

養鰻における疾病の早期検知技術の開発

中城 岳・隅川 和・高月 明

1 目的

県内ではウナギ養殖が盛んに行われているが、疾病によるへい死被害が大きな問題となっており、年間被害金額は約9千万円にもものぼる。

本研究では、本県のウナギ養殖において最もへい死被害の大きい「パラコロ病」の早期検知技術の開発を目的として、①qPCRを用いた環境水からの *E. anguillarum* 細菌量の定量検出手法の確立、②当該手法を用いた感染試験による *E. anguillarum* の細菌量動態のモニタリング、③養鰻池における *E. anguillarum* の細菌量動態及び水質のモニタリングを行う。なお、本事業は令和3年度から5年度までの3カ年事業であり、令和5年度については、昨年度に引き続き、②及び③を実施した。

2 材料と方法

(1) 水槽での感染試験による *E. anguillarum* の細菌量動態のモニタリング

パラコロ病に感染したウナギから飼育水中に排出される原因菌の細菌量をモニタリングするため、腹腔内注射法を用いて感染試験を実施した。

ア 供試魚及び供試菌株

供試魚は県内養鰻業者から入手した、魚体重約200~250g/尾のニホンウナギを用いた。供試菌株は当所保有の *E. anguillarum* (KFCB-617株) とし、病原性を高めるため以下の手法で魚体通過させた後、攻撃用菌株として使用した。

- ・ハートインフュージョン液体培地（以下、HI液体培地）5.0mLに接種後、30℃、24時間静置培養
- ・培養液を供試魚1尾の腹腔内に接種し、死亡魚の腎臓からSS寒天培地で分離した菌株をHI液体培地で30℃、24時間静置培養後、80%グリセロールと混和し、-80℃で冷凍保存

イ 飼育水槽の環境条件

1区あたり500Lパンライト水槽に10尾を収容した。飼育水容量は200Lで、1回転/5時間の微換水とした。また、飼育水の水温はヒーターで30℃に維持し、十分なエアレーションによって一定の溶存酸素量が保持されるようにした。なお、飼育期間中は無給餌とした。

ウ 供試魚及び飼育水の分析

供試魚については、死亡個体は取り上げ後、症状の確認、肝臓及び腎臓の塗抹標本の観察、サルモネラ・シゲラ寒天培地（以下、SS寒天培地）による菌分離を行い、肝臓及び腎臓からDNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen) を用いてDNAを抽出し、中城（2021）と同

様の qPCR に供し、*E. anguillarum* の DNA コピー数を定量した。陽性が確認された場合、Qubit fluorometer (invitrogen) を用いて当該 DNA サンプルの総 DNA 量を測定し、各抽出 DNA 1.0ng あたりの *E. anguillarum* の DNA コピー数を算出した。なお、生存魚は試験終了日に全て取り上げ、同様の検査を実施した。

また、飼育水については、試験開始 0 日目から試験終了日まで、オーバーフロー排水を 100mL 採水し、全量を孔径 0.2 μ m のサイクロポアメンブレンフィルター (cytiva) でろ過し、以下の手法でフィルターから DNA を抽出した。なお、本手法については、中城 (2022) で実施した、嶋原ら (2015) の手法と検出感度が同程度であることを確認済みである。

- ・ 1.5mL マイクロチューブにろ過したフィルターと Buffer ATL (Quiagen) 360 μ L 及びプロテナーゼ K (ナカライテスク) 溶液 (濃度 : 200 μ g/mL) 40 μ L を添加
- ・ 56 $^{\circ}$ C で 1 時間程度、攪拌しながらインキュベート
- ・ Buffer AL (Quiagen) を 400 μ L 添加し、攪拌
- ・ 70 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベート
- ・ チューブ内の液体を新しい 1.5mL マイクロチューブに回収し、回収した溶液に 99.5% 特級エタノール (富士フィルム和光純薬) を 400 μ L 添加し、攪拌
- ・ 核酸精製用シリカメンブレンスピニングカラム EconoSpin カラム II a (ジーンデザイン) に溶液を添加し、8,000rpm で 1 分遠心分離
- ・ 濾液を捨て、Buffer AW1 (Quiagen) を 500 μ L 添加し、8,000rpm で 1 分遠心分離
- ・ 濾液を捨て、Buffer AW2 (Quiagen) を 500 μ L 添加し、11,000rpm で 3 分遠心分離
- ・ スピニングカラムを新しい 1.5mL マイクロチューブにセットし、Buffer AE (Quiagen) 100 μ L を添加し、1 分程度静置した後、8,000rpm で 1 分遠心分離し、DNA を溶出 (使用時まで -80 $^{\circ}$ C 冷凍保存)

抽出した DNA サンプルは中城 (2021) と同様の qPCR に供し、飼育水中の *E. anguillarum* の細菌量 (CFU/L) を定量した。

また、ポータブル中濃度アンモニア態窒素測定器 HI-97715 (HANNA instruments) 及びポータブル低濃度亜硝酸態窒素測定器 HI-97707 (HANNA instruments) を用い、飼育水中のアンモニア態窒素量及び亜硝酸態窒素量を測定した。

エ 感染試験

第 1 回から第 3 回の計 3 回、菌液の腹腔内注射による感染試験を実施した。攻撃用菌株を HI 液体培地 5.0mL に接種後、30 $^{\circ}$ C で 24 時間静置培養し、1 尾あたり 0.1mL の培養液をウナギの腹腔内へ注射した。対照区については、同量の滅菌 PBS を腹腔内へ注射した。また、攻撃用菌株の培養液を超純水で 10^0 - 10^{-9} の 9 段階に希釈後、各希釈系列 10 μ L を SS 寒天培地に塗布し、30 $^{\circ}$ C で 24 時間培養後、培地上のコロニー数を計数し、1 尾あたりに投与した細菌量 (CFU/尾) を算出した。

