

増養殖環境における微生物の生態と利用に関する研究

野口 浩介

Ecology of microorganisms and their use in the aquaculture environment

Kohsuke NOGUCHI

キーワード：バイオコントロール, 有用細菌, 水産養殖

Summary

In order to prevent of multiplication of viral and bacterial pathogens which infect to fish, the research of the function of antagonistic influences among microorganisms in aquaculture should be useful. For this purpose, marine and fresh water bacteria that have the properties of virucidal and bacteria-static activities in the aquaculture site was investigated. Firstly the microbes which attached to the several substrates in aquaculture environments were isolated. Among these strains that maintained the bacteria-static activities there were few in the anti-*Edwardsiella* though half the number had the anti-*Vibrio* activities, and several had the virucidal activities, from aquaculture water, the glass slide, and the biofilm set to the fish-rearing container. After this study several bacterial strains were obtained that keep anti-pathogen activities and were used for the following studies.

In the study of antagonistic bacterium, the process of microbial interactions was used for prevention of red sea bream diseases. As a result, *Edwardsiella tarda* infecting to red sea bream was restrained using the bacteria LMC-9 strain given as a feed to fish. In addition, the number of neutrophil increased six times more compared with the fish in the control experiment.

The EKZ-2 strain isolated from the macroalgae *Ecklonia kurome* zoospore, which has the anti-bacterial activities for pathogenic *Vibrio anguillarum* and *E. tarda* was used for rearing flat-fish. The increased body weight of flat fish juvenile was obtained using the EKZ-2 strain, and also in situ, the survival rates of flat fish was much improved in the mass production of the larvae.

Number of bacteria decreased in copper sterilized water compared in usual aquaculture water, and *Flavobacterium* and *Vibrio* were dominating in aquaculture water where copper was used. Moreover, when the EKZ-2 strain was inoculated in the low concentration copper medium, the growth was inhibited.

The mortality rate became 73% without EKZ-2 strain while it was 0% with EKZ-2 strain as a result of the *Edwardsiella* syndrome infection in eel aquaculture.

Also in eel aquaculture *in situ*, the presence of *E. tarda* was investigated in rearing water, soil of the bottom in the ponds and the bodies of eel using PCR. As a result, The *E. tarda* detection rates were 56.8% without PMC-7 strain, while with PMC-7 was 18.9% in aquaculture water. Moreover, the change of the density of the nutritive salts in the aquaculture environment was verified with and without PMC-7. It was confirmed that the

concentration of the nutrients decreased with PMC-7. In eel aquaculture *in situ*, the survival number of the eel was much higher using PMC-7 than that without PMC-7.

With the studies of these microorganisms and their use *in vitro* and *in situ*, several results were obtained; that is, ① the pathogenic microbes were depressed, ② the immune activities were increased with these microorganisms, ③ the survival and production rates of aquaculture fish were improved, and ④ nutrients concentration in fish rearing biotopes was decreased using the microbes as a feed to fish.

第1章 はじめに

魚介類と環境水との接点における微生物の機能は、これら水族動物の生残、成長等に様々な作用をおよぼすと考えられている。例えば、魚介類の体表面やその周辺の有用微生物と病原微生物との相互作用において、病原微生物が優勢である場合には、魚介類の感染・罹病する機会も増大し、一方、病原菌の増殖を抑制する有用微生物が優勢である状態では、魚介類の疾病感染頻度の減少する可能性がある。病原菌が優占しない場合においても、魚体の抵抗力が弱い場合等では疾病は発生するが、伝染性疾病のように健康と考えられていた魚介類が短期的に感染する過程では、このような微生物間の相互作用、平衡関係が関与すると考えられる。

自然界で進行している微生物の相互作用には、中立、共生（片利、相利等）、競合等がみられる。中立は、微生物間に距離があるか、あるいは微生物種において、環境への要求あるいは適合性が異なる場合などに成立し、このような関係は概して微生物の少ない場で生じる。片利共生は、一方の微生物が他方より利益を得て、利益を与える方には影響がない状況を現しており、ミルク中の *Streptococcus lactis* と酵母 *Geotrichum candidum* との間にこの関係がみられる。すなわち、*S. lactis* は乳酸濃度が1%以上になると増殖できなくなるが、共存する *G. candidum* がこの乳酸を酸化すると *S. lactis* の増殖が維持される。酵母は乳酸がなくても増殖でき、この反応条件において特に利益を得ているとはいえないため、両者の関係は片利共生と考えられる¹⁾。相利共生は、双方が利便を得るために生息しており、一方のみの存在ではその機能を遂行できない場合をいう。フィニルアラニンを要求する *Lactobacillus arabinosus* と葉酸を要求する *Streptococcus faecalis* は、お互いに他方の微生物がこれらの物質を生産するため、ともに増殖が可能となる²⁾。

藻類に付着する微生物は藻類の生産する栄養物質を利用し、また微生物が生産するビタミン B₁₂ が藻類に利用される例^{3,4)} も相利共生関係といえる。また、アブラムシと、その細胞内で生息するブフネラ細菌は、非常に強い相利共生の関係にある。アブラムシが主食としている植物の師管液には、グルタミンとアスパラギン以外の必須アミノ酸はほとんど含まれていない。本来ならアブラムシはこれだけで生命を維持することは不可能であるが、アブラムシの細胞内のブフネラが、これら2つのアミノ酸を基に他のアミノ酸を合成し、アブラムシに供給しているため、結果的に師管液のみで必要な栄養を得ることができる。このように、アブラムシはブフネラなしでは生命を維持することができないが、一方、ブフネラは自らの生命を維持するための遺伝子の多くを失っており、アブラムシの細胞内でしか分裂・増殖することができない。この共生関係は2億年にわたり世代間で引き継がれており、共生関係以前のブフネラの祖先は、大腸菌の仲間であったと考えられている⁵⁾。

競合も、自然界では恒常的に進行している現象といえる。微生物は、ほかの生物と同様に、隣接する生物や環境要因に対応して生存しなければならないが、とくに微生物の場合は、増殖が速く、かつ生物量も多いため、ほかの生物よりも競合の度合いは大きいと考えられる。この競合には、抗菌物質によるほかに、微生物作用によって生じる酸化還元電位の変化によって、他微生物の増殖が阻害される場合などがあり、概して栄養塩が十分に存在する生息場の少ない自然環境では、微生物間で物質をめぐる競合がおきる。

生物防除（生物学的防除、バイオコントロール、Biological control, Biocontrol）は自然界に進行している生物間の競合の中で、主として拮抗作用を利用した方法であり、天敵生物を増殖させることによって病原微生物の防除を行う目的で開発された。農業領域における生

物防除方法では、天敵生物を外部より移入させる直接的な技術（Classical or Augmentative biocontrol）と、有害微生物を阻害するあるいは低減するような植物を栽培するなどして当該生産対象植物を保護するといった間接的生物防除技術（Conservation biocontrol）、さらに両者の特徴を併用する方法等が採用されている。このような生物防除に使用する天敵生物をバイオ農薬あるいはバイオコントロール製剤とよんでいる。このバイオコントロール研究は農業分野で1960年代後半より始まっており、この生物防除製剤（バイオ農薬）の特徴は、①人畜に危害がない、②病原生物に作用する選択性が高く、生態系を大きく攪乱することがない、③ウイルスなどの生物防除製剤は、抗生物質によって抑制されないで、化学農薬との併用が可能な場合がある、などとなる。短所としては、①速効性を欠き、対象生物の発育段階、生息密度により効果の変動が大きい、②微生物は増殖停滞、死滅など変化しやすく、このため製剤の均一性、安定性に工夫を必要とする、③微生物株によって活性に相違がある、また保存株の活性低下が生じる、などがある。

日本における水産増養殖では、1980年代に入り種苗生産技術が飛躍的に向上し、各種海産魚の集約的養殖が行われるようになった。このため、生産量は増大しているが、一方、種苗生産および養成過程ではウイルス病による被害が続発している。これらのウイルス病は致死性が高く、種苗生産および養殖業において大きな損害となる。疾病例では、ヒラメの仔魚に特有のウイルス性表皮増生症、ブリの稚魚に発生するウイルス性腹水症（YTAV）、イシダイ、シマアジなどの種苗生産対象魚に発生するウイルス性神経壊死症（VNN）などがある。また、甲殻類においてもウイルス病は深刻な問題となっており、台湾においては、突発的かつ広範囲に発生したエビウイルス疾病により、1987年に80,000トン/年以上に達したウシエビ生産量が翌年（1989年）30,000トン/年に減少、90年には10,000トン/年を下回った。また、日本でもクルマエビ類の急性ウイルス血症（PAV）が深刻な問題となっており、クルマエビ養殖業に多大な損害を与えてきた。他にもサケ科魚類に感染する伝染性造血器壊死症ウイルスや伝染性脾臓壊死症ウイルス、ヒラメのラプトウイルス、ブリに感染する腹水症ウイルス、シマアジの神経壊死症ウイルスなど、大きな被害を生じ

る疾病が報告されている。本研究では、後述のような、バイオコントロール（生物防除）において、拮抗細菌を用いたウイルス疾病の防除を目的として、抗ウイルス細菌の探索、分離を行った。

細菌性疾病については、マダイ養殖におけるマダイ・エドワジエラ症が、1980年代では散発的な発生が報告される程度であったが、1990年後半ごろから、徐々に流行しはじめた。しかし、その頃のマダイ養殖では、まだ中心的な疾病ではなく、4大疾病としては、マダイイリドウイルス病、ピバギナ症、滑走細菌症、エピテリオシスチス病となっていた。ところが、現在においては、エドワジエラ症はマダイ疾病において最も大きい被害が生じている。発生期間も以前は水温20℃以上で流行していたのに対して、現在は周年発生しており、稚魚から2kg以上の出荷サイズまで罹病する。実際に2008年のマダイ養殖では高水温期のイリドウイルスによる大規模な被害は少なかったものの、代わって夏以降期にエドワジエラ症が当歳から出荷サイズまで幅広く発病し、大きな問題となっている。養殖現場での治療としては、塩酸オキシテトラサイクリン、オキソリン酸、アンピシリン等の抗菌剤に頼っている現状であるが、薬剤耐性菌の出現等の新たな問題も出てきている。

また、ウナギ養殖においても、温室での加温飼育、いわゆるハウス養鰻が盛んになり、常に高水温で飼育されるようになったため、*Edwardsiella tarda*によるパラコロ病が成長段階や季節を問わず発生し、大きな問題となっている。*Edwardsiella tarda*は、グラム陰性の運動性短桿菌（0.5～1×1～3 μm）で、周毛を持つ。発育可能温度は15～42℃、至適温度約31℃、発育可能塩分濃度0～4%である。このパラコロ病の症状としては、鰭や腹部に発赤を生じ、鰭赤病に似た症状を示す。細菌性疾病はウイルス病とは異なり、予防や治療が可能のため、様々な化学療法剤が養鰻池に大量に長期間投与されてきた。現在、ウナギのパラコロ病の治療用の水産用医薬品としては、オキソリン酸、フロルフィニコール、塩酸オキシテトラサイクリン、ミロキサシン、スルファモノメトキシシン・オルメトロプリム配合剤が市販されている（平成21年現在）。その結果、魚病細菌の薬剤耐性化が進み、魚類養殖では新たな問題となっている。特に*E. tarda*は、薬剤耐性化が進み、様々な多剤耐性株が出

現しており、その結果、現場養鰻池では、薬剤を使用しても斃死が止まらない状況にある。

これまでにいくつかの養殖魚介類の疾病防除方法が行われてきた。すなわち、病原菌に未感染の親魚の選定、薬浴による親魚や卵の殺菌、飼育水の殺菌、飼育水の連続的な交換、薬剤投与などの方法が一般的に採用されている。この中で、飼育水の殺菌では、微細フィルターによる濾過とともに、紫外線やオゾンによる処理、さらに塩素剤、抗生物質などの薬剤が使用されているが、これらの手法による、養殖水中の細菌数の減少は一時的な現象にすぎない。例えば抗生物質を飼育水に添加した場合には、薬剤の量と種類によって異なるものの、細菌数が減少・低濃度に維持された後に、耐性菌等の増加により細菌数は数十時間で、もとの濃度までに回復する⁶⁾。また、濾過及びオゾンや紫外線殺菌処理においても、餌飼料の添加などによって新たな微生物が加入するとともに、水槽壁などの付着微生物が水中に供給されるため、結局は処理前とほぼ同数の微生物が養殖水中に生息することになる。このように、これらの処理で飼育環境から微生物を取り除くことはむずかしく、逆に殺菌処理の後では、細菌群集間の拮抗作用が減少するため、特定の細菌が急速に増加することも考えられる。実際に大半の養殖場がこのような殺菌処理を行っているにもかかわらず、養殖魚の疾病発生は止まらず、かえって被害の規模が拡大していることから、このような処理の効果の低いことが推察できる。そして、国内外の養殖現場では、代替えとなる疾病防除方法のない状況において、しばしば人間への害となる核酸染色剤、ホルマリン、銅イオンなどが使用されており、これらの薬剤などの使用は、消費者の養殖魚への不信感増大の一因となっている。

このような状況において、水産分野におけるバイオコントロール製剤の研究は、1989年に初めて、魚の成長促進効果と同時に病原菌の増殖を抑制する有用な機能を保持した微生物が報告された⁷⁾。その後、現在までに同じような微生物の探索と水産養殖への実用化例が100編以上の論文で報告されている⁸⁾。世界でこのような急速な研究の発展の背景には、養殖における過剰な薬剤使用に対する消費者の危惧感の増大と監視体制の強化が挙げられるが、同時に薬剤の効力が低減し疾病防除が難しくなっている現状がある。しかし、このような研究の進展

にもかかわらずこれらの微生物の養殖への実用化プロセスでは、多くの解決すべき問題があり、例えば使用する微生物の養殖水中における消長等の知見も十分に明らかにされていない。また、水中への有用細菌の定着方法等も確立していない現状にある。

そこで、本研究においては、第2章で、養殖水中及び付着基盤上の細菌分布の様相、この細菌群集中の抗ウイルス・抗病原性細菌の割合等を明らかにするとともに、拮抗細菌の探索、分離をおこなった。第3章では、近年発生事例が増加し、問題となっている、*E. tarda*を原因菌とするマダイ・エドワジエラ症に対して抗菌活性を保持する拮抗細菌を投与することで、疾病防除できるか否か、バイオコントロール方法の検討を行った。また、拮抗細菌を投与することで、マダイの非特異的生体防御である白血球、特に好中球の働きが増強されるか否かを検定した。第4章では、*Vibrio*属の細菌および*E. tarda*に対して抗菌活性を保持する拮抗細菌を探索した。その後、ヒラメの種苗生産を行っている養殖水中へ拮抗細菌を投与することで、ヒラメ種苗の生残が向上するかを調べ、さらに、飼育水中の投与細菌の消長を調べた。また、銅イオン殺菌を行っているヒラメ養殖場において、細菌群の変動を調査し、特に銅耐性菌の出現に関する研究を行った。第5章では、第4章で*E. tarda*に対して抗菌活性を保持していることが判明したEKZ-2株を使用し、ウナギ養殖現場におけるパラコロ病の防除を目的として、薬剤を使用しないバイオコントロール法の開発を行った。第6章では、アユ養殖池から分離した、*E. tarda*に対して強い拮抗作用を保持する菌株をバイオコントロール製剤とし、エドワジエラ症防除試験を行った。さらに、養鰻池現場において、拮抗細菌を投与することで、ウナギ養殖水中や底層土での細菌数、細菌相や*E. tarda*の消長を検定した。また拮抗細菌を投与することで養殖環境、主に養殖水中と底層土（ヘドロ）の栄養塩が対照区と比べて、変化するか否かを検定した。

ここに、本論文研究をとらえて、養殖環境における拮抗細菌と病原菌の生態の一端を明らかにすることにより、拮抗細菌を有効に利用する疾病防除方法、バイオコントロールのさらなる確立を目指した。

