循環式 IPN ウイルス感染実験系の精度について

岡本 信明, 三上 益弘, 長原 聡, 木下 仁徳
福田 穎穂, 秋山 修輝, 佐野 徳夫

(1987 年 1 月 14 日受理)

A Study on a Reproducible Challenge System for IPN Virus in Rainbow Trout

Nobuaki Okamoto,*¹ Masuhiro Mikami,*² Satoshi Nagahara,*¹
Hironori Kinoshita,*¹ Hideo Fukuda,*¹ Nobuteru Akiyama,*¹
and Tokuo Sano*¹

A water-recirculating system instead of a conventional flow-through system was studied for the reason that experimental water which was recirculating in an aquarium during the fish infectivity trials for IPN virus (IPNV) can be completely disinfected by a small amount of chlorine. The required numbers of fish for an aquarium and of aquaria for an experiment in the water-recirculating system developed was determined. Fish and virus used in this study were rainbow trout fry (*Salmo gairdneri*, 0.11–0.14 g in B.W.) and IPNV-Buhl. Fish were exposed to $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml of IPNV and incubated for 28 days at 15°C. The experiments revealed the following facts: Twenty-five fish per aquarium were required as a minimum. In the case of approximately 35–70% in cumulative mortalities, 2, 4 and approximately 8 aquaria per experiment were required respectively when 90% of all the experimental values occupied the mean ± 15 (%), ± 10 (%) and ± 5 (%). In the case of approximately 90% in cumulative mortalities, 2 aquaria per experiment were required when approximately 95% of all the experimental values occupied the mean ± 5 (%).

IPN (infectious pancreatic necrosis, 伝染性膵臓壊死症)は、魚類ウイルス病の中でも IHN (infectious hematopoietic necrosis, 伝染性造血器壊死症)とともに、被害が激烈な伝染病の一つである。本病は、1960 年に Wolf *et al.* が初めて原因ウイルスの分離に成功してウイルス病であることが確認された疾病で、その後の魚類ウイルス病の研究発展の端緒を開いた疾病でもある。¹⁻²⁾ また、わが国の IPN に関しては、Sano³⁾ が 1969 年、初めて IPN ウイルスを分離し、わが国における魚類ウイルス学ならびに魚類ウイルス病の研究に先鞭をつけた。それだけに、この疾病あるいはその病原体である IPN ウイルスに関する研究は、他の魚類病原ウイルスのそれとは比較にならないほど多く、その範囲も、自然発病例や宿主域に関するものから、ウイルスの分類、ウイルス粒子の生物物理学的性質、分子生物学的な研究に至るまで幅広い。

Hill⁴⁾ は IPN ウイルスとその病原性について総説し、その中で感染実験に基づく IPN のウイルス病原性に関

する研究が、ウイルスの毒力 (virulence) や魚の抵抗性を比較したりする上で重要であるにもかかわらず、ほとんどなされていないことを指摘している。その要因として 2 つの理由が存在するように思われる。その一つは、ニジマスまたはカワマスの稚魚を用いた感染実験ではその結果の再現性に不安定さがあったことが考えられる。その証拠に、IPN 研究のための感染実験系の確立の必要性がこの分野の研究者によって強調されている⁴⁻⁶⁾ もう一つの理由は、IPN ウイルスが様々な消毒剤に対してかなり安定であることである。例えば、活性塩素は感染実験後の排水中の IPN ウイルスの不活化に用いられているが、水中に存在する有機物が有効塩素量を著しく減ずることが報告されている。すなわち 50 mg/l 濃度の塩素液中に 0.7% になるようにウシ血清を添加すると、 $10^{6.3}$ TCID₅₀/ml の IPN ウイルスは 5 分間では不活化されず、水中の有効塩素が 30 mg/l の濃度で残留しているにもかかわらず、完全に IPN ウイルスを不活化するのに 30 分もの接触時間を必要とするとされている。⁷⁾ それ故に、

*¹ 東京水産大学 (Laboratory of Fish Pathology, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato, Tokyo 108, Japan).

*² 富士通株式会社 (Fujitsu Co., Ltd., Shinkamata 1, Ota, Tokyo 144, Japan).

