

## 5 2) アユの細菌性出血性腹水病（シュードモナス病）感染試験

山本充孝

【目的】ワクチンの有効性判定や薬剤の効果判定試験等のためには再現性の高い感染手法の開発が求められる。そこで、本試験では腹腔内注射法、浸漬法および経口投与法の3つの方法でアユにおける細菌性出血性腹水病（シュードモナス病）菌の人為感染試験を試みた。

### 【方法】

**供試菌株:**アユ病魚由来の *Pseudomonas plecoglossicida*FPC941 株をアユに腹腔内接種後、再分離したものを用いた(-85℃保存)。保存菌株をハートインフュージョン(HI)寒天培地で25℃・24時間培養後、滅菌生理食塩水に懸濁して希釈系列を作り、3段階の菌液を調製した。

**供試魚:**2001年11月に琵琶湖エリで採捕され滋賀県水産試験場で飼育された平均体重3.5gのアユを用いた。

**感染試験:**攻撃方法として腹腔内注射法、浸漬法および経口投与法の3つの方法を用いた。

- ① **腹腔内注射法** 調整した菌液を供試魚1尾あたり0.05ml腹腔内接種した。接種菌量は、 $2.4 \times 10^1$ 、 $2.4 \times 10^2$ および $4.9 \times 10^2$ CFU/fishとした。対照区は同量の滅菌生理食塩水を接種した。
- ② **浸漬法** 調整した菌液を飼育水で希釈し、8Lの菌液に供試魚を収容し通気しながら、10分間浸漬した。浸漬液の菌濃度は、 $6.7 \times 10^4$ 、 $6.7 \times 10^5$ および $6.7 \times 10^6$ CFU/mlとした。なお、対照区は菌液を含まない同量の飼育水に浸漬した。浸漬時の水温は17.5℃とした。
- ③ **経口投与法** 調整した菌液に1%のCMC（ナトリウム塩）を添加し、ゾル状化した後、連続分注器にカテーテルを装着したものを用いて0.1mlを胃内に強制的に投与した。供試魚1尾あたりの接種菌量は、 $2.4 \times 10^5$ 、 $2.4 \times 10^6$ および $2.4 \times 10^7$ CFU/fishとした。対照区は菌液の代わりに滅菌生理食塩水をゾル状化して投与した。

また、人為感染後、60cmアクリル製水槽に供試魚を腹腔内注射法および浸漬法では25尾経口投与法では26尾ずつ収容し、毎日実験魚の観察と水温の測定を行い、18日間、18℃の地下水による流水飼育を行った。なお、給餌はアユ用配合飼料を日間給餌率0.5%で投与した。

**死亡原因の特定:**死亡は腎臓からHI寒天培地を用いて再分離を行い、抗*P.plecoglossicida*FPC941ウサギ血清を用いたスライド凝集テストにより分離菌が*P.plecoglossicida*であることを確認した。

【結果および考察】以下の3つの感染実験における試験期間中の水温は16.1~17.8℃であった。また、死亡魚の症状は何れの感染方法においても、鰓の軽度の貧血、出血性腹水の貯溜が認められた。死亡魚から原因菌が分離されなかった個体は腹腔内注射法で1尾、浸漬法で2尾、経口投与法で1尾であった。この4尾は試験結果から除外して3つの感染試験結果を図1、図2および図3に示した。

本試験では腹腔内注射法、浸漬法および経口投与法の3つの方法で50%以上の死亡率が得られた。また、3つの人為感染方法において、接種菌量が増すほど死亡率が高くなり、また死亡するまでの期間が短くなっていることから、再現性が高いと思われる。

したがって、何れの感染方法も種々の試験の効果判定法として用いることができると考えられる。また、感染方法の選択は評価する対象によって決定する必要があると考えられる。

