の変動が認められないことがすでに明らかにされている（岐阜水試 1979）ので、供試菌懸濁液を接種終了時まで氷水中に静置した。

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0.1 ml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°C・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1 ml当たりのCFUを算出した。

接種方法 MS-222 の 100ppm 溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、供試魚の感受性によって異なるが、表-4に示したように、 2.8×10^0 ～ 2.8×10^3 CFU/mlの間の3段階の菌量の供試菌懸濁液を、1尾当たり 0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。なお、接種に要した時間はおよそ1時間であった。

実験水温 18.2～19.0°Cであった。

供試魚の飼育および観察 15l 容ガラス水槽に供試魚を収容し、地下水を

一槽当たり約0.5 ℥ /min注入し、流水条件下で接種後2週間観察した。なお、実験期間中は給餌を行わなかった。

死因の判定 せっそう病の定型的外観症状の有無によって判定した。

LD₅₀の算出 せっそう病による斃死率から、プロビット法（キャノン販売K.K.コンピュータソフト [LD₅₀ {プロビット法}])によりLD₅₀とその95%信頼区間を算出した。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、接種部筋肉における膨隆患部の形成、鰓基部の発赤、肛門の発赤・拡張等、せっそう病自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。各供試魚種について各接種菌濃度における斃死率および算出されたLD₅₀を表-4に示した。各魚種のLD₅₀は、アマゴ1.8×10⁰ CFU/fish、ヤマメ7.6×10⁰ CFU/fish、ニジマス1.4×10¹ CFU/fish、サクラマス6.5×10¹ CFU/fish、イワナ8.4×10¹ CFU/fishの順であった。

実験2 腹腔内接種

実験方法

供試菌株 実験1と同じである。

供試魚 実験1と同じである。

菌懸濁液の調整 実験1と同じである。

生菌数の測定 実験1と同じである。

接種方法 実験1と同様に麻酔を施した供試魚に、表-5に示したように

表-4 背鰭下筋肉接種による Aeromonas salmonicida AYS-2 株のアマゴ、ヤマメ、サクラマス、イワナおよびニジマスに対する半数致死菌量 (LD_{50})

魚種	菌数 (CFU/fish)	供試尾数	斃死率 (%)	LD_{50} (CFU/fish)	95%信頼区間 (CFU/fish)
アマゴ	2.8×10^1	30	100		
	2.8×10^0	30	70.0	1.8×10^0	$1.2 \times 10^{-1} \sim 3.5 \times 10^0$
	2.8×10^{-1}	30	26.7		
ヤマメ	2.8×10^1	30	96.7		
	2.8×10^0	30	46.7	7.6×10^0	$3.9 \times 10^0 \sim 1.2 \times 10^1$
	2.8×10^{-1}	30	6.7		
サクラマス	2.8×10^2	30	90.0		
	2.8×10^1	30	50.0	6.5×10^1	$1.1 \times 10^1 \sim 1.2 \times 10^2$
	2.8×10^0	30	26.7		
イワナ	2.8×10^2	30	80.0		
	2.8×10^1	30	53.3	8.4×10^1	$6.4 \times 10^0 \sim 1.5 \times 10^2$
	2.8×10^0	30	23.3		
ニジマス	2.8×10^2	30	100		
	2.8×10^1	30	93.3	1.4×10^1	$1.4 \times 10^0 \sim 2.7 \times 10^1$
	2.8×10^0	30	16.7		

$1.7 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^7$ CFU/ml の間の 4 段階の菌量の供試菌懸濁液を、1 尾当たり 0.1 ml ずつ腹腔内に接種した。なお、接種に要した時間はおよそ 1 時間であった。

実験水温 実験 1 と同じである。

供試魚の飼育および観察 実験 1 と同じである。

死因の判定 実験 1 と同じである。

LD₅₀の算出 実験 1 と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、実験 1 と同様、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。各魚種について各接種菌濃度における斃死率および算出された LD₅₀ を表-5 に示した。各魚種の LD₅₀ は、ヤマメ 9.1×10^2 CFU/fish、アマゴ 1.4×10^3 CFU/fish、ニジマス 9.1×10^4 CFU/fish、サクラマス 9.3×10^4 CFU/fish、イワナ 2.6×10^5 CFU/fish の順であった。

実験 3 菌浴接種

実験方法

供試菌株 実験 1 と同じである。

供試魚 実験 1 と同じである。

菌懸濁液の調整 実験 1 と同じである。

生菌数の測定 実験 1 と同じである。

接種方法 供試魚を 5.32% 食塩水に 2 分間浸漬後、直ちに表-6 に示したように $1.7 \times 10^5 \sim 1.7 \times 10^7$ CFU/ml の 3 段階の菌量の供試菌懸濁液に 3 分間浸漬し、

表-5 腹腔内接種による *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株のアマゴ、ヤマメ、
サクラマス、イワナおよびニジマスに対する半数致死菌量 ($L D_{50}$)

魚種	菌数 (CFU/fish)	供試尾数	斃死率 (%)	$L D_{50}$ (CFU/fish)	95%信頼区間 (CFU/fish)
アマゴ	1.7×10^4	30	100		
	1.7×10^3	30	60.0	1.4×10^3	$4.6 \times 10^2 \sim 3.7 \times 10^3$
	1.7×10^2	30	26.7		
	1.7×10^1	30	0		
ヤマメ	1.7×10^4	30	100		
	1.7×10^3	30	76.7	9.1×10^2	$3.3 \times 10^2 \sim 1.7 \times 10^4$
	1.7×10^2	30	40.0		
	1.7×10^1	30	16.7		
サクラマス	1.7×10^5	30	100		
	1.7×10^4	30	80.0	9.3×10^4	$4.1 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^5$
	1.7×10^3	30	36.7		
	1.7×10^2	30	13.3		
イワナ	1.7×10^6	30	96.7		
	1.7×10^5	30	60.0	2.6×10^5	$5.7 \times 10^4 \sim 4.7 \times 10^5$
	1.7×10^4	30	36.7		
	1.7×10^3	30	23.3		
ニジマス	1.7×10^5	30	100		
	1.7×10^4	30	76.7	9.1×10^4	$3.3 \times 10^4 \sim 1.7 \times 10^5$
	1.7×10^3	30	40.0		
	1.7×10^2	30	16.7		

その後清水に戻した。なお接種に要した時間はおよそ20分間であった。

死因の判定 せっそう病の定型的外観症状の有無によって判定し、外観症状がない斃死魚については、普通寒天培地（ニッスイ）平板を用い、腎臓からのA. salmonicidaの分離の有無により判定した。

実験水温 実験1と同じである。

供試魚の飼育および観察 実験1と同じである。

LD₅₀の算出 実験1と同じである。

実験結果

本実験におけるほとんどの斃死魚の外観症状は、実験1と同様、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたこと、また、外観症状がないすべての斃死魚から、A. salmonicidaが分離され、他の病原菌は分離されなかったことから、すべてせっそう病による斃死であると判断された。各供試魚種について各接種菌濃度における斃死率および算出されたLD₅₀を表-6に示した。各魚種のLD₅₀は、アマゴ1.8×10⁷ CFU/ml、ヤマメ2.8×10⁷ CFU/mlであったが、サクラマスおよびイワナでは各実験区とも斃死がみられず、ニジマスでは、1.7×10⁷ CFU/ml区で2尾の斃死がみられただけで、LD₅₀はいずれも1.7×10⁷ CFU/ml以上であった。

考 察

現在までにA. salmonicidaに対して、感受性を有すると報告されているサケ科魚類は、Lake trout (Salvelinus namaycush)、Dolly Verden trout (S. malma spectabilis)、カワマス (S. fontinalis)、ブラウンマス (Salmo trutta)、

表-6 菌浴接種による *Aeromonas salmonicida* AYS-2株のアマゴ、ヤマメ、
サクラマス、イワナおよびニジマスに対する半数致死菌量 (LD_{50})

魚種	菌数 (CFU/ml)	供試尾数	斃死率 (%)	LD_{50} (CFU/ml)	95%信頼区間 (CFU/ml)
アマゴ	1.7×10^7	30	46.7		
	1.7×10^6	30	10.0	1.8×10^7	$1.3 \times 10^7 \sim 3.1 \times 10^7$
	1.7×10^5	30	0		
ヤマメ	1.7×10^7	30	26.7		
	1.7×10^6	30	6.7	2.8×10^7	$1.9 \times 10^7 \sim 2.4 \times 10^8$
	1.7×10^5	30	0		
サクラマス	1.7×10^7	30	0		
	1.7×10^6	30	0	$>1.7 \times 10^7$	—————
	1.7×10^5	30	0		
イワナ	1.7×10^7	30	0		
	1.7×10^6	30	0	$>1.7 \times 10^7$	—————
	1.7×10^5	30	0		
ニジマス	1.7×10^7	30	6.7		
	1.7×10^6	30	0	$>1.7 \times 10^7$	—————
	1.7×10^5	30	0		

ニジマス、Cutthroat trout (S. clarki)、大西洋サケ (S. salar)、Grayling (Thymallus vulgaris、T. signifer)、Rocky Mountain whitefish (Prosopium williamsoni)、Chub (Squalius cephalus) (McCRAW 1952)、ギンザケ (Oncorhynchus kisutch)、マスノスケ (O. tshawytscha)、Lough Neagh pollan (Coregonus pollan) (HERMAN 1968)、サクラマス、カラフトマス (Oncorhynchus gorbuscha) (木村 1970)、アマゴ、Lake whitefish (Coregonus clupeaformis) (ANKELI 1971)、サケ (Oncorhynchus keta)、ヒメマス (O. nerka) (EVELYN 1971)、ビワマス (O. rhodurus rhodurus) (AOKI et al. 1971)、ヤマメ (AOKI et al. 1972)、Grayling (Thymallus thymallus) (BUCKE 1980) の7属・23種（2亜種を含む）で、本実験に供試したイワナを除く4魚種は過去において感受性のあることがすでに報告されている。しかし、イワナは養殖現場においては、せっそう病がしばしば問題になっているが、自然発生例の報告は見当たらない。今回、供試した5魚種は、いずれも A. salmonicidaに対して感受性があると言える。

3種の菌接種法における各魚種に対する A. salmonicida の LD₅₀ およびその95%信頼区間を図-1に示した。菌接種法の相違による LD₅₀ の差異については、背鰭下筋肉接種では、10⁰ ~ 10¹ CFU/fish であったのに対し、腹腔内接種では、10² ~ 10⁵ CFU/fish で、背鰭下筋肉接種の方が低かったが、菌浴接種は接種ルートが明らかに異なることから、単純に比較することができなかった。

菌接種法別に魚種ごとの LD₅₀ を比較すると、背鰭下筋肉接種では、アマゴ < ヤマメ < ニジマス < サクラマス < イワナ、腹腔内接種では、ヤマメ < アマゴ < ニジマス < サクラマス < イワナ、菌浴接種では、アマゴ < ヤマメ < ニジマス = サクラマス = イワナとなった。これらの結果から A. salmonicida の各種サケ科魚類に対する病原性は、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種の3通りの接種法

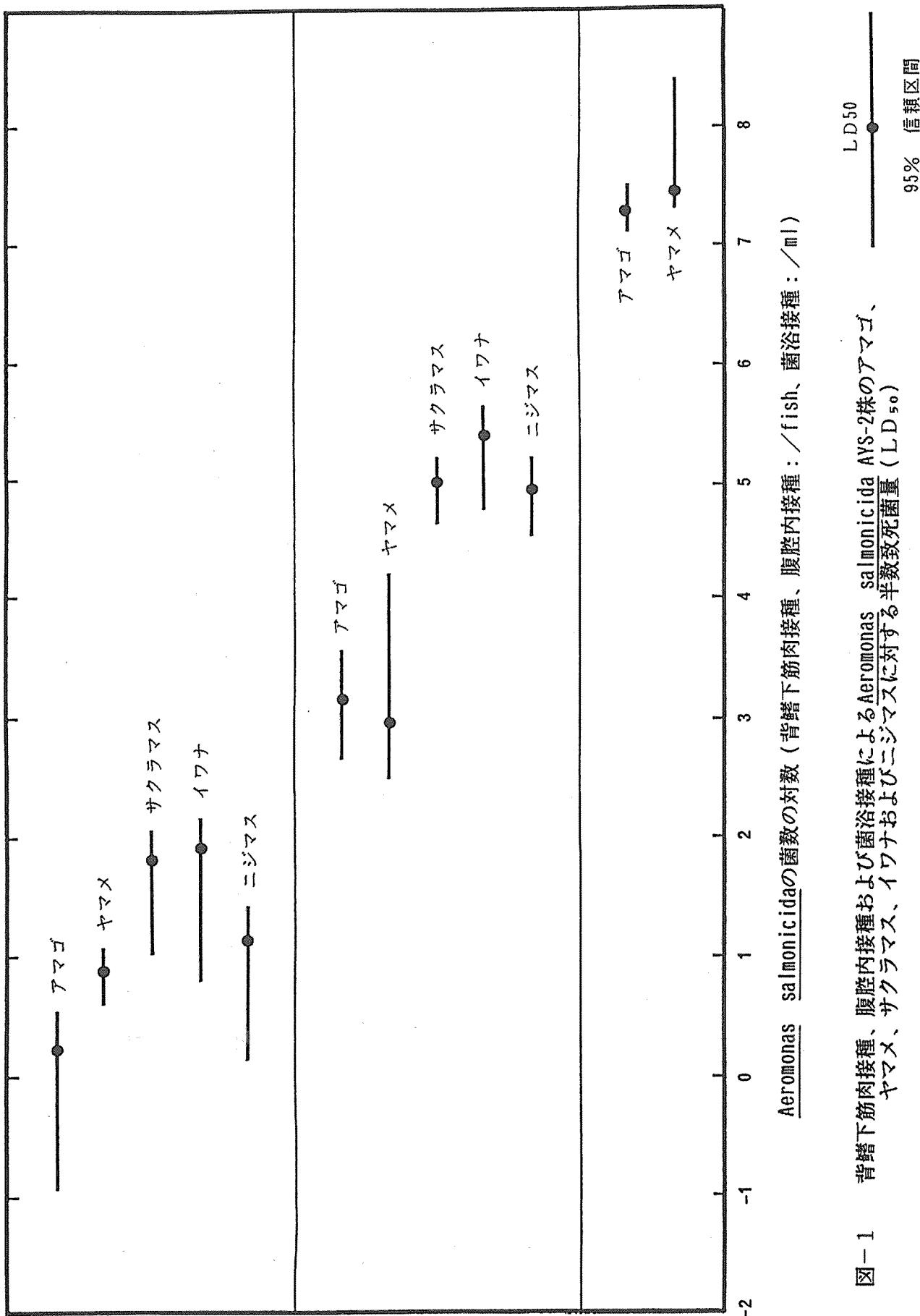


図-1

背鰭下筋肉接種、腹腔内接種による *Aeromonas salmonicida* AYS-2株のアマゴ、
ヤマメ、サクラマス、イワナおよびニジマスに対する半致死菌量 (LD_{50})

95% 信頼区間

LD_{50}

Aeromonas salmonicida の菌数の対数 (背鰭下筋肉接種、腹腔内接種: / fish、菌浴接種: / ml)

について総合的に考えると、アマゴおよびヤマメに対しては強く、サクラマス、イワナおよびニジマスに対しては前二者に比較して弱いと考えられた。このことは、従来ニジマスを主要魚種としていた我が国の養鱒業においてはせっそう病による被害はほとんどみられなかつたが、近年アマゴおよびヤマメの養殖が盛んになるにつれて、せっそう病が問題化してきつつあること（江草 1978、長野水試 1987）の裏付けと考えられる。McCRAW (1952) は、1920年代から1940年代に欧米で報告されたデータから、ニジマスの A. salmonicida に対する感受性は、大西洋サケ、ブラウンマスおよびカワマスより低いとしており、また、CIPRIANO and HEARTWELL III (1986) も、米国の Reeds Creek 培育場におけるせっそう病の被害は、ブラウンマスに多くカワマスがそれに次ぐが、ニジマスではほとんどないとしており、ニジマスの A. salmonicida に対する感受性が低い点では本実験の結果と一致する。しかし、宇野(1976)は、A. salmonicida のアマゴ、ヒメマス、イワナおよびニジマスに対する病原性を背鰭下筋肉接種によって比較し、イワナの感受性が最も高かったとしているが、その実験結果を統計学的に検討すると、供試された4魚種の感受性に有意差があるとは考えられなかった。

なお、ヤマメはサクラマスの亜種とされているが、本実験結果のように、ヤマメとサクラマスに対する A. salmonicida の病原性がかなり異なることは興味深い。

以上のように A. salmonicida の病原性は、我が国の養鱒業の主要魚種であるニジマスに比較して、アマゴおよびヤマメに対しては強いことが明らかになった。アマゴおよびヤマメの池中養殖技術は、昭和40年代前半に確立されたが（本荘・原 1973）、ニジマス養殖の技術を準用したものが多い。A. salmonicida は絶対性病原体とされている (SNIESZKO 1964) が、せっそう病の発生が飼育環境条件に影響されることも多いとされている（山崎ら 1977）ことから、A. salmonicida のアマゴおよびヤマメに対する病原性が、ニジマスよりも強いことを考慮

すると、特にせっそう病対策に重点をおいた、アマゴおよびヤマメ独自の養殖技術を確立する必要があると考えられる。また、この際には池中養殖において、ニジマスではほとんどみられないスモルト化現象が、アマゴおよびヤマメでは顕著にみられることから、後述するようにスモルト化魚のせっそう病に対する感受性がバーに比較して高いことも、併せ考える必要があると思われる。

なお、本実験において供試魚は菌接種後2週間、給餌をしないで観察を行った。長期間にわたる無給餌の影響については、体重や体成分の変化等に関する報告はあるが（新聞ら 1976、竹内・渡辺 1982）、疾病に対する抵抗性のような魚の生理条件におよぼす影響は明らかにされていない。本実験においては、斃死がみられない実験区があり、菌接種2週間後に生残した供試魚は、やや瘦せる以外には異常が認められなかったことから、観察期間中の無給餌が実験結果に大きな影響をおよぼしていないと判断された。

第2節 アマゴに対する新鮮分離株の病原性

A. salmonicidaは、各種サケ科魚類に対して病原性を有するとされていたが、前節ではA. salmonicidaの各種サケ科魚類に対する、病原性の差異を明らかにした。本節では岐阜県内の各地の養魚場の、アマゴおよびイワナの0年魚および1年魚の自然発病魚群から分離された、A. salmonicida新鮮分離株のアマゴに対する病原性を比較検討した。

実験方法

供試菌株 表-7に示したように、1987年の6月から8月にかけて、岐阜県内の4町村にある5養魚場において、アマゴおよびイワナの0年魚および1年魚のせっそう病自然発病魚の腎臓から分離した8株のA. salmonicidaを直ちに供試した。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病の発病歴がなく、健康な平均体重29.8gのアマゴ1年魚を各区20尾ずつ用いた。

菌懸濁液の調整 自然発病魚からの分離菌株を普通寒天培地（ニッスイ）を用いて20°C・72時間培養を行った後、前節と同様にハートインフュージョンプロス（栄研）で20°C・一夜培養し、滅菌生理食塩水で 10^{-5} ～ 10^{-8} まで10倍段階希釈した。

接種方法 MS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、表-8に示したように 1.3×10^0 ～ 5.0×10^3 CFU/mlの間の3または4段階の菌量の供試菌懸濁液を、1尾当たり0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。なお、接種に要した時間はおよそ40分間であった。

実験水温 電気ヒーターを用いて、 19 ± 0.5 °Cに制御した。

表-7 病原性試験に用いたAeromonas salmonicida新鮮分離株の由来

菌株No.	魚種	魚齢	養魚場の所在地	分離年月日
G8706	アマゴ	1	岐阜県 萩原町	1987. 6. 24
AM8701	アマゴ	1	岐阜県 河合村	1987. 7. 4
CT8705	アマゴ	1	岐阜県 明方村	1987. 7. 14
CT8710	アマゴ	0	岐阜県 明方村	1987. 7. 14
AM8702	イワナ	1	岐阜県 河合村	1987. 7. 19
W8701	イワナ	1	岐阜県 白川村	1987. 8. 7
ND8704	アマゴ	1	岐阜県 白川村	1987. 8. 7
G8712	アマゴ	0	岐阜県 萩原町	1987. 8. 11

生菌数の測定 第1節と同じである。

供試魚の飼育および観察 第1節と同じである。

死因の判定 第1節と同じである。

LD₅₀の算出 第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、第1節、実験1と同様、せっそく病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそく病による斃死であると判断された。各菌株の各接種菌濃度における斃死率および算出されたLD₅₀を表-8に示した。各菌株のLD₅₀は、G8706株2.3×10¹ CFU/fish(以下本節では単位を省略)、AM8701株8.9×10⁰、CT8705株7.7×10⁰、CT8710株9.9×10⁰、AM8702株9.6×10¹、W8701株1.9×10²、ND8704株1.1×10²、G8712株1.7×10¹であった。

考 察

A. salmonicidaの各種サケ科魚類に対する病原性については、subsp. salmonicidaについて BULLOCK et al. (1976)、GROBERG et al. (1978), MICHEL(1980)の、subsp. masoucidaについて木村(1970)の報告があるが、いずれも凍結保存株または魚体通過株を用いており、新鮮分離株についての検討は行われていない。

本実験では、8株の新鮮分離株のアマゴに対する病原性を比較検討したが、そのLD₅₀が、図-2に示したように7.7×10⁰～2.3×10¹の範囲に包含され、病原性が比較的強いと思われるCT8710株、G8712株、G8706株、AM8701株およびCT8705株の5株と、9.6×10¹～1.9×10²の範囲で前5株よりも病原性がやや低いと思われるND8704株、AM8702株およびW8701株の3株に二大別された。前者はアマゴ

表-8 背鰭下筋肉接種によるAeromonas salmonicida新鮮分離8菌株のアマゴに対する半数致死菌量($L D_{50}$)

菌株 No.	菌数 (CFU/fish)	供試尾数	斃死率 (%)	$L D_{50}$ (CFU/fish)	95 %信頼区間 (CFU/fish)
G8706	6.2×10^1	20	90.0		
	6.2×10^0	20	30.0	2.3×10^1	$4.6 \times 10^0 \sim 3.8 \times 10^1$
	6.2×10^{-1}	20	0		
AM8701	1.6×10^1	20	80.0		
	1.6×10^0	20	20.0	8.9×10^0	$4.5 \times 10^0 \sim 1.3 \times 10^1$
	1.6×10^{-1}	20	0		
CT8705	1.3×10^2	20	100		
	1.3×10^1	20	90.0	7.7×10^0	$2.9 \times 10^{-1} \sim 1.5 \times 10^1$
	1.3×10^0	20	10.0		
	1.3×10^{-1}	20	0		
CT8710	1.3×10^2	20	100		
	1.3×10^1	20	70.0	9.9×10^0	$4.7 \times 10^0 \sim 2.0 \times 10^1$
	1.3×10^0	20	30.0		
	1.3×10^{-1}	20	10.0		
AM8702	2.3×10^2	20	80.0		
	2.3×10^1	20	40.0	9.6×10^1	$3.8 \times 10^1 \sim 1.7 \times 10^2$
	2.3×10^0	20	20.0		
	2.3×10^{-1}	20	0		
W8701	5.0×10^2	20	90.0		
	5.0×10^1	20	40.0	1.9×10^2	$9.1 \times 10^1 \sim 2.9 \times 10^2$
	5.0×10^0	20	10.0		
	5.0×10^{-1}	20	0		
ND8704	1.6×10^2	20	60		
	1.6×10^1	20	40.0	1.1×10^2	$5.8 \times 10^1 \sim 2.9 \times 10^2$
	1.6×10^0	20	10.0		
	1.6×10^{-1}	20	0		
G8712	2.0×10^2	20	100.0		
	2.0×10^1	20	60.0	1.7×10^1	$6.6 \times 10^0 \sim 5.6 \times 10^1$
	2.0×10^0	20	10.0		
	2.0×10^{-1}	20	0		

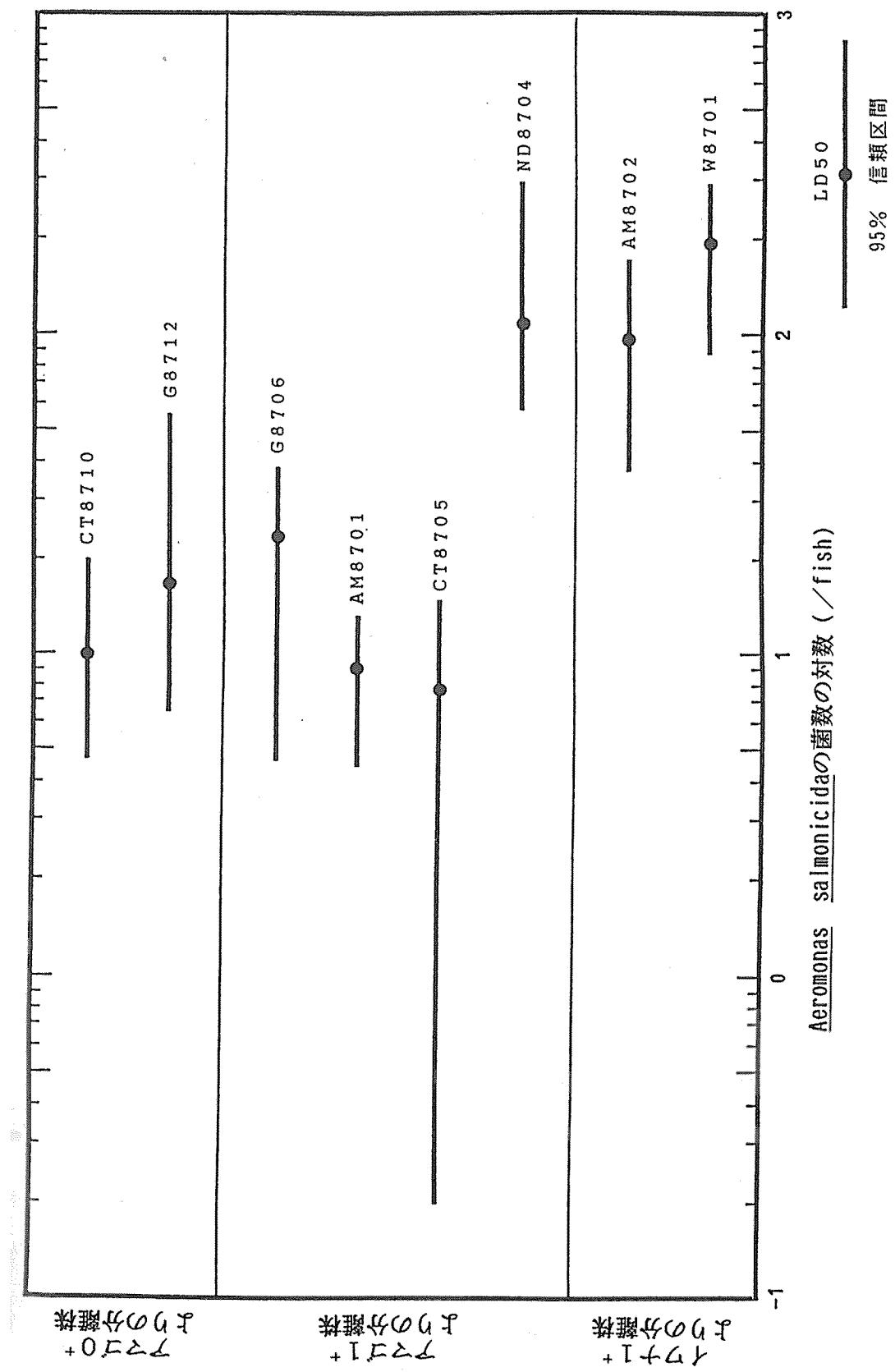


図-2 背鰭下筋肉接種による*Aeromonas salmonicida*の新鮮分離株のアマゴに対する半致死量 (LD_{50})

の0年魚より分離した2株と1年魚よりの3株であり、すべてアマゴから得られたものであるが、後者はイワナ1年魚よりの2株とアマゴ1年魚よりの1株であった。これらの結果より、A. salmonicidaの新鮮分離株のアマゴに対する病原性は一律でないことが明らかになった。また、宿主と病原性との相関については、検査株数が少なく断定はできないが、アマゴからの分離株の方がイワナからのそれよりも、病原性が強い傾向がうかがわれた。

第3節 アマゴに対する病原性の菌株保存に伴う変化

前節までにA. salmonicidaの強毒株の各種サケ科魚類に対する病原性の相違と、アマゴおよびイワナからの新鮮分離株のアマゴに対する病原性を明らかにした。

感染症の予防・治療に関する研究において、ワクチンの効果判定、化学療法剤の評価や実験病理学的検討などのために、in vivoにおける定量的で再現性の高い実験感染技法の開発が望まれる。そのためには、感受性が均一な実験動物の確立とともに、病原性の安定した菌株を必要な時に使うことができるようになるとが不可欠である。

一般に微生物はその世代時間が短く、継代保存中に遺伝的な変異が起りやすいので、病原性および生理活性物質生産能等が低下する例が多いとされており（森地ら 1977）、また病原性が低下した微生物を、いわゆる動物通過をさせることによって、その病原性を回復させ得ることも広く知られている（江草 1982）。

そこで本節では、種々の条件下で保存したA. salmonicidaの病原性の変化を検討した。すなわち、まず実験1では高層穿刺培養保存によって病原性の低下した菌株について、魚体通過によって病原性が高まるか否かを調べ、つぎに実験2では魚体通過を繰返して病原性を高めた菌株について、高層穿刺培養保存および継代培養保存による病原性の低下状況を調べ、さらに実験3では実験2と同じ菌株について、実験感染致死魚体中の凍結保存による病原性の変化を調べた。

実験1 病原性の低下した菌株の魚体通過による病原性の変化

自然発病魚より分離後、高層穿刺培養によって保存され、病原性が低下した菌株を用いて、数回の魚体通過を行い、各魚体通過時のアマゴに対するLD₅₀の変

化から供試菌株の病原性の変化を調べた。

実験方法

供試菌株 1975年6月19日に岐阜県内の養魚場において、アマゴの1年魚のせっそう病自然発病魚の腎臓から分離され、室温において普通寒天培地（ニッスイ）の高層穿刺培養（年一回継代）で5年間保存されていた、A. salmonicida CT7505株と、同年6月27日に同県内の他の養魚場において、同様に分離・保存されたA. salmonicida TK7504株の2株を用いた。なお、これらの供試菌株には分離当初に観察された自発凝集性が実験開始時には認められなかった。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重35.6～39.8gのアマゴ1年魚を各実験区10尾ずつ用いた。

魚体通過 供試菌株をハートインフュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し、滅菌生理食塩水で $10^0 \sim 10^{-8}$ まで10倍段階希釈した菌懸濁液を、MS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、1尾当たり0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。

供試菌株の回収は、接種5～6日後の斃死魚（斃死がみられなかつたCT7505株の魚体通過0回の場合のみ生残魚）の腎臓から、普通寒天培地（ニッスイ）を用いて行った。このようにして得られた菌株を魚体通過1回株（以下これをP-1とし、魚体通過n回株をP-nとする）とし、その後は同様の方法で魚体通過を、CT7505株については計4回、TK7504株については計3回行った。各回の接種菌量は表-9および10に示したように、 $5.0 \times 10^{-1} \sim 2.5 \times 10^8$ CFU/fishのうちの3～4段階とした。

病原性の検討 各回の魚体通過時のせっそう病による供試魚の斃死率から、第1節と同じ方法で、LD₅₀を算出した。

実験水温 電気ヒーターを用いて、 16 ± 0.5 °Cに制御した。

自発凝集性の判定 9mlのハートインフェージョンプロス（栄研）を用いた一夜培養液をよく振盪した後室温に静置し、翌日、培養液全体に菌が浮遊している場合を「自発凝集性-」、菌が試験管の壁面に集り培養液の透明度が高い場合を「自発凝集性+」とした。

生菌数の測定 第1節と同じである。

供試魚の飼育および観察 第1節と同じである。

死因の判定 第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、前節と同様、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。両菌株の魚体通過に伴う自発凝集性の有無、接種菌量、斃死率およびLD₅₀を、CT7505株については表-9に、TK7504株については表-10に示した。各株の病原性は、CT7505株のP-0では 2.3×10^7 CFU/fish（以下本節では単位を省略）の接種でも供試魚の斃死がみられず、接種部筋肉の発赤が認められたのみで、LD₅₀は 2.3×10^7 以上であった。しかし、接種6日後の生残魚の腎臓からの分離株P-1のLD₅₀は 3.7×10^4 となり、P-2、P-3およびP-4のLD₅₀は、それぞれ 9.2×10^1 、 3.5×10^1 および 3.4×10^0 と、魚体通過2回までは急激にそれ以降は徐々に通過回数にしたがってLD₅₀の低下が認められた。自発凝集性は原株ではみられなかったが、P-1以降で認められた。TK7504株では、P-0からP-3までのLD₅₀が 1.2×10^7 ～ 6.4×10^7 と、変化は認められず、自発凝集性もP-0からP-3までいずれも認められなかった。

表-9 魚体通過後のAeromonas salmonicida CT7505 株のアマゴに
対する病原性の変化

魚体通過回数	自発凝集性	菌数 (CFU/fish)	致死率 (%)	半数致死菌量 (CFU/fish)
0	-	2.3×10^7	0	
		2.3×10^6	0	$>2.3 \times 10^7$
		2.3×10^5	0	
		2.3×10^4	0	
1	+	3.4×10^5	100	
		3.4×10^4	50	3.7×10^4
		3.4×10^3	40	
		3.4×10^2	20	
2	+	4.0×10^4	100	
		4.0×10^3	100	9.2×10^1
		4.0×10^2	100	
		4.0×10^1	30	
3	+	9.2×10^2	100	
		9.2×10^1	90	3.5×10^1
		9.2×10^0	40	
		9.2×10^{-1}	20	
4	+	5.0×10^2	100	
		5.0×10^1	100	3.4×10^0
		5.0×10^0	80	
		5.0×10^{-1}	10	

表-10 魚体通過後のAeromonas salmonicida TK7504 株のアマゴに対する病原性の変化

魚体通過回数	自発凝集性	菌数 (CFU/fish)	斃死率 (%)	半数致死菌量 (CFU/fish)
0	—	7.4×10^7	100	
		7.4×10^6	40	1.2×10^7
		7.4×10^5	0	
1	—	5.0×10^7	100	
		5.0×10^6	10	1.8×10^7
		5.0×10^5	0	
2	—	6.6×10^7	100	
		6.6×10^6	0	3.6×10^7
		6.6×10^5	0	
3	—	2.5×10^8	90	
		2.5×10^7	40	6.4×10^7
		2.5×10^6	0	

実験2 病原性を高めた菌株の高層穿刺培養保存および継代培養保存による病原性の変化

高層穿刺培養による保存株を、魚体通過を繰返して病原性を高めた後、2か年間の高層穿刺培養による保存および115回の継代培養による保存中の供試菌株の病原性の変化を、アマゴに対するLD₅₀の変化によって調べた。

実験方法

供試菌株 第1節と同じA. salmonicida AYS-2 株を用いた。

高層穿刺培養保存および継代培養保存 高層穿刺培養保存については、普通寒天培地（ニッスイ）を9ml分注した、直径16mmの密栓試験管中の高層培地（高さ約7cm）に供試菌株を穿刺し、室温で2年間保存した。継代培養保存については、普通寒天培地（ニッスイ）を15ml分注した、直径85mmのプラスティックシャーレ中の平板培地に供試菌株を塗抹し、20°Cで6～7日培養した後、新しい平板に継代培養し、この操作を115回繰返した。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重38.5～39.5gのアマゴ1年魚を各実験区10尾ずつ用いた。

病原性の検討 高層穿刺培養保存菌株については、0、1.5、7、18、19および24か月後に、継代培養保存菌株については、0、1（実験開始6日後、以下同じ）、10（62日後）、89（570日後）、114（742日後）および115回目（749日後）に、供試魚にアマゴを用いて、背鰭下筋肉接種法によって行った。

供試菌懸濁液の調整 第1節と同じである。

生菌数の測定 第1節と同じである。

接種方法 MS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、

表-11および表-12に示したように $8.4 \times 10^{-1} \sim 1.1 \times 10^9$ CFU/mlの間の4段階の供試菌懸濁液を、1尾当たり 0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。

供試魚の飼育および観察 第1節と同じである。

実験水温 実験1と同じである。

自発凝集性の判定 実験1と同じである。

死因の判定 第1節と同じである。

LD₅₀の算出 第1節と同じである。

実験結果

本実験における斃死魚の外観症状は、すべて実験1と同様、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。各保存菌株の自発凝集性の有無、接種菌量、斃死率および算出されたLD₅₀を、高層穿刺培養保存については、表-11に、継代培養保存については、表-12に示した。

各保存菌株の病原性は、供試菌のLD₅₀が保存前は 1.9×10^0 であったのに対して、高層穿刺培養保存では、7か月後までは $4.0 \times 10^1 \sim 4.3 \times 10^0$ と病原性に変化はみられなかつたが、18か月後では 2.8×10^3 、19か月後では 2.6×10^7 と病原性の低下が認められ、24か月後では 5.0×10^7 もの接種でも斃死がみられなかつた。自発凝集性については、7か月後までは認められたが、18か月後以降は認められなかつた。継代培養保存では、89回継代株までは $8.1 \times 10^0 \sim 8.7 \times 10^1$ とほとんど病原性に変化はみられなかつたが、114回継代株および115回継代株では、 7.6×10^5 以上および 5.7×10^7 と著しく低下した。自発凝集性については、各保存株とも認められた。

表-11 高層穿刺培養保存後のAeromonas salmonicida AYS-2株の
アマゴに対する病原性の変化

保存期間 (月数)	自発凝集性	菌数 (CFU/fish)	致死率 (%)	半数致死菌量 (CFU/fish)
0	+	8.4×10^1	100	
		8.4×10^0	100	1.9×10^0
		8.4×10^{-1}	30	
		8.4×10^{-2}	0	
1.5	+	7.0×10^2	100	
		7.0×10^1	60	4.0×10^1
		7.0×10^0	40	
		7.0×10^{-1}	0	
7	+	5.2×10^2	100	
		5.2×10^1	100	4.3×10^0
		5.2×10^0	70	
		5.2×10^{-1}	10	
18	-	2.4×10^3	30	
		2.4×10^2	0	2.8×10^3
		2.4×10^1	0	
		2.4×10^0	0	
19	-	1.1×10^8	80	
		1.1×10^7	70	2.6×10^7
		1.1×10^6	10	
		1.1×10^5	0	
24	-	5.0×10^7	0	
		5.0×10^6	0	$>5.0 \times 10^7$
		5.0×10^5	0	
		5.0×10^4	0	

表-12 繙代培養保存後のAeromonas salmonicida AYS-2株の
アマゴに対する病原性の変化

継代回数	自発凝集性	菌数 (CFU/fish)	斃死率 (%)	半数致死菌量 (CFU/fish)
0	+	8.4×10^1	100	
		8.4×10^0	100	1.9×10^0
		8.4×10^{-1}	30	
		8.4×10^{-2}	0	
1	+	4.1×10^2	100	
		4.1×10^1	80	8.1×10^0
		4.1×10^0	40	
		4.1×10^{-1}	0	
10	+	4.7×10^2	100	
		4.7×10^1	50	5.6×10^1
		4.7×10^0	30	
		4.7×10^{-1}	10	
89	+	7.8×10^2	90	
		7.8×10^1	50	8.7×10^1
		7.8×10^0	0	
		7.8×10^{-1}	0	
114	+	7.6×10^5	0	
		7.6×10^4	0	$>7.6 \times 10^5$
		7.6×10^3	0	
		7.6×10^2	0	
115	+	7.7×10^7	90	
		7.7×10^6	0	5.7×10^7
		7.7×10^5	0	
		7.7×10^4	0	

実験3 実験感染斃死魚体中の凍結保存による病原性の変化

高層穿刺培養による保存菌株を、魚体通過を繰返して病原性を高めた後、アマゴに実験感染させ斃死させた。その斃死魚を凍結保存し、保存 740日後に解凍して分離した供試菌の病原性の変化を、アマゴに対する LD₅₀の変化によって調べた。

実験方法

供試菌株 実験2と同じである。

保存用実験感染斃死魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重 60.0 g のアマゴ 1年魚 150尾を、菌浴接種によって実験感染させた。すなわち、供試魚を 5.32% 食塩水に 2 分間浸漬後、直ちに 1.2×10^8 CFU/ml の供試菌懸濁液に 3 分間浸漬し、1 t 容のコンクリート水槽に収容した。地下水を毎分約 120l 注入して流水条件下で飼育し、感染 4 日後に斃死魚 10 尾を得た。この間の飼育水温は 15.9~16.1°C であった。

実験感染斃死魚の凍結保存 上記の斃死魚を 5 尾ずつポリエチレン袋に入れ、-20°C および -80°C のフリーザーに収容して保存した

凍結保存された実験感染斃死魚からの A. salmonicida の再分離 凍結保存 740 日後に、各保存温度における実験感染斃死魚の肝臓および腎臓における A. salmonicida の生菌数の測定を行い同時に各試料から接種菌の回収を行った。すなわち、肝臓および腎臓を無菌的に摘出後、重量を測定し、試料重量の 10倍量の生理食塩水を加え、乳鉢で磨碎したものの 10 倍段階希釈系列を作り、各希釈段階試料の 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°C・72時間培養後に出現した A. salmonicida の定型的集落数を計数した

後、コロニーを釣菌分離した。なお、測定限界は肝臓および腎臓とも 10^2 CFU/gであり、生菌数の平均値は幾何平均（日本獣医師会 1970）によって表した。

凍結保存 740日後分離株の病原性の検討 上記の各保存温度で保存した供試魚腎臓からの分離株の代表1株ずつについて、自発凝集性および病原性を検討した。すなわち、自発凝集性については、第1節と同じ方法で、病原性については、岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重28.0gのアマゴ1年魚を、各接種菌量毎に10尾ずつ用い、-20°C区よりの分離株については、 $8.2 \times 10^0 \sim 8.2 \times 10^2$ CFU/ml、-80°C区よりの分離株については、 $5.8 \times 10^0 \sim 5.8 \times 10^2$ CFU/mlのそれぞれ3段階の菌量の供試菌懸濁液を、1尾当たり0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。

供試魚の飼育および観察 第1節と同じである。

死因の判定 第1節と同じである。

LD₅₀の算出 第1節と同じである。

実験結果

凍結保存 740日後における供試菌の分離結果を、表-13に示した。-20°C区では、5尾の内1尾の供試魚肝臓から 4.4×10^4 CFU/g、3尾の腎臓から $2.0 \times 10^2 \sim 8.0 \times 10^3$ CFU/g、-80°C区では、5尾すべての肝臓から $3.8 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^6$ CFU/g、5尾すべての腎臓から $3.9 \times 10^5 \sim 2.8 \times 10^7$ CFU/gのA. salmonicidaが計数された。

各保存温度の供試魚から回収された代表2菌株の、自発凝集性の有無および病原性の検討結果を表-14に示した。両菌株とも自発凝集性が認められ、背鰭下筋肉接種によるLD₅₀は、-20°C区の供試魚よりの分離株が 6.9×10^0 、-80°C区の供試魚よりの分離株が 1.9×10^0 とほぼ同じであった。

表-13 せっそう病病魚の凍結保存 740日後におけるAeromonas salmonicida AYS-2株の魚体内生菌数

供試魚 No.	<u>-20°C</u>		<u>-80°C</u>	
	肝臓	腎臓	肝臓	腎臓
1	4.4×10^4 *	8.0×10^3	3.9×10^5	1.5×10^6
2	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	3.8×10^4	9.0×10^6
3	$<1.0 \times 10^2$	2.0×10^2	3.0×10^5	3.2×10^6
4	1.0×10^2	$<1.0 \times 10^2$	1.6×10^6	2.8×10^7
5	$<1.0 \times 10^2$	2.0×10^2	4.7×10^4	3.9×10^5
平均**	5.4×10^1	1.3×10^2	2.0×10^5	3.4×10^6

* CFU/g ** 幾何平均

表-14 740日間凍結保存された実験感染致死魚体から分離したAeromonas
salmonicidaの背鰭下筋肉接種によるアマゴに対する病原性

保存温度	自発凝集性	菌数 (CFU/fish)	致死率 (%)	半数致死菌量 (CFU/fish)
-20°C	+	8.2×10^1	100	
		8.2×10^0	70	6.9×10^0
		8.2×10^{-1}	10	
-80°C	+	5.8×10^1	100	
		5.8×10^0	60	1.9×10^0
		5.8×10^{-1}	0	

考 察

実験1では、自然発病魚より分離後、高層穿刺培養によって保存され、病原性が低下したA. salmonicida菌株について、魚体通過による病原性の変化を調べたが、病原性が回復した菌株と回復しない株とがみられた。すなわちCT7505株では、2回の魚体通過によって筋肉内接種によるLD₅₀が10⁷から10¹に低下したが、TK7504株では、3回の魚体通過後もLD₅₀は変わなかった。このように菌株によって、魚体通過による病原性の回復に相違がみられることは興味深い事実であったが、その原因は明らかではない。しかし、実験感染に用いる供試菌株を選択する際には注意を要する点と考えられ、3～4回の魚体通過を行っても病原性が回復しない菌株は供試菌株として不適当であると判断すべきであろう。

実験2では、保存前の背鰭下筋肉接種によるLD₅₀が1.9×10⁰と病原性の強い菌株の、高層穿刺培養保存および継代培養保存による病原性の変化について調べた。保存後の菌株のLD₅₀は前者は7か月後で4.3×10⁰、後者では89回継代株で8.7×10¹と病原性の低下はほとんどみられなかつたが、前者については18か月後で2.8×10³、後者については114回継代株で7.6×10⁵以上と、両保存法とも保存期間が長くなったり、継代数が増加すると病原性の低下が認められた。HAHNEL et al. (1983) は、保存期間や継代数は記載していないが、A. salmonicidaの強毒株を室温でブレインハートインフュージョンプロス (Difco)で継代培養保存すると弱毒株になるとしており、本実験の結果と一致している。これらのことから、実験感染に使用する菌株の保存は、病原性が低下しない範囲内で行われるべきであり、保存期間または継代数には十分注意し、使用前に魚体通過による病原性の回復を図るべきであろう。

実験3では、実験感染致死魚体中の凍結保存による病原性の変化を、-20℃

および -80°C の保存温度について調べたが、保存 740日後の菌株の病原性は、両保存温度とも背鰭下筋肉接種による LD₅₀が 10^0 であり、低下していなかった。このことから、A. salmonicidaを病原性を低下させずに長期間保存するためには、実験感染斃死魚をそのまま凍結する方法が簡便で優れていると考えられた。また、表-13に示したように、保存 740日後に実験感染斃死魚体から、A. salmonicidaが計数されたのは、 -20°C では供試魚5尾中3尾であったのに対して、 -80°C では5尾すべてから多数のA. salmonicidaが計数されたことから、一般的に言われているように（森地ら 1977）保存温度は低い方が望ましいと考えられた。

A. salmonicidaの自発凝集性と病原性との関係については、既往の報告（UDEY and FRYER 1978、SAKAI and KIMURA 1985）では、自発凝集性のある菌株は強毒株であるとされている。また、本章、第2節で述べた8株の供試菌や第V章、第1節で述べる自然発病魚からの 776株の新鮮分離株は、いずれも自発凝集性のあるものであった。しかし本実験では、実験1および3では自発凝集性と病原性の間に相関が認められたが、実験2では同一菌株を用いたにもかかわらず、相関が認められた場合と認められない場合とがあった。すなわち、CT7505株ではLD₅₀が 10^7 から 10^4 に低下して病原性が強まったのと同時に自発凝集性が回復したのに対して、病原性が強まらなかったTK7505株では自発凝集性も回復しなかった（実験1）。一方病原性の低下がみられなかった凍結保存 740日の分離株にも自発凝集性がみられた（実験3）。これに対して高層穿刺培養保存では、18か月後の病原性の低下と同時に自発凝集性の喪失が認められたが、平板培地による継代培養保存においては、病原性の低下がみられた 114代以降にも自発凝集性が認められた場合もあった（実験2）。UDEY(1977)は、病原性のない自発凝集株を報告しており、A. salmonicidaの起病性については、未だ明らかでない部分が多く、自発凝集性と病原性とが完全に一致するものではないと考えられる。

自発凝集性の喪失について、SAKAI(1985)は、各種のサケ科魚類から分離した114株のA. salmonicidaを、普通寒天培地(栄研)斜面を用いて、15°Cで6か月毎に継代培養したところ、自発凝集性の喪失は3~4年で始まり5~6年後には自発凝集性を示すものはみられなくなるとしている。これは本実験の結果よりもかなり遅いと思われるが、A. salmonicidaの自発凝集性の喪失は培養温度によって異なるという報告もあることから(ISHIGURO et al. 1981)、A. salmonicidaの保存中に自発凝集性が喪失するまでの時間は、種々の培養条件によって左右されるものと考えられた。

小 括

本章ではA. salmonicidaの病原性について検討した。

すなわち、本菌の各種サケ科魚類に対する病原性について、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によって検討し、アマゴおよびヤマメに対する病原性が、サクラマス、イワナおよびニジマスに対するそれよりも強いことを明らかにし、ニジマス養殖の技術を準用しているアマゴおよびヤマメの池中養殖技術における、せっそう病の防除技術確立の重要性を指摘した。

つぎに、アマゴおよびイワナのせっそう病自然発病魚から得られた8株の新鮮A. salmonicida分離株について、アマゴに対する病原性を背鰭下筋肉接種によって検討したが、各株の病原性は一律ではなかった。