第2章 養殖環境からの拮抗細菌の分離

緒言

日本では1980年代に入り種苗生産技術が飛躍的に向上し、各種海産魚の集約的養殖が行われるようになった。このため、生産量は増大しているが、一方、種苗生産および養成過程ではウイルス病による被害が続発している。これらのウイルス病は致死性が高く、種苗生産および養殖業において大きな損害を生じている。疾病例では、ヒラメの仔魚に特有のウイルス性表皮増生症(VEH)、ブリの稚魚に発生するウイルス性腹水症(YTAV)、イシダイ、シマアジなどの種苗生産対象魚に発生するウイルス性神経壊死症(VNN)などがある。また、甲殻類においてもウイルス病は深刻な問題となっており、台湾においては、突発的かつ広範囲に発生したエビウイルス疾病により、1987年に80,000トン/年以上に達したウシエビ生産量が翌年(1989年)30,000トン/年に減少、90年には10,000トン/年を下回った。また、日本でもクルマエビ類の急性ウイルス血症(PAV)が深刻な問題となっており、クルマエビ養殖業に多大な損害を与えてきた。他にもサケ科魚類に感染する伝染性造血器壊死ウイルスや伝染性膀胱壊死ウイルス、ヒラメのラプトウイルス、ブリに感染する腹水症ウイルス、シマアジの神経壊死症ウイルス、タイに感染するイリドウイルス病等の、大きな被害を生じる疾病が報告されている。

これらのウイルス病の防除では抗生物質等の薬剤の効果が低いため、微生物の拮抗作用による病原菌の抑制方法の開発が期待されている。実際、自然海水中においては抗ウイルス作用を持つ細菌が生息し、これらの細菌がウイルスを分解することが判明しており⁹⁻¹¹⁾、また水産養殖においても菌株 *Pseudoalteromonas undina* によって、SJNNV、バキュロウイルスおよびイリドウイルスの稚魚感染が防除された例がある⁶⁾。このように、水圏水中にはウイルスを不活化する抗ウイルス微生物が生息しており、これらの有用微生物を利用した場合には魚介類のウイルス感染を防除することが期待できる。

養殖環境における拮抗微生物の生態に関する研究は、1989年に初めて、魚の成長促進効果と同時に病原菌の増殖を抑制する有用な機能を保持した微生物が報告されて

以来⁷⁾、現在までに同じような微生物の探索と水産養殖への実用化例が100編以上の論文で報告されている^{8,12)}。世界でこのような急速な研究の発展の背景には、養殖における過剰な薬剤使用に対する消費者の危惧感の増大と監視体制の強化が挙げられるが、同時に薬剤の効力が低減し疾病防除が難しくなっている現状がある。しかし、このような研究の進展にもかかわらずこれらの微生物の養殖への実用化プロセスでは、多くの解決すべき問題があり、例えば使用する微生物の養殖水中における消長等の知見も十分に明らかにされていない。また、水中への有用細菌の定着方法等も確立していない現状にある。

本研究は、養殖水中に設置した付着基盤上に分布する抗ウイルス・抗病原菌活性を保持する機能性細菌を利用して、魚介類の疾病を生物的に防除する方法の確立を目的としている。本章では、養殖水中及び付着基盤上の細菌分布の様相、この細菌群集中の抗ウイルス・抗病原性細菌の割合等を明らかにした。

材料及び方法

バイオフィルムの採取

イシガキダイ *Oplegnathus punctatus*、ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 及びホシガレイ *Verasper variegatus* を飼育している循環濾過式水槽において、養殖水とバイオフィルムを採取した。

バイオフィルム形成のためには、養殖水中に滅菌済みスライドガラスを浸漬し、5日間通して毎日適当数のスライドガラスを採取し、滅菌海水を満たした100mlビーカーに静置、直ちに実験室に運んだ。次にスライドガラス上のバイオフィルムを、滅菌セルスクレーパーで剥離した。また濾過槽中の生物濾過材上のバイオフィルムも滅菌ブラシを用いて滅菌海水中で剥離し、採取した。

細菌分離

採取したバイオフィルムは、試験管中の滅菌海水で十分に攪拌した後、 10^{-1} ~ 10^{-6} の希釈段階を順次設定し、希釈水を100 μ lずつ平板寒天培地(ZeBell 2216E)に接種した。この平板培地は20°Cで1週間培養し、その後コロニー数(生菌数)を計測した。

また、直接計数法を用いた総菌数の計数は、Porter and Feig¹³⁾の直接計数法、いわゆる DAPI (4'6-

diamidino-2-phenylindole) 染色法を採用した。すなわち、あらかじめ2%ホルマリンで固定した試水に濾過滅菌した DAPI 溶液 (1 μ l/ml) を添加し、暗所で5分間放置、次に、吸引濾過によってヌクレポアフィルター上に上記混液中の細菌粒子を捕集した後、フィルターを滅菌蒸留水で数回洗浄した。このフィルターを無蛍光イマージョンオイルを1滴置いたスライドガラスにのせ、カバーガラスで封入した。その後、落射蛍光顕微鏡を用いて UV 励起下で細菌数を計測した。

抗 *Vibrio* 試験

Maeda and Nogami⁷⁾ の方法に基づいて、単分離した細菌の抗菌活性を検定した。ZoBell 2216E 平板寒天上で供試菌を平行になるように2本塗抹 (スミアの長さ4cm, スミア間隔3cm) した後、3日間培養した。次に、寒天培地にピブリオ病の原因菌である *Vibrio anguillarum* (American Type Culture Collection 19264) を供試細菌の間に長さ2cmのスミアになるように塗抹した。同時に対照区として *V. anguillarum* のみを塗抹した平板培地を設定した。これらの菌を移植した培地を10日間培養した後、実験区と対照区とのスミアの大きさを比較することにより *V. anguillarum* に対する供試菌の抗菌活性を検定した。(抗菌活性はスミアの横幅について対照区と実験区との比として表した。)

抗ウイルス試験

伝染性造血器壊死症の原因ウイルスである IHN ウイルスは、マスノスケの胚由来細胞 CHSE-214を用いて増やした。ウイルスが細胞内で増殖すると、細胞の形態が変化し多くの場合死滅する。このような細胞の変化を細胞変性効果 (CPE) という。本実験では、抗菌活性の強い培養細菌株の上澄液について、ウイルス増殖を抑制するか否かを、CPE プロセスを追跡して検定した。

細胞を培養するための MEM 培地の作製は、ダルベック変法イーグル培地9.5gに蒸留水1 ℓ を加え、十分に溶解した後、10%炭酸水素ナトリウムを混合して pH を調節、その後滅菌して行った。さらに濾過滅菌した L-グルタミンを0.584g/ ℓ の濃度で加え、細菌汚染がないかを30 $^{\circ}$ C下で3日間観察した。その後、10%ウシ胎児血清 (FBS) と10,000units/mlペニシリン、10mg

/mlストレプトマイシンと25 μ g/mlファンギゾンを含む抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン-ファンギゾン混液, 和光) を500 μ l/ ℓ 加えた。そして、本培地で CHSE-214細胞を、24穴プレートを用いてコンフルエントまで成長させた。また同時に供試菌株を ZoBell 2216E 液体培地で3日間培養した。次に IHN ウイルス液と供試菌培養上澄液 (6000 rpm で遠心分離) とを100 μ l ずつ、CHSE-214と MEM 培地両者を分注した各プレート中に添加した。対照区として IHN ウイルスのみと供試菌培養上澄液のみの実験区も設定し、それぞれのプレートの CPE を観察した。

分離菌株の簡易性状試験

分離菌株は、Okuzumi ら¹⁴⁾ の簡易同定法に基づき、グラム染色、運動性、形態、色素産生能、チトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖発酵能の結果より、属レベルの同定を行った。

抗エドワジエラ試験

ウナギ、ヒラメ等で問題となっているエドワジエラ症の原因菌である *Edwardsiella tarda* (ヒラメ由来 FPC 498養殖研究所病害防除部所有) に対して、分離した菌株が抗菌活性を保持するか否か、抗 *Vibrio* 試験と同様の方法を用いて検定した。なお、供試菌としては、抗 *Vibrio* 試験において強い抗菌活性を保持した菌株を使用した。

結 果

バイオフィームと養殖水中の細菌数

循環濾過式イシガキダイ飼育水槽における、水中細菌、付着細菌数の日数ごとの変動を図1、2に示した。養殖水中の細菌数は、平板法、直接検鏡法とも5日間においてほぼ一定しており、各々約 1×10^5 cells/ml, 2×10^6 cells/ml であった (図1)。水槽中に浸漬したスライドガラス上において、平板法では1日目に 1×10^4 cells/cm² の細菌数が計数され、3~5日目では、ほぼ 1×10^6 cells/cm² レベルの菌数となった。直接検鏡法による総菌数は浸漬1日目では 3.5×10^5 cells/cm²、5日目では 3×10^6 cells/cm² となった (図2)。

循環濾過式ヒラメ水槽における水中細菌、付着細菌数

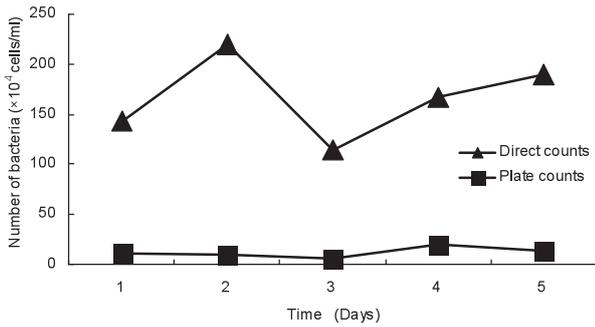


図1 直接計数法と平板法によるイシガキダイ飼育水中の細菌数の変化

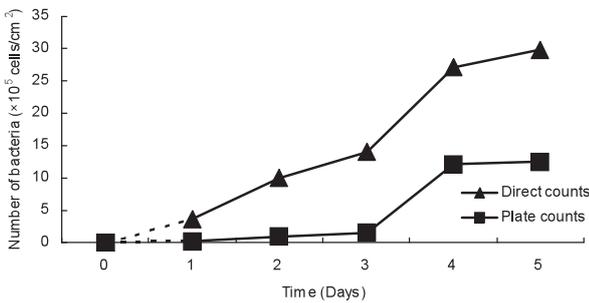


図2 直接計数法と平板法によるイシガキダイ水槽に設置したスライドガラス上の付着細菌数の変化

の経時的变化を図3, 4に示した。養殖水中の細菌数は平板法, 直接検鏡法とも5日間において約5倍幅の変動があった, その値は各々最大で約 2.5×10^6 cells/ml (生菌数), 6×10^6 cells/ml (総菌数), 最小で約 6×10^5 cells/ml (生菌数), 1×10^6 cells/ml (総菌数)であった(図3)。水槽中に浸漬したスライドガラス上において, 平板法では1日目に 1×10^6 cells/cm²の細菌数が計数され, 3~5日目では菌数の増加は滞り約 2×10^7 cells/cm²の菌数となった。直接検鏡法によるスライドガラス上の総菌数は浸漬1日目では 3×10^6 cells/cm², 5日目では 6×10^7 cells/cm²となった(図4)。

また, 循環濾過式ホシガレイ水槽における水中細菌, 付着細菌数の経時的变化を図5, 6に示した。養殖水中の細菌数は平板法, 直接検鏡法ともにヒラメ水槽中の菌数よりも少なく, また変動幅は5日間通して小さく, 各々約 1×10^3 cells/ml (生菌数), 6×10^5 cells/ml (総菌数)であった(図5)。水槽中に浸漬したスライドガラス上では, 平板法では1日目に 1×10^5 cells/cm²の細菌数が計数され, 3~5日目では菌数の増加は滞り約 8×10^6 cells/cm²の菌数となった。直接検鏡法によるスライド

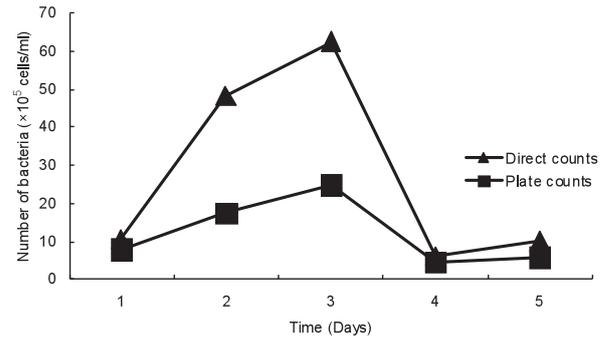


図3 直接計数法と平板法によるヒラメ飼育水中の細菌数の変化

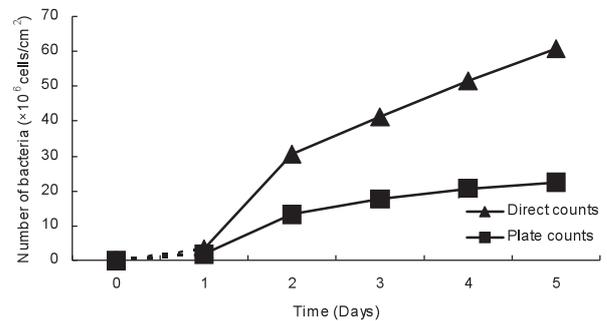


図4 直接計数法と平板法によるヒラメ水槽に設置したスライドガラス上の付着細菌数の変化

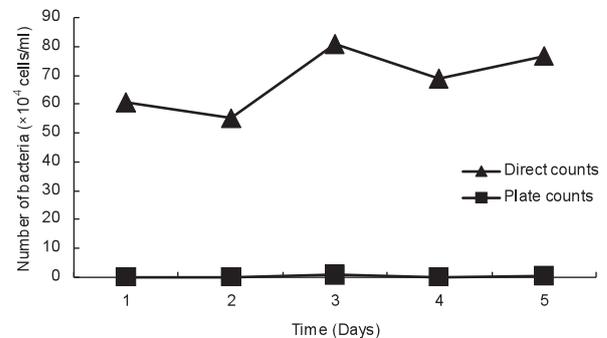


図5 直接計数法と平板法によるホシガレイ飼育水中の細菌数の変化

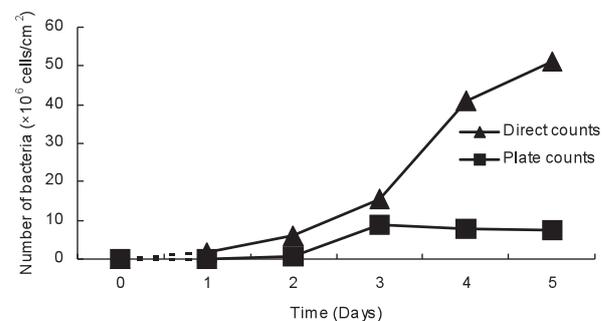


図6 直接計数法と平板法によるホシガレイ水槽に設置したスライドガラス上の付着細菌数の変化

ガラス上の総菌数は浸漬1日目では 1.5×10^6 cells/cm²、5日目では 5×10^7 cells/cm²となった(図6)。

抗 *Vibrio* 試験

イシガキダイ循環濾過式水槽から採取した細菌について、平板培地上のコロニーの色素産生・形状を根拠として、スライドガラスの付着細菌9種、養殖水から6種、生物濾過材からは7種、計22の菌株を単分離した。すべての分離株について抗菌活性試験を行った結果、22株中13株は抗菌活性30%以上の値を示し、明らかに抗 *Vibrio* 活性を保持していた(表1)。

ヒラメ循環濾過式水槽において、スライドガラス上の付着細菌9種、養殖水からの2種、生物濾過材からは5種、計16株を単分離し、すべての分離株において抗 *Vibrio* 活性試験を行った。その結果、16株中6株は30%以上の抗菌能を呈し、明らかに抗 *Vibrio* 活性を保持していた。

また、ホシガレイ循環濾過式水槽において、スライドガラスの付着細菌7種、養殖水から2種、生物濾過材からは6種、計15株を単分離し、すべての分離株において抗 *Vibrio* 活性試験を行ったが、15株中7株は強い抗 *Vibrio* 活性を示した(表2)。