流水式飼育装置から大量に排出される, IPN ウイルスを含んだ汚染水を完全に不活化するには, 大量の塩素処理が継続的に必要となる。このことも実験規模の拡大を妨げていた。本研究では, この点を解消するために, 飼育可能期間に限られるという欠点はあるが, 従来, マス類の実験のために使われてきた流水式飼育装置に代わって, 循環式飼育装置を用いた。

循環式感染実験装置を用いて行う感染実験では, 実験水槽あたりの供試尾数が多いほど, 個々の実験区のへい死率の振れ幅が小さくなることが予想される。故に, へい死率の分散も小さくなると考えられる。しかし, 供試魚の確保や実験期間, 実験中の水質の悪化などの問題が

あるため, へい死率の分散や平均値に差がない範囲で, できるだけ供試尾数が少ない実験区の設定が望まれる。そこで本研究では, 実験水槽あたりの供試尾数と, 供試実験水槽数およびへい死率との関係を明らかにし, 同実験装置での実験水槽あたりの必要供試尾数, および必要供試実験水槽数を定めることを目的とした。

実験方法

循環式感染実験装置 循環式感染実験装置は以下の通りである。L 型アングル (4×4 cm) でわくを作り, 底面および側面を防水化粧板 (厚さ 1 cm) で囲った。保温効果を高めるため, 内面に発泡スチロール (厚さ 2 cm) を

Fig. 1. Scheme of a water-recirculating system for fish infectivity trials. The arrows indicate water movement. (a) System. (b) Aquarium.

敷き、さらに、塩化ビニールシート (厚さ 0.2 mm) を二重に敷いた。ここに水を入れて外水槽 (240×90×25 cm) とした。この外水槽を二段重ねにし、塩化ビニールパイプで上下の外水槽をつなぎ、クーラー (オリオン電気, HC-200, 最大冷却水量 400 l, 循環水量 26 l/min) のポンプを利用して水を循環させた。外水槽の水温調整は、クーラーに設備された電子式サーモスタットと、ロバートショウ式サーモスタットに接続された 1 kw のヒーターで行った。水温の安定を図るために、外水槽全体を発泡スチロール (厚さ 2 cm) で覆った。この外水槽に市販の飼育水槽 (トモフジ製, 22.0×35.0×25.5 cm, プラスチックウールを敷いた上面ろ過器を付設) を 8 個ずつ 2 列に並べ、合計 16 個ずつを上下の外水槽内に設置した。飼育水槽の水温は、外水槽の循環水によって間接的に調整した (Fig. 1)。なお同装置を用いた場合の飼育水温は、室温の相違にかかわらず 5~20°C の設定水温の範囲で、ほぼ設定水温 $\pm 1^\circ\text{C}$ を維持できた。実験水槽水の水質については特に検査しなかった。

供試ウイルスとウイルス液の調製 本研究で使用する IPN ウイルス-Buhl は、Dr. K. Wolf (National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, West Virginia, USA) から譲渡されたもので、RTG-2 細胞⁹⁾ でクローン純化 1 回、継代 18 回されたものである。供試ウイルス液の調製は、Okamoto *et al.*⁹⁾ を一部変更して行った。RTG-2 細胞 (約 6×10^4 細胞/cm²) に MOI = 0.01 でウイルスを接種し、15°C で約 1 週間培養した。CPE が完全に出現した後、ウイルス液中の細胞残さを 450 nm のメンブランフィルターで除去し、pH を 6.0~7.0 に調節して、2 ml ずつスクリーキャップ付きバイアルに小分けし、-20°C または -80°C に保存した。感染実験には、小分けして保存されている供試ウイルスをその都度融解して用いた。-20°C および -80°C での保存時における供試ウイルス力価の減少は全く認められず、保存後 24 ヶ月でも、保存直後と同じ $10^{7.8}$ TCID₅₀/ml のウイルス力価を保持していた。なお、ウイルス力価の測定は、RTG-2 細胞を用い、マイクロタイター法で常法に従って 15°C で行った。

供試魚および感染実験 供試魚には以下のニジマス稚魚 (*Salmo gairdneri*) を用い、同様な実験を 3 回 (実験 1, 実験 2 および 実験 3) 行った。