(2) 養鰻池における *E. anguillarum* の細菌量動態及び水質のモニタリング

県内養鰻業者のうち、過去5年間でパラコロ病の発生が見られた2業者をモニタリング対象とし、それぞれ、A業者及びB業者とした。各業者の2池をモニタリング対象池として、それぞれA業者-飼育池(1)及び(2)、B業者-飼育池(1)及び(2)とした。なお、各池の飼育形式や調査開始時の飼育尾数は表1のとおりである。A業者については、飼育池(1)は8月から10月までの3ヶ月間、飼育池(2)は7月から10月までの4ヶ月間、B業者の2池については、7月から12月までの6ヶ月間、毎月1回、投げ込み式多項目水質測定器 HI-9828 (HANNA instruments) を用い、水温、pH、溶存酸素量(DO)及び塩分を測定した。また、飼育水100mLを採水し、当所へ持ち帰った後、前述と同様の手法で飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量(CFU/L)を定量し、ポータブル中濃度アンモニア態窒素測定器 HI-97715 (HANNA instruments) 及びポータブル低濃度亜硝酸態窒素測定器 HI-97707 (HANNA instruments) を用いて、飼育水中のアンモニア態窒素量及び亜硝酸態窒素量を測定した。B業者の2池については、統計解析ソフト「EZR (ver. 1.61)」(Kaneda, 2013)を用い、*E. anguillarum* 細菌量と各水質の相関について検定を行った。

なお、調査期間中にA業者のモニタリング対象業者の飼育池2面(5番池、8番池と称する。)でパラコロ病が発生した場合は、不定期のモニタリングとして、判明日から7日に1回の頻度で約30日間飼育水1Lを採水し、前述と同様の手法で飼育水中の細菌量(CFU/L)を定量した。また、当該飼育池における1週間ごとの1日当たりの飼育魚の死亡尾数の推移と比較した。

3 結果及び考察

(1) 水槽での感染試験による *E. anguillarum* の細菌量動態のモニタリング

計3回の感染試験の結果は以下の通りである。また、試験結果の概要を表2に示した。

①第1回試験(令和6年1月11日~15日)

攻撃用菌株培養液の細菌量は 3.0×10^8 CFU/mL であり、1尾あたりの投与細菌量は 3.0×10^7 CFU/尾であった。試験区の供試魚は試験開始2~3日目で全て死亡し、自然感染による死亡状況と大きく異なっていたことから、開始3日目で試験を中断した。

②第2回試験(令和6年1月19日~29日)

攻撃用菌株培養液の細菌量は 6.0×10^6 CFU/mL であり、1尾あたりの投与細菌量は 6.0×10^5 CFU/尾であった。試験区の供試魚については、試験開始3~5日目に7尾が死亡し、残り3尾は最終日まで死亡しなかった。死亡した供試魚7尾には肛門や臀鰭の発赤症状が見られ、塗抹標本の観察で肝臓及び腎臓に短桿菌の増殖が見られ、肝臓及び腎臓の抽出DNAサンプルがqPCR陽性であったことから、いずれもパラコロ病を発症し死亡したと考えられた。一方、死亡しなかった供試魚3尾については、症状の発生や短桿菌の増殖は見られず、肝臓及び腎臓の抽出DNAサンプルがqPCR陰性であったことから、パラコロ病を発症しなかったと考えられた。なお、対照区の供試魚に発症や死亡は見られなかった。

試験期間中の飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量及び累積死亡率の推移は図1の通りで

あった。試験区においては、供試魚が試験開始 3 日目に初めて死亡したが、飼育水中の細菌量は試験開始 1 日目から増加しており、細菌量のモニタリングによって本病発生の兆候を検知できると考えられた。また、試験期間中の飼育水のアンモニア態窒素量及び亜硝酸態窒素量の推移は図 2 の通りであった。アンモニア態窒素量については、試験区及び対照区ともに試験開始 1 日目から増加傾向が見られていたが、試験区の増加傾向がより顕著であった。飼育水中のアンモニア態窒素量が増加した要因としては、魚体内で大量に増殖した *E. anguillarum* を体外へ排出するために尿量が多くなったことや、腎臓における大量増殖により尿排出機構が損傷したことで排出の制御が困難となった可能性が考えられた。このため、飼育水中のアンモニア態窒素量も本病発生の兆候として利用できる可能性があると考えられた。しかし、アンモニア態窒素は残餌や死亡魚からも発生するため、アンモニア態窒素量のみを指標に疾病発生の兆候を捉えることは困難であると考えられ、細菌量のモニタリングと併せて検討していく必要があると考えられた。

一方、亜硝酸態窒素量については、試験期間を通じ、対照区と比較して試験区が高い傾向であったが、死亡尾数との関連は確認できなかった。

③第 3 回試験（令和 6 年 3 月 12 日～22 日）

攻撃用菌株培養液の細菌量は 1.0×10^6 CFU/mL であり、1 尾あたりの投与細菌量は 1.0×10^5 CFU/尾であった。試験区の供試魚については、試験開始 2～4 日目に 8 尾が死亡し、残り 2 尾は最終日まで死亡しなかった。死亡した供試魚 8 尾には肛門や臀鰭の発赤症状が見られ、塗抹標本の観察で肝臓及び腎臓に短桿菌の増殖が見られ、肝臓及び腎臓の抽出 DNA サンプルが qPCR 陽性であったことから、供試魚はパラコロ病を発症し死亡したと考えられた。一方、死亡しなかった供試魚 2 尾については、症状の発生や短桿菌の増殖は見られず、肝臓及び腎臓の抽出 DNA サンプルが qPCR 陰性であったことから、パラコロ病を発症しなかったと考えられた。なお、対照区の供試魚に発症や死亡は見られなかった。

