



Title	限外濾過濃縮法による飼育水中IHNVの検出および紫外線のIHNV不活化効果について
Author(s)	吉水, 守; 佐見, 学; 小原, 昌和 他
Citation	日本水産学会誌, 57(3), 555-560 https://doi.org/10.2331/suisan.57.555
Issue Date	1991-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38619
Rights	© 1991 公益社団法人日本水産学会
Type	journal article
File Information	yoshimizu-96.pdf



限外濾過濃縮法による飼育水中 IHNV の検出および 紫外線の IHNV 不活化効果について

吉水 守, 佐見 学, 小原昌和, 山崎隆義, 木村喬久

(1990 年 9 月 6 日受付)

Detection of IHNV in Hatchery Water by Molecular Filtration Method and Effectiveness of U. V. Irradiation on IHNV Infectivity

Mamoru Yoshimizu,*¹ Manabu Sami,*¹ Masakazu Kohara,*²
Takayoshi Yamazaki,*² and Takahisa Kimura*¹

Infectivity of the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) was measured by molecular filtration method. Before filtration, beef extract was added to the water (0.01 %) and the condensed water was sterilized with 0.45 μ m filter pretreated with 1 % FBS. Virus infectivity of IHNV in non-irradiated river water was 0.56 TCID₅₀/l and U.V. irradiated water was less than 0.32 TCID₅₀/l. Infectivity of the IHNV in the pond water where there was an IHN outbreak, was measured 5.60 TCID₅₀/l. Two groups of 1,000 rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (body weight 0.11 g), were cultured in 45 l of aquarium, to use the river water and U.V. irradiated river water. U.V. dosage was 6.0 to 10.0 $\times 10^3$ μ W $\cdot$ sec/cm². Cumulative mortality of these 2 groups of the fish observed 25 days as 99.7 % in river water and 3.9 % in U.V. irradiated river water.

結 言

魚類の養殖事業の進展につれ、魚病被害も年々増加の傾向にある。特にウイルス性疾病は効果的治療法がなく、現状では防除・防疫に頼らざるを得ない。

IHN の防御対策としては、幼稚魚の飼育水温を調節する方法¹⁾をはじめ、ワクチンの開発²⁾や化学療法³⁻⁵⁾等が検討されてきたが、現在最も効果的でかつ広く用いられている方法は卵を産卵期にヨード剤で消毒し^{6,7)}その後 IHNV に感受性を持つ期間を、ウイルスフリーの湧水あるいは紫外線で処理した用水で飼育することにより発病を予防する方法である。

この方法により現在 IHNV 汚染地域のニジマス養魚場では IHNV の被害から免れているが、病原体フリーと考えられる湧水あるいは紫外線処理飼育水中の IHNV 量を測定することは従来困難であった。

最近 Watanabe *et al.*⁸⁾ は、IHNV およびその他の魚類病原ウイルスの濃縮を限外濾過装置を用いて行い、また Batts and Winton⁹⁾ もこの限外濾過装置とポリエチレングリコールによるウイルスの沈降法を組み合わせた方法が、IHNV の濃縮に有効であると報告している。

本報ではまず限外濾過装置による IHNV の濃縮条件について検討し、得られた条件下で飼育水中の IHNV 感染価の測定を行ないウイルス回収率の検討を行なった。ついで紫外線の IHNV 不活化効果を検討し、IHNV 汚染流域での養魚用水中に存在する IHNV の検出と、長野県水産試験場構内の養魚用水濾過殺菌装置の IHNV 不活化効果を検討したのでその結果を報告する。なお同水試の位置する明科、穂高地域は、豊富な湧水を利用して我国有数のニジマス生産地であるが、昭和 49 年以降 IHN が発生し養魚用水系が IHNV に汚染されたためニジマスの再生産は不可能となり、多くの養魚場では IHNV に感受性を有する期間、IHNV に汚染されていない湧水や地下水を用いて稚魚を飼育している。

材 料 と 方 法

供試ウイルス IHNV として ChAb 株を供試し、10 % 牛胎児血清加 minimum essential medium (Gibco) を用い RTG-2 細胞¹⁰⁾で培養後、培養液を HA フィルターで濾過し -80°C にストックして以後の実験に供試した。ウイルス感染価の測定は RTG-2 細胞を用いた常法のマイクロタイタープレート法により行った。

*¹ 北海道大学水産学部 (Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minato, Hakodate, Hokkaido 041, Japan).