抗ウイルス試験

イシガキダイ循環濾過式水槽から採取した細菌について、抗 *Vibrio* 活性を保持する菌株について抗ウイルス試験を行った結果、すべての供試菌株は細胞変性効果(CPE)を抑制・緩和した(図7)。特に細菌株 OP-8、PB-5と PB-6は強い抗ウイルス活性を示した。一方、他

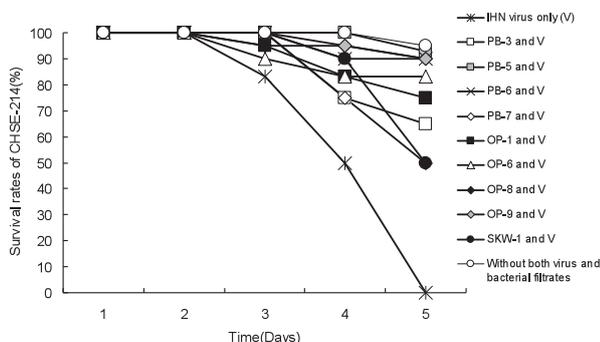


図7 イシガキダイ飼育水槽からの分離菌株上澄液による IHN ウイルス成長抑制効果

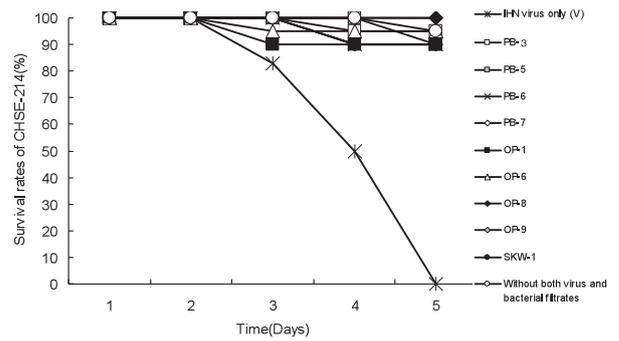


図8 イシガキダイ飼育水槽からの分離菌株上澄液による CHSE-214細胞変性効果

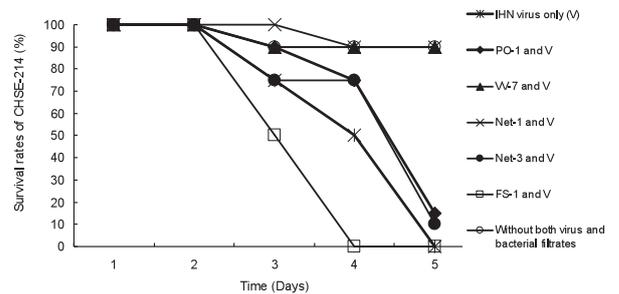


図9 ヒラメ、ホシガレイ飼育水槽からの分離菌株上澄液による IHN ウイルス成長抑制効果

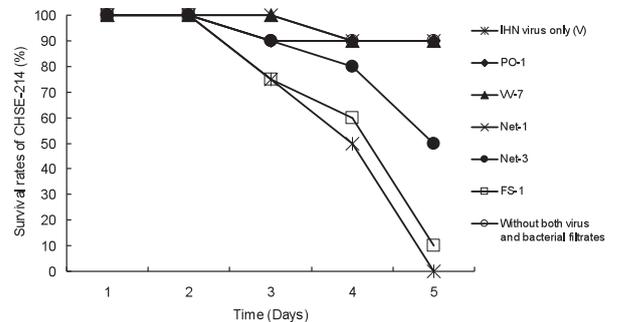


図10 ヒラメ、ホシガレイ飼育水槽からの分離菌株上澄液による CHSE-214細胞変性効果

の大半の供試菌株上澄液は、CHSE-214細胞を死滅させる作用は示さなかった(図8)。

また、ヒラメ及びホシガレイ飼育水槽から分離した細菌についても、抗 *Vibrio* 活性を保持する菌株を供試菌として抗ウイルス試験を行った。供試菌株のうち VV-7、Net-1株は細胞変性効果(CPE)を抑制した(図9)。一方、供試菌株上澄液が CHSE-214細胞の CPEを起こす例(FS-1株)もあった(図10)。

表1 イシガキダイ飼育水からの分離菌株における抗 *Vibrio* 活性と簡易分類

Bacterial strains*	Vibriostatic activities (%)*	Motility	Cytochrome oxidase test	O-F test	Tentative identification
OP-1	39	-	+	negative	not identified
OP-2	29	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
OP-3	17	+	-	negative	not identified
OP-4	29	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
OP-5	29	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
OP-6	36	+	-	negative	not identified
OP-7	29	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
OP-8	39	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
OP-9	32	-	-	negative	not identified
PB-1	55	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PB-2	50	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PB-3	67	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PB-4	52	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PB-5	53	-	+	negative	not identified
PB-6	50	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I
PB-7	33	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
SKW-1	53	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
SKW-2	22	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
SKW-3	9	+	-	negative	not identified
SKW-4	47	+	+	Fementative	<i>Vibrio</i>
SKW-5	14	+	-	negative	not identified
SKW-6	29	+	+	Fementative	<i>Vibrio</i>

* : OP : イシガキダイ水槽中のスライドガラス付着細菌,
PB : イシガキダイ水槽中の生物濾過材からの付着細菌,
SKW : イシガキダイ飼育水中からの分離細菌,
** : 抗 *Vibrio* 活性試験には病原菌 *Vibrio anguillarum* を用いた。

分離菌株の性状試験

分離菌株 (22株) の中で3株は運動性 (+), チトクロームオキシダーゼ (+), ブドウ糖無発酵の性状を示したため *Pseudomonas* III / IV に属すると考えられた。また, 他の3株は運動性 (+), チトクロームオキシダーゼ (+), ブドウ糖を好氣的に分解したため *Pseudomonas* I / II に該当すると思われた。さらに, 7株は色素産生能 (+), 運動性 (-), ブドウ糖無発酵であったため *Flavobacterium* 属と考えられ, 2株は運動性 (+), チトクロームオキシダーゼ (+), ブドウ糖を発酵的に分解したため *Vibrio* 属に該当した。残りの6株は Okuzumi *et al.*¹⁴⁾ の簡易同定法では同定することはできなかった (表1)。

ヒラメとホシガレイ水槽中から分離した, すべての分離菌株 (31株) はグラム陰性細菌であった。それらのうち11株は運動性 (+), チトクロームオキシダーゼ (+), ブドウ糖無発酵であり *Pseudomonas* III / IV に属すると考えられる。また, 8株は運動性 (+), チトクロームオキシダーゼ (+), ブドウ糖を好氣的に分解し

表2 ヒラメ, ホシガレイ飼育水からの分離菌株における抗 *Vibrio* 活性と簡易分類

Bacterial strains*	Vibriostatic activities (%)	Motility	Cytochrome oxidase test	O-F test	Tentative identification
PO-1	33	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
PO-2	0	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
PO-3	25	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
PO-4	22	+	-	negative	not identified
PO-5	0	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
PO-6	0	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PO-7	22	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
PO-8	0	-	-	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
PO-9	54	+	+	Fementative	<i>Vibrio</i>
Net-1	44	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
Net-2	36	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
Net-3	43	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
Net-4	12	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
Net-5	19	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
POW-1	30	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
POW-2	0	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
VV-1	1	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
VV-2	0	+	-	negative	not identified
VV-3	25	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
VV-4	1	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
VV-5	20	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
VV-6	36	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
VV-7	43	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
FS-1	39	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
FS-2	33	+	+	negative	<i>Pseudomonas</i> III / IV
FS-3	21	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
FS-4	33	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
FS-5	36	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
FS-6	0	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I · II
VVW-1	0	-	-	negative	<i>Flavobacterium</i>
VVW-2	48	+	+	Fementative	<i>Vibrio</i>

* : PO : ヒラメ水槽中のスライドガラス付着細菌,
Net : ヒラメ水槽中の生物濾過材付着細菌,
POW : ヒラメ飼育水中からの分離細菌,
VV : ホシガレイ水槽中のスライドガラス付着細菌,
FS : ホシガレイ水槽中濾過砂付着細菌,
VVW : ホシガレイ飼育水中からの分離細菌。

たため *Pseudomonas* I / II に該当すると思われた。8株は色素産生 (+), 運動性 (-), ブドウ糖無発酵であり *Flavobacterium* 属に, また2株は運動性 (+), チトクロームオキシダーゼ (+), ブドウ糖の発酵的分解により *Vibrio* 属に該当した。残りの2株は Okuzumi *et al.*¹⁴⁾ の簡易同定法では同定することはできなかった (表2)。

抗エドワジエラ試験

抗エドワジエラ試験で, 強い抗 *Vibrio* 活性を保持した菌株の多くが, *E. tarda* に対して抗菌活性を保持しておらず, OP-1, OP-6の2株のみが抗エドワジエラ活性

表3 抗 *Vibrio* 活性を保持する菌株における抗エドワジエラ試験

Bacterial strains	<i>Vibrio</i> -static activities (%)	<i>E. tarda</i> -static activities (%)
OP-1	39	35
OP-6	36	21
OP-8	39	0
OP-9	32	9
PB-3	67	0
PB-5	53	0
PB-6	50	0
PB-7	33	0
PO-1	33	0
Net-1	44	0
Net-3	43	0

を示した (表3)。

考 察

水産増養殖環境中における病原菌と抗病原菌の間の拮抗作用は、自然界では常に起こっている現象である。この拮抗作用を利用して病原菌を防除する方法は生物的防除またはバイオコントロールと呼ぶ。海水中のウイルスの分布について Fauré-Fremiet ら¹⁵⁾ は電子顕微鏡の観察により、その分布量が予想外に多いと報告した。彼らは、カニ (*Cancer pagurus*) に付着している繊毛虫 *Zoothamnium alternans* の細胞表面に多数の細菌が生息し、これら細菌の外内に大量のバクテリオファージが分布している様相を観察した。

Bergh ら¹⁶⁾ は、電子顕微鏡による計数をもとにして海水、淡水中のウイルス数は、 $10^4 \sim 10^8$ virus particles mL⁻¹の間で変動すると報告している。この他にも海水中のウイルスの分布についての多くの報告がある¹⁷⁻¹⁹⁾。従来海水中のウイルスの計数では、細菌株を寒天平板培地に混釈して、ウイルスによる透明なプラーク形成をもとにした方法が用いられてきており、この方法では電子顕微鏡での計数値より大幅に低い数10ウイルス粒子 mL⁻¹以下の計数値が得られる。

上記の海水におけるウイルス数の変動は、抗ウイルス細菌が関与していると考えられる。Gundersen ら⁹⁾ は、海洋細菌のウイルス不活性化能すなわち VIC (Virus Inactivating Capacity) について報告し、この細菌は *Vibrio* sp.であると示唆した。さらに Magnusson ら¹⁰⁾ は *Vibrio marinus* の抗ウイルス活性は、4℃~12℃培養下で発現するが、25℃培養においては検出できないと報告

している。これらの研究にさきだち、Magnusson ら²⁰⁾ は、海水を1時間45℃以上に熱すると、ウイルスの不活性化能は失われ、この海水の不活性化能は NaClが0.1M濃度以上ないと維持されないが、NaClが直接不活性化には関与していないと報告した。この結果は、塩分を増殖や他の機能発現に必要とする海洋微生物がウイルスの不活性化に関与していることを示唆している。その後も Fujioka ら²¹⁾ は、ウイルスを不活化する海洋微生物の存在について、Toranzo²²⁾ も海洋微生物によるポリオウイルス等の不活性化について示唆した。また Toranzo ら²³⁾ は、主にサケ科魚類に感染する伝染性腭臓壊死症ウイルスについて、海水のウイルス不活性化能は、海水中の微生物数が多い場合に増大することを明らかにした。他に、海洋細菌の抗ウイルス活性については Kamei ら¹¹⁾、Direkbusarakom ら²⁴⁾ も報告しているが、一方 Suttle and Chen²⁵⁾ は、海洋微生物によるウイルスの不活性化について、否定的な見解を示している。

本研究において水産養殖水中に多くの抗ウイルス細菌の生息していることが明らかになったので、これらの細菌が水中でのウイルス伝染を防止していることが示唆された。魚類がこれらの細菌を摂食した場合、有効細菌の抗菌性作用により消化管から病原菌を防除することが可能となる。

近年、規模が拡大する水槽養殖において、恒常的に発生するウイルス病や細菌病の蔓延を防ぐために抗生物質、ホルマリンなどの薬剤を投与しているが、ウイルスと細菌との関係において、抗生物質の使用によってウイルス分解能を保持する細菌の大半は死滅する。しかし、ウイルスには抗生物質の効力がおよばないために生存し、魚介類に感染する。また、細菌群の中にも薬剤耐性菌の出現が見られ、細菌症が治療できない事例も数多く起こっている。このことが抗生物質使用にもかかわらず魚介類疾病が頻発する理由の1つと考えられる。

イシガキダイ水槽由来の菌株において、スライドガラス付着細菌では抗菌活性を持った菌の出現率が45%であったのに対し、養殖水中分離菌では33%となった。また、スライドガラスから分離したテスト菌株のすべての細菌に抗ウイルス活性が見られ、その中で3株は魚類細胞がまったく崩壊しない、強い抗ウイルス活性を示した。このことは、スライドガラスなどに付着する細菌群

が、水中に浮遊すると思われる細菌よりも、強い抗菌能を保持することを示唆している。

強い抗 *Vibrio* 活性を示す多くの分離株が *E. tarda* に対して抗菌性を示さなかったが、この事実は、菌株によって抗菌作用の異なることを示している。すなわち、病原菌に対する抗菌能は異なったプロセスで発現している可能性があるように思われた。

第3章 LMC-9株によるマダイ・エドワジエラ症感染防除実験

緒言

エドワジエラ症は *Edwardsiella tarda* を原因菌とする細菌性疾病で、多くの魚類、特にウナギ、マダイ、ヒラメ等の重要養殖魚種に大きな被害を及ぼす。また、水辺に生息する両生類、爬虫類、鳥類からも分離され、人魚共通病原菌の疑いももたれている²⁶⁾。

1980年代のマダイ養殖において、マダイ・エドワジエラ症は、散発的な発生が報告される程度であったが²⁷⁾、1990年後半ごろから、徐々に流行しはじめた。しかし、その頃のマダイ養殖では、まだ中心的な疾病ではなく、マダイイリドウイルス病、ビバギナ症、滑走細菌症、エピテリオシスチス病が4大疾病となっていた。ところが、現在においては、エドワジエラ症はマダイの被害が最も大きい疾病のひとつになっている。発生期間も以前は水温20℃以上で流行していたのに対して、現在は周年発生しており、稚魚から2kg以上の出荷サイズまで罹病している。症状としては、体表のスレ、脱鱗、出血がみられ、進行すると、潰瘍を呈する。解剖所見では、肝臓や腎臓の腫大が特徴的で、症状が進行すると肝臓、腎臓、脾臓等に結節様の白い小さな斑点が観察される。また、ヒラメ、ウナギで発生する *E. tarda* とはタイプが異なり、運動性がなく、非定型形 *E. tarda* といわれている。

近年、このような多発要因としては、地球温暖化に伴う水温上昇を疑う声もあり²⁸⁾、事実20℃以上の本症の好適水温は確実に長期化している。2008年のマダイ養殖では高水温期に高い頻度で発生するイリドウイルスによる大規模な被害は少なかったものの、夏以降期にエドワジエラ症が当歳から出荷サイズまで幅広く発病し、大きな

問題となっている。養殖現場での治療としては、塩酸オキシテトラサイクリン、オキソリン酸、アンピシリン等の抗菌剤に頼っている現状であるが、薬剤耐性菌の出現等の新たな問題も出てきている。

そこで本研究では、拮抗細菌投与によるマダイ・エドワジエラ症の感染防除を目的として、バイオコントロール法の検討を行った。また、拮抗細菌を投与することで、マダイの非特異的生体防御である白血球、特に好中球の働きが増強されるか否かも検定した。