さらに、種々の条件下における保存後の菌株のアマゴに対する病原性の変化について検討し、病原性の低下した菌株は、魚体通過によって病原性が回復する菌株と、しない菌株とが存在すること明らかにし、実験感染のための供試菌株を選択する際に、3～4回の魚体通過を行っても病原性が回復しない菌株は不適当であると判断すべきことを示した。このようにして病原性を高めた菌株でも、培地中での長期間の保存あるいは多くの継代を重ねることによって、再び病原性が低下することを明らかにし、実験感染に使用する菌株の保存は、保存期間および継代数には充分注意し、実験開始前に魚体通過による病原性の回復を図るべきことを示した。実験感染致死魚体のまでの凍結保存による病原性の変化について検討して、2年間以上病原性が低下しないことを明らかにし、本菌を病原性を低下させずに保存するには、本法が簡便で優れていることを示した。本菌の自発凝集性と病原性との関係については、必ずしも一致するものではないことを明らかにした。

第Ⅱ章 A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法の検討

前章では、A. salmonicidaの病原性について、各種サケ科魚類に対する病原性、新鮮分離株の病原性および病原性の菌株保存に伴う変化を明らかにした。本章では、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法をより信頼性の高いものとするために、前章の知見にもとづいて得られた病原性の安定した強毒株を用いて、接種ルート、実験水温、供試魚体重および供試魚の相分化などの各種要因の実験感染結果におよぼす影響について検討を行った。

第1節 実験感染におよぼす接種ルートの影響

本節では、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法をより信頼性の高いものとするために、実験感染におよぼす接種ルートの影響を、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種における半数致死菌量（以下本章ではLD₅₀とする）を比較することによって調べた。

実験方法

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康なアマゴ0年魚を、各接種菌量毎に背鰭下筋肉および腹腔内接種では10尾ずつ、菌浴接種では20尾ずつ用いた。実験は各接種法について2回ずつ行ったが、供試魚の平均体重は、背鰭下筋肉接種では40.6gおよび35.8g、腹腔内接種では34.8gおよび36.7g、菌浴接種では15.7gおよび15.8gであった。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフュージョンプロス（栄研）

で、20°C・一夜培養し（ 10^8 CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で 10^{-1} ～ 10^{-8} まで10倍段階希釈した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 背鰭下筋肉接種では、MS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、表-15に示したように1尾当たりそれぞれ4段階の菌量を含む供試菌懸濁液を、0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。腹腔内接種では、同様に麻酔を施した供試魚に、表-15に示したように1尾当たりそれぞれ5段階の菌量を含む供試菌懸濁液を、0.1mlずつ腹腔内に接種した。また、菌浴接種では、供試魚を5.32%食塩水に2分間浸漬後、表-15に示したようにそれぞれ3段階の菌量を含む供試菌懸濁液に3分間浸漬し、清水に戻した。

実験水温 電気ヒーターを用いて、 15 ± 0.5 °Cに制御した。

供試魚の飼育および観察 各接種菌量毎に15l容ガラス水槽に供試魚を収容し、地下水を一槽当たり約0.5l/min注入して、無給餌、流水条件下で接種後3週間観察した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

LD₅₀の算出 第Ⅰ章、第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各接種法での斃死率は表-15に示したように、背鰭下筋肉接種では、 10^2 CFU/fish（以下本節では単位を省略）接種では第1回実験および第2回実験とも100%、 10^1 では80%および90%、 10^0 では20%および40%、 10^{-1} では10%および20%

表-15 背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種による *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株のアマゴに対する半数致死菌量 ($L D_{50}$) の相違

<背鰭下筋肉接種>

実験回数	菌数*	供試尾数	斃死率	$L D_{50}$ *	95%信頼区間*
1	2.0×10^2	10	100 %		
	2.0×10^1	10	80.0	5.1×10^0	$1.6 \times 10^0 \sim 3.6 \times 10^1$
	2.0×10^0	10	20.0		
	2.0×10^{-1}	10	10.0		
2	4.5×10^2	10	100		
	4.5×10^1	10	90.0	4.3×10^0	$1.1 \times 10^0 \sim 2.3 \times 10^1$
	4.5×10^0	10	40.0		
	4.5×10^{-1}	10	20.0		

<腹腔内接種>

1	7.6×10^5	10	100		
	7.6×10^4	10	90.0		
	7.6×10^3	10	60.0	3.0×10^3	$7.6 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^4$
	7.6×10^2	10	30.0		
	7.6×10^1	10	10.0		
2	3.8×10^5	10	100		
	3.8×10^4	10	80.0		
	3.8×10^3	10	40.0	4.5×10^3	$1.0 \times 10^3 \sim 5.6 \times 10^4$
	3.8×10^2	10	20.0		
	3.8×10^1	10	10.0		

<菌浴接種>

1	6.1×10^7	20	85.0		
	6.1×10^6	20	70.0	2.2×10^6	$3.8 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^6$
	6.1×10^5	20	30.0		
2	1.2×10^7	20	65.0		
	1.2×10^6	20	45.0	2.7×10^6	$8.3 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^7$
	1.2×10^5	20	15.0		

* 背鰭下筋肉接種および腹腔内接種: CFU/fish、菌浴接種: CFU/ml

%であり、LD₅₀（95%信頼区間）は、第1回実験で 5.1×10^0 ($1.6 \times 10^0 \sim 3.6 \times 10^1$)、第2回実験で 4.3×10^0 ($1.1 \times 10^0 \sim 2.3 \times 10^1$)と計算された。腹腔内接種では、 10^5 では第1回および第2回実験とも 100%、 10^4 では90%および80%、 10^3 では60%および40%、 10^2 では30%および20%、 10^1 ではともに10%であり、LD₅₀は、第1回実験で 3.0×10^3 ($7.6 \times 10^2 \sim 1.4 \times 10^4$)、第2回実験では 4.5×10^3 ($1.0 \times 10^3 \sim 5.6 \times 10^4$)と計算された。菌浴接種では、 10^7 では第1回実験で85%、第2回実験で65%、 10^6 では70%および45%、 10^5 では30%および15%であり、LD₅₀は、第1回実験では 2.2×10^6 ($3.8 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^6$)、第2回実験では 2.7×10^6 ($8.3 \times 10^5 \sim 1.9 \times 10^7$)と計算された。

考 察

以上本実験では、各々の菌接種法について2回の反復実験を行ったが、それぞれ近似の安定したLD₅₀を得ることができた。その理由として、本研究の供試魚として、岐阜県飛騨川水系原産アマゴを7代にわたり累代飼育した魚を用いたことによって、感受性が比較的安定していたと考えられるほか、供試菌株として毒力が安定した強毒株 AYS-2株を用いたことによるものと考えられた。

既往の研究で、A. salmonicidaのLD₅₀が示されているものおよび他の研究者のデータからLD₅₀を推定し得たものを表-16に示した。背鰭下筋肉接種では、ニジマスで 200～2,000 cells/fish (MICHEL 1980)、ギンザケで 55cells/fish (GROBERG et al., 1978)、腹腔内接種では、マスノスケおよびスチールヘッドトラウトで 300cells/fish (GROBERG et al., 1978)、菌浴接種では、大西洋サケで 10^7 cells/ml (BULLOCK et al., 1976)などと報告されている。これらを本実験の結果と比較すると、背鰭下筋肉接種では1～3オーダー低く、腹腔内接種では1オーダー高く、菌浴接種では1オーダー低くなっている。供試魚種および系統などに

表-16 Aeromonas salmonicidaの実験感染による
半数致死菌量（LD₅₀）の報告例

接種法	LD ₅₀	供試魚種	実験水温	報告者
背鰭下筋肉接種	200-2,000 cells/fish	ニジマス	15°C	MICHEL(1980)
背鰭下筋肉接種	55 ノ	ギンザケ	?	GROBERG <u>et al.</u> (1978)
腹腔内接種	300 ノ	マスノスケ	?	〃
腹腔内接種	300 ノ	スチールヘッド	?	〃
菌浴接種	10 ⁷ cells/ml	大西洋サケ	12.5°C	BULLOCK <u>et al.</u> (1976)

による感受性の差、供試魚の生理条件および供試菌株の毒力の差などの実験条件の相違が原因しているものと考えられた。また、菌浴接種については、浸漬時間、食塩水による前処理の有無などの実験技法の相違にもとづく影響も考えられた。

なお、菌浴接種において変動のない安定した斃死率を得ることができたが、この理由として、本実験では5.32%の食塩水による前処理を行ったことによると考えられた。かつて食塩水による前処理を行わなかった場合には、同じ実験条件下でも、実験毎に供試魚の斃死率に大きな変動が認められたこと（森川、未発表）も経験しており、食塩水による前処理によって、蛋白質など高分子物質の取込みが促進されること（AMEND and FENDER 1976）や、体表粘液が除去されるために、供試魚の病原菌に対する感受性が増加したためであろうと考えられた。

他の魚類病原菌におけるLD₅₀について、楠田ら（1981）は、アユ（Plecoglossus altivelis）におけるStreptococcus sp.では、背鰭下筋肉接種で10² cells/fish以下、菌浴接種で10⁶ cells/ml、またVibrio anguillarumでは、それぞれ10⁰ cells/fish以下、10⁴ cells/mlと報告している。一方、HOLT et al. (1975) は、Flexibacter columnarisの菌浴接種におけるLD₅₀は、ニジマス、マスノスケおよびギンザケでは、10⁶ CFU/mlと報告している。これらの結果は、菌種および魚種が異なるとはいえ、本実験の結果と大きな差異が認められない。

接種方法別のLD₅₀を比較すると、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種、菌浴接種の順に高く、それぞれの間に、約3オーダーの差異が認められた。せっとう病の感染経路としては、経皮、経鰓および経口感染が考えられており（江草 1978）、実験感染においても実験の目的によって、接種方法を選択する必要があると考えられる。すなわち、治療効果を目的とする化学療法剤の評価には、すべての供試魚を確実に斃死させ得る背鰭下筋肉接種および腹腔内接種を、ワクチンなどの効果の評価には、自然発病に近い菌浴接種を用いるのが適当と考えられる。

なお、本実験において供試魚は菌接種後3週間、給餌をしないで観察を行ったが、第Ⅰ章、第1節と同様、観察期間中の無給餌が実験結果に大きな影響をおぼしていないと判断された。

第2節 実験感染におよぼす水温の影響

前節では、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法を確立するために、実験感染におよぼす接種ルートの影響を検討し、接種方法別のLD₅₀は、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種、菌浴接種の順に高く、実験の目的に応じて接種方法を選択する必要があることを明らかにした。そこで、本節では実験感染におよぼす水温の影響を明らかにするために、5、10および15°Cの飼育水温における菌浴接種魚の斃死率を比較した。

実験方法

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重55.6gのアマゴ1年魚を各区20尾ずつ用いた。

実験区 5、10および15°C区の3区について、それぞれ反復実験区を設けた。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（10⁸ CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で10⁻¹に希釈した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 供試魚を5.32%食塩水に2分間浸漬後、1.3×10⁷ CFU/mlの供試菌懸濁液に3分間浸漬し、清水に戻した。

実験水温 接種時水温ならびに飼育水温を電気ヒーターを用いて、5、10および15°C±0.5°Cに制御した。

供試魚の飼育および観察 各実験区毎に22.5l容ガラス水槽に供試魚を収容し、地下水を一槽当たり約1.0 l/min注入して、無給餌、流水条件下で菌接種後

3週間観察した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外觀症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的状況と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各区の供試魚の斃死率は表-17に示したように、各区とも反復実験区の結果が同じになり、5°C区では0%、10°C区では95%（斃死期間：接種6～18日後、半数斃死日数：10日）、15°C区では100%（同：接種3～9日後、同：5日）で、試験した水温の範囲では水温が高い程斃死率が高かった。

考 察

せっそう病の自然発病は、晩春から夏期にかけてよくみられ、冬期には少ないことが知られており（全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会 1976、McCRAW 1952）、本実験の結果はこのことを裏付けるものと思われた。FRYER *et al.* (1976) も、マスノスケ稚魚を用いて A. salmonicida の腹腔内接種による実験感染魚の斃死によよぼす水温の影響を検討し、斃死率が15.0°Cでは56%、9.4°Cでは48%、3.9°Cでは8%であったと報告しており、本実験ほど顕著ではないが、水温が高くなるほど斃死率も高くなる傾向を認めている。

魚類の細菌性疾患は、宿主と病原菌との相互関係に環境要因が関与して発生することが知られているが (SNIESZKO 1978)、環境要因のうちでは温度が大きな要因であると考えられる。飼育水温が宿主によよぼす影響については、ベニザケについて水温が15°Cを越えると活動代謝量が低下するとした報告もみられるが (BRETT 1964)、アマゴ等のサケ科魚類はいわゆる冷水性魚類であり、本実験で

表-17 アマゴの Aeromonas salmonicida AYS-2 株の菌浴接種実験
感染群の斃死率におよぼす水温の影響

	5℃区		10℃区		15℃区	
	①*	②*	①	②	①	②
斃死尾数／供試尾数	0/20	0/20	19/20	19/20	20/20	20/20
半数斃死日数	—	—	10	10	5	5
斃死率 (%)	0	0	95	95	100	100

* : ①反復実験区 1 ②反復実験区 2

設定した5～15°C度の範囲内では、一般的に供試魚の生理条件にそれほどの悪影響をおよぼしているとは考えられない。一方、A. salmonicidaは、in vitroの実験において、5～20°Cの範囲では培養温度が高い程増殖が速く、また、ヤマメに本菌を背鰭下筋肉および腹腔内に接種したin vivo の実験においても、10～20°Cの範囲では水温が高い程各臓器における生菌数の増加が速いことが報告されており（佐古・原 1981）、本節の実験感染において水温が斃死率に大きく影響をおよぼした原因として、原因菌A. salmonicidaの増殖が温度によって左右されることによるものと考えられる。

第3節 実験感染におよぼす供試魚体重の影響

前節では、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法を確立するために、実験感染におよぼす水温の影響を検討し、実験水温が高い程斃死率が高く、水温の実験感染におよぼす影響が大きいことを明らかにした。本節では実験感染におよぼす供試魚体重の影響を、3段階の体重の供試魚の背鰭下筋肉接種におけるLD₅₀を比較することによって調べた。

実験方法

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重 1.5 g のアマゴ 0年魚 1群と、平均体重15.9 g および72.3 g の1年魚 2群を各菌接種濃度毎に20尾ずつ用いた。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフェュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し (10⁸ CFU/mlになる)、滅菌生理食塩水で10⁻⁶～10⁻⁹に希釈した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 MS-222 の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、表-18に示したように4.1×10⁻¹～4.1×10² CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液を、1尾当たり 0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。

実験水温 電気ヒーターを用いて、15°C±0.5 °Cに制御した。

供試魚の飼育および観察 各区毎に22.5l 容ガラス水槽に供試魚を収容し、地下水を一槽当たり約1.0 l / min 注入して、無給餌、流水条件下で接種後3周間観察した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

L D₅₀の算出 第Ⅰ章、第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各段階の体重の供試魚に対する供試菌のL D₅₀は、表-18に示したように、平均体重 1.5 g では 2.1×10^0 CFU/fish (95%信頼区間: $7.1 \times 10^{-2} \sim 4.9 \times 10^0$ CFU/fish)、15.9 g では 2.2×10^0 CFU/fish ($1.7 \times 10^{-1} \sim 4.9 \times 10^0$ CFU/fish)、72.3 g では 3.0×10^0 CFU/fish ($8.9 \times 10^{-1} \sim 8.0 \times 10^0$ CFU/fish) であった。

考 察

体重の異なる供試魚のL D₅₀は、いずれも 10^0 のオーダーであり、供試魚の体重の違いによる影響はほとんど認められなかった。また、 4.1×10^{-1} 接種区における各体重区の斃死率は、40～45%であったことから、本実験の供試菌株の最少致死菌量 (MLD: Minimum lethal dose) はおよそ 1 CFU/fish と考えられ、供試魚の体重に関係なく、A. salmonicidaの強毒株が背鰭下筋肉接種により各個体に 1 CFU 入れば、感染発症は成立すると思われた。このことから、前章において述べたような、いわゆる魚体通過によって A. salmonicida の病原性を高める際に、MLD を 1 CFU まで上昇させることが、基準になると考えられる。また、従来、実験感染に関する報告においては、接種菌量を単位供試魚体重当りの量として表示している場合が多いが、本実験で用いた供試菌のように 1 CFU で供試魚を斃死させ得る場合には、その必要がないと考えられる。

表-18 *Aeromonas salmonicida* AYS-2株が背鰭下筋肉接種された体重の異なるアマゴに対する半数致死菌量 ($L D_{50}$)

供試魚平均 体重 (g)	菌数 (CFU/fish)	供試尾数 (%)	斃死率 (%)	$L D_{50}$ (CFU/fish)	95%信頼区間 (CFU/fish)
1.5	4.1×10^1	20	100		
	4.1×10^0	20	75.0	2.1×10^0	$7.1 \times 10^{-2} \sim 4.9 \times 10^0$
	4.1×10^{-1}	20	45.0		
	4.1×10^{-2}	20	15.0		
15.9	4.1×10^1	20	100		
	4.1×10^0	20	75.0	2.2×10^0	$1.7 \times 10^{-1} \sim 4.9 \times 10^0$
	4.1×10^{-1}	20	45.0		
	4.1×10^{-2}	20	10.0		
72.3	4.1×10^1	20	100		
	4.1×10^0	20	65.0	3.0×10^0	$8.9 \times 10^{-1} \sim 8.0 \times 10^0$
	4.1×10^{-1}	20	40.0		
	4.1×10^{-2}	20	5.0		

第4節 実験感染におよぼす供試魚の相の影響

前節では、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法を確立するために、実験感染におよぼす供試魚体重の影響を検討し、供試魚の体重の差による影響は認められず、供試したA. salmonicida AYS-2株の最少致死菌量は1 CFU/fishであることを明らかにした。

ところで、アマゴなどサケ科魚類では降海型のスモルト、河川残留型のバー、早期成熟雄魚など生理状態の異なった相のあることが知られている（本荘・原1973）。そこで、本節では本菌の実験感染におよぼす供試魚の相の影響を、菌浴接種を施したスモルト、バーおよび成熟雄供試魚の斃死状況を比較することによって調べた。

実験方法

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康なアマゴ満1年魚のスモルト（平均体重：55.0g）、バー（42.3g）および成熟雄魚（52.0g）を供試菌各接種濃度毎に20尾ずつ用いた。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフェージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（10⁸ CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で10⁻³および10⁻⁴に希釈した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 供試魚を5.32%食塩水に2分間浸漬後、8.3×10⁴ および8.3×10⁵ CFU/mlの供試菌懸濁液に3分間浸漬し、清水に戻した。なお、これらの接種菌量は、スモルトのA. salmonicidaに対する感受性が高いことが予測されたので、本

章、第1節で求めたLD₅₀より低い菌量とした。

実験水温 12.2~13.4°Cであった。

供試魚の飼育および観察 各区毎に22.5l 容ガラス水槽に供試魚を収容し、地下水を一槽当たり約1.0 l/min注入して、無給餌、流水条件下で接種後3週間観察した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各実験区の斃死率は表-19に示したように、8.3×10⁵ CFU/ml接種の場合は、スマルトが50%であったのに対して、バーおよび成熟雄魚ではいずれも15%であった。また8.3×10⁴ CFU/ml接種の場合には、スマルトが5%であったのに対して、バーおよび成熟雄魚ではいずれも斃死がみられなかった。

考 察

供試菌の8.3×10⁵ CFU/ml接種において、スマルトの斃死率はバーおよび成熟雄魚に比較して有意に高く（有意水準5%）、また8.3×10⁴ CFU/ml接種においても、スマルトのみに斃死がみられたことから、菌浴接種によるせっそう病の実験感染において、アマゴのスマルトはバーおよび成熟雄魚よりもA. salmonicidaに対する感受性が高いと思われた。これは、従来から池中養殖されているアマゴやヤマメでは、バーよりもスマルトの方がIHN（伝染性造血器壊死症）やせっそう病に罹りやすいことが経験的に知られていることとよく一致している。また、岐阜水試（1987）はサクラマスにA. salmonicidaおよびVibrio anguillarum biotype

表-19 相の異なるアマゴに *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を菌浴接種により実験感染させたときの斃死率

相	<u>8.3×10^5 CFU/ml</u> 接種			<u>8.3×10^4 CFU/ml</u> 接種		
	供試尾数	斃死尾数	斃死率(%)	供試尾数	斃死尾数	斃死率(%)
スモルト	20	10	50	20	1	5
バー	20	3	15	20	0	0
成熟雄魚	20	3	15	20	0	0

2 を実験感染させてスモルトとバーの感受性の比較をし、スモルトはバーよりも両魚病菌に対する感受性が高いことをすでに報告している。

このようにスモルトがバーに比較して各種の疾病に対する感受性が高いことは、スモルトの皮膚構造の特徴として、バーよりも表皮層が薄く、鱗が剥離しやすい（久保 1980）ために、それが魚病病原体の侵入門戸となる可能性が高く、また、スモルトでは体表には粘液を分泌する粘液細胞が少ないことから、接触した魚病原体に対する防御作用の低下が指摘されている（日比谷 1982）こととも関連していると考えられる。

以上の事実は、サケ科魚類の池中養殖や増殖事業において、スモルトの出現期には、魚の取扱いによる損傷を可及的に少なくするため、魚を取扱う機会をなるべく少なくするなど、スモルトの生理的特性を十分に配慮した疾病対策が必要であることを示唆するものである。

小 括

本章では、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法を確立するために、以下の検討を行った。

まず、実験感染におよぼす菌接種ルートの影響を、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によるLD₅₀を比較することによって検討した。その結果、各接種法によるLD₅₀は、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種、菌浴接種の順に高く、それぞれの間におよそ3オーダーの相違が認められ、実験の目的に応じて接種方法を選択する必要性のあることを明らかにした。

つぎに、実験感染におよぼす水温の影響を、5、10および15°Cの実験水温における菌浴接種群の斃死率を比較することによって検討した。その結果、実験水温が高いほど斃死率が高く、水温の実験感染におよぼす影響が著しかったことから、せっそう病の自然発病における流行が晩春から夏期に多い理由として水温が原因していることが裏付けられた。

また、実験感染におよぼす供試魚体重の影響を、1.5、15.9および72.3gの3段階の体重の供試魚の背鰭下筋肉接種によるLD₅₀を比較し検討した。その結果、供試魚の体重の差による影響は認められず、いずれの魚体重でも供試したA. salmonicidaの最少致死菌量は1CFU/fishと考えられ、せっそう病の背鰭下筋肉接種による実験感染において、接種菌量を単位供試魚体重当りの量として表示する必要のないことを明らかにした。

さらに、実験感染におよぼす供試魚の相の違いによる影響を、菌浴接種を施したスモルト、バーおよび早期成熟雄魚の斃死状況を比較し検討し、スモルトはバーおよび成熟雄魚に比較して、A. salmonicidaに対する感受性が高く、経験的に知られているスモルトが種々の疾病に対して感受性が高いことを裏付ける結果を

得、スモルトの出現期における疾病対策の重要性を示唆した。

第Ⅲ章 A. salmonicidaの魚体内における動態

前章では、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法によばす種々の要因の影響を明らかにし、実験感染結果をより信頼性の高いものとした。

せっそう病の防除対策、とりわけ化学療法やワクチンによる予防、または適切な防疫技術を検討するに際して、まず本病原因菌の魚体内における動態を把握しておく必要性が考えられる。そこで、本章では、A. salmonicidaの魚体内における動態を明らかにするために、アマゴの実験感染魚の臓器内における本菌の消長、実験感染アマゴ魚群からの飼育水中への本菌の排出について検討するとともに、種々の魚群について不顕性感染の状況を検討した。

第1節 実験感染における接種ルート別のアマゴの各臓器中の生菌数の消長

本節では、アマゴにA. salmonicidaの強毒株を背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種により実験感染させ、斃死状況と魚体内での接種菌の消長および分布を調べた。

実験方法

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康なアマゴ1年魚を供試菌の各接種法毎に 100尾ずつ用いた。供試魚の平均体重は、背

鰭下筋肉接種では 114.0 g、腹腔内接種では 100.7 g、菌浴接種では 65.0 g であった。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフェージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（ 10^8 CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で 10^{-1} および 10^{-3} に希釈した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 背鰭下筋肉接種では、MS-222 の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、 6.8×10^5 CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液を、1尾当たり 0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。腹腔内接種では、同様に麻酔を施した供試魚に、 4.2×10^7 CFU/mlの供試菌懸濁液を、1尾当たり 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、 5.2×10^7 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 電気ヒーターを用いて、 15 ± 0.5 °Cに制御した。

供試魚の飼育および観察 各接種法毎に5槽の15l 容ガラス水槽に供試魚を20尾ずつ収容し、地下水を一槽当たり約0.5 l/min注入して、無給餌、流水条件下で接種後10日間観察した。なお5槽のうち1槽は斃死状況観察用とし、魚体内菌数測定のための供試魚採取は行わなかった。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

魚体内の接種菌生菌数の測定 接種菌生菌数の経時変化を調べるために、背鰭下筋肉接種では、接種1～8日後の間に毎日5尾ずつ、腹腔内接種では、1～5日後の間ならびに7および10日後に毎日5尾ずつ、菌浴接種では、1～7日の間に毎日4尾ずつの生残魚の、血液、肝臓および腎臓について、接種菌の生菌数を測定した。また魚体内の分布状況を調べるために、表-23に示したように、背鰭下筋肉接種では4尾、腹腔内接種および菌浴接種では2尾の斃死魚の血液、

肝臓、腎臓、脾臓、心臓、胃、腸、幽門垂、鰓、筋肉、眼球、胆汁、接種部筋肉およびせっそう患部臓様物について、接種菌生菌数の測定を行った。すなわち、血液および胆汁については、それぞれ滅菌生理食塩水を用いて10倍段階希釀液列を作り、その他の試料については、それぞれ試料重量の10倍量の滅菌生理食塩水を加え、乳鉢で磨碎したものの10倍段階希釀液列を作つて、各希釀段階の試料の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°C・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、試料1mlまたは1g当りのCFUを算出した。従つて検出限界は、血液および胆汁は 1.0×10^1 CFU/ml、その他の試料は 1.0×10^2 CFU/g（以下本節では単位を省略する）である。なお、各試料の採取は放血後に行った。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。しかし解剖所見では、背鰭下筋肉接種では他の接種法と異なり、自然発病魚にみられる腸の発赤が認められなかった。

各接種法での斃死状況は図-3に示したように、背鰭下筋肉接種では、接種5日後から斃死が始まり8日後に全数が斃死、腹腔内接種では、接種5日後から斃死が始まり10日後に全数が斃死、菌浴接種では、接種4日後から斃死が始まり8日後に全数が斃死した。

魚体中の接種菌生菌数の経時変化は、表-20～表-22に、平均値の推移を図-4示した。背鰭下筋肉接種では、接種1日後ではいずれも検出限界以下であったが、2日後には5尾中3尾の血液および5尾の腎臓から接種菌生菌が検出され、その平均値は血液で 6.9×10^0 、腎臓で 7.8×10^2 であった。3日後には3尾の血液、

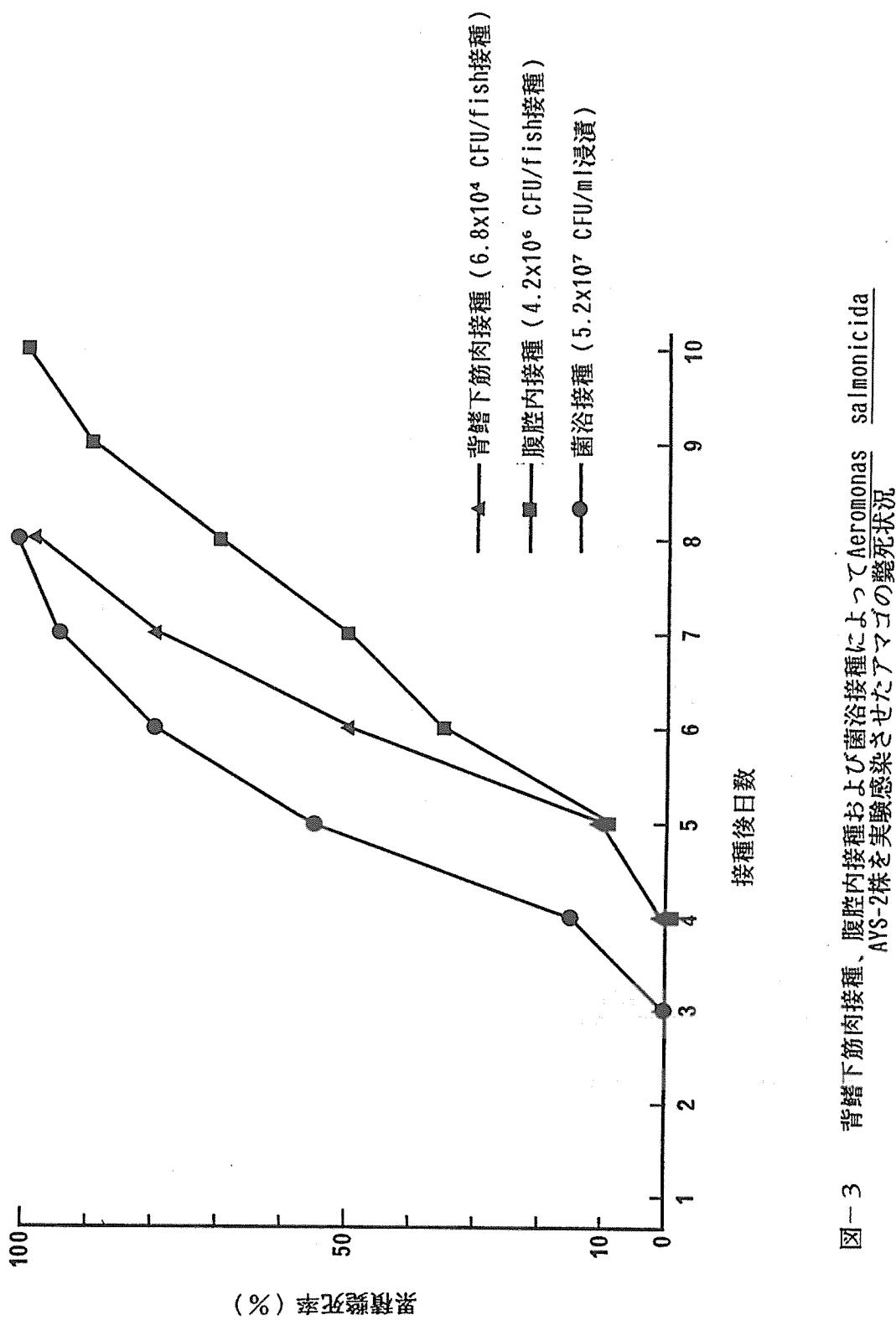


図-3 背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によつて *Aeromonas salmonicida* AYS-2株を実験感染させたアマゴの致死状況

表-20 背鰭下筋肉接種により *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を実験感染させたアマゴの血液、肝臓および腎臓中の接種菌生菌数の経時変化

接種後日数	供試魚No.	血 液	肝 臓	腎 臓
1	1	<1.0x10 ¹ *	<1.0x10 ²	<1.0x10 ²
	2	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ²	<1.0x10 ²
	3	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ²	<1.0x10 ²
	4	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ²	<1.0x10 ²
	5	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ²	<1.0x10 ²
平均**		1.0x10 ⁰	1.0x10 ¹	1.0x10 ¹
2	1	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ²	6.0x10 ²
	2	2.0x10 ¹	<1.0x10 ²	1.0x10 ³
	3	2.0x10 ¹	<1.0x10 ²	7.0x10 ²
	4	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ²	5.0x10 ²
	5	4.0x10 ¹	<1.0x10 ²	1.4x10 ³
平均		6.9x10 ⁰	1.0x10 ¹	7.8x10 ²
3	1	8.4x10 ²	2.7x10 ³	6.2x10 ⁴
	2	2.0x10 ¹	8.5x10 ²	1.8x10 ⁴
	3	3.0x10 ¹	<1.0x10 ²	2.2x10 ³
	4	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ²	2.3x10 ⁴
	5	<1.0x10 ¹	<1.0x10 ²	7.2x10 ³
平均		1.4x10 ¹	7.5x10 ¹	1.3x10 ⁴
4	1	9.7x10 ³	2.3x10 ³	1.2x10 ⁵
	2	3.8x10 ⁵	3.3x10 ⁵	5.3x10 ⁷
	3	3.8x10 ⁴	2.3x10 ⁴	2.3x10 ⁶
	4	5.0x10 ⁵	8.9x10 ⁴	6.4x10 ⁷
	5	5.8x10 ³	5.5x10 ³	4.4x10 ⁵
平均		8.4x10 ⁴	2.4x10 ⁴	3.3x10 ⁶
5	1	1.6x10 ⁶	6.8x10 ⁵	6.8x10 ⁶
	2	2.0x10 ³	7.7x10 ⁴	1.4x10 ⁶
	3	3.8x10 ⁶	9.1x10 ⁵	1.3x10 ⁷
	4	7.0x10 ⁵	3.8x10 ⁷	1.8x10 ⁸
	5	1.4x10 ⁴	6.9x10 ⁴	1.4x10 ⁶
平均		1.6x10 ⁵	6.6x10 ⁵	7.9x10 ⁶
6	1	1.8x10 ⁶	1.3x10 ⁷	1.4x10 ⁸
	2	2.7x10 ⁴	5.3x10 ⁶	2.7x10 ⁷
	3	1.0x10 ⁷	1.8x10 ⁶	5.9x10 ⁷
	4	1.1x10 ⁴	5.0x10 ⁶	1.8x10 ⁸
	5	7.2x10 ⁵	3.4x10 ⁵	9.1x10 ⁷
平均		3.3x10 ⁵	2.9x10 ⁶	8.2x10 ⁷
7	1	9.4x10 ⁵	7.6x10 ⁷	6.4x10 ⁸
	2	6.0x10 ⁵	1.8x10 ⁷	4.0x10 ⁸
	3	2.8x10 ⁶	2.1x10 ⁷	3.1x10 ⁷
	4	7.1x10 ⁵	5.6x10 ⁵	3.4x10 ⁶
	5	2.2x10 ⁵	2.6x10 ⁶	2.0x10 ⁸
平均		7.6x10 ⁵	8.4x10 ⁶	8.8x10 ⁷
8	1	3.6x10 ⁶	5.6x10 ⁷	1.7x10 ⁸
	2	8.3x10 ⁵	5.6x10 ⁷	8.4x10 ⁷
	3	2.4x10 ⁵	4.6x10 ⁶	4.6x10 ⁷
	4	1.7x10 ⁶	2.5x10 ⁷	7.0x10 ⁸
平均		1.1x10 ⁶	2.5x10 ⁷	1.5x10 ⁸

* CFU/ml、g ** 幾何平均

表-21 腹腔内接種により *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を実験感染させたアマゴの血液、肝臓および腎臓中の接種菌生菌数の経時変化

接種後日数	供試魚 No.	血 液	肝 臓	腎 臓
1	1	3.0×10^1 *	1.0×10^2	8.0×10^2
	2	1.9×10^2	1.0×10^4	3.2×10^4
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	5	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	平均 **	5.6×10^0	6.3×10^1	1.2×10^2
2	1	1.0×10^1	3.3×10^3	1.0×10^2
	2	9.9×10^2	1.5×10^5	4.5×10^4
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	5	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	平均	4.0×10^0	2.2×10^2	8.5×10^1
3	1	3.2×10^4	3.8×10^5	9.4×10^6
	2	4.1×10^2	8.5×10^4	1.1×10^4
	3	1.6×10^3	1.1×10^6	1.8×10^5
	4	1.2×10^3	1.0×10^6	1.5×10^7
	5	1.9×10^4	2.9×10^6	5.2×10^6
	平均	3.4×10^3	6.3×10^5	1.1×10^6
4	1	1.8×10^2	1.6×10^4	1.0×10^3
	2	9.1×10^3	1.9×10^5	1.3×10^6
	3	4.5×10^2	1.2×10^6	3.0×10^5
	4	5.9×10^3	5.1×10^5	4.5×10^5
	5	$<1.0 \times 10^1$	6.8×10^3	1.0×10^3
	平均	3.4×10^2	1.0×10^5	4.5×10^4
5	1	2.3×10^5	2.2×10^6	2.4×10^6
	2	1.4×10^5	5.0×10^6	9.9×10^5
	3	9.0×10^4	2.7×10^7	1.2×10^8
	4	1.4×10^5	2.4×10^7	6.5×10^7
	5	5.0×10^2	4.1×10^6	3.8×10^5
	平均	4.6×10^4	7.8×10^6	5.9×10^6
7	1	1.1×10^7	3.3×10^7	2.0×10^7
	2	6.8×10^4	9.6×10^6	2.6×10^7
	3	2.2×10^5	1.3×10^7	2.1×10^8
	4	1.1×10^6	5.5×10^7	5.2×10^7
	5	2.4×10^4	3.2×10^7	2.8×10^8
	平均	3.4×10^5	2.4×10^7	6.9×10^7
10	1	3.1×10^6	6.5×10^7	2.9×10^8
	2	4.7×10^6	1.9×10^8	1.3×10^9
	3	1.1×10^7	1.4×10^9	1.3×10^8
	平均	5.4×10^6	2.6×10^8	3.7×10^8

* CFU/ml、g

** 幾何平均

表-22 菌浴接種により Aeromonas salmonicida AYS-2
株を実験感染させたアマゴの血液、肝臓および
腎臓中の接種菌生菌数の経時変化

接種後日数	供試魚 No.	血 液	肝 臓	腎 臓
1	1	3.0×10^1 *	6.0×10^2	1.5×10^3
	2	4.0×10^1	7.0×10^2	1.1×10^3
	3	1.0×10^1	1.0×10^2	9.5×10^2
	4	2.1×10^2	4.5×10^3	6.5×10^4
	平均 **	4.0×10^1	6.6×10^2	3.2×10^3
2	1	1.0×10^1	2.1×10^3	9.2×10^3
	2	4.1×10^2	9.5×10^3	2.5×10^5
	3	1.1×10^3	5.6×10^4	4.5×10^6
	4	6.0×10^1	8.0×10^2	6.1×10^4
	平均	1.3×10^2	5.5×10^3	1.6×10^5
3	1	1.1×10^2	1.9×10^3	3.5×10^4
	2	1.1×10^4	6.5×10^5	6.1×10^6
	3	4.0×10^2	7.2×10^4	1.2×10^7
	4	6.5×10^3	4.2×10^3	6.5×10^6
	平均	1.3×10^3	2.5×10^4	2.0×10^6
4	1	2.9×10^5	1.2×10^6	2.0×10^6
	2	3.6×10^5	7.2×10^6	9.9×10^6
	3	2.7×10^6	1.5×10^6	1.2×10^7
	4	4.8×10^4	1.1×10^5	1.6×10^5
	平均	3.4×10^5	1.1×10^6	2.5×10^6
5	1	1.6×10^6	2.5×10^6	4.1×10^6
	2	2.8×10^4	4.1×10^5	5.2×10^6
	3	1.4×10^5	1.2×10^6	1.8×10^7
	4	9.5×10^5	1.1×10^6	1.7×10^7
	平均	2.8×10^5	1.1×10^6	9.0×10^6
6	1	2.1×10^5	7.6×10^5	3.0×10^6
	2	3.3×10^6	5.3×10^6	5.1×10^7
	3	1.0×10^6	2.4×10^6	2.6×10^6
	4	5.2×10^5	3.1×10^6	9.9×10^6
	平均	7.7×10^5	4.2×10^6	7.9×10^6
7	1	4.5×10^6	3.2×10^6	8.3×10^7
	2	7.9×10^5	4.4×10^6	7.5×10^6
	3	3.0×10^6	6.2×10^6	2.1×10^6
	4	2.5×10^4	1.9×10^5	1.9×10^6
	平均	7.2×10^5	2.0×10^6	7.1×10^6

* CFU/ml、 g

** 幾何平均

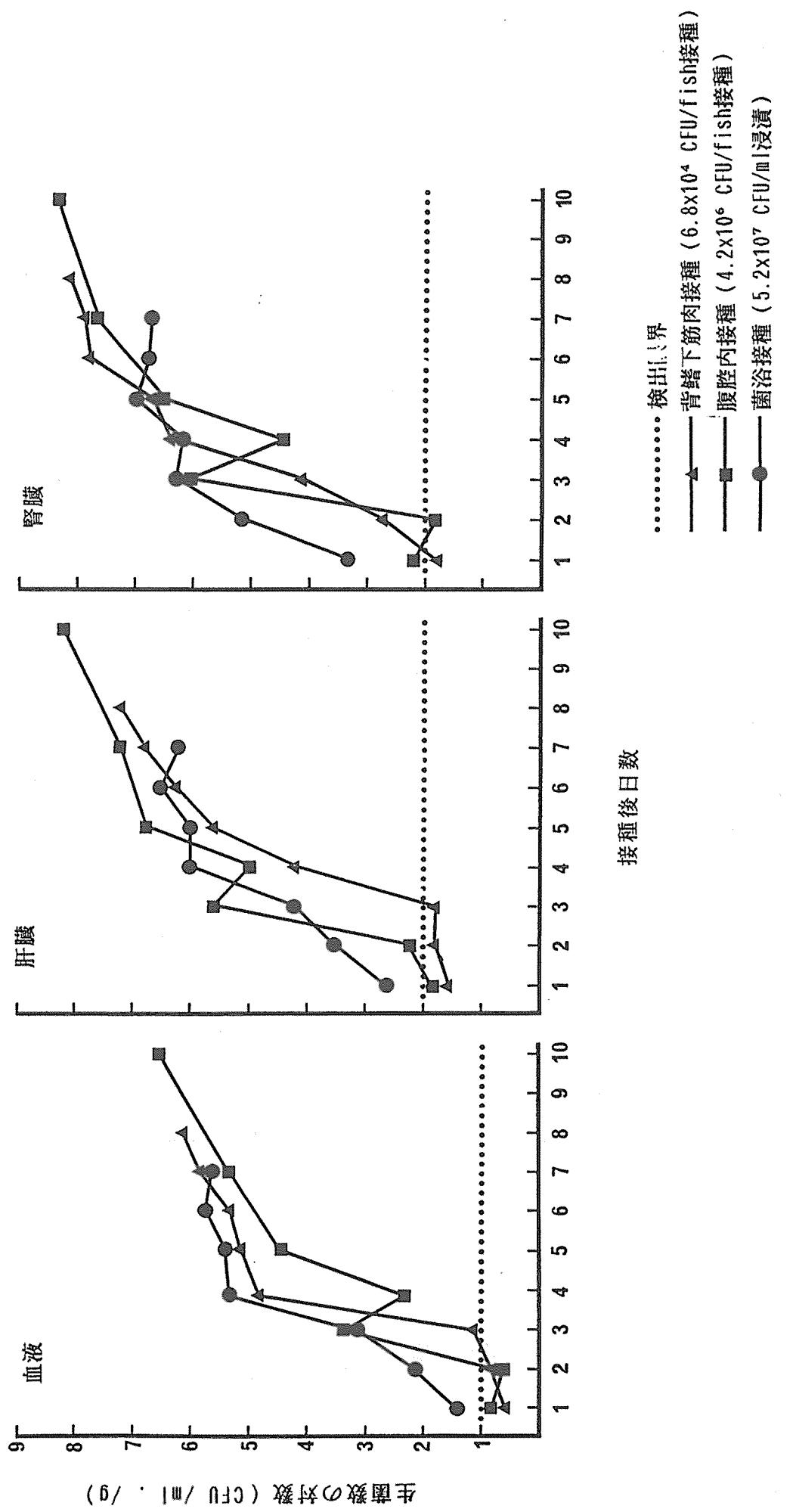


図-4 背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によって*Aeromonas salmonicida* AVS-2株を実験感染させたアマゴの血液、肝臓および腎臓における接種菌生菌数の経時変化

2尾の肝臓および5尾の腎臓から検出され、その平均値はそれぞれ 1.4×10^1 、 7.5×10^1 および 1.3×10^4 であった。4日後以降は全供試魚の各臓器から検出され、4日後の平均値は血液で 8.4×10^4 、肝臓で 2.4×10^4 、腎臓で 3.3×10^6 、5日後以降は徐々に増加して、それぞれ $1.6 \times 10^5 \sim 1.1 \times 10^6$ 、 $6.6 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^7$ 、 $7.9 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^8$ であった。腹腔内接種では、接種1日後および2日後に5尾中2尾の各臓器から検出され、その平均値はそれぞれ血液で 5.6×10^0 および 4.0×10^0 、肝臓で 6.3×10^1 および 2.2×10^2 、腎臓で 1.2×10^2 および 8.5×10^1 であった。3日後以降は全供試魚の各臓器から検出され、3日後の平均値は血液で 3.4×10^3 、肝臓で 6.3×10^5 、腎臓で 1.1×10^6 であり、4日後以降は徐々に増加してそれぞれ $3.4 \times 10^2 \sim 5.4 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^5 \sim 2.6 \times 10^8$ 、 $4.5 \times 10^4 \sim 3.7 \times 10^8$ であった。菌浴接種では、接種1日後より全供試魚の各臓器から検出され、その平均値は1日後の血液で 4.0×10^1 、肝臓で 6.6×10^2 、腎臓で 3.2×10^3 から、3日後のそれぞれ 1.3×10^3 、 2.5×10^4 、 2.0×10^6 まで徐々に増加したが、4日後以降はそれぞれ $2.8 \times 10^5 \sim 7.7 \times 10^5$ 、 $1.1 \times 10^6 \sim 4.2 \times 10^6$ 、 $2.5 \times 10^6 \sim 9.0 \times 10^6$ とあまり変化しなかった。

瀕死魚における各臓器中の接種菌生菌数については、表-23に示した。背鰭下筋肉接種では、胃、腸、幽門垂、筋肉、眼球および胆汁が $10^3 \sim 10^5$ 、肝臓が $10^4 \sim 10^6$ 、腎臓、脾臓、心臓および鰓が $10^5 \sim 10^7$ 、接種部筋肉およびせつそう患部膿様物が $10^8 \sim 10^9$ であった。腹腔内接種では、肝臓、心臓、鰓、筋肉、眼球および胆汁が $10^5 \sim 10^7$ 、血液、腎臓、脾臓、胃、腸および幽門垂が $10^7 \sim 10^9$ であった。菌浴接種では、血液、肝臓、胃、幽門垂、筋肉、眼球および胆汁が $10^5 \sim 10^7$ 、腎臓、脾臓、心臓、腸および鰓が $10^7 \sim 10^9$ であった。

考 察

表-23 背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によつてAeromonas salmonicida AYS-2株を実験感染させたアマゴ瀕死魚の各臓器中の接種菌生菌数

臓 器	背鰭下筋肉接種				腹腔内接種				菌浴接種			
	供試魚 1	供試魚 2	供試魚 3	供試魚 4	供試魚 1	供試魚 2	供試魚 1	供試魚 2	供試魚 1	供試魚 2	供試魚 1	供試魚 2
血液	NT *	NT	NT	NT	4.7×10 ^{7**}	3.7×10 ⁸	8.7×10 ⁶	1.6×10 ⁷	NT	NT	NT	NT
肝臓	3.0×10 ^{4***}	2.9×10 ⁶	NT	NT	2.9×10 ⁷	1.5×10 ⁷	7.0×10 ⁷	4.4×10 ⁷	NT	NT	NT	NT
腎臓	3.0×10 ⁵	1.8×10 ⁷	3.0×10 ⁶	5.3×10 ⁷	2.9×10 ⁸	2.1×10 ⁸	1.0×10 ⁹	2.0×10 ⁹	NT	NT	NT	NT
脾臓	6.0×10 ⁵	1.0×10 ⁷	NT	NT	2.9×10 ⁹	1.0×10 ⁹	6.6×10 ⁸	2.8×10 ⁸	NT	NT	NT	NT
心臓	6.2×10 ⁵	1.8×10 ⁷	NT	NT	3.6×10 ⁷	9.3×10 ⁷	2.4×10 ⁸	1.9×10 ⁸	NT	NT	NT	NT
胃	3.2×10 ³	1.0×10 ⁵	NT	NT	1.9×10 ⁸	3.9×10 ⁷	9.0×10 ⁵	1.5×10 ⁶	NT	NT	NT	NT
腸	4.0×10 ³	2.3×10 ⁵	NT	NT	1.0×10 ⁹	1.2×10 ⁹	1.5×10 ⁸	1.2×10 ⁷	NT	NT	NT	NT
幽門垂	1.3×10 ⁵	2.5×10 ⁵	NT	NT	5.2×10 ⁸	1.3×10 ⁸	6.5×10 ⁶	4.4×10 ⁶	NT	NT	NT	NT
鰓	1.1×10 ⁵	2.3×10 ⁷	NT	NT	3.5×10 ⁷	6.0×10 ⁷	2.2×10 ⁸	6.8×10 ⁷	NT	NT	NT	NT
筋肉	NT	NT	5.5×10 ³	2.4×10 ⁴	2.6×10 ⁶	1.4×10 ⁵	4.8×10 ⁵	1.0×10 ⁶	NT	NT	NT	NT
眼球	NT	NT	3.6×10 ⁴	8.9×10 ⁴	1.3×10 ⁶	5.9×10 ⁵	2.8×10 ⁵	1.7×10 ⁵	NT	NT	NT	NT
胆汁	NT	NT	1.4×10 ⁵	2.0×10 ⁴	3.9×10 ⁷	2.7×10 ⁷	4.5×10 ⁵	5.2×10 ⁵	NT	NT	NT	NT
接種部筋肉	3.7×10 ⁹	5.6×10 ⁸	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
腹部臓様物	NT	NT	7.8×10 ⁹	1.8×10 ⁹	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

* 測定せず ** CFU/ml ***CFU/g

本実験では、アマゴにA. salmonicidaを、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種により実験感染させ、斃死状況と魚体内の接種菌生菌数の消長を調べた。