*² 長野県水産試験場 (Nagano Prefectural Fisheries Experimental Station, Akashina, Higashichikuma, Nagano 399-71, Japan).

供試魚 サクラマス発眼卵を北海道さけ・ますふ化場より分与を受け、水産学部内の脱塩素処理水道水 (10°C) を用いた飼育槽で孵化させ、魚齢約 3 カ月齢時に実験に供試した。

限外濾過装置 限外濾過装置としては、Millipore のペリコンラボカセット (XX42 OLC KO) を、また限外濾過膜には同じく Millipore の公称分子量限界 300,000 のバケット (PTMK OLC M2) を供試した。

限外濾過条件の検討 1) FBS 処理によるミリポアフィルター HA への IHN 吸着阻止効果

Hanks' BSS (Gibco) で 0, 0.1, 1.0, 2.0% に希釈した FBS をあらかじめ 2 ml 通過させたミリポアフィルター HA (ポアサイズ 0.45 μm) を用いて $10^{5.00}$ TCID₅₀/ml の IHN 培養濾液 2 ml を濾過し、濾液の感染価を FBS 未処理フィルターによる濾液と比較した。

2) 肉エキスを添加による限外濾過膜への IHN 吸着阻止効果 $10^{6.00}$ TCID₅₀/ml の IHN 培養濾液 1 ml を 5,000 ml の脱塩素処理水道水に懸濁後、まず 1.0% FBS (in Hanks' BSS) に浸したポアサイズ 0.80 μm のミリポアフィルター SC で濾過し、次にこの IHN 懸濁液に肉エキスを 0, 0.01, 0.05, 0.10% となるように添加して限外濾過し 10 ml に濃縮した。上記同様 1.0% FBS (Hanks' BSS) をあらかじめ 2 ml 通過させたミリポアフィルター HA で再度濾過除菌し、濾液のウイルス感染価を比較した。

IHN 浸漬感染実験前後の飼育水中ウイルス感染価の変化 IHN 培養濾液 ($10^{6.00}$ TCID₅₀/ml) 1 ml を 1,000 ml の脱塩素処理水道水に懸濁し、約 3 カ月齢のサクラマス 50 尾を収容して 60 分間浸漬感染させた。浸漬後の飼育水 500 ml に肉エキスを 0.01% の割合に添加後、限外濾過装置で 5 ml に濃縮し、1.0% FBS (in Hanks' BSS) を 2 ml 通した HA フィルターで再度濾過除菌して濾液のウイルス感染価を測定した。対照としては、まずサクラマス 50 尾を脱塩素水 1,000 ml に同様に 60 分間収容後 IHN 培養濾液 1 ml を懸濁し、試験区同様 60 分間供試魚なしに静置して、その 500 ml を同条件で限外濾過処理を行い、ミリポアフィルターで濾過除菌後、濾液のウイルス感染価を測定した。

流水式紫外線殺菌装置の IHN 不活化効果 70 l の脱塩素処理水にウイルス感染価が約 $10^{2.00}$ TCID₅₀/ml となるように、IHN 培養濾液を懸濁したものに、市販の流水殺菌装置 (西武化学 CS-50-U, 二重管式, U.V. 出力 15 W, 耐水圧力 10 kg/cm² 以上) に渦流ポンプ、流量計等を組み合わせたものを用い、流量がそれぞれ 10.0, 5.0 l/min すなわち紫外線照射量が 1.1×10^4 , $2.3 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ となるように紫外線を照射した。紫外線照射前後の供試水のウイルス感染価を 1.0% FBS (in Hanks'