試験期間中の飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量及び累積死亡率の推移は図 3 の通りであった。試験区においては、供試魚が試験開始 2 日目に初めて死亡したが、同日から飼育水中の細菌量も急激な増加が見られていた。また、試験期間中の飼育水のアンモニア態窒素量及び亜硝酸態窒素量の推移は図 4 の通りであった。アンモニア態窒素量については、第 2 回試験と同様に、対照区と比較して試験区の増加傾向が顕著であった。一方、亜硝酸態窒素量については、第 2 回試験と同様に、試験期間を通じ、対照区と比較して試験区が高い傾向であったが、死亡尾数との関連は確認できなかった。

(2) 養鰻池における *E. anguillarum* の細菌量動態及び水質のモニタリング

モニタリングを実施した 2 業者の飼育池の pH、D0、水温、塩分、アンモニア態窒素量、亜硝酸態窒素量、*E. anguillarum* 細菌量の推移は図 5～11 の通りであった。B 業者の飼育池においては、EZR を用いた Spearman の順位相関係数による統計解析の結果、*E. anguillarum* 細菌量といずれの水質にも相関は見られなかった ($p=0.125 \sim 0.803$)。中城 (2022) においても、県内養鰻業者 4 者の飼育池で実施した同様の解析の結果、

E. anguillarum 細菌量といずれの水質にも相関は見られておらず ($p=0.127\sim 0.954$)、パラコロ病の発生と関連性の高い水質を見出すことはできなかった。ただし、先述の感染試験の結果のとおり、試験区のアンモニア態窒素量の増加が顕著であったことから、本項目については、今後も疾病発生との関連性を検証する必要があると考えられた。なお、A 業者については、解析に必要なデータ数が不足しており、同様の解析は実施できなかった。

また、A 業者の 5 番及び 8 番池の計 2 池において、パラコロ病（他疾病との併発事例含む）の発生が見られた。まず、5 番池については（図 12）、3 月初旬から飼育魚の死亡が確認され、3 月下旬から死亡尾数が増加したことから、4 月 6 日に死亡魚を用いて当所で魚病診断を実施した。その結果、へい死原因はパラコロ病の発症であったことが明らかになった。その後、4 月 17 日から 6 月 19 日まで、飼育水の採水を実施した。当該期間中における飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量は 10^3 CFU/L 程度で、横ばいで推移していた。これについては、中城（2022）で報告されたパラコロ病発生時の飼育水中の細菌量のオーダー（ $10^3\sim 10^4$ CFU/L 程度）と同様であった。A 業者は 4 月 6 日に実施した魚病診断の結果を受け、4 月 8 日から 12 日までの 5 日間、抗菌剤の 1 種であるフロルフェニコール製剤の投薬処置を実施していたが、その後も死亡尾数の減少は見られず、横ばい傾向であった。以上の結果から、投薬処置ではパラコロ病は治癒しなかったと考えられた。パラコロ病の治療法としては投薬処置が一般的であり、オキシリン酸、フロルフェニコール、スルファモノメトキシシン及びオルメトプリム配合剤、塩酸オキシテトラサイクリンの 4 種を有効成分とする抗菌剤の使用が承認されているが、*E. anguillarum* 含むエドワジェラ症の原因菌は宿主の食細胞内で生存、増殖することが知られており（飯田ら、2016）、水産用抗菌剤の投与効果が十分得られない可能性が指摘されている。そのため、投薬処置後も一定量の *E. anguillarum* が魚体内に残存しており、完全には治癒しなかった可能性が考えられた。中城（2022）でも、パラコロ病が発生した飼育池において、投薬処置実施後に同様の事例が見られており、本推測を裏付けるものとなっている。

次に、8 番池については（図 13）、8 月 3 日、他の飼育池を出荷した際に出荷サイズに満たなかった個体を池入れしたが、8 月 7 日から飼育魚の死亡が確認され、増加傾向が見られていたことから、8 月 15 日に死亡魚を用いて当所で魚病診断を実施した結果、へい死原因はパラコロ病とカラムナリス病の混合感染であったことが明らかになった。その後、8 月 21 日から 10 月 30 日まで、飼育水の採水を実施した。5 番池では診断後に抗菌剤の投薬処置を行ったが、本飼育池では飼育責任者の判断で実施しなかった。8 月 7 日以降の死亡尾数はほぼ横ばい傾向であったが、9 月 18 日頃から死亡尾数の増加が見られたため、9 月 20 日に当所で魚病診断を行った結果、へい死原因はウイルス性血管内皮壊死症の発症であったことが明らかになった。その後、死亡尾数が急増し、9 月 19 日から 25 日までの 1 週間に 1 日当たり約 400 尾が死亡したが、翌週以降は死亡尾数が大幅に減少した。一方、飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量については、8 月 21 日から 9 月 25 日までは $1.0\times 10^3\sim 10^4$ CFU/L 程度で推移しており、これについても、中城（2022）で報告されたパラコロ病発生時の飼育水中の細菌量のオーダーと同様であった。しかし、死亡

尾数が急増した翌週の10月2日には飼育水から *E. anguillarum* は検出されず、その翌週の10月9日以降、 $1.0 \times 10^2 \sim 10^3$ CFU/L 程度が再び検出された。まず、10月2日に *E. anguillarum* が検出されなかった要因としては、前週に飼育魚が大量に死亡し、*E. anguillarum* の保菌個体が減少したことで飼育水中に排出される細菌量も減少したためだと考えられた。また、その後は細菌量が再び増加していることから、一部の生存魚が保有していた *E. anguillarum* が飼育水中に拡散したと考えられた。本飼育池については、11月初旬に出荷を行ったが、翌年以降も飼育を継続した場合、パラコロ病の再発により、さらなる被害が発生していた可能性も考えられた。