接種ルートによる接種菌生菌数の動向については、接種1日後において、背鰭下筋肉接種では血液、肝臓および腎臓の各臓器ともに接種菌生菌が検出されなかつたのに対して、腹腔内接種では5尾中2尾、菌浴接種ではすべての供試魚の各臓器から検出された。またすべての供試魚から接種菌生菌が検出されるようになったのは、菌浴接種では1日後であったのに対して、背鰭下筋肉接種では4日後、腹腔内接種では3日後と接種ルートにより大きな差が認められた。せっそく病の感染経路については、経皮、経鰓および経口が考えられ、それぞれ特異な初期症状を呈するとされているが（江草 1978）、実験感染においても接種ルートの違いによって、接種された生菌の初期の魚体内動向が異なることが明らかになった。なお、KLONTZ *et al.* (1966) はニジマスにA. salmonicidaの強毒株を背鰭下筋肉接種して（接種96時間後で40%の斃死率）、接種8時間後に腎臓より少数の接種菌生菌を検出したが、その後56時間までは検出されず、それ以後に再度腎臓より検出したとしており、本実験結果とやや異なった結果を報告している。

臓器別の接種菌生菌の出現状況をみると、腹腔内接種および菌浴接種では血液、肝臓および腎臓においては、差異が認められなかつたが、背鰭下筋肉接種では肝臓における出現が著しく遅れた。宮崎・窪田（1975）が指摘しているように、臓器によって防御機能になんらかの差異があるものと推察される。

接種菌生菌数の経時変化についてみると、接種4日後以降は各接種法ともほぼ同じ傾向を示し、斃死魚が出現するまでは経時的に増加し、血液で $10^4 \sim 10^5$ 、肝臓および腎臓で $10^5 \sim 10^6$ に達すると斃死が始まり、その後の生残魚においてはあまり変化しないものと考えられた。

瀕死魚においては、測定したすべての臓器から多量の接種菌生菌が検出され、

各接種法とも、全身感染に陥っていると考えられた。接種法別に見ると、背鰭下筋肉接種では腹腔内接種および菌浴接種に比較して、全般的にやや接種菌生菌数が少なく、殊に腸では4オーダー低かった。これは、前述のように背鰭下筋肉接種において腸の発赤が認められなかつたことと関連していると思われ、背鰭下筋肉接種よりも腹腔内接種や菌浴接種の方が、自然感染により近いのではないかと考えられた。

第2節 実験感染アマゴ魚群からの飼育水中への接種菌の排菌

前節ではアマゴに*A. salmonicida*の強毒株を背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種により実験感染させ、斃死の状況と接種菌生菌の魚体内消長および分布を検討した。本節では前節と同様にアマゴに*A. salmonicida*の強毒株を3ルートによって実験感染させ、斃死状況と感染魚から飼育水中への接種菌の排菌の状況を調べた。

実験方法

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重81.3gのアマゴ1年魚を、各接種法毎に10尾ずつ用いた。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフェュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（ 10^8 CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で 10^{-2} ～ 10^{-5} まで10倍段階希釈した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 背鰭下筋肉接種では、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尾当たり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尾当たり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°Cであった。

供試魚の飼育および観察 各接種区毎に15l容ガラス水槽に供試魚を収容

し、地下水を一槽当たり約 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。なお、本実験に供試した地下水は、屋外に設置された無蓋の貯水槽を経由するものである。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

飼育水中の生菌数の測定 表-24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口より無菌的に採水し、滅菌生理食塩水を用いて10倍段階希釀系列を作つて、各希釀段階の 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日後に出出現した集落数を計数し総生菌数とした。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当たりの 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であった。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各接種区における斃死状況を表-24に示した。背鰭下筋肉接種では、接種7日後に斃死が始まり12日後に全数が斃死した。腹腔内接種では、5日後に斃死が始ま10日後に全数が斃死した。菌浴接種では、11日後および13日後に1尾ずつ斃死したのみで、累積斃死率は20%であった。

各飼育水の総生菌数およびA. salmonicida生菌数の変化を表-25に示した。各接種区共通の給水においては、総生菌数が $10^2 \sim 10^3$ CFU/mlで推移し、当然 A. salmonicida は検出されなかった。背鰭下筋肉接種区の排水では、総生菌数は $10^2 \sim 10^4$ CFU/mlで推移し、A. salmonicidaは接種6日後から12日後までと14日後に

表-24 背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によって Aeromonas salmonicida AYS-2株を実験感染させたアマゴの斃死状況

接種後 日数	背鰭下筋肉接種		腹腔内接種		菌浴接種	
	斃死尾数	累 斃死率	斃死尾数	累 斃死率	斃死尾数	累 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
15					0	20
16					0	20
17					0	20
18					0	20
19					0	20
20					0	20
21					0	20
22					0	20
23					0	20
24					0	20
25					0	20
26					0	20
27					0	20
28					0	20

表-25 実験感染魚飼育水の総生菌数およびAeromonas salmonicida AYS-2株生菌数

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

* CFU/ml ** 測定せず

網掛け部は鱗死魚の見られた期間を表す

$10^2 \sim 10^4$ CFU/ml 検出された。腹腔内接種区の排水では、総生菌数は $10^2 \sim 10^4$ CFU/ml で推移し、A. salmonicida は接種 5 日後から 11 日後までに $10^1 \sim 10^4$ CFU/ml 検出された。菌浴接種区の排水では、総生菌数は $10^2 \sim 10^4$ CFU/ml で推移し、A. salmonicida は接種 6 日後から 15 日後までと 18, 19 および 22 日後に $10^1 \sim 10^3$ CFU/ml 検出された。

考 察

本実験には開放式の貯水槽を経由する地下水を供試魚飼育水として用いたが、各接種区共通の給水試料の総生菌数は、実験期間を通じてほぼ一定であり、この給水の細菌数は一定していたことになる。

各接種区の排水に A. salmonicida が初めて検出された時期は、各区とも菌接種 4～6 日後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、背鰭下筋肉接種および腹腔内接種では試水中に接種菌が検出されたのは最初の斃死のみられた 1 日前であったが、菌浴接種では 6 日前であった。これは各区の累積斃死率が前二者で 100% であったのに対し、後者では 20% と感染の程度が低かったため、感染・発病から斃死までにより長時間を要したためであると考えられた。また、菌浴接種において斃死がみられなくなつてから 9 日後の、菌接種 22 日後にも本菌が検出されたが、これは生残魚が保菌魚となって、本菌を排出し続いているものと考えられた。

感染魚から排出された A. salmonicida の菌量は、各接種区とも飼育水排水 1 ml 当り $10^3 \sim 10^4$ CFU に達した。本供試菌の菌浴接種による実験感染の LD₅₀ はアマゴでは $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml であり（表-6 および表-15）、排出された菌量では直ちに感染・発病するとは限らない。しかし自然状態では本研究の実験感染法より暴露時間も長いことから、このように病魚から排出された A. salmonicida によ

って、感染・発病が拡大していくものと思われる。

以上のように、せっそう病の実験感染においては、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、飼育水中の菌検出による本病発生の早期発見の可能性が示唆された。なお前述のように斃死魚がみられるようになると、飼育水中に多量のA. salmonicidaが排出される事実や、長野県水産指導所（1980）がニジマスを用いて背鰭下筋肉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、疾病の拡大を防ぐためには斃死魚の早期撤去が必要であると考えられる。

なお、本実験において供試魚は菌接種後4週間、給餌をしないで観察を行ったが、第Ⅰ章、第1節と同様、観察期間中の無給餌が実験結果に大きな影響をおぼしていないと判断された。

第3節 実験感染アマゴ魚群における不顕性感染魚の検出

せっそう病をはじめとする魚類の伝染性疾病の防疫対策を考える場合、伝染源の排除が要求され、その伝染源として不顕性感染魚の存在が最も重要であるとされている（MCCRAN 1952）。マス類の養殖が盛んになるにつれて、その種苗魚等の交流が増加しており、伝染性疾病の蔓延の一因とも考えられているが、これには「健康魚」として移動された魚群に混在している不顕性感染魚が見逃されたと思われる例が多く、迅速で感度の良い不顕性感染魚の検出技術の開発が待たれている。

本節では実験感染アマゴ魚群中のA. salmonicida不顕性感染魚の有無を、腎臓の塗抹培養法によって調べるとともに、BULLOCK and STUCKEY (1975)に準じて不顕性感染魚の検出率におよぼす副腎皮質ホルモン剤投与の効果についても調べた。

実験1 実験感染生残魚群からの不顕性感染魚の検出

実験方法

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重33.1g のサクラマス0年魚のスマoltを 120尾用いた。

A. salmonicidaの実験感染 供試魚を20尾ずつ6群に分け、3群に供試菌の背鰭下筋肉接種を、他の3群には菌浴接種を施した。供試菌接種方法は第2節と同じであるが、接種菌量は、背鰭下筋肉接種では 3.5×10^{-1} CFU/fish(以下本節では単位を省略する), 3.5×10^0 および 3.5×10^1 、菌浴接種では供試菌懸濁液の菌数を 3.5×10^5 CFU /ml (以下本節では単位を省略する) 、 3.5×10^6 および 3.5×10^7

とした。

供試魚の飼育および観察 各区毎に25l 容ガラス水槽に供試魚を収容し、地下水を一槽当たり約 0.8l /min注入して、無給餌、流水条件下で3週間斃死状況を観察した。

副腎皮質ホルモン剤の注射 供試菌接種3週間後の生残魚の半数に酢酸プロレドニゾロン<塩野義製薬K.K. プレドニン注>（以下PZAと略記）を供試魚体重1kg当たり20mg（注射液量0.1ml/fish）背鰭下筋肉に注射し、以後1週間斃死状況を観察した。

死因の判定 第I章、第1節と同じである。

不顕性感染魚の検査 PZA注射前およびPZA注射1週間後に、各区の非発病魚より腎臓から白金耳を用いて普通寒天培地（ニッスイ）平板上に塗抹を行い、20°Cで4日間培養後に*A. salmonicida*の発育がみられた供試魚を不顕性感染魚とした。なお、PZA注射後にせっそう病によって斃死した供試魚も不顕性感染魚とみなした。

実験水温 15.8～16.6°Cであった。

実験結果

菌接種3週間後およびPZA注射1週間後の斃死状況、PZA注射前およびPZA注射1週間後の不顕性感染魚検査の結果を表-26に示した。菌接種3週間後には、背鰭下筋肉接種では、 3.5×10^1 区で20%、 3.5×10^0 区で5%の斃死がみられ、 3.5×10^{-1} 区では斃死がみられなかった。菌浴接種では、 3.5×10^7 区で75%， 3.5×10^6 区で20%の斃死がみられ、 3.5×10^5 区では斃死がみられなかった。また、PZA注射1週間後には、背鰭下筋肉接種では、 3.5×10^1 区の8尾のうち3尾が斃死したのみであったが、菌浴接種では、 3.5×10^7 区で2尾中1尾、 3.5×10^6 区

表-26 Aeromonas salmonicida AYS-2 株の実験感染生残魚群からの
不顯性感染魚の検出結果

	背鰭下筋肉接種 (CFU/fish)			菌浴接種 (CFU/ml)		
	3.5×10^1	3.5×10^0	3.5×10^{-1}	3.5×10^7	3.5×10^6	3.5×10^5
<u>鑿死尾数</u>						
PZA* 注射前	4/20**	1/20	0/20	15/20	4/20	0/20
PZA 注射 1 週間後	3/ 8	0/10	0/10	1/ 2	3/ 8	7/10
<u>不顯性感染魚尾数</u>						
PZA 注射前	0/ 8	0/ 9	0/10	0/ 3	0/ 8	0/10
PZA 注射 1 週間後	1/ 5	2/10	2/10	1/ 1	1/ 5	1/ 3

* PZA : 酢酸プレドニゾロンを供試菌接種3週間後に注射

** 分母：供試尾数 分子：該当尾数

で8尾中3尾、 3.5×10^5 区で10尾中7尾が斃死した。菌接種3週間後の不顕性感染の状況については、両接種区とも不顕性感染魚はまったくみられなかつた。しかしPZA注射1週間後の生残魚では、背鰓下筋肉接種では、 3.5×10^1 区で5尾中1尾、 3.5×10^0 区および 3.5×10^{-1} 区で10尾中2尾が、菌浴接種では、 3.5×10^7 区の1尾、 3.5×10^6 区で5尾中1尾、 3.5×10^5 区で3尾中1尾が不顕性感染魚であつた。

実験2 実験感染後抗菌剤によって治癒した魚群からの不顕性感染魚の検出

実験方法

供試魚 以下の方針によって、せっそう病の実験感染後、抗菌剤によって治癒した魚群を供試した。

岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重65.0gのアマゴ1年魚を120尾用い、実験1と同じ方法で菌浴接種により実験感染を行つた。なお供試菌懸濁液の菌量は 2.2×10^7 とした。この供試魚を20尾と100尾に分け、前者を20l容ガラス水槽に、後者を100l容プラスチック水槽に収容し、地下水を前者には約0.8l/min、後者には約4l/min注入した。20尾の供試魚は無処理のまま、100尾の供試魚には、供試菌接種3日後から5日間、ナリジクス酸を1日量として魚体重1kg当たり20mgを、第IV章、第1節で詳述する方法で強制経口投与した。供試菌接種後3週間の斃死状況は、20尾の無処理供試魚群が全数斃死したのに対して、100尾のナリジクス酸投与魚群から48尾の治癒生残魚を得た。

生理食塩水および副腎皮質ホルモン剤の注射 上記により得た48尾の供試生残魚を22尾と26尾に分け、前者には1尾当たり0.1mlの生理食塩水を、後者には

表-27 *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株の実験感染後、抗菌剤によって治癒した魚群からの不顕性感染魚の検出結果

	生理食塩水注射区	P Z A* 注射区
斃死尾数	1/22**	15/26
不顕性感染魚尾数	0/21	7/11

*P Z A : 酢酸プレドニゾロン

**分母：供試尾数 分子：該当尾数

供試魚体重1kg当たり20mgのPZA（注射液量0.1ml）を背鰭下筋肉に注射した。

生理食塩水およびPZA注射後の飼育および観察 両群を別々に25L容ガラス水槽に収容し、地下水を一槽当たり約0.8L/min注入して、無給餌、流水条件下で注射後3週間斃死状況を観察した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

不顯性感染魚の検査 生理食塩水およびPZA注射3週間後に、実験1と同じ方法で行った。

実験水温 電気ヒーターを用いて、15±0.5°Cに制御した。

実験結果

PZA注射後3週間の斃死状況と、実験終了時における不顯性感染魚の検査の結果を表-27に示した。生理食塩水注射区では、注射6日後にせっそう病による斃死が1尾みられたのみであったが、PZA注射区では、注射3日後からせっそう病による斃死が始まり、13日後までに供試した26尾中15尾（57.7%）が斃死した。PZA注射3週間後の不顯性感染の状況については、生理食塩水注射区では、21尾の生残魚はいずれも不顯性感染魚ではなかったが、PZA注射区では、生残魚11尾のうち7尾（63.6%）が不顯性感染魚として検出された。

考 察

本節では、不顯性感染魚の検出法について、供試魚腎臓の直接塗抹培養法とBULLOCK AND STUCKEY(1975)に準じた副腎皮質ホルモン剤の投与処理後の腎臓の塗抹培養法との比較を行った。彼等は昇温処理とトリアムシノロンアセトニドの投与の併用によりA. salmonicidaの不顯性感染魚の検出率が高まったと述べてい

るが、本実験でも高水温下（15～16°C）においてPZAを注射するとA. salmonicida不顯性感染魚の検出率が飛躍的に向上した。

実験1では、せっそう病実験感染後の生残魚群における不顯性感染の状況を調べたが、背鰭下筋肉接種および菌浴接種の各3段階の接種菌量の合計6魚群とも明らかに不顯性感染魚群（群不顯性感染率<不顯性感染魚数／検査尾数>：20～100%）が認められた。供試した生残魚は実験感染において、すでに斃死がみられなくなつてから11～14日も経過し、実験開始時にも全く異常が認められなかつたにもかかわらず、すべてが不顯性感染魚群と認定された。また BULLOCK and STUCKEY (1975) はニジマスのせっそう病の流行2年後にも同一群から不顯性感染魚を検出しているが、せっそう病の終熄後、同一魚群にはかなりの期間不顯性感染魚が存在するものと思われ、種苗等の交流などによるこのような不顯性感染魚の移動に起因する本病の伝播には充分な注意が必要と考えられる。

実験2においては、A. salmonicidaの実験感染後、抗菌剤の投与によって治癒した魚群の不顯性感染の状況を調べたところ、群不顯性感染率が84.6%ときわめて高かった。この魚群は、実験感染後ナリジクス酸の投与により治癒したものと考えられ、供試時にも全く異常が認められなかつたにもかかわらず、このように高い不顯性感染率を示したのは、ナリジクス酸の抗菌作用が、静菌的であること (RINGEL et al. 1968) とも関連していると考えられるが、静菌剤の投与によって一旦本魚病が治癒したようにみえても、同一魚群にはかなりの期間不顯性感染魚が存在するものと思われ、やはり種苗の交流時には注意を要すると考えられる。

なお、実験2において供試魚は実験開始後6週間、給餌をしないで観察を行つたが、第Ⅰ章、第1節と同様、観察期間中の無給餌が実験結果に大きな影響をおよぼしていないと判断された。

第4節 自然発病経歴のない魚群からの不顕性感染魚の検出

前節ではA. salmonicidaによる実験感染アマゴ魚群について、不顕性感染の状況を調べ、実験感染生残魚群および実験感染後抗菌剤によって治癒した魚群のいずれもが高い群不顕性感染率を示すこと、副腎皮質ホルモン剤の投与によって不顕性感染魚の検出率が向上することを明らかにした。本節では、せっそう病の自然発病経歴のないアマゴ、ヤマメおよびサクラマス魚群を対象として、副腎皮質ホルモン剤の投与によって不顕性感染の状況を調べるとともに、不顕性感染魚の検査時の飼育水温についても検討した。

実験方法

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴および抗菌剤の投与経歴がなく、供試時にも異常が認められなかったアマゴ0年魚（平均体重27.5g）を120尾、同様のアマゴ1年魚（50.0g）、同様のヤマメ1年魚（45.0g）および同様のサクラマス1年魚（100.0g）をそれぞれ80尾ずつ用いた。なお、本節、第V章・第3節および第VI章・第1節以外で用いた供試魚は実験飼育池で飼育されたものであるが、本節、第V章・第3節および第VI章・第1節で用いた供試魚は一般飼育池で飼育されたものである。

実験区 1魚群を40尾ずつに2等分（アマゴ0年魚のみは、40尾と80尾）し、第1群は自然水温下（7.0～8.0℃）で（自然水温区）、第2群は飼育水温を約2時間で自然水温から15℃に上昇させ（水温上昇区）、 15 ± 0.5 ℃で1日飼育した後、各群を更に2等分（アマゴ0年魚のみは、20尾と40尾）し、一方には生理食塩水（生理食塩水注射区）を、他方には前節同様下記の方法でPZA（PZA注射区）を注射した。

生理食塩水および副腎皮質ホルモン剤の注射 生理食塩水注射区には供試

魚1尾当り 0.1mlの生理食塩水を、PZA注射区には供試魚体重1kg当り20mg（注射液量0.1ml/fish）のPZAを背鰭下筋肉に注射した。

生理食塩水およびPZA注射後の飼育および観察 各区毎に25l容ガラス水槽に供試魚を収容し、地下水を一槽当たり約 0.8l/min 注入して、無給餌、流水条件下のそれぞれの飼育水温で注射後3週間斃死状況を観察した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

不顕性感染魚の検査 観察期間終了直後、各区の生残魚について、前節、実験1と同様の方法で行った。なお、PZA注射後にせっそう病によって斃死した供試魚も不顕性感染魚とみなした。

実験結果

生理食塩水およびPZA注射後3週間の斃死状況と観察期間終了直後の不顕性感染魚の検査結果を表-28に示した。アマゴ0年魚群、ヤマメ1年魚群およびサクラマス1年魚群においては、各区とも斃死および不顕性感染魚はまったくみられなかった。アマゴ1年魚群においては、自然水温区および水温上昇区の生理食塩水注射区では斃死および不顕性感染魚はみられなかつたが、水温上昇区のPZA注射区では、注射7日後からせっそう病による斃死が始まり、14日後までに16尾（80%）が斃死した。なお同区の4尾の生残魚からは*A. salmonicida*は検出されなかつた。

考 察

本節では、せっそう病の自然発病経歴がなく、供試時にも異常が認められない4魚群について不顕性感染の状況を調べたが、そのうち1群が不顕性感染魚群（

表-28 せっそう病の自然発病経歴のない魚群からのAeromonas salmonicida不顯性感染魚の検出結果

魚種	魚齢	自然水温区				水温上昇区			
		生理食塩水注射	P.Z.A.* 注射	不顯性感		生理食塩水注射	P.Z.A.注射	不顯性感	
				斃死尾数**染魚尾数	染魚尾数			斃死尾数	染魚尾数
アマゴ	0+	0/20***	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/60	0/60
アマゴ	1+	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	16/20	0/4
ヤマメ	1+	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20
サクラマス	1+	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

* P.Z.A.: 酢酸ブレドニゾロン ** せっそう病による斃死尾数 *** 分母: 供試尾数 分子: 該当尾数

群不顕性感染率：80%）であることが明らかになった。供試した魚群が飼育されていた岐阜県水産試験場の一般飼育池では、毎年せっそう病の発病がみられる魚群があることや、水系を同じくする同水試の上流部にも例年せっそう病の発生がみられる養魚場が存在することなどから、同水試一般飼育池で飼育されている魚群はA. salmonicidaに侵襲を受ける機会が多いことが予想される。しかし供試した4魚群のうち1魚群だけが不顕性感染魚群と考えられたことから、ある魚群がA. salmonicidaに暴露された場合や一旦感染しても、魚群の生理的条件や飼育環境条件の相違によって、何等の影響も受けない場合や不顕性感染魚群となる場合、あるいは感染後発病する場合のあることが推察される。すなわち従来A. salmonicidaは絶対性病原体といわれてはいるが（SNIESZKO 1964）、その感染・発病に至る過程には、飼育環境条件を背景にした宿主の生理的条件などが大きく関与しているものと推察される。この事実はマス類の池中養殖において従来から経験的に知られているように、飼育環境条件が良ければ本病の発生が少ない傾向のあること、また発病しても被害量が少ない傾向のあることを裏付けていると考えられる。

本節では前節に引き続き不顕性感染魚の検出法について、供試魚腎臓の直接塗抹培養法とBULLOCK and STUCKY (1975)に準じた副腎皮質ホルモン剤の投与処理後の腎臓の塗抹法との比較を行い、同時に供試魚飼育水温の昇温処理の影響について検討した。BULLOCK and STUCKY (1975)は昇温処理とトリアムシノロンアセトニドの投与の併用は無論、生理食塩水を注射し昇温処理をするだけでも不顕性感染魚の検出率が高まったとしているが、本実験では生理食塩水を注射し昇温処理をするだけ、あるいはPZAの投与だけでは検出率は向上せず、高水温下(15°C前後)において同剤を注射すると不顕性感染魚の検出率が飛躍的に向上した。このことから、より確実に不顕性感染魚を検出するには、供試魚飼育水温を15°C

前後とし、副腎皮質ホルモン剤を注射する方法が適していると考えられた。

小 括

本章では、A. salmonicidaの魚体内における動態を明らかにするために、以下の検討を行った。

まず、実験感染における接種ルート別のアマゴの各臓器中の接種菌生菌数の消長について、A. salmonicidaを背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によって感染させた魚群の斃死状況、生残魚の血液、肝臓および腎臓における接種菌生菌数の推移および瀕死魚の各臓器や組織における接種菌生菌の分布を検討し、接種ルートの違いによって、接種された生菌の感染初期の魚体内動向が異なること、接種菌生菌数は斃死魚が出現するまでは経時的に増加し、生菌数が一定の数に達すると斃死が始まること、瀕死魚は全身感染に陥っていること、菌浴接種が背鰭下筋肉接種および腹腔内接種に比較して、自然発病により近いことを明らかにした。

つぎに、実験感染アマゴ魚群からの飼育水中への接種菌の排菌について、A. salmonicidaを上記の3接種法によって感染させた魚群の斃死状況と飼育水中への排菌状況を調べることによって検討し、斃死魚が出現する以前に、すでに飼育水中にA. salmonicidaが検出され、飼育水中の本菌検出による本病の早期発見の可能性を示唆した。

また、不顕性感染魚の検出法を、A. salmonicidaによる実験感染アマゴ魚群を用いて、供試魚腎臓の直接塗抹培養法と飼育水温の昇温処理および副腎皮質ホルモン剤投与後の腎臓塗抹培養法とによって調べ、飼育水温の昇温処理と副腎皮質ホルモン剤投与との併用によって、不顕性感染魚の検出率が飛躍的に向上することを確認するとともに、実験感染生残魚群および実験感染後抗菌剤によって治癒した魚群の一部に不顕性感染魚が発見されることを明らかにした。

さらに、せっそう病の自然発病経歴がなく、供試時にも異常が認められない4魚群について、飼育水温の昇温処理および副腎皮質ホルモン剤投与後の腎臓塗抹培養法によって調べ、アマゴの1群が不顯性感染魚群であることを明らかにした。

第IV章 実験感染系を用いたアマゴのせっそう病治療試験法の検討

前章までに、アマゴに対するA. salmonicidaの実験感染技法に関する検討を行い、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種について、再現性の良い感染技法を確立するとともに、魚体内におけるA. salmonicidaの動態を明らかにした。しかし、実験感染系を用いて疾病の治療試験を行う際には、それに影響をおよぼす種々の要因を明らかにする必要があるが、これらについての既往の報告はほとんど見当たらない。そこで本章では、前章までに得られた知見を基礎とした実験感染系を用い、治療実験を行う際に問題になると思われる要因についての検討を行った。

第1節 投薬治療時の魚体内のA. salmonicida 菌数の変化

本節では、せっそう病を薬剤投与によって治療する際の、投薬直後の魚体内A. salmonicidaの動向を明らかにするために、菌浴接種によってA. salmonicidaを実験感染させたアマゴに抗菌剤を経口投与し、投薬24時間後までの魚体内の接種菌生菌数の消長を調べた。

実験方法

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重80.0gのアマゴ1年魚 100尾を用いた。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフェージョンプロス（栄研）

で、20°C・一夜培養し（ 10^8 CFU/mlになる），滅菌生理食塩水で 10^{-1} に希釈した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 供試魚を5.32%食塩水に2分間浸漬後、 4.8×10^7 CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液に3分間浸漬し、無投薬対照区および投薬区に50尾ずつ2等分して180l容のコンクリート水槽2槽に収容した。水槽には地下水を一槽当たり毎分約6l注入して、流水条件下で2日間観察した。

投薬 菌接種24時間後に投薬区の50尾には、ナリジクス酸を20mg/kg、1回、餌に混ぜ強制経口投与した。すなわち、マス用粉末飼料90%、 α -デンプン10%、水60%（固型成分に対する割合）に所定量の薬剤を加えて、ペレット状に成型し乾燥させたものを、MS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚の胃内に1尾ずつピンセットを用いて挿入した。なお、給餌率は0.5%とし、投薬終了1時間後に薬剤の嘔吐がないことを確認した。

魚体内の接種菌生菌数の測定 接種菌生菌数の魚体内経時変化を調べるために、無投薬対照区については菌接種24時間後、引き続き無投薬対照区および投薬区の両者について25時間後（投薬区では投薬1時間後に相当、以下同じ）、27(3)、30(6)、33(9)、36(12)、39(15)、42(18)、45(21)、48(24)時間後に、各区4尾ずつの供試魚の血液、肝臓および腎臓における接種菌生菌数を測定した。測定方法は第Ⅲ章、第1節と同じである。

実験水温 電気ヒーターを用いて、 15 ± 0.5 °Cに制御した。

実験結果

本実験の観察時間内には供試魚の斃死はみられなかった。

接種菌生菌数の経時変化については、図-5および表-29に示した。投薬前（

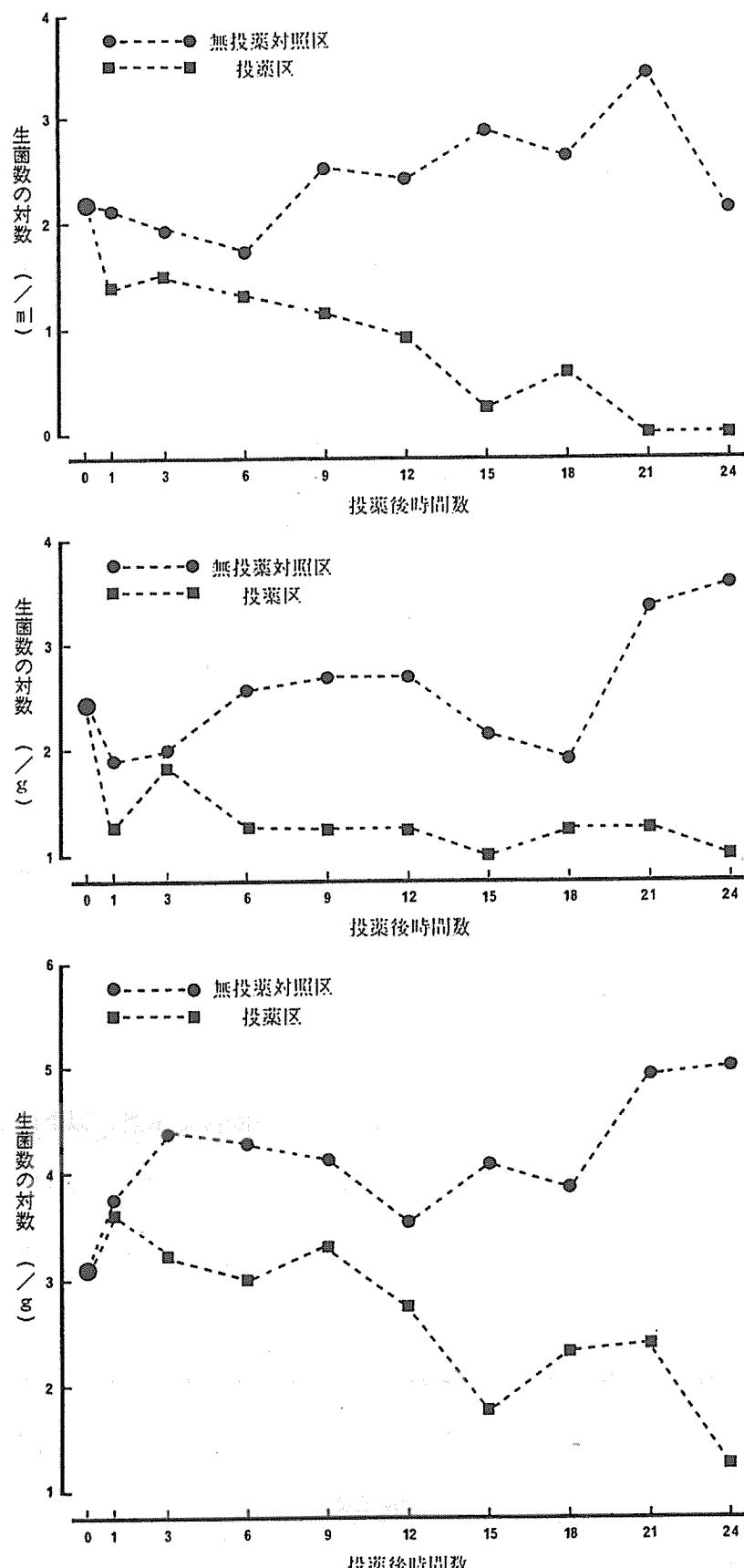


図-5 *Aeromonas salmonicida* AYS-2株を実験感染させたアマゴにおける投薬治療時の魚体内的接種菌生菌数の推移

表-29 *Aeromonas salmonicida* AYS-2株を実験感染させたアマゴにおける投薬治療時の魚体内の接種菌生菌数の推移

投薬後時間数	供試魚No.	無投薬対照区			NA投薬区		
		血液	肝臓	腎臓	血液	肝臓	腎臓
投薬前	1	1.6×10^2	4.0×10^2	4.9×10^4			
	2	9.2×10^2	1.5×10^3	1.1×10^4			
	3	4.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	5.0×10^3			
	4	9.0×10^1	8.0×10^2	8.6×10^3			
	平均**	1.5×10^2	2.6×10^2	1.2×10^3			
1	1	4.9×10^2	3.4×10^3	1.4×10^4	1.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	3.6×10^3
	2	5.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	6.0×10^2	1.0×10^1	1.0×10^2	1.8×10^3
	3	3.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	7.2×10^3	7.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	1.5×10^4
	4	4.0×10^2	1.0×10^2	1.6×10^4	5.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^3
	平均	1.3×10^2	7.6×10^1	5.6×10^3	2.4×10^1	1.8×10^1	4.1×10^3
3	1	1.7×10^2	2.0×10^3	5.2×10^4	2.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	1.8×10^3
	2	4.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	2.1×10^3	5.0×10^1	1.0×10^2	6.0×10^2
	3	9.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	9.2×10^3	3.0×10^1	2.0×10^2	2.5×10^3
	4	9.0×10^1	5.0×10^2	3.2×10^5	3.0×10^1	1.0×10^2	2.8×10^3
	平均	8.6×10^1	1.0×10^2	2.4×10^4	3.1×10^1	6.7×10^1	1.7×10^3
6	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^3	2.1×10^2	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^2
	2	1.6×10^2	5.0×10^2	1.2×10^4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	1.2×10^3
	3	1.5×10^2	1.3×10^3	1.1×10^4	7.0×10^1	1.0×10^2	1.5×10^3
	4	3.5×10^2	2.9×10^3	3.2×10^5	1.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	1.9×10^3
	平均	5.4×10^1	3.7×10^2	1.9×10^4	2.0×10^1	1.8×10^1	1.0×10^3
9	1	2.6×10^2	3.0×10^2	1.1×10^4	1.0×10^2	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^2
	2	7.2×10^2	1.0×10^3	2.0×10^5	4.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	4.0×10^2
	3	5.3×10^2	3.0×10^2	4.2×10^3	1.9×10^3	$<1.0 \times 10^2$	1.2×10^5
	4	1.4×10^2	6.0×10^2	3.2×10^3	5.0×10^1	1.0×10^2	1.3×10^3
	平均	3.4×10^2	4.8×10^2	1.3×10^4	1.4×10^2	1.8×10^1	2.1×10^3
12	1	9.1×10^3	7.8×10^3	3.2×10^4	4.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	8.0×10^2
	2	4.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	7.0×10^2
	3	2.3×10^3	3.9×10^3	1.0×10^4	1.0×10^1	1.0×10^2	3.0×10^2
	4	5.0×10^1	2.0×10^2	1.4×10^3	1.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	6.0×10^2
	平均	2.5×10^2	5.0×10^2	3.4×10^3	8.0×10^0	1.8×10^1	5.6×10^2
15	1	1.8×10^3	$<1.0 \times 10^2$	4.2×10^3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^2
	2	6.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	1.1×10^3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	3	4.5×10^3	4.2×10^3	2.3×10^5	1.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	6.0×10^2	9.0×10^2	2.3×10^4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	5.0×10^2
	平均	7.4×10^2	1.4×10^2	1.2×10^4	1.8×10^0	1.0×10^1	6.2×10^1
18	1	4.8×10^2	$<1.0 \times 10^2$	6.0×10^3	2.0×10^1	1.0×10^2	1.0×10^2
	2	1.5×10^2	$<1.0 \times 10^2$	5.1×10^3	1.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	1.2×10^3
	3	1.5×10^2	8.0×10^2	3.1×10^3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	1.0×10^2
	4	2.5×10^3	5.0×10^2	2.9×10^4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	2.0×10^2
	平均	4.1×10^2	8.0×10^1	7.2×10^3	3.8×10^0	1.8×10^1	2.2×10^2
21	1	1.4×10^3	1.7×10^4	1.7×10^6	$<1.0 \times 10^1$	$<1.1 \times 10^2$	1.0×10^2
	2	5.2×10^4	1.7×10^4	6.4×10^5	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^2
	3	9.0×10^1	1.0×10^2	5.2×10^2	$<1.0 \times 10^1$	1.0×10^2	1.1×10^3
	4	7.6×10^3	8.0×10^2	9.2×10^4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	1.0×10^2
	平均	2.7×10^3	2.2×10^3	8.5×10^4	1.0×10^0	1.8×10^1	2.4×10^2
24	1	2.5×10^1	6.2×10^2	8.2×10^3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	2	3.1×10^1	3.5×10^3	4.1×10^4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	3	1.0×10^2	1.2×10^3	1.5×10^5	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	4.2×10^3	7.5×10^4	2.0×10^6	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	1.0×10^2
	平均	1.3×10^2	3.7×10^3	1.0×10^5	1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1

* CFU/ml or g

** 幾何平均

菌接種24時間後)の生菌数は、血液で平均 1.5×10^2 CFU/ml、肝臓で 2.6×10^2 CFU/g、腎臓で 1.2×10^3 CFU/gであった。その後は多少の変動はあるが、無投薬区では時間の経過とともに生菌数が増加し、接種48時間後には、血液で 1.3×10^2 CFU/ml、肝臓で 3.7×10^3 CFU/g、腎臓で 1.0×10^5 CFU/gとなった。一方、投薬区では、血液で投薬後12時間以降、肝臓で6時間以降、腎臓で12時間以降に無投薬対照区との生菌数の差が大きくなり、24時間後(接種48時間後)には、1尾の腎臓から 1.0×10^2 CFU/gが検出されたのみで、ほとんど接種菌生菌が計測されなくなった。

考 察

養殖現場においてマス類のせっそう病に対して、抗菌剤の経口投与による治療が適正に行われた場合、投薬開始2~3日後より、斃死尾数が減少し始めることが経験的に知られているが、これまで投薬治療時のA. salmonicidaの魚体内における動態は解明されていない。本実験においては、ナリジクス酸の投薬6~12時間後に投薬区の魚体内接種菌生菌数が無投薬区に比較して少なくなり、24時間後には、接種菌生菌がほとんどみられなくなった。これは、本実験に供試した、A. salmonicida AYS-2株に対するナリジクス酸のMICが0.2mcg/mlであり(森川未発表)、一方、本章、第5節で詳述するように、アマゴにナリジクス酸を30mg/kg、1回、強制経口投与すると、投薬3時間後に血漿で3.3 mcg/ml、肝臓で8.8mcg/gとなり、6時間後には最高値(血漿:8.6mcg/ml、肝臓:13.9mcg/g、腎臓:12.2mcg/g)に達し、24時間後まで血漿で6 mcg/ml以上の濃度が保たれていたことから、本実験における投薬量が20mg/kgと若干低かった点を考慮しても、MICの10倍以上の組織内濃度が数時間持続されていると考えられ、魚体内での接種菌生菌の増殖が完全に阻止されたものと考えられる。

この実験結果から、せっそう病の化学療法に際して、原因菌が感受性を有する

薬剤を、魚体内濃度が有効治療濃度以上に上昇および持続される量を、適切な方法で投与すれば治療効果が充分期待できると考えられた。

第2節 A. salmonicida の接種ルートと治療効果との関係

前章までに、アマゴに対するA. salmonicidaの実験感染技法に関する検討を行い、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種による実験感染技法を確立した。せっそう病原因菌A. salmonicidaの感染経路としては、経皮、経鰓および経口が考えられ、それぞれの感染ルートにより特異な初期症状を示すとされているが（江草 1978）、実験感染魚に対する薬剤治療実験における原因菌接種ルートと治療効果との関係は明らかにされていない。そこで本節では、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によって、A. salmonicidaを実験感染させたアマゴに2段階の投薬量のナリジクス酸を経口投与し、菌の接種ルートが治療効果におよぼす影響を検討した。

実験方法

実験区 供試菌の背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種の3つの接種ルート毎に、それぞれ無投薬対照区、ナリジクス酸2.5mg/kg投薬区およびナリジクス酸10mg/kg 投薬区の合計9区を設けた。

供試菌株 第I章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重80.0gのアマゴ1年魚を各区10尾ずつ用いた。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフェュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（10⁸ CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で10⁻¹～10⁻⁵に希釈した。

生菌数の測定 第I章、第1節と同じである。

接種方法 背鰭下筋肉接種では、MS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔

を施した供試魚に、 5.9×10^3 CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液を、1尾当たり 0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。腹腔内接種では、同様に麻酔を施した供試魚に、 5.9×10^6 CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液を、1尾当たり 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、 5.9×10^7 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。

菌接種後の飼育 菌接種後の供試魚を各区毎に 270 容ガラス水槽に収容し、地下水を一槽当たり毎分約 1 ℥ 注入した。

投薬 投薬区には、1日1回、5日間（最初の投薬は菌接種24時間後）ナリジクス酸を 2.5あるいは 10mg/kg、餌に混ぜ強制経口投与した。投与方法は、第1節と同じである。

投薬後の観察 投薬後は無給餌で菌接種後 3 週間観察した。

実験水温 電気ヒーターを用いて、 15 ± 0.5 °C に制御した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各区の斃死状況を表-30に示した。無投薬対照区では、いずれの接種ルートともすべての供試魚が斃死した。すなわち背鰭下筋肉接種では接種 5 日後より斃死が始まり 8 日後に全数が斃死し、腹腔内接種では接種 3 日後より斃死が始まり 7 日後に全数が斃死し、菌浴接種では接種 5 日後より斃死が始まり 11 日後に全数が斃死した。投薬区では、ナリジクス酸を 2.5mg/kg 投与した場合は、背鰭下筋肉接種で斃死率 50%（斃死がみられた期間：接種 5 日後より 12 日後まで）、腹腔内接種および菌浴接種では同 60%（同：それぞれ 5 日後より 11 日後まで、6 日後よ

表-30 背鰭下筋肉接種、腹腔内接種および菌浴接種によって
Aeromonas salmonicida AYS-2 株を実験感染させた
 アマゴに対してナリジクス酸を投与した時の斃死状況

	背鰭下筋肉接種	腹腔内接種	菌浴接種
無投薬対照区	10/10**	10/10	10/10
NA 2.5* 投与区	5/10	6/10	6/10
NA10 投与区	0/10	0/ 0	0/10

* : 投薬量 単位 mg/kg

** : 分母:供試尾数 分子:斃死尾数

り12日後まで)であり、10mg/kg投与した場合は、いずれの菌接種法でもすべての供試魚が生残した。

考 察

前述したように、せっそう病原因菌の感染経路としては、経皮、経鰓および経口が考えられるとされており(江草 1978)、実験感染魚に対する従来の薬剤治療実験においても、菌の背鰭下筋肉接種(McCARTHY *et al.* 1974)、腹腔内接種(BULLOCK *et al.* 1974)および菌浴接種(第IV章、第1、4節)が行われているが、それぞれの接種ルートが治療効果におよぼす影響は明らかにされていない。本実験では、供試菌の各接種ルートの実験感染の程度を等しくするために、第I章、第1節および第II章、第1節の結果を参考にして、背鰭下筋肉接種では 5.9×10^2 CFU/fish、腹腔内接種では 5.9×10^5 CFU/fish、菌浴接種では 5.9×10^7 CFU/mlとした。その結果、無投薬対照区の斃死状況は各接種ルートともほぼ同じであり、各接種ルートとも感染の程度はほぼ同じであったと考えられた。このような実験感染系では、投薬量を変えた2つの投薬区においても、いずれの菌接種ルートともほぼ同様の斃死状況を示したことから、せっそう病の実験感染魚による薬剤治療実験においては、感染の程度を同じにすれば、菌接種ルートが違っても同程度の治療効果が得られると考えられた。

第3節 接種菌量と治療効果の関係

前節では、せっそう病の実験感染系を用いて薬剤治療実験を行う際の、接種ルートの影響について検討し、菌接種ルートが異なっても感染の程度を同じにすれば、同程度の治療効果が得られることを明らかにした。そこで本節では、接種菌量と薬剤治療効果との関係を明らかにするために、3段階の菌量を背鰭下筋肉接種によって実験感染させたアマゴに対して、アンピシリンを経口投与した場合の治療効果を比較検討した。なお、供試薬剤として前節まではナリジクス酸を用いてきたが、本節では第V章、第2節で述べるように、半数有効量（以下本章ではED₅₀とする）がナリジクス酸よりやや高いアンピシリンを用いた。

実験方法

実験区 表-31に示したように3段階の接種菌量毎に、無投薬対照区および投薬区を設けた。

供試菌株 第I章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。なお、本株に対するアンピシリンのMICは0.2mcg/mlであった（森川 未発表）。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重55.0gのアマゴ1年魚を各区毎に20尾ずつ用いた。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（10⁸ CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で10⁻⁴～10⁻⁶に希釈した。

生菌数の測定 第I章、第1節と同じである。

接種方法 MS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、2.3×10²、2.3×10³ および2.3×10⁴ CFU/mlの菌量の供試菌懸濁液を、1尾当たり

0.1ml ずつ背鰭下筋肉に接種した。

菌接種後の飼育 菌接種後の供試魚を各区毎に 27 ℥ 容ガラス水槽に収容し、地下水を一槽当たり毎分約 1 ℥ 注入した。

投薬 投薬区には、1日1回、5日間（最初の投薬は菌接種24時間後）アンピシリン製剤（1g中 850mg<力価>を含む）を魚体重1kg当たり50mg<力価>を餌に混ぜ強制経口投与した。投与方法は、第1節と同じである。

供試魚の観察 投薬後は無給餌で菌接種後2週間観察した。

実験水温 12.8~19.0°Cであった。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各区の斃死状況を表-31に示した。 2.3×10^3 CFU/fish接種では、無投薬対照区がすべて斃死した（斃死がみられた期間：接種3日後および4日後）のに対して、投薬区では3尾が生残した（同：接種3日後より14日後まで、生残率15%）。 2.3×10^2 CFU/fish接種では、無投薬対照区がすべて斃死した（同：接種3日後および4日後）のに対して、投薬区では18尾が生残した（同：接種5日および9日後まで、生残率90%）。 2.3×10^1 CFU/fish接種では、無投薬対照区は4尾が生残した（同：接種4日後および5日後、生残率20%）のに対して、投薬区ではすべてが生残した。

考 察

供試菌の 2.3×10^3 CFU/fish接種では、無投薬対照区と投薬区の生残率の間に有

表-31 3段階の菌量の *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を背鰓下筋肉接種によって実験感染させたアマゴに対してアンピシリンを1日1回
魚体重1kg当たり50mg・5日間投与したときの生残尾数

	接種後日数													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<u>2.3×10^3 CFU/fish接種</u>														
無投薬対照区	20	20	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投薬区	20	20	19	19	16	12	11	6	5	5	5	5	4	3
<u>2.3×10^2 CFU/fish接種</u>														
無投薬対照区	20	20	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投薬区	20	20	20	20	19	19	19	19	18	18	18	18	18	18
<u>2.3×10^1 CFU/fish接種</u>														
無投薬対照区	20	20	20	9	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
投薬区	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

意差がみられず、投薬による治療効果が判然としなかった（有意水準95%）が、 2.3×10^2 CFU/fishおよび 2.3×10^1 CFU/fish接種ではいずれも無投薬対照区と投薬区の間の生残率に有意差があり（有意水準99%）、明らかな治療効果が認められた。このように、同一薬剤を同一量投与しても、実験感染における接種菌量の違いによって、治療効果が認められる場合とそうでない場合があり、せっそう病の実験感染魚による治療実験においては、接種菌量が治療効果に大きく影響することが明らかになった。

人体用のワクチンの力価試験においては、実験動物に対する攻撃菌量がLD₅₀（例えばペストワクチンの場合、LD₅₀の10倍量、百日せきワクチンの場合、同200倍量、破傷風トキソイドの場合、同10～20倍量）を基準として定められている例が多く（国立予防衛生研究所 1967）、魚病の分野でも化学療法剤の評価やワクチンの効果判定に際して、実験感染系を用いる場合の攻撃菌量の基準を定める必要があると思われた。

本実験の結果から、背鰭下筋肉接種によるせっそう病の実験感染系を用いて化学療法剤の評価をするためには、無投薬対照区のすべての供試魚を確実に斃死させ得る、半数致死菌量の100倍量程度（ 10^2 CFU / fish）の菌量を接種すれば良いと考えられる。

第4節 抗菌剤の投与開始時期と治療効果との関係

前節までに、せっそう病の実験感染系を用いて治療試験を行う際の原因菌の接種ルートおよび接種菌量の影響を明らかにした。本節では、抗菌剤の投与開始時期が治療効果におよぼす影響を明らかにするために、菌浴接種によって実験感染させたアマゴに、スルファモノメトキシンおよびナリジクス酸の投薬開始時期を変えて投与し、斃死状況および接種菌生菌の供試魚体中の動向を調べた。

実験1 スルファモノメトキシンについて

実験方法

実験区 表-32に示したように、無投薬対照区、菌接種2日前投薬開始区、菌接種1日前投薬開始区、菌接種当日投薬開始区、菌接種1日後投薬開始区および菌接種2日後投薬開始区の計6区を設けた。

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重80.0gのアマゴ1年魚を用いた。供試尾数は、投薬開始時期と斃死状況との関係を調べるために各区とも20尾ずつ、投薬開始時期と魚体内の接種菌生菌数の推移との関係を調べるために各区とも40尾ずつとした。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフェージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（ 10^8 CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で 10^{-1} に希釀した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 供試魚を5.32%食塩水に2分間浸漬後、 4.8×10^7 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。

菌接種後の飼育 投薬開始時期と斃死状況との関係を調べる各実験区の供

試魚は、それぞれ27l 容ガラス水槽に収容し、地下水を一槽当たり毎分約1l 注入した。一方投薬開始時期と魚体内の接種菌生菌数の推移との関係を調べる各実験区の供試魚は、それぞれ 100l 容コンクリート水槽に収容し、地下水を一槽当たり毎分約30l 注入した。

投薬 各投薬区の供試魚には所定の投薬開始時期から、1日1回、5日間、100 mg/kgのスルファモノメトキシンを餌に混ぜ強制経口投与した。投与方法は、第1節と同じである。

供試魚の観察 投薬後は無給餌で菌接種後3週間観察した。

魚体内の接種菌生菌数の測定 菌接種2日前投薬開始区および菌接種当日投薬開始区を除いて、接種菌生菌数の経時変化を調べるために、無投薬対照区では、菌接種1、2、3、4、5および6日後に、菌接種1日前投薬開始区では、1、2、3、4、5、6、8、10、12、および14日後に、菌接種1日後投薬開始区では、2、3、4、5、6、7、8、10、12および14日後に、菌接種2日後投薬開始区では、3、4、5、7および9日後に、各区3~4尾ずつの供試魚の血液、肝臓、腎臓および脾臓における接種菌生菌数を測定した。測定方法は、第Ⅲ章、第1節と同じである。

