

## 8) 皮下注射法によるアユ冷水病人為感染試験

山本充孝・二宮浩司

**【目的】** アユ冷水病は自然感染では容易に発病するが、培養菌体を用いて皮下注射法で感染試験を行うと、安定した死亡が認められず再現性が低いことが知られている。そこで、我々は1998年に飼育水温を15および19°Cで皮下注射法を用いて感染実験を行ったところ、15°Cの方が死亡率は高かった。このことから、本試験では飼育水温を15.5°Cで統一して攻撃手法として適当と思われる菌株、供試魚の大きさを検討するため、皮下注射法による感染試験を行った。

### 【方法】

**供試魚:** 供試魚は平均体重10、17および40gの3群のアユを1試験区に10尾ずつ用いた。なお、冷水病発病歴のないアユが入手できなかったためすべて発病歴のあるアユを用いた。

**供試菌株:** 供試菌株はアユ病魚由来の *Flavobacterium psychrophilum* (SG990302: 滋賀株、PH9304: 広島株、FPC840: 東大株) 3菌株を用いた。

**菌液の調製:** 凍結保存株を改変 *Cytophaga* 寒天培地で15°C、3日間培養後、同様の条件で継代し1日培養したものを滅菌地下水に懸濁して希釈系列を作製した。それぞれの試験で $10^5 \sim 10^8$  CFU/fishの範囲で段階希釈した6または4段階の菌液を感染試験に供した。

**試験区の設定:** 各魚体重の供試魚に3菌株を用いて感染試験を行った。

**攻撃および飼育方法:** 攻撃は皮下注射法で行い、背鰭基部前端部に供試魚1尾あたり50 $\mu$ Lを接種した。接種後、それぞれ60cm水槽に収容し、水温15.5°Cの地下水を用いて10または11日間流水飼育した。給餌は市販飼料を適時与えた。また、へい死魚がみられた場合には死因を特定するための検査を行った。

**攻撃試験結果の評価:** 結果からLD<sub>50</sub>(半数致死濃度)を求めて攻撃試験の評価を行った。なお、本試験は1999年7~8月に実施した。

**【結果】** アユの冷水病原因菌の皮下注射法による感染試験結果を表1に、それぞれの供試魚の大きさおよび供試菌株におけるLD<sub>50</sub>を表2に示した。

攻撃菌株間の比較では病原性はSG990302株が他の2株より高い傾向を示した。また、供試魚の魚体重とLD<sub>50</sub>の間に大きな差は認められなかった。また、供試魚の接種部位には $10^7$  CFU/fish接種区以上の濃度区すべてに3日目から出血が認められ、4日目には膨隆患部が形成された。その後大半の個体では潰瘍状の病変を形成したが、死亡しない個体も認められた。この潰瘍症状は一部の個体では治癒する傾向を示したが、進行する傾向はなかった。また、接種後7日目までは死亡したすべてのアユの腎臓または患部から冷水病菌が分離されたが、それ以降の死亡魚からの検査においては、冷水病様の症状を示して死亡するものの再分離率は極端に低下した。

以上のことから、皮下注射法を用いて感染試験を行う場合、供試魚の大きさには影響はなく、菌株にはSG990302株を用いる方法がよいと考えられた。なお、本試験では冷水病歴のあるアユを用いて試験を行ったため、今後は発病歴のないアユを用いた場合と比較する必要がある。

表1 アユの冷水病原菌の皮下注射法による感染試験結果

平均 体重 (g)	供試 菌株	接種菌の希釈系列 (CFU/fish)						
		接種菌量 * <sup>1</sup>	$2.6 \times 10^7$	$8.7 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$	$9.6 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$
10	FPC840	接種菌量 * <sup>1</sup>	$2.6 \times 10^7$	$8.7 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$	$9.6 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$
		死亡率 (%)	60	10	0	0	0	0
10	PH9304	接種菌量	$4.1 \times 10^8$	$1.4 \times 10^8$	$4.5 \times 10^7$	$1.5 \times 10^7$	$5.0 \times 10^6$	$1.7 \times 10^6$
		死亡率 (%)	20	20	10	0	10	0
10	SG990302	接種菌量	$2.6 \times 10^8$	$8.6 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$9.6 \times 10^6$	$3.2 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$
		死亡率 (%)	100	90	40	20	10	0
17	FPC840	接種菌量	$3.2 \times 10^8$	$1.1 \times 10^8$	$3.6 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$4.0 \times 10^6$	$1.3 \times 10^6$
		死亡率 (%)	10	0	0	0	0	0
17* <sup>2</sup>	PH9304	接種菌量	$2.2 \times 10^8$	$7.3 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$	$8.1 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6$	$9.0 \times 10^5$
		死亡率 (%)	0	10	20	0	0	0
17	SG990302	接種菌量	$9.5 \times 10^7$	$4.8 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$5.9 \times 10^6$	$3.0 \times 10^6$
		死亡率 (%)	100	90	70	60	50	30
40	FPC840	接種菌量	$2.6 \times 10^7$	$8.7 \times 10^6$	$2.9 \times 10^6$	$9.6 \times 10^5$	$3.2 \times 10^5$	$1.1 \times 10^5$
		死亡率 (%)	10	0	0	0	0	0
40	PH9304	接種菌量	$1.7 \times 10^8$	$5.6 \times 10^7$	$1.9 \times 10^7$	$6.2 \times 10^6$		
		死亡率 (%)	0	0	0	0		
40	SG990302	接種菌量	$2.7 \times 10^8$	$9.1 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$		
		死亡率 (%)	90	50	44.4	10		

\*<sup>1</sup> 接種菌量 (CFU/fish)

\*<sup>2</sup>  $10^8$  より  $10^7$  CFU/fish で接種した場合に死亡率が高くなり実験的に不成立となった

表2 それぞれの種苗の大きさおよび供試菌株における LD<sub>50</sub> (CFU/fish)

平均体重 (g)	SG990302 (滋賀株)	PH9304 (広島株)	PT87024 (東大株)
10	$3.6 \times 10^7$	$>4.1 \times 10^8$ (20%) * <sup>1</sup>	$2.1 \times 10^7$
17	$2.9 \times 10^7$	不成立	$>3.2 \times 10^8$ (10%)
40	$5.1 \times 10^7$	$>1.7 \times 10^8$ (0%)	$>2.6 \times 10^7$ (10%)

\*<sup>1</sup> LD<sub>50</sub> が得られなかったものは、最高攻撃菌数とその濃度における死亡率(%)を示した