実験 1 東京都の T ふ化場産ニジマス稚魚、餌付け後 35 日、魚体重 0.14 g

実験 2 静岡県東の F ふ化場産ニジマス稚魚、餌付け後 14 日、魚体重 0.11 g

実験 3 埼玉県東の K ふ化場産ニジマス稚魚、餌付け後 7 日、魚体重 0.11 g

実験区として、実験水槽あたりの供試尾数が 15 尾、

25 尾、35 尾の 3 種類を設定した (以後、15 尾実験区、25 尾実験区、35 尾実験区と呼称する)。実験 1 では、15 尾実験区、25 尾実験区および 35 尾実験区に対し、実験水槽をそれぞれ 15 個、14 個および 16 個設置し、実験 2 では、それぞれ 16 個、18 個および 16 個、実験 3 では、それぞれ 20 個、19 個および 19 個設置した。実験 1, 実験 2 および 実験 3 とともに、各実験区には、対照区としてそれぞれ 2 個の実験水槽を設置した。ウイルス接種は浸漬法によって行った。浸漬接種の 24 時間前から絶食させておいた供試魚から無作為に抽出した 50 尾を水量 500 ml のビーカー (容量 1000 ml) に入れた後、ウイルス液 2 ml を加え、通気しながら 15°C で 1 時間浸漬した。浸漬用のビーカーは必要数準備した。浸漬接種時のウイルス力価は $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml であった。浸漬接種後、体表のウイルス液を洗い流した後、実験水槽に 15 尾実験区では 15 尾、25 尾実験区では 25 尾、35 尾実験区では 35 尾を収容した。対照区ではウイルス液に換えて MEM-10 (10% ウシ胎児血清加 minimum essential medium) を用い、実験区と全く同様に行った。実験期間中の供試魚への給餌は、飽食量の約 80% を 1 日に 2 回に分けて与えた。供試魚の魚齢には餌付け後の経過日数を用いた。供試魚の魚体重の測定は以下の方法で行った。浸漬接種直前に供試魚から無作為に 20 尾を取り上げ、50 ppm ペラアミノ安息香酸エチル (ベンゾキン) にて麻酔した後、体表面についた水分を吸い取り紙 (キムワイプ) にて拭き取り、個体ごとに電子上皿天秤を用いて測定した。なお、魚体重の分散は無視できるほど小さかったので、魚体重は平均値のみで表した。へい死魚は毎日取り上げ、これを基にへい死率を計算し、累積へい死率として用いた。対照区のへい死率は 2 個の実験水槽の結果の平均値として表した。感染実験期間は 28 日間、実験期間中の水温は $15 \pm 1^\circ\text{C}$ であった。

結果および考察

実験 1, 実験 2 および 実験 3 の結果を Table 1 に示した。実験 1 では、15 尾実験区、25 尾実験区および 35 尾実験区のへい死率の平均値 $\pm$ 標準偏差は、それぞれ 37 ± 20.3 (%), 39 ± 12.8 (%), および 42 ± 11.4 (%) であり、実験 2 ではそれぞれ 68 ± 15.8 (%), 66 ± 10.4 (%), および 67 ± 8.9 (%), 実験 3 ではそれぞれ 97 ± 3.9 (%), 97 ± 3.8 (%), および 96 ± 3.7 (%) であった。なお対照区のへい死率は、実験 1 では 15 尾実験区で 0%, 25 尾実験区で 5%, 35 尾実験区で 3% であり、実験 2 では 15 尾実験区で 0%, 25 尾実験区で 6%, 35 尾実験区で 3%, 実験 3 では 15 尾実験区で 24%, 25 尾実験区で 10%, 35 尾実験区で 13% であった。

Table 1. Cumulative mortalities obtained from IPNV-infectivity trials with different density of fish