実験水温 電気ヒーターを用いて、 $15 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に制御した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各区の斃死状況を表-32に示した。無投薬対照区では菌接種4日後より斃死が

表-32 菌浴接種によって Aeromonas salmonicida AYS-2株を実験感染させたアマゴに対してスルファモノメトキシンを投薬開始時期を変えて投与* した時の斃死状況

	供試尾数	斃死尾数	斃死率
無投薬対照区	20	20	100%
菌接種2日前投薬開始区	20	0	0
菌接種1日前投薬開始区	20	0	0
菌接種当日投薬開始区	20	0	0
菌接種1日後投薬開始区	20	0	0
菌接種2日後投薬開始区	20	14	70

* : 1日1回魚体重1kg当たり100mg 5日間

始まり、8日後までにすべての供試魚が斃死した。菌接種2日前投薬開始区、菌接種1日前投薬開始区、菌接種当日投薬開始区および菌接種1日後投薬開始区ではまったく斃死がみられなかった。菌接種2日後投薬開始区では菌接種3日後より斃死が始まり、16日後までに14尾が斃死した（斃死率70%）。

また、各供試魚の魚体内における接種菌生菌数の推移を図-6および表-33～表-36に示した。無投薬対照区では、菌接種1日後に血液で平均 10^1 CFU/ml（以下本節では単位を省略する）、肝臓で 10^2 CFU/g（以下本節では単位を省略する）、腎臓および脾臓で 10^3 のオーダーとなり、斃死魚の出現し始めた菌接種4日後まで日数経過とともに増加し、4日後から6日後まではあまり変化がなく、各臓器いずれにおいても 10^5 ～ 10^6 となった。菌接種1日前投薬開始区では、血液で菌接種1日後および2日後、腎臓で1日後～4日後、脾臓で3日後に 10^1 ～ 10^2 の接種菌生菌が計数されたのみであった。菌接種1日後投薬開始区では、菌接種2日後は無投薬対照区とほぼ同様に、血液および肝臓で 10^2 、腎臓および脾臓で 10^3 であったが、3日後より減少し、4日後には1尾の肝臓から 10^2 が計数されたのみであった。しかし、5日後から再び増加し、7日後には血液および肝臓で 10^2 、腎臓および脾臓で 10^3 となったが、8日後からは再度減少し、10日後以降はまったく計数されなくなった。なお、6日後（供試魚No.2）および7日後（供試魚No.1および3）に検査した供試魚には、鰓基部、腹膜および体脂肪の発赤が認められた。菌接種2日後投薬開始区では、菌接種3日後は無投薬対照区とほぼ同様に、血液で 10^3 、肝臓、腎臓および脾臓で 10^4 となった。しかし4日後以降は、個体差が著しくなり、4日後から9日後までに検査した16尾の供試魚のうち、4尾が各臓器とも 10^3 ～ 10^7 、12尾が各臓器とも 10^3 以下であった。なお、接種菌生菌数の多かった4尾では、いずれも鰓基部および幽門垂の発赤、脾臓の肥大が認められた。

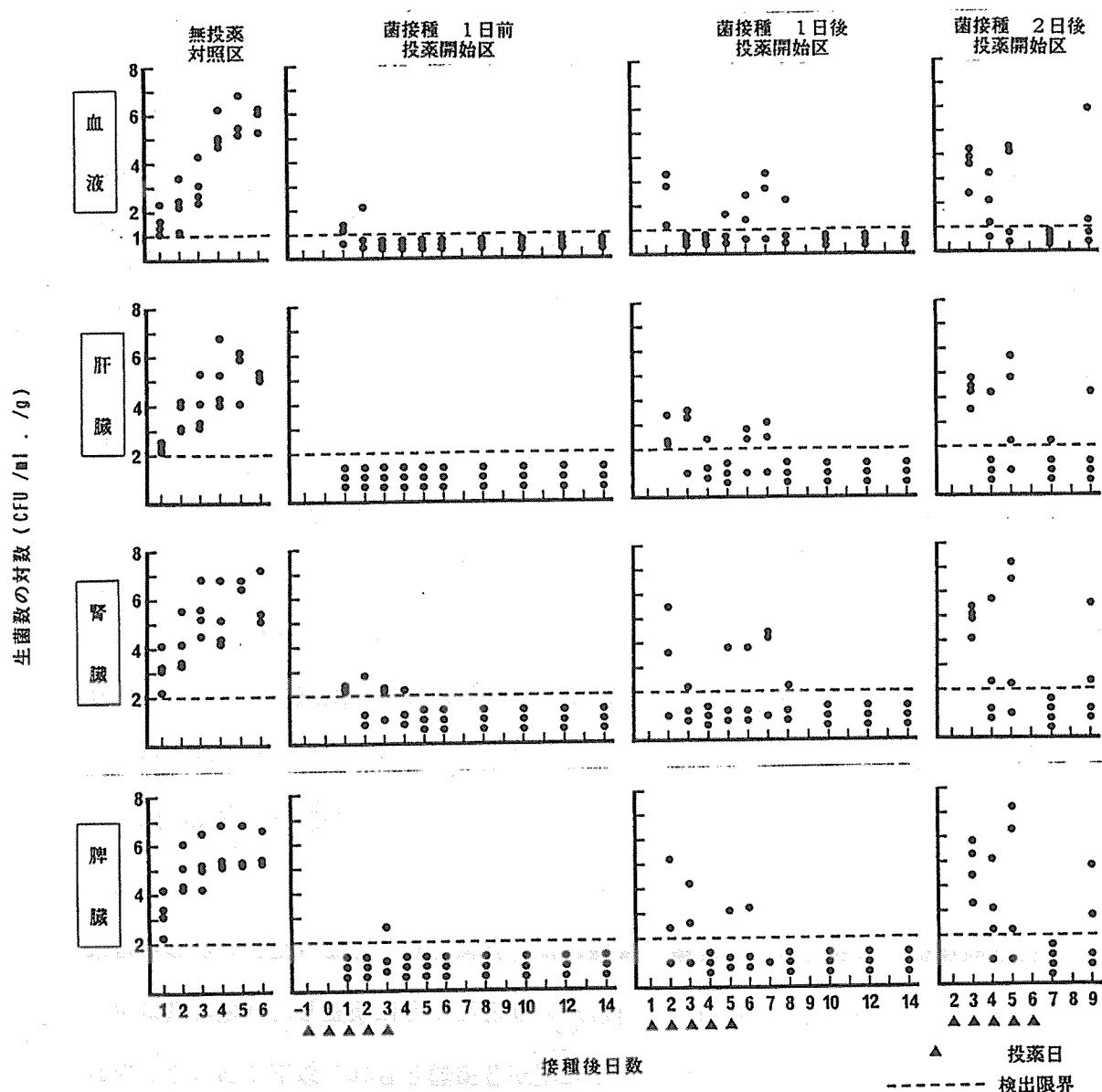


図-6 菌浴接種によって *Aeromonas salmonicida* AYS-2株を実験感染させたアマゴに対してスルファモノメトキシンを投薬開始時期を変えて投与*したときの各臓器中の接種菌生菌数の推移

* 1日1、魚体重1kg当たり100mg、5日間投与

表-33 菌浴接種によって *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を実験感染させたアマゴに対してスルファモノメトキシンを投薬開始時期を変えて投与* したときの各臓器中の接種菌生菌数の推移（無投薬対照区）

接種後日数	供試魚No.	血 液	肝 臓	腎 臓	脾 臓
1	1	6.0×10^1	$**1.0 \times 10^2$	1.7×10^3	1.0×10^3
	2	2.6×10^2	4.0×10^2	1.3×10^4	4.0×10^3
	3	3.0×10^1	2.0×10^2	1.9×10^3	2.4×10^4
	4	1.0×10^1	1.0×10^2	2.0×10^2	2.0×10^2
平均***		4.7×10^1	1.7×10^2	1.7×10^3	2.1×10^3
2	1	3.8×10^3	2.4×10^4	5.5×10^5	1.1×10^6
	2	2.5×10^2	1.2×10^4	1.6×10^4	2.6×10^4
	3	2.6×10^2	1.0×10^3	3.2×10^3	1.4×10^5
	4	1.0×10^1	1.0×10^3	3.0×10^3	2.0×10^4
平均		2.2×10^2	4.1×10^3	1.7×10^4	9.5×10^4
3	1	4.0×10^2	1.5×10^3	2.0×10^5	1.5×10^5
	2	2.9×10^4	2.5×10^5	2.0×10^7	4.5×10^6
	3	1.0×10^3	1.0×10^4	6.0×10^5	2.0×10^4
	4	7.0×10^2	2.5×10^3	5.0×10^4	1.1×10^5
平均		1.7×10^3	9.8×10^3	5.9×10^5	2.0×10^5
4	1	7.0×10^4	1.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^5
	2	2.7×10^6	7.7×10^6	1.5×10^7	3.4×10^7
	3	1.0×10^5	2.5×10^5	1.0×10^5	2.5×10^5
	4	1.0×10^5	2.9×10^4	3.0×10^4	2.0×10^5
平均		2.1×10^5	1.5×10^5	1.7×10^5	7.6×10^5
5	1	4.9×10^5	1.0×10^4	2.0×10^4	2.0×10^5
	2	7.5×10^6	2.0×10^6	6.7×10^6	2.6×10^7
	3	1.8×10^5	9.0×10^5	3.5×10^6	2.0×10^5
	平均	8.7×10^5	2.6×10^5	7.8×10^5	1.0×10^6
6	1	3.3×10^5	3.5×10^5	2.5×10^7	6.2×10^6
	2	1.0×10^6	1.0×10^5	1.0×10^5	2.1×10^5
	3	2.5×10^6	2.5×10^5	2.5×10^5	2.6×10^5
	平均	9.4×10^5	2.1×10^5	8.5×10^5	7.0×10^5

* : 1日1回魚体重1kg当り100mg 5日間

** : CFU/ml or g

*** : 幾何平均

表-34 菌浴接種によって Aeromonas salmonicida AYS-2 株を実験感染させたアマゴに対してスルファモノメトキシンを投薬開始時期を変えて投与* したときの各臓器中の接種生菌数の推移（接種 1 日前投薬開始区）

接種後日数	供試魚No.	血液	肝臓	腎臓	脾臓
1	1	1.0×10^1 ***	<1.0×10 ²	2.0×10^2	<2.0×10 ²
	2	4.0×10^1	<1.0×10 ²	2.0×10^2	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	3.0×10^2	<2.0×10 ²
平均***		7.4×10^0	1.0×10^1	2.3×10^2	2.0×10^1
2	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	2	2.0×10^1	<1.0×10 ²	8.0×10^2	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
平均		2.7×10^0	1.0×10^1	4.3×10^1	2.0×10^1
3	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	1.0×10^2	6.0×10^2
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	1.0×10^2	<2.0×10 ²
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	4.6×10^1	6.2×10^1
4	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	2.0×10^2	<2.0×10 ²
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	2.7×10^1	2.0×10^1
5	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
6	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
8	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
10	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
12	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
14	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<2.0×10 ²
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1

*1日1回魚体重1kg当たり100mg 5日間 **CFU/ml、g ***幾何平均

表-35 菌浴接種によって *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を実験感染させたアマゴに対してスルファモノメトキシンを投薬開始時期を変えて投与* したときの各臓器中の接種菌生菌数の推移（菌接種 1 日後投薬開始区）

接種後日数	供試魚No.	血液	肝臓	腎臓	脾臓
2	1	3.3×10^3	$\text{**}3.0 \times 10^2$	5.9×10^3	4.0×10^2
	2	8.2×10^2	3.5×10^3	4.8×10^5	1.4×10^5
	3	2.0×10^1	1.0×10^2	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	平均***	3.8×10^2	4.7×10^2	3.0×10^3	1.0×10^3
3	1	$<1.0 \times 10^1$	2.8×10^3	1.0×10^2	6.0×10^2
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	5.2×10^3	$<1.0 \times 10^2$	1.5×10^4
	平均	1.0×10^0	5.3×10^2	2.2×10^1	5.6×10^2
4	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	4.0×10^2	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	平均	1.0×10^0	3.4×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
5	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	2	6.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	7.7×10^3	1.0×10^3
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	平均	3.9×10^0	1.0×10^1	9.2×10^1	7.4×10^1
6	1	4.0×10^1	8.0×10^2	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	2	4.0×10^2	5.0×10^2	7.6×10^3	1.6×10^3
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	平均	2.5×10^1	1.6×10^2	9.1×10^1	8.6×10^1
7	1	3.0×10^3	5.0×10^2	2.3×10^4	2.8×10^4
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	3	7.0×10^2	1.0×10^3	3.9×10^4	2.8×10^4
	平均	1.3×10^2	1.7×10^2	2.1×10^3	2.0×10^3
8	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	2	2.2×10^2	$<1.0 \times 10^2$	1.0×10^2	$<2.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	平均	6.0×10^0	1.0×10^1	2.2×10^1	2.0×10^1
10	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	平均	1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
12	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	平均	1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
14	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	平均	1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1

*1日1回魚体重1kg当たり100mg 5日間 **CFU/ml、g ***幾何平均

表-36 菌浴接種によって *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を実験感染させたアマゴに対してスルファモノメトキシンを投薬開始時期を変えて投与* したときの各臓器中の接種生菌数の推移（菌接種2日後投薬開始区）

接種後日数	供試魚No.	血 液	肝 臍	腎 臍	脾 臍
3	1	5.6×10^3	$\text{**} 7.7 \times 10^4$	3.5×10^5	2.6×10^5
	2	8.9×10^3	2.5×10^4	9.1×10^4	4.4×10^4
	3	2.1×10^4	4.1×10^4	1.2×10^5	8.2×10^5
	4	4.0×10^2	5.1×10^3	1.2×10^4	3.2×10^3
平均***		4.5×10^3	2.5×10^4	8.2×10^4	7.4×10^4
4	1	2.1×10^3	2.4×10^4	7.0×10^5	1.0×10^5
	2	1.1×10^2	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^2	2.0×10^2
	3	1.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	1.4×10^2
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
平均		3.9×10^1	7.0×10^1	3.8×10^2	8.7×10^2
5	1	3.4×10^4	6.8×10^5	4.9×10^6	1.5×10^7
	2	2.2×10^4	8.4×10^4	2.2×10^7	2.6×10^6
	3	$<1.0 \times 10^1$	1.2×10^2	1.4×10^2	2.0×10^2
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
平均		1.7×10^2	2.9×10^3	2.0×10^4	2.0×10^4
7	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	1.0×10^2	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
平均		1.0×10^0	1.8×10^1	1.0×10^1	2.0×10^1
9	1	3.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	3.0×10^2	8.0×10^2
	2	9.1×10^5	2.2×10^4	4.7×10^5	8.2×10^4
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<2.0 \times 10^2$
平均		7.2×10^1	6.8×10^1	3.4×10^2	4.0×10^2

*1日1回魚体重1kg当り100mg 5日間 **CFU/ml、g *** 幾何平均

実験2 ナリジクス酸について

実験方法

実験区 表-37に示したように、無投薬対照区、菌接種1日前投薬開始区、菌接種1日後投薬開始区、菌接種2日後投薬開始区、菌接種3日後投薬開始区および菌接種4日後投薬開始区の計6区を設けた。

供試菌株 第Ⅰ章、第1節と同じ AYS-2株を用いた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重65.0gのアマゴ1年魚を用いた。供試尾数は、投薬開始時期と斃死状況との関係を調べるために各区とも20尾ずつ、投薬開始時期と魚体内の接種菌生菌数の推移との関係を調べるために各区とも100尾ずつとした。

供試菌懸濁液の調整 供試菌株をハートインフュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し（ 10^8 CFU/mlになる）、滅菌生理食塩水で 10^{-1} に希釈した。

生菌数の測定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

接種方法 供試魚を5.32%食塩水に2分間浸漬後、 5.2×10^7 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。

菌接種後の飼育 投薬開始時期と斃死状況との関係を調べる各実験区の供試魚は、それぞれ27l容ガラス水槽に収容し、地下水を一槽当たり毎分約1l注入した。一方投薬開始時期と魚体内の接種菌生菌数の推移との関係を調べる各実験区の供試魚は、それぞれ100l容コンクリート水槽に収容し、地下水を一槽当たり毎分約30l注入した。

投薬 各投薬区の供試魚には所定の投薬開始時期から、1日1回、5日間、20mg/kgのナリジクス酸を餌に混ぜ強制経口投与した。投与方法は、第1節と同じである。

供試魚の観察 投薬後は無給餌で菌接種後3週間観察した。

魚体内の接種菌生菌数の測定 菌接種4日後投薬開始区を除いて、接種菌生菌数の経時変化を調べるために、無投薬対照区では、菌接種1、2、3、4、5、6および7日後に、菌接種1日前投薬開始区では、1、2、3および4日後に、菌接種1日後投薬開始区では、2、3、4、5および7日後に、菌接種2日後投薬開始区では、3、4、5、6、7および9日後に、菌接種3日後投薬開始区では、4、5、6、7、8、9、11、13、15および17日後に、各区3～4尾ずつの供試魚の血液、肝臓、腎臓および脾臓における接種菌生菌数を測定した。測定方法は、第Ⅲ章、第1節と同じである。

実験水温 電気ヒーターを用いて、 15 ± 0.5 °Cに制御した。

死因の判定 第Ⅰ章、第1節と同じである。

実験結果

本実験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。

各区の斃死状況を表-37に示した。無投薬対照区では菌接種4日後より斃死が始まり、8日後までにすべての供試魚が斃死した。菌接種1日前投薬開始区、菌接種1日後投薬開始区および菌接種2日後投薬開始区ではまったく斃死がみられなかった。菌接種3日後投薬開始区では接種4日後より斃死が始まり、18日後までに12尾が斃死した（斃死率60%）。菌接種4日後投薬開始区では接種4日後より斃死が始まり、18日後までに全数が斃死した。

また、各供試魚の魚体内における接種生菌数の推移を図-7および表-38～表40に示した。無投薬対照区では、接種1日後に血液で 10^1 、肝臓で 10^2 、腎臓および脾臓で 10^3 のオーダーとなり、斃死魚の出現し始めた菌接種4日後まで日数

表-37 菌浴接種によって Aeromonas salmonicida AYS-2 株を実験感染させたアマゴに対してナリジクス酸を投薬開始時期を変えて投与* した時の斃死状況

	供試尾数	斃死尾数	斃死率
無投薬対照区	20	20	100%
菌接種 1 日前投薬開始区	20	0	0
菌接種 1 日後投薬開始区	20	0	0
菌接種 2 日後投薬開始区	20	0	0
菌接種 3 日後投薬開始区	20	12	60
菌接種 4 日後投薬開始区	20	20	100

* : 1日1回魚体重1kg当たり20mg 5日間

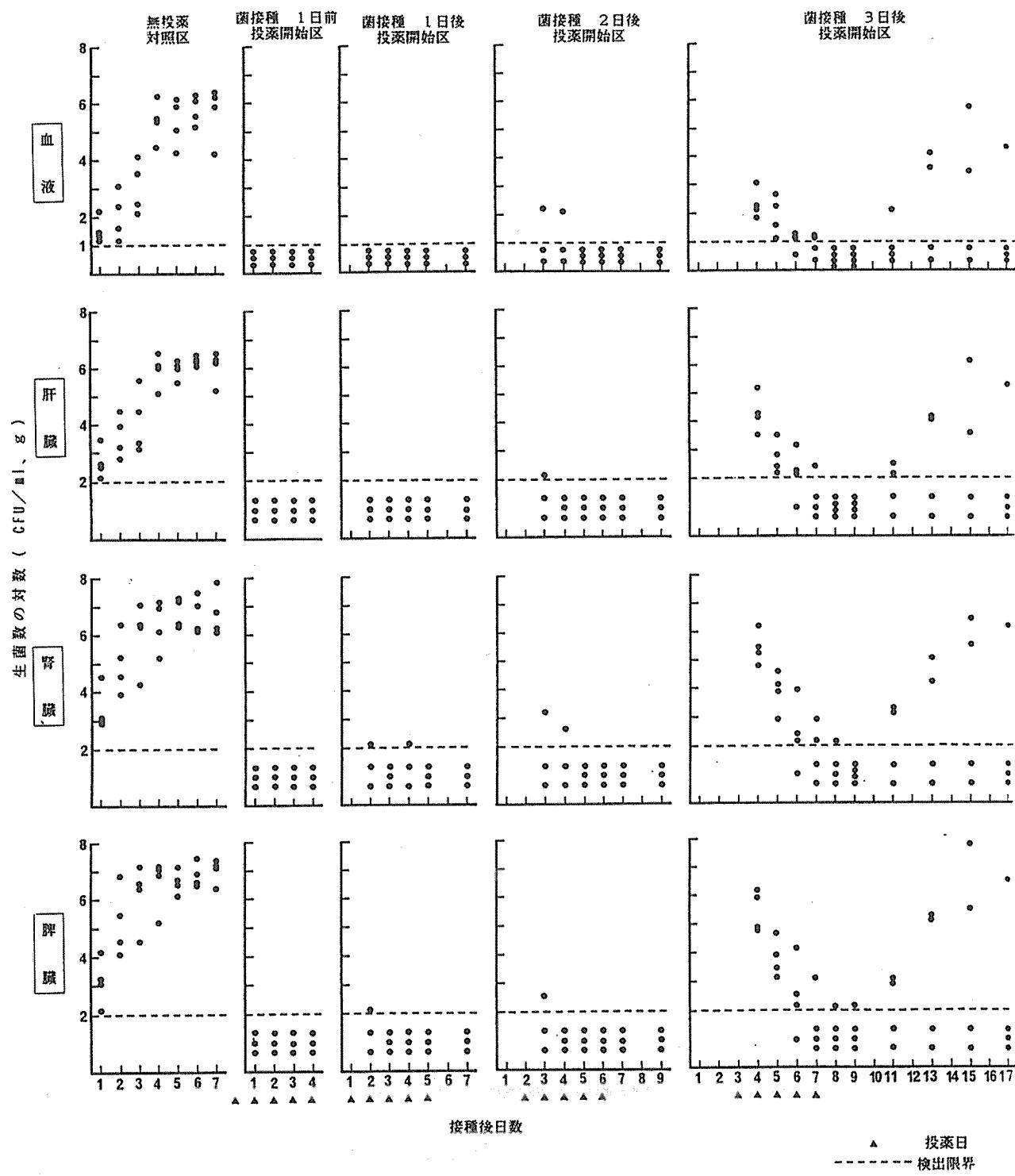


図-7 菌浴接種によって *Aeromonas salmonicida* AYS-2株を実験感染させたアマゴに対してナリジクス酸を投薬開始時期を変えて投与*したときの各臓器中の接種菌生菌数の推移

* 1日1、魚体重1kg当たり20mg、5日間投与

表-38 菌浴接種によって *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を実験感染させたアマゴに対してナリジクス酸を投薬開始時期を変えて投与* したときの各臓器中の接種菌生菌数の推移（無投薬対照無区）

接種後日数	供試魚No.	血 液	肝 臓	腎 臓	脾 臓
1	1	3.0×10^1	$\text{**} 6.0 \times 10^2$	1.5×10^3	1.1×10^3
	2	4.0×10^1	7.0×10^2	1.1×10^3	2.5×10^3
	3	1.0×10^1	1.0×10^2	9.5×10^2	1.0×10^2
	4	2.1×10^2	4.5×10^3	6.5×10^4	2.1×10^4
平均***		4.0×10^1	6.6×10^2	3.2×10^3	1.6×10^3
2	1	1.0×10^1	2.1×10^3	9.2×10^3	1.1×10^4
	2	4.1×10^2	9.5×10^3	2.5×10^5	5.1×10^5
	3	1.1×10^3	5.6×10^4	4.5×10^6	8.5×10^6
	4	6.0×10^1	8.0×10^2	6.1×10^4	6.2×10^4
平均		1.3×10^2	5.5×10^3	1.6×10^5	2.3×10^5
3	1	1.1×10^2	1.9×10^3	3.5×10^4	4.7×10^4
	2	1.1×10^4	6.5×10^5	6.1×10^6	8.1×10^6
	3	4.0×10^2	7.2×10^4	1.2×10^7	5.1×10^6
	4	6.5×10^3	4.2×10^3	6.5×10^6	1.5×10^7
平均		1.3×10^3	2.5×10^4	2.0×10^6	2.3×10^6
4	1	2.9×10^5	1.2×10^6	2.0×10^6	8.5×10^6
	2	3.6×10^5	7.2×10^6	9.9×10^6	1.2×10^7
	3	2.7×10^6	1.5×10^6	1.2×10^7	2.1×10^7
	4	4.8×10^4	1.1×10^5	1.6×10^5	2.4×10^5
平均		3.4×10^5	1.1×10^6	2.5×10^6	4.7×10^6
5	1	1.6×10^6	2.5×10^6	4.1×10^6	1.9×10^7
	2	2.8×10^4	4.1×10^5	5.2×10^6	2.1×10^6
	3	1.4×10^5	1.2×10^6	1.8×10^7	8.3×10^6
	4	9.5×10^5	1.1×10^6	1.7×10^7	6.2×10^6
平均		2.8×10^5	1.1×10^6	9.0×10^6	6.7×10^6
6	1	2.1×10^5	7.6×10^6	3.0×10^6	5.5×10^6
	2	3.3×10^6	5.3×10^6	5.1×10^7	3.4×10^7
	3	1.0×10^6	2.4×10^6	2.6×10^6	6.5×10^6
	4	5.2×10^5	3.1×10^6	9.9×10^6	9.1×10^6
平均		7.7×10^5	4.2×10^6	7.9×10^6	1.0×10^7
7	1	4.5×10^6	3.2×10^6	8.3×10^7	2.5×10^7
	2	7.9×10^5	4.4×10^6	7.5×10^6	3.0×10^7
	3	3.0×10^6	6.2×10^6	2.1×10^6	4.1×10^6
	4	2.5×10^4	1.9×10^5	1.9×10^6	1.7×10^7
平均		7.2×10^5	2.0×10^6	7.1×10^6	1.5×10^7

* 1日1回魚体重1kg当り20mg 5日間 ** CFU/ml、g *** 幾何平均

表-39 菌浴接種によって *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を実験感染させたアマゴに対してナリジクス酸を投薬開始時期を変えて投与* したときの各臓器中の接種菌生菌数の推移（菌接種 2 日後投薬開始区）

接種後日数	供試魚No.	血 液	肝 臍	腎 臍	脾 臍
3	1	<1.0×10 ¹ **	1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	2	3.4×10 ²	1.0×10 ²	2.1×10 ²	6.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
平 均***		7.0×10 ⁰	2.2×10 ¹	5.9×10 ¹	3.9×10 ¹
4	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	3	1.5×10 ²	<1.0×10 ²	7.0×10 ²	<1.0×10 ²
平 均		5.3×10 ⁰	1.0×10 ¹	4.1×10 ¹	1.0×10 ¹
5	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.1×10 ²	<1.0×10 ²
平 均		1.0×10 ⁰	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹
6	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
平 均		1.0×10 ⁰	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹
7	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	1.0×10 ²	1.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
平 均		1.0×10 ⁰	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹
9	1	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	2	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
	3	<1.0×10 ¹	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²	<1.0×10 ²
平 均		1.0×10 ⁰	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹	1.0×10 ¹

* 1 日 1 回魚体重 1 kg 当り 20mg 5 日間

** CFU/ml 、 g

*** 幾何平均

表-40 菌浴接種によって *Aeromonas salmonicida* AYS-2 株を実験感染させたアマゴに対してナリジクス酸を投薬開始時期を変えて投与* したときの各臓器中の接種菌生菌数の推移（菌接種 3 日後投薬開始区）

接種後日数	供試魚No.	血 液	肝 臍	腎 臍	脾 臍
4	1	2.1×10^3	$\ast\ast 1.6 \times 10^4$	3.0×10^5	9.5×10^5
	2	1.5×10^3	2.2×10^4	4.1×10^5	8.2×10^4
	3	1.2×10^4	1.9×10^5	3.2×10^6	2.1×10^6
	4	8.0×10^2	5.2×10^3	7.7×10^4	9.2×10^4
平均***		2.3×10^3	2.4×10^4	4.2×10^5	3.5×10^5
5	1	2.7×10^2	9.0×10^2	1.2×10^4	4.1×10^3
	2	1.0×10^1	2.0×10^2	9.0×10^2	1.0×10^3
	3	7.1×10^2	4.5×10^3	5.8×10^4	6.1×10^4
	4	6.6×10^1	6.0×10^2	8.5×10^3	9.9×10^3
平均		1.1×10^2	8.3×10^2	8.5×10^3	7.1×10^3
6	1	1.0×10^1	2.0×10^2	5.0×10^2	6.0×10^2
	2	2.0×10^1	1.2×10^3	8.9×10^3	2.4×10^4
	3	1.0×10^1	2.0×10^2	2.0×10^2	2.0×10^2
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
平均		6.7×10^0	1.5×10^2	3.1×10^2	4.1×10^2
7	1	2.0×10^1	5.0×10^2	8.0×10^2	1.1×10^2
	2	1.0×10^1	$<1.0 \times 10^2$	2.0×10^2	$<1.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
平均		3.8×10^0	2.7×10^1	6.3×10^1	3.2×10^1
8	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	2.0×10^2	1.0×10^2
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	2.1×10^1	1.8×10^1
9	1	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	2.0×10^2
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
平均		1.0×10^0	1.0×10^1	1.0×10^1	2.1×10^1
11	1	$<1.0 \times 10^1$	2.0×10^2	1.6×10^3	9.0×10^2
	2	1.5×10^2	5.0×10^2	2.0×10^3	1.5×10^3
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
平均		3.5×10^0	5.6×10^1	1.3×10^2	1.1×10^1
13	1	5.6×10^3	1.0×10^4	2.9×10^4	2.0×10^5
	2	1.0×10^4	1.0×10^4	1.2×10^5	1.9×10^5
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
平均		8.7×10^1	3.2×10^2	7.7×10^2	1.4×10^3
15	1	3.9×10^3	6.6×10^3	4.0×10^5	5.1×10^5
	2	5.2×10^5	1.5×10^6	5.3×10^6	7.2×10^7
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
平均		2.1×10^2	1.0×10^3	3.8×10^3	7.8×10^3
17	1	2.9×10^4	2.5×10^5	3.1×10^6	4.5×10^6
	2	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	3	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
	4	$<1.0 \times 10^1$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
平均		1.3×10^1	1.3×10^2	2.4×10^2	2.6×10^2

*1日1回魚体重1kg当り20mg5日間 **CFU/ml、g ***幾何平均

経過とともに増加し、4日後から7日後まではあまり変化がなく、各臓器いずれにおいても 10^5 ～ 10^7 となった。菌接種1日前投薬開始区では、接種菌生菌はまったく検出されなかった。菌接種1日後投薬開始区では、2日後の1尾の腎臓および別の1尾の脾臓から、また4日後の1尾の腎臓から 10^2 の接種菌生菌が計数されたが、5日後以降はまったく計数されなかった。菌接種2日後投薬開始区では、3日後の1尾の各臓器から、また4日後の1尾の血液および腎臓から 10^2 の接種菌生菌が計数されたが、5日後以降はまったく計数されなかった。菌接種3日後投薬開始区では、4日後に、血液で 10^3 、肝臓で 10^4 、腎臓および脾臓で 10^5 となったが、5日後より減少し、9日後には1尾の脾臓から 10^2 が計数されたのみであった。しかし、11日後以降は個体差が著しくなり、13日後から17日後までに検査した12尾の供試魚のうち、5尾が各臓器とも 10^3 ～ 10^7 であったのに対して、7尾からは接種菌生菌がまったく計数されなかった。なお、生菌数の多かつた5尾では、いずれも鰓基部、腹膜、体脂肪および幽門垂の発赤、脾臓の肥大が認められた。

考 察

本節の実験はせっそう病を実験的に感染させたアマゴに対して、スルファモノメトキシンおよびナリジクス酸を、それぞれ魚体重1kg当たり 100および20mg・5日間連続経口投与した場合の、投薬開始時期の治療効果におよぼす影響を検討したものである。

スルファモノメトキシンでは、菌接種1日後までに投薬を開始した場合は、供試魚の斃死をみなかつたが、2日後に投薬を開始した場合は累積斃死率が70%で

あった。、ナリジクス酸では、菌接種2日後までに投薬を開始した場合は、供試魚の斃死をみなかつたが、3日後に投薬を開始した場合は累積斃死率が60%で、4日後に投薬を開始した場合は100%であった。

同時に測定した接種菌生菌数の魚体内推移は、スルファモノメトキシン投与の場合は、菌接種1日前投薬開始区は、菌接種4日後までおよそ半数の供試魚から少数の接種菌生菌が計数されたのみで、接種菌の魚体内での増殖はほぼ抑制されていた。菌接種1日後投薬開始区では、菌接種3日後（投薬開始2日後）および4日後（3日後）には接種菌の魚体内生菌数が減少し、5日後（4日後）から7日後（6日後）に再び増加し、8日後（7日後）以降は再度減少した。菌接種2日後投薬開始区では、菌接種4日後（2日後）以降は接種菌生菌数の個体差が著しくなつた。原ら（1966）は、ニジマスに魚体重1kg当たり100mgのスルファモノメトキシンを4日間連続経口投与した場合、血漿中の濃度は投薬開始12時間後で3.0mg/dlに達し、治療効果が期待される有効血中濃度である7mg/dl以上の濃度は、投薬開始2日後から5日後まで持続することを明らかにしている。本節の実験とは供試魚種、投与日数および実験水温がやや異なるとはいえ、薬剤の吸収の状況はほぼ同様の傾向であると推察されることから、本実験の結果と対比させると、菌接種1日前投薬開始区では、菌接種時点ですでにスルファモノメトキシンの血中濃度が充分上昇していて、その後もさらに高濃度になつたために接種菌の魚体内増殖が抑制されたと考えられる。菌接種1日後投薬開始区で、菌接種3日後（投薬開始2日後）から接種菌の魚体内生菌数が減少しはじめたのは、やはりこの時点で薬剤の有効血中濃度に達したためであると考えられるが、薬剤の有効血中濃度が充分持続されていると推察される菌接種5日後（投薬開始4日後）以降に接種菌の魚体内生菌数が増加した点については説明し得ない。しかしこの場合も菌接種8日後以降は再び生菌数の減少がみられ、供試魚の斃死もまったくみ

られなかつたことから、もし薬剤の有効血中濃度が充分に持続されていれば、一時的に多少の菌の増殖を許したとしても、斃死には至らなかつたものと考えられる。菌接種2日後投薬開始区では、菌接種4日後（投薬開始2日後）以降に接種菌の魚体内生菌数の個体差が大きくなり、魚体内生菌数が少ない個体では回復に向かい、生菌数が多い個体では斃死に向かうのではないかと考えられた。すなわちこの場合には投薬開始時期にすでに魚体内の接種菌生菌数がかなり増加しており、サルファ剤が有効血中濃度に達したとしても菌の増殖を充分抑制できない個体もあったものと考えられた。

ナリジクス酸の場合は、菌接種1日前投薬開始区では、接種菌生菌はまったく計数されず、また、菌接種1日後投薬開始区でも、菌接種4日後（投薬開始3日後）までの3尾から少数の生菌が計数されたのみであり、菌接種2日後投薬開始区でも、菌接種4日後（投薬開始2日後）までの2尾から少数の生菌が計数されたのみで、接種菌の魚体内増殖はほぼ抑制されていた。菌接種3日後投薬開始区では、菌接種5日後（投薬開始2日後）より接種菌の魚体内生菌数が減少し、9日後（6日後）にはほとんど計数されなくなつたが、11日後（8日後）以降に個体差が著しくなつた。ナリジクス酸の連続投与による魚体内吸収を明らかにした研究例はみあたらないが、次節で詳述するように、アマゴにナリジクス酸を1回、30mg/kg、強制経口投与した場合、各臓器において投薬後6～24時間にわたり高い魚体内濃度が維持されることから、本節の実験のように5日間連続投与した場合は、少なくとも投薬開始1日後から6日後までは高い魚体内濃度が持続されると推察されるので、前述の本実験の接種菌生菌数の魚体内推移と対比させて考えると、菌接種1日前投薬開始区では、菌接種時点ですでにナリジクス酸の血中濃度が充分上昇しており、その後も高濃度が続いたことから接種菌の増殖が完全に抑制されたものと考えられる。菌接種1日後投薬開始区および菌接種2日後投薬

開始区でも、投薬開始時にはかなり接種菌が増殖していたにもかかわらず、ナリジクス酸の血中濃度が上昇すると考えられる投薬開始翌日から接種菌の魚体内生菌数の減少が認められた。菌接種3日後投薬開始区でも、同様に投薬開始翌日から生菌数の減少が認められたが、血中濃度が低下すると推察される菌接種11日後（投薬終了4日後）以降には魚体内生菌数の個体差が大きくなり、感染・発病から回復するものと斃死するものとに分かれたものと考えられる。

以上の結果から、供試した化学療法剤2剤では、すでに魚体内の薬剤濃度が上昇している状態で、本病原因菌が接種（感染）された場合には、菌の増殖はほぼ完全に抑えられることがわかった。これに対して菌の接種（感染）後に投薬された場合には、魚体内の接種菌生菌数がまだ少ない間は菌の増殖を充分に抑えることが可能であるが、魚体内ですでに多数の菌が増殖してしまった後では、これら薬剤による抑制はできないと考えられる。したがって、せっそう病など魚類の細菌性疾病の薬剤治療に際して、群としての治療効果をあげるためにには、まだ病勢が弱く魚体内原因菌菌数の少ない発病初期に投薬を開始することが必要であり、従来から叫ばれている「早期発見・早期治療」の重要性が再確認された。

第5節 ピリドンカルボン酸系薬剤の魚体内濃度について

前節までに、せっそう病の実験感染系を用いて治療実験を行う際に影響をおよぼすと考えられる要因として、投薬治療時の魚体内のA. salmonicida菌数の変化、A. salmonicidaの接種ルートと治療効果の関係、接種菌量と治療効果の関係および抗菌剤の投薬開始時期と治療効果との関係について検討した。本節では、抗菌剤の魚体内濃度を明らかにするために、2種のピリドンカルボン酸系薬剤をアマゴに経口投与した場合の魚体内への取り込みについて検討した。

実験1 ナリジクス酸について

実験方法

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重80.0gのアマゴ0年魚50尾を用いた。

投薬 魚体重1kg当たり30mgのナリジクス酸を餌に混ぜ、1回、強制経口投与した。投与方法は、第1節と同じである。

供試魚の飼育 180l容のコンクリート水槽に供試魚を収容し、地下水を毎分約6l注入し、流水条件下で4日間飼育した。

飼育水温 17.2~17.6°Cであった。

魚体内濃度の測定 投薬3、6、12、24、36、48、72および96時間後に、5尾の供試魚の血漿、筋肉、肝臓および腎臓について、Aeromonas liquefaciens Y-62を指示菌とするディスク法による微生物定量法（井上 私信）により、ナリジクス酸の定量を行った。定量限界は血漿で0.8mcg/ml（以下本節では単位を省略する）、筋肉、肝臓、および腎臓で3.2mcg/g（以下本節では単位を省略する）

であった。なお、腎臓については試料が少なかったため、2尾あるいは3尾のペール試料を用いた。

実験結果

ナリジクス酸投薬後の各時間毎の定量結果を表-41に示した。投薬3時間後では血漿で3.3(5尾の平均値、腎臓を除いて以下同じ)、肝臓で8.8であったが、筋肉および腎臓では定量限界以下であった。6時間後には血漿で8.6、筋肉で7.7、肝臓で13.9、腎臓で12.2と各臓器とも最高値に達し、12時間後には血漿で7.6、筋肉で6.8と6時間後に比してほぼ同程度であったが、肝臓では7.3、腎臓では6.6とほぼ半分となった。24時間以降は血漿および筋肉のみについて測定したが、血漿では24時間後で6.7、36時間後で3.2、48時間後で1.7と徐々に低下し、72時間以降は定量限界以下になった。筋肉では24時間後には5.2となり、36時間後には5尾中1尾のみが4.0で他の個体は定量限界以下に、48時間以降は全個体が定量限界以下となった。

実験2 ピロミド酸について

実験方法

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重100.0gのアマゴ0年魚を40尾用いた。

投薬 魚体重1kg当たり40mgのピロミド酸を餌に混ぜ、1回、強制経口投与した。投与方法は、第1節と同じである。

供試魚の飼育 180l容のコンクリート水槽に供試魚を収容し、地下水を毎分約6l注入し、流水条件下で2日間飼育した。

表-41 アマゴ0年魚にナリジクス酸を30mg/kg・1回経口投与したときの魚体内濃度

サンプルNo.		1	2	3	4	5	平均
3時 間後	血漿	3.2	3.3	3.0	2.2	4.8	3.3
	筋肉	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2
	肝臓	8.4	6.0	8.7	12.6	8.4	8.8
腎臓		<3.2			<3.2		<3.2
6時 間後	血漿	8.9	6.9	7.2	10.5	9.6	8.6
	筋肉	9.3	6.0	7.5	8.1	7.5	7.7
	肝臓	15.6	6.9	17.7	15.3	14.7	13.9
腎臓		10.2			14.1		12.2
12時 間後	血漿	8.9	11.5	7.3	3.5	6.9	7.6
	筋肉	7.2	7.2	4.5	5.4	9.9	6.8
	肝臓	9.6	6.6	<3.2	4.8	15.3	7.3
腎臓		6.3			6.9		6.6
24時 間後	血漿	3.7	10.5	3.7	8.0	7.4	6.7
	筋肉	5.7	4.8	4.5	5.7	5.4	5.2
36時 間後	血漿	2.5	3.5	2.3	4.3	3.2	3.2
	筋肉	<3.2	4.0	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2
48時 間後	血漿	2.6	1.4	1.4	1.3	1.8	1.7
	筋肉	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2
72時 間後	血漿	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8
	筋肉	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2
96時 間後	血漿	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8	<0.8
	筋肉	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2	<3.2

単位: mcg/ml, g

飼育水温 13.2~13.7°Cであった。

魚体内濃度の測定 投薬1、3、6、12、24および48時間後に、5尾の供試魚の血漿、筋肉、肝臓、腎臓および脾臓について、E. coli kp を指示菌とする薄層カップ法（清水ら 1971）により、ピロミド酸の定量を行った。定量限界は血漿で0.24、筋肉で0.28、肝臓で0.74、腎臓で0.56、脾臓で0.37であった。なお、脾臓については試料が少なかったため、5尾のプール試料を用いた。

実験結果

ピロミド酸投薬後の各時間毎の定量結果を表-42に示した。投薬1時間後では各臓器いずれも定量限界以下であったが、3時間後には、血漿で1.47（5尾の平均値、脾臓を除いて以下同じ）、筋肉で1.03、肝臓で5.27、腎臓で2.50、脾臓で1.62と明らかに魚体内吸収がみられ、24時間後の最高値（血漿で7.73、筋肉で11.09、肝臓で17.25、腎臓で17.42、脾臓で7.76）に達するまで、時間経過とともに上昇した。また、48時間後にも、血漿で4.32、筋肉で6.73、肝臓で8.53、腎臓で9.93、脾臓で3.96となお高い魚体内濃度を示した。

考 察

実験1では、アマゴ0年魚に魚体重1kg当たり30mgのナリジクス酸を1回経口投与したときの魚体内への吸収を調べた。血漿をはじめ各臓器中のナリジクス酸濃度は投薬6時間後に最高値に達し、24時間後まで血漿で6以上の高い濃度が持続した。このことは、第1節で述べたように、A. salmonicida AYS-2株（ナリジクス酸の本株に対するM I Cは0.2mcg/ml）の実験感染24時間後にナリジクス酸を魚体重1kg当たり20mg投薬した場合に、投薬24時間後には供試魚の魚体内接種菌生

表-42 アマゴ0年魚にピロミド酸を40mg/kg・1回経口投与したときの魚体内濃度

サンプルNo.		1	2	3	4	5	平均
1時間後	血 筋 肝 腎	<0.24 <0.28 <0.74 <0.56	<0.24 <0.28 <0.74 <0.56	<0.24 <0.28 <0.74 <0.56	<0.24 <0.28 <0.74 <0.56	<0.24 <0.28 <0.74 <0.56	<0.24 <0.28 <0.74 <0.56
	脾 臍				<0.37		
	血 筋 肝 腎	1.87 1.43 4.60 2.94	1.46 1.26 7.40 1.83	1.47 0.89 4.56 3.01	0.87 0.37 4.76 1.36	1.67 1.21 5.04 3.34	1.47 1.03 5.27 2.50
	脾 臍				1.62		
	血 筋 肝 腎	5.19 5.94 9.02 9.81	4.55 3.58 14.74 8.32	3.14 3.78 7.29 5.75	5.54 5.30 15.78 7.14	4.14 4.94 13.79 8.00	4.51 4.71 12.12 7.80
6時間後	脾 臍				4.70		
	血 筋 肝 腎	4.79 6.55 10.58 9.32	7.42 9.59 13.79 14.37	3.68 4.36 10.16 4.51	5.85 7.34 10.58 10.59	6.16 7.33 11.00 11.87	5.58 7.03 11.22 10.13
	脾 臍				5.43		
	血 筋 肝 腎	6.67 7.98 13.25 14.55	7.83 12.71 17.29 15.91	7.82 13.63 18.72 21.32	9.29 12.18 22.85 18.77	7.04 8.93 14.16 16.53	7.73 11.09 17.25 17.42
	脾 臍				7.76		
24時間後	血 筋 肝 腎	4.46 6.19 8.33 8.00	3.89 5.77 9.90 8.97	4.19 6.93 6.47 8.86	4.14 8.10 8.44 10.86	4.94 6.65 9.51 12.98	4.32 6.73 8.53 9.93
	脾 臍				3.96		

単位: mcg/ml, g

歯がほとんどみられなくなり、斃死もみられなかつたことを裏付けるものと考えられる。なお、同様の条件下で行われたニジマスに対するナリジクス酸の投与では、本節のアマゴにおける場合とほぼ同じ魚体内への吸收を示すことが明らかにされており（井上 私信）、同じサケ科魚類のアマゴとニジマスにおけるナリジクス酸の魚体内動態は類似しているものと推察される。

実験2では、アマゴ0年魚に魚体重1kg当たり40mgのピロミド酸を1回経口投与したときの魚体内への吸收を調べた。血漿をはじめ各臓器中のナリジクス酸濃度は投薬24時間後に最高値（血漿で7.73）に達し、48時間後まで血漿で4以上の高い濃度が持続した。ピロミド酸の岐阜県内で分離されたA. salmonicida 20株に対するM I Cは1.56mcg/mlであることが明らかにされており（森川ら 1979）、本剤も適切な方法で投与すれば、せっそう病に対する治療効果を期待することができるものと考えられる。

小 括

本章ではA. salmonicidaの実験感染系を用いて化学療法剤によるせっそう病の治療試験を行う際に影響をおよぼすと考えられるいくつかの要因について検討した。

まず、投薬直後における魚体内の接種菌生菌数の推移について調べ、投薬によって薬剤の魚体内濃度が上昇すると推定される時点で、魚体内の接種菌生菌数が明らかに減少し、投薬24時間後にはほとんど接種菌生菌が魚体内に計数されなくなることを明示した。従って、せっそう病の治療を行う際には、薬剤を魚体内濃度が有効濃度まで上昇できるような適切な投与をすれば、治療効果が充分期待されるものと推察した。

ついで、菌の接種（感染）ルートの違いが治療効果におよぼす影響を調べ、実験感染の程度を同程度にすれば、その影響は無視し得ることを明らかにした。

つぎに、接種菌量の違いが治療効果におよぼす影響を調べ、接種菌量すなわち実験感染の程度の違いによって、薬剤の治療効果が大きく左右されることを明らかにし、背鰭下筋肉接種によるせっそう病の実験感染系を用いて、化学療法剤の評価を行う場合には、無投薬対照区のすべての供試魚を確実に斃死させ得ると思われる LD₅₀ の 100倍量程度 (10^2 CFU / fish) の菌量を接種することが必要であることを指摘した。

また、抗菌剤の投与開始時期と治療効果との関係について調べ、魚体内の薬剤濃度が充分上昇してから菌が接種（感染）された場合には菌の増殖をほぼ完全に抑え、当然予防・治療効果は期待できるのに対して、実際の疾病発生の場合のように菌の接種（感染）後に投薬が開始されるときは、魚体内の原因菌生菌数が未だ少ない間は菌の魚体内増殖を抑えることが充分可能であるが、魚体内すでに

多数の菌が増殖した後では、その抑制は不可能と考えられ、本病のような魚類の細菌性疾病の治療に際して、従来から言わわれている「早期発見・早期治療」の重要性を実験的に再確認し得た。

さらに、治療薬剤の投薬時の魚体内吸収を調べ、ナリジクス酸およびピロミド酸の両薬剤とも、経口投与によって血漿をはじめ各臓器によく吸収されることから、これらの薬剤に感受性のあるA. salmonicidaが原因菌の場合は、これらの薬剤を魚体内濃度が有効治療濃度以上に上昇および持続できる量を、適切な方法で投与すれば、せっそう病に対する治療効果が充分期待されることを指摘した。

以上、本章ではA. salmonicidaの実験感染系を用いて化学療法剤によるせっそう病の治療試験を行う際に影響をおよぼすと考えられるいくつかの要因について検討してきたが、治療効果の客観的な評価には実験技法の統一が重要であると考えられ、とりわけ、実験感染時の接種菌量と投薬開始時期は、治療効果におよぼす影響が大きい。従って、サケ科魚類におけるせっそう病治療薬剤の評価法として、「供試魚には体重数10グラム（個体変動10%以内）のアマゴ0年魚を1実験区20尾ずつ用い、対象薬剤に感受性を持つA. salmonicidaの強毒株を 10^2 CFU/fish、背鰭下筋肉接種して、実験水温 15 ± 0.5 °Cで飼育し、実験感染24時間後に投薬を開始する。1薬剤について2倍希釈で4段階以上の投薬量の試験区を設定し、強制餌混ぜ経口投与（給餌率 0.5%）を5日間行い、投薬後は無給餌で菌接種後3週間観察し、斃死状況から各薬剤のED₅₀を算出する」のが望ましいと考えられる。

