

アユ種苗生産現場におけるビブリオ病防除策としてのバチルス属細菌添加の有効性の検討

古川大・山口洋平・小松仁・原日出夫

Effectiveness of *Bacillus* bacterium additives for control of the vibriosis in the Ayu seedling production site.

Dai FURUKAWA*, Youhei YAMAGUCHI**, Jin KOMATSU**, and Hideo HARA*

緒 書

アユ *Plecoglossus altivelis altivelis* はキュウリウオ目アユ亜科に属する魚類で、特有の味と香りから食用や、友釣りなど遊漁の対象として需要がある¹⁾。また、内水面の漁業権対象魚種であることが多く、第5種共同漁業権者が漁業法に基づく増殖義務を達成するための放流を行っていることから、これらの需要に応えるために放流用アユ種苗の安定供給が求められている。

一般に種苗生産の過程においては様々な魚種で魚病の発生とそれに伴う被害があり²⁾、アユの種苗生産現場で発生する細菌性疾病として *Vibrio anguillarum* によるビブリオ病が知られている^{2, 3)}。本病に罹患したアユは仔魚期に体の屈曲や白濁、稚魚期では肛門の充血及び拡張、腸管の充血及び炎症などの症状を呈する。人為的に感染させた場合には死亡率が90%以上に達することが報告されて⁴⁾、1967年に浜名湖の海産稚アユで初めて確認されて以来⁵⁾、全国のアユ種苗生産現場で発生して被害をもたらしているほか⁶⁾、神奈川県内水面種苗生産施設（以下、生産施設）においても、アユ仔魚期におけるビブリオ病の発生が確認されている。

本病の対策として、ワクチンの投与や抗菌剤の投薬があるが⁷⁾、現在市販されているアユのビブリオ病ワクチンは体重0.6 g 以上の種苗について有効性が認められ用法が定められており、ふ化直後のアユ仔魚には

使うことができない。これは、魚類一般で4～6週齢未満の仔魚の液性免疫機能は未発達であり、6週齢を超えて機能を獲得したとしても、その直後は成魚に比べて応答能が低いことから、ワクチンを投与しても免疫を獲得することができないためとされる⁸⁾。また、現在、アユのビブリオ病に対して承認されている8種類すべての抗菌剤に対して耐性菌が出現した事例があるほか³⁾、厚生労働省は薬剤耐性対策アクションプランで薬剤耐性菌の出現抑制に取り組んでおり、社会的要請を鑑みても、可能な限りその使用を避けることが求められている。

このような背景からワクチンや抗菌剤を使用しない魚病の防除策として、魚類及び甲殻類に対するプロバイオティクス（腸内微生物のバランスを改善することによって宿主動物に有益に働く生菌添加物）⁹⁾の投与事例^{10, 11)}が報告されている。ビブリオ病対策としては、望月らがクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の養殖水槽にバチルス属細菌 *Bacillus* sp. を添加することで、ビブリオ属細菌 *Vibrio* sp. の増殖を抑制できたことを報告している¹²⁾。また、培地上の溶菌実験でバチルス属細菌がアユのビブリオ病原菌に対して溶菌作用を示すことから、生産施設ではアユ仔魚期のビブリオ病対策としてバチルス属細菌を飼育水に添加しているが¹³⁾、近年、ビブリオ病の発生が確認されている。そこで本研究では、生産施設におけるバチルス属細菌の添加量と添加方法を再検討するため、添加量の増加や、アユ仔魚の餌料に添加する投与法について従来の方法と比較検討した。

材料と方法

供試魚及び飼育条件

相模湾で採捕されたアユを神奈川県水産技術センター内水面試験場で継代飼育した親魚F3（継代数3）から受精卵を得た。卵は生産施設に移送してふ化させ、得られたふ化仔魚は水量100 tの円形コンクリート水槽6槽（各試験区2水槽ずつ）に表1の尾数で収容した。各試験区は塩分7‰の人工海水を水温18℃に維持しながら閉鎖循環ろ過で飼育し、餌料はシオミズツボワムシ*Brachionus plicatilis*を用いたほか、仔稚魚の成長に合わせて配合飼料を給餌した。

供試したバチルス属細菌

本試験では相川らがアユのビブリオ病原菌に対して溶菌作用を認め、これまで生産施設の飼育水に添加されてきたバチルス属細菌2菌株（No. 2及びNo. 10）¹³⁾を供試した。これら供試菌はポリペプトン10g、酵母エキス5g、人工海水1,000mLの組成で培養液を調製して、25℃で42時間通気培養した菌液を用いた。