材料及び方法

抗エドワジエラ試験

伊藤ら²⁹⁾の研究によって分離された拮抗細菌 LMC-9株を用いて、マダイより得られたエドワジエラ症の原因菌である *Edwardsiella tarda* への抗菌試験を行った。抗菌試験の方法は前章と同様である。また Okuzumi *et al.*¹⁴⁾の簡易同定法に基づき、グラム染色性、運動性、形態、色素産生能、チトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖発酵性の結果より LMC-9株の属レベルの同定を行った。

マダイにおけるエドワジエラ症 LD₅₀ (50%死亡率)の検定

供試魚として使用したマダイ (*Pagrus major*) は、水温20℃に調整した50リットル水槽で一週間以上飼育し、毎日適当量の餌を与え、実験当日と前日は無給餌とした。なお、供試魚は、平均体重10gのものを使用した。

Edwardsiella tarda の培養は塩分濃度を0.8%に調整した改変 ZoBell2216E 培地を使用し、前培養25℃、24時間、本培養25℃、72時間とした。培養した *E. tarda* は順次希釈して、生菌数を計数した。

そして、10⁵、10⁶、10⁷ CFU/0.1ml に調整した *E. tarda* を0.1ml/尾ずつマダイ腹腔内注射を行い、LD₅₀を検定した。

LMC-9株によるマダイ・エドワジエラ症感染防除実験

LMC-9株は ZoBell2216E 培地で培養し、配合飼料に5% (w/v) になるように添加した。細菌添加区のマダイ (10g/尾) は4週間添加区と2週間添加区を設定して、また、細菌無添加の飼育魚を対照区とした。餌料投

与量は、マダイ体重の5%とし、毎日給餌した。その後、LD₅₀の結果から濃度調整した *E. tarda* をマダイへ腹腔内注射を行い、生残尾数を計数した。

マダイ生体防御能の測定

HBSS (-) ハンクス氏液の調整

NaCl 8.0 g, KCl 0.4 g, Na₂HPO₄12H₂O 0.12 g, KH₂PO₄ 0.06 g, Dglucose 1.0 g, NaHCO₃ 0.35 g を 1 L の蒸留水に溶解した。あるいは溶液の pH は HCl, NaOH を用いて 7.3~7.6 に調整した後、0.22 μm のミリポアフィルターで濾過滅菌し、使用時まで 4℃ で保存した。

大腸菌死菌の調整

Escherichia coli は改変 ZoBell2216E (NaCl 濃度を 0.8% に調整) で 24h 培養後、集菌し、1% ホルマリン生理食塩水に 100mg/ml の濃度で懸濁して、不活化した。

正常血清の分離

マダイ尾静血より採血した血液を、室温で 1 時間放置して血液を凝固させた後、水中に 1 時間放置して血餅を凝固させた。そして、1600×g, 5 分間遠心後、上清を回収し、使用時まで -80℃ で保存した。

ザイモサンの調整

上記 HBSS (-) で 3 回洗浄したザイモサンを HBSS (-1) 1 ml に対して 5 mg となるように濃度調整し、20 分間超音波に処理し、その後、顕微鏡により均一に分散していることを確認後、使用時まで -80℃ で保存した。

マダイ好中球の分離

配合飼料に拮抗細菌を添加してマダイに投与した細菌区と、細菌を投与していない対照区とにおいて、それぞれ、マダイより好中球 (好酸球) を Endo^ら³⁰⁾ の方法に従い、鰾より採取した。すなわち、好中球の採取前に、大腸菌死菌を 0.2ml 鰾内に注射し、24 時間後、魚体を取り上げ、腹部を切開し内臓を取り除き、鰾を露出させた。次に、鰾の一部を切開し HBSS (-) を注入した後、魚体をしばらく揺り動かし鰾の内壁から遊離した好

中球を含む HBSS (-) を注射筒にて回収した。回収した好中球は 2 回遠沈洗浄 (4℃, 200×g, 5 分間) したのち、0.5% トリパンプルー HBSS (-) 溶液と細胞浮遊液を等量混合し、トーマ血球計算板にこの細胞混合液をのせ、検鏡して細胞数を測定した。また、その後貪食能試験のために、1×10⁶ 細胞/ml に調整した。

マダイ好中球の貪食能試験

マダイ好中球 1×10⁶ cells/ml とザイモサン 0.5mg/ml を同量混合し、30 分反応させた後、好中球、約 100 個当たりのザイモサンの貪食数 (貪食率)^{*1} と貪食されたザイモサン粒子の数 (貪食指数)^{*2} を測定した。また、好中球数×貪食率から貪食細胞数を算出した。なお、好中球表面の付着ザイモサンについても貪食したものとした。

結 果

LMC-9 株の抗エドワジエラ能及び簡易同定

LMC-9 株は *E. tarda* に対して強い拮抗活性を示した。簡易同定ではグラム陰性、運動性 (+)、チトクローム・オキシダーゼ試験 (+) OF 試験 (O) で、*Pseudomonas* I/II 群に属した (表 1)。

表 1 LMC-9 株における抗エドワジエラ試験と簡易性状試験

Bacterial strains	<i>E. tarda</i> static activity (%)	Motility	Cytochrome oxidase test	O-F test	Tentative identification
LMC-9	44	+	+	Oxidative	<i>Pseudomonas</i> I・II

マダイにおけるエドワジエラ症 LD₅₀ (50% 死亡率) の検定

E. tarda の培養後の生菌数は約 1×10⁹ CFU/ml となったので、順次希釈した後、マダイへの感染実験を行い、各々の希釈段階における生存マダイ数と死亡マダイ数から LD₅₀ を算出した (図 1)。その結果、LD₅₀ は約 7×10⁶ CFU/0.1ml となり、この値を元にして、感染実験における腹腔内注射の濃度を 1×10⁷ CFU/0.1ml とした。

LMC-9 株によるマダイ・エドワジエラ症感染防除実験

LMC-9 株を配合飼料に混合し、2 週間投与した細菌区では、15 尾中 6 尾が死亡したのに対して、細菌無添加

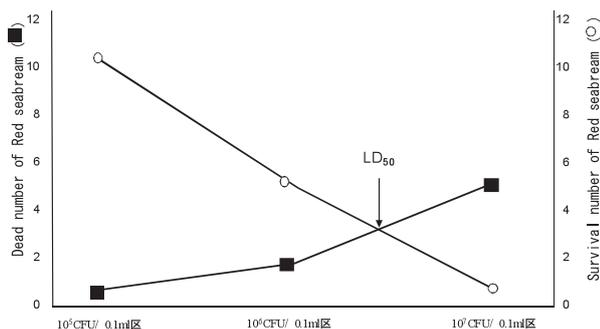


図1 マダイにおける *E. tarda* 感染による LD₅₀ の検定

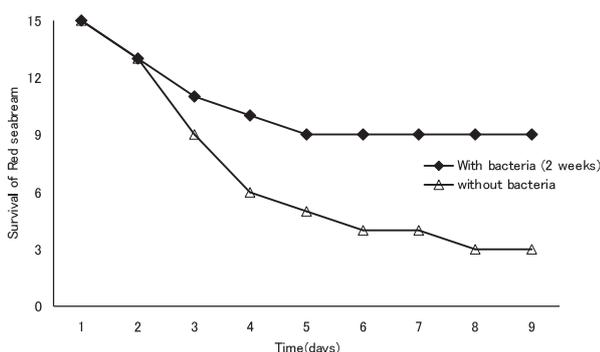


図2 LMC-9株投与（2週間）、無投与条件下におけるマダイの *E. tada* 感染試験

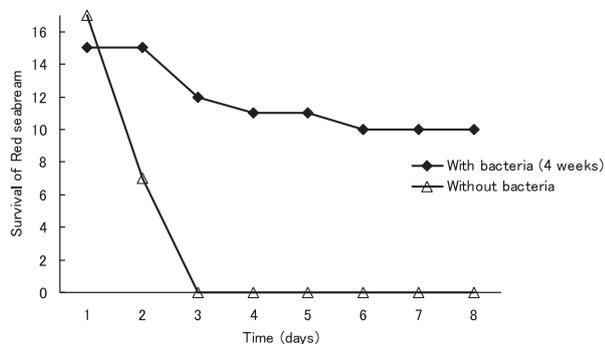


図3 LMC-9株投与（4週間）、無投与条件下におけるマダイの *E. tada* 感染試験

の対照区では12尾死亡する結果となった（図2）。また、細菌を4週間投与した区では15尾中5尾が死亡したのに対して、対照区では全尾死亡する結果となった（図3）。なお LD₅₀ よりも死亡マダイ数が多くなったが、これは、使用した *E. tarda* の感染力が変動したためと考えられた。

マダイ生体防御能の測定

拮抗細菌を投与した細菌区と無投与の対照区における

好中球数は、細菌区では 1.45×10^7 cells/ml、対照区では 2.5×10^6 cells/ml (n = 6) となり、有意な差がみられた。

食食率 (%)^{*1} は細菌区、対照区、各々31%、30%となった。また、食食指数^{*2} では、各々2.275、2.25となり、有意な差はみられなかった。

好中球数×食食率である食食細胞数は、細菌投与区が 4.5×10^6 cells/ml、対照区では 7.5×10^5 cell/ml となり、6倍の差がみられた（表2）。

*1：食食率 (%) = (ザイモサンを食した食食細胞数 / 観察した食食細胞) × 100

*2：食食指数 = 食食されたザイモサン数 / 食食陽性細胞数

表2 細菌区と対照区におけるマダイ好中球の食食能

	食食率 (%) [*]	食食指数 ^{**}	食食細胞数
細菌区	31	2.275	4.5×10^6 cells/ml
対照区	30	2.25	7.5×10^5 cells/ml

*：食食率 (%) = (ザイモサンを食した食食細胞数 / 観察した食食細胞) × 100

**：食食指数 = 食食されたザイモサン数 / 食食陽性細胞数。

考 察

近年、マダイ養殖現場において、外観症状を呈さないエドワジエラ症羅病魚がみられるようになった。解剖すると、腎臓が腫大して膿瘍を形成しており、エドワジエラ症原因菌である *E. tarda* も検出される。魚は原因菌に暴露し、感染が成立した後、体内で増殖し発症する。通常、*E. tarda* はそれほど強い病原性がないため、死に至るまでかなりの時間を要する。そのため、羅病魚は外観症状、内臓の変性がみられるのだが、近年、外観症状を伴わずに斃死する個体が見られることから、*E. tarda* の毒性が強くなった、又はマダイの抵抗力が弱くなったとの報告例もある²⁸⁾。

魚類の健康を維持する生体防御機構は、非特異的生体防御と特異的生体防御に分けることができる。前者は不特定多数の侵入異物に対抗する役割を担っており、後者は再侵入する同一異物を効率的かつ迅速に撃退する機能を果たしている。魚類が免疫学的に健康であるためには、両者の生体防御が異物侵入後に一定の順序で段階的に発現することが重要である。ワクチンは特異的生体防

御を活用した病気予防であり、特定の疾病を対象にしたものであるのに対して、免疫賦活剤は非特異的生体防御の効果を高め、様々な疾病に対処しようとするものである。

この免疫賦活剤として、微生物由来のものが報告されている³¹⁾。例えば、細菌の場合、連鎖球菌などのグラム陽性菌の細胞壁には、外側からタイコ酸（グリセリンやリビトールがホスホジエステル結合で連結し、これに糖などが付着）、リポタイコ酸（末端に脂溶性の脂肪酸をもち細胞膜と結合）、ペプチドグリカン（細胞壁の主成分）が存在する。一方、グラム陰性菌の細胞壁にはリポ多糖（LPS）、ペプチドグルカン（陽性菌よりも薄い）が観察される。これらの微生物の細胞壁成分には、魚の生体防御力を増強する成分が認められ、免疫賦活剤として認知されている。細胞壁外層に存在するリポ多糖には、白血球の増加作用や、好中球による貪食作用の亢進が認められ、又、ペプチドグルカンにはマクロファージや好中球の活性化による食作用と殺菌活性の増強、NK細胞機能促進による細胞障害活性の増強やリゾチーム活性の上昇のような様々な感染防御機構を高める作用がある。

免疫賦活剤としては、このような物質を含んだ細胞破砕物が投与されることが多いが、生菌を、免疫賦活剤として直接投与するアプローチは少ない。Irianto and Austin³²⁾によると、グラム陰性およびグラム陽性細菌を投与した魚では、液性免疫応答よりも細胞性免疫応答を刺激し、特に血球数（白血球、マクロファージ、リンパ球）が増加し、リゾチーム活性の増強が確認されたと報告している。本研究で使用したLMC-9株はグラム陰性細菌であり、細胞壁にはリポ多糖（LPS）、ペプチドグルカンが分布するが、本研究において拮抗細菌を投与することで、マダイ好中球数の増加がみられた。なお、LMC-9株には、免疫賦活剤としてだけでなく、*E. tarda* に対する直接的な拮抗作用も保持しているので、本実験で明らかになった *E. tarda* 感染防除効果は、両方の作用が相乗効果として発現したものと考えられる。

第4章 拮抗細菌利用によるヒラメ飼育および銅イオンの影響

緒言

近年、養殖魚介類の疾病防除にはさまざまな方法が用いられている。その中でも、病原菌に未感染の親魚の選定、薬浴による親魚や卵の殺菌、飼育水の殺菌、飼育水の連続的な交換、薬剤投与などの方法が一般的に採用されている。この中で、飼育水の殺菌では、微細フィルターによる濾過とともに、紫外線やオゾンによる処理、さらに塩素剤、抗生物質などの薬剤が使用されているが、これらの手法による、養殖水中の細菌数の減少は一時的な現象にすぎない。例えば抗生物質を飼育水に添加した場合には、薬剤の量と種類によって異なるものの、細菌数が減少・低濃度に維持された後に、耐性菌や非感受性の菌等の増加により細菌数は数十時間で、もとの濃度までに回復する⁶⁾。また、濾過及びオゾンや紫外線殺菌処理においても、処理後の水槽水には餌飼料の添加などによって新たな微生物が加入するとともに、水槽壁などの付着微生物が供給されるため、結局は処理前とほぼ同数の微生物が養殖水中に生息することになる。このように、これらの処理で飼育環境から微生物を取り除くことはむずかしく、逆に殺菌処理の後では、微生物群集間の拮抗作用が減少するため、特定の細菌等が急速に増加することも考えられる。実際に大半の養殖場がこのような殺菌処理を行っているにもかかわらず、養殖魚の疾病発生は止まらず、かえって被害の規模が拡大していることから、このような処理の効果の低いことが推察できる。そして、国内外の養殖現場では、代替えとなる疾病防除方法のない状況において、しばしば人間への害となり、魚体も衰弱する核酸染色剤（マラカイトグリーン等）、ホルマリン、銅イオンなどが使用されており、これらの薬剤などの使用は、消費者の養殖魚への不信感増大の一因となっている。

そこで本研究では、薬剤を使用しない増養殖方法の検討の一環として、病原菌に対して、抗菌活性を保持する拮抗細菌を探索した。その後、ヒラメ飼育への実用化試験として、ヒラメの種苗生産を行っている養殖水中へ拮抗細菌を投与することで、ヒラメ種苗の生残が向上するか否か検定した。このヒラメ種苗生産場では、稚魚期に

おける細菌性腸管白濁症（原因細菌 *Vibrio ichthyoenteri*）が問題となっており、この疾病に対しては発症した場合は薬浴や薬剤の経口投与を行ってもほとんど効果が認められない。そこで、拮抗細菌投与による疾病の防除を目的として、種苗の生残および飼育水中の投与細菌の消長を調べた。

さらに、銅イオン使用によりヒラメが衰弱傾向にある養殖場において、銅イオン殺菌による細菌群の変動、および銅耐性菌の出現に関する研究を行った。

材料及び方法

細菌分離

大型海藻クロメ (*Ecklonia kurome*) の遊走子培養液中から採取した試水を滅菌海水で 10^{-1} ~ 10^{-5} の段階に希釈し、各希釈水を ZoBell 2216E 培地³³⁾に接種した。これら平板培地は20℃で7日間培養し、得られたコロニーを単分離した。その後、Okuzumi ら¹⁴⁾の簡易同定法に基づき、グラム染色、運動性、形態、色素産生能、チトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖発酵能の項目を調べ、その結果より属にいたるまでの同定を行った。