第V章 A. salmonicidaの薬剤感受性と せっそう病の治療試験

せっそう病の薬剤による治療に関しては、欧米において1940年代からサルファ剤を中心に検討されてきた。(McCRAW 1952) が、的確な使用には未だ問題があり、近年は耐性株の出現 (AOKI et al., 1971) など問題点も多い。本章では、化学療法剤によるせっそう病の治療に関して、多数のA. salmonicida分離株の薬剤感受性を調べ、A. salmonicida実験感染魚群およびせっそう病自然発病魚群に対する各種化学療法剤による治療試験を行った。

第1節 A. salmonicidaの薬剤感受性の年変化

本節では、化学療法剤によるせっそう病の治療に関する基礎的資料を得る目的で、1974年から1986年にかけて岐阜県内の養魚場から分離した 776株の A. salmonicidaの薬剤感受性を調べた。

試験方法

供試菌株 1974年から1986年にかけて岐阜県内の73か所の養魚場において、せっそう病の自然発病がみられた養殖サケ科魚類から分離した 776株の A. salmonicidaを用いた。その由来は、アマゴから 708株、ヤマメから 1株、ヒメマスから 16株、ギンザケから 5株、イワナから 31株、ニジマスから 9株、ブラウンマスから 6株であった。菌分離は病魚腎臓を普通寒天培地(ニッスイ)平板に塗抹し25°Cで培養して行い、形成された定形的集落を釣菌し、分離後10日以内に薬剤感受性を調べた。

薬剤感受性試験 一濃度ディスク法によった。すなわち病魚からの分離培養平板から、数個のA. salmonicidaの定型的集落を釣菌し、ハートインフュージョンプロス（栄研）で20°C・一夜培養後（約 10^8 CFU/ml）、滅菌生理食塩水による100倍希釈液を作製しその0.1mlを後述の感受性試験用平板培地（直径85mmのプラスチックシャーレに15ml分注）上に接種し、コンラージ棒で全面に塗抹した。従って接種菌量は1平板当たり約 10^5 CFU、培地1cm²当たり約 10^3 CFUとなる。感受性試験用平板培地の乾燥程度が試験結果に大きな影響をおよぼすとされている（金沢 1980）ので、感受性試験用平板培地は、乾燥度合を可及的に一定にした。使用培地としては変法ミューラーヒントン培地〔感性ディスク用培地（ニッスイ）〕を用い、ディスクは市販（昭和）ディスクを用いた。供試薬剤は、養魚現場での薬剤使用状況を考慮してスルファモノメトキシン（以下SMMと記す）、クロラムフェニコール（CP）、オキシテトラサイクリン（OTC）およびナリジクス酸（NA）の4種とした。菌接種後、その表面に常法によりディスクをのせ、20°Cで2日間培養し、形成された阻止円の直径を測定した。感受性の判定は、市販の（昭和ディスク）判定表に準じ、阻止円の直径がSMMで28mm以上、CPで26mm以上、OTCで25mm以上、NAで25mm以上を感受性、それ未満を耐性と判定した。

試験結果

1974年から1986年にかけて岐阜県内で分離されたA. salmonicidaの薬剤感受性を分離年別に整理して表-43に示した。

感受性株（ここでは調査した4薬剤のすべてに感受性を有していた菌株とした）の出現率は、1974年分離株では91.2%を占めていたが、翌年には0.6%と激減し、1976年および1977年には感受性株は1株も認められなかった。その後は分離

表-43 1974年～1986年に岐阜県内で分離されたAeromonas salmonicidaの毒剤感受性の年変化

年	調査 株数	感受 性株**	SHH*	CP*	OTC*	N A*	交 差 耐 性			バ タ ン		
							SHH	CP	OTC	SHH NA	CP NA	OTC NA
1974	57	52(91.2)***	5(8.8)	3(5.3)	0(0)	0(0)	2(3.5)			3(5.3)		
1975	154	1(0.6)	153(99.4)	64(41.6)	11(7.1)	2(1.3)	83(53.9)			57(37.0)	6(3.9)	5(3.2)
1976	94	0(0)	94(100)	20(21.3)	7(7.4)	1(1.1)	66(70.2)			20(21.3)	7(7.4)	1(1.1)
1977	76	0(0)	76(100)	15(19.7)	0(0)	17(22.4)	44(57.9)			15(19.7)		17(22.4)
1978	48	7(14.6)	38(79.2)	3(6.3)	3(6.3)	25(52.1)	16(33.3)			3(6.3)		19(39.6)
1979	61	27(44.3)	27(44.3)	8(13.1)	1(1.6)	8(13.1)	20(32.8)	2(3.3)		5(8.2)	3(4.9)	1(1.6)
1980	32	4(12.5)	27(84.4)	5(15.6)	4(12.5)	16(50.0)	10(31.3)			1(3.1)	1(3.1)	10(31.3)
1981	45	16(35.6)	22(48.9)	4(8.9)	0(0)	15(33.3)	11(24.4)			7(15.6)	3(6.7)	7(15.6)
1982	43	9(20.9)	15(34.9)	0(0)	1(2.3)	33(76.7)	1(2.3)			19(44.2)		13(30.2)
1983	54	22(40.7)	10(18.5)	0(0)	0(0)	31(57.4)	1(1.9)			22(40.7)		9(16.7)
1984	42	11(26.2)	11(26.2)	0(0)	0(0)	31(73.8)				20(47.6)		11(26.2)
1985	48	26(54.2)	5(10.4)	0(0)	0(0)	22(45.8)				17(35.4)		5(10.4)
1986	22	1(4.5)	16(72.7)	0(0)	0(0)	10(45.5)	11(50.0)			5(22.7)		5(22.7)
合計	776	176(22.7)	499(64.3)	122(15.7)	27(3.5)	211(27.2)	265(34.1)	2(0.3)	0(0)	99(12.8)	102(13.1)	13(1.7)
										7(0.9)	3(0.4)	4(0.5)

* SHH:スルファモンメトキシン CP:クロラムフェニコール OTC:オキシテトラサイクリン NA:ナリジクス酸 ** SHH, CP, OTCおよびNA感受性を有する菌株
 *** バーセンテージ

年毎にかなりの変動がありながらも、10%台から50%台の間を推移したのに対して、1986年には分離菌株数は少ないが再び 4.5%に激減した。個々の薬剤についてみると SMM 耐性株の出現率は、1974年分離株では 8.8%と低かったが、翌年には99.4%と急増し、1976年および1977年分離株ではすべてが耐性株であった。その後は1982年まではかなりの変動がありながらも、30%台から80%台の間を推移していたが、1983年から1985年までの3年間は20%台以下に低下した。しかし、1986年には再び72.7%に急増した。CP 耐性株の出現率は、1974年分離株では 5.3 %と低かったが、1975年から1977年までの3年間は19.7～41.6%とやや高くなつた。その後は1981年まで 6.3～15.6%と低く推移し、しかも1982年以降は CP 耐性株は認められなくなった。OTC 耐性株は、1974年分離株ではみられなかつたが、翌年から1982年までの間は 0～12.5%の出現率で推移し、1983年以降はみられなくなつた。NA 耐性株の出現率は、1974年から1976年までの分離株では 1.3 %以下と低かったが、1977年以降は1986年まで1979年の13.1%を除き、20%台から70%台で推移した。なお全分離株数に対する割合は、感受性株が22.7%、SMM 耐性株が64.3%、CP 耐性株が15.7%、OTC 耐性株が 3.5%、NA 耐性株が27.2%であった。

各分離株の耐性パターンについては、SMM および NA の単剤耐性株は、それぞれ 265 株（全分離株数に対する割合、34.1%）、99 株（12.8%）と比較的高頻度にみられたが、CP 単剤耐性株は 2 株認められたのみで、OTC 单剤耐性株は一株も認められなかった。多剤耐性株としては、2 剤耐性株は SMM・CP 耐性、SMM・OTC 耐性、および SMM・NA 耐性、3 剤耐性株は SMM・CP・OTC 耐性、SMM・CP・NA 耐性および SMM・OTC・NA 耐性、4 剤耐性株は SMM・CP・OTC・NA 耐性株が認められた。これらのすべての多剤耐性パターンには SMM が含まれており、特に SMM・CP および SMM・NA の

2剤耐性株がそれぞれ 102株（全分離株数に対する割合、13.1%）、98株（12.6%）と多く認められた。

考 察

本節の試験では、前述のように供試薬剤として養殖マス類に使用されている水産用医薬品のうち、交叉耐性を考慮してSMM、CP、OTCおよびNAを選んだ。すなわち各種のサルファ剤（SA）、CPおよびチアンフェニコール、テトラサイクリン系抗生物質、ピリドンカルボン酸系薬剤は、それぞれ交叉耐性を示しやすいとされており（傍士 1971、小栗・小酒井 1977、田中・中村 1967、BARRY and JONES 1984）、供試した4薬剤に対するせっとう病原因菌 A. salmonicidaの薬剤感受性を検査することによって、養殖マス類に使用されている水産用医薬品のせっとう病治療効果を推測できると考えたからである。

分離菌株中の耐性株の出現状況をみると、1975年を境として大きく様相が変わっていた。前述したように、我が国におけるアマゴ・ヤマメを中心とした在来マス類の池中養殖技術は昭和40年代前半に確立され、その後養殖産業として定着してきた。せっとう病は在来マス類養殖の黎明期においても散見されていたが、当時の発病時にはSA投与が著効を示していた。その後1970年頃から在来マス類養殖業がさらに発展し、生産量の増加や種苗等の交流の広域化に伴って、せっとう病の発生件数も増え、SAやCPの使用頻度が増加し、その結果としてSAおよびCP耐性株の割合が増加したのではないかと考えられる。またSAは1976年頃からそれに追従するように数年間は耐性株の増加によって養魚現場ではほとんど使用されなかつたために、1981年頃から耐性株の割合が減少し、その結果再びSAの使用が増え、1986年に再度高頻度に耐性株が認められるようになったものと考えられ、CPについても、SAと同様の理由で1975年以降は使用が減少したた

めに耐性株の割合が減少し続け、1982年以降には耐性株が認められなくなったものと考えられる。一方、OTCについては、アマゴにおける経口投与時の吸収が悪く（森川・田代 1975）、治療効果があまり期待できないとされていたことから使用例が少なく、耐性株があまり認められなかつたものと思われる。またNAについては、SAおよびCPに代わって1975年頃から使用が増加し、それについて1984年まで耐性菌の増加傾向が認められたが、やはり耐性菌の増加に伴う養魚現場での使用の減少につれて、1985年から耐性菌の割合の減少が認められた。以上のように、養魚現場における薬剤の使用状況と耐性分離株の出現状況には、密接な関連が認められた。このような現象は、医学領域においても1945年から1950年にかけての赤痢菌のSAに対する耐性獲得過程でも認められている（三橋 1970）。

本研究では、市販の（昭和ディスク）判定表における「+++」のみを感受性株とし、「++」以下を耐性株としたが、この基準の「+++」のMIC近似値は、SMMが 25mcg/ml 以下、CPが 6.25mcg/ml 以下、OTCが 1.56mcg/ml 以下、NAが 6.25mcg/ml 以下となる。この基準値と養魚現場における薬剤投与によるせっそう病の治療効果の聞き取り調査結果とはよく一致し（森川ら 1975）、「++」程度の感受性菌によるせっそう病発生の場合は、投薬により一旦斃死魚が減少しても、すぐに再発する例が多いとされていることから、以上の感受性・耐性の判定基準は妥当なものと考えられる。

第2節 実験感染魚群に対する治療試験

前節においては、自然発生せっそう病病魚から年度別に分離した多数のA. salmonicida株の各種薬剤に対する感受性を検討し、分離年度により分離菌株の感受性に変動がみられることを明らかにした。本節ではA. salmonicidaの実験感染魚を用いて、近年その相乗作用が注目されているサルファア剤とピリミジン誘導体との合剤（五島ら 1973）3種、マス類以外の魚種に水産用医薬品として市販されているアンピシリン（以下A B P C）を含む抗生物質2種およびSAや多くの抗生物質に交叉耐性を示さないとされているピリドンカルボン酸系薬剤（西野 1987）3種について、その経口投与による治療効果を検討した。

試験1 サルファア剤とピリミジン誘導体との合剤について

試験方法

供試薬剤 スルファジアシン（SDZ）純末、トリメトプリム（TMP）純末、SDZ純末とTMP純末との5：1の合剤を40%含有する製剤であるATP（ATP）、SMM純末とオルメトプリム（OMP）純末との3：1の合剤を40%含有する製剤であるDG-5459（DG）およびスルフィソゾール純末とTMP純末との5：1の合剤であるAMF-16（AMF）を用いた。なお、ATPおよびDGの投薬量はSDZあるいはSMM純末とTMPあるいはOMP純末との合剤の量に換算して表示した。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重50.0または55.0gのアマゴ0年魚を、各区20尾ずつ用いた。

試験区 無投薬対照区、

S D Z : 50、100、200、400mg/kg投与区、
T M P : 1.25、2.5、5.0、10.0mg/kg投与区、
A T P : 7.5、15.0、30.0、60.0mg/kg投与区、
D G : 5、10、20、40、80mg/kg投与区、
A M F : 15、30、60、120mg/kg投与区の計22試験区を設けた。

実験感染 A. salmonicida G7202株<1972年7月1日に岐阜水試にてアマゴのせっそう病自然発病魚より分離したSMM、CP、OTC、NAおよびOMP感受性株>を、ハートインフュージョンプロス（栄研）で、20°C・一夜培養し、第Ⅰ章、第1節および第Ⅱ章、第1節の結果を参照して、滅菌生理食塩水で 10^{-5} に希釈したものを、MS-222の100ppm溶液で約2分間麻酔を施した供試魚に、1尾当たり0.1mlずつ背鰭下筋肉に接種した。接種菌量は $5.0 \sim 6.7 \times 10^2$ CFU/fishであった。

投薬 餌に混ぜ経口強制投与とした。すなわち、マス用粉末飼料90%、αーデンプン10%、水60%（固形成分に対する割合）に所定量の薬剤を加えて、ペレット状に成型し乾燥させたものを、実験感染時と同様に麻酔を施した供試魚の胃内に、ピンセットを用いて挿入した。投薬は各区とも1日1回、5日間連続とし、第Ⅳ章、第4節を参照して初回投薬は菌接種24時間後に行い、給餌率は魚体重の0.5%とした。なお、投薬終了1時間後に薬剤の嘔吐がないことを確認した。

試験水温 15.8~21.1°Cであった。

供試魚の飼育および観察 180l容のコンクリート水槽に供試魚を収容し、地下水を一槽当たり毎分約6l注入し、流水条件下で菌接種後3週間観察した。なお、投薬終了後は給餌を行わなかった。

死因の判定 せっそう病の外観症状の有無によって判定した。

半数有効量の算出 せっそう病による斃死率から、probit法（キャノン販

壳K.K.コンピュータソフト [LD₅₀ (probit法)])により半数有効量（以下本章ではED₅₀とする）を算出した。

試験結果

各試験区の生残率および各薬剤のED₅₀を表-44に示した。本試験におけるすべての斃死魚の外観症状は、せっそう病の自然発病魚の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。無投薬対照区では、全数が菌接種後3～6日間で斃死したのに対して、各区の菌接種21日後の生残率はSDZ50投与区で40%、100投与区で70%、200投与区で85%、400投与区で100% (SDZのED₅₀: 65.4mg/kg)、TMP1.25投与区で0%、2.5投与区で35%、5.0投与区で65%、10.0投与区で70% (TMPのED₅₀: 4.4mg/kg)、ATP7.5投与区で80%、15.0投与区で85%、30.0投与区で95%、60.0投与区で100% (ATPのED₅₀: < 7.5mg/kg)、DG5投与区で0%、10投与区で10%、20投与区で25%、40投与区で40%、80投与区で75% (DGのED₅₀: 51.8mg/kg)、AMF15投与区で95%、30投与区で90%、60および120投与区で100% (AMFのED₅₀: < 15.0mg/kg)であった。

試験2 抗生物質について

試験方法

供試薬剤 OTC製剤 (1g中 905mg<力価>を含む) およびABC製剤 (1g中 850mg<力価>を含む) を用いた。

供試魚 試験1と同様な平均体重35.0g (OTCについて) および55.0g (ABCについて) のアマゴ0年魚を、各区20尾ずつ用いた。

表-44 *Aeromonas salmonicida* G7202 株を実験感染させた
アマゴに対するサルファ剤とピリミジン誘導体との
合剤の経口投与による治療効果

実験区	生残率	100 %生残最少投与量	ED ₅₀
無投薬対照区	0%		
S D Z 50.0区	40%		
S D Z 100.0区	70%	400mg/kg	65.4mg/Kg
S D Z 200.0区	85%		
S D Z 400.0区	100%		
T M P 1.25区	0%		
T M P 2.5区	35%	> 10mg/kg	4.4mg/Kg
T M P 5.0区	65%		
T M P 10.0区	70%		
A T P 7.5区	80%		
A T P 15.0区	85%	60mg/kg	< 7.5mg/Kg
A T P 30.0区	95%		
A T P 60.0区	100%		
無投薬対照区	0%		
D G 5.0区	0%		
D G 10.0区	10%		
D G 20.0区	25%	> 80mg/kg	51.8mg/Kg
D G 40.0区	40%		
D G 80.0区	75%		
無投薬対照区	0%		
A M F 15.0区	95%		
A M F 30.0区	90%	60mg/kg	< 15.0mg/Kg
A M F 60.0区	100%		
A M F 120.0区	100%		

試験区 無投薬対照区、

O T C : 10、50、100mg<力価>/kg投与区、

A B P C : 50、100、200mg<力価>/kg投与区の7試験区を設けた。

実験感染 試験1と同一株を用い、同様の方法で行ったが接種菌量は1.5
~ 2.3×10^2 CFU/fishであった。

投薬 試験1と同じである。

試験水温 12.8~19.0°Cであった。

供試魚の飼育および観察 試験1と同じである。

死因の判定 試験1と同じである。

E D₅₀の算出 試験1と同じである。

試験結果

各試験区の生残率およびE D₅₀を表-45に示した。本試験におけるすべての斃死魚の外観症状は、試験1と同様、せっそう病の自然発病の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。無投薬対照区では、全数が菌接種後3~5日間に斃死したのに対して、各区の菌接種21日後の生残率は、O T C 10投与区で0%、50投与区で45%、100投与区で60% (O T CのE D₅₀: 69.4mg/kg)、またA B P C 50投与区で90%、100および200投与区で100% (A B P CのE D₅₀: 29.0mg/kg) であった。

試験3 ピリドンカルボン酸系薬剤について

試験方法

供試薬剤 オキソリン酸(O A)純末、N A純末およびピロミド酸(P A

表-45 *Aeromonas salmonicida* G7202 株を実験感染させた
アマゴに対する抗生物質の経口投与による治療効果

実験区	生残率	100%生残最少投与量	ED_{50}
無投薬对照区	0%		
O T C 10.0区	0%		
O T C 50.0区	45%	>100mg/kg	69.4mg/Kg
O T C 100.0区	60%		
無投薬对照区	0%		
A B P C 50.0区	90%		
A B P C 100.0区	100%	100mg/kg	29.0mg/Kg
A B P C 200.0区	100%		

)純末を用いた。

供試魚 試験1と同様な平均体重55.0gのアマゴ0年魚を、各試験区20尾ずつ用いた。

試験区 無投薬対照区、

OA: 2.5、5.0、10.0、20.0mg/kg投与区、

NA: 5.0、10.0、20.0、40.0mg/kg投与区、

PA: 2.5、5.0、10.0、20.0mg/kg投与区の計13試験区を設けた。

実験感染 試験1と同一株を用い、同様の方法で行ったが接種菌量は1.9
~ 7.0×10^2 CFU/fishであった。

投薬 試験1と同じである。

試験水温 16.1~21.2°Cであった。

供試魚の飼育および観察 試験1と同じである。

死因の判定 試験1と同じである。

ED₅₀の算出 試験1と同じである。

試験結果

各試験区の生残率およびED₅₀を表-46に示した。本試験におけるすべての斃死魚の外観症状は、試験1と同様、せっそう病の自然発病の定型的症状と一致していたので、せっそう病による斃死であると判断された。無投薬対照区では、全数が菌接種後3~5日間で斃死したのに対して、菌接種21日後の各区の生残率は、OA 2.5、5.0および10.0投与区で100%、20.0投与区で95% (OAのED₅₀: < 2.5mg/kg)、NA 5.0、10.0、20.0および40.0投与区で100% (NAのED₅₀: < 5.0mg/kg)、PA 2.5、5.0および10.0投与区で100%、20.0投与区で95% (PAのED₅₀: < 2.5mg/kg) であった。

表-46 *Aeromonas salmonicida* G7202 株を実験感染させた
アマゴに対するピリドンカルボン酸系薬剤の経
口投与による治療効果

実験区	生残率	100 %生残最少投与量	ED ₅₀
無投薬対照区	0%		
O A 2.5区	100%		
O A 5.0区	100%	2.5mg/kg	<2.5mg/Kg
O A 10.0区	100%		
O A 20.0区	95%		
N A 5.0区	100%		
N A 10.0区	100%	5.0mg/kg	<5.0mg/Kg
N A 20.0区	100%		
N A 40.0区	100%		
無投薬対照区	0%		
P A 2.5区	100%		
P A 5.0区	100%		
P A 10.0区	100%	2.5mg/kg	<2.5mg/kg
P A 20.0区	95%		

考 察

実験感染魚を用いた化学療法剤の有効性の評価基準としては、①無投薬対照区と投薬区の生残率を比較・検定する、②ED₅₀を算出する、③投薬区の生残率を100%にできる最少投薬量を求める、等が考えられる。①は有意水準を5%とした場合、供試魚数20尾で、無投薬対照区が全数斃死したときに、投薬区の生残率が25%以上で有意な差となるが、実用面を考慮すると、この程度の差では治療効果があるとはいひ難く、本節では、ED₅₀および投薬区の生残率を100%にできる最少投薬量を求めた。

試験1では、SAとピリミジン誘導体との合剤、試験2では抗生物質、試験3ではピリドンカルボン酸系薬剤を経口投与した場合の、*A. salmonicida*の背鰭下筋肉接種により実験感染させたアマゴに対する治療効果を検討した。各薬剤のED₅₀および投薬区の生残率を100%にする最少投薬量は、表-44～表-46に示したようにSDZが65.4、400mg/kg、TMPが4.4、10mg/kg以上（投薬区の最高生残率70%）、ATPが7.5以下、60mg/kg、DGが51.8、80mg/kg以上（投薬区の最高生残率75%）、AMFが15以下、60mg/kg、OTCが69.4mg、100<力価>/kg以上（投薬区の最高生残率60%）、ABPCが29.0、100mg<力価>/kg、OAが2.5以下、2.5mg/kg、NAが5.0以下、5.0mg/kg、PAが2.5以下、2.5mg/kgであった。

TMPやOMP等のピリミジン誘導体とSAとの合剤は、細菌に対しそれぞれ単剤で用いた場合よりもすぐれた効果を示し、相乗作用を有することが知られており（五島ら1973）、KIMURA et al. (1983) および吉水・木村（1986）は各種の魚病細菌に対して、SAとしてSDZおよびSMM、ピリミジン誘導体としてTMPおよびOMPとそれらの合剤のMICを比較し、特にSDZおよびSMM感受性菌において相乗作用が強くなることを報告している。本実験における、AT

PのED₅₀は7.5mg/kg以下であったことから、ED₅₀相当量のATP中にはSDZが6.25mg以下、TMPが1.25mg以下しか含まれていないことになり、これらをそれぞれの単剤のED₅₀と比較すると、SDZでは9.6%以下、TMPでは28.4%以下の量にすぎず、明らかに合剤における両剤の相乗作用が認められた。

SAとピリミジン誘導体との合剤として、ATP、DGおよびAMFの3剤について、ほぼ同じ条件下で検討したが、そのED₅₀および投薬区の生残率を100%にできる最少投薬量を比較すると、供試菌株がSA、ピリミジン誘導体およびそれらの合剤のいずれに対しても感受性であったにもかかわらず、DGの有効性が他の2剤と比較して明らかに低かった。従ってこのような治療効果の相違は、薬剤の魚体への吸収等、抗菌力以外の要因に基づくものであると考えられた。

第3節 自然発病魚群に対する治療試験

本節では、前節の実験感染魚の治療試験において明らかな治療効果が認められた供試薬剤のうち、サルファ剤とピリミジン誘導体との合剤2種とピリドンカルボン酸系薬剤2種の計4剤を対象として、せっそう病の自然発生魚群に対する治療効果を検討した。

試験1 スルファモノメトキシンとオルメトプリムの合剤について

実験方法

供試薬剤 第2節、試験1と同様のSMMとOMPとの合剤DGを用いた。

供試魚 1979年6月にせっそう病の自然発生をみた岐阜県内の養魚場のコンクリート池（面積40m²・水深50cm・注水量20l／秒）で飼育されていた、平均体重118gのアマゴ1年魚の約1,700尾の魚群を用いた。

投薬 DGを5日間、魚体重1kg当たり100mg投与した。投薬方法は、飼料重量の約6%の養魚用オイルに薬剤を懸濁させ、市販のマス用ペレットに吸着させた後、手撒きして自由摂餌させた。なお、給餌率は投薬前後、投薬時いずれも約1%とした。

供試魚の観察 毎日の斃死魚の外観症状を観察し、適宜原因菌の分離確認を行い、斃死尾数を記録した。

原因菌の確認法 斃死魚腎臓の一白金耳を、普通寒天培地（ニッスイ）平板に塗抹し、20°Cで3~4日培養後に、円形、半透明、クリーム色、周縁無構造、表面隆起、褐色色素産生の集落を*A. salmonicida*と推定した。

試験水温 12.3~19.9°Cであった。

薬剤感受性の測定 投薬前および投薬終了後にそれぞれ5株ずつ分離した
A. A. salmonicidaの、D G、N A、C PおよびOTCに対する薬剤感受性を第1節
と同様にディスク法によって測定した。

試験結果

図-8に示したように、供試魚群には6月2日前後にせっそう病の自然発病が
みられ、急激に斃死尾数が増加し始めたので、6月10日から14日までの5日間、
D Gの投薬を行った。日間斃死率は投薬前日が1.74%、初日が2.28%と高かった
が、2日目より減少し始め、5日目には0.41%と激減した。その後も斃死尾数は
減少の一途をたどり、投薬終了5日後には斃死魚がみられず、以後も2~3日に
1尾が斃死する程度でせっそう病の再発は認められなかった。以上の斃死魚のほ
とんどに外観的にせっそう病の症状が認められた。なお、投薬を開始した6月10
日から起算して、疾病が終息したと思われる6月19日までの生残率は93.7%であ
った。また、投薬前後に分離した10株のA. salmonicidaの薬剤感受性は、D Gを
含め供試したいずれの薬剤にも感受性が認められた。

試験2 スルフィソゾールとトリメトプリムの合剤について

試験方法

供試薬剤 第2節、試験1と同様のSIZとTMPの合剤AMFを用いた。

供試魚 1973年7月にせっそう病の自然発生をみた岐阜県内の養魚場のコ
ンクリート池（面積50m²・水深1m・注水量20l／秒）で飼育されていた、平均
体重9.8gのアマゴ0年魚の15,325尾の魚群を用いた。

投薬 AMFを7日間、魚体重1kg当たり30mg投与した。投薬方法は試験1

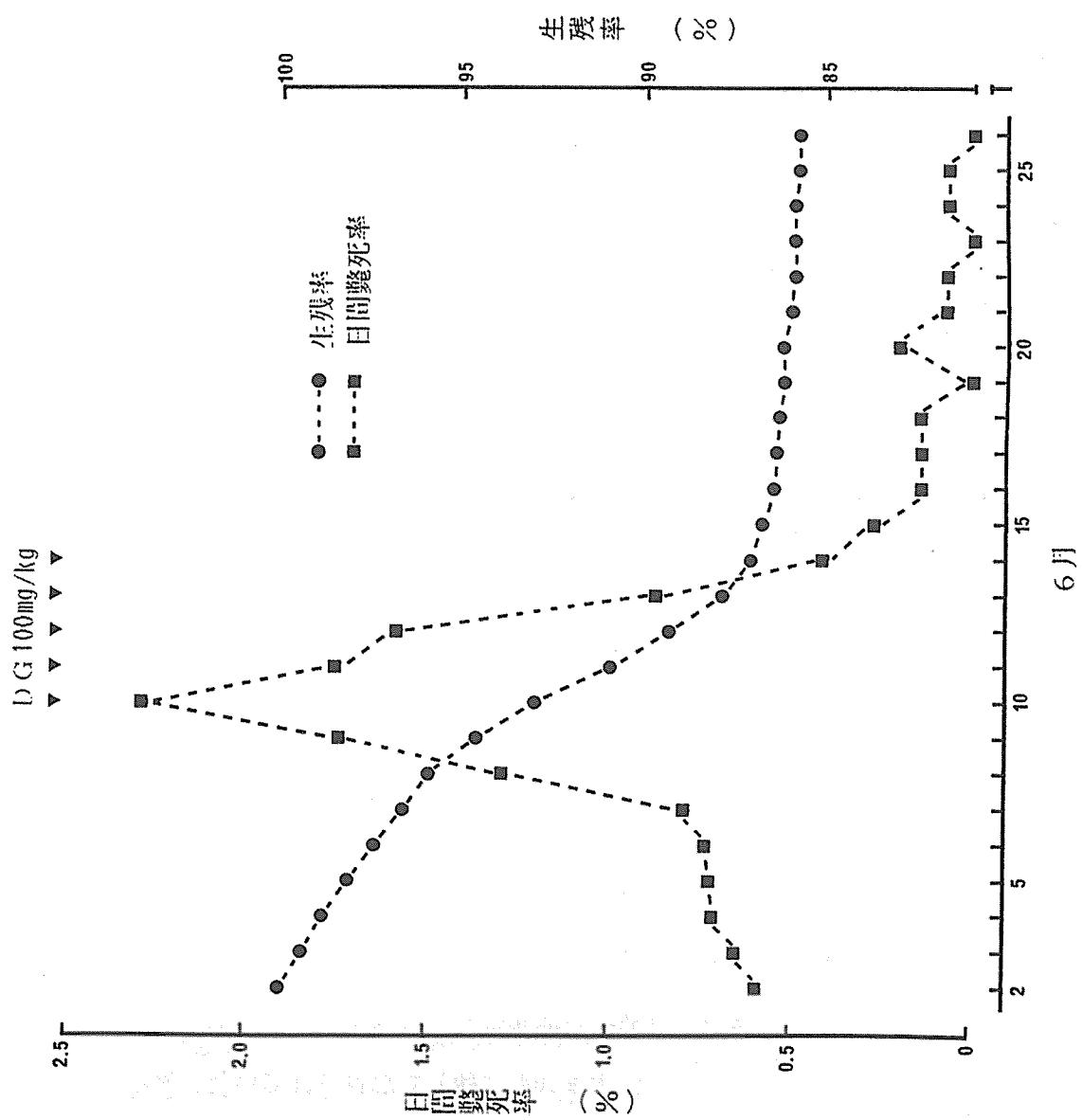


図-8 せっそう病が自然発生したアマゴ1年魚群に対するスルファモノメトキシンとオルメトブリムの合剤(DG)による治療試験

と同じであるが、飼料には市販のマス用クランブルを用いた。

供試魚の観察 試験1と同じである。

原因菌の確認法 試験1と同じである。

試験水温 16.7~20.2°Cであった。

薬剤感受性の測定 投薬前後にそれぞれ5株ずつ分離した*A. salmonicida* の、SIZ、CP、OTCおよびNAに対する薬剤感受性を第1節と同様にディスク法によって測定した。

試験結果

図-9に示したように、供試魚群には7月28日前後にせっそう病の自然発病がみられ、徐々に斃死尾数が増加したので、8月5日から11日までの7日間、AMFを投与した。投与前の日間斃死率は0.2%前後であったが、投薬3日目より斃死尾数が減少し、同月下旬には疾病が終息した。以上の斃死魚のほとんどに外観的にせっそう病の症状が認められた。なお、投薬前後に分離された10株の*A. salmonicida*は、SIZをはじめ供試したいずれの薬剤にも感受性が認められた。

試験3 オキソリン酸について

試験方法

供試薬剤 第2節、試験3と同様のOAを用いた。

供試魚 1972年6月にせっそう病の自然発生をみた岐阜県内の養魚場のコンクリート池（面積50m²・水深1m・注水量20l／秒）で飼育されていた平均体重272gのアマゴ1年魚780尾の魚群を用いた。

投薬 OAを5日間、魚体重1kg当たり10mg投与した。投薬方法は、薬剤と

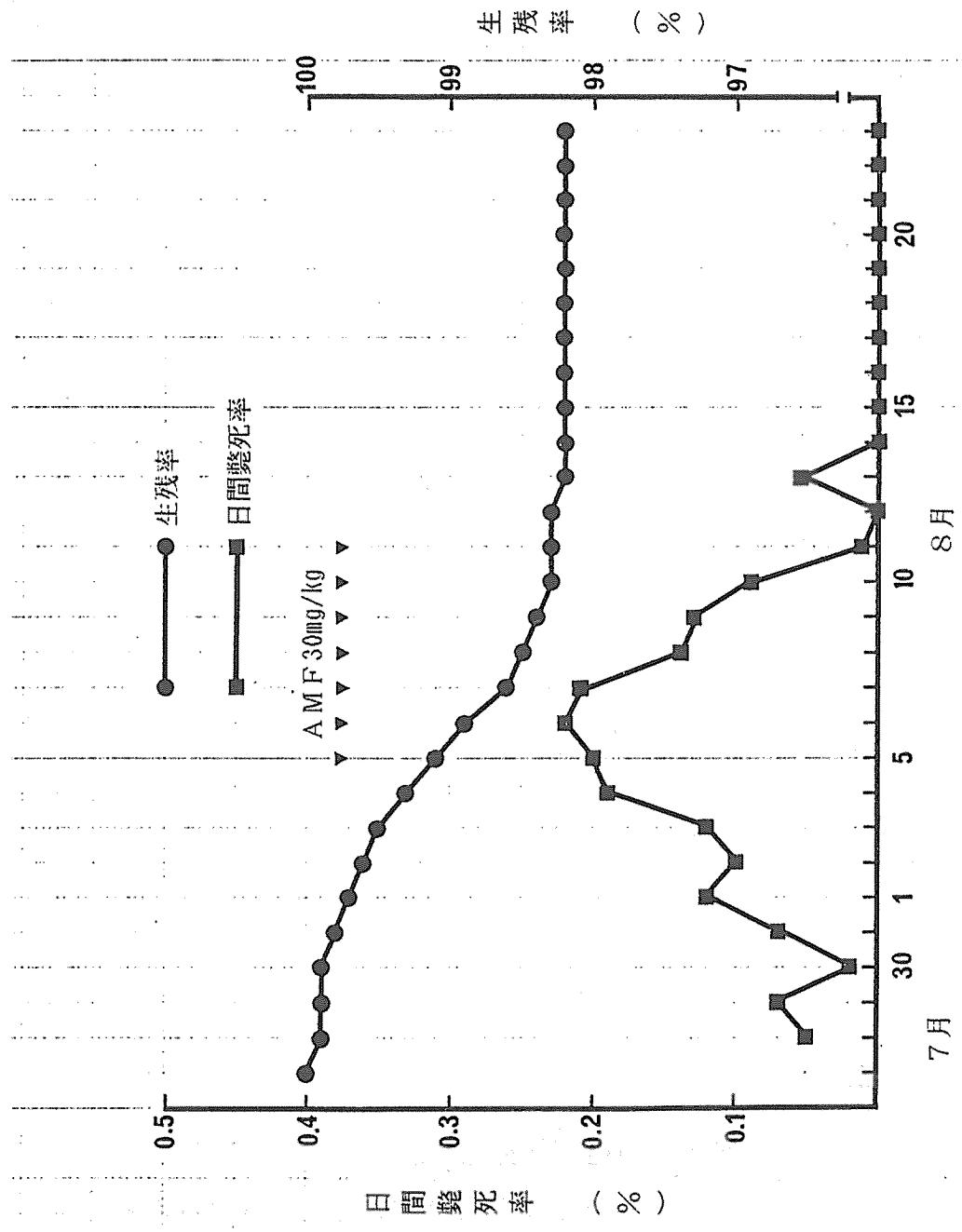


図-9 せっそう病が自然発生したアマゴ0年魚群に対するスルフィソゾールとトルメトプリムの合剤(AMF)による治療試験

市販のマス用ペレットをよく混ぜ合せた後、飼料重量の約10%の水をふりかけて再びよく混ぜ合せ1時間乾燥させたものを、手撒きして自由摂餌させた。なお、給餌率は投薬前後、投薬時いずれも約1%とした。

供試魚の観察 試験1と同じである。

原因菌の確認法 試験1と同じである。

試験水温 14.8~18.9°Cであった。

薬剤感受性の測定 試験を実施した養魚場において、OAを使用したことのなかった前年に分離された*A. salmonicida* 1株、本試験でOA投薬終了6日後の1972年7月4日に分離された1株、および試験終了後の1972年8月9日に分離された1株の計3株について、平板希釀法によりOAに対する薬剤感受性を測定した。

実験結果

図-10に示したように、供試魚群には1972年6月15日前後よりせっそう病の自然発生が認められ、下旬には斃死尾数が急激に増加してきたので、6月24日から28日までの5日間、OAの投薬を行った。日間斃死率は投薬2日目が1.33%と最も高かったが、投薬終了後はほとんど斃死が認められなくなり疾病は終熄した。以上の斃死魚のほとんどに外観的にせっそう病の症状が認められた。なお、投薬を開始した6月24日から起算して、疾病が終熄したと思われる7月7日までの生残率は97.6%であった。また、OAに対する薬剤感受性を測定した結果、供試した*A. salmonicida* 3株のMICはいずれも0.02mcg/mlであった。

試験4 ナリジクス酸について

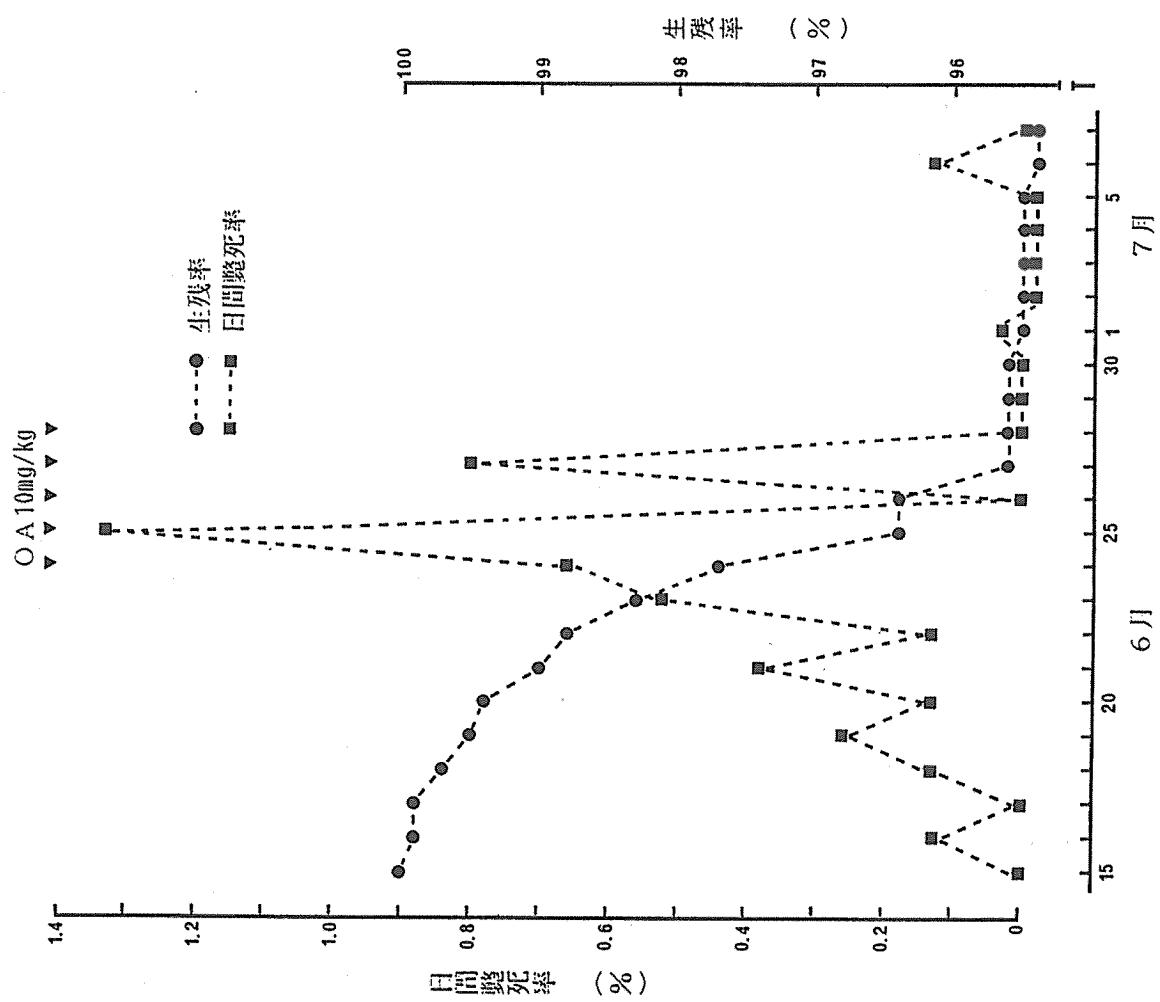


図-10 せっそう病が自然発生したアマゴ1年魚群に対する
オキソリン酸(OA)による治療試験

試験方法

供試薬剤 NAの純末およびNAを10%含む製剤（10倍散）を用いた。

供試魚 1973年8月にせっそう病の自然発生をみた岐阜県内の養魚場のコンクリート池（面積60m²・水深1m・注水量30l／秒）2面に別々に飼育されていた、平均体重15gの2群のアマゴ0年魚（魚群I：26,000尾、魚群II：12,000尾）を用いた。

投薬 魚群IにはNA純末を、魚群IIにはNA10倍散を、5日間、魚体重1kg当たり25mg（純末換算）投与した。投薬方法は、純末の場合は、飼料重量の約5%の養魚用オイルに薬剤を懸濁させ、10倍散の場合は、同量のぬるま湯で薬剤を溶解させ、市販のマス用ペレットに吸着させた後、手撒きして自由摂餌させた。

供試魚の観察 試験1と同じである。

原因菌の確認法 試験1と同じである。

試験水温 17.8～19.0°Cであった。

薬剤感受性の測定 投薬前に魚群IIより分離した5株の*A. salmonicida*のNA、SMM、CPおよびOTCに対する薬剤感受性を、第1節と同様にディスク法によって測定した。

実験結果

1973年7月9日前後より前記両供試魚群にせっそう病の自然発生が認められ、斃死尾数が徐々に増加してきたので、8月10日から14日までの5日間、両供試魚群にNAの投与を行った。魚群Iでは、日間斃死率は図-11に示したように、投薬開始前から投薬3日目までは4～5%と高かったが、4日目より減少し始め、投薬終了11日後には斃死魚が認められなくなり疾病は終息した。以上の斃死魚のほとんどに外観的にせっそう病の症状が認められた。なお、投薬を開始した8月

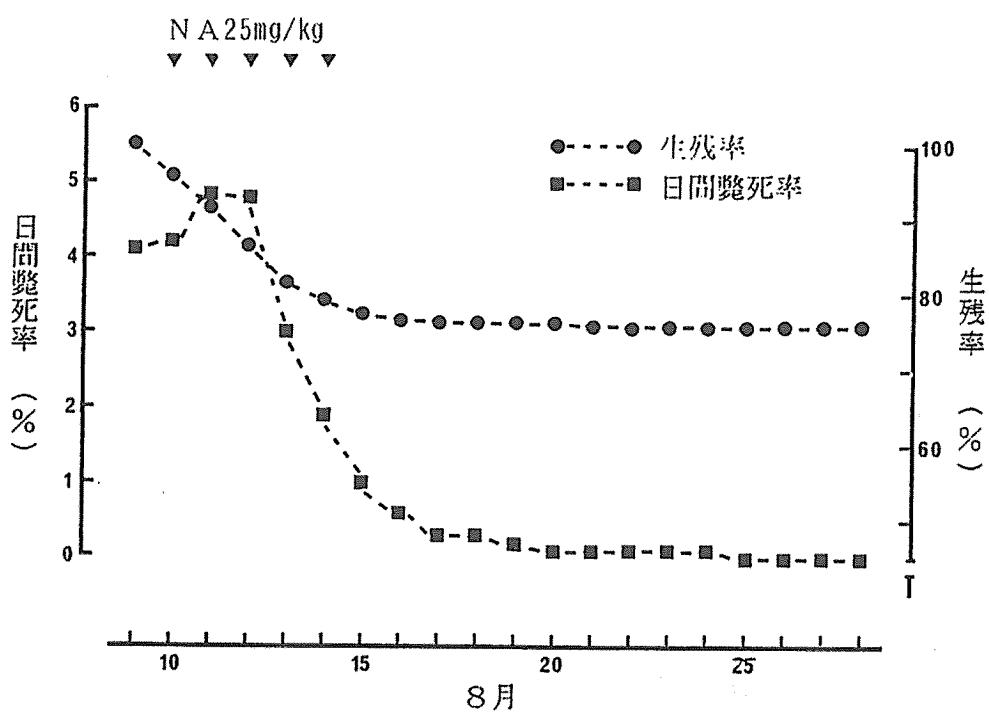


図-11 せっそう病が自然発生したアマゴ0年魚群に対する
ナリジクス酸(NA)による治療試験(魚群I)

10日から起算して、疾病が終息した8月25日までの生残率は82.0%であった。

魚群Ⅱでは、日間斃死率は図-12に示したように、投薬開始前から投薬3日目までは4～5%と高かったが、4日目より減少し始め、投薬終了12日後には斃死魚が認められなくなり疾病は終息した。以上の斃死魚のほとんどに外観的にせっそう病の症状が認められた。なお、投薬を開始した8月10日から起算して、疾病が終息した8月26日までの生残率は70.1%であった。投薬前に分離した5株のA. salmonicidaは、いずれもNAおよびOTCに感受性を示したが、SMMおよびCPには感受性を示さなかった。

考 察

本節では、第2節の実験感染魚による治療試験において有効性の認められた薬剤のうち、DG、AMF、OAおよびNAを取りあげ、アマゴのせっそう病自然発生魚群に対する治療効果を検討した。各薬剤の投与量は、前節で得たED₅₀の2～5倍量に設定した。投薬の前後に、各供試自然発病魚群から分離したA. salmonicidaはすべての供試薬剤に感受性を示し、それぞれの試験で各薬剤の投薬2～3日目頃から明らかに斃死尾数が減少し、投薬終了後12日以内にせっそう病による斃死魚がみられなくなったことから、いずれの供試薬剤も所定の投与量および投与日数でせっそう病の治療効果が期待できると考えられ、第2節の実験感染魚による治療試験の結果の妥当性が裏付けられた。なお、NAに関しては、供試薬剤の剤型について、純末と10倍散との比較を行ったが、差は認められなかった。

以上、4種類の薬剤について、せっそう病の自然発病魚に対する治療効果を検討したが、第2節の実験感染魚に対する治療試験の結果と併せ考察すると、DG

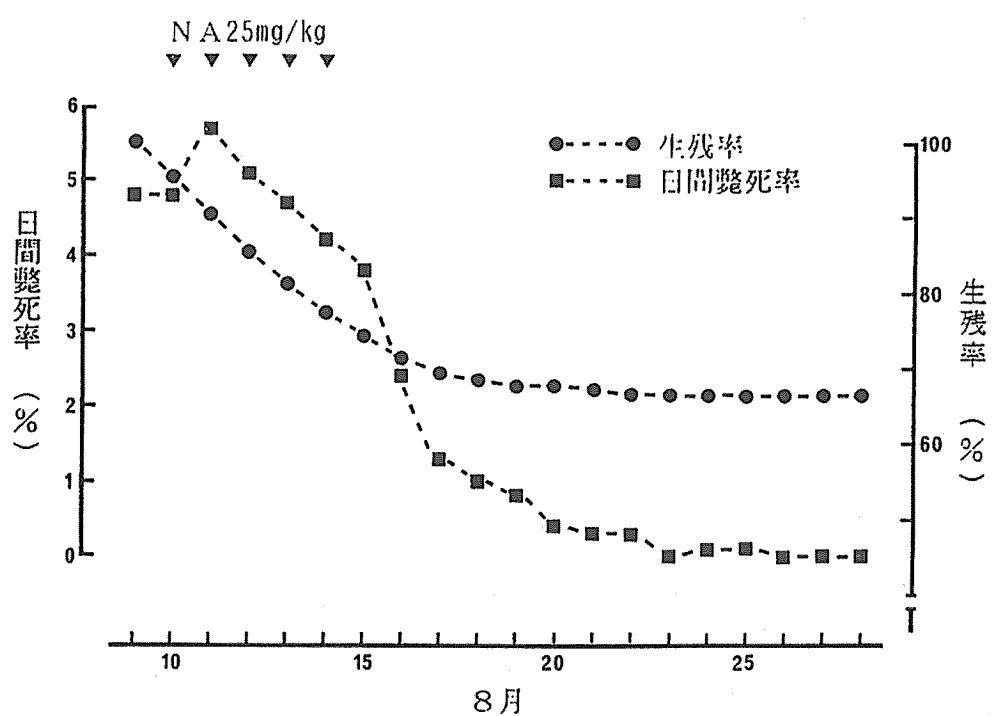


図-12 せっそう病が自然発生したアマゴ0年魚群に対する
ナリジクス酸(NA)による治療試験(魚群II)
<但しこの場合には10倍散を用い投薬量は純末換算した>

ではED₅₀の2倍の量を投与した場合でも充分な効果を認めることができ、AMFでは100%の供試魚が生残できる最少投与量の0.5倍、OAでは同量の4倍、NAでは同量の5倍で充分な効果を認めることができた。せっそう病の実験感染魚における治療に必要な投薬量と養殖現場におけるそれとの相関を明らかにし、一定の基準を定めることは実験例も少なく困難であるが、それを明らかにすることは、今後のせっそう病の治療対策をたてるうえできわめて重要であり、今後さらに多くの検討が必要と考えられる。