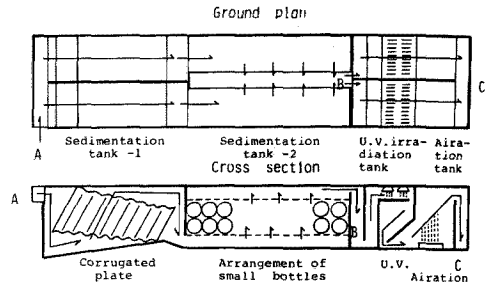


Fig. 1. Illustration of disinfection system of rearing water by U.V. treatment in Nagano Prefectural Fisheries Experiment Station.

BSS) を 2 ml 通したミリポアフィルターで濾過除菌して測定すると共に、紫外線処理水 1 l に肉エキスを 0.01% の割合に添加後、限外濾過によりそれぞれ 10 ml に濃縮し、濾過除菌後 (1.0% FBS 処理 HA 使用) ウイルス感染価を測定した。なお、紫外線照射量は照度計 (トプコン UVR-254) による照度の実測値と照射時間から算出した。

長野県水産試験場構内の養魚用水濾過殺菌装置の IHN 不活化効果 1) 濾過殺菌処理水中の IHN 感染価: 長野水試内の養魚用水濾過殺菌装置の全容を Fig. 1 に示した。すなわちまず河川水を取り入れ、プラスチックの波板 (タキロン) を 514 枚、斜め 45° に並べ、用水中の大きな粒子を沈澱除去し、次いで容量約 65 ml のプラスチック容器 1,000 個を一袋として 300 袋を収容した槽を通過させ、微細浮遊物を吸着除去後、ステンレス板上に水深 4.5 cm となるように用水を流し、水面上 6 cm に市販の紫外線殺菌灯 (15 W) を 40 本設置して $1.2 \sim 2.0 \times 10^5 \mu\text{W} \cdot \text{cm}^2$ の紫外線 (実測値) を照射した。流量から求めた照射時間は 5 秒間であり照射紫外線外線量は $6.0 \sim 10.0 \times 10^5 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ と計算される。この濾過殺菌装置の処理前の水 (原水: Fig. 1; A 点)、沈澱濾過処理水 (Fig. 1; B 点)、紫外線処理水 (Fig. 1; C 点)、および同水試構内の IHN 発症池の飼育水各 10 l を供試し、ミリポアフィルター (0.80 μm , 1.0% FBS 処理) で濾過後、0.01% の割合に肉エキスを添加して限外濾過を行い 10 ml まで濃縮した。1.0% FBS で前処理した HA フィルターで再度濾過除菌後ウイルス感染価を測定した。

2) 濾過殺菌処理水を用いたニジマスの飼育試験: 上記の養魚用水濾過殺菌装置の原水 (A 点)、沈澱濾過処理水 (B 点) および紫外線処理水 (C 点) をそれぞれ注水量 15~20 ml/sec で 45 l の水槽に引き込み、平均魚体重 0.11 g のニジマスを 1,000 尾収容し、その後 25 日間の累積死亡率を観察するとともに斃死魚については、常法によるウイルス検査を実施した。

Table 1. Effect of FBS pre-treatment* on IHNV infectivity

Concentration of FBS (%)	Infectivity (Log. TCID ₅₀ /ml)			
	Before filtration	After filtration experiment		
		I	II	III
0	5.05	2.55	3.05	3.55
0.1	5.05	2.80	2.80	3.80
1.0	5.05	3.80	4.05	3.80
2.0	5.05	4.05	3.80	4.55

* HA filter was treated by FBS added Hanks' BSS.

