

アユの冷水病人為感染方法について - I

宇野悦央

アユの冷水病対策の開発研究において、ワクチンの有効性評価や治療試験等の実施に際し、本疾病に対する人為感染方法の確立が不可欠である。このため、全国湖沼河川養殖研究会アユ冷水病研究部会の連絡試験として、人為感染方法のうち菌浴法、腹腔内接種法、筋肉内接種法および皮下接種法について検討したのでその概要を述べる。

菌株 供試した冷水病菌株は、表1に示した6株で、いずれもアユから分離されたものである。

菌浴法 網もみ後に菌浴する方法により実施した。網もみ条件およびその後の菌浴結果は表2～4に示したとおりである。攻撃菌は、改変サイトファグブイオンを用いて18℃で4日間振とう培養し、得られた菌液は飼育水で所定の濃度に希釈した。網もみは、垂るみがないように張った網地の中で供試魚を所定時間、所定回数往復させることにより行った。網地は、30節目合のナイロンラッセル210デニール5本を用いた。

表1 人為感染に用いた冷水病菌株

株名	分離年	分離した県名
92F1-0423	1992	和歌山
PT87024	1987	徳島
98C4-0406	1998	和歌山
PH9304	1993	広島
98C2-0128	1998	和歌山
99C1-0111	1999	和歌山

その結果、試験I～IIIから魚を2～3分間網もみした後、 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mlの菌液に10分間浸漬することにより高いへい死亡率を得ることができた。へい死魚には尾鰭の欠損、びらんや冷水病の特徴である貧血症状等がみられ、へい死魚からは供試菌が再分離されることが多かった。しかし、試験IVにお

表2 網もみ条件

試験	実施年度	試験区	供試魚		網もみ時間(分)	網もみ回数(往復/分)
			由来	平均体重(g)		
I	6年	1	海産	3.7	3	約60
		2			0	0
II	"	1	海産	4.8	3	約60
		2			2	
		3			1	
III	"	1	海産	6.7	2	約60
		2				
		3				
IV	10年	1	人工産	2.0	2	約60
		2			2	約60
		3			0	0

表3 網もみ後の菌浴条件

試験	試験区	使用菌株 (魚体通過の有無)	菌浴濃度 (CFU/ml)	菌浴時間 (分)	菌浴中の水温 (°C)
I	1	92F1-0423 (無)	1.0×10^8	10	15.4~16.1
	2	"	"	"	"
II	1				
	2	92F1-0423 (無)	1.4×10^8	10	17.0~17.7
	3				
III	1		6.1×10^7		
	2	92F1-0423 (無)	6.1×10^6	10	19.0~19.7
	3		6.1×10^5		
IV	1	92F1-0423 (無)	7.1×10^7		
	2	98C4-0406 (無)	4.3×10^7	60	18.6~19.2
	3	"	4.3×10^7		

表4 網もみ後の菌浴条件

試験	試験区	供試尾数	へい死 尾数	へい死率 (%)	へい死魚の菌 分離割合*	観察 日数	飼育水温 (°C)
I	1	10	10	100	9/10	14	15.4~17.3
	2	10	1	10	1/1	14	(平均16.1)
II	1		10	100	10/10		
	2	10	10	100	10/10	14	16.2~17.9
	3		2	20	2/2		(平均17.1)
III	1		10	100	8/10		
	2	10	1	10	1/1	14	18.1~19.6
	3		6	60	5/6		(平均18.7)
IV	1		4	40	4/4		
	2	10	1	10	1/1	10	18.3~19.3
	3		1	10	1/1		(平均18.8)

* 腎臓および外観患部から分離

いてこの方法による人為感染の再現性について検討したところ、高いへい死率は得られなかった。その原因としては供試魚の由来の違いがあげられ、試験 I~III の供試魚は海産であるのに対し、再現性試験では人工産である。なお、網もみ処理なしに菌浴した場合は10%以下のへい死率であった。

腹腔内接種法 表5に腹腔内接種結果を示した。攻撃菌は、馬血清を10%添加した改変サイ

表5 腹腔内接種結果

実施 年度	試験区	使用菌株 (魚体通過 の有無)	接種菌量 (CFU/尾)	供試魚			へい死 尾数	へい死 率(%)	へい死魚 の菌分離 割合*1	観察 日数	飼育 水温 (°C)
				由来	平均 体重(g)	尾数					
6年	1	92F1-0423	1.3×10^6				6	60	6/6		
	2		1.3×10^5	海産	15	10	2	20	2/2	37	13.8~15.0
	3	(無)	1.3×10^3				5	50	4/4		(平均14.5)
	4		1.3×10^1				3	30	3/3		

*1 腎臓および外観患部から分離

*2 接種菌液量は0.1ml

トファガ寒天培地を用いて3日間18°Cで培養し、0.85%滅菌生理食塩水で希釈して所定濃度の菌液を調整した。接種部位は腹鰭後方から少し上の体側とした。その結果、 1.3×10^6 CFU/尾の接種菌量で最も高いへい死率(60%)を示したものの菌量に応じたへい死率は得られなかった。なお、へい死魚には鰓や肝臓の貧血および体の穴あき症状がみられ、へい死魚からは供試菌が再分離された。