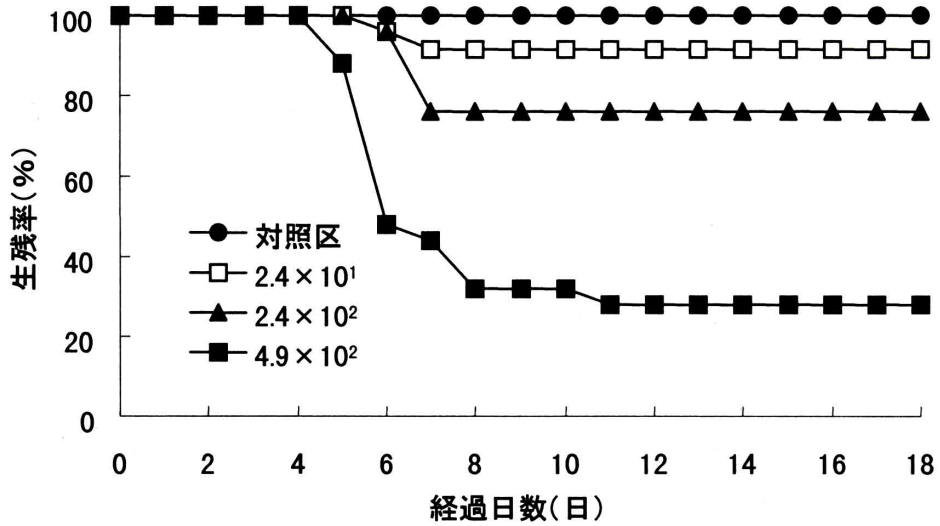


図1. アユのシュードモナス病菌腹腔内注射感染における生残率

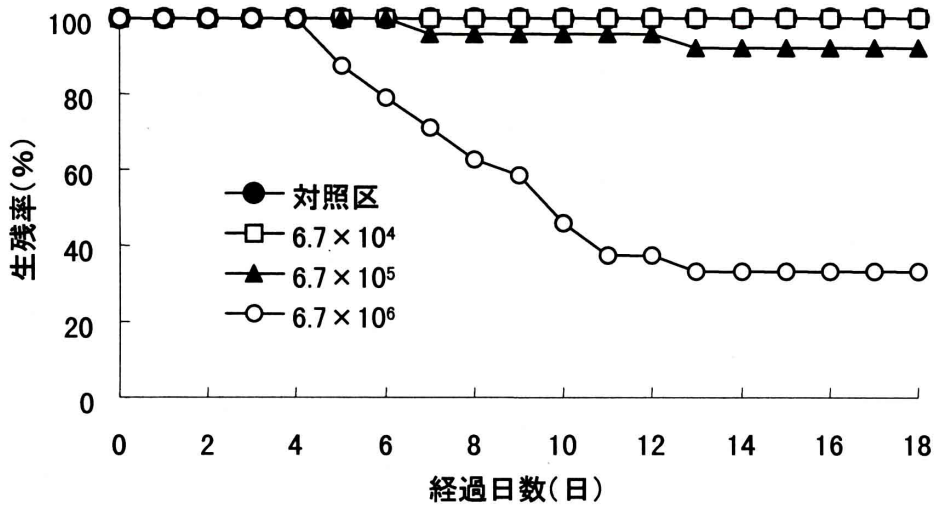


図2. アユのシュードモナス病菌浸漬感染における生残率

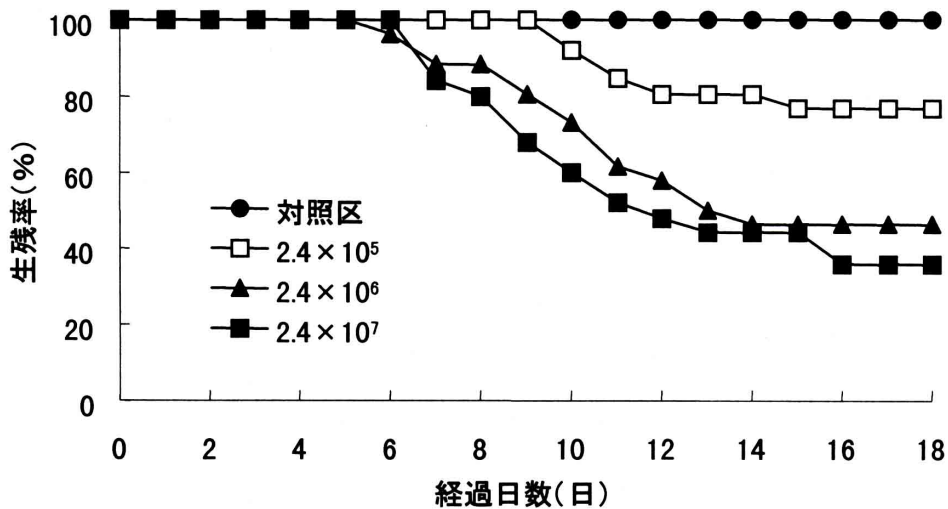


図3. アユのシュードモナス病菌経口感染における生残率