抗 *Vibrio anguillarum* 及び抗 *Edwardsiella tarda* 試験

Maeda and Nogami⁷⁾の方法に基づいて単分離した細菌の抗菌活性を検定した。すなわち ZoBell 2216E 平板寒天上で、分離菌を平行になるように2本塗抹（スミアの長さ4 cm, スミア間隔3 cm）した後、ピブリオ病の原因菌である *Vibrio anguillarum* (American Type Culture Collection 19264) を、供試細菌の間に、長さ2 cmのスミアになるように塗抹した。同時に対照区として、*V. anguillarum* のみを塗抹した平板培地を設定した。このようにして病原菌と拮抗細菌を移植したこれらの培地は、10日間培養した後、実験区及び対照区における *V. anguillarum* の増殖を比較した。また、同様の方法を用いて、ウナギ、ヒラメ等のエドワジエラ症原因菌である *Edwardsiella tarda* (ヒラメ由来 FPC498 養殖研究所病害防除部所有) に対する抗菌活性を検定した。なお、各々抗菌活性検定は3回行い、平均値で表した。供試菌の病原菌増殖抑制能は、対照区 (W) と試験区 (w) とにおける塗抹した病原菌の横幅について、(1

-w/W) ×100としてあらわした。

EKZ-2株のヒラメ稚魚への投与実験

上記の抗菌性試験において、高い抗菌能を示した EKZ-2 株を以下の実験に用いた。

3日間、22℃で培養した EKZ-2株 (約 10^9 CFU/ml) を配合飼料 (株ヒガシマル製) に $50 \mu\text{l} / \text{g}$ の割合で混合して、細菌混合飼料を作製した。この細菌混合飼料を約5 g/尾のヒラメに毎日投与する実験区と、配合飼料のみの投与の対照区とを設定し、斃死数、成長率等を比較することにより、投与細菌の有効性を検定した。なお、給餌量は体重の約5%とした。また、実験区と対照区のデータにおいて有意差があるか否かは、t検定を用いて表した。

ヒラメ種苗生産における EKZ-2株投与実験

ヒラメ稚魚 (約50万尾) の種苗生産 (緩やかな爆気攪拌装置のある200トン水槽使用) において、3日間22℃で培養した EKZ-2株 (約 10^9 CFU/ml) を最終濃度約 10^6 CFU/ml になるように養殖水中に毎日投与した (実験区)。そして、菌株を投与しない対照区も設定して、両者におけるヒラメ種苗の斃死数を比較した。また、養殖水を、3日毎の朝8:00、EKZ-2株投与前に採取し、上記の ZoBell 2216E 培地を用いて、生菌数及び EKZ-2株の出現数を調べた。EKZ-2コロニー数の計測では、EKZ-2株が特徴あるコロニーを呈するので、そのコロニーについて García-Martínez ら³⁴⁾で設計された、mac1300F と 23S1R のプライマーを用いて、PCR による遺伝子増幅を行い、EKZ-2株と同一の341bp付近にバンドが確認できることを確認した。このようにして、特徴あるコロニーが EKZ-2株であると確認したため、その後は、コロニーによる簡易的な判別を行った。

ヒラメ養殖水の銅イオン殺菌による細菌群の変動

銅イオン殺菌を行っているヒラメ養殖水を 10^{-1} ~ 10^{-6} の段階に順次希釈した。その希釈水を $100 \mu\text{l}$ ずつ平板寒天培地 (ZoBell 2216E) に接種し、この平板培地を20℃で1週間培養した後、コロニー数を計数した。また同時に、ヒラメの腸内細菌も分離した。

分離菌株は Okuzumi ら¹⁴⁾の簡易同定法に基づき、グ

ラム染色性, 運動性, 形態, 色素産生能, チトクロームオキシダーゼ反応, ブドウ糖発酵性の性状をしらべ, その結果より属レベルの同定を行った。

銅イオン耐性試験

Casida³⁵⁾ が使用した培地を参考にし, ペプトン 1 g / ℓ, 酵母 0.2 g / ℓ, 寒天 15 g / ℓ, 塩化銅各々 0.01ppm, 0.1ppm, 1 ppm を海水に加え, pH 7.2 に調節後, オートクレーブ滅菌し, 銅寒天培地として本実験に使用した。そして, 単分離した細菌を本培地に塗抹し, 1 週間 20℃ 下で培養後, 分離細菌が増殖するか否かを判定した。また, EKZ-2 株の銅イオン耐性試験も同様にして行った。

結 果

細菌分離

大型海藻クロメ (*Ecklonia kurome*) 遊走子培養液中から分離したいずれの菌株もコロニー形状が同一であった。分離株はグラム陰性細菌であり, 運動性 (+), チトクロームオキシダーゼ (+), ブドウ糖無発酵であり *Pseudomonas* III/IV に属すと考えられた。コロニー形状が同一であった菌株は簡易同定法でも同様の結果となり, 同一菌株であると判断し, 菌株名を EKZ-2 とした (表 1)。

表 1 EKZ-2 株の簡易分類と抗 *Vibrio* 及び抗 *Edwardsiella* 試験

Bacterial strain	<i>Vibrio</i> -static activity	<i>Edwardsiella</i> -static activity	Gram-stain	Motility	Cytochrome oxidase test	O-F test	Tentative identification
EKZ-2	+	+	-	+	+	-	Genus <i>Pseudomonas</i>

抗 *Vibrio* 試験及び抗 *Edwardsiella tarda* 試験

EKZ-2 株は抗 *Vibrio* 試験において強い抗菌活性を示し, 抗 *E. tarda* 試験においても同作用が見られた (表 1)。

分離細菌のヒラメ稚魚に対する投与実験

実験区 (EKZ-2 株投与), 対照区 (EKZ-2 株無投与) ともに, ヒラメの斃死個体は見られなかった。そして, 両実験区において, ヒラメ魚体長の増加には有意な差はなかったが, 増体重では, EKZ-2 株を投与した実験区に

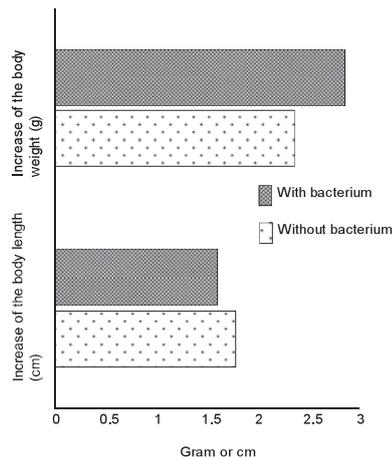


図 1 EKZ-2 株投与区と無投与区におけるヒラメの成長比較

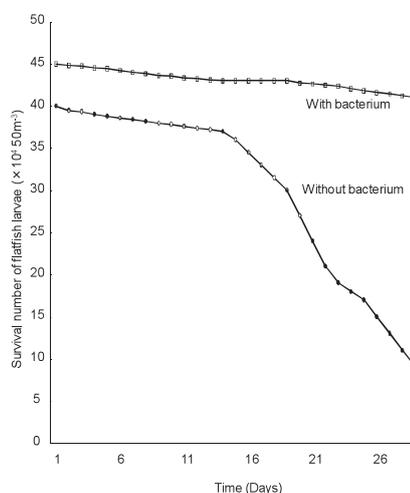


図 2 ヒラメ種苗における生残数

においてより高い値となった ($t < 0.05$) (図 1)。

ヒラメ種苗生産における EKZ-2 株投与実験

孵化後 0 日目から 30 日目まで, EKZ-2 株を投与した実験区ではヒラメ約 45 万尾中 41 万尾が生残したのに対して, 細菌無投与区では約 40 万尾の中で 31 万尾が斃死する結果となった ($t < 0.01$) (図 2)。またヒラメ飼育水中の細菌相を調べた結果, EKZ-2 株を投与した実験区では恒常的に EKZ-2 株が分離された (図 3)。

ヒラメ養殖水の銅イオン殺菌による細菌群の変動

銅イオンを添加しているヒラメ養殖水中の細菌数は, 通常 (殺菌を行っていない) ヒラメ養殖水を比べて有意に少なく, 1×10^3 CFU / ml となった (図 4)。またコロニーの形状によって養殖水から 9 株, ヒラメ腸内か

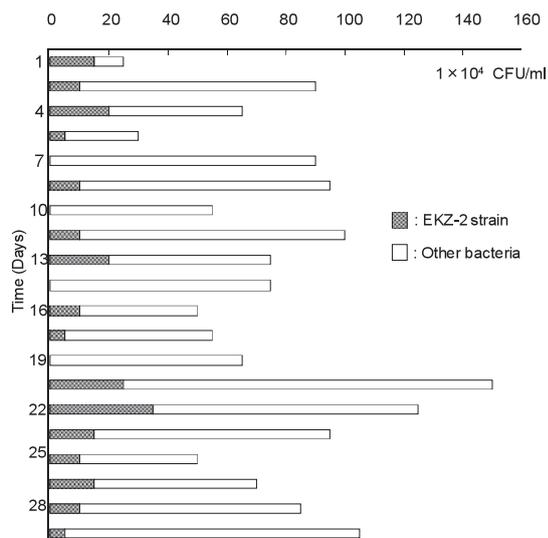


図3 EYZ-2株投与区におけるヒラメ飼育水の細菌数

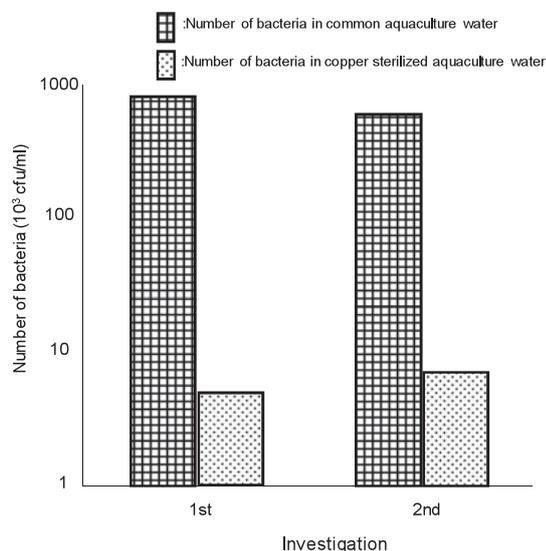


図4 銅イオン殺菌によるヒラメ養殖水の細菌数の変化

ら5株、計14株の細菌を分離した。分離菌株の簡易性状試験では14株中7株が色素産生細菌 (*Flavobacterium* 属)であった(表2)。

銅イオン耐性試験

銅イオン殺菌を行っている養殖水より分離した14株のうち、11株が0.1ppmの銅イオン濃度でも増殖した(表2)。しかし、EYZ-2株は0.01ppmの銅イオン濃度で増殖できなかった(表3)。

考 察

水産養殖環境中における病原菌と抗病原細菌との間の

表2 銅イオン殺菌を使用しているヒラメ養殖水とヒラメ腸内における分離細菌の簡易同定と銅イオン濃度別増殖試験

Bacterial strains	Source of isolation	Tentative identification	Cu Cl ₂ concentrations (ppm)		
			0	0.01	0.1
POCW-1	water	<i>Flavobacterium</i>	+	-	-
POCW-2	water	<i>Flavobacterium</i>	+	-	-
POCW-3	water	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+
POCW-4	water	<i>Vibrio</i>	+	+	+
POCW-5	water	<i>Flavobacterium</i>	+	-	-
POCW-6	water	<i>Flavobacterium</i>	+	+	+
POCW-7	water	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+
POCW-8	water	<i>Vibrio</i>	+	+	+
POCW-9	water	<i>Vibrio</i>	+	+	+
POCD-1	intestinal	<i>Flavobacterium</i>	+	+	+
POCD-2	intestinal	<i>Pseudomonas</i>	+	+	+
POCD-3	intestinal	<i>Vibrio</i>	+	+	+
POCD-4	intestinal	<i>Flavobacterium</i>	+	+	+
POCD-5	intestinal	<i>Flavobacterium</i>	+	+	+

表3 EYZ-2株における銅イオン濃度別増殖試験

Bacterial strains	Source of isolation	Cu Cl ₂ concentrations (ppm)		
		0	0.01	0.1
EYZ-2	<i>Ecklonia kurome</i> zoospores	+	-	-

拮抗作用は、自然界では恒常的にみられる事象であり、この拮抗作用を利用した病原菌防除方法は生物学的防除またはバイオコントロールと呼ばれる。水産養殖分野の生物防除研究においては、魚の成長促進効果と同時に病原菌の増殖を抑制する有用な機能を保持した微生物が報告されて以来⁷⁾、現在までに同じような微生物の探索と水産養殖への実用化例が100編以上の論文で報告されている⁸⁾。このような研究の進展の背景には、過剰な薬剤使用に対する消費者の危惧感とともに、薬剤の効力が低減し、疾病防除が難しくなっている現状がある。

これまでに、報告された拮抗微生物の多くは *Vibrio* 属の病原菌をターゲットとしており、*E. tarda* に対する拮抗作用を保持する菌株は報告されていない。本実験で使用した EYZ-2株の病原菌抑制能では、*Edwardsiella tarda* に対するよりも、*Vibrio anguillarum* に対して強く、このことは、病原菌種の相違によって、EYZ-2株の拮抗活性の発現の異なることを示している。Dopazoら³⁶⁾の研究でも、魚病細菌の生物防除を目的として、分離細菌の病原菌に対する増殖阻害作用を調べているが、*E. tarda* と *Pseudomonas aeruginosa* 2株への抑制

効果はみられなかったと報告している。

ヒラメ種苗生産の細菌（EKZ-2株）投与区と細菌無投与区において、種苗生残数に有意な差が見られたことにより、EKZ-2株の種苗生産向上の効果が示唆された。また、野口・前田³⁷⁾によると、ウナギ養殖場の拮抗細菌投与区でも同様の効果が得られている。本実験における細菌無投与区における斃死原因は定かではないが、ヒラメ種苗生産でしばしば問題となる孵化後20日前後から発症しやすいピブリオ属細菌性疾患（細菌性腸管白濁症）の症状を呈する種苗がみられた。また、養殖水中細菌相において、細菌投与区ではEKZ-2株が高い頻度で分離された。このため効果の一因として、EKZ-2株の有効な作用が考えられ、この作用としては、病原菌の抑制、ヒラメの代謝増進⁸⁾や環境向上⁶⁾等があげられる。

ヒラメ養殖場においては、銅イオン滅菌を行っている水槽では、斃死するヒラメ個体が継続してみられた。本研究で、このヒラメ養殖場から分離された菌株の多くが、通常の養殖水では優占種とはならない *Flavobacterium* 属の種であり、銅イオンに対して耐性を持っていた。このように、養殖環境における殺菌方法の施行では、この殺菌法に対して耐性を獲得すると、これらの耐性細菌群が多く増殖する。この増殖した細菌が病原菌である場合、疾病が発症する可能性が高くなる。また、EKZ-2株は養殖現場で使用されている銅イオン濃度では増殖することができなかった。このように、本研究は薬剤や銅イオンなどの殺菌過程で、拮抗細菌が減少し、病原菌が蔓延する可能性のあることを示唆している。

第5章 拮抗細菌利用によるウナギ養殖

緒言

近年、ウナギ養殖では温室での加温飼育、いわゆるハウス養鰻が盛んになり、常に高水温で飼育されるようになったため、パラコロ病が成長段階や季節を問わず発生している³⁸⁾。Wakabayashi and Egusa³⁹⁾によって報告された、この通称パラコロ病は、養鰻場で甚大な被害を与え、大きな問題となっている。原因菌である *Edwardsiella tarda* は、グラム陰性、運動性 (+)、短桿形状 (0.5~1 × 1~3 μm) で、周毛を持つ通性嫌気