試験区

①対照区「週に一度バチルス菌培養液8Lを飼育水に添加」、②大量添加区「週に一度バチルス菌培養液32Lを飼育水に添加」、③餌料添加区「日に一度、給餌直前にワムシ培養液にバチルス菌培養液1.14Lを混合して給餌することで、1週間当たり合計8Lの培養液を添加」の3試験区を設定して、各試験区に2水槽を割り当てそれぞれA水槽、B水槽とした（表1）。なお、本試験はアユ種苗を量産する施設において実施する試験であり、ビブリオ病が発生する可能性が見込まれるバチルス菌無添加区は設定できなかったことから、対照区は従来の添加方法である週に一度バチルス菌培養液8Lを飼育水に添加する方法とした。

アユの生残率及び、*V. anguillarum*の生菌数の算出

試験区別に表1の日数で飼育した後、水槽内の全ての供試魚を取上げて計数し、各水槽の生残率を算出した。各水槽の生残率から試験区ごとの平均生残率を算出して、対照区と大量添加区間及び、対照区と餌料添加区間の有意差の有無をイェーツの連続性補正を施す

こととした χ^2 検定により有意水準5%で検定した。

また、飼育開始後1週間ごとに各水槽の仔稚魚10尾を採取して、滅菌した生理食塩水100 μ Lを加えた後に滅菌綿棒ですり潰して摩砕液を調整し、摩砕液を滅菌生理食塩水で10倍及び100倍に希釈した後に、それぞれの希釈液100 μ Lをビブリオ菌の選択分離培地であるTCBS寒天平板培地（栄研化学）に塗布して、それらを37℃の孵化器内で48時間培養した。培養後に形成された各水槽のコロニー数について、10倍希釈塗布でのコロニー数（ f_1 ）及び100倍希釈塗布でのコロニー数（ f_2 ）から、次の式で生菌数を算出した。

$$\text{生菌数 (cfu/mL)} = ((f_1 \times 10 + f_2 \times 100) / 2) \times 10$$

なお、コロニーを形成した細菌は抗*V. anguillarum*血清に対する凝集反応から、*V. anguillarum*であるか否かを判定した。

結果

アユの生残率

各試験区の生残率は対照区A水槽とB水槽がそれぞれ21.4%、27.3%、大量添加区A水槽とB水槽がそれぞれ34.5%、39.7%、餌料添加区A水槽とB水槽がそれぞれ38.9%、8.6%であった。餌料添加区B水槽では飼育19日目から腹部が白濁して死亡する仔魚が発生して生残率が低下し、白濁箇所を鏡検したところ細胞が長く糸状に連なった菌糸が観察されたことから、真菌病による死亡と判断して、本水槽の値は評価に用いないこととした。対照区と大量添加区間での平均生残率及び、対照区の平均生残率と餌料添加区A水槽の生残率間の両方で有意差はなかった（表1）。なお、本試験での飼育中にアユのビブリオ病の症状を呈した死亡魚は見られなかった。

*V. anguillarum*の生菌数

表2のとおり、対照区A水槽でのみ、培地上に緑色コロニーを形成するビブリオ属細菌が2回分離された。一方で、大量添加区及び餌料添加区ではAB両水槽とも分離されなかった。また、抗*V. anguillarum*血清に対して凝集したコロニーはなかった。

表1 各試験区におけるふ化仔魚の収容数、回収数、生残率及び飼育期間と日数

試験区、飼育期間（2021年）及び日数		収容数 (万尾)	回収数 (万尾)	生残率 (%)
対照区	平均	81.3	20.4	25.0
	A水槽(9/24-12/10の77日間)	62.5	13.4	21.4
	B水槽(10/12-12/15の64日間)	100.0	27.3	27.3
大量添加区	平均	137.0	51.1	37.3
	A水槽(10/1-12/9の69日間)	127.0	43.8	34.5
	B水槽(10/8-12/14の67日間)	147.0	58.3	39.7
餌料添加区	平均	—	—	—
	A水槽(10/1-12/10の70日間)	152.3	59.2	38.9
	B水槽(10/5-12/13の69日間)	188.2	16.1	8.6※

※餌料添加区B水槽は真菌病による減耗があったため生残率を統計処理から除いた。

対照区と大量添加区の平均生残率間及び、対照区の平均生残率と餌料添加区A水槽の生残率間で有意差なし（N. S. , χ^2 検定（イエーツの連続性補正済み））

表2 仔稚魚の摩砕液から分離されたビブリオ属細菌の生菌数

(cfu/mL)