Table 2. Effect of beef extract concentration on IHNV infectivity condensed by molecular filtration*

Concentration of beef extract (%)	Infectivity (Log. TCID ₅₀ /ml)			
	Theoretical	Ultra-filtration experiment		
		I	II	III
0	5.05	2.80	3.05	3.05
0.01	5.05	3.30	3.30	3.55
0.05	5.05	3.55	3.30	3.55
0.10	5.05	3.30	3.05	3.55

* IHNV was suspended in beef extract added dechlorinated city water (5,000 ml; 10^{2.85} TCID₅₀/ml). IHNV suspended water was condensed to 10 ml by molecular filtration, and filtered by HA (pretreated with 1.0% FBS).

結 果

FBS 処理による HA フィルターへの IHNV 吸着阻止効果 ミリポアフィルター HA を 0.1, 1.0, 2.0% の FBS (in Hanks' BSS) で処理した後 IHNV 培養濾液 (10^{5.05} TCID₅₀/ml) を濾過したときのウイルス感染価の測定結果を Table 1 に示した。0, 0.1, 1.0, 2.0% の FBS を通した HA フィルターで濾過後のウイルス感染価は、それぞれ 10^{3.22}, 10^{3.40}, 10^{3.80}, 10^{4.10} TCID₅₀/ml (平均値) となり、HA フィルターを 1.0~2.0% FBS で処理した場合、回収率が最も高くなった。

肉エキスを添加による限外濾過膜への IHNV 吸着阻止効果 IHNV 懸濁液に、肉エキスを 0.01, 0.05, 0.1% の濃度で添加後、限外濾過 (分子量 300,000 の濾過膜を使用) により 500 倍に濃縮した後のウイルス感染価を Table 2 に示した。理論的 (回収率 100% 時) には、10^{5.05} TCID₅₀/ml のウイルスが回収されることになるが肉エキスを 0, 0.01, 0.05, 0.10% の割合に添加した場合の濃縮液のウイルス感染価はそれぞれ 10^{2.85}, 10^{3.40}, 10^{3.45}, 10^{3.55} TCID₅₀/ml (平均値) となり、肉エキスを少量 (0.01% 以上) 添加することにより回収率が増加した。

IHNV 浸漬感染実験前後における飼育水中ウイルス感染価の変化 IHNV 培養液を脱塩素処理水道水 1,000 ml に 10^{5.05} TCID₅₀/ml となるように懸濁後、サク

Table 3. Reduction of the IHNV infectivity by water-borne infection*

Infectivity (Log. TCID ₅₀ /ml)		
Not immersed	Immersed	Reduction
4.30	3.05	1.25

* Fifty of masu salmon were immersed in IHNV suspended dechlorinated city water (1,000 ml; 10^{5.05} TCID₅₀/ml) for 60 min. IHNV suspended water was condensed to 5 ml from 500 ml by molecular filtration, and filtered by HA (pretreated with 1.0% FBS).

ラマスを 60 分間浸漬した飼育水を限外濾過により 100 倍に濃縮した時のウイルス感染価は 10^{3.05} TCID₅₀/ml であった。対照としてサクラマスをまず 60 分間収容後、魚を取り上げ IHNV 培養濾液を懸濁し、同様に 100 倍に濃縮した場合のウイルス感染価は 10^{4.30} TCID₅₀/ml であった (Table 3)。

流水式紫外線殺菌装置の IHNV 不活化効果 IHNV 懸濁液の紫外線処理前のウイルス感染価は 10^{4.55} TCID₅₀/ml であったが、紫外線を照射するといずれの紫外線量においてもウイルス感染価は検出限界以下 (≤10^{0.80} TCID₅₀/ml) となった。一方紫外線処理前のウイルス懸濁液を限外濾過により 100 倍に濃縮した時のウイルス感染価は、10^{3.55} TCID₅₀/ml であったが、紫外線処理後の懸濁液では検出限界以下 (≤10^{0.80} TCID₅₀/ml) となった (Table 4)。

Table 4. Effect of U.V. irradiation on IHNV infectivity

Flow rate (l/min)	U.V. dosage ($\mu\text{W}\cdot\text{sec}/\text{cm}^2$)	Infectivity (Log. TCID ₅₀ /ml)	
		No treatment	Treatment*
	0	1.55	2.55
10.0	1.1×10^4	≤ 0.80	≤ 0.80
5.0	2.3×10^4	≤ 0.80	≤ 0.80

* IHNV was suspended in beef extract added (0.01%) dechlorinated city water (70 l; $10^{2.00}$ TCID₅₀/ml). IHNV suspended water was condensed to 10 ml from 1,000 ml by molecular filtration, and filtered by HA pretreated with 1.0% FBS).