性細菌である。普通寒天培地に発育し、コロニーは比較的小さく、25℃24時間培養で直径1 mm程度の灰白色で光沢のある正円形コロニーを形成する。SS寒天（組成1 L中：肉エキス5.0 g、ペプトン5.0 g、乳糖10.0 g、デオキシコール酸ナトリウム8.5 g、クエン酸ナトリウム8.5 g、チオ硫酸ナトリウム8.5 g、クエン酸鉄1.0 g、ブリリアントグリーン0.00033 g、中性紅0.025 g、寒天13.5 g、pH7.0に調整）、DHL寒天（組成1 L中：肉エキス3.0 g、ペプトン20.0 g、乳糖10.0 g、白糖10.0 g、デオキシコール酸ナトリウム1.0 g、チオ硫酸ナトリウム2.3 g、クエン酸ナトリウム1.0 g、クエン酸鉄アンモニウム1.0 g、ニュートラルレッド0.03 g、寒天13.5 g、pH7.0に調整）およびXLD寒天培地（組成1 L中：酵母エキス3.0 g、塩化ナトリウム5.0 g、キシロース3.75 g、乳糖7.5 g、シヨ糖7.5 g、リシン5.0 g、デオキシコール酸ナトリウム1.0 g、チオ硫酸ナトリウム6.8 g、クエン酸鉄（Ⅲ）アンモニウム0.8 g、フェノールレッド0.08 g、寒天14.5 g、pH7.0に調整）などの選択鑑別培地では、中心部が黒色で周辺部が透明な比較的小さなコロニーを形成する。発育可能温度は15~42℃、至適温度約31℃、発育可能塩分濃度0~4%である。このパラコロ病の症状としては、鰭や腹部に発赤が生じ、鰭赤病に似た症状を示す。しかし、鰭赤病よりも症状が酷く、悪臭が強い。さらに、肛門の拡大突出、その周囲の発赤腫脹が多く、病魚にみられる。これは腎臓の後部に腫瘍病巣が形成され、腎臓が腫大し、さらには開口して膿が流れ出たことに起因するもので、肛門付近以外の腸には顕著な病変は認められない。宮崎・江草⁴⁰⁻⁴²⁾によれば、本病は本質的には腎臓あるいは肝臓の繊維索性化膿炎であり、ある段階から転移病巣が心臓、脾臓にも形成され、ついには敗血症になって死ぬ。

細菌性疾患はウイルス病とは異なり予防や治療が可能なため、様々な化学療法剤が養鰻池に大量に長期間投与されてきた。現在、ウナギのパラコロ病の治療用の水産用医薬品としては、オキシリン酸、フロルフィニコール、塩酸オキシテトラサイクリン、ミロキサシン、スルファモノメトキシシン・オルメトロプリム配合剤等が市販されている（平成21年現在）。その結果、魚病細菌の薬剤耐性化が進み、魚類養殖では新たな問題となっている。特に *E. tarda* は疾病ウナギから分離された菌株に

において薬剤耐性化の進行が明らかにされている⁴³⁻⁴⁶⁾、このため、現場養鰻池では、薬剤を使用しても斃死が止まらない状況にある。

本研究では、パラコロ病の防除を目的として、薬剤を使用しない方法、拮抗細菌投与によるバイオコントロール法の開発を行った。なお、使用した菌株は第4章で *E. tarda* に対して抗菌活性を保持していることが判明している EKZ-2株を使用した。

材料及び方法

拮抗細菌の簡易性状及び抗菌活性

投与実験に使用した拮抗細菌 EKZ-2株の性状等は、第4章に記載した。

E. tarda 感染防除実験

本実験では50L水槽を用いて、拮抗細菌 (EKZ-2) 投与実験区と無投与区とを設定した。各区ともウナギ (約30g/尾) 15尾ずつを供試し、有用細菌投与区ではEKZ-2株培養液を50ml/kgの割合で配合飼料に混合し、ウナギに体重の3%相当の餌量として給与した。無投与区では細菌無添加の配合飼料を給与した。各区ともにウナギを2週間30℃で給餌飼育し、その後、病原菌 *E. tarda* を 10^4 、 10^5 、 10^6 CFU/mlの濃度に希釈した後、ウナギ腹腔内に0.5mlの量で注射、実験区と対照区においてウナギ斃死数を比較した。

養鰻池におけるEKZ-2株投与実験

実験に使用した養鰻池ではハウス加温式養殖を行っており、水温は約30℃、1池 (約150m²) 当たり約2万尾のウナギを飼育している。3日間培養したEKZ-2株 (菌数約 10^9 CFU/ml) を50ml/kgの濃度で混合した配合飼料を約2ヶ月間ウナギへ投与し、生残尾数を対照生産区 (菌無投与) の尾数と比較した。

結 果

E. tarda 感染防除実験

E. tarda 感染試験の結果を表1に示した。*E. tarda* の濃度を 10^4 CFU/mlに調整しウナギに攻撃した場合、EKZ-2投与区では全尾が生存し、細菌無投与区では15日間で11尾が斃死した (図1)。さらに、細菌投与区にお

表1 *E. tarda* 感染試験におけるウナギ生残数

Concentration of <i>E. tarda</i> (CFU/ml)	With the Strain EKZ-2	Without the Strain EKZ-2
	Survival number of eel	
10^6	0	0
10^5	6	4
10^4	15	4

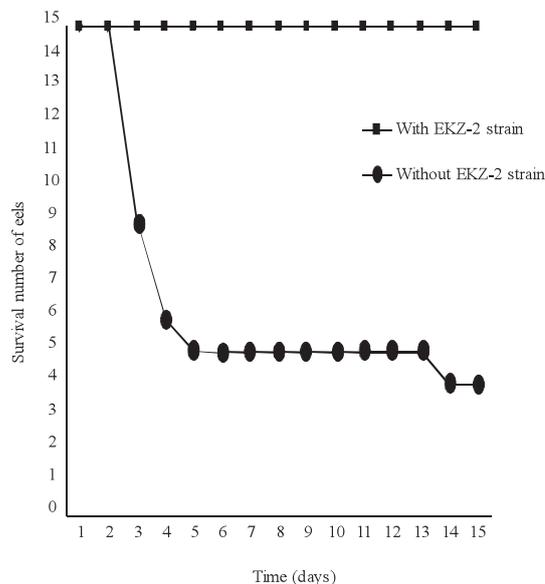


図1 細菌投与区と無投与区における *E. tarda* (10^4 CFU/ml) の攻撃実験

いては、餌食い等の活動の低下が見られなかったことから、EKZ-2株のウナギへの悪影響はないか、あるいは少ないものと判断した。

養鰻池におけるEKZ-2株投与実験

EKZ-2株投与区では、細菌投与後53日間において約500尾の死亡が見られたのに対して、細菌無投与区では約3500尾が死亡した (図2)。細菌投与区においては、給餌の際に、水流に逆らって泳ぐ個体が多く、活発な摂餌行動がみられた。なお、細菌無投与区における斃死魚には、パラコロ病の症状を呈した個体がみられた。

考 察

ウナギを対象にしたワクチンについては、Song and Kou⁴⁷⁾ や Trongvanichnam ら⁴⁸⁾ がホルマリン不活化菌体を抗原とする浸漬免疫を試み、ある程度の有効性を認めている。また、Salati ら^{49,50)} は *E. tarda* から抽出したリポ多糖 (LPS) がワクチン抗原として有効であると報

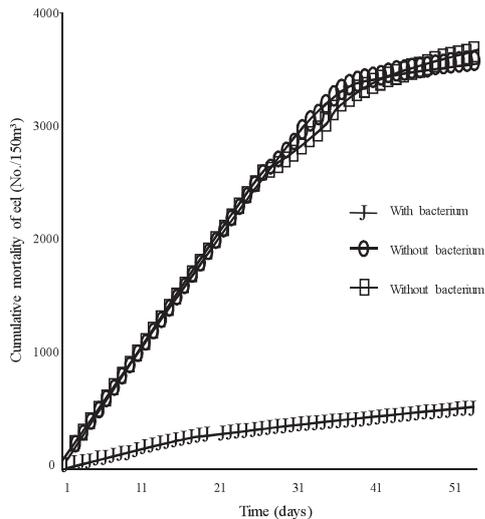


図2 養鰻池における、細菌投与区と無投与区のウナギ斃死数

告している。ウナギ以外では、テラピアに対するホルマリン不活化菌体を抗原とする浸漬免疫⁵¹⁾や弱毒変異株を抗原とする生菌免疫⁵²⁾、マダイに対するホルマリン不活化菌体および抽出LPSの筋肉注射免疫⁵³⁾などが報告されている。しかし、いずれの場合でも、ワクチンは実用化には到っておらず、薬剤投与に頼っている現状にある。

養鰻池現場では、薬剤投与を行うと、次にウイルス性疾病が発生する状況にある。これは、薬の使用により魚が罹病してしまうことが現実に行っていることを表している。つまり、ウイルスと細菌の関係をみると、ウイルスの感染を抑制する微生物（拮抗微生物）は海水中には多数生息している⁵⁴⁾。ところが、抗生物質は細菌を殺すことはできるが、ウイルスには効かない。このため、薬剤の使用によってウイルスを抑制する細菌、すなわち善玉菌が減らされてしまい、ウイルスは残る。こうして、いままで善玉菌によって抑制されていたウイルスはのびのびと活動することができ、魚に感染する。そのため、薬剤耐性菌の弊害だけではなく、ウイルス性疾病による新たな斃死が起こる。このウイルス性疾病では、ウイルス性血管内皮壊死症と点状出血症・板状出血症とが発生している。ウイルス性血管内皮壊死症の原因ウイルスについては、電子顕微鏡によって確認された形態や細胞内での存在位置から、アデノ様ウイルスに類似していると考えられている。このウイルスは血管の内面を覆う細胞（内皮細胞）に選択的に侵入し、その結果として全

身のうっ血や出血などの病変が生じる。現在までのところ、本ウイルスの性状等については不明な点が多いが、本ウイルスに感受性のある培養細胞が樹立され、ウイルス分離に成功したとの報告もある⁵⁵⁾。現状では、今後の研究の進展が期待されるものの、原因ウイルスの性状が不明なため、決定的な対策はまだ無い。また、点状出血症・板状出血症は、ウイルスもまだ特定されておらず、効果的な治療法も皆無であり、両疾病の対策としては、現在は昇温のみが行われている。これは、ウイルスの増殖源となる衰弱魚を高水温により殺し、感染源を除去するという方法であり、根本的な対策とは考えにくく、すでに重篤に本症が蔓延している場合には、際限なく死亡が続くことになる。

このように、薬剤投与による疾病対策では、疾病とのイタチごっこになり、変異の進行する細菌やウイルスに対応するのは、難しい現状である。本研究においては、水槽実験において *E. tarda* に対して抗菌活性を保持する拮抗細菌を配合飼料に添加することで、パラコロ病を抑制することができた。また、養鰻池現場でも、拮抗細菌を投与することでウナギ斃死数が減少した。この結果は、現状の薬剤投与からウイルス性疾病の発症という負のスパイラルからの脱出を示唆しており、ウイルス性疾病の防除が期待できると考える。

なお、*E. tarda* への増殖阻害作用を保持する拮抗細菌は少なく、Dopazoら³⁶⁾の研究でも、*E. tarda* 抑制効果を保持する細菌はみられなかったと報告している。また水産養殖における生物防除製剤の研究総説⁸⁾においても、*E. tarda* に対する拮抗細菌の報告例はみられない。

第6章 養鰻池における環境向上と病原菌の消長

緒言

ウナギ養殖がハウス加温飼育方式となり、高水温設定が定常化したため、*Edwardsiella tarda* を原因菌とするパラコロ病が成長段階や季節を問わず、単独感染症として発生している。この *E. tarda* は淡水魚ではウナギのほかナマズ *Ictalurus punctatus*⁵⁶⁾、テラピア *Tilapia mossambica*⁵⁷⁾、マスノスケ *Oncorhynchus tshawytscha*⁵⁸⁾、ドジョウ *Misgurnus anguillicaudatus*⁵⁹⁾、およびコイ *Cyprinus carpio*⁶⁰⁾ などで疾病を引き起こし、

水産業に甚大な被害を与えている。このような中、薬剤投与を行ってきた現状にあるウナギ養殖でも、使用可能な抗生物質に耐性を示す菌株が増えている⁶¹⁾。

第5章の研究において、*E. tarda* に対して拮抗作用を示した微生物をウナギ餌料に添加し、投与したところ、無投与区と比べて有意に生残数が向上した。しかし、使用した菌株は海産の海藻表面から分離した菌株であり、養鰻場における淡水環境下では、増殖率が小さいという課題を残した。そこで、本研究では、アユ養殖池の淡水環境から分離し、強い拮抗作用を保持する菌株をバイオコントロール製剤として、エドワジエラ症防除試験に用いた。さらに、拮抗細菌を投与することで、ウナギ養殖水中や底層土での細菌数、細菌相や *E. tarda* の消長の変化をしらべた。

ウナギ養殖において、養殖環境はウナギの生残や成長を左右する大きな要因となる。特に、ウナギの飼育量が過密になると水質の急激な悪化が起こり、例えば溶存酸素量、アンモニア、亜硝酸等の水質が飼育制限要因となり、健康なウナギ育成の妨げになる。また、高濃度の栄養塩の排出は、その下流域における富栄養化の原因となる。養殖環境の保全、また排水による下流域での弊害を防除するためには、栄養塩を分解し、低濃度状態に保つ必要がある。この栄養塩の分解には細菌の働きによるところが大きいため、本研究では、バイオコントロール製剤が、養殖水中と底層土（ヘドロ）の栄養塩の低減効果を示すかしらべた。

材料及び方法

抗エドワジエラ試験

伊藤ら²⁹⁾の研究において分離した拮抗細菌 PMC-7株を用いて、マダイより得られたエドワジエラ症の原因菌である *Edwardsiella tarda* に対する抗菌試験を行った。抗菌試験の方法は前章と同様である。また Okuzumi ら¹⁴⁾の簡易同定法に基づき、グラム染色性、運動性、形態、色素産生能、チトクロームオキシダーゼ反応、ブドウ糖発酵性の結果より、LMC-9株の属レベルでの同定を行った。

養鰻池における PMC-7株投与実験

実験に使用した養鰻池ではハウス加温式養殖を行って

おり、水温は約30℃、1池（約150m³）当たり約2万尾のウナギを飼育している。この試験池において、3日間培養した PMC-7株（菌数約10⁹ CFU/ml）を50ml/kgの濃度で配合飼料に混合し、この飼料を約9ヶ月間（6ヶ月間投与したのち、別の池に3ヶ月間）投与した。また、無投与区も設置して実験区と比較した。

細菌分離

細菌投与区及び対照生産区（細菌無投与）の水中、底層土（ヘドロ蓄積）より細菌を分離した。水中細菌の分離では、10⁻¹~10⁻⁶の希釈段階を順次設定し、希釈水を100 μl ずつ平板寒天培地（ZeBell 2216E）に接種した。また、底層土からの細菌分離では、10ml 試験管（滅菌淡水9 mlを含む）に10ml になるところまで底層土を入れ、しっかりと攪拌した後、10⁻¹~10⁻⁶の希釈段階を順次設定し、希釈水を100 μl ずつ平板寒天培地（同上）に接種した。それぞれ平板培地は20℃で1週間培養し、その後コロニー数（生菌数）を計数した。また、分離した菌株において、コロニー形状毎に発酵性細菌か否かを、O-F 試験を用いて検定した。

PCR を使用した *E. tarda* の検出

E. tarda 検出手段として PCR を使用した。*E. tarda* の DNA 試料は chelex100® 法⁶²⁾ による簡易抽出によって調整し、プライマーは、*E. tarda* の検出に設計された Eta-210, Eta-1030r を用いた。プライマーの塩基配列については以下に示す。