小 括

本章では、分離年度の異なるA. salmonicidaの薬剤感受性を明らかにした後、せっそう病の実験感染魚および自然発病魚に対する治療試験を行った。

まず、1974年から1986年にかけて、せっそう病の自然発病がみられた、養殖サケ科魚類から分離された 776株のA. salmonicidaの薬剤感受性をディスク法によって調べ、薬剤感受性の経年変化を検討して、薬剤の使用状況と耐性株の出現状況には密接な関連がうかがわれること、「感受性株」の判定基準としては市販の（昭和ディスク）判定表の「+++」が妥当であることを指摘した。

つぎに、A. salmonicidaの実験感染魚を用いて、3種類のサルファ剤とピリミジン誘導体との合剤（スルファジアジンとトリメトプリムとの合剤、スルファモノメトキシンとオルメトプリムとの合剤およびスルフィソゾールとトリメトプリムとの合剤）、2種類の抗生物質（オキシテトラサイクリンおよびアンピシリン）および3種類のピリドンカルボン酸系薬剤（オキソリン酸、ナリジクス酸およびピロミド酸）の治療効果を検討し、治療効果の評価法として、半数有効量または供試魚が 100% 生残できる最少投与量として表すべきことを指摘した。さらに、実験感染治療試験において明らかに治療効果が認められた供試薬剤のうち、2種類のサルファ剤とピリミジン誘導体との合剤（スルファモノメトキシンとオルメトプリムとの合剤およびスルフィソゾールとトリメトプリムとの合剤）および2種類のピリドンカルボン酸系薬剤（オキソリン酸およびナリジクス酸）について、せっそう病自然発病魚群に対する治療効果を明らかにし、実験感染魚を用いた治療試験の結果の妥当性を裏付け、今後、実験感染における治療に要する投与量と養殖現場におけるそれとの相関をより多く検討し、一定の投薬基準算出法を明らかにする必要のあることを指摘した。

第VI章 せっそう病に対する予防 免疫の試み

前章では、せっそう病対策としての、薬剤による治療に関する検討を行った。

本章では、今後せっそう病対策の最も有望な対策になると考えられる、予防免疫の実用化に関する検討を主な目的として、ワクチン腹腔内注射、経口免疫および浸漬免疫についての検討を行った。

第1節 ワクチン腹腔内注射

本節では、HARA et al. (1976) によって実験的にその有効性が明らかにされた、せっそう病のワクチン腹腔内注射の実用化に関して、水温の季節変動が大きい河川水使用池（岐阜県内における在来マス類養殖業者の大半は河川水使用）におけるせっそう病の自然発生下での実用規模によるワクチン投与効果、水温変化が少ない湧水使用池における効果および同一養魚場における多年にわたる継続注射の効果の3項目について検討を行った。

試験1 河川水使用池での実用規模におけるワクチン注射の効果（1）

試験方法

試験区 生理食塩水注射対照区、岐阜株アジュバント無添加ワクチン注射区、岐阜株アジュバント添加ワクチン注射区および東京株アジュバント添加ワクチン注射区の4試験区を設けた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重 188.0 g のアマゴ 1 年魚を各試験区 255 尾ずつ用いた。

ワクチンの調整 *A. salmonicida* G6801 株（岐阜株：1968年 5 月にアマゴの自然発病魚より分離）および T69 株（東京株：1968 年に東京都水産試験場奥多摩分場より分与を受けた）を、アマゴを用いて 2 回魚体通過を行った後、普通寒天培地（ニッスイ）で 25°C・48 時間培養した菌体を、0.5% ホルマリン加生理食塩水に懸濁し、37°C に 48 時間保って不活化した後、脱脂綿で沪過して混入した培地を除き、遠心分離により菌体を 0.3% ホルマリン加生理食塩水で一度洗浄した。洗浄後の菌体を湿菌重量で 4 mg/ml になるように、滅菌生理食塩水に懸濁させたものをアジュバント無添加ワクチンとした。アジュバント添加ワクチンは、Klearol white mineral oil (Sonneborn Chemical and Refining Corporation) と AraceI 83 (Atlas Powder Company) を 9 : 1 に混合したものに、湿菌重量で 8 mg/ml としたアジュバント無添加ワクチンを等量混合乳化して調整した。

ワクチン注射 2 日間餌止めした供試魚を MS-222 の 100 ppm 溶液で約 2 分間麻酔し、連続接種器「ピスター 1」（富士平工業 K.K.）を用いて、ワクチン液を 1 尾当たり 0.1 ml ずつ腹腔内に注射した。なおワクチン注射は 1969 年 2 月 19 日に行った。

供試魚の飼育および観察 各試験区毎に長方形コンクリート池（長さ 11.4 m × 幅 2.3 m × 水深 0.5 m）に収容し、毎秒約 8 ℥ の河川水を注入して、1969 年 10 月 15 日まで飼育した。給餌は 1 日数回マス用市販飼料を手撒きで行い、注射後ほぼ半月毎に採取した供試魚血清の *A. salmonicida* に対する凝集素価を測定し、また毎日の斃死状況を記録した。なお、せっそう病の自然発生がみられても、薬剤による治療は一切行わなかった。

死因の判定 せっそう病の定型的症状の有無によって判定し、外觀症状が

明らかでない斃死魚については、普通寒天培地（ニッスイ）平板を用い、腎臓からA. salmonicidaの分離を行って確認した。

凝集素価の測定 1回の測定時に各区5尾ずつ個体別に血清を採取し測定した。すなわち、尾柄部を切断して採血し、4℃に一夜放置した後、翌朝血清を分離した。得られた血清を生理食塩水で2倍希釈により希釈液列を作り各希釈液に等量の抗原液を添加後、25℃で2時間反応させ4℃に一夜置いて翌日結果を判定した。抗原液にはA. salmonicida G6801株を用い、アジュバント無添加ワクチンと同様の方法で調整したもの用いた。なお、血清の非働化は行わなかった。

試験水温 図-13に示したように、1.2～22.5℃であった。

試験結果

各試験区の供試魚の生残率の推移を図-14に示した。各区いずれにおいても4月下旬から6月中旬にかけて、せっそう病の自然発病がみられた。せっそう病以外の斃死原因として、水カビ病、スレおよび原因不明の脊椎骨異常症によると考えられるものもみられたが、総斃死魚の81.7%はせっそう病によるものであった。試験終了時の各区の生残率およびせっそう病による斃死率は、生理食塩水注射対照区では60.5%および35.0%（生残率および斃死率の算出には凝集素価の測定に供した55尾を除いた）であったのに対して、岐阜株アジュバント無添加ワクチン注射区では69.5%および24.5%、岐阜株アジュバント添加ワクチン注射区では70.5%および24.5%、東京株アジュバント添加ワクチン注射区では85.0%および9.5%であり、RPS < Relative Percent Survival : (1 - ワクチン注射区の斃死率 / 対照区の斃死率) × 100 > (AMEND 1981) は、岐阜株アジュバント無添加ワクチン注射区で23%（せっそう病による斃死率では30%）、岐阜株アジュバント添加ワクチン注射区で25%（30%）、東京株アジュバント添加ワクチン注射

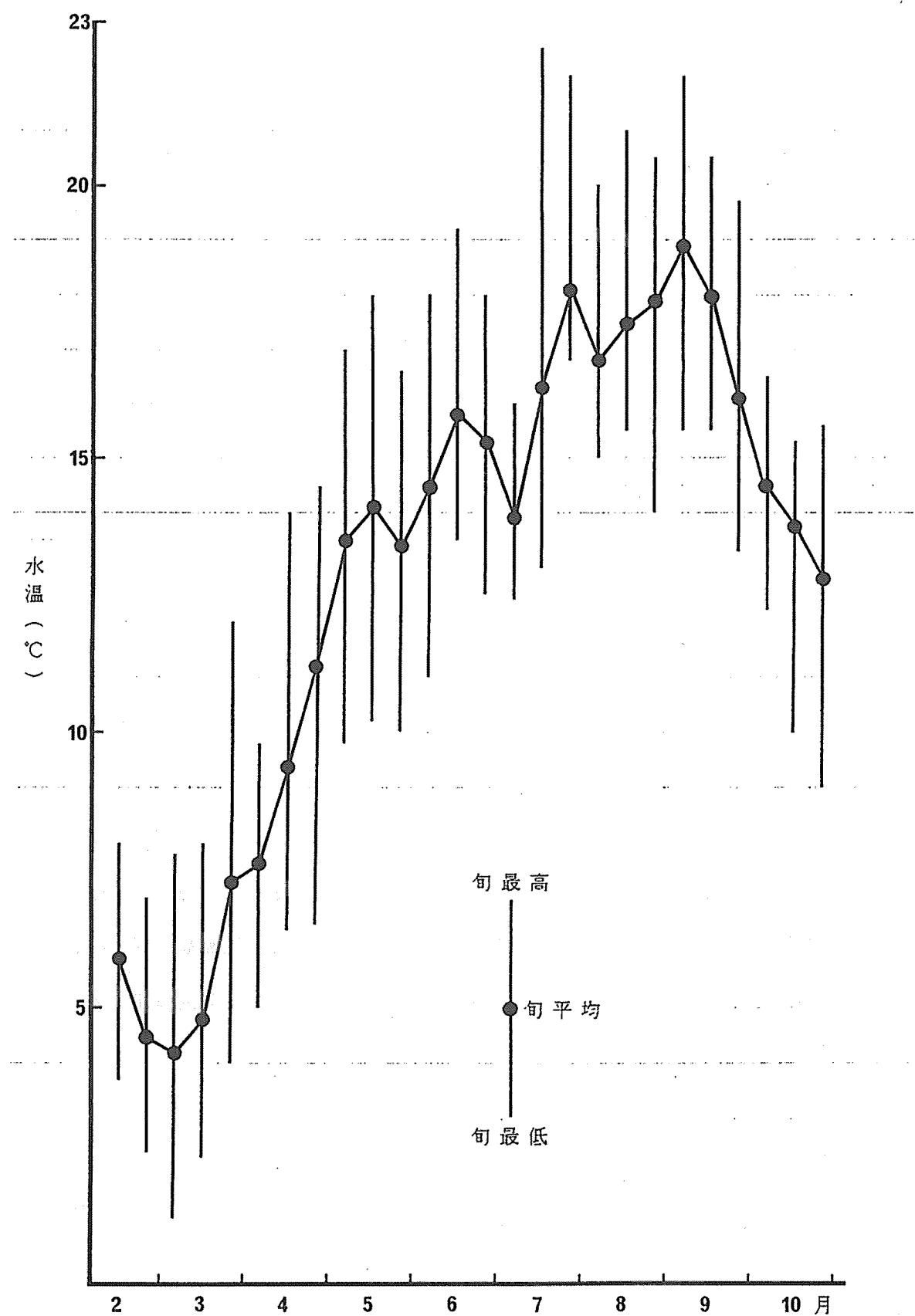


図-13 アマゴに対するせっそう病ワクチン腹腔内注射試験の供試魚飼育水温（試験1）

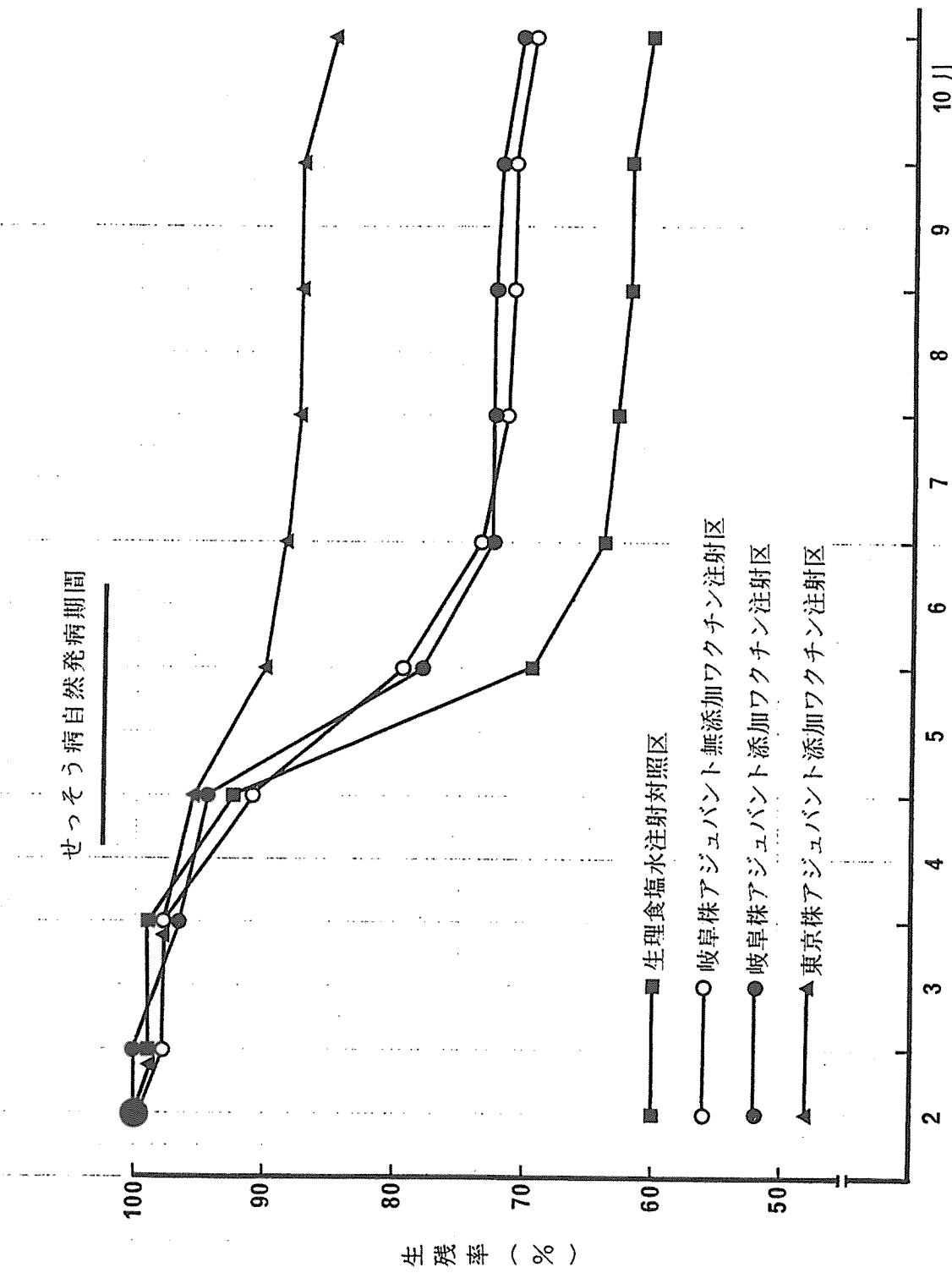


図-14 河川水使用池において3種のせっそう病ワクチンを腹腔内
注射後の生存率の経過

区で62%（73%）と算出された。

凝集素価の測定結果を表-47に、その平均値の推移を図-15示した。生理食塩水注射対照区では、注射51日後に最高値の110を示し、その前後は18~64の範囲にあった。岐阜株アジュバント無添加ワクチン注射区では、ワクチン注射115日後に最高値の339に達し、その前後は7~258の範囲にあった。岐阜株アジュバント添加ワクチン注射区では、ワクチン注射95日後に1,100まで上昇し、以後注射186日後まで1,000以上を保ち、最高値は注射186日後の5,380であった。東京株アジュバント添加ワクチン注射区では、ワクチン注射130日後に3,530まで上昇し、以後注射186日後まで1,000以上を保ち、最高値は注射186日後の6,210であった。

試験2 河川水使用池での実用規模におけるワクチン注射の効果（2）

試験1を実施した翌年に、その追試を行った。

試験方法

試験区 生理食塩水注射対照区、岐阜株アジュバント無添加ワクチン注射区、岐阜株アジュバント添加ワクチン注射区、東京株アジュバント無添加ワクチン注射区および東京株アジュバント添加ワクチン注射区の5試験区を設けた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重157.0gのアマゴ1年魚を各区459尾ずつ用いた。

ワクチンの調整 岐阜株としてA. salmonicida G6901株（1969年12月にアマゴの自然発病魚より分離）を用い、ワクチン液の湿菌濃度を2mg/mlにした以外、試験1と同じである。

表-47 河川水使用池において3種のせっそう病ワクチンを腹腔内注射後の各実験区
アマゴ供試魚血清中の凝集素価測定結果（試験1）

採血年月日	生理食塩水注射 対照区	岐阜株アジュバント無 添加ワクチン注射区	岐阜株アジュバント添加 ワクチン注射区	東京株アジュバント添加 ワクチン注射区
1969. 3. 4	54*(32 ~ 64)**	37 (8~ 64)	42 (32~ 64)	85 (64~ 128)
3. 18	42 (8 ~ 64)	110 (64~128)	85 (64~ 128)	74 (32~ 128)
4. 1	110 (64 ~128)	49 (16~128)	110 (64~ 128)	74 (32~ 128)
4. 15	56 (32 ~ 64)	98 (64~256)	85 (64~ 128)	74 (16~ 128)
4. 30	56 (32 ~ 64)	130 (64~256)	110 (64~ 256)	130 (64~ 256)
5. 15	64 (32 ~128)	258 (128~512)	1,100 (1,024~ 2,048)	538 (256~1,024)
6. 4	49 (32 ~ 64)	339 (128~512)	2,040 (256~ 8,192)	197 (128~ 256)
6. 19	37 (32 ~ 64)	64 (32~128)	1,030 (1,024~ 2,048)	3,530 (2,048~8,192)
7. 2	24 (16 ~ 32)	64 (32~128)	1,520 (1,024~ 2,048)	2,660 (2,048~4,096)
7. 24	18 (4 ~ 64)	74 (16~512)	3,530 (1,024~ 8,192)	2,310 (1,024~8,192)
8. 14	18 (16 ~ 32)	7 (4~ 32)	5,380 (4,096~ 16,384)	6,210 (4,096~8,192)

* 幾何平均 ** 范囲

せっそう病自然発病期間

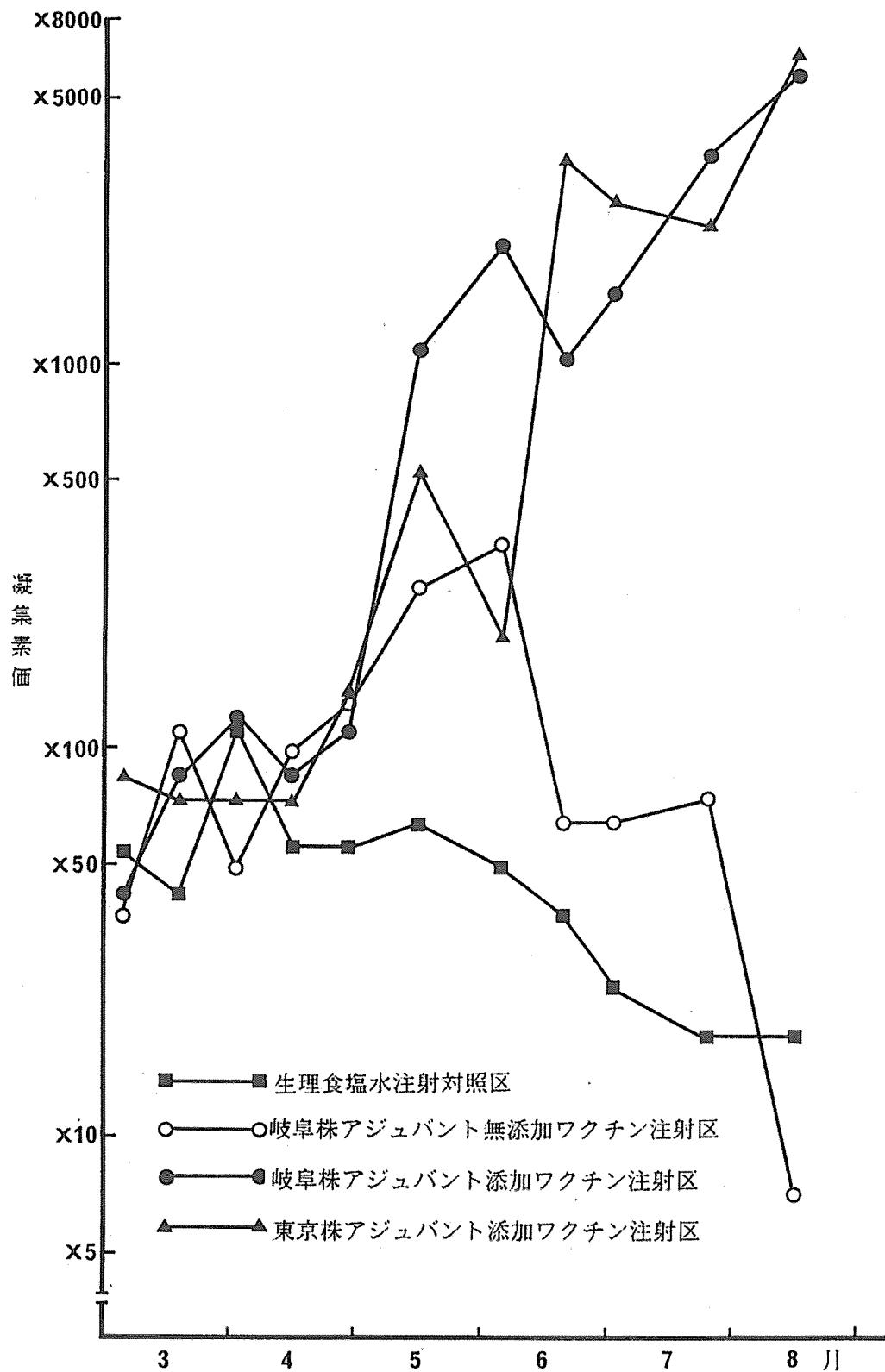


図-15 河川水使用池において3種のせっそう病ワクチンを腹腔内注射後の各試験区
アマゴ供試魚血清中の凝聚素価の推移(試験1)

ワクチン注射 1970年3月18日に行った。なお、注射方法は試験1と同じであるが、注射ワクチン液量は、1尾当たり0.2mlずつとした。

供試魚の飼育および観察 試験1と同じであるが、飼育期間は1970年10月15日までとした。

死因の判定 試験1と同じである。

凝集素価の測定 1回の測定時に各区4尾ずつ個体別に測定した。測定方法は、試験1と同じである。

試験水温 図-16に示したように、2.0～23.3°Cであった。

試験結果

各試験区の供試魚の生残率の推移を図-17に示した。各区いずれにおいても4月下旬から7月上旬にかけて、せっそう病の自然発病がみられた。せっそう病以外の斃死原因は、試験1と同様であり、総斃死魚の95.5%がせっそう病による斃死であった。試験終了時の各試験区の生残率およびせっそう病による斃死率は、生理食塩水注射対照区では70.3%および28.3%（生残率および斃死率の算出には凝集素価の測定に供した32尾を除いた）であったのに対して、岐阜株アジュバント無添加ワクチン注射区では81.0%（R P S : 36%、以下同じ）および17.6%（38%）、岐阜株アジュバント添加ワクチン注射区では83.8%（45%）および15.5%（45%）、東京株アジュバント無添加ワクチン注射区では82.4%（41%）および17.3%（39%）、東京株アジュバント添加ワクチン注射区では87.8%（59%）および11.7%（59%）であった。

試験1同様供試魚血清中の凝集素価の測定結果を表-48に、その平均値の推移を図-18に示した。生理食塩水注射対照区では、注射106日後に最高値の64を示し、その前後は4～51の範囲にあった。岐阜株アジュバント無添加ワクチン注射

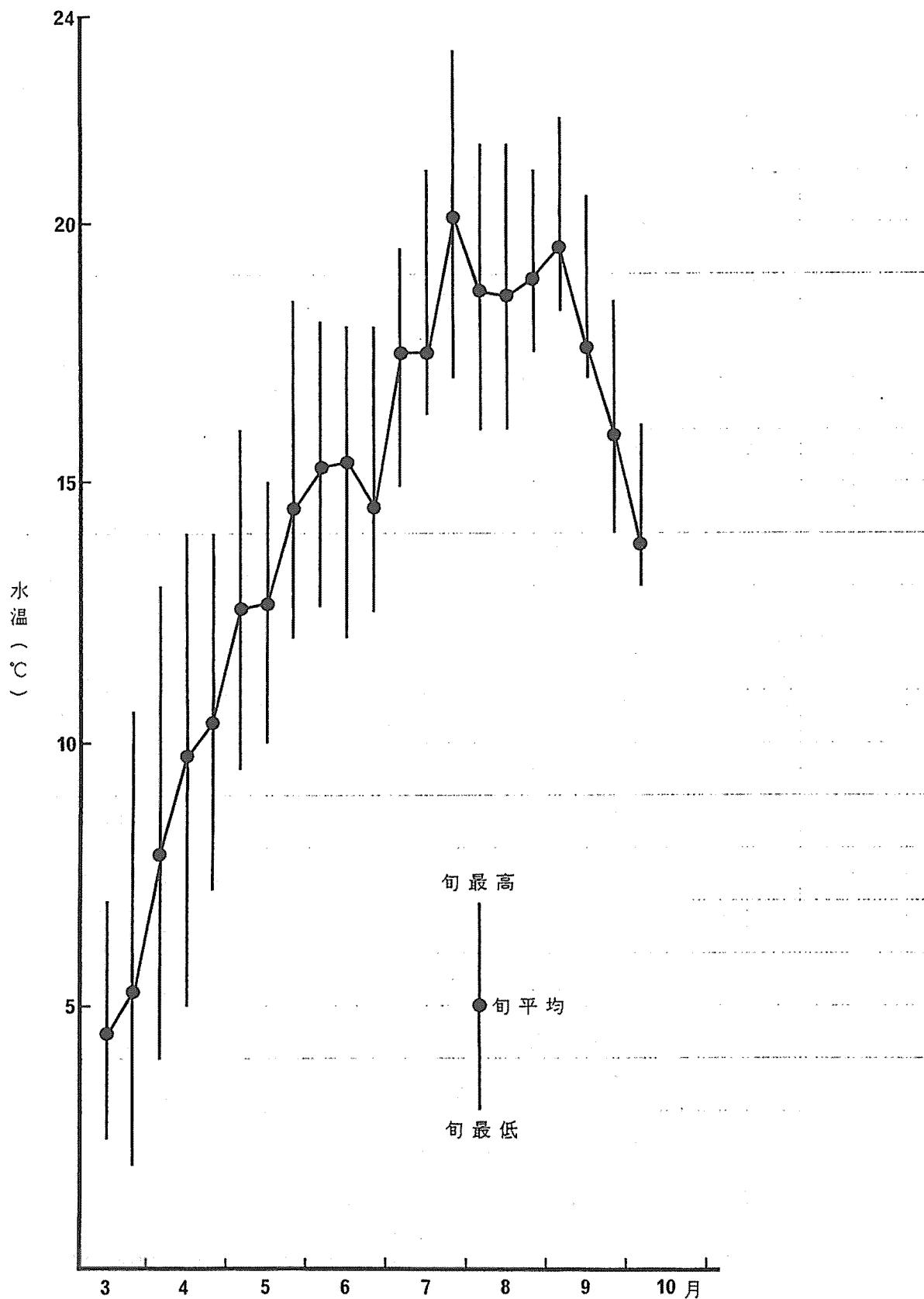


図-16 アマゴに対するせっそう病ワクチン腹腔内注射試験の供試魚飼育水温（試験2）

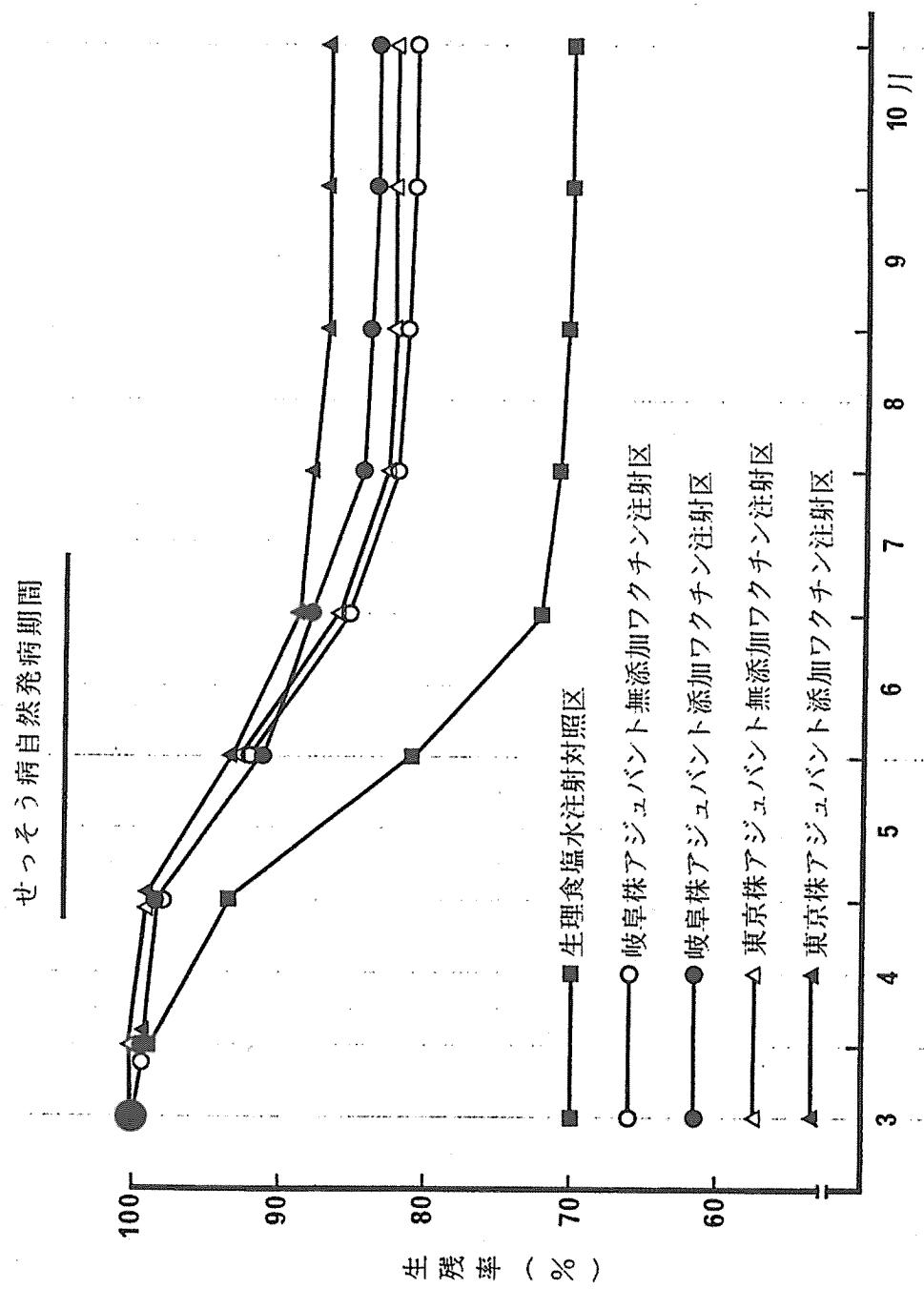


図-17 河川水使用池において4種のセツソウ病ワクチンを腹腔内
注射後の予防効果(試験2)

表-48 河川水使用池において4種のせっそう病ワクチンを腹腔内注射後の各実験区
アマゴ供試魚血清中の凝集素価測定結果(試験2)

採血年月日	生理食塩水注射 対照区	岐阜株アジュバント無 添加ワクチン注射区	岐阜株アジュバント添 加ワクチン注射区	東京株アジュバント無 添加ワクチン注射区	東京株アジュバント添 加ワクチン注射区
1970.5.24	27*(16 ~ 64)**	128 (128)	108 (64 ~ 128)	128 (64 ~ 256)	609 (128 ~ 2,048)
6. 4	51 (16 ~ 256)	76 (32 ~ 128)	512 (256 ~ 1,024)	431 (256 ~ 512)	1,218 (1,024 ~ 2,048)
6. 18	45 (16 ~ 128)	64 (32 ~ 128)	4,871 (2,048 ~ 16,384)	362 (128 ~ 512)	1,722 (1,024 ~ 4,096)
7. 2	64 (64)	108 (64 ~ 128)	2,436 (2,048 ~ 4,096)	152 (128 ~ 256)	1,218 (512 ~ 2,048)
8. 6	7 (4 ~ 16)	16 (16)	362 (256 ~ 512)	23 (16 ~ 32)	181 (128 ~ 512)
8.24	13 (4 ~ 64)	19 (8 ~ 32)	362 (128 ~ 2,048)	13 (8 ~ 16)	181 (64 ~ 512)
9. 2	10 (8 ~ 16)	13 (8 ~ 32)	256 (32 ~ 512)	19 (8 ~ 64)	181 (64 ~ 512)
10. 5	4 (4)	4 (4)	23 (4 ~ 28)	6 (4 ~ 8)	38 (32 ~ 64)

* 幾何平均 ** 範囲

せっそう病自然発病期間

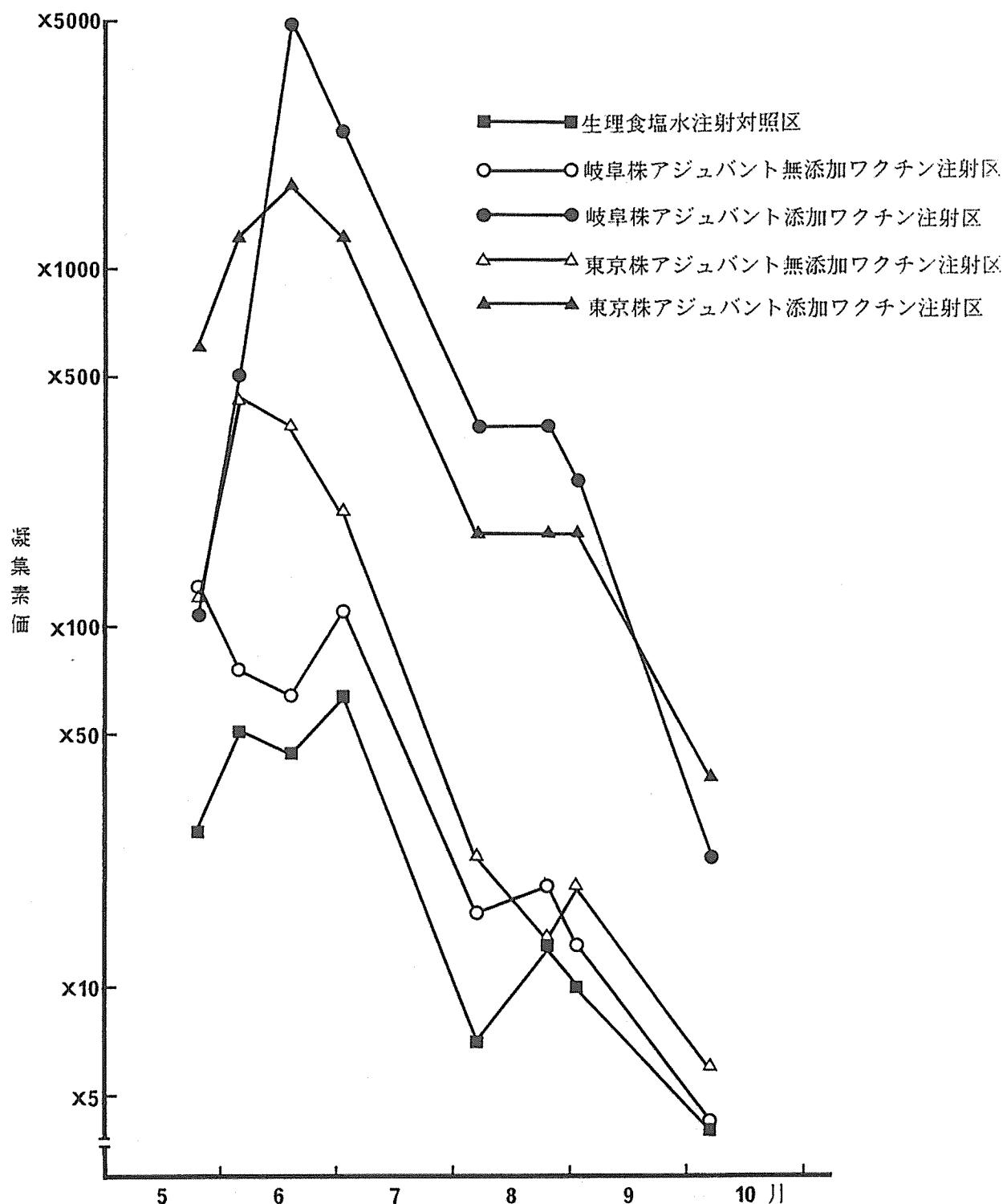


図-18 河川水使用池において4種のせっそう病ワクチンを腹腔内注射後の各試験区
アマゴ供試魚血清中の凝集素価の推移(試験1)

区では、ワクチン注射67日後に最高値の128を示し、その後は4～108の範囲にあった。岐阜株アジュバント添加ワクチン注射区では、ワクチン注射92日後4,871まで上昇し、注射106日後まで1,000以上を保ち、最高値は注射92日後の4,871であった。東京株アジュバント無添加ワクチン注射区では、ワクチン注射78日後に最高値の431に達し、その前後は6～362の範囲にあった。東京株アジュバント添加ワクチン注射区では、ワクチン注射78日後に1,218まで上昇し、注射106日後まで1,000以上を保ち、最高値は注射92日後の1,722であった。

試験3 水温が一定な飼育池におけるワクチン注射の効果

試験1および2は水温変化の大きい河川水使用池で行ったが、変温動物である魚類の抗体形成は、飼育水温によって影響をうけるとされている（川津 1968）ことを考慮して、湧水を使用して一定の飼育水温下でのワクチン注射の効果を検討した。また、繰返してワクチンを注射した場合の効果も検討した。

試験方法

試験区 ワクチン無注射対照区、ワクチン1回注射区、2回注射区および3回注射区の4試験区を設けた。

供試魚 岐阜県中津川市の神坂養魚場で飼育中のせっそう病発病歴がなく、健康な平均体重52.0gのアマゴ1年魚を各区100尾ずつ用いた。

ワクチンの調整 本試験では北里研究所で調整されたワクチンを用いた。このワクチンは、*A. salmonicida*の東京株、長野株、岐阜株および静岡株が等量混合され、ホルマリンによって不活化されたもので、抗原量は0.025mgN/ml(0.005mg N/fish)であり、アジュバントは添加されていなかった。

ワクチン注射 ワクチン1回注射区は1977年4月5日に、2回注射区は4月5日および6月6日に、3回注射区は4月5日、6月6日および8月9日に行った。注射方法は試験2と同じである。

供試魚の飼育および観察 前記神坂養魚場において、各試験区毎に供試魚を長方形コンクリート池（長さ 2.0m×幅 1.0m×水深 0.5m）に収容し、毎秒約2ℓの湧水を注入して、1977年9月27日まで飼育した。給餌は1日数回マス用市販飼料を手撒きで行い、試験1と同様に斃死魚の観察を行った。

凝集素価の測定 ワクチン注射3週後までは毎週、以後は2週間毎に供試魚血清の凝集素価を、1回の測定時に各区4尾ずつ個体別に測定した。測定方法は試験1と同じである。

試験水温 10.5±0.5°Cであった。

攻撃試験 せっそう病の自然発生がみられなかつたので、ワクチン無注射対照区およびワクチン1回注射区について、ワクチン注射45日後に*A. salmonicida* G7604 株の菌浴接種による攻撃を行い、ワクチン注射効果の判定を行つた。供試魚数は、各試験区10尾ずつとし、接種菌量は 2.9×10^7 CFU/mlおよび 2.9×10^6 CFU/mlとし、菌接種後2週間観察した。接種方法等は第Ⅰ章、第1節と同様である。

試験結果

本試験においては、せっそう病の自然発生は認められず、自然発病による斃死魚や、せっそう病以外の原因による斃死魚もまったくみられなかつた。

供試魚血清中の凝集素価の測定結果を表-49に、その平均値の推移を図-19に示した。ワクチン無注射対照区では、平均凝集素価は5～38とほとんど上昇がみられなかつた。ワクチン1回注射区では注射3週間後に 362まで上昇し、7週間

表-49 水温が一定（湧水）な飼育池においてせっそう病ワクチンを腹腔内注射後の各試験区アマゴ供試魚血清中の凝聚素価測定結果

最終注射後週数	ワクチン無注射対照区		ワクチン1回注射区		ワクチン2回注射区		ワクチン3回注射区	
	ワクチン	ワクチン	ワクチン	ワクチン	ワクチン	ワクチン	ワクチン	ワクチン
1	32*(32)**	38 (32~ 64)		256 (128~ 512)	215 (128~ 512)			
2	64 (32~ 128)	64 (32~ 128)		609 (256~2,048)	724 (512~1,024)			
3	38 (32 ~ 64)	362 (256~ 512)				1,024 (512~2,048)		
5		861 (512~1,024)		2,048 (512~4,096)		724 (256~1,024)		
7	38 (16 ~ 64)	3,444 (1,024~8,192)				724 (512~2,048)		
8				609 (256~2,048)				
9		861 (512~4,096)			861 (512~2,048)			
11	27 (16 ~ 32)	362 (64~1,024)			256 (128~ 512)			
14	10 (4 ~ 16)	181 (64~ 256)			304 (128~ 512)			
16					304 (128~ 512)			
17		152 (64~ 512)						
18	16 (8 ~ 32)	91 (64~ 256)						
20		128 (32~ 512)						
23		128 (32~ 512)						
25	5 (4 ~ 8)	215 (128~ 512)						

* 幾何平均 ** 范囲

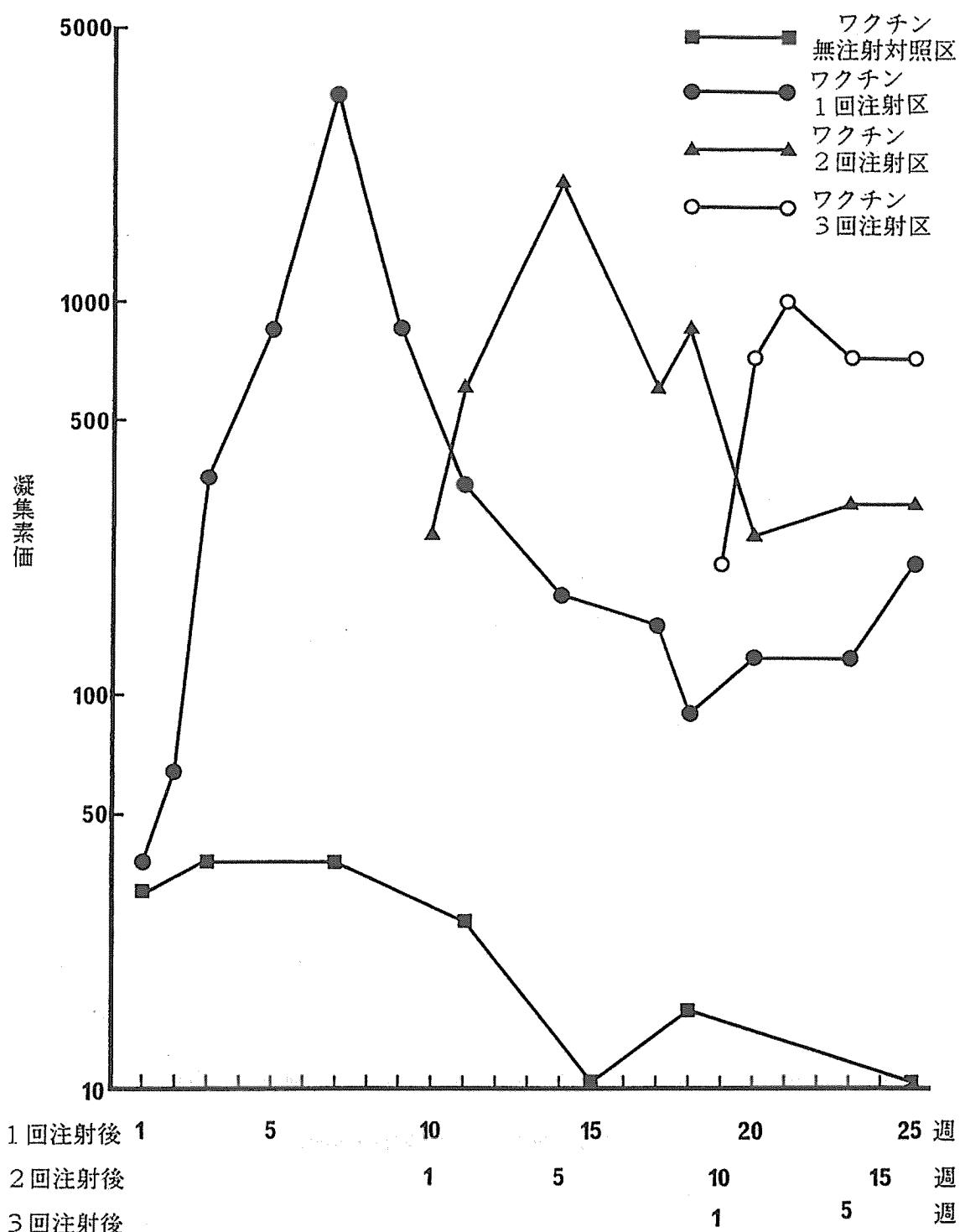


図-19 水温が一定(湧水)飼育池においてせっそう病ワクチンを腹腔内注射後の各試験区アマゴ供試魚血清中の凝集素価の推移

後に最高値の 3,444に達し、その後は徐々に低下したが25週間後でも 215を保った。2回注射区では最終注射 1週間後に 256まで上昇し、5週間後に最高値の 2,048 に達し、その後は徐々に低下したが16週間後でも 304を保った。3回注射区では最終注射 1週間後に 215まで上昇し、3週間後に最高値の 1,024に達し、その後は7週間後にも 724を保った。

攻撃試験によるワクチン注射の効果判定結果は、表-50に示した。攻撃菌濃度 2.9×10^7 CFU/mlでは、ワクチン無注射対照区の斃死率が100 %であったのに対して、ワクチン1回注射区では70%でRPSは30%と算出された。攻撃菌濃度 2.9×10^6 CFU/mlでは、ワクチン無注射対照区の斃死率が70%であったのに対して、ワクチン1回注射区では40%でRPSは43%と算出された。

試験4 飼育魚に継年ワクチン注射した場合の効果

同一養魚場において、毎年、大半の飼育魚に対してワクチン注射を施し、養魚場全体のせっそう病原因菌に対する免疫レベルを向上させて、同病による被害量を減少させる目的で本試験を1971年から1978年にかけて行った。

試験方法

試験場所 岐阜県魚苗生産調査事業・郡上試験地（岐阜県郡上郡大和町）で行った。同試験地は、1970年に開設され、飼育用水として地下水を用いている。アマゴの親魚飼育（1年魚を3月に選別し、9～10月の採卵期まで約7か月間飼育する）は1971年から開始された。

供試魚 表-51に示したように、同試験地で飼育中のアマゴ1年魚（親魚候補）を毎年 3,106尾～ 5,671尾ずつ用いた。

表-50 水温が一定（湧水）飼育池においてせっ
そう病ワクチンを腹腔内注射後の攻撃試
験結果（試験3）

試験区	<u>攻撃菌量</u>		<u>2.9x10⁷ CFU/ml</u>	<u>2.9x10⁶ CFU/ml</u>
	ワクチン	ワクチン	ワクチン	ワクチン
	無注射	1回	無注射	1回
対照区		注射区	対照区	注射区
供試尾数	10尾	10尾	10尾	10尾
斃死率	100%	70%	70%	40%
R P S*		30%		43%

* Relative Percent Survival

ワクチンの調整 本試験では、東京、岐阜、長野、滋賀、新潟、北海道、埼玉、山梨、静岡の各道県で分離された A. salmonicida の 3~4 株を用いて、北海道大学木村研究室、化学及血清療法研究所、北里研究所および日生研 K.K. において調整されたワクチンを用いた。調整方法は、試験 1 とほぼ同様であるが、ワクチン液の湿菌濃度は 2 mg/ml であり、アジュバントは添加されていなかった。

ワクチン注射 表-51に示したように 1972 年から 1978 年にかけて毎年 3 月にワクチン注射を行った。注射方法は試験 2 と同じである。

供試魚の飼育および観察 長方形コンクリート池（長さ 20.0 m × 幅 2.5 m × 水深 1.0 m）4~6 面（一面当たり約 1,000 尾ずつ）に収容し、毎秒約 4 ℥ の地下水を注入して、9~10 月まで飼育した。給餌は 1 日数回マス用市販飼料を手撒きで行い、毎日の斃死状況を記録した。なお、この試験ではせっそう病の自然発病がみられた場合は、SMM（魚体重 1 kg 当り 100 mg を 5 日間投与）、SIZ（100 mg を 5 日間投与）、CP（50 mg <力価> を 5 日間投与）および NA（20 mg を 5 日間投与）などを適宜投与した。

死因の判定 試験 1 と同じである。

試験水温 1971 年から 1978 年までの各月の平均水温は 図-20 に示したとおりで、7.8°C から 18.8°C であった。

試験結果

1971 年から 1978 年までの各年の供試魚の生残率および投薬回数の推移を表-51 および図-21 に示した。この試験地では試験期間中いずれの年もせっそう病の自然発病がみられ、水カビ病、原因不明の脊椎骨異常症なども認められたが、いずれの年も総斃死魚の 80% 以上がせっそう病によるものであった。1971 年にはワクチン注射は行わなかったが、5 月中旬よりせっそう病が発生し、治療投薬を延べ