試験区		採取日							
		10/20	10/27	11/2	11/10	11/17	11/24	12/1	12/8
対照区	A	0.0	0.0	2.0×10 ³	2.5×10 ²	0.0	0.0	0.0	0.0
	B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
大量添加区	A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
餌料添加区	A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	B	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

考 察

本試験では対照区も含めて、全ての試験区においてビブリオ病の症状を呈した死亡魚は観察されず、*Vibrio anguillarum*も分離されなかったことから、ビブリオ病は発生しなかったと判断して、ビブリオ病の発症による生残率に基づいた各添加条件の有効性を検討することはできなかった。しかし、仔稚魚の摩砕液から分離されたビブリオ属細菌の生菌数に着目すると、大量添加区及び餌料添加区ではビブリオ属細菌が全く分離されなかったほか、Moriarty(1998)及び望月ら(2008)が報告しているバチルス属細菌がTCBS寒地培地上で緑色コロニーを形成するビブリオ属細菌の増殖を抑制するという知見と類似した傾向として^{12,14)}、本試験でも対照区でのみ緑色を呈するコロニーを形成す

るビブリオ属細菌が分離されたが、大量添加区と餌料添加区では分離されなかった。

このことから、従来の添加条件は、ビブリオ病の発生をある程度抑制できると考えられるが、アユの仔稚魚からビブリオ属細菌が分離されているので、日和見感染等によるビブリオ病の発症リスクを有することが考えられた。これに対して、餌料添加区及び大量添加区では仔稚魚からビブリオ属細菌が分離されず、従来の添加条件に比べてビブリオ病の発症リスクをより低下させた可能性が考えられた。さらに、餌料添加区は1週間当たりのバチルス菌液の添加量が対照区と同じであったが、4倍の添加量である大量添加区と同様に仔稚魚からビブリオ属細菌が分離されなかった。このことから、バチルス菌液を餌料に添加したほうが、飼育水への添加に比べて少ないバチルス菌液量でビブリオ

病の防除効果が得られるものと考えられた。

本試験と同様に、プロバイオティクス製剤として細菌等を餌料添加等で経口投与した場合に、イシビラメ及びヒラメにおけるビブリオ病及び、ニジマスにおけるせつそう病の防除効果が得られた事例が報告されている^{15, 16, 17)}。これらの防除要因として、プロバイオティクス製剤中の細菌が消化管内壁で他の細菌を溶菌しつつ増殖して、細菌叢で優占して他の細菌の増殖に必要な栄養と空間を独占する結果、病原細菌が増殖できずに魚病の発生が抑えられるものと推察されている^{10, 11)}。特に、バチルス属細菌を経口投与した場合における防除効果は複数の魚種及び魚病で報告されており¹¹⁾、その作用機序としても、消化管表面での優占及び競争による病原細菌の排除が考察されている¹⁴⁾。これらを裏付ける知見として、飼育環境中にバチルス属細菌を添加すると、その生物の消化管細菌叢ではバチルス属細菌が急激に増殖することで細菌叢の約9割を占め得ることが確認されているほか¹⁸⁾、バチルス属細菌は20種類以上の抗生物質を産生して¹⁹⁾、アユから分離された*V. anguillarum*を含む複数の種類の魚病細菌を溶菌することが報告されている¹³⁾。また、アユにおける*V. anguillarum*の侵入経路は表皮及び肛門であり、そこから侵入した菌が消化管内壁で増殖することで、肛門の充血あるいは消化管の炎症といった症状を呈してビブリオ病を発症する²⁰⁾。これらの知見から、本試験の餌料添加区においても、バチルス属細菌が消化管内壁に達して、前述と同様の作用機序によりビブリオ属細菌の増殖が抑制されたものと推察された。

また、飼育水の浸透圧に着目すると、アユのような広塩性魚類は周囲の水の浸透圧が自身の体液の浸透圧である約300mOsm/Lを境にこれよりも低いと水の飲み込みが抑制され、高いと促進される²¹⁾。生産施設の飼育水は塩分7‰人工海水で、その浸透圧は200mOsm/Lに満たないことから、仔稚魚の飼育水の飲み込みが抑制されたと考えられる。一方で飼育水の塩分を上げて浸透圧を上昇させると飲み込みが促進されるので、飼育水とともに経口摂取されることで、本試験の手法よりも効率的にバチルス属細菌を取り込むことができる