4 結論

水槽での感染試験の結果から、本研究の手法を活用した飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量のモニタリングによって、 $10^2 \sim 10^3$ CFU/L 程度の細菌が検出された場合、パラコロ病の感染拡大の可能性があると推測できることが分かった。

感染拡大の兆候が見られた際の対策については、早期に投薬処置等を行うことで疾病の発生を未然に防止できると考えられたが、本手法については、薬剤耐性菌株を発生させる危険性があるため、餌止めや換水量の増加などを行うべきであると考えられた。

また、養鰻池のモニタリング結果から、一度本病を発病した飼育池については、保菌個体が一定数存在し、飼育水中に原因菌が排出されている可能性が高いと考えられたため、未発病の飼育群と混養しない、あるいは当該飼育池の飼育作業を最後に行うといった防疫対策を実施することが重要であると考えられた。なお、将来的には、本研究で開発したモニタリング技術と併せ、細胞性免疫を強化する免疫賦活剤やワクチンの開発など、疾病の予防を目的とした技術開発も必要になると考えられた。

【引用文献】

- 中城岳（2021）養鰻における疾病の早期検知技術の開発．令和3年度事業報告書（事業報告）．32. 42-54.
- 中城岳（2022）養鰻における疾病の早期検知技術の開発．令和4年度事業報告書（事業報告）．33. 52-61.
- 嶋原佳子、河東康彦、柳宗悦、前野幸二、釜石隆（2015）養殖場における *Nocardia seriolae* の分布に関する研究．平成27年度日本魚病学会春季大会．
- Kanda.Y（2013）Investigation of the freely available easy-to-use software ‘EZR’ for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 48. 452-458.
- 飯田貴次、坂井貴光、高野倫一（2016）：エドワジェラ症. 魚病研究, 51(3), 87-91.