Number of fish per aquarium		Cumulative mortality (%) of fish	
		Control aquarium	Experimental aquarium (mean $\pm$ SD)
Exp. 1	15*	0	21.4, 40.0, 44.0, 71.4, 66.7, 6.7, 25.0, 61.0, 12.5, 53.3, 21.4, 26.7, 35.7, 56.3, 13.3 (37 $\pm$ 20.3)
	25	5	24.0, 52.0, 16.0, 32.0, 52.0, 20.8, 33.3, 33.3, 44.0, 40.0, 44.8, 53.8, 60.7, 40.0 (39 $\pm$ 12.8)
	35	3	28.6, 18.2, 54.3, 40.0, 50.0, 48.6, 45.7, 32.4, 52.9, 58.9, 48.6, 30.6, 35.5, 56.0, 45.5, 30.0 (42 $\pm$ 11.4)
Exp. 2	15*	0	87.5, 100, 60.0, 71.4, 80.0, 60.0, 82.4, 78.6, 60.0, 66.7, 64.3, 46.6, 86.7, 43.8, 60.0, 46.6 (68 $\pm$ 15.8)
	25	6	87.0, 84.0, 76.0, 72.0, 80.0, 76.0, 75.0, 68.0, 68.0, 64.0, 72.0, 56.0, 64.0, 44.0, 76.0, 72.0, 60.0, 56.0 (66 $\pm$ 10.4)
	35	3	79.4, 76.5, 60.0, 68.6, 65.7, 68.6, 75.0, 55.6, 57.1, 85.7, 65.7, 71.4, 68.6, 50.0, 65.7, 62.9 (67 $\pm$ 8.9)
Exp. 3	15	24	87.0, 92.9, 93.3, 93.3, 93.3, 100, 100, 93.3, 100, 100, 100, 100, 100, 92.9, 100, 100, 93.8, 93.3, 100 (97 $\pm$ 3.9)
	25	10	66.0, 100, 100, 95.8, 100, 100, 100, 96.0, 96.0, 96.0, 100, 96.0, 100, 96.0, 96.2, 83.3, 95.8, 92.3, 95.8 (97 $\pm$ 3.8)
	35	13	97.3, 93.8, 96.9, 94.3, 94.3, 100, 100, 97.1, 97.2, 90.2, 85.3, 97.2, 100, 100, 94.1, 94.1, 100, 97.1, 92.7 (96 $\pm$ 3.7)

* Statistically significant (*F*-test, $p < 0.05$) differences are indicated to 25 fish or 35 fish per aquarium.

実験 1, 実験 2 ともに, 供試尾数を増やすことでへい死率の分散は小さくなった。そこで, 各実験区のへい死率の分散が等しいと見なしうかどうかを確かめるために, 実験値が正規分布をするとみなして *F*-比を求め, 等分散の検定を行った。その結果, 実験 1, 実験 2 ともに, 有意水準 0.05 で, 35 尾実験区と 25 尾実験区との間には, へい死率の分散に有意差は認められなかった。一方, 15 尾実験区と 25 尾実験区および 15 尾実験区と 35 尾実験区の間には, へい死率の分散に有意差が認められた。35 尾実験区と 25 尾実験区とは, へい死率の分散に差は認められなかったもので, さらに, 両実験区のへい死率の平均値が等しいと見なしうかどうかを確かめるために *t*-比を求め, 平均値の差の検定を行った。その結果, 実験 1, 実験 2 ともに, 有意水準 0.01 で, 平均値に有意差は認められなかった。実験 3 では, 供試尾数が違っても, それらの間にへい死率の分散および平均値に差は認められなかった。以上の結果は, へい死率が低い場合には, 実験水槽間のへい死率の分散が大きくなることを示しており, さらにその傾向は, 一実験水槽あたりの供試尾数が少ない場合に, より顕著に現れることが明らかとなった。特に実験 1 および実験 2 で, 15 尾実験区のへい死率と 25 尾実験区および 35 尾実験区のへい死率の間において, 有意水準 0.05 でその分散に有意差が認められたことから, 実験には, 少なくとも一実験水槽あたり 25 尾を供試する必要があると思われた。実験 1 および実験 2 では, 25 尾実験区および 35 尾実験区ともに, 得られ

たへい死率には実験水槽間のバラツキが存在したが, どちらの実験区においても, その平均値に差は認められなかった。

実際に実験を行うにあたっては, 限られた実験場所を有効に使用するため, 一実験区に供試する実験水槽数は, 精度が同じなら少ない方がよい。ここでは, 実験 1, 実験 2 および実験 3 の 25 尾実験区および 35 尾実験区で得られた実験水槽別のへい死率を用い, 実験水槽が 1 個から 15 個 (実験 1 の 25 尾実験区は 1 個から 14 個) まで使われた場合に得られるへい死率の平均値の出現頻度を求めた。例えば, 実験 1 の 25 尾実験区では供試実験水槽数は 14 個なので, 得られた実験水槽別のへい死率も 14 例ある。この 14 例のへい死率は最高 60.7%, 最低 16.0% とばらつきがあるが, 同一実験条件下で得られた結果である (Table 1)。この 14 例の実測値の平均値 (%) を中心に, 前後 5 (%) 間隔で出現頻度を示したのが Table 2 の 25 尾実験区, 実験水槽数 1 の数値である。もし感染実験が実験水槽 2 個を用いて行われたと仮定した場合には, それら 14 例のへい死率の中から高いへい死率を示したものが 2 例の場合や, 逆に低いへい死率を示したものが 2 例の場合など, 様々な組合せが有り得る。そこで 14 例のへい死率から 2 例ずつ取る組合せを考え, 組合せから得られた 2 例のへい死率の平均値を求めた (以後, 実測値の組合せから得た計算上の平均値を組合せの平均値と呼称する)。そして, これら 2 例ずつ取る組合せの平均値の出現頻度を実測値の平均値を中心