Eta-210:TCG GGC CTC ATG CCA TCA GAT GAA

Eta-1030r :CCA AAG GCA CTC CCG TAT CTC TAC

PCR では、熱変性を95℃で1分間行い、続いて3ステップサイクル（95℃30秒間、55℃30秒間、72℃1分間）を30サイクル行った。PCR 終了後、PCR 反応液を試料として、アガロースゲルによる電気泳動を行い、PCR による増幅の有無を確認した。電気泳動は3%アガロースゲルを担体として用い、1× TAE buffer（40mM Tris-酢酸、1mM EDTA（pH 8.0））を溶媒として定電圧100V、30分間の条件で行った。

拮抗細菌投与における *E. tarda* 出現の有無

養鰻池において、拮抗細菌 PMC-7株を投与した実験

区と無投与の対照区とにおいて、*E. tarda* 出現の変動を比較した。すなわち、その出現の有無を *E. tarda* 検出用プライマーによる PCR 法を用いて行った。DNA サンプルは、養殖水、底層土については2005年11月から2006年7月までの間、7日間に一度の割合で、またウナギ（生魚及び斃死魚）からは1ヶ月に一度の割合で、それぞれサンプルを採取し、検定に使用した。

拮抗細菌投与における栄養塩の比較

養殖池底土には飼料の食べ残し、ウナギの糞等の有機物が沈積し、栄養塩濃度を高くしている。そこで、拮抗細菌を投与することによる栄養塩濃度の変動をしらべた。栄養塩の指標にはリン、アンモニアを採用し、サンプルとして養殖水と底層土を採取し、2005年11月から2006年7月までの期間、7日間に一度、Murphyら⁶³⁾とSearle⁶⁴⁾の方法によって栄養塩濃度を測定した。

結 果

抗エドワジエラ試験

PMC-7株は *E. tarda* に対して強い拮抗活性を示し、簡易同定ではグラム陰性、運動性 (+)、チトクローム・オキシダーゼ試験 (-) OF 試験 (-) となったため、簡易分類法では同定できなかった (表1)。

表1 PMC-7株の簡易分類

Bacterial strains	<i>E. tarda</i> -static activity (%)	Motility	Cytochrome oxidase test	O-F test	Tentative identification
PMC-7	41	+	-	-	Not identified

養鰻池における PMC-7株投与実験

PMC-7株投与区では、細菌投与後180日間において約1,950尾の死亡が見られたのに対して、細菌無投与区では約4,160尾が死亡した (表2)。なお、投与区での4月の斃死魚にはエラにトリコジナが寄生していた。

細菌分離

細菌投与区と無投与区において、池中の細菌群は、養殖水では 5×10^3 CFU/ml から 7×10^4 CFU/ml、また底層土では、 2×10^5 CFU/ml から 2×10^6 CFU/ml までの間で変動し、拮抗細菌投与、無投与の池における、それ

表2 ウナギ斃死数の比較

A.D/ Month	With bacteria	Without bacteria
2005/12	153	362
2006/ 1	300	427
2	196	428
3	307	869
4	718*	467
5	285	1607
Dead number of eels	1959	4160

* : Dead of parasitic disease.

表3 細菌投与区と対照生産区における醗酵性細菌

Date	With bacteria	Without bacteria
5/4	-0/8*	+2/8
5/11	-0/6	+1/6
5/18	-0/6	-0/6
5/25	-0/5	+1/5
6/1	+1/5	+2/5
6/8	-0/5	-0/5
6/15	+1/5	+1/5
6/22	-0/7	+2/7
6/29	-0/6	+1/6
7/6	-0/6	-0/6
7/13	+1/5	+1/5
7/20	-0/6	+1/6
7/27	-0/6	-2/6

* : Number of fermentative bacteria/Number of isolated bacteria.

ぞれの細菌数の変動には相違はみられなかった。一方、分離したシャーレ上の細菌群からコロニー形状の異なる菌株に O-F 試験を行った結果、有用細菌投与区と比較して、無投与区からは発酵性細菌がより多く検出された (表3)。

PCR を使用した *E. tarda* の検出

E. tarda の検出用プライマーを用いて、PCR 反応を行うと、800bp 付近にバンドが検出され、その検出限界は、 10^2 CFU/ml までであることが確認された (図1)。

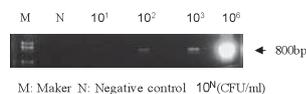


図1 PCR を使用した *E. tarda* の検出

拮抗細菌投与における *E. tarda* 出現の有無

計37回のサンプリングにおいて、細菌投与区では養殖水中から7回、底層土から1回 *E. tarda* が検出されたのに対して、対照区では養殖水中から21回検出され、検出率はそれぞれ18.9%と56.8%となった(表4)。

表4 養鰻池の *E. tarda* 検出数と検出率

	With bacteria		Without bacteria	
	water	bottom mud	water	Mud of bottom
Number of <i>E. tarda</i> detection	7	1	21	0
<i>E. tarda</i> detection rate (%)	18.9	2.7	56.8	0

Number of sampling: 37.

また、ウナギでは、生魚からは分離されることが少なかったが、斃死魚からは、細菌投与の有無に関わらず、*E. tarda* が検出された(表5)。

表5 ウナギからの *E. tarda* 検出数と検出率

	With bacteria		With out bacteria	
	live eels	dead eels	live eels	dead eels
Number of <i>E. tarda</i> detection	1	9	1	9
<i>E. tarda</i> detection rate (%)	11.1	100	11.1	100

Number of sampling: 9.

Isolated from mucus, liver, intestines.

拮抗細菌投与における栄養塩の比較

拮抗細菌投与区と無投与区における、養殖水及び底層土のリン酸態リンとアンモニア態窒素の変動を図2、3に示した。リン酸態窒素では、対照生産区の養殖水で約0.8mg/L、底層土で約1.5mg/Lであるのに対して、拮抗細菌投与区では、それぞれ約0.3mg/L、0.5mg/Lと有意に減少していた。また、アンモニア態窒素においても、同様に細菌投与区の養殖水では約70%減少、底層土でも約40%減少していた。この結果から拮抗細菌投与によって、栄養塩の減少することが判明した。

考 察

反町・江草⁶⁵⁾は、ウナギの腸内細菌叢の季節的变化を調べ、*Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Alcaligenes* は特に冬に多く、*Vibrio* は夏から秋にかけて多い。一方、*Aeromonas* は春先に多く、以後減少し、冬には認められなかったと述べている。*E. tarda* の出現については、ハウス加温式の養鰻場においては、パラコロボの発生状況と関係なしに、周年を通して養殖環境や

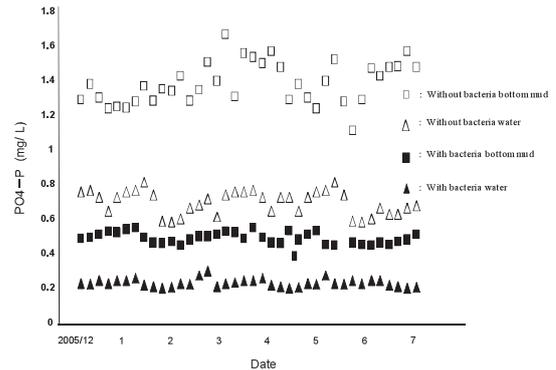


図2 養殖水及び底層土におけるリン酸態リンの変動

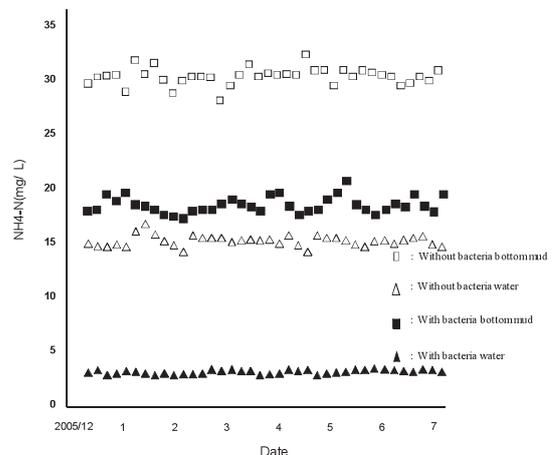


図3 養殖水及び底層土におけるアンモニア態窒素の変動

ウナギ腸内に分布することが明らかにされている⁶⁶⁾。また、*E. tarda* は海水中では、生存期間が比較的短く、塩分が3%を超えると増殖が著しく低下するが²⁸⁾、淡水環境下では長期間生存することが報告されている⁶⁷⁾。また、ヒラメにおいて、エドワジエラ発症魚や、死亡魚から大量の *E. tarda* が排出されることが実験的に示されており⁶⁸⁾、ウナギにおいても同様に、ウナギ生体あるいは斃死した個体から養殖環境へ放出されている可能性がある。本研究において、拮抗細菌を投与していない対照区において、養殖水中から *E. tarda* が高い頻度で検出された。また生魚からの検出は少なかったものの、斃死したウナギからは、全ての個体で *E. tarda* が検出された。これは、拮抗細菌投与区でも同様であったので、斃死魚の速やかな除去が、パラコロボ防除には必要であると思われる。

養殖を行う上で大きな問題には、養殖場の環境汚染がある。養殖魚の残餌や排泄物などの有機物が養殖環境内に蓄積して、その分解過程で溶存酸素を消費する。有機

物負荷量が多く、酸素供給が追いつかないと、蓄積された有機物が嫌気分解され硫化水素を発生し、同時に貧酸素水塊が形成され、飼育環境がいつそう悪化する。特にアンモニア態窒素は魚類に強い害作用を与える。非イオンのアンモニア (NH_3) は水温、pH の変化によって発生する場合が異なるが、水温が高く、pH が高ければその毒性が強くなる。ウナギでは、アンモニア態窒素が約 30mg/L で、成長に悪影響を及ぼすことが分かっている⁶⁹⁾。本研究において、養鰻場における水は、細菌無投与の対照区では約 15mg/L であったのに対して、拮抗細菌投与区では約 3 mg/L となっていた。またリン酸態リンにおいても、拮抗細菌投与により、減少することが判明し、これは、投与した拮抗細菌が栄養塩を分解したものと考えられた。

なお、底層土の浄化については、投与細菌が底層土中の原生動物によっても摂食され、それにより増加した原生動物は底層土中を移動し、その攪拌作用により、酸素が多く浸透して、よりヘドロ分解が促進されたとも考えられる。

細菌によって取り込まれた有機物の大部分は最終的に水と二酸化炭素に分解され、その過程で窒素やリンなどの無機塩が生成されるが、これらの無機塩類は植物プランクトンによって利用され再び有機物となり、食物連鎖網に組み込まれて、より大型の生物へと転換される。また細菌に取り込まれた有機物の一部分は細菌細胞となり、細菌を餌とする微少な原生動物を通して食物連鎖網に組み込まれる。このように、有用細菌をめぐる食物連鎖も、環境の向上に重要な要素になると考える。

第7章 総合討論

人々の多くは魚の養殖において、微生物を悪物と考え取り除こうとする。魚介類種苗生産施設を訪ねると、その多くの施設で、微生物＝悪物として、塩素による殺菌や UV ランプやフィルターろ過による海水浄化等の対策がとられている。

また、人間の生活でも衛生管理のために、消毒剤の散布をおこない、多くの微生物を排除する。通常の人間生活では、消毒を常時おこなっているわけではないので弊害は目立たないが、薬剤を頻繁に使用する病院では、薬

に対して抵抗する病原菌に原因する院内感染が大きな問題となっている。これが畜産業や水産業になると薬の使用回数と量が多いので、院内感染が常時起きているような状況となる。そして今、薬剤を多用しても家畜、魚介類の病気の治らない事例が数多く起こっている。

ここで、薬を使えば使うほど魚が病気になってしまうという自然界の仕組みについて考える。ウイルスと細菌の関係をみると、ウイルスの感染を抑制する細菌（拮抗微生物）は海水中には多数生息している。ところが、抗生物質は細菌を抑制ことはできるが、ウイルスには効かない。このため、薬剤の使用によってウイルスを抑えている細菌、すなわち善玉菌が減らされてしまい、ウイルスは残る。こうして、いままで善玉菌によって抑制されていたウイルスはのびのびと活動することができ、魚に感染する。薬剤を与えて、言い換えればコストを費やして魚を病気にしてしまうようなことが現実になっているといえる。

ここで、善玉菌を増殖させる方法を講じれば、悪玉菌が減少し疾病は起きないという考え方があり、このような有効な善玉菌は大別するとプロバイオティクスとバイオコントロール製剤となる。Maeda⁷⁰⁾、Maeda and Nogami⁷¹⁾の研究により、世界で初めて魚の成長促進（プロバイオティクス）効果をあらわし、同時に病原菌の増殖を抑制（バイオコントロール）、さらに海底土のヘドロなどの有機物を分解する有効な機能を保持した微生物が発見され、その後同じような微生物の探索と水産増養殖への実用化例が100編以上の論文で報告されている⁸⁾。このような研究の背景には、先にも述べたような過剰な薬剤使用に対する消費者の危惧感とともに、薬剤の効力が低減し、疾病防除が難しくなっている状況がある。

実際、本研究で対象となった魚種でも、薬を使用しても全く効果がない事例が多数みられた。特に、第5章、第6章の対象魚種であるウナギにおいては、エドワジエラ症とともに、ウイルス性と考えられるエラ病が蔓延している。この疾病は、エドワジエラ症に対して薬剤投与を行うと、発生が顕著になるということが現実に行っており、先に述べたように、薬剤投与下での善玉菌の減少によるウイルス性疾患の増加と考えられる。

バイオコントロール製剤とプロバイオティクス

生物防除（生物学的防除、バイオコントロール、Biological control, Biocontrol）は自然界に進行している生物間の競合の中で、主として拮抗作用を利用した方法であり、天敵生物を増殖させることによって病原微生物の防除を行う目的で開発された。農業領域における生物防除方法では、天敵生物を外部より移入させる直接的な技術（Classical or Augmentative biocontrol）と、有害微生物を阻害するあるいは低減するような植物を栽培するなどして当該生産対象植物を保護するといった間接的生物防除技術（Conservation biocontrol）、さらに両者の特徴を併用する方法等が採用されている。このような生物防除に使用する天敵生物をバイオコントロール製剤、あるいは農業領域ではバイオ農薬とよんでいる。

プロバイオティクスは、原生動物の生産物で、他の原生動物の増殖を促進する物質をあらわす語として Lilly and Stillwell⁷¹⁾によって提唱された。その後、プロバイオティクスの用語は、動物の腸内細菌相に効果的な作用を及ぼす栄養補助剤として用いられるようになり⁷²⁾、さらに Fuller⁷³⁾は、プロバイオティクスを、宿主の腸内細菌相組成を宿主の健康増進あるいは成長促進に有効な状態に保つ微生物と定義した。プロバイオティクスの意義は無菌の動物は、より容易に罹病することからも推測できる。Nurmi and Rantala⁷⁴⁾は、成長した健康なニワトリの腸内容物や少量の糞を若鶏に投与した場合、若鶏の病原菌 *Salmonella infantis* への抵抗性が増大したと報告した。これは、若鶏消化管内において、新しく構成された細菌群が *S. infantis* の侵入、定着を阻止したと考えられる。

プロバイオティクスは、上記の定義のように、病原菌に対して拮抗作用を発現するというよりは、場の競合などで優勢となり、結果的に病原菌の定着を阻害する微生物をあらわす。このような特徴により、プロバイオティクスとバイオコントロール製剤（Biocontrol agents）とは区別され、バイオコントロール製剤の定義としては「自然界に分布する微生物、昆虫等で、病原生物を殺滅するか、その増殖を阻害する作用を及ぼし、同時に生産を目的とする生物に対しては少なくとも無害であるか、あるいは成長促進、代謝増進効果を及ぼす生物」とすることができる。

養殖環境でも、他の自然生態系と同様に、多数の微生物や微細藻類および原生動物等が分布し、これらの微生物は直接的あるいは間接的に相互作用をおよぼしているが、近年これらの微生物のプロバイオティクスおよびバイオコントロール製剤としての利用が注目されるようになった。