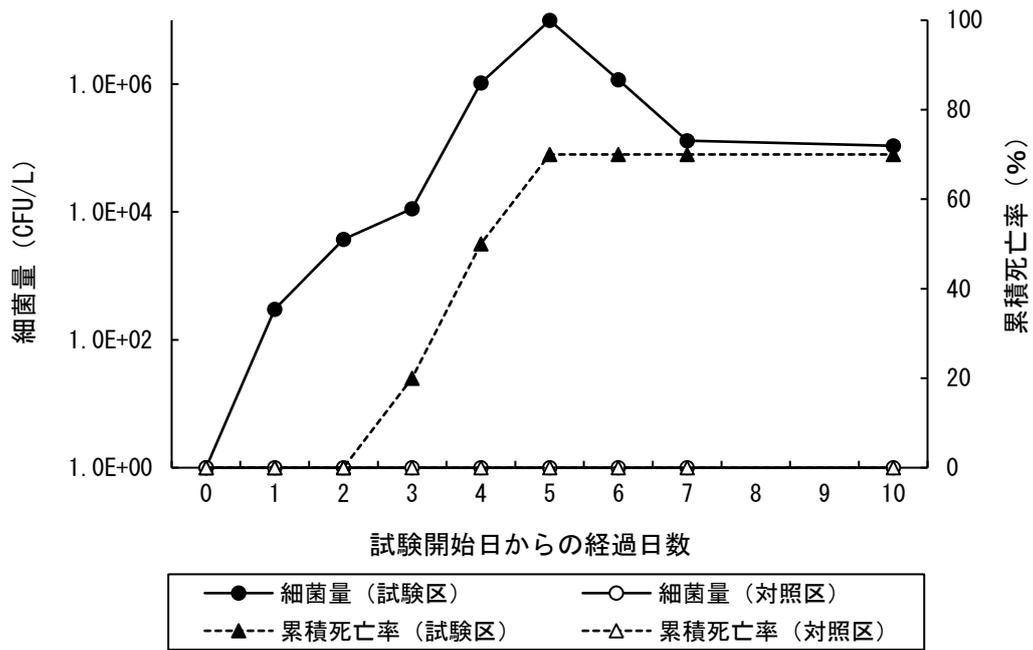


図1 第2回試験における飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量の推移

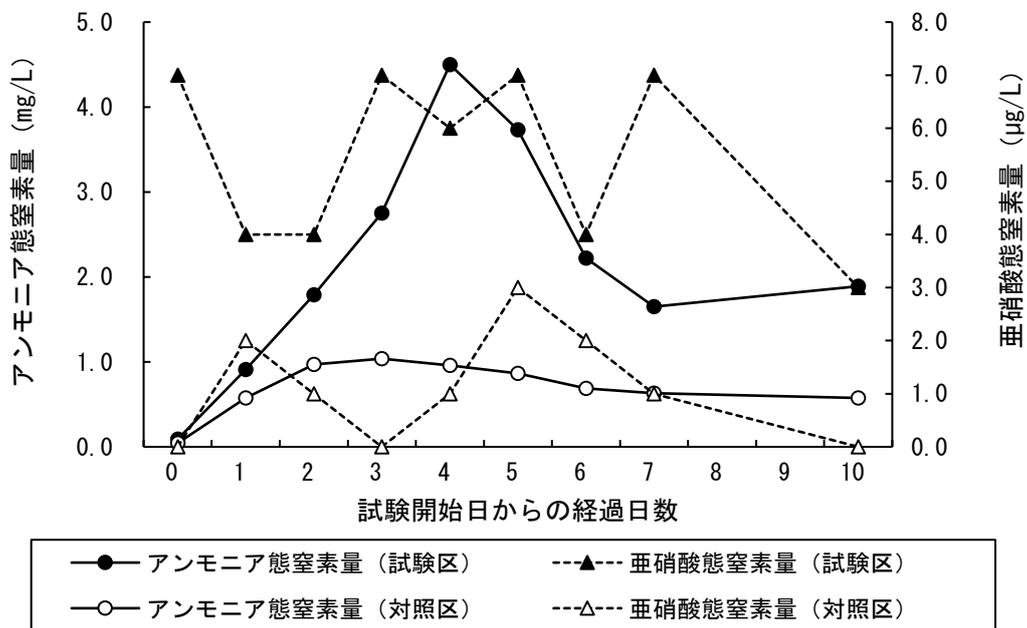


図2 第2回試験における飼育水中のアンモニア態窒素量及び亜硝酸態窒素量の推移

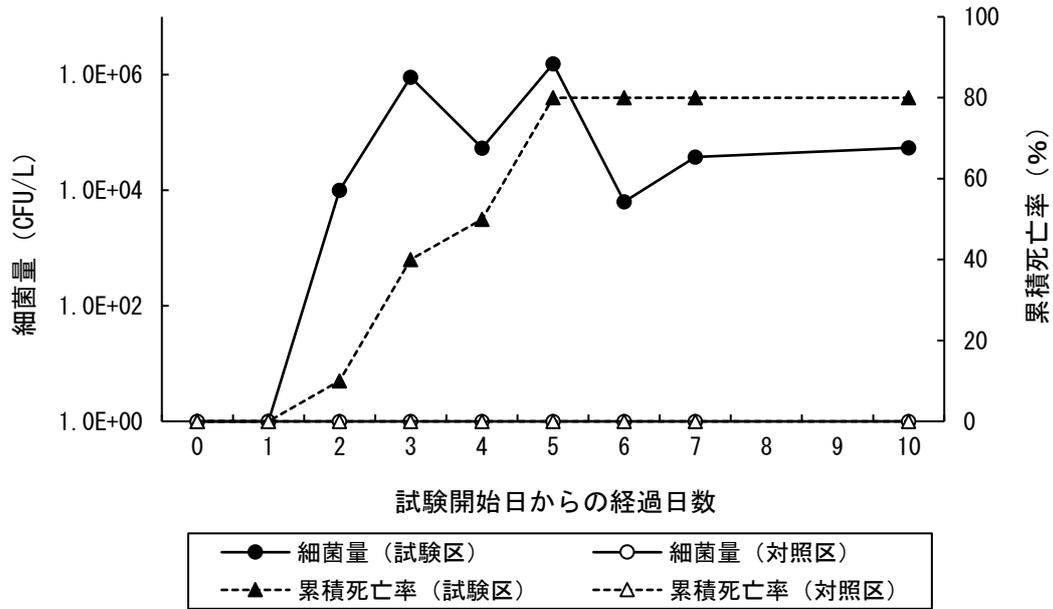


図3 第3回試験における飼育水中の *E. anguillarum* 細菌量の推移

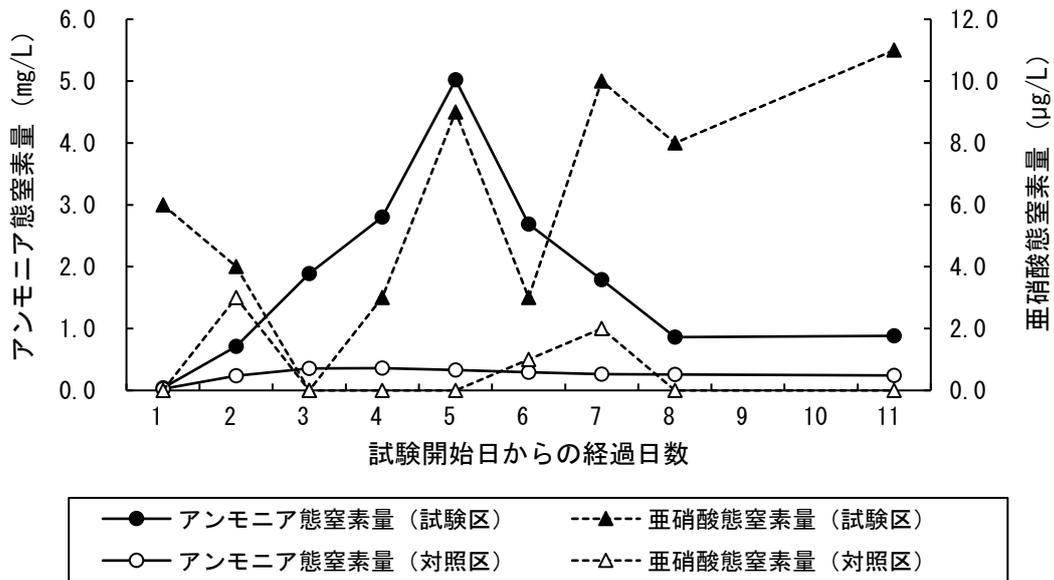


図4 第3回試験における飼育水中のアンモニア態窒素量及び亜硝酸態窒素量の推移

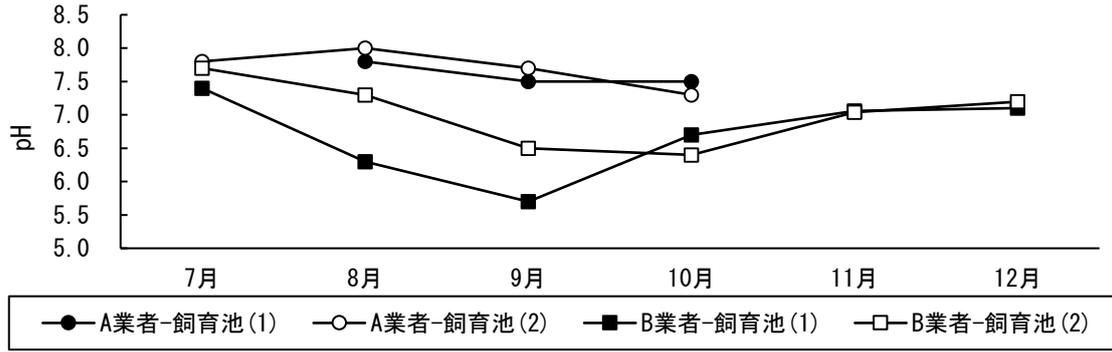


図5 モニタリング対象池における pH の推移

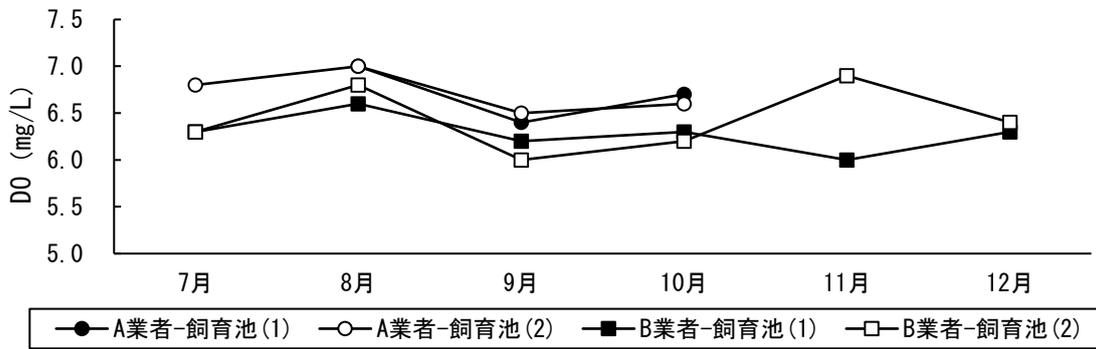


図6 モニタリング対象池における DO の推移

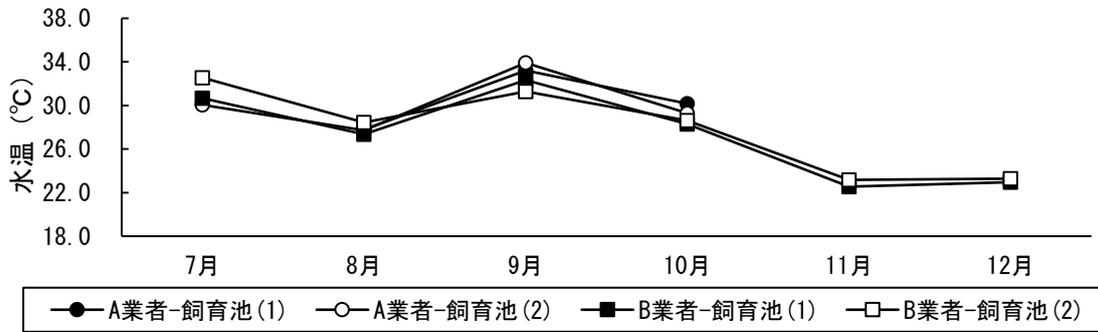


図7 モニタリング対象池における水温の推移

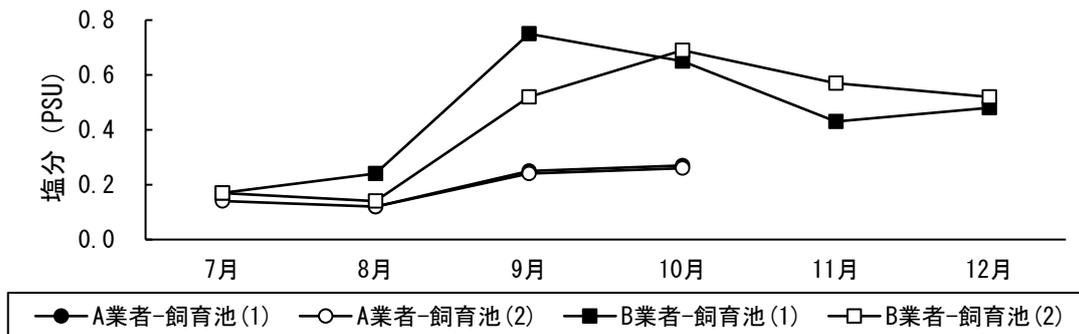


図8 モニタリング対象池における塩分の推移

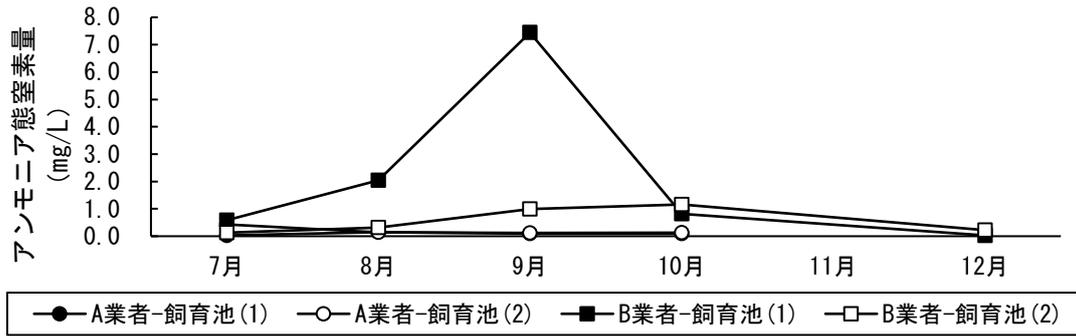


図9 モニタリング対象池におけるアンモニア態窒素量の推移

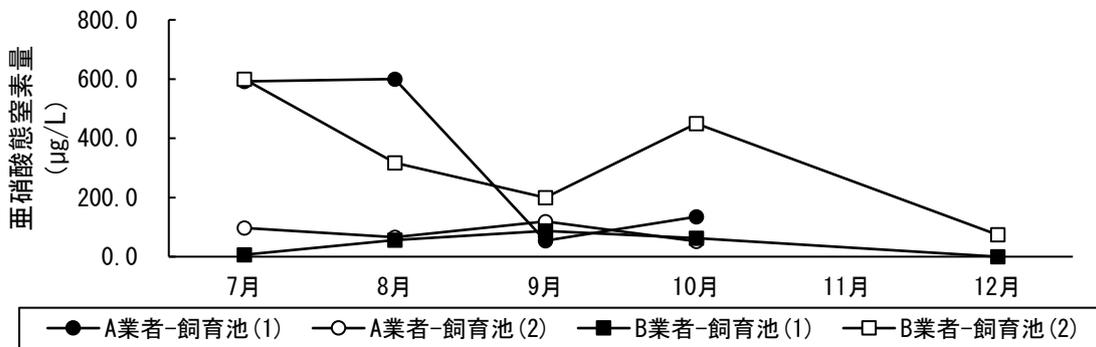


図10 モニタリング対象池における亜硝酸態窒素量の推移

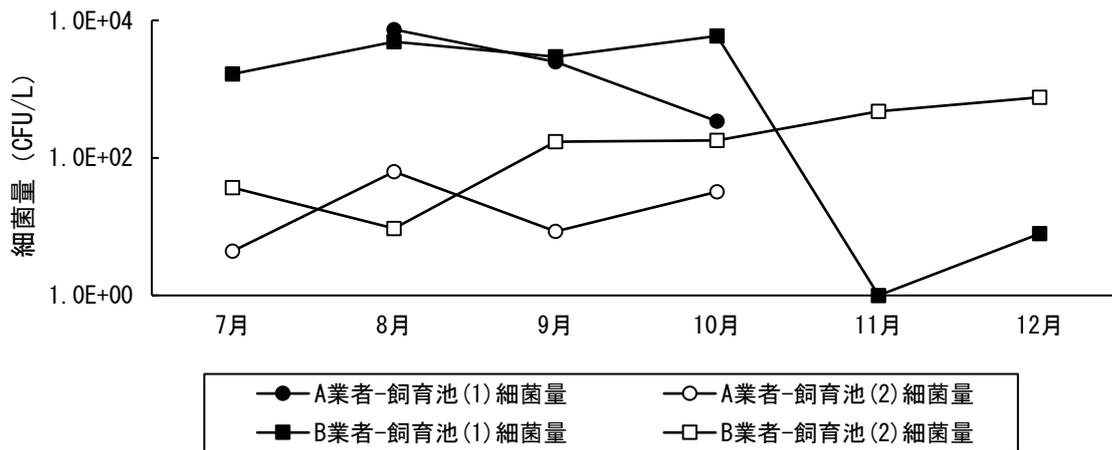


図11 モニタリング対象池における *E. anguillarum* 細菌量の推移

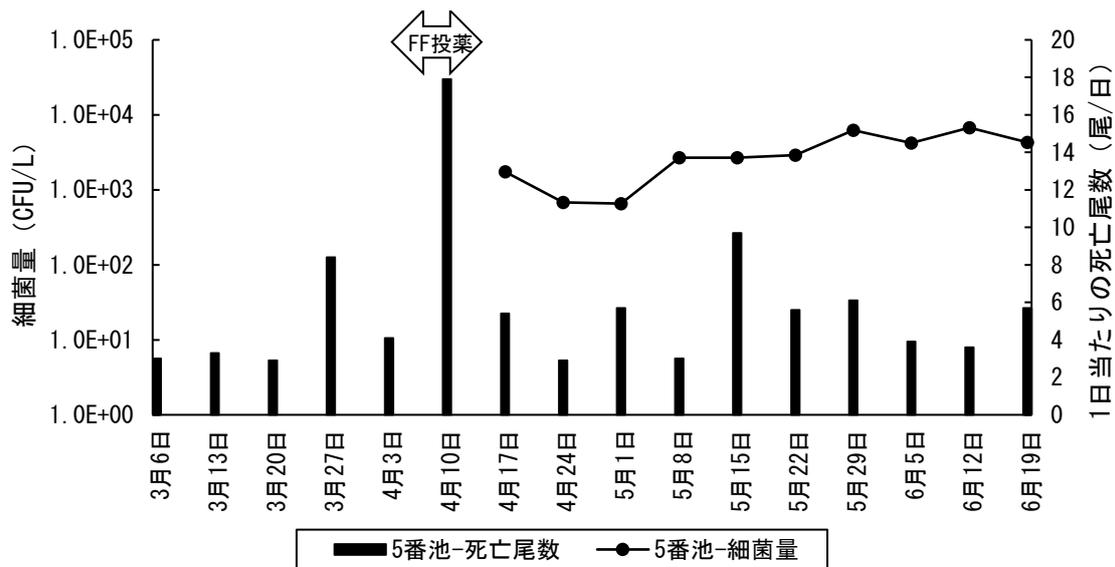


図 12 A 業者のパラコロ病発生飼育池（5 番池）における *E. anguillarum* 細菌量及び死亡尾数の推移

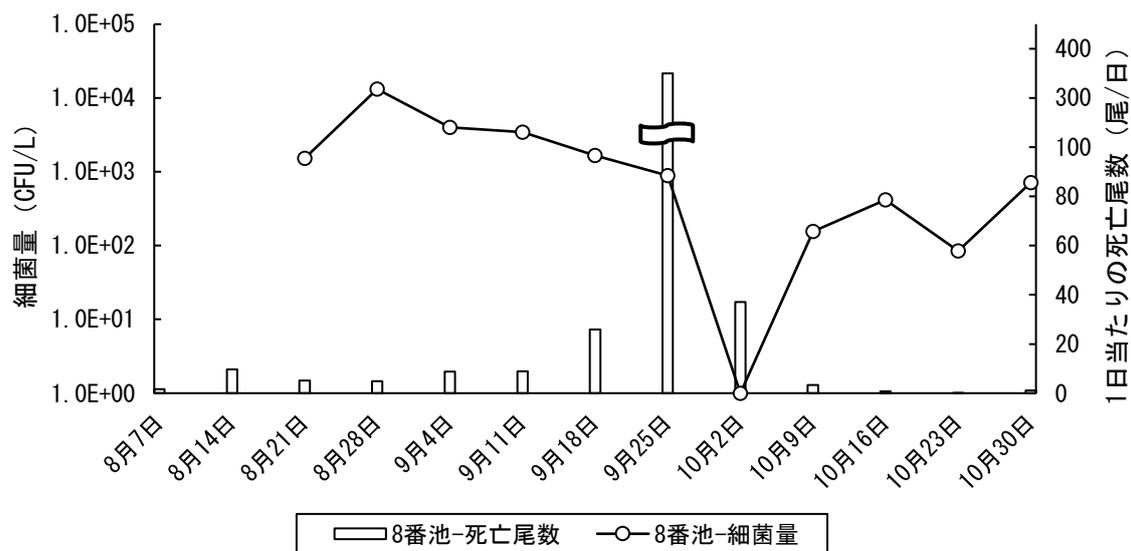