Table 2. Relationship between the appearance-frequency of the mean of cumulative mortality of fish due to IPNV and the required number of aquarium in Experiment 1

Number of fish per aquarium	Number of aquarium per experiment*1	Appearance-frequency of the cumulative mortality in percent*2										
		-25	-20	-15	-10	-5	Mean (39)	+5	+10	+15	+20	+25
25	1	7	14	0	21	0	21	7	21	0	7	
	2	1	3	11	15	23	18	16	9	3	0	
	3	0	2	6	18	28	23	17	5	1	0	
	4	0	0	4	16	31	29	15	3	0	0	
	5	0	0	2	15	36	33	13	1	0	0	
	6	0	0	1	13	40	37	10	0	0	0	
	7	0	0	0	10	44	39	6	0	0	0	
	8	0	0	0	7	49	40	4	0	0	0	
	8	0	0	0	4	52	42	2	0	0	0	
	10	0	0	0	2	56	42	0	0	0	0	
	11	0	0	0	0	59	41	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	65	35	0	0	0	0	
	13	0	0	0	0	57	43	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	
35		-25	-20	-15	-10	-5	Mean (42)	+5	+10	+15	+20	+25
	1	6	0	19	13	6	13	19	19	6	0	
	2	0	4	7	14	23	25	18	10	0	0	
	3	0	1	5	15	28	31	17	4	0	0	
	4	0	0	2	14	32	35	15	1	0	0	
	5	0	0	1	12	36	38	12	0	0	0	
	6	0	0	0	9	40	42	9	0	0	0	
	7	0	0	0	7	44	44	6	0	0	0	
	8	0	0	0	4	46	46	4	0	0	0	
	9	0	0	0	2	49	46	2	0	0	0	
	10	0	0	0	1	50	48	1	0	0	0	
	11	0	0	0	0	52	48	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	52	48	0	0	0	0	
	13	0	0	0	0	54	46	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	53	48	0	0	0	0	
	15	0	0	0	0	56	44	0	0	0	0	

*1 In the case of which the number of aquarium per experiment was one, the appearance-frequency was calculated direct from the data shown at Table 1. In the cases such as the number of aquarium of 2-14 or 2-15, the appearance-frequency was calculated from the mean of the combination based on the data shown at Table 1.

*2 The appearance-frequency of the cumulative mortality was shown as the mean was at the center and intervals were set 5% on the center.

に前後 5 (%) 間隔で示したのが Table 2 の 25 尾実験区, 実験水槽数 2~14 に示した数値である。その結果, 実験 1 のようにへい死率が 35~40% 程度の低いへい死率のときには, 25 尾実験区では一実験区あたり 2 個の実験水槽を使用した場合, 組合せの平均値の約 90% が実測値の平均値 ± 15 (%) の範囲入り, これを 4 個にした場合には, 組合せの平均値の約 90% が実測値の平均値 ± 10 (%) の範囲に入ることが分かった。これに対し 35 尾実験区では, 一実験区あたり 2 個の実験水槽を使用した場合, 組合せの平均値の約 95% が実測値の平均値 ± 15 (%) の範囲に入り, また, 組合せの平均値の

約 90% が, 実測値の平均値 ± 10 (%) の範囲に入るためには, 一実験区あたり 3 個の実験水槽を供すればよいことが分かった。しかし, 組合せの平均値の約 90% が実測値の平均値 ± 5 (%) の範囲に入るようにするには, 25 尾実験区で 9 個, 35 尾実験区で 8 個の実験水槽数を供さねばならないことも明らかになった。実験 2 のようにへい死率が 65~70% 程度の場合にも, 供試実験水槽数と平均値の信頼度との関係は, へい死率が 40% 程度の場合とほぼ同じであった (Table 3)。この場合にも, 組合せの平均値の約 90% が実測値の平均値 ± 5 (%) の範囲に入るようにするには, 25 尾実験区で 8 個,