Table 5. Effect of the sedimentation and U.V. irradiation on the IHNV infectivity

Sample	Infectivity (Log. TCID ₅₀ /l)*1
A*2: Untreated	0.56
B*2: After filtration	≤ 0.32
C*2: After U.V. irradiation	≤ 0.32
IHN outbreak pond	5.60

*1 Water samples were condensed to 10 ml from 10 l by molecular filtration, and filtered by HA(pretreated with 1.0% FBS).

*2 See Fig. 1.

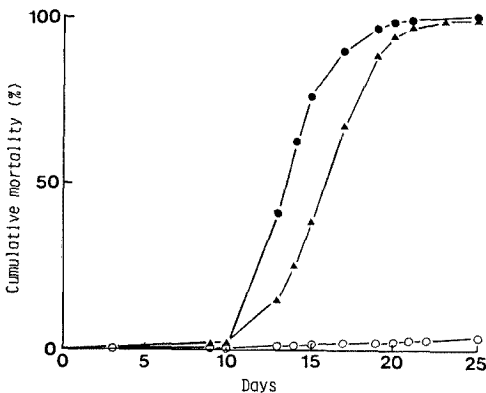


Fig. 2. Cumulative mortalities of rainbow trout.

▲; Untreated water.
●; After sedimentation.
○; After U.V. irradiation.

長野水試構内の養魚用水濾過殺菌装置の IHNV 不活化効果 1) 限外濾過による養魚用水からの感染性 IHNV 粒子の検出 IHN 発症池, 濾過殺菌装置の原水, 沈澱濾過処理水および紫外線処理水をそれぞれ限外濾過により 1,000 倍に濃縮した時のウイルス感染価は, それぞれ 5.6, 0.56, ≤ 0.32 (検出限界以下), ≤ 0.32 (検出限界以下) TCID₅₀/l であった (Table 5)。

2) 濾過殺菌処理水を用いたニジマスの飼育試験 濾過殺菌装置の原水, 沈澱濾過処理水および紫外線処理水を用いて 25 日間飼育したニジマスの累積死亡率はそれ

ぞれ 99.7, 100, 3.9% であった (Fig. 2)。また原水および沈澱濾過処理水を用いて飼育した群の斃死魚からは IHNV が分離されたが, 紫外線処理水を用いて飼育した群の斃死魚からは IPNV が分離されたものの, IHNV は分離されなかった。

考 察

IHN 防御を行うにあたり飼育用水中に存在する極めて少量の感染ウイルス粒子を検出することは, 飼育用水の管理を行う上で重要である。すなわち, 現在飼育用水のウイルス不活化には, 紫外線殺菌装置が実用化されているが, その有効性は高い感染価のウイルスを用いての実験室レベルでの証明がなされているにすぎない。そこでまず飼育用水中に存在する少量のウイルスを検出するために, 限外濾過を用いる場合の濃縮条件について検討を行った。

飼育用水の限外濾過濃縮を行う場合, 用水中の細菌も濃縮され濾液をそのまま細胞培養系に接種することは不可能である。従って濃縮前後に濾過除菌が必要であるが, 濃縮前の大量の水を濾過除菌することは実際上困難であり, 濃縮後に濾過除菌することになる。一般にこれらの濾材はウイルスを吸着することが知られている。そこで供試するミリポアフィルター HA を FBS で前処理することにより, IHNV の回収率を高めることを目的に FBS の最適濃度を検討した。無処理の HA フィルターで濾過した場合, ウイルス感染価は 1/100 に減少したが, 1.0% FBS で前処理することによって感染価の減少は 1/14 にとどまった。