筋肉内接種法 筋肉内接種結果を表6に示した。攻撃菌は腹腔内接種法と同じ方法で培養し、接種菌液量は0.05ml/尾とした。試験Iでは海産アユを用いて水温別感受性を12~18°Cで検討した

表6 筋肉内接種結果

試験 年度	実施 年度	試験区	使用菌株 (魚体通過 の有無)	接種菌量 (CFU/ 尾)	接種 部位	供試魚			へい死 尾数	へい死 率(%)	へい死魚 の菌分離 割合*1	飼育 水温 (°C)
						由来	平均 体重(g)	尾数				
I	9年	1							16	80	15/16	11.7~12.2 (平均11.9)
		2	PT87024 (有, 1回)	2.6×10^8	体側	海産	17	20	11	55	11/11	14.7~15.2 (平均15.0)
		3							5	25	2/5	17.6~18.4 (平均17.9)
II	10年	1	92F1-0423	4.1×10^8	尾柄部	人工産	2	10	10	100	10/10	17.8~19.4
		2	(無)		背部後方				10	100	4/10	(平均18.6)
III	"	1		9.5×10^7					10	100	10/10	
		2	92F1-0423	9.5×10^5	背部後方	人工産	2.2	10	0	0	-	17.8~19.4
		3	(無)	9.5×10^3					1	10	1/1	(平均18.6)
		4		9.5×10^7	体側	人工産	2.2	10	8	80	6/8	

*1 腎臓および外観患部から分離

*2 観察日数14日

ところ、水温が低い程高いへい死率を示した。試験ⅡおよびⅢでは接種部位について検討した。部位が体側、尾柄部および背部後方とも感染は成立したが、試験Ⅱの背部後方（接種菌量 4.1×10^8 CFU/尾）では接種翌日にほとんどの魚がへい死し、この部位では感染が強過ぎると思われた。なお、いずれの試験ともへい死魚には貧血症状がみられ、試験Ⅰの3区および試験Ⅱの2区以外では供試菌が高率で再分離された。

皮下接種法 皮下接種結果は表7に示したとおりで、菌株による病原性の差、接種菌量および種苗の由来別感受性について検討した。攻撃菌は1回魚体通過を行った後、改変サイトファガ寒天培地（寒天はDIFCO製のBACTO AGAR）を用いて18°C24時間培養を3回繰り返した。菌液の調整は滅菌淡水で行い、接種部位は背鰭基部後端と側線の中間の部分で、皮下に0.05ml/尾接種した。菌株毎のLD₅₀は、92F1-0423株が $3 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$ CFU/尾（試験Ⅱ、Ⅲ）、PH9304株が 10^8 CFU/尾以上であった。また、試験Ⅰから98C2-0128株および99C1-0111株は92F1-0423株と同等の病原性を

表7 皮下接種結果

試験年度	実施試験区	使用菌株	接種菌量 (CFU/尾)	供試魚 由来	平均体重 (g)	尾数	へい死 尾数	へい死 率(%)	へい死魚 の菌分離 割合*1	観察 日数	飼育水温 (°C)
Ⅰ 11年	1	PH9304	1.5×10^8			21	3	14	3/3		15.0~19.1*2
	2		1.5×10^7			21	1	5	1/1		
	3	92F1-0423	2.2×10^8			21	10	48	10/10		
	4		2.2×10^7	海産	37	21	6	29	6/6	17	
	5	98C2-0128	1.9×10^8			20	11	55	11/11		
	6		1.9×10^7			21	7	33	7/7		
	7	99C1-0111	1.6×10^8			21	14	67	13/14		
	8		1.6×10^7			21	15	71	14/15		
Ⅱ 11年	1		1.0×10^8				11	44	11/11		15.3~16.0 (平均15.7)
	2	PH9304	1.0×10^7	海産	20	25	1	4	1/1	17	
	3		1.0×10^6				0	0	—		
	4		1.5×10^8				18	72	11/11		
	5	92F1-0423	1.5×10^7	海産	20	25	10	40	10/10	17	
	6		1.5×10^6				5	20	4/5		
Ⅲ 11年	1		1.4×10^8			26	25	96	9/9		15.8~16.7 (平均16.1)
	2	92F1-0423	1.4×10^7	海産	12.2	25	19	76	15/16	15	
	3		1.4×10^6			24	6	25	6/6		
	4		1.4×10^8			24	23	95	8/8		
	5	92F1-0423	1.4×10^7	人工産	11.6	25	24	96	19/20	15	
	6		1.4×10^6			25	9	36	9/9		

*1 腎臓および外観患部から分離

*2 冷却装置故障のため、試験開始後1~4日目までは18.4~19.1°C、その他は15~16°C

示した。このように菌株により病原性に差がみられ、92F1-0423株は約16℃の水温下で安定したへい死率を得ることができた。次に、海産と人工産を用いて種苗の由来別感受性について検討したところ、試験Ⅲの結果から水温16℃では種苗間に感受性の差はみられなかった。なお、各試験におけるへい死魚には注射部の潰瘍、鰓や肝臓の貧血等が認められ、へい死魚からは概ね供試菌が再分離された。

以上のように、各種方法で冷水病の人為感染を試みたところ、病原性の強い菌株を用いた皮下接種法により安定したへい死率を得ることができた。しかし、供試魚の由来によってはへい死率に差があることが網もみ後の菌浴法で示唆されており、今後、この点について検討する必要があると考えられる。