Table 3. Relationship between the appearance-frequency of the mean of cumulative mortality of fish due to IPNV and the required number of aquarium in Experiment 2

Number of fish per aquarium	Number of aquarium per experiment*1	Appearance-frequency of the cumulative mortality in percent*2										
		-25	-20	-15	-10	- 5	Mean (69)	+ 5	+10	+15	+20	+25
25	1	6	0	11	17	11	17	22	11	6	0	
	2	0	3	5	16	19	33	14	8	1	0	
	3	0	0	5	15	31	27	18	3	0	0	
	4	0	0	2	13	32	36	15	1	0	0	
	5	0	0	1	11	36	42	10	0	0	0	
	6	0	0	0	8	42	40	10	0	0	0	
	7	0	0	0	6	42	46	6	0	0	0	
	8	0	0	0	4	45	47	4	0	0	0	
	9	0	0	0	3	47	47	3	0	0	0	
	10	0	0	0	1	47	51	1	0	0	0	
	11	0	0	0	0	52	48	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0	
	13	0	0	0	0	52	48	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	52	48	0	0	0	0	
	15	0	0	0	0	49	51	0	0	0	0	
35		-25	-20	-15	-10	- 5	Mean (67)	+ 5	+10	+15	+20	+20
	1	0	6	13	6	25	25	13	6	6	0	
	2	0	0	4	18	32	24	18	3	1	0	
	3	0	0	1	16	35	34	12	1	0	0	
	4	0	0	0	11	41	38	10	0	0	0	
	5	0	0	0	8	45	41	6	0	0	0	
	6	0	0	0	5	47	44	4	0	0	0	
	7	0	0	0	3	50	45	2	0	0	0	
	8	0	0	0	2	51	46	1	0	0	0	
	9	0	0	0	0	52	47	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	54	46	0	0	0	0	
	11	0	0	0	0	54	46	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	56	44	0	0	0	0	
	13	0	0	0	0	57	43	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	60	40	0	0	0	0	
	15	0	0	0	0	69	31	0	0	0	0	

*1 In the case of which the number of aquarium per experiment was one, the appearance-frequency was calculated direct from the data shown at Table 1. In the cases such as the number of aquarium of 2-15, the appearance-frequency was calculated from the mean of the combination based on the data shown at Table 1.

*2 The appearance-frequency of the cumulative mortality was shown as the mean was at the center and intervals were set 5% on the center.

35 尾実験区で 6 個の実験水槽数を供さねばならない。これに対し, 実験 3 のようにへい死率が 90% 以上の場合には, 25 尾実験区, 35 尾実験区ともに, 組合せの平均値の約 95% が実測値の平均値 ± 5 (%) の範囲に入るようにするには, 2 個の実験水槽を供試すれば十分であることが判明した (Table 4)。

最近, わが国の多くの養魚試験場で用いられるようになった紫外線による殺ウイルス装置でも, IHN ウイルスは不活化できるが IPN ウイルスは不活化できない。¹⁰⁾ しかも緒論で述べたように, IPN ウイルスは塩素

に対しても耐性が非常に強く, 従来用いられてきた流水式飼育装置での感染実験は行い難いのが現状である。今までに, ニジマスのような冷水性魚類を循環式で飼育して IPN ウイルスの感染実験を行ったという報告およびその感染実験系の精度について報告した論文は著者らの知る限りでは見あたらない。本実験結果はニジマス稚魚に対する IPN ウイルスの感染実験が循環式飼育装置で可能であることを示したと同時に, その実験系の精度, すなわち, 何個の実験水槽を使用すればどの程度の精度で実験結果を比較検討できるかを示したものである。例

Table 4. Relationship between the appearance-frequency of the mean of cumulative mortality of fish due to IPNV and the required number of aquarium in Experiment 3