可能性があり、今後この条件を満たす飼育水の浸透圧について検証したい。

本試験で設定した「飼育水への大量添加」及び「餌料添加」のいずれかの添加条件下であれば、従来の方法よりもアユ体内でのビブリオ属細菌の増殖を抑制でき、さらに、「餌料添加」では「大量添加」に比べて少ないバチルス菌液量でも効果が得られ、ビブリオ病の防除策として有効であると考えられた。ただし、バチルス属細菌を添加した条件下であっても、餌料添加区B水槽のように、真菌症に対する予防策を講じる必要がある。真菌症に対しては飼育水の高pH化が防除に有効との報告があることから²²⁾、pHを高める対策等を併せて検討したい。バチルス菌の飼育水への添加は閉鎖循環飼育施設において汚泥を減少させるほか²³⁾、ヒラメ養殖における飼育水質の改善及びストレス耐性の増強が報告されていることから¹⁷⁾、アユ種苗の生産過程における生残率の向上に寄与することが期待され、これらの効果についても今後の検討課題としたい。

文 献

- 1) 中村智幸 (2019) : 日本における海面と内水面の釣り人数および内水面の魚種別の釣り人数. 日本水産学会誌, **85** (4), 398-405.
- 2) 江草周三 (1972) : 魚病細菌と魚病. 日本細菌学雑誌, **27** (6), 739-744.
- 3) 石丸克也・中井敏博 (2017) : ビブリオ病. 魚病研究, **52** (3), 120-125.
- 4) 楠田理一・川合研児・城泰彦・秋月友治・福永稔・小竹子之助 (1978) : アユのビブリオ病に対する経口ワクチンの効果について. 日本水産学会誌, **44** (1), 21-25.
- 5) Muroga K. and Egusa S. (1967) : *Vibrio anguillarum* from an Endemic Disease of Ayu in Lake Hamana. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, **33** (7), 636-640.
- 6) 城泰彦 (2015) : アユ 日本魚病学会50周年記念シンポジウム「魚病問題 過去・現在・未来」, 魚病研究, **50** (3), 134-136.
- 7) 農林水産省 消費・安全局 畜水産安全管理課

- (2024) : 水産用医薬品の使用について (第37報) . 農林水産省, 29.
- 8) 中西照幸 (1998) : 魚類ワクチン開発の現状と展望. 水産増殖, **46** (3) , 461-468.
- 9) Fuller R. (1989) : Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, **66**, 365-378.
- 10) Gatesoupe F. J. (1999) : The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture, **180**, 147-165.
- 11) Irianto A. and B. Austin (2002) : Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases, **25**, 1-10.
- 12) 望月秀郎・竹内俊郎 (2008) : 閉鎖循環式水槽におけるクルマエビの成長・消化およびビブリオ菌抑制に及ぼすプロバイオティクスの影響, 水産増殖, **56** (3) , 281-294.
- 13) 相川英明・山本裕康 (2010) : 魚病細菌に対するバチルス菌の溶菌作用, 神奈川県水産技術センター研究報告, **4**, 39-41.
- 14) Moriarty D. J. W. (1998) : Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture, **164**, 351-358.
- 15) Gatesoupe F. J. (1994) : Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, against pathogenic vibrio. Aquatic living resource, **7**, 277-282.
- 16) Nikoskelainen S., A. Ouwehand, S. Salminen and G. Bylund (2001) : Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture, **198**, 229-236.
- 17) Taoka Y., Maeda H., Jo J.-Y., Jeon M.-J., Bai S. C., Lee W.-J., Yuge K. and Koshio S. (2006) : Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. Fisheries science, **72**, 310-321.
- 18) Ziaei-Nejad S., Rezaei M. H., Takami G. A., Lovett D. L., Mirvaghefi A.-R. and Shakouri M. (2006) : The effect of *Bacillus* spp. bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture, **252**, 516-524.
- 19) Torsten S. (2005) : *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology, **56** (4) , 845-857.
- 20) Kanno T., T. Nakai and K. Muroga (1989) : Mode of Transmission of Vibriosis among Ayu *Plecoglossus altivelis*. Journal of Aquatic Animal Health, **1** (1) , 2-6.
- 21) 金子豊二 (2015) : 魚類の浸透圧調節とセシウムの排出. 日本海水学会誌, **69** (4) , 238-243.
- 22) 安信秀樹・永山博敏・中村和代・畑井喜司雄 (1997) : 飼育水の pH 調整によるガザミ幼生真菌症の防除. 日本水産学会誌, **63** (1) , 56-63.
- 23) 相川英明 (2009) : 養殖用底質改善剤使用菌株の溶菌活性, 第24回神奈川県水産技術センター業績発表会講演要旨集