図 13 A 業者のパラコロ病発生飼育池（8 番池）における *E. anguillarum* 細菌量及び死亡尾数の推移

表 1 モニタリング対象池の飼育形式及び飼育尾数

業者名	飼育池	飼育形式	飼育尾数 (尾) ※試験開始時	飼育池面積 (m ²)
A業者	A業者-飼育池(1)	周年加温 (30℃)	10,026	300
	A業者-飼育池(2)		4,454	300
B業者	B業者-飼育池(1)	周年加温 (冬期のみ23~25℃)	4,400	210
	B業者-飼育池(2)		1,800	210

表2 浸漬感染法による感染試験結果概要

試験回及び 試験期間	感染手法	投与細菌量 (CFU/尾)	試験区	供試魚No.	平均魚体重 (g)	死亡日 (経過日数)	検査結果					
							外観及び内観症状	塗抹標本観察結果	SS寒天培地による 腎臓からの菌分離結果	肝臓及び腎臓抽出DNAの qPCR結果 (++)：陽性、(-)：陰性	抽出DNA1.0ngあたりの 原因菌DNAコピー数 (copies/ng)	
第1回 令和6年1月11日 ～15日	菌液の腹腔内 注射	3.0E+07					供試魚が試験開始2～3日目で全て死亡したため、試験を中断					
第2回 令和6年1月19日 ～29日	菌液の腹腔内 注射	6.0E+05	試験区		214.3	②試験区(1)	1月22日 (3日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓のうっ血	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	(+)	2.9E+02
						②試験区(2)	1月22日 (3日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓の褪色	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	(+)	3.6E+02
						②試験区(3)	1月23日 (4日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓のうっ血	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	3.8E+02