Number of fish per aquarium	Number of aquarium per experiment ^{*1}	Appearance-frequency of the cumulative mortality in percent ^{*2}										
		-25	-20	-15	-10	-5	Mean (97)	+5	+10	+15	+20	+25
25	1	0	0	5	0	58	37	0	0	0	0	
	2	0	0	0	7	32	62	0	0	0	0	
	3	0	0	0	1	39	60	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	38	62	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	37	63	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	37	63	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	40	60	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	42	58	0	0	0	0	
	9	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	50	50	0	0	0	0	
	11	0	0	0	0	49	51	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	48	52	0	0	0	0	
	13	0	0	0	0	47	53	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	43	57	0	0	0	0	
	15	0	0	0	0	62	38	0	0	0	0	
35		-25	-20	-15	-10	-5	Mean (96)	+5	+10	+15	+20	+25
	1	0	0	5	5	32	58	0	0	0	0	
	2	0	0	0	4	26	70	0	0	0	0	
	3	0	0	0	1	40	59	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	36	64	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	41	59	0	0	0	0	
	6	0	0	0	0	36	64	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	40	60	0	0	0	0	
	8	0	0	0	0	35	65	0	0	0	0	
	9	0	0	0	0	38	62	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	36	64	0	0	0	0	
	11	0	0	0	0	35	65	0	0	0	0	
	12	0	0	0	0	33	67	0	0	0	0	
	13	0	0	0	0	32	68	0	0	0	0	
	14	0	0	0	0	28	72	0	0	0	0	
	15	0	0	0	0	24	76	0	0	0	0	

^{*1} In the case of which the number of aquarium per experiment was one, the appearance-frequency was calculated direct from the data shown at Table 1. In the cases such as the number of aquarium of 2-15, the appearance-frequency was calculated from the mean of the combination based on the data shown at Table 1.

^{*2} The appearance-frequency of the cumulative mortality was shown as the mean was at the center and intervals were set 5% on the center.

えば、本実験系では一実験水槽に 25 尾を収容して A と B のウイルスの毒力を比較した場合、へい死率が 40% 前後ならば Table 2 の結果から、実験水槽を 2 個使用するときには両者間のへい死率の隔たりが 30% 以上、実験水槽を 4 個使用するときには 20% 以上、実験水槽を 9 個使用するときには、10% 以上の隔たりで、A と B のウイルスの毒力に違いがあるとしてよい。しかし、改良の余地も残されており、実験魚として、Okamoto *et al.*¹¹⁾ が報告したような IPN ウイルス高感受性ニジマス (RT-101 系) を使用すれば、実験系の精度はさらに上が

るであろう。また、ろ過材の改良によって一実験水槽あたりの供試尾数を増やすことができるので、これも実験系の精度を上げることにつながる。さらに、そのことによって実験期間が大幅に延長できれば、5°C 前後の低水温域での IPN による慢性的なへい死に関する実験も可能となり、IPN 感受性期を過ぎた大型稚魚でキャリアーに関する研究も可能となるものと期待できる。

謝 辞

ニジマス発眼卵の分与を頂いた東京都水産試験場奥多摩分場, 静岡県水産試験場富士養鱒場ならびに埼玉県水産試験場熊谷支場の各位に心よりお礼申し上げます。本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (No. 57490062) によって行われた。

文 献

- 1) K. Wolf, S. F. Snieszko, C. E. Dunber, and E. Pyle: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **104**, 105-108 (1960).
- 2) K. Wolf, C. E. Dunber, and E. Pyle: *Prog. Fish-Cult.*, **23**, 61-65 (1961).
- 3) T. Sano: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **37**, 495-498 (1971).
- 4) B. J. Hill: in "Microbial Diseases of Fish" (ed. by R. J. Roberts), Academic Press, London, 1982, pp. 91-114.
- 5) B. J. Hill and P. F. Dixon: *Bull. Off. Int. Epiz.*, **87**, 425-427 (1977).
- 6) M. Dorson: in "Antigens of Fish Pathogens" (ed. by D. P. Anderson), Collection Foundation Marcel Merieux, Lyon, 1983, pp. 7-32.
- 7) D. G. Elliott and D. F. Amend: *J. Fish Biol.*, **12**, 277-286 (1978).
- 8) K. Wolf and M. C. Quimby: *Science*, **135**, 1065-1066 (1962).
- 9) N. Okamoto, T. Sano, R. P. Hedrick, and J. L. Fryer: *J. Fish Dis.*, **6**, 6-12 (1983).
- 10) 吉水 守, 瀧沢宏子, 木村喬久: 魚病研究, **21**, 47-51 (1986).
- 11) N. Okamoto, M. Tanaka, H. Fukuda, S. Suzuki, Y. Yasuda, and T. Sano: *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **7**, 2-5 (1987).