次に限外濾過膜への吸着防止を目的にウイルス懸濁液に種々の濃度で肉エキスを加えて限外濾過を行い肉エキスの添加効果を検討したが, 肉エキスを少量 (0.01% 以上) 添加することにより回収率が増大した。Watanabe et al.⁸⁾ はウイルス懸濁液中に FBS を同程度添加することによりウイルスの回収率が増加することを報告しているが, コスト面から考えて肉エキスの方が有利であると考えられる。

従って肉エキスを供試水に 0.01% となるように添加後, 限外濾過濃縮を行い, 1.0% FBS で前処理した HA

フィルターにより濾過除菌すれば、ある程度効率良く IHNV の濃縮が可能であると考えられる。先の肉エキスを添加濃度の検討においては、0.01% 肉エキス添加後限外濾過濃縮し 1.0% FBS で前処理した HA フィルターを用いて濾過除菌をおこなったが、その濃縮 (500 倍) 後のウイルス感染価は $10^{8.40}$ TCID₅₀/ml であった。仮に回収率を 100% とする濃縮後の感染価は $10^{6.00}$ TCID₅₀/ml となる。ここで上述の HA フィルター濾過による損失を考え合わせると、限外濾過そのものの回収率は 31.6% と算出された。

ところで従来、魚類病原ウイルスの人工感染実験を行う場合、浸漬法では 100 TCID₅₀/ml のウイルス懸濁液に 60 分間供試魚を浸漬する方法を用いていたが、浸漬水中の IHNV の感染価の変化を測定することは困難であった。上述のように限外濾過濃縮法によりウイルスの濃縮が可能となったことから、IHNV 懸濁液 ($10^{3.05}$ TCID₅₀/ml) にサクラマスに浸漬感染させた場合の浸漬水中のウイルス感染価の変化を限外濾過濃縮法により検討した。濃縮後のウイルス感染価は対照で $10^{4.30}$ TCID₅₀/ml であったが、サクラマス浸漬後の飼育水は $10^{3.06}$ TCID₅₀/ml であった。このウイルス感染価の減少は、なんらかの形で魚体に捕捉されたものと考えられる。浸漬感染実験を 100 TCID₅₀/ml 程度の懸濁液で行った場合、HA フィルターへの吸着を考え併せると、限外濾過濃縮を行わなければ浸漬後のウイルス感染価は、検出され得ないことになる。

次に、市販の流水式紫外線殺菌装置の IHNV 不活化効果を検討したが、通常のマイクロタイター法による測定では、紫外線照射前に $10^{1.55}$ TCID₅₀/ml であった IHNV 感染価は $1.1 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射で、検出限界以下 ($\leq 10^{0.80}$ TCID₅₀/ml) となり、吉水ら¹¹⁾の結果と同様、紫外線による IHNV 不活化率は 82.2% 以上と算出された。そこで前記同様限外濾過法を用いて紫外線照射前の IHNV 懸濁液を濃縮し感染価を $10^{2.65}$ TCID₅₀/ml まで増加せしめ得たが、 $1.1 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$ の紫外線照射後は、同様に限外濾過濃縮を行ってもウイルスの検出されなかった ($\leq 10^{0.80}$ TCID₅₀/ml)。この場合の IHNV 不活化率は 98.1% 以上と算出された。従って限外濾過濃縮法を利用することにより流水式紫外線殺菌装置の IHNV 不活化効果をより厳密に把握することが可能になると考える。

そこで長野水試構内の濾過殺菌装置の IHNV 不活化効果について限外濾過法を用いて検討した。濾過殺菌装置で処理する前の河川水 (原水) を 1000 倍に濃縮したところ、1 l 当り 0.56 TCID₅₀ のウイルスが検出された。しかし濾過殺菌装置内の濾過槽通過後および紫外線照射後の用水では共に検出限界以下 (≤ 0.32 TCID₅₀/l) であ