						②試験区(4)	1月23日 (4日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓のうっ血	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	7.9E+01
						②試験区(5)	1月23日 (4日目)	肛門の拡張 腎臓の腫脹	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	9.1E+00
						②試験区(6)	1月24日 (5日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓の一部うっ血	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	6.9E+00
						②試験区(7)	1月24日 (5日目)	肛門の拡張及び発赤 腎臓の腫脹	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	1.4E+01
						②試験区(8)	生存	症状なし	細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	(-)	-
						②試験区(9)	生存	症状なし	細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	(-)	-
						②試験区(10)	生存	症状なし	細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	(-)	-
	対照区	②対照区(1)～(10)	212.1	生存	症状なし	細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	(-)	-			
第3回 令和6年3月12日 ～22日	菌液の腹腔内 注射	1.0E+05	試験区		244.8	③試験区(1)	3月14日 (2日目)	体表の出血点 肛門の拡張及び発赤	肝臓：短桿菌及び雑菌 腎臓：短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	(+)	7.2E+02
						③試験区(2)	3月15日 (3日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓のうっ血	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	(+)	8.6E+02
						③試験区(3)	3月15日 (3日目)	肛門の拡張 肝臓の一部うっ血	肝臓：短桿菌及び雑菌 腎臓：短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	(+)	8.1E+02
						③試験区(4)	3月15日 (3日目)	体表の出血点 肛門の拡張及び発赤	肝臓：短桿菌及び雑菌 腎臓：短桿菌及び雑菌	中心黒コロニー出現	(+)	3.6E+02
						③試験区(5)	3月16日 (4日目)	肛門の拡張及び発赤 腎臓の腫脹	肝臓：短桿菌及び雑菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	1.3E+02
						③試験区(6)	3月17日 (5日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓の褪色	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	4.5E+02
						③試験区(7)	3月17日 (5日目)	肛門の拡張 腎臓の腫脹	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	2.7E+02
						③試験区(8)	3月17日 (5日目)	肛門の拡張及び発赤 肝臓の褪色	肝臓：短桿菌 腎臓：短桿菌	中心黒コロニー出現	(+)	5.8E+02
						③試験区(9)	生存	症状なし	細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	(-)	-
						③試験区(10)	生存	症状なし	細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	(-)	-
	対照区	③対照区(1)～(10)	239.1	生存	症状なし	細菌類の増殖見られず	細菌コロニー出現せず	(-)	-			