水産増養殖におけるバイオコントロール製剤（生物防除）

水産増養殖のバイオコントロール製剤研究は、3つの研究レベルに分けることができる。

1. 拮抗微生物が病原菌の増殖を阻害するが、魚介類へのかかわりは明らかにされていない研究
2. 病原菌の増殖を阻害し、かつ魚介類には無害であるか、または成長促進効果のある微生物の研究
3. 上記2つの研究において、さらに菌株が分類同定され、人体に対しても無害であるとした研究

以下にこれらの研究例を示す。

病原細菌の防除

Dopazo ら³⁶⁾は、魚病細菌（*Vibrio*, *Aeromonas*, *Pasteurella*, *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Pseudomonas* 属の菌株）の防除を目的として、分離細菌株の病原菌に対する増殖阻害作用をしらべた結果、供試菌は上記の病原菌に対して抑制効果を示したが、*Edwardsiella tarda* と *Pseudomonas aeruginosa* 2株への抑制効果はみられなかったと報告した。Tanasomwang ら⁷⁵⁾は、ウシエビ（別名ブラックタイガー、*Penaeus monodon*）の孵化水槽より抗 *Vibrio* 細菌を分離し、Jayanth ら⁷⁶⁾は、*Aeromonas* 属の菌が魚やエビの病原細菌に対して強い拮抗作用を示したと報告した。Ruiz ら⁷⁷⁾も、*Alteromonas* の1種が養殖水中の多くの細菌に対して拮抗作用を示したと報告した。Rico-Mora ら⁷⁸⁾は、培養したケイ藻 *Skeletonema costatum* に分離細菌（同定されていない）を加えた場合、その後人為的に加えた病原菌 *Vibrio alginolyticus* の増殖が阻害されたことを報告し、この阻害作用は供試菌が抗菌作用を保持しないことから、ケイ藻の細胞外生産有機物のみという低栄養条件下における供試菌2株の場の競合において、高栄養環境を好む *Vibrio* 属の増殖が抑制されたと推測した。

Moriarty⁷⁹⁾は *Bacillus sp.* を160日間濃度 $10^4 \sim 10^5$ cells/mL⁻¹ になるようにウシエビ養殖池に投与したところ、*Vibrio* 属菌数の減少したことを報告した。この報告では池水中の投与した *Bacillus sp.* 菌数の分布・変動のデータが示されていないので、投与した *Bacillus sp.* が池中で増殖しうるのか否か不明である。

上記の拮抗微生物と病原菌との間の拮抗作用研究では、供試菌株が魚介類の代謝・成長等にどのように影響するのか明らかにされていないので、現場養殖への実用化には十分な知見が得られたとはいえない。これに対して次の研究では、供試菌の拮抗作用とともに、用いた菌株の魚介類への影響についても調べられている。

Jöborn ら⁸⁰⁾によると、*Carnobacterium sp.* が魚類消化管中に生存して、病原菌 *Vibrio anguillarum* と *Aeromonas salmonicida* とを抑制し、一方、供試菌の魚類への阻害作用はなかった。Smith and Davey⁸¹⁾は供試菌株 (*Fluorescent pseudomonas*) が鉄イオンの吸収により魚類に人為的に感染した *Aeromonas salmonicida* の増殖を抑制したと報告した。この作用は、3価鉄イオン輸送因子シデロフォア (siderophore) を持つ微生物が環境中から鉄イオンを消費するため、結果として鉄イオンを要求する他の微生物の増殖を阻害する効果によるものである。Gatesoupe⁸²⁾も *Vibrio sp.* をワムシ飼育水槽中で増殖させ、このワムシを Turbot 稚仔に与えた場合、*Vibrio splendidus* の増殖が抑制され、この抑制効果はシデロフォアによると報告した。Nakamura ら⁸³⁾によると、いくつかの分離菌が *Vibrio* 属菌3種の増殖を阻害し、中でも1株は強い阻害作用を示したが、カキの成長への抑制作用はなかった。彼らは、さらに病原菌 *Vibrio alginolyticus* のカキに対する攻撃試験において、有用細菌の存在下でカキ幼生の70%が生残したが、有用細菌の存在しない条件では8%のみの生残にとどまったことを報告した。しかし、これらの研究では供試菌はカキの生残率向上には有効であったが、使用した菌株の分類同定が行われていないため、人間への毒性の有無が危惧される。

一方、次に示す研究では、有用細菌による病原菌の抑制、魚介類の成長促進効果とともに、使用した菌株の分類同定が行われている。Riquelme ら⁸⁴⁾は、*Alteromonas haloplanktis* の培養静止期の培養上澄液が

病原菌の増殖を抑制したと報告している。この抑制効果は、*A. haloplanktis* の培養初期および対数増殖期の培養上澄にはみられない。この有用細菌に貝類幼生を1時間浸漬した場合、病原菌 *Vibrio sp.* への抵抗効果をあらわしたが、24時間浸漬の場合では無浸漬の場合との相違はみられなかった。この菌液への浸漬は、農業領域で採用されているバクテリゼーションといわれる方法であり、植物の種子や根を細菌液に浸し、その後地中に移植すると、細菌が種子、根の周りに分布、あるいは増殖するため、植物の成長促進効果や病原菌の抑制効果が期待できる手法とされている⁸⁵⁾。Austin ら⁸⁶⁾の報告では *Vibrio alginolyticus* の培養上澄の凍結乾燥粉末がバイオコントロール製剤としての効果をあらわし、病原菌 *Vibrio ordalii*, *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida* の増殖を抑制したが、*Yersinia ruckeri* に対しては阻害効果がなかったと報告した。彼らは、また、このバイオコントロール製剤を太平洋サケに投与した結果、病原菌 *Aeromonas salmonicida* の攻撃試験に対して魚体の抵抗性が増大したが、一方 *V. anguillarum* と *V. ordalii* に対する感染抑制効果は低かったと報告している。Gram ら⁸⁷⁾の報告では、鉄イオン制限下で培養した *Pseudomonas fluorescens* の培養上澄は *Vibrio anguillarum* の増殖を抑制したが、鉄分が豊富にある培地中で培養した場合の上澄には阻害効果はない。彼等はさらに、 $10^5 \sim 10^7$ cells mL⁻¹ の *P. fluorescens* をニジマス飼育水中に添加して5日間飼育した後、 $10^4 \sim 10^5$ cells mL⁻¹ 濃度の *V. anguillarum* の攻撃試験を行った結果、ニジマスの生残率は有用菌株の添加によって向上したと報告している。

Gibson ら⁸⁸⁾によると、バクテリオシンを生産する *Aeromonas media* は病原菌 *Vibrio tubiashii* の攻撃に対してカキを防御する効果を示し、*A. media* 無投与の実験区では、カキは5日後に死滅した。また有用菌 *A. media* 単独投与の場合においては、カキ生残への悪影響は見られなかったと報告している。

Gatesoupe ら⁸⁹⁾は、乳酸菌を与えたワムシのヒラメに対する餌料価値の向上を報告した。さらに Gatesoupe⁹⁰⁾は、*Bacillus sp.* の胞子をワムシに投与した場合、ワムシ培養水中には多様な菌が出現したが、無投与のワムシ培養水中の細菌相は *Vibrio* 属の細菌が優占すること、

当該細菌を投与したワムシをカレイ目ターボットに与えた場合、10日後の成長と生残率が向上することを示した。このように、有用微生物をワムシやアルテミア等の餌料生物に摂食させ、この餌料を魚類に投与して抗病性向上をはかる試みが行われているが、一方では、アルテミアやワムシ等が細菌を消化した後は、細菌効果の発現が低減する傾向にあることが指摘されている⁶⁾。

Maeda⁶⁾, Maeda and Nogami⁷⁾, Maeda⁷⁰⁾, Maeda and Liao⁹¹⁾, Maedaら⁹²⁾, Nogami and Maeda⁹³⁾, Maeda and Liao⁹⁴⁾は養殖水中より分離した菌株 *Thalassobacter utilis* と *Pseudoalteromonas undina* がエビ (*Penaeus monodon*), カニ (*Portunus trituberculatus*) の成長を促進するとともに、病原微生物への拮抗作用を示すことを報告した。さらに、この *P. undina* がシマアジ (*Caranx delicatissimus*) の生残向上および病原ウイルス抑制効果もあらし⁹⁵⁾, *Thalassobacter utilis* は養殖水中に出現した真菌の増殖を抑制することも明らかにした⁹⁶⁾。Gatesoupe¹²⁾の総説では、これらの研究が水産養殖における生物防除およびプロバイオティクス研究の先駆けとなったと評価している。

本研究で使用した拮抗細菌 LMC-2株 (第3章), EKZ-2株 (第4, 5章), PMC-7株 (第6章) は、病原菌への拮抗作用を保持しており、かつ魚介類には無害であるか、または成長促進効果があり、かつ菌株が分類同定されている。また、LMC-2株 (第3章) では、マダイ好中球数の増加が認められたことから、病原菌への直接的な抗菌活性とともに、魚介類の生体防御能の上昇により、病原菌への耐性の向上した可能性が示唆された。次に、PMC-7株 (第6章) では、拮抗細菌を投与することで病原菌の減少とともに栄養塩が減少した。これは、投与した拮抗細菌が、有機物などを分解する能力をもつことを示している。このように本研究は、上記の既報告にない新たな知見を提供しており、バイオコントロールの実用化を促進したものと考えられる。

養殖魚の病害生物のバイオコントロール (生物防除) に使用可能な微生物には *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, *Thalassobacter*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus* 属の種等があるが、これらの有用細菌はバクテリオシン、シデロフォアや酵素等の物質を生産し、この物質の作用によっ

て他微生物の増殖を抑制すると考えられる。さらに、このような作用物質とともに、微生物間の「場の競合」 (niche exclusion) によって、他微生物を排除する作用も、バイオコントロールにおいては重要である。

Okami⁹⁷⁾ は、バクテリオシンは近縁種のみ作用する物質で、この特徴によって抗生物質と区別されると述べているが、この作用範囲が狭いという定義においては、大半の細菌がバクテリオシンを生産することになり、これらも生物防除製剤として利用することが可能となる。さらに、拮抗微生物をより効率よく探索・分離するうえでは、生物体表が適当な場として指摘されている。例えば、海藻に付着する細菌の中には抗菌性を保持する種が多い。Lemosら⁹⁸⁾ は、特定の海産植物種から高頻度で抗菌活性を示す株を得ている。Burgessら⁹⁹⁾ も多くの細菌を海藻や無脊椎動物の表面から分離し、35%の菌株が抗菌活性を示し、この割合は、海水中の浮遊細菌における割合よりも高かったと報告した。本研究でも同様の結果を得ており、第2章の研究において、養殖水中分離細菌よりも付着基盤から分離した菌株のほうが、抗菌・抗ウイルス細菌の割合の高いことを示した。

細菌に感染するバクテリオファージは、養殖魚介類病原菌の生物防除製剤に利用しうると考えられるが、いまだ実用化にはいたっていない。Park and Nakai¹⁰⁰⁾ は、ファージを配合飼料に混合しアユに投与した結果、*Pseudomonas plecoglossicida* の攻撃に対してアユの抵抗性が増大したと報告している。しかし、自然界海水におけるファージ感染特異性の再確認、およびファージに対する耐性菌出現等の問題については、更なる検討が必要であろう。

近年、養殖魚の「食の安全」 (risks on the table) に対する消費者の関心は著しく増大しており、薬剤等の使用は抑制される方向にある。また、近年の地球気象の変化 (温暖化) にともなって、例えば亜熱帯、熱帯の疾病が温帯、亜寒帯地域に発生しているように、新たな疾病の発生が続くと危惧されている。このような薬剤使用の抑制と疾病増大の状況において、バイオコントロールへの関心はより増大する傾向にあるといえる。

謝 辞

本研究のすべての過程において、懇切な御指導をいただいた宮崎大学農学部・前田昌調教授に謹んで深謝の意を表します。本論文御校閲を賜った宮崎大学農学部・岩槻幸雄教授、佐賀大学農学部・神田康三教授、鹿児島大学水産学部・川村軍蔵教授、同・山本淳教授に厚く深謝申し上げます。また、宮崎大学農学部・吉田照豊准教授には病原菌株 *Vibrio anguillarum* 及び IHN Virus の提供並びに有益な御助言をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。

独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所飯田貴次所長には病原菌株 *Edwardsiella tarda* の提供並びに御助言を賜りました。厚く御礼申し上げます。

イシガキダイ養殖施設を提供していただいた宮崎大学工学部・丸山俊朗教授（現名誉教授）、同・鈴木祥広准教授に深謝します。また、ヒラメ、ホシガレイ養殖施設を提供していただいた、長崎県漁業公社島原事業所（長崎県、島原市）の方々にお礼申し上げます。MBC 開発株式会社（鹿児島県、霧島市）の方々には、ヒラメ種苗生産でご協力を頂いたので、ここに謝意を表します。さらに、元佐土原養鰻組合児玉正組合長からはウナギ養殖施設の提供及び有益な助言をいただきました。また、クロレラ工業の方々にはEKZ-2株大量培養のご協力をいただき、感謝します。そして、宮崎県魚病指導専門員岩田一夫魚類防疫士には有益な御助言をいただき、また研究施設の便宜をはかっていただきました。ここに御礼申し上げます。

文 献

- 1) Elliker, P.R. (1949): Practical Dairy Bacteriology. 1st ed. McGraw-Hill, New York, 391pp.
- 2) Nurmikko, V. (1956): Biochemical factors affecting symbiosis among bacteria. *Experientia*, **12**, 245-249.
- 3) Ericson, L.-E., and L. Lewis (1954): On the occurrence of vitamin B12-factors in marine algae. *Arkiv. Kemi*, **6**, 427-442.
- 4) Provasoil, L. (1958): Nutrition and ecology of protozoa and algae. *Ann. Rev. Microbiol.*, **12**, 279-308.
- 5) Shigenobu, S., H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki, and H. Ishikawa (2000): Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature*, **407**, 81-86.
- 6) Maeda, M. (1999): *Microbial Processes in Aquaculture*. Biocreate Press, Derby, UK, pp. 102.
- 7) Maeda, M. and K. Nogami (1989): Some aspects of the biocontrolling method in aquaculture. In *Current Topics in Marine Biotechnology*, Miyachi, S., *et al.*, (eds.), Japan. Soc. Mar. Biotechnol. Tokyo, p. 395-398.
- 8) Maeda, M. (2004): Interactions of microorganisms and their use as biocontrol agents in aquaculture. *La Mer*, **42**, 1-19.
- 9) Gundersen, K., Å. Brandeberg, S. Magnusson, and E. Lycke (1967): Characterization of a marine bacterium associated with virus inactivating capacity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **71**, 281-286.
- 10) Magnusson, S., K. Gundersen, Å. Brandberg, and E. Lycke (1967): Marine bacteria and their possible relation to the virus inactivation capacity of sea water. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B: Microbiol.*, **71**, 274-280.
- 11) Kamei, Y., M. Yoshimizu, Y. Ezura, and T. Kimura (1987): Screening of bacteria with antiviral activity against infectious hematopoietic necrosis virus (IHN) from estuarine and marine environments. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 2179-2185.
- 12) Gatesoupe, F.-J. (1999): The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, **180**, 147-165.
- 13) Porter, K. G. and Y. G. Feig (1980): The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**, 943-948.
- 14) Okuzumi, M., S. Okuda, and M. Awano (1981): Isolation of psychrophilic and halophilic histamine-forming bacteria from *Scomber japonicus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 1591-1598.
- 15) Fauré-Fremiet, E., P. Favard, and N. Carasso (1963): Images électroniques d'une microbiocénose marine. *Cahiers de Biologie Marine*, **4**, 61-64.
- 16) Bergh, Ø., K. Y. Borsheim, G. Bratbak, and M. Heldal (1989): High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467-468.
- 17) Heldal, M. and G. Bratbak (1991): Production and decay of viruses in aquatic environments. *Mar. Eco. Prog. Ser.*, **72**, 205-212.
- 18) Weinbauer, M. G., D. Fuks, S. Puskaric, and P. Peduzzi (1995): Diel, seasonal, and depth-related variability of viruses and dissolved DNA in the Northern Adriatic Sea. *Microb. Ecol.*, **30**, 25-41.
- 