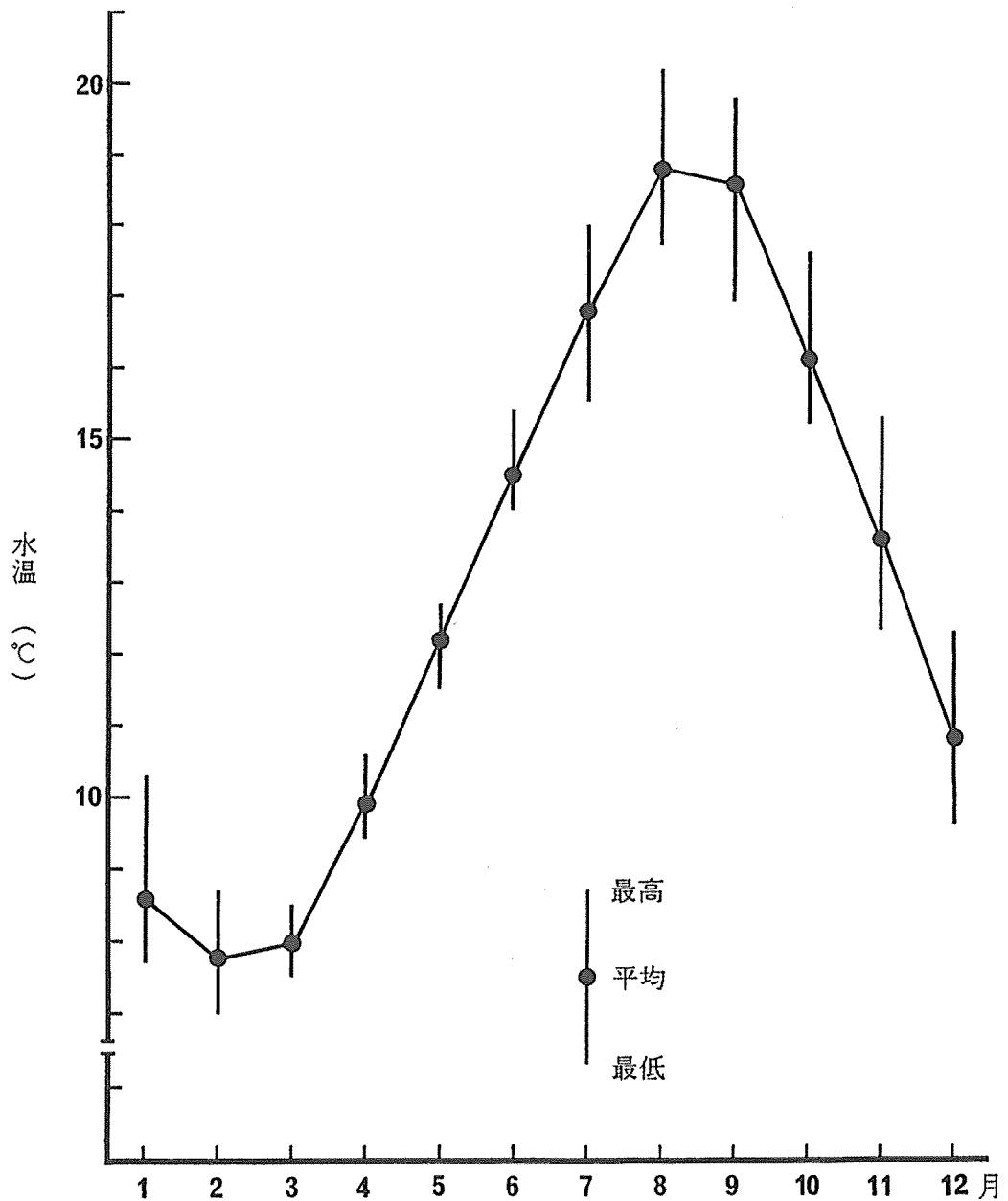


図-20 郡上試験地における、1971年から1978年までの各月の平均飼育水温

表-51 郡上試験地におけるアマゴ親魚飼育経過とせっそう病ワクチン接種実績

年	飼育開始月日	飼育終了月日	開始時尾数	終了時尾数	ワクチン注射尾数
1971	3月31日	9月28日	3,275尾	1,441尾	0尾 (0%) **
1972	3月16日*	9月30日	3,587尾	3,349尾	2,880尾 (80.3%)
1973	3月15日*	9月30日	5,671尾	3,359尾	5,671尾 (100%)
1974	3月15日*	9月30日	4,764尾	3,335尾	4,764尾 (100%)
1975	3月15日*	9月30日	4,410尾	3,714尾	4,410尾 (100%)
1976	3月15日*	10月19日	3,383尾	2,886尾	3,383尾 (100%)
1977	3月14日*	10月21日	4,071尾	3,580尾	4,071尾 (100%)
1978	3月16日*	9月30日	3,106尾	2,882尾	3,106尾 (100%)

* ワクチン注射日

** 全尾数に対する割合

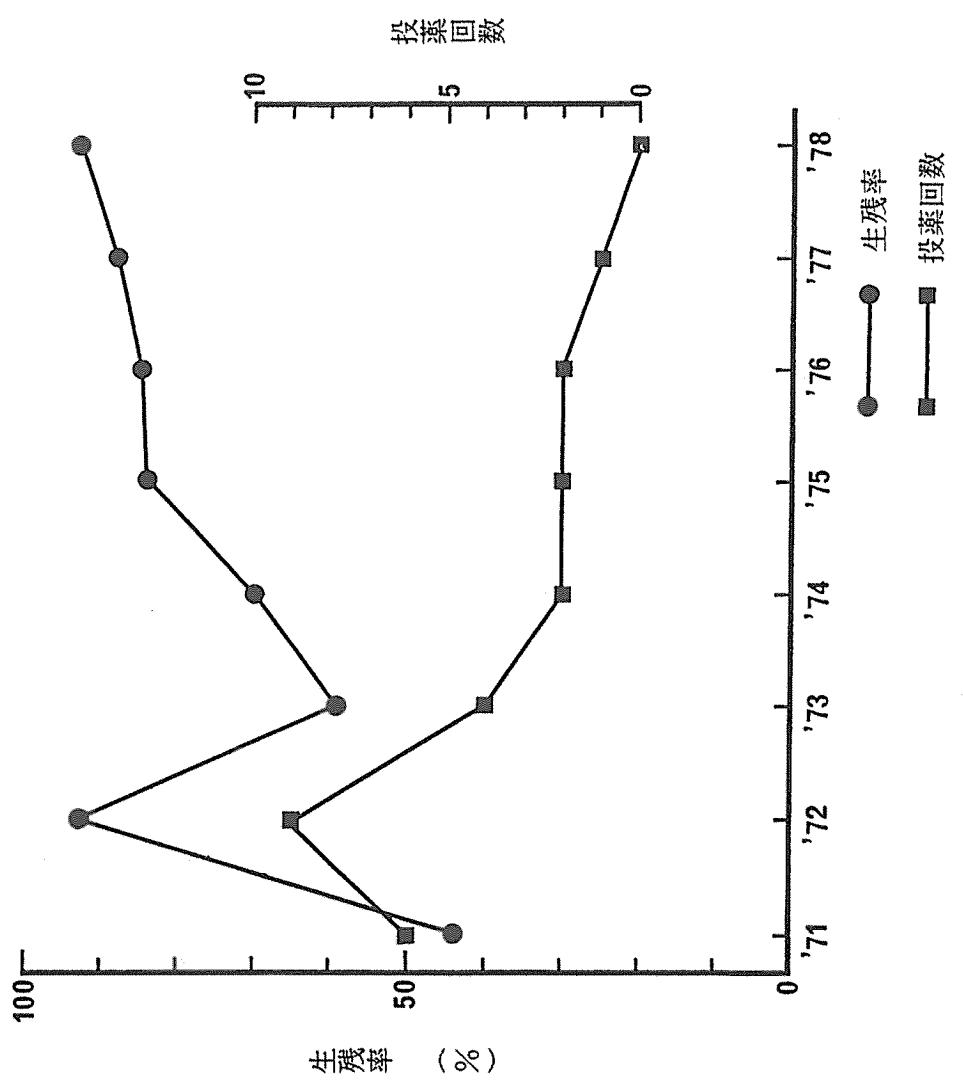


図-21 郡上試験地における親魚候補アマゴにせっそう病ワクチンを腹腔内に経年注射した場合の各年間の生残率とせっそう病治療薬投薬回数の推移

6回（飼育池1面に対する1回の投薬を延べ1回とした。）行い、9月末の生残率は44.0%であった。1972年は親魚候補供試魚の80.3%にワクチン注射を行い、せっそう病の発病初期に延べ8回の投薬を行ったが、9月末の生残率は93.4%であった。1973年以降は毎年全数の親魚候補供試魚にワクチン注射を行ったが、やはりせっそう病の発生はみられた。しかし1973年から1978年までの年別の秋期の試験終了時の生残率はそれぞれ59.2%、70.0%、84.2%、85.3%、87.9%および92.8%と年を追う毎に上昇し、一方、延べ投薬回数はそれぞれ4回、2回、2回、2回、1回および0回と減少した。

考 察

HARA *et al.* (1976) は、A. salmonicidaのホルマリン不活化菌体を、ヤマメに湿菌重量で1尾当たり 0.1mg腹腔内注射することによって、せっそう病による減耗を低下させ得ることを明らかにした。本節では、HARA *et al.* (1976) によって実験的にその有効性が明らかにされたせっそう病のワクチン腹腔内注射法の実用化に関する検討を行った。

試験1および2では、河川水を使用している養魚池において、それぞれ3および4種類のせっそう病ワクチンをアマゴの親魚候補供試魚に注射し、約8か月間のせっそう病発生状況および供試魚血清中の凝集素価の変動を調べた。各ワクチン注射区の生残率は、生理食塩水注射対照区に比して 9.0~24.5%高く、生残率の差を χ^2 法によって検定すると、生理食塩水注射対照区に対して各ワクチン注射区とも有意に生残率が高く（有意水準95%）、明らかにワクチン注射によるせっそう病の予防効果が認められた。アマゴの池中養殖における、せっそう病による年間の斃死率は、通常30%前後であり、以上のようにアマゴの親魚候補飼育に

おいて約8か月間の飼育期間の生残率を10%以上向上させ得たことは、産業的に大きな意味があるものと考えられる。しかし、RPSは7例中5例が50%以下と比較的低く、今後はワクチンの有効性をより向上させる必要があると考えられる。

同時に測定した供試魚血清中の凝集素価については、各ワクチン注射区とも生理食塩水注射対照区に比して顕著な上昇が認められた。またワクチンの調整法に関しては、抗原菌株の相違とは無関係にアジュバント添加ワクチン注射区の上昇が著しく、明らかなアジュバント添加の効果が認められた。ところで川津（1968）は抗体形成の適温は、マス類では10～15℃であるとしている。本節の試験でもこの見解を裏づける結果が得られている。すなわち、各ワクチン注射区の供試魚の凝集素価は、これらの試験で供試魚の飼育水温が5～7℃であったワクチン注射後の2か月間は上昇がみられておらず、10℃以上に上昇した4月下旬から上昇はじめている。なお、生理食塩水注射対照区においても、5月～6月に 128～256 の凝集素価を示す供試魚が出現したが、これは木村（1970）がカラフトマスのA. salmonicida subsp. masoucida 感染症の自然発病において、発病中および発病直後の魚の血清凝集素価が上昇したと報告しているように、本試験区の供試魚にも前述のようにせっそう病の自然発病がみられたことによる凝集素価の上昇であると考えられる。凝集素価の上昇とワクチン効果との関連については、凝集素価の顕著な上昇が認められた各ワクチン注射区で明らかな予防免疫効果がみられたことから、相関が推察されるものの、アジュバント添加ワクチン注射区と無添加区で、凝集素価の上昇に著しい相違がみられたにもかかわらず、予防免疫効果にはそれほどの差は認められなかったことから、凝集素価が一定のレベルに達すれば、充分ワクチンの効果が発現されるものと考えられた。

試験3では、湧水を用いて飼育水温を一定とした飼育池における1回および繰返しワクチン注射の効果を検討した。各ワクチン注射区の供試魚血清凝集素価が

最高に達したワクチン最終注射後の週数は、ワクチン1回注射区では7週間（最高 3,444）、2回注射区では5週間（2,048）、3回注射区では3週間（1,024）であり、ワクチン注射を数回行うことによって、ワクチン最終注射から凝集素価が最高になるまでの時間は短くはあるが、必ずしも凝集素価は高くなるとは限らないことが明らかになった。なお凝集素価の最高価は河川水飼育供試魚では339、湧水飼育供試魚では3,444で大差がみられた。また、凝集素価の持続期間も、河川水飼育供試魚では、最高価に達した後2～3週間程度より持続しなかったが、湧水飼育供試魚では、最高価に達した後18週間以上高い価が持続した。以上の事実から、水温が一定（10.5°C）な飼育条件では、水温が変動する河川水飼育の供試魚と比較すると、凝集素価の上昇が速やか（飼育水温が10°C以上になってからの速度は変わらない）で、その最高価も高く、持続期間も長いと考えられた。

KRANTZ et al. (1964a) は、水温11°CにおいてA. salmonicidaのホルマリン死菌をブラウンマスに接種すると、3か月後に凝集素価が最高の160に達し、その後2か月で低下したと報告しているが、同様の水温条件下で行った本節の実験に比し、凝集素価の上昇速度が遅く、最高価も低く、持続期間もかなり短いように思われる。

湧水飼育試験では、供試魚にせっそう病の自然発病がみられなかつたので、ワクチン1回注射区について、血清凝集素価が最高に達したワクチン注射45日後に、A. salmonicidaの攻撃によるワクチン効果の判定を行つたが、RPSは30～43%と算出され、FISHERの直接確率計算法（伝染病研究所学友会 1958）によって検定したところいずれもワクチン無注射対照群と有意な差が認められず（有意水準95%）、前にも指摘したように、本ワクチンの有効性が充分高くなかったことを示していると考えられた。

試験4では、同一養魚場において数年間大多数の飼育魚にワクチンを注射して、

養魚場全体のせっそう病に対する免疫レベルを向上させて、同病による被害を減少させ得るか否かを検討した。その結果同養魚場における年間の生残率が徐々に向上し、せっそう病の治療のための投薬回数も年々減少し、初期の目的通りの成果を得ることができた。同様な例は、東京水試奥多摩分場、岐阜水試および北海道さけ・ますふ化場北見支場渚滑蓄養場でも認められている（全国湖沼河川養殖研究会・せっそう病研究部会 1979）。

以上、本節ではせっそう病のワクチン腹腔内注射の実用化に関する検討を行い、河川水飼育池および水温が一定な飼育池におけるワクチン効果、継年注射による効果を明らかにしてきたが、今後は使用抗原の検討等、基礎的な問題点を解決することによって、より有効性の高いワクチンを開発する必要があると考えられた。

第2節 経口免疫

前節では、アマゴに対するせっそう病のワクチン腹腔内注射の実用化についての検討を行った。しかしアマゴ0年魚については、一般的に飼育尾数が多いことおよび未だ魚体が小さいことから、ワクチンの腹腔内注射は実用上困難であると考えられ、ワクチンの腹腔内注射以外のルートによる免疫賦与を考える必要がある。そこで本節では、従来、一応経口ワクチンの有効性が否定されている（SNIESZKO and FRIDDLE 1949、SPENCE *et al.* 1965）が、前節で腹腔内注射によってワクチン有効性が認められたホルマリン死菌ワクチンと加熱死菌ワクチンの経口投与および、KLONTZ and ANDERSON (1970)に準じた超音波処理菌体の経口投与を行い、せっそう病の経口免疫の可能性を検討した。

試験1 ホルマリン死菌および加熱死菌ワクチンの経口投与による予防免疫効果

試験方法

試験区 ワクチン無投与対照区、ホルマリン死菌ワクチン投与区および加熱死菌ワクチン投与区の3試験区を設けた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中の餌付け開始約100日後の平均体重0.52gのアマゴ0年魚を各区8,500尾ずつ用いた。

ワクチンの調整 *A. salmonicida* T69株（第1節、試験1参照）を、アマゴを用いて2回魚体通過を行った後、ブイヨン培地（ニッスイ）で25°C・48時間振盪培養し、遠心分離をして集菌した後、滅菌生理食塩水に懸濁させ、ホルマリンを0.5%添加し、37°Cに48時間保ち不活化を行ったものをホルマリン不活化ワクチンとした。加熱死菌ワクチンは、同上の生菌懸濁液を100°C・30分間加熱不

活化して調整した。

ワクチン投与 1970年3月29日から5月1日までの間に、10日間ずつ3期に分けて行った。すなわち両ワクチン区とも、第Ⅰ期（3月29日～4月7日）には、*A. salmonicida*の湿菌重量として供試魚1尾・1日当り約14mcgを、第Ⅱ期（4月10日～4月19日）には、同じく約50mcgを、第Ⅲ期（4月22日～5月1日）には、同じく約86mcgを投与した。投与方法は、マス用餌付粉末飼料に養魚用オイルを約5%、水を約30%および所定の投与菌量になるように調整したワクチン液を約15%加えて、チョッパーを用いてクランブル状に成型し、手撒きで投与した。ワクチン投与中の給餌率は、3.0～3.5%とした。無投与対照区には、マス用配合飼料を上記のワクチン区と同量投与した。なお、ワクチン投与中は、各区毎に供試魚を屋内に設置した木製水槽（長さ1.7m×幅0.5m×水深0.5m）を用いて、毎秒約0.2lの地下水を注入して飼育した。

供試魚の飼育および観察 ワクチン投与終了直後に、各区毎に屋外の長方形コンクリート池（長さ3.9m×幅1.3m×水深0.5m）に移収し、毎秒約1lの河川水を注入して6月下旬まで飼育した。給餌は1日数回マス用市販飼料を手撒きで行い、毎日の斃死状況を記録した。なお、せっそう病の自然発病がみられても、薬剤による治療は一切行わなかった。

死因の判定 第1節、試験1と同じである。

凝集素価の測定 ワクチン最終投与終了56日後の6月26日および同68日後の7月8日に、各区の供試魚10尾ずつの血清のプール試料について*A. salmonicida*に対する凝集素価を測定した。測定方法は第1節、試験1と同じである。

試験水温 地下水でのワクチン投与飼育期間中は5.1～9.4°C、ワクチン投与後の河川水での飼育期間中は9.5～18.5°Cであった。

試験結果

各試験区の供試魚の斃死状況および供試魚血清中の凝集素価測定結果を表-52に示した。ワクチン無投与対照区およびホルマリン死菌ワクチン投与区では6月中旬から、加熱死菌ワクチン投与区では6月上旬からせっそう病の自然発生がみられた。しかし、6月下旬から各試験区とも、カラムナリス病が併発したので、斃死状況の記録は6月中旬までとした。この間のせっそう病による斃死尾数は、ワクチン無投与対照区では53尾（せっそう病による斃死率；0.62%）、ホルマリン死菌ワクチン投与区では38尾（0.45%）、加熱死菌ワクチン投与区では584尾（6.87%）、であった。

供試魚血清中のA. salmonicidaに対する凝集素価は、ワクチン最終投与終了56日後の6月26日には、ワクチン無投与対照区が64であったのに対して両ワクチン区ではいずれも128であり、68日後の7月8日には、ワクチン無投与対照区が64であったのに対して両ワクチン区では32であった。

試験2 超音波処理菌体経口ワクチンの投与効果（1）

試験方法

試験区 ワクチン無投与対照区、ワクチン投与区-1およびワクチン投与区-2の3試験区を設けた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中の、餌付け開始時の平均体重約0.1gのアマゴ0年魚を各試験区約5,000尾ずつ用いた。

ワクチンの調整 本試験に供試した超音波処理菌体ワクチンは化学及血清療法研究所で調整されたものを用いた。ワクチンは、KLONTZ(1970)の報告に準じ、東京、長野、岐阜および滋賀の各地で1972年にせっそう病の自然発病魚から

表-52 せっそう病の経口ワクチンを投与したアマゴにおける予防免疫効果（試験1）

	ワクチン 無投与対照区	加熱死菌ワク チン投与区	ホルマリン死菌 ワクチン投与区
放養尾数（3月29日）	8,500尾	8,500尾	8,500尾
斃死尾数	84尾	711尾	60尾
せっそう病による斃死率	0.62%	6.87%	0.45%
供試魚血中の凝集素価			
投与終了後56日目	64	128	128
投与終了後68日目	64	32	32

分離された、A. salmonicida菌株の48時間培養菌体を等量混合して、超音波で破壊し、その遠心沈澱上清を凍結乾燥したものである。

ワクチン投与 供試魚に餌付け開始と同時に投与を開始した。すなわち、1973年1月27日から2月10日まで15日間連続投与した後、5月19日まで1週間毎に15回、合計30回の投与を行った。ワクチンの投与量はワクチン投与区-1では、1日・1尾当たり湿菌重量に換算して150mcg、ワクチン投与区-2では、同じく300mcgとした。ワクチンを無菌水で溶解し、マス用市販飼料（クランブル）に吸着させ軽く乾燥させた後、手撒きで投与した。

供試魚の飼育および観察 ワクチン投与中および投与12日後（5月31日）までは、各試験区毎に供試魚を屋内に設置した木製水槽（長さ 1.7m×幅 0.5m ×水深 0.3m）を用いて、毎秒約 0.2ℓ の地下水を注入して飼育した。6月1日に、各試験区毎に供試魚尾数を計数した後、屋外の長方形コンクリート池（長さ 3.9 m×幅 1.3m×水深 0.5m）に移収し、毎秒約 1ℓ の河川水を注入して8月20日まで飼育した。ワクチン投与後の給餌は1日数回マス用市販飼料を手撒きを行い、毎日の斃死状況を記録した。なお、せっそう病の自然発病がみられても、薬剤投与による治療は一切行わなかった。

死因の判定 第1節、試験1と同じである。

試験水温 図-22に示したように、ワクチン投与中の地下水での飼育期間中は 3.7~15.1°C、ワクチン投与終了後の河川水での飼育期間中は 12.0~25.0°C であった。

凝集素価の測定 ワクチン最終投与終了62日後の7月20日に、各試験区の供試魚10尾ずつの血清のプール試料についてA. salmonicidaに対する凝集素価を測定した。測定方法は第1節、実験1と同じである。

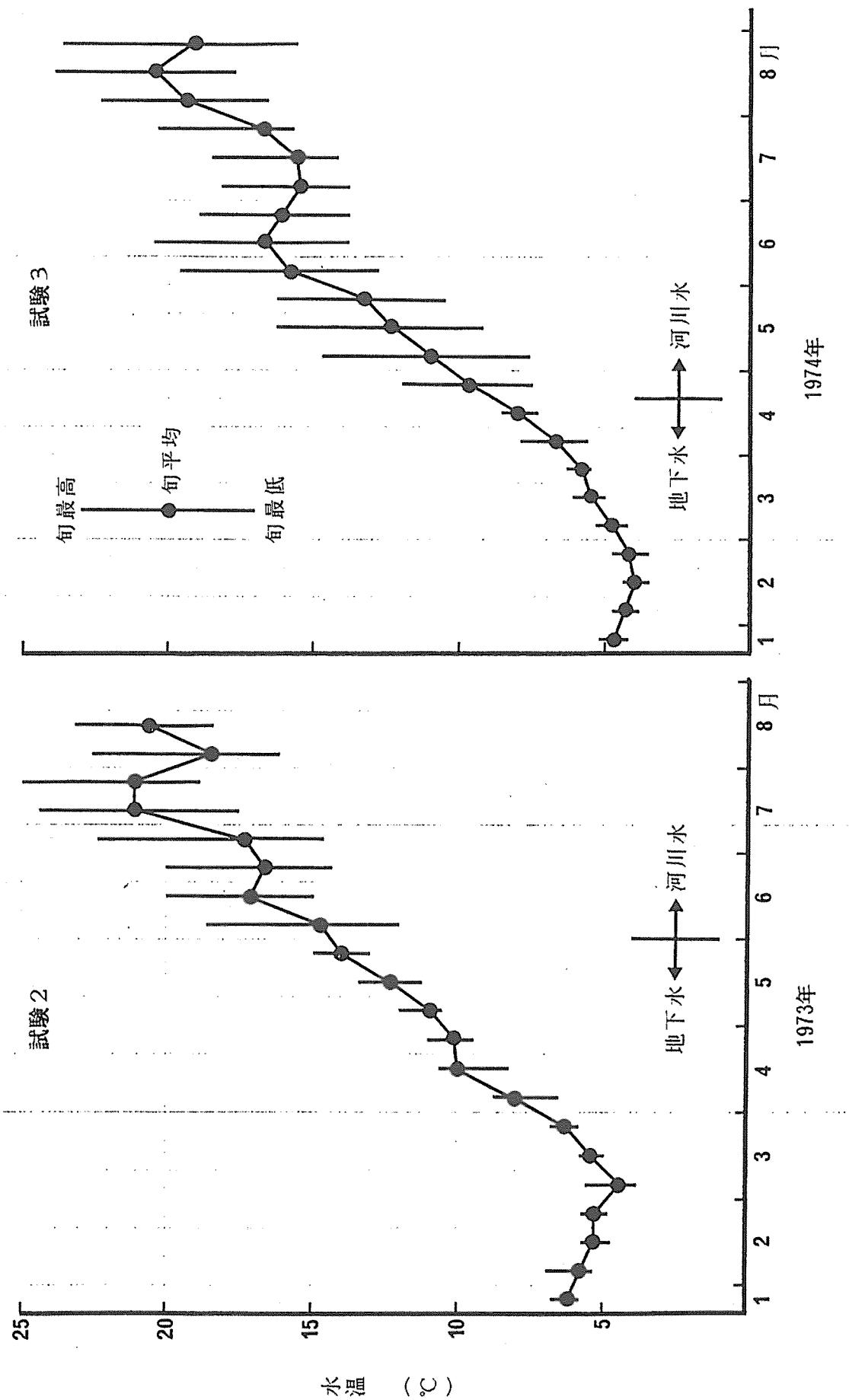


図-22 アマゴに対するセツソウ病経口ワクチン投与試験(2および試験3)
の供試魚飼育水温(試験2および試験3)

試験結果

ワクチン投与中および投与12日後までの屋内池での飼育中は、いずれの試験区の供試魚にもせっそう病の自然発生は認められず、他の原因による斃死尾数も僅かであった。せっそう病の自然発生は図-23に示したように、各試験区いずれにおいても6月上旬より始まり、ワクチン無投与対照区では6月中旬から病勢が悪化し、6月下旬をピークとして7月下旬までせっそう病による斃死率が高かったのに対し、いずれのワクチン投与区も散発的な発病斃死魚よりみられなかつた。各試験区の供試魚の生残率およびせっそう病による斃死率は、図-24および表-53に示したように最終的には、ワクチン無投与対照区ではそれぞれ67.2%および16.0%であったのに対して、ワクチン投与区-1では90.5%および1.6%、ワクチン投与区-2では92.1%および1.0%であり、RPSはワクチン投与区-1で71%（せっそう病斃死率では90%）、ワクチン投与区-2で76%（同94%）と算出された。

供試魚血清中のA. salmonicidaに対する凝集素価は、ワクチン最終投与終了62日後の7月20日には、各試験区とも32であった。

試験3 超音波処理菌体経口ワクチンの投与効果（2）

試験2を実施した翌年に、その追試を行った。

試験方法

試験区 ワクチン無投与対照区、ワクチン投与区-1およびワクチン投与区-2の3試験区を設けた。

供試魚 試験2と同じである。

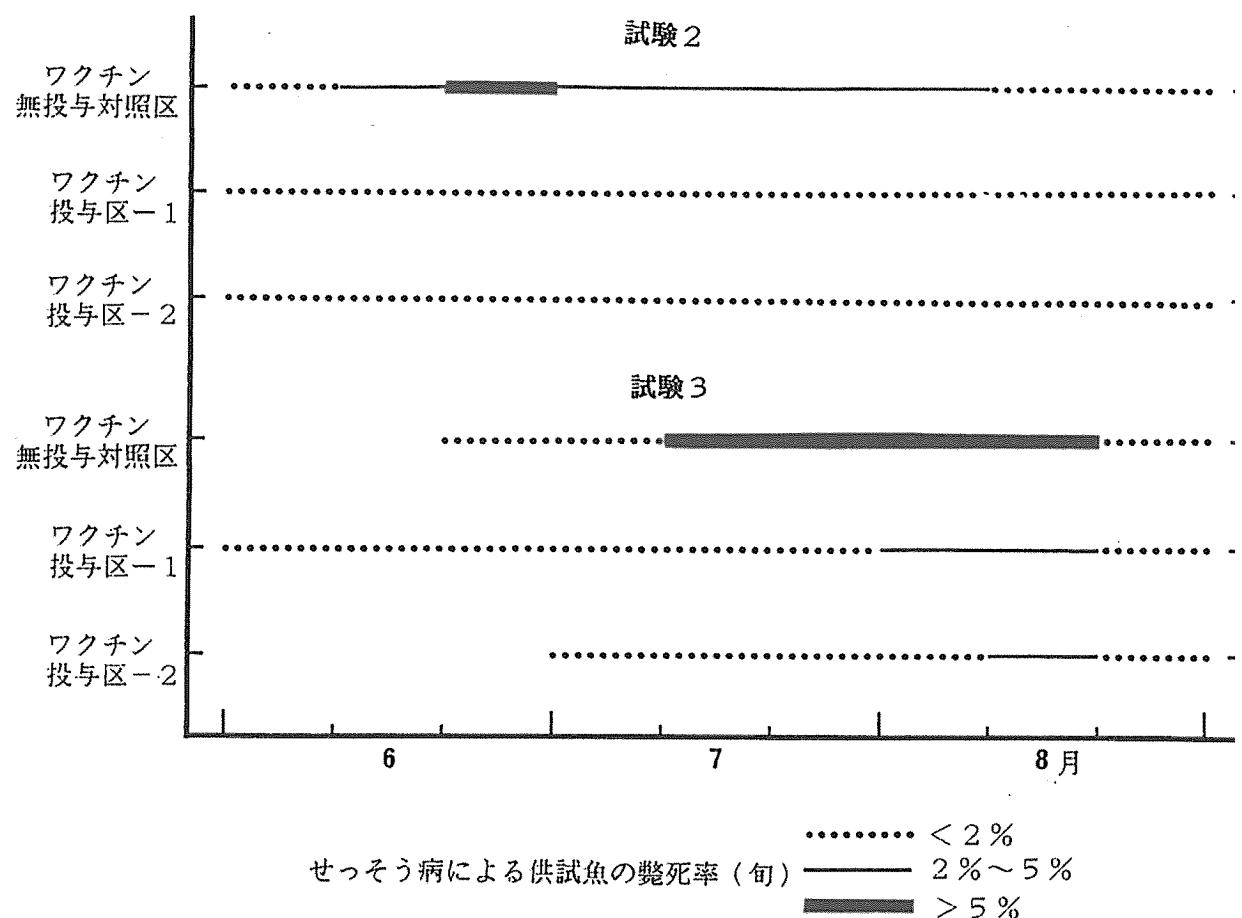


図-23 超音波処理菌体せっそう病経口ワクチン投与後のアマゴにおけるせっそう病の発生状況（試験2および試験3）

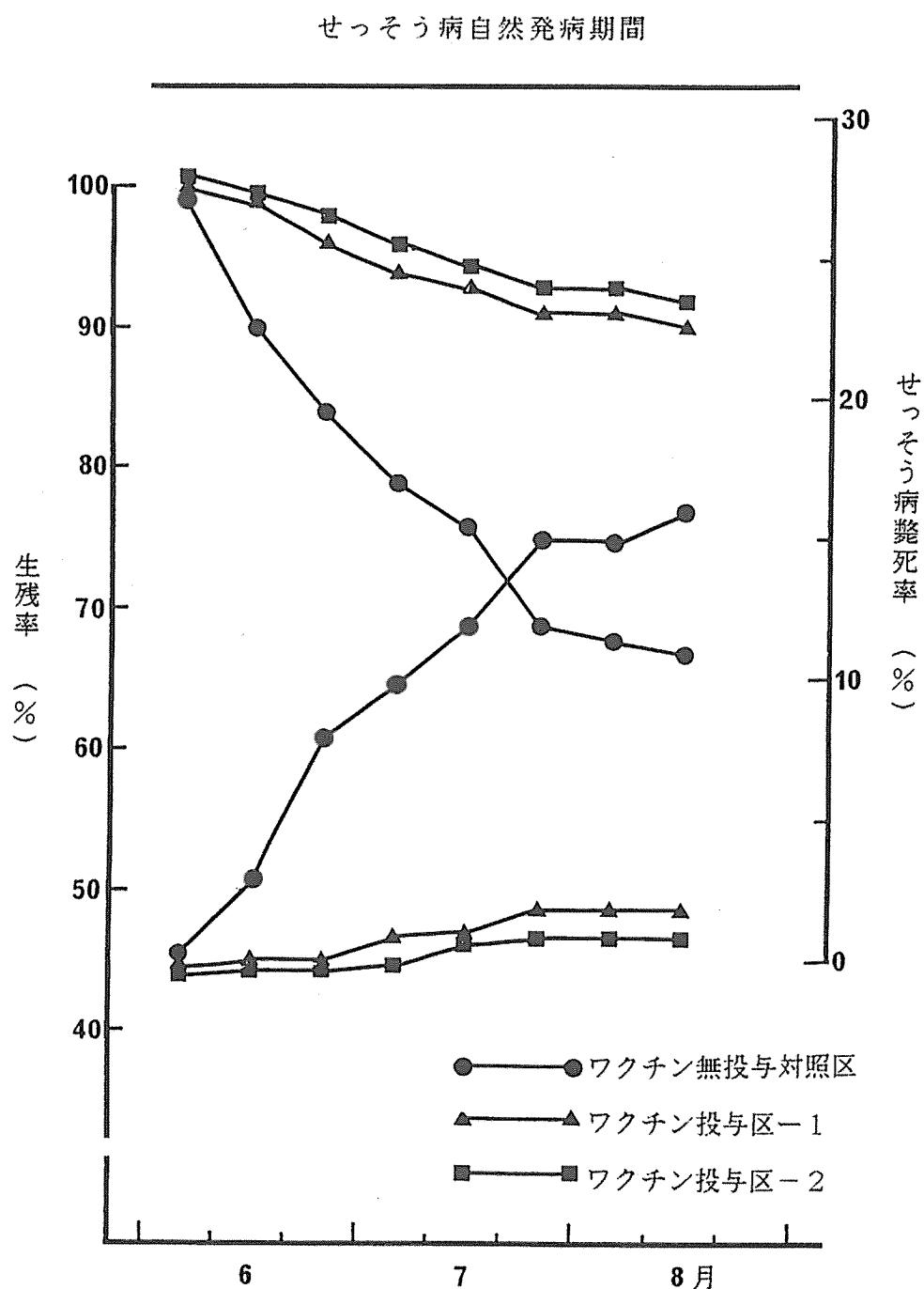


図-24 超音波処理菌体せっそう病経口ワクチン投与後のアマゴ供試魚の旬間生残率およびせっそう病による斃死率の推移（試験2）

表-53 せっそう病の経口ワクチンを投与したアマゴにおける予防免疫効果（試験2）

	ワクチン 無投与対照区	ワクチン 投与区-1	ワクチン 投与区-2
放養尾数（6月1日）	4,310尾	4,360尾	4,390尾
生残尾数（8月20日）	2,898尾	3,946尾	4,044尾
生残率（%）	67.2%	90.5%	92.1%
斃死尾数	1,277尾	364尾	304尾
原因内訳	せっそう病 水カビ病 不明	689尾 350尾 238尾	68尾 128尾 168尾
せっそう病による斃死率（%）	16.0%	1.6%	1.0%
不明減耗尾数	135尾	50尾	42尾
供試魚血清中の凝集素価	32	32	32

ワクチンの調整 試験2と同じである。

ワクチン投与 餌付け開始と同時に投与を開始した。すなわち、1974年1月25日から2月14日まで21日間連続投与した後、7月1日まで1週間毎に39回、合計60回の投与を行った。ワクチンの投与量は、いずれのワクチン投与区とも1日・1尾当たり湿菌重量として150mcgとした。投与方法は、試験2と同じである。

供試魚の飼育および観察 ワクチン投与中の4月18日までは、各試験区毎に供試魚を屋内に設置した木製水槽（長さ 1.7m × 幅 0.5m × 水深 0.3m）を用いて、毎秒約 0.2l の地下水を注入して飼育した。4月19日に、各試験区毎に供試魚尾数を計数した後、屋外の長方形コンクリート池（長さ 3.9m × 幅 1.3m × 水深 0.5m）に移収し、毎秒約 1l の河川水を注入して8月25日まで飼育した。ワクチン投与後の給餌は1日数回マス用市販飼料を手撒きで行い、毎日の斃死状況を記録した。なお、せっそう病の自然発病がみられても、薬剤による治療は一切行わなかった。

死因の判定 第1節、試験1と同じである。

試験水温 図-22示したように、地下水での飼育期間中は 3.5~8.6 °C、河川水での飼育期間中は 7.7~24.0°C であった。

試験結果

ワクチン投与中の4月18日までの屋内池での飼育中は、いずれの供試魚にもせっそう病の自然発病は認められず斃死尾数は僅かであった。せっそう病の自然発生は図-23に示したように、ワクチン無投与対照区で6月下旬より供試魚の斃死が始まり、7月中旬～8月中旬に高い斃死率を示した。ワクチン投与区-1では、6月上旬よりせっそう病による斃死が始まり、8月上旬～中旬に若干斃死率が高くなつたが、他の時期の斃死は散発的であった。ワクチン投与区-2では、7月

上旬よりせっそう病による斃死が始まったが、8月中旬にやや斃死率が高くなつたのみで、他の時期のせっそう病による斃死は散発的であった。各試験区の供試魚の生残率およびせっそう病による斃死率は、図-25および表-54に示したように、ワクチン無投与対照区ではそれぞれ62.9%および26.9%であったのに対して、ワクチン投与区-1では83.4%および6.4%、ワクチン投与区-2では84.3%および4.5%であり、RPSはワクチン投与区-1で55%（せっそう病斃死率では76%）、ワクチン投与区-2で58%（同83%）と算出された。

考 察

せっそう病に対する経口免疫についての既往の研究には、有効性の認められるとするものと認められないとするものとがみられる。最初の有効例はDUFF(1942)によるクロロホルム死菌の経口投与に関する報告である。それによればワクチン投与区の供試魚血清中に対照区に比し高いA. salmonicidaに対する凝集素価を認め、また同菌による攻撃実験でもワクチン投与区のせっそう病による斃死率が対照区のそれより低く、ワクチン効果が認められるとしている。しかし、KRANTZ et al. (1964b) は、上記DUFF (1942) の研究の追試を行うとともにワクチンとして生菌の投与を試みたが、いずれのワクチン投与区も供試魚血清中には凝集素価の上昇は認められなかったとしている。また、SNIESZKO and FRIDDLE (1949) は加熱死菌ワクチン、SPENCE et al. (1965) はホルマリン死菌ワクチンの経口投与を試みたが、いずれもその有効性を認めていない。一方、KLONTZ and ANDERSON (1970)は、超音波処理をしたA. salmonicida菌体 (Hagerman strain) の水溶性成分からの明礬沈澱抗原 (Furunculosis Soluble Antigen、以下FSAとする)

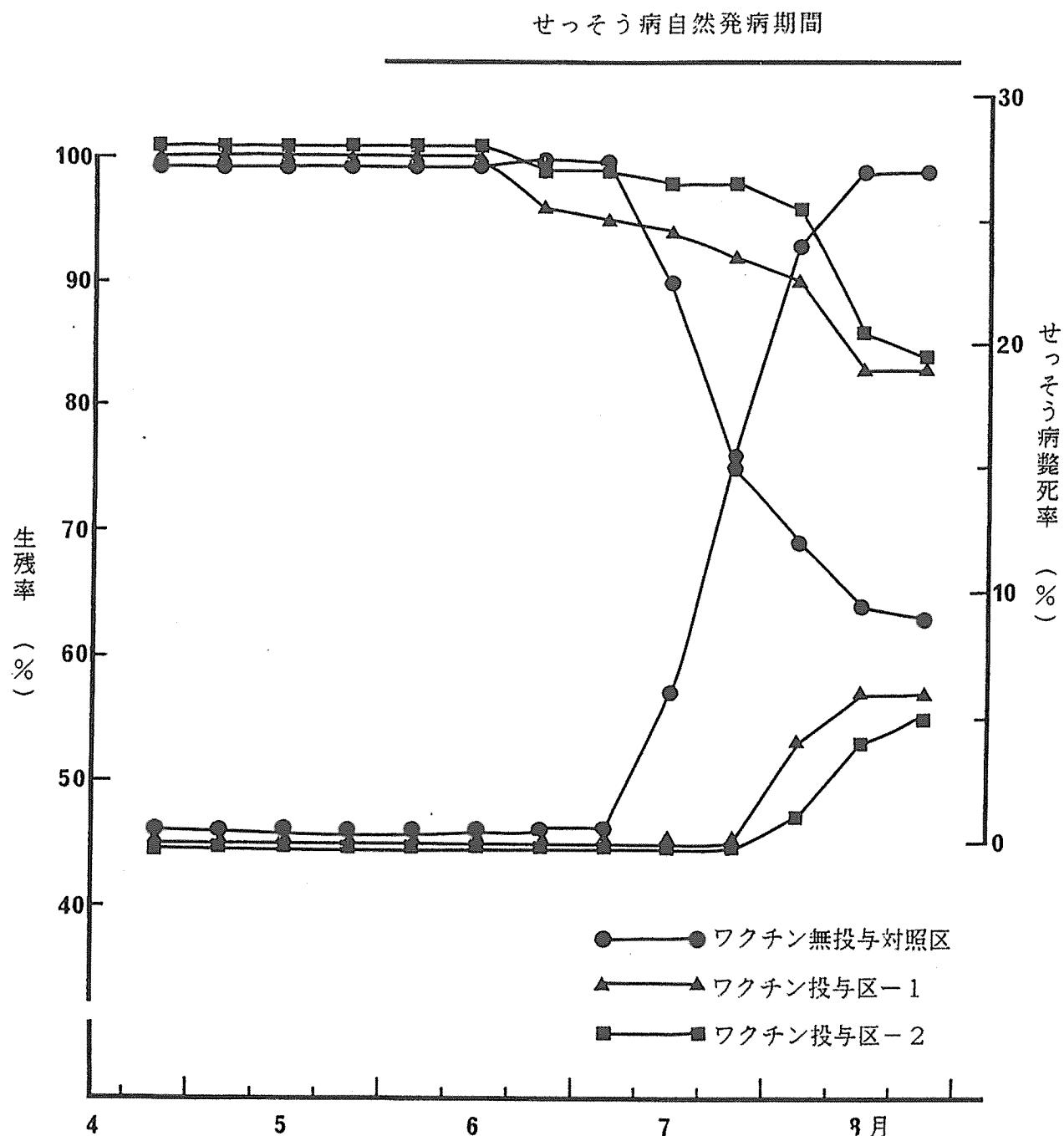


図-25 超音波処理菌体せっそう病経口ワクチン投与後のアマゴ供試魚の旬間生残率およびせっそう病による斃死率の推移（試験3）

表-54 せっそう病の経口ワクチンを投与したアマゴに
おける予防免疫効果（試験3）

	ワクチン 無投与対照区	ワクチン 投与区-1	ワクチン 投与区-2
放養尾数（4月19日）	4,750尾	4,750尾	4,750尾
生残尾数（8月25日）	2,990尾	3,962尾	4,002尾
生残率（%）	62.9%	83.4%	84.3%
斃死尾数	1,579尾	713尾	683尾
原因内訳	せっそう病 水カビ病 不明	1,277尾 108尾 194尾	302尾 133尾 278尾
せっそう病による斃死率（%）	26.9%	6.4%	4.5%
不明減耗尾数	181尾	75尾	65尾

を調整し、これをワクチンとしてカワマスに1尾当たり 60mcgを25回経口投与したところ、蛍光抗体法により明らかに A. salmonicidaに対する抗体が検出され、その後のせっそう病自然発生による斃死率も、対照区が58%であったのに対してワクチン投与区は0%と著しい効果を認めている。また、OVERHOLSER (1968) は、F S A (Siletz strain) ワクチンをギンザケに1尾当たり 160~380mcgを20~30回経口投与しその有効性を認めている。上記2例は、供試尾数が 100~150 尾と実験室レベルのものであったが、KLONTZ and ANDERSON (1970)は、360,000 尾のギンザケに F S A (Hagerman strain) ワクチンを1尾当たり 33mcg、16回経口投与した場合、せっそう病自然発生による斃死率は、対照区が11.4%であったのに対してワクチン投与区は 5.6%とやや低い結果を得ている。さらに、KLONTZ and ANDERSON (1970) は、3か所のふ化場において、商品化された F S A (Issaquah strain) ワクチンと加熱死菌 (Quilcene strain) ワクチンを、 200,000~1,160,000 尾のギンザケに1尾当たり 150mcgを15回経口投与したが、せっそう病自然発生による斃死率は、いずれのワクチン投与区も対照区と差がなかったとしている。これらの一連の実験において、実験室レベルでは著効が得られているのに、ふ化場レベルの大規模な実験では充分な効果が認められなかつた理由として、KLONTZ and ANDERSON (1970)は、供試した A. salmonicida の strain 間の血清学的な差異ならびに、商品化された F S A ワクチンが、経口投与では魚体内抗体形成部位へ充分量到達し得ないためではないかと推察している。

本節の試験でも同様の傾向が認められ、試験1では、加熱死菌およびホルマリン死菌ワクチンを供試魚に経口投与したが、各試験区にせっそう病の自然発病がみられ、各ワクチン投与区も無投与対照区とほぼ同程度もしくはそれ以上のせっそう病による斃死があり、また血清中凝集素価の上昇も認められず、明瞭なワクチンの経口投与効果は認められなかつた。なお、東京水試奥多摩分場において、

ヤマメ0年魚を用いて本試験と同時期に同様の方法で行われた経口ワクチン投与試験でも、ワクチンの予防効果は認められなかつたと報告されている（東京水試1971）。

試験2および3では、A. salmonicida菌体を超音波処理し、その遠心沈澱上清をワクチンとして経口投与したが、いずれの試験においても著しい経口ワクチンの予防免疫効果が認められた。ところでこれらの試験では、春期から夏期にかけての養殖アマゴにおける通常のせっそう病自然発病期における生残率を、ワクチン有効性の判定の根拠とした。そのような方法によってワクチンの有効性を判定することは、最も妥当な方法であると思われるが、実際にはワクチン無投与対照区とワクチン投与区の飼育環境等を完全に同一にすることは不可能に近い。そのためこれらの試験では結果の信頼性を高めるために、試験2では、投与量の異なるワクチン投与区を2区設け、試験3では同一投与量のワクチン投与区を2区設けたが、各ワクチン投与区いずれも同程度の高い予防効果を示したので、得られた実験結果の信頼性は高いと考えられる。本節の試験ではワクチン無投与対照区とワクチン投与区との生残率の差は21～25%もあったが、アマゴ0年魚の池中養殖での春期から秋期までの歩留りは通常70%前後であるので、このように生残率を20%以上向上させ得ることは、産業的には大きな意味があるものと思われる。

供試魚血清中のA. salmonicidaに対する凝集素価については前述したように DUFF (1942) はワクチンの経口投与区が対照区よりも高かったとしているが、本節の試験では上昇は認められなかつた。またKRANTZ et al. (1964b) も、凝集素価の上昇は認められなかつたとしており、本節の試験で認められた経口ワクチンの効果は、液性免疫によるものではないのではないかと思われた。抗原の投与量との関連については、本節の試験では1尾当たり湿菌重量として 150mcg および 300mcg／尾／日のいずれの経口投与でもほぼ同程度に有効であったが、KLONTZ

and ANDERSON (1970) やOVERHOLSER (1968) らの報告にみられるように 33 ~ 60 mcg / 尾 / 日のきわめて少ない投与量での有効例もあり、投与量を今後更に減少させ得る可能性があると考えられた。投与回数については、本節の試験では30回および60回の投与を行って比較したが、いずれも同程度に有効であった。経口ワクチンの実用化に際して、投与量および投与回数を減少させることは、実用上の意味が大きいと考えられ、今後の詳細な検討が必要であろう。

第3節 浸漬免疫

前節では、一般に飼育尾数が多く魚体が小さいことから実用上ワクチンの腹腔内注射が困難と考えられるアマゴの0年魚について、ワクチンの経口投与によるせっそう病の予防免疫の可能性について検討した。本節では同様の目的で、その様な飼育魚に対する免疫賦与の方法として、近年多くの研究者により試みられている（PALMER and SMITH 1980, SMITH et al. 1980, JOHNSON and AMENDO 1984）、A. salmonicidaのホルマリン不活化菌体の懸濁液を用いる浸漬免疫の応用の可能性を検討した。なお本試験では、従来から行われている高張液による前処理は必ずしも必要ではないことが明らかにされている（GOULD et al. 1979）ので、直接浸漬法によった。

試験1 ブイヨン培地（ニッスイ）で培養した、A. salmonicidaホルマリン不活化菌体の懸濁液による浸漬免疫の効果

試験方法

試験区 無処理対照区および浸漬ワクチン処理区の2試験区を設けた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中の平均体重0.57gのアマゴ0年魚を各区2,000尾ずつ用いた。

ワクチンの調整 A. salmonicida T69株（第1節、試験1参照）を、アマゴを用いて2回魚体通過を行った後、ブイヨン培地（ニッスイ）で25°C・48時間振盪培養し、遠心分離をして集菌した後、湿菌重量として4.2mg/mlとなるように滅菌生理食塩水に懸濁させホルマリンを0.5%添加し、37°Cに48時間保って不活化を行ったものをワクチン液とした。