った。すなわちこの濾過殺菌装置においては濾過も IHNV 除去に有効であったと考えられる。さらに同水試構内の IHNV 発生池の飼育水からは、1 l 当り 5.6 TCID₅₀ の IHNV が検出された。前述の如く限外濾過による IHNV の回収率は 500 倍濃縮時において 31.6% であったが、本実験の濃縮倍率は 1,000 倍であり、その回収率はさらに低いものと予想される。しかし濾過と紫外線照射を組み合わせた濾過殺菌装置の処理水からは IHNV が検出されなかったこと、また濾過殺菌装置の処理水中ではニジマスに IHNV 感染が成立しなかったことなどを考え合わせると、今回調査した濾過殺菌装置は IHNV の不活化には十分機能していることが確認された。養魚用水系の上流において IHNV が発生し、水系が IHNV に汚染された場合にも、今回調査した濾過殺菌装置と同等の能力を有する装置を用いた処理で汚染水の有効利用が可能になると考える。

要 約

限外濾過法を用いた IHNV の濃縮条件を検討し、得られた条件下で濾過濃縮を行い、浸漬感染試験時の飼育水中の IHNV 感染価の変化、さらに実験室内における流水式紫外線殺菌装置および長野県水産試験場構内の濾過殺菌装置の IHNV 不活化効果を観察し、以下の結論を得た。

- 1) 限外濾過濃縮は試水に 0.01% の割合に肉エキスを添加して行い、濾過除菌には 1.0% FBS で前処理をしたフィルターを用いることにより高いウイルス回収率が得られた。
- 2) 限外濾過濃縮法を用いることにより、サクラマスの IHNV 浸漬感染試験で、飼育水中のウイルス感染の変化が観察でき、魚体への IHNV 吸着を認めることができた。
- 3) 市販の流水式紫外線殺菌装置の公称有効能力 (照射量 $1.1 \times 10^4 \mu\text{W} \cdot \text{sec}/\text{cm}^2$) で IHNV 懸濁液を処理した場合、98.1% 以上の IHNV が不活化されることが確認された。
- 4) 長野水試構内の濾過殺菌装置の IHNV 不活化効果を観察し、IHNV 発生池から 5.6 TCID₅₀/l、殺菌棟の原水から 0.56 TCID₅₀/l のウイルスを検出し得た。濾過および紫外線処理後の用水からは IHNV は検出されなかった。またニジマスを用いた感染試験では、原水および濾過処理水中で IHNV の発症を認めたが、紫外線処理水中での発症は認められず濾過殺菌装置の有効性が確認された。

謝 辞

本研究の一部は平成 2 年度文部省科学研究費補助金一

般 C (02660185) によった。ここに記して謝意を表する。

参 考 文 献

- 1) D. F. Amend: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **27**, 5-270 (1970).
- 2) D. F. Amend: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **33**, 1059-1066 (1976).
- 3) M. Hasobe and M. Saneyoshi: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 1079-1084 (1985).
- 4) M. Hasobe and M. Saneyoshi: *Fish Path.*, **20**, 343-351 (1985).
- 5) 木村喬久, 吉水 守, 西沢豊彦: 北大水産彙報, **38**, 151-155 (1987).
- 6) D. F. Amend and J. P. Pietsch: *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **101**, 267-269 (1972).
- 7) D. F. Amend: *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **103**, 73-78 (1974).
- 8) R. A. Watanabe, J. L. Eryer, and J. S. Rohovec: *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1606-1609 (1988).
- 9) W. N. Batts and J. R. Winton: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**, 964-968 (1989).
- 10) K. Wolf and M. C. Quimby: *Science*, **135**, 1065-1066 (1962).
- 11) 吉水 守, 瀧沢宏子, 木村喬久: 魚病研究, **21**, 47-52 (1986).