ワクチン浸漬処理 1971年4月7日、10日、14日、17日、22日、25日、28

日の合計7回同供試魚に繰返し浸漬処理を行った。処理方法は、190 lの供試魚飼育水中にワクチン液を1l添加し、1時間注水を止めることによった。従って、処理時のワクチン液湿菌重量は、22.1mcg/mlとなった。

供試魚の飼育および観察 1971年4月5日より5月8日までは、屋内に設置した木製水槽（長さ0.98m×幅0.45m×水深0.43m）に供試魚を収容し、毎秒約0.05 lの地下水を注入した。5月9日以降は、屋外のコンクリート池（長さ1.8 m×幅1.3m×水深0.5m）に移収し、毎秒約0.5lの河川水を注入した。給餌は1日数回マス用市販飼料を手撒きで行い、8月31日まで毎日の斃死状況を記録した。なお、せっそう病の自然発病がみられても、薬剤による治療は一切行わなかった。

死因の判定 第1節、試験1と同じである。

凝集素価の測定 ワクチン液浸漬最終処理の99日後に、各試験区供試魚10尾ずつの血清のプール試料について*A. salmonicida*に対する凝集素価の測定を行った。測定方法は第1節、試験1と同じである。

試験水温 図-26に示したように、地下水での供試魚飼育期間中は7.7～10.1°C、河川水での飼育期間中は8.7～23.0°Cであった。

試験結果

両試験区の供試魚の斃死状況および凝集素価測定結果を表-55に示した。両試験区とも5月中旬から試験終了（8月31日）まで、供試魚にせっそう病の自然発生がみられた。せっそう病以外の斃死原因としては、水カビ病もみられたが、総斃死魚の93.5%はせっそう病によるものであった。両試験区の供試魚生残率は、ワクチン無処理対照区では95.1%（せっそう病による斃死率；3.8%）であった。

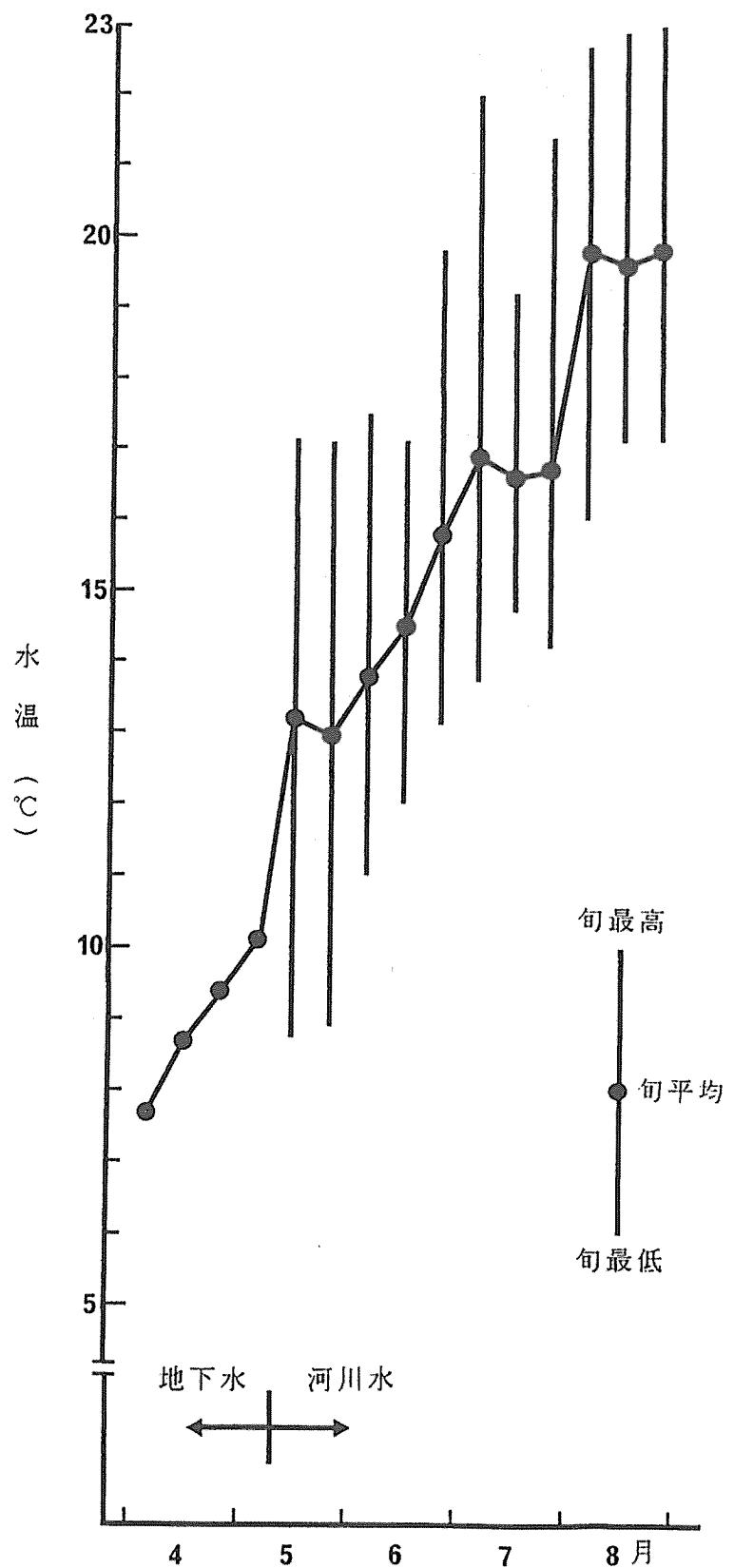


図-26 アマゴに対するせっそう病浸漬ワクチン処理試験時の供試魚飼育水温（試験1）

表-55 せっそう病の浸漬ワクチン処理をしたアマゴにおける予防免疫効果（試験1）

	ワクチン 無処理対照区	浸漬ワクチン 処理区
放養尾数（4月5日）	2,000尾	2,000尾
生残尾数（8月31日）	1,901尾	1,874尾
生残率（%）	95.1%	93.7%
斃死尾数	85尾	115尾
原因内訳	せっそう病 水カビ病 不明	75尾 4尾 6尾
せっそう病による斃死率（%）	3.8%	5.6%
不明減耗尾数	14尾	11尾
供試魚血清中の凝聚素価	16	16

が、ワクチン浸漬処理区でも93.7%（同5.6%）であった。供試魚血清中の A. salmonicida に対する凝集素価は、ワクチン浸漬最終処理99日後の8月5日に、両試験区いずれとも16であった。

試験2 CYBブイヨンで培養した、A. salmonicidaホルマリン不活化菌体の懸濁液による浸漬免疫の効果

試験方法

試験区 ワクチン無処理対照区および浸漬ワクチン処理区の2試験区を設けた。

供試魚 岐阜県水産試験場で飼育中の平均体重 6.5g のアマゴ0年魚を各区 420尾ずつ用いた。

ワクチンの調整 この試験に供試した浸漬用ワクチン液は日生研K.K.で調整された。すなわち、A. salmonicida AYS-2株（第I章、第1節、実験1参照）を、McCARTHY et al. (1983) の推奨するCYBブイヨン*で22°C・24時間培養後、

* CYB (Casein yeast beef) ブイヨン

pancreatic digest of casein	10 g
yeast extract	5 g
beef extract	2.5 g
sodium acetate	2.5 g
sodium chloride	10 g
distilled water	1l

pH:7.3

ホルマリンを 0.3% 添加し、室温に48時間保って不活化を行ったものをワクチン液として提供された。なお、本ワクチン液は湿菌重量として 1ml当たり 1.9mg の菌体を含むものであった。

ワクチン浸漬処理 1985年7月29日に行った。浸漬処理は、前述のワクチン液 5.6l を飼育用水で5倍に希釀したものに、供試魚を5分間、通気しながら浸漬し行った。従って、処理時のワクチン液湿菌重量は、0.4mg/ml であった。

供試魚の飼育および観察 屋外のコンクリート池（長さ 1.5m × 幅 0.5m × 水深 0.5m）に供試魚を収容し、毎秒約 0.2l の河川水を注入して、1985年9月17日まで飼育した。給餌は1日数回マス用市販飼料を手撒きで行い、毎日の斃死状況を記録した。なお、せっそう病の自然発病がみられても、薬剤による治療は一切行わなかった。

死因の判定 第1節、試験1と同じである。

試験水温 図-27に示したように、15.1～24.3°C であった。

試験結果

両試験区の供試魚の斃死状況を表-56に示した。ワクチン無処理対照区では、8月中旬から9月中旬まで、浸漬ワクチン処理区では、8月中旬から9月上旬まで、供試魚にせっそう病の自然発生がみられた。せっそう病以外の斃死原因としては、カラムナリス病もみられたが、総斃死魚の95.2%はせっそう病によるものであった。各試験区の供試魚の生残率は、ワクチン無処理対照区では44.0%（せっそう病による斃死率；43.1%）であったのに対して、浸漬ワクチン処理区では85.0%（同13.3%）であり、RPSは、52%（せっそう病による斃死率では69%）と算出された。

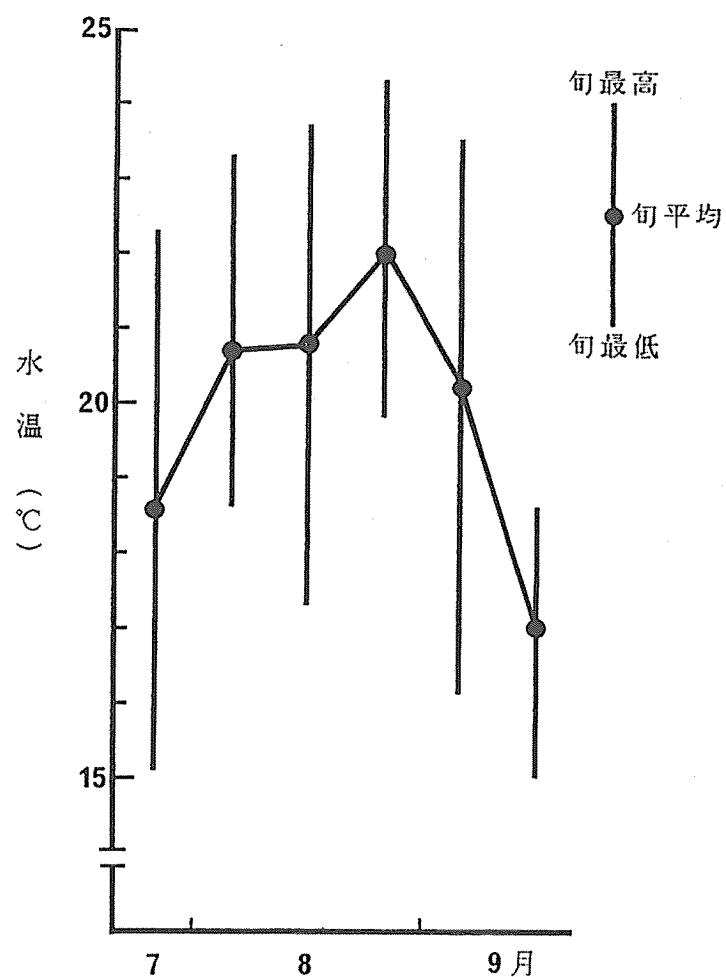


図-27 アマゴに対するせっそう病浸漬ワクチン処理試験時の供試魚飼育水温（試験2）

表-56 せっそう病の浸漬ワクチン処理をしたアマゴにおける予防免疫果（試験2）

	ワクチン 無処理対照区	浸漬ワクチン 処理区
放養尾数（7月29日）	420尾	420尾
生残尾数（9月17日）	185尾	357尾
生残率（%）	44.0%	85.0%
斃死尾数	186尾	60尾
原因内訳	せっそう病 カラムナリス病 不明	181尾 0尾 5尾
せっそう病による斃死率（%）	43.1%	13.3%
不明減耗尾数	49尾	3尾

考 察

魚類の浸漬免疫に関しては、AMEND and FENDER (1976) が高張浸透法 (hyperosmotic infiltration) によって、牛血清アルブミンが供試魚血中に取り込まれることを報告して以来、せっそう病の浸漬ワクチンについて、PALMER and SMITH (1980)、SMITH *et al.* (1980)、JOHNSON and AMEND (1984) 等の報告がみられる。PALMER and SMITH (1980) は大西洋サケに 5.3% 食塩の高張浸透法で浸漬ワクチン処理をし、処理区では対照区よりも高い生残率であったことから予防免疫効果を認めたが、ワクチン処理供試魚血清中の A. salmonicida に対する凝集素価は上昇しなかったとしている。SMITH *et al.* (1980) はブラウンマスに高張浸透法でワクチン処理をし、ワクチン処理供試魚のせっそう病自然発病による斃死率は対照区よりも低かったが、やはり凝集素価は上昇しなかったと報告している。以上これら 2 つの報告では、いずれも高張浸透法による浸漬ワクチンの有効性を認めているが、供試魚血清中の凝集素価の上昇は認めていない。

JOHNSON and AMEND (1984) は前述の CYB ブイヨンによって培養された A. salmonicida を用いて調整したワクチンの高張液による前処理を行わない、直接浸漬処理による有効性を明らかにし、ワクチン浸漬処理を 4 日間隔で 3 回繰り返すとさらに有効性が向上することを報告している。本節の試験では、試験 1 でブイヨン培地 (ニッスイ) で培養された菌体で調整したワクチンの浸漬処理を 7 回行ったが、明らかな予防免疫効果は認められず、血清凝集素価の上昇も認められなかった。しかし試験 2 では CYB ブイヨンで培養された菌体を用いて調整したワクチンの浸漬処理を 1 回だけ試みたにかかわらず、明らかな有効性が認められた。前述の CYB ブイヨンは A. salmonicida に additional antigen を多く産生させる培地であると報告されており、MCCARTHY *et al.* (1983) は同培地で培養

された菌体を用いた筋肉注射ワクチンのすぐれた予防免疫効果を認めている。

従来せっそう病の浸漬ワクチンに関する研究例は比較的少なく、今後さらに検討が必要と考えられるが、A. salmonicida の抗原や病原因子に関しては、leucocytolytic factor (FULLER et al. 1977)、A layer (UDEY and FRYER 1978)、additional cell envelope protein (EVENBERG et al. 1982)、extra-cellular products (MUNRO et al. 1980) 等が報告されており、今後更に有効なワクチンの開発が期待される。

小 括

本章では、せっそう病の予防免疫に関する従来の知見を参考に実用化に関する検討を主な目的として、腹腔内注射免疫、経口免疫および浸漬免疫についての検討を行った。

腹腔内注射免疫としては、まず、HARA *et al.* (1976) によって、実験的にその有効性が明らかにされている A. salmonicida のホルマリン死菌ワクチンについて、アマゴの親魚候補に対して河川水使用池における実用規模のワクチン注射を行い、ワクチンへのアジュバント添加の有無にかかわらず、年間の生残率を 10% 以上向上させ得ることを明らかにした。つぎに、飼育水温が一定な飼育池における 1 回および繰返しワクチン注射の効果を検討するために、ワクチン注射後の供試魚血清中の凝集素価の推移を調べ、水温変動の大きい河川水飼育に比較して、A. salmonicidaに対する凝集素価の上昇が速やかで、その最高価も高くなり、高い凝集素価を示す期間が長いこと、またワクチン注射を繰返すことによって、凝集素価が最高に達するまでのワクチン注射後の時間が短くなることを明らかにした。さらに、单年度のワクチン注射ではせっそう病に対する予防効果が不十分でも、同一養魚場において、数年間大多数の飼育魚にワクチンを接種し、養魚場全体の A. salmonicida に対する免疫レベルを向上させることによって、年間の生残率を徐々に向上させ、せっそう病治療のための投薬回数も年々減少させ得ることを明らかにした。

経口免疫については、A. salmonicida の加熱死菌およびホルマリン死菌ワクチンを経口投与した場合には、有効性が認められなかつたが、菌体を超音波で破壊し、その遠心沈澱上清をワクチンとして投与した場合は著しいワクチンの効果が認められた。

浸漬免疫については、ブイヨン培地（ニッスイ）で培養したA. salmonicida菌体を用いて調整したワクチンの浸漬処理では予防効果は認められないが、C Y Bブイヨンで培養された菌体を用いて調整したワクチンの浸漬処理では、せっそう病の予防効果が認められることを明らかにした。

以上、せっそう病の免疫による予防効果に関して、腹腔内注射、経口および浸漬の各ワクチンについて検討し、いずれの投与方法においても、効果の認められる結果が得られたが、その有効性は未だ不十分であり、今後さらに効果の高いワクチンの開発が必要であることを指摘した。

総 括

以上本研究では在来マス類、特にアマゴの池中養殖において最も問題となるせっそう病の防除対策の確立を目的として、養魚の現場における実用的な見地からまず、原因菌A. salmonicidaの病原性、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法について検討を行い、ついで、A. salmonicidaの魚体内における動態、アマゴのせっそう病実験感染系を用いた化学療法剤によるせっそう病の治療試験法の検討、A. salmonicidaの薬剤感受性と治療試験およびせっそう病に対する予防免疫の可能性について検討した。

第Ⅰ章では、まず、A. salmonicidaの病原性について検討した。すなわち、本菌の各種サケ科魚類に対する病原性を比較し、アマゴおよびヤマメに対する病原性が、ニジマス等に対するそれよりも強いことから、ニジマス養殖の技術を準用したアマゴおよびヤマメの池中養殖技術（本荘・原 1973）における、せっそう病の防除対策確立の重要性を明らかにした。つぎに、アマゴおよびイワナのせっそう病自然発病魚から得られた8株の新鮮A. salmonicida分離株について、アマゴに対する病原性を検討し、各菌株の病原性は一律ではないことを明らかにした。また、保存後の菌株の病原性の変化について検討し、保存により病原性の低下した菌株は、魚体通過によって病原性が回復する菌株と回復しない菌株とが存在することを明らかにし、実験感染のための供試菌株を選択する際には、3～4回の魚体通過を行っても病原性が回復しない菌株は、供試菌株として不適当なことを明らかにした。このように病原性を高めた菌株でも再び培地中での長期間の保存あるいはHAHNEL et al. (1983)も報告しているように、多くの継代を重ねることによって病原性が低下することを明らかにし、実験感染に使用する菌株の保存は病原性が低下しない範囲で行われるべきであり、保存期間および継代数には充分

注意し、使用前に魚体通過による病原性の回復を図るべきであることを指摘した。ついで、病原性を低下させない簡易な保存法として、実験感染致死魚体のまでの凍結保存が適当であることを明らかにした。さらに、本菌の自発凝集性と病原性とに相関のあることが報告されているが（UDEY and FRYER 1978、SAKAI and KIMURA 1985）、本章の実験ではそれらは必ずしも一致しないことも明らかにした。

第Ⅱ章では、A. salmonicidaのアマゴに対する実験感染技法について検討した。まず、各接種法による半数致死菌量は、背鰭下筋肉接種、腹腔内接種、菌浴接種の順に低くなることから、実験の目的に応じて菌の接種方法を選択する必要のあることを明らかにした。つぎに、5～15°Cの範囲ではA. salmonicidaの増殖が温度によって左右される（佐古・原 1981）ことから、実験水温が高いほど致死率が高くなることを明らかにし、全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会（1976）、McCRAW（1952）により報告されている本病の流行期との関連を見出した。また、供試したA. salmonicidaの背鰭下筋肉接種による最少致死菌量は魚体重に関係なく同一であることから、特に接種菌量を単位供試魚体重当たりの量として表示する必要のないことを指摘した。さらに、スモルト期のアマゴは特にA. salmonicidaに対する感受性が高い傾向のあること（岐阜水試 1987）から、スモルトの出現期にはスモルトの生理的特性（久保 1980）を充分に配慮した疾病対策が重要であることが示唆された。

第Ⅲ章では、A. salmonicidaの魚体内における動態について検討した。まず、実験感染における接種ルート別のアマゴの各臓器中の接種菌生菌数の消長を調べ、接種ルートの違いによって接種された生菌の感染初期の魚体内動向が異なること、接種菌生菌数は致死魚が出現するまでは経時的に増加し、一定の数に達すると致死が始まること、瀕死魚は全身感染に陥っていること、菌浴接種が背鰭下筋肉接

種および腹腔内接種よりも自然発病に近いことを明らかにした。つぎに、実験感染アマゴ魚群からの飼育水中への接種菌の排菌について調べ、斃死魚が出現する以前にすでに飼育水中に A. salmonicida が検出され、飼育水中の菌検出によって本病を早期に発見できる可能性があることが示唆された。また、A. salmonicida の不顯性感染魚の検出法について検討し、供試魚に対する高水温下での副腎皮質ホルモン剤の投与によって、BULLOCK and STUCKEY (1975)の報告に述べられているように、せっそう病原因菌の検出率が飛躍的に向上することを再確認するとともに、実験感染生残魚群および実験感染後抗菌剤によって治癒した魚群とも不顯性感染魚群になる可能性の高いことを明らかにした。さらに、自然発病経験のない魚群にも不顯性感染魚群が存在することも明らかにし、種苗等の交流などによるこのような不顯性感染魚の移動に起因する本病の伝播には充分な注意が必要なことを指摘した。

第IV章では、アマゴのせっそう病実験感染系を用いて化学療法剤による治療試験を行う際に、問題となると思われるいくつかの点について検討した。まず、投薬直後における魚体内の接種菌生菌数の推移を調べ、投薬によって薬剤の魚体内濃度が上昇すると推定される時点で接種菌生菌数が減少し、投薬24時間後には魚体内に接種菌がほとんどみられなくなることを明らかにした。つぎに、接種ルートの違いが治療効果におよぼす影響を調べたが、攻撃の強さを同程度にすれば、その影響がないことが分った。ついで、攻撃の強さの違いによって、薬剤の治療効果が大きく左右されることを見出し、実験感染系を用いてせっそう病に対する化学療法剤の評価を行う際の接種菌量は半数致死菌量の 100倍量程度にすべきであることを指摘した。また、抗菌剤の投与開始時期と治療効果との関係について調べ、魚体内的薬剤濃度が充分に上昇してから菌が接種された場合は、当然効果が期待できるが、実際の疾病発生の場合のように菌の接種（感染）後に投薬が開

始される場合は、魚体内の原因菌生菌数が未だ少ない間は菌の魚体内増殖を抑えることが可能であるが、魚体内すでに多数の菌が増殖した後では、その抑制は不可能なことが明らかになり、本病のような魚類の細菌性疾病の治療に際して、従来からいわれているように早期治療の重要性を実験的に再確認し得た。さらに、2種類のピリドンカルボン酸系薬剤の投薬時の魚体内吸収について検討し、これらの薬剤は経口投与によって魚体内によく吸収されることを明らかにした。最後に、サケ科魚類におけるせっそう病治療薬剤の評価法として、半数有効量を求める試験法を提案した。

第V章では、分離年度の異なるA. salmonicidaの薬剤感受性を検討した後、せっそう病の実験感染魚および自然発病魚に対する治療試験を行った。まず、1974年から1986年にかけて、自然発病魚から分離された 776株の A. salmonicida の薬剤感受性を調べ、その経年変化を明らかにし、薬剤の使用状況と耐性株の出現状況とに密接な関連があるかがわれること、感受性株の判定基準としては市販の（昭和ディスク）判定表の「+++」が妥当であることを指摘した。つぎに、実験感染魚を用いて、3種類のサルファ剤とピリミジン誘導体との合剤、2種類の抗生素および3種類のピリドンカルボン酸系薬剤の治療効果を明らかにし、薬剤の治療効果の評価法として、半数有効量または供試魚が 100% 生残できる最少投与量として表すべきことを指摘した。さらに、この実験感染治療試験において明らかに治療効果が認められた供試薬剤のうち、2種類のサルファ剤とピリミジン誘導体との合剤および2種類のピリドンカルボン酸系薬剤について、せっそう病の自然発病魚群に対する治療効果を明らかにし、実験感染魚を用いた治療実験における薬剤の評価の妥当性を裏付け、今後、実験感染魚における治療に要する投与量と養殖現場におけるそれとの相関をより多く検討し一定の投薬基準を明らかにする必要のあることを指摘した。

第VII章では、せっそう病の予防免疫に関する従来の知見を参考に実用化に関する検討を行った。まず、HARA *et al.* (1976) に準じて、腹腔内注射免疫についてアマゴの親魚候補に対して河川水使用池における事業規模でのA. salmonicida のホルマリン死菌ワクチン注射を行った。その結果、通常せっそう病による年間の斃死率が30%前後であるのに対して、年間の生残率を10%以上向上させ得ることが明らかになり、ワクチン注射によるせっそう病の予防免疫効果は産業的に大きな意味があることを明らかにした。これらの試験においては供試魚血清中のA. salmonicidaに対する凝集素価についても検討し、ワクチン注射魚の凝集素価は生理食塩水注射対照区に比して明らかに高くなること、アジュバント添加ワクチンの凝集素価は添加しないものに比して著しく上昇すること、川津 (1968) も指摘しているように飼育水温が10°C以上にならないと凝集素価は上昇しないこと、凝集素価が一定のレベルに達すれば充分ワクチン効果が発現することを明らかにした。つぎに、飼育水温が一定な飼育池における1回および繰返しワクチン注射後の供試魚血清中のA. salmonicidaに対する凝集素価の推移について検討し、ワクチン注射を数回行うことによってワクチン最終注射から凝集素価が最高に達するまでの時間は短くなるが、必ずしも凝集素価は高くなるとは限らないこと、河川水飼育魚に比して、凝集素価が著しく上昇しその持続期間も長いことを明らかにした。さらに、同一養魚場において数年間にわたって大多数の飼育魚にせっそう病ワクチンの腹腔内注射を続けた結果、養魚場全体のせっそう病に対する免疫レベルを向上させることによって、同養魚場における年間の生残率が徐々に向上し、せっそう病の治療のための投薬回数も年々減少することを明らかにした。アマゴ0年魚に対する経口免疫については、加熱死菌およびホルマリン死菌ワクチンの投与では、従来の知見と同様予防免疫効果は認められなかつたが、KLONTZ and ANDERSON (1970) に準じてA. salmonicida菌体を超音波で破壊しその遠心

沈澱上清を投与した場合には明らかな予防免疫効果が認められ、通常せっそう病による年間の斃死率が30%前後であるのに対して、年間の生残率を20%以上向上させ得ることが明らかになり、ワクチン経口投与によるせっそう病の予防免疫効果は産業的に大きな意味を持つことを指摘した。これらの試験においては供試魚血清中のA. salmonicidaに対する凝集素価についても検討したが、凝集素価の上昇は認められず、経口ワクチンの予防免疫効果は液性免疫によるものではないことが示唆された。浸漬免疫については、ブイヨン培地で培養したA. salmonicidaホルマリン不活化菌体を用いたワクチンでは予防免疫効果は認められなかつたが、McCARTHY et al. (1983) の提案したCYBブイヨンで培養された菌体を用いたワクチンの浸漬処理では予防免疫効果が認められることを明らかにした。以上せっそう病の予防免疫に関して、いずれの投与方法においても有効な結果が得られたが、今後はさらに有効性の高いワクチン開発の必要性があることを指摘した。

本研究ではアマゴの池中養殖におけるせっそう病対策の確立を目的として種々の検討を重ね、多くの知見が得られた。アマゴの池中養殖における従来からのせっそう病防除対策に、本研究で得られた知見を付け加えて、アマゴの養殖現場におけるせっそう病防除対策を以下のように取りまとめた。

種苗生産の過程においては、採卵時に親魚がA. salmonicidaを保菌している場合があり（森川・荒井 1984）、体腔液や血液を介しての汚染が考えられるので、等調液による洗卵を入念に行い、卵の表面に存在するA. salmonicidaを可及的に減少させる。孵化用水等はA. salmonicidaの汚染の恐れのないものを使用することは当然のことであるが、清浄な用水が得られない場合は、用水を紫外線照射することなどによって、せっそう病の発病を抑え得ることが明らかにされている（臼田 1988）。発眼期には、ポビドンヨード剤による消毒（有効ヨウ素濃度とし

て50ppm・15分間）を行う（全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会 1976）。なお、発眼卵を種苗として出荷する場合は、出荷時および入荷時の合計2回消毒を行うようとする。

仔魚期の飼育には、防疫対策の施された飼育室が望ましい。すなわち、地下水等のA. salmonicidaの汚染の可能性のない飼育用水を用い、汚染魚または汚染の可能性のある成魚や親魚とは隔離して飼育する。また、管理者も仔魚飼育室の専任とする。飼育環境条件については、岐阜水試（1988）はせっそう病の実験感染魚の斃死率は、飼育密度が高くなるほど、換水率が低くなるほど高くなることを明らかにしており、できるだけ飼育密度を下げ、注水量を多くすることに留意する。

せっそう病の治療対策としては早期発見・早期治療が重要であるが、斃死魚が出現する以前に飼育水中のA. salmonicidaの検出による早期発見も可能であり、本病の多発する春期～秋期には週1回程度の調査が望ましい。抗菌剤の投与は、飼育水中にA. salmonicidaが検出されたり、せっそう病の定型的な斃死魚が発見された時点で開始する。使用薬剤の選択については、薬剤感受性調査の結果を考慮しつつ、原（1983）が指摘しているように、サルファ剤を第一次選択剤、抗生素質を第二次選択剤、合成抗菌剤を第三次選択剤とすべきであろう。せっそう病の発病魚群は、ほとんどの魚が保菌魚であると考えられるので、投薬によって治癒した群でも、その活魚としての移動には慎重を期すべきである。岐阜水試（1988）は、せっそう病の実験感染魚の斃死率によれば、供試魚のハンドリングストレスの影響を調べ、ハンドリングストレスが強いほうが斃死率が高いことを明らかにしており、飼育魚の選別や移動に際しては、極力ていねいな取扱いをし、飼育魚にストレスがかからないように心掛ける。また、スマルトはバーに比較してせっそう病原因菌に対する感受性が高いので、スマルトの出現期には魚の取扱

いによる損傷を可及的に少なくするため、魚を取扱う機会をなるべく少なくするなど、スモルトの生理的特性を十分に配慮した取扱いに留意する必要がある。ワクチンについては、実用化されていないが、稚魚期には浸漬ワクチンによる免疫賦与が最善と考えられ、また、超音波処理をした経口ワクチンを餌付け開始と同時に投与すれば免疫が賦与され、せっそう病による斃死が減少する。親魚候補には2月から3月にかけて死菌ワクチンを腹腔内注射すれば、秋期までの生残率を向上させることが可能であるし、毎年大多数の飼育魚にワクチンを注射し��ることによっても、徐々にせっそう病による被害を減少させることが可能と考えられる。

謝　　辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導を賜り、また、厳密なる御校閲を頂いた北海道大学水産学部水産食品学科微生物学講座教授木村喬久博士に深甚なる敬意と謝意を表します。また種々適切な御助言と御教示を頂いた北海道大学水産学部水産食品学科食品製造学講座教授信濃晴雄博士、ならびに同大学水産学部水産食品学科微生物学講座助教授絵面良男博士に衷心より御礼申し上げます。本稿の取纏めの機会を与えて下ださり、種々有益な御助言と御指導および御校閲を頂いた水産庁養殖研究所病理部長原武史博士に心から感謝致します。

魚病研究の手ほどきをしていただいた、恩師東京水産大学名誉教授保科利一博士、本研究の端緒を与えられ、示唆に富む御助言を頂いた岐阜県水産試験場名誉場長本荘鉄夫博士、本研究の遂行にあたり積極的な援助と便宜を与えて下ださった岐阜県水産試験場田代文男場長はじめ職員の皆様方に厚く御礼申し上げます。

水産庁北海道さけ・ますふ化場の野村哲一氏には、文献収集に御協力頂き、また、薬剤およびワクチンの研究については、各メーカーの担当者の方々の御協力を頂き深く感謝致します。

本研究に要した費用の一部は、水産庁指定調査事業「病害研究」、水産庁魚病対策技術開発研究および農林水産技術会議近海漁業の家魚化システムの開発に関する総合研究によったことを付記して謝意を表します。

最後に、本研究をすすめるにあたり、数々の御援助を頂いた岐阜県下の水産関係者の皆様に深謝致します。

文 献

- AMEND, D. F. and D. C. FENDER (1976) : Uptake of bovine serum albumin by rainbow trout from hyperosmotic solutions : A model for vaccinating fish. Science, 192, 793-794.
- AMEND, D. F. (1981) : Potency testing of fish vaccines. Develop. biol. Standard, 49, 447-454.
- ANKELI, G. O. (1971) : Furunculosis in the redspot salmon (Oncorhynchus rhodurus) and other salmonids in holding tanks. Can. Vet. Jour., 12, 136-138.
- AOKI, T., S. EGUSA, T. KIMURA and T. WATANABE (1971) : Detection of R factors in naturally occurring Aeromonas salmonicida strains. Applied Microbiology, 22, 716-717.
- AOKI, T., S. EGUSA, C. YADA and T. WATANABE (1972) : Studies of drug resistance and R factors in bacteria from pond-cultured salmonids. Japan J. Microbiol., 16, 233-238.
- BARRY, A. L. and R. N. JONES (1984) : Cross-resistance among cinoxacin, DJ-6783, enoxacin, nalidixic acid, norfloxacin and oxolinic acid after in vitro selection of resistant populations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 25, 775-777.
- BRETT, J. R. (1964) : The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. J. Fish. Res. Board Can., 21, 1183-1226.
- BUCKE, D. (1980) : Experimental and naturally occurring furunculosis in various fish species : a comparative study. Fish Disease, 3rd. COPRAQ-session 1980, 82-86.
- BULLOCK, G. L., H. M. STUCKEY, D. COLLIS, R. L. HERMAN and G. MAESTRONE (1974) : In vitro and in vivo efficacy of a potentiated sulfonamide in control of furunculosis in salmonids. J. Fish. Res. Board Can., 31, 75-82.
- BULLOCK, G. L. and H. M. STUCKEY (1975) : Aeromonas salmonicida : Detection of asymptotically infected trout. Prog. Fish-Cult., 37, 237-239.
- BULLOCK, G. L., H. M. STUCKEY and R. L. HERMAN (1976) : Comparative susceptibility of Atlantic salmon (Salmo salar) to the enteric red-mouth bacterium and Aeromonas salmonicida. J. Wildl. Dis., 12, 376-379.
- CIPRIANO, R. C. and C. M. HEARTWELL III (1986) : Susceptibility of salmonids to furunculosis: Differences between serum and mucus responses against Aeromonas salmonicida. Trans. Am. Fish. Soc., 115, 83-88.
- 伝染病研究所学友会 編 (1958) : 細菌学実習提要、丸善、東京、478pp.
- DUFF, D. C. B. (1942) : The oral immunization of trout against Bacterium salmonicida. J. Immunol., 44, 87-94.
- 江草周三 (1978) : 魚の感染症、恒星社厚生閣、東京、554pp.
- 江草周三 編 (1982) : 魚病学辞典、近代出版、東京、383pp.
- EMMERICH, R. and C. WEIBEL (1890) : Über eine durch Bakterien verursachte Infektionskrankheit der Forellen. Allg. Fish-Ztg., 15, 73-77; 85-92.
- EVELYN, T. P. T. (1971) : An aberrant strain of the bacterial fish patho-

- gen Aeromonas salmonicida isolated from a marine host, the sablefish (Anoplopoma fimbria), and from two species of cultured Pacific salmon. J. Fish. Res. Board Can., 28, 1629-1634.
- EVENBERG, D., R. V. BOXTEL, B. LUGTENBERG, F. SCHURER, J. BLOMMAERT and R. BOOTSMA (1982) : Cell surface of the fish pathogenic bacterium Aeromonas salmonicida I. Relationship between autoagglutination and the presence of a major cell envelope protein. Biochimica et Biophysica Acta., 684, 241-248.
- FRYER, J. L., K. S. PILCHER, J. E. SANDERS, J. S. ROHOVEC, J. L. ZINN, W. J. GROBERG and R. M. MCCOY (1976) : Temperature, infectious disease, and the immune response in salmonid fish. Ecological Research Series, Environmental Research Laboratory, Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, 57pp.
- FULLER, D. W., K. S. PILCHER and J. L. FRYER (1977) : A leukocytolytic factor isolated from cultures of Aeromonas salmonicida. J. Fish. Res. Board Can., 34, 1118-1125.
- 岐阜県水産試験場 (1979) : 昭和53年度、指定調査研究総合助成事業、病害研究報告書(マス類のウィルス病、せっそう病に関する研究)、16pp.
- 岐阜県水産試験場 (1987) : 近海漁業資源の家魚化システムの開発に関する総合研究 昭和61年度、委託事業報告書、疾病の防除と生産向上に関するシステム(環境条件)、サクラマスおよびアマゴのスモルトとペーパーの疾患に対する感受性の差異、7pp.
- 岐阜県水産試験場 (1988) : 近海漁業資源の家魚化システムの開発に関する総合研究、昭和62年度、委託事業報告書、疾病の防除と生産向上に関するシステム(環境条件)、スモルトの細菌性疾病に対する飼育環境条件の影響、10pp.
- 五島瑳智子・金子康子・原田公子・桑原章吾 (1973) : サルファ剤と Trimethoprim の協力作用 - in vitro 抗菌作用について - . Chemo-therapy, 21, 77-86.
- GOULD, R. W., R. ANTIPA and D. F. AMEND (1979) : Immersion vaccination of sockeye salmon (Oncorhynchus nerka) with two pathogenic strains of Vibrio anguillarum. J. Fish. Res. Board Can., 36, 222-225.
- GROBERG, W. J. Jr., R. H. MCCOY, K. S. PILCHER and J. L. FRYER (1978) : Relation of water temperature to infections of coho salmon (Oncorhynchus kisutch), chinook salmon (O. tshawytscha), and steelhead trout (Salmo gairdneri) with Aeromonas salmonicida and A. hydrophila. J. Fish. Res. Board Can., 35, 1-7.
- HAHNEL, G. B., R. W. GOULD and E. S. BOATMAN (1983) : Serological comparison of selected isolates of Aeromonas salmonicida ssp. salmonicida. J. Fish Dis., 6, 1-11.
- 原 武史・井上進一・今井重之・吉田文三 (1966) : サルファ剤の魚類に関する研究-III、サルファ剤を連続投与した時のニジマス組織内濃度について、魚病研究、1, 10-14.
- HARA, T., K. INOUE, S. MORIKAWA and F. TASHIRO (1976) : Vaccination trials for control of furunculosis of salmonids in Japan. Fish Pathology, 10, 227-235.
- 原 武史 (1983) : 医薬品の使用、魚病の本 - 養殖生産の安定をめざして - 地球社、東京、220pp.
- HERMAN, R. L. (1968) : Fish furunculosis 1952-1966. Trans. Am. Fish.

- Soc., 97, 221-230.
- 日比谷京 編 (1982) : 魚類組織図説、講談社、東京、152pp.
- HOLT, R. A., J. E. SANDERS, J. L. ZINN, J. L. FRYER and K. S. PILCHER (1975) : Relation of water temperature to Flexibacter columnaris infection in steelhead trout (Salmo gairdneri), coho (Oncorhynchus kisutch) and chinook (O. tshawytscha) salmon. J. Fish. Res. Board Can., 32, 1553-1559.
- 本荘鉄夫・原 武史 (1973) : ヤマメ・アマゴ、養魚講座、第8巻、緑書房、東京、184pp.
- 傍士和彦 (1971) : 獣医畜産家のためのサルファ剤の基礎知識、日本動物薬事協会、東京、171pp.
- ISHIGURO, E. E., W. W. KAY, T. AINSWORTH, J. B. CHAMBERLAIN, R. A. AUSTIN, J. T. BUCKLEY and T. J. TRUST (1981) : Loss of virulence during culture of Aeromonas salmonicida at high temperature. J. Bacteriol., 148, 333-340.
- JOHNSON, K. A. and D. F. AMEND (1984) : Potential for immersion vaccination against Aeromonas salmonicida. J. Fish Dis., 7, 101-105.
- 鎌田淡紅郎・田代文男・立川 互・田村栄治・青江 弘・矢辺芳治 (1974) : ニジマス、養魚講座、第10巻、緑書房、東京、270pp.
- 金沢 裕 (1980) : 薬剤耐性(感受性)の測定法、一濃度ディスク法、三橋進 編、薬剤感受性測定法、講談社、東京、139pp.
- 川津浩嗣 (1968) : 魚類の免疫反応、 日水誌、34, 246-250.
- 木村喬久 (1970) : 催熟蓄養中のサクラマスならびにカラフトマス親魚に発生した細菌性疾病に関する研究、 北海道さけ・ますふ化場研報、24, 9-100.
- KIMURA, T., M. YOSHIMIZU and M. WADA (1983) : In vitro antibacterial activity of the combination of sulphadiazine and trimethoprim on bacterial fish pathogens. J. Fish Dis., 6, 525-532.
- KLONTZ, G. W., W. T. YASUTAKE and A. J. ROSS (1966) : Bacterial disease of the salmonidae in the Western United States: Pathogenesis of furunculosis in rainbow trout. Amer. J. Vet. Res., 27, 1455-1460.
- KLONTZ, G. W. (1970) : Oral immunization of salmonids against furunculosis, and alum-precipitated Aeromonas salmonicida antigenic fraction therefor. U. S. Patent office 3,492,400.
- KLONTZ, G. W. and D. P. ANDERSON (1970) : Oral immunization of salmonids : a review. Symposium on diseases of fishes and shellfishes, Am. Fish. Soc., Special publ. No. 5, 16-20.
- 国立予防衛生研究所 編 (1967) : 日本のワクチン、丸善、東京、390pp.
- KRANTZ, G. E., J. M. REDDECLIFF and C. E. HEIST (1964a) : Immune response of trout to Aeromonas salmonicida. Part I. Development of agglutinating antibodies and protective immunity. Prog. Fish-Cult., 26, 3-10.
- KRANTZ, G. E., J. M. REDDECLIFF and C. E. HEIST (1964b) : Immune response of trout to Aeromonas salmonicida. Part II. Evaluation of feeding techniques. Prog. Fish-Cult., 26, 65-69.
- 久保達郎 (1980) : 北海道のサクラマスの生活史に関する研究、 北海道さけ・ますふ化場研究報告、34, 1-95.
- 楠田理一・杉山昭博・川合研児・稻田善和・米田 実 (1981) : アユに対する Streptococcus sp. ならびに Vibrio anguillarum の病原性について、

- 日水誌、47, 993-997.
- MCCARTHY, D. H., J. P. STEVENSON and A. W. SALSBURY (1974) : Therapeutic efficacy of a potentiated sulphonamide in experimental furunculosis. *Aquaculture*, 4, 407-410.
- MCCARTHY, D. H., D. F. AMEND, K. A. JOHNSON and J. V. BLOOM (1983) : Aeromonas salmonicida : determination of an antigen associated with protective immunity and evaluation of an experimental bacterin. *J. Fish Dis.*, 6, 155-174.
- MCCRAN, B. M. (1952) : Furunculosis of fish. *U. S. Fish Wildl. Serv., Spec. Sci. Rep. Fish*, 84, 87pp.
- MICHEL, C. (1980) : A standardized model of experimental furunculosis in rainbow trout (Salmo gairdneri). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 37, 746-750.
- 三橋 進 編著 (1970) : 薬剤と耐性菌、南江堂、東京、280pp.
- 宮崎照雄・塙田三朗 (1975) : アマゴ瘡瘍病の病理組織学的研究 - II . 経鰓感染について、*魚病研究*, 9, 204-212.
- 森地敏樹・山里一英・鈴木正敏・高野光男・根井外喜男 (1977) : 微生物の保存法、根井外喜男 編、東京大学出版会、東京、433pp.
- 森川 進・田代文男 (1975) : せっそう病に関する研究 - VII . クロラムフェニコール・オキシテトラサイクリン・AMF-16・テトラサイクリン・ピロミド酸の治療効果・毒性・吸収について、*岐阜水試研報*, 21, 97-110.
- 森川 進・荒井 真・田代文男 (1975) : せっそう病に関する研究 - IX . 1975年に県内で分離されたAeromonas salmonicida の薬剤感受性について、*岐阜水試研報*, 21, 111-117.
- 森川 進・田代文男・河野 薫 (1979) : せっそう病に関する研究 - X I . ピロミド酸の化学療法的研究、*岐阜水試研報*, 24, 33-49.
- 森川 進・荒井 真 (1984) : サクラマス、アマゴにおける河川別病原体調査、3、アマゴ、昭和55~57年度、近海漁業資源の家魚化システムの開発に関する総合研究(マリーンランチング計画)プログレス・レポート、病害防除(1)、12-15.
- MUNRO, A. L. S., T. S. HASTINGS, A. E. ELLIS and J. LIVERSIDGE (1980) : Studies on an ichthyotoxic material produced extracellularly by the furunculosis bacterium Aeromonas salmonicida. *Fish Disease 3rd. COPRAQ-session 1980*, 98-106.
- 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.
- 長野県水産試験場 (1987) : 第12回全国養鯉技術協議会資料、ニジマス・在来マス類等の疾病実態調査、7pp.
- 日本獣師会 (1970) : 家畜衛生に必要な調査・統計の知識、日本獣師会、東京、145pp.
- 西野武志 (1987) : キノロン系(ピリドンカルボン酸系)抗菌薬の *in vitro* および *in vivo* 抗菌力について、*臨床と微生物*, 14, 143-152.
- 小栗豊子・小酒井望 (1977) : 臨床材料から分離された肺炎球菌の抗生物質感受性、*Jap. J. Antibiotics*, 30, 133-138.
- *OVERHOLSER, D. L. (1968) : Control of furunculosis in Pacific salmon by immunization. *M.S. thesis*, 58pp. Oregon State University.
- PALMER, R. and P. R. SMITH (1980) : Studies on vaccination of Atlantic salmon against furunculosis. *Fish Disease 3rd. COPRAC session 1980*, 107-112.

- RINGEL, S. M., F. J. TURNER, F. L. LINDO, S. ROEMER, B. A. DIRENGA and B. S. SCHWARTZ (1968) : Oxolinic acid, a new synthetic antimicrobial agent. II. Bacterial rate and resistance development. *Antimicrob. Agents and Chemotherapy*-1967, 480-485.
- SAKAI, D. K. (1985) : Phenotypic variation in haemagglutination corresponding with spontaneous agglutination in Aeromonas salmonicida strains. *Fish Pathology*, 20, 1-7.
- SAKAI, D. K. and T. KIMURA (1985) : Relationship between agglutinative properties of Aeromonas salmonicida strains isolated from fish in Japan and their resistance to mechanisms of host defense. *Fish Pathology*, 20, 9-21.
- 佐古 浩・原 武史 (1981) : ヤマメに接種されたAeromonas salmonicidaの増殖に及ぼす水温の影響、*養殖研報*, 2, 73-81.
- 清水当尚・中村信一・高瀬善行 (1971) : 新抗菌剤Piromidic acidの研究Ⅰ、抗菌作用、*Chemotherapy*, 19, 379-386.
- 新間弥一郎・市村 博・柴田宣和 (1976) : 絶食によるニジマス成魚の脂質の変化、*日水誌*, 42, 83-89.
- SMITH, P. D., D. H. McCARTHY and W. D. PATERSON (1980) : Further studies on furunculosis vaccination. *Fish Disease* 3rd. COPRAC-session 1980, 113-119.
- SNIESZKO, S. F. and S. B. FRIDDLE (1949) : Prophylaxis of furunculosis in brook trout (Salvelinus fontinalis) by oral immunization and sulfamerazine. *Prog. Fish-Cult.*, 11, 161-168.
- SNIESZKO, S. F. (1964) : Remarks on some facets of epizootiology of bacterial fish diseases. *Develop. Ind. Microbiol.*, 5, 97-100.
- SNIESZKO, S. F. and G. L. BULLOCK (1975) : Fish furunculosis. *U.S. Fish Wildl. Serv., Fish Disease Leaflet*, 43, 10pp.
- SNIESZKO, S. F. (1978) : Control of fish diseases. *Marine Fisheries Review*, 40, 65-68.
- SPENCE, K. D., J. L. FRYER and K. S. PILCHER (1965) : Active and passive immunization of certain salmonid fishes against Aeromonas salmonicida. *Can. J. Microbiol.*, 11, 397-405.
- 竹内俊郎・渡辺 武 (1982) : コイおよびニジマスの体組成および脂肪酸組成に及ぼす絶食および水温の影響、*日水誌*, 48, 1307-1316.
- 田中信男・中村昭四郎 (1967) : 抗生物質－化学と生物活性、東京大学出版会、東京、263pp.
- 東京水試 (1971) : 昭和45年度病害研究最終報告書、23pp.
- **UDEY, L. R. (1977) : Pathogenic, antigenic, and immunogenic properties of Aeromonas salmonicida studied in juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Doctoral thesis, Oregon State University.
- UDEY, L. R. and J. L. FRYER (1978) : Immunization of fish with bacterins of Aeromonas salmonicida. *Marine Fisheries Review*, 40, 12-17.
- 宇野将義 (1976) : Aeromonas salmonicida, Vibrio anguillarumおよびPseudomonas anguillicarpaのイワナなどに対する実験的病原性、*魚病研究*, 11, 5-9.
- 臼田 博 (1988) : 飼育用水の紫外線照射による生残率の向上について、*岐阜水試研報*, 33, 55-61.
- 山崎隆義・富永正雄・高橋耿之介・西尾和民 (1977) : 原色・淡水魚の病気－診断・原因・対策－、農山漁村文化協会、東京、184pp.
- 吉水 守・木村喬久 (1986) : 魚類病原細菌に対するサルファ剤とピリミジン

誘導体との協力作用について、サルファモノメトキシンとオルメトブ
リムの協力作用、北大水産彙報、37, 38-49.
全国湖沼河川養殖研究会養鱒部会編（1976）：養鱒の研究、緑書房、東京、
178pp.
全国湖沼河川養殖研究会・せっそう病研究部会（1979）：せっそう病の経皮ワ
クチンについて、23pp.

* KLANTS and ANDERSON (1970) より間接引用
** UDEY and FRYER (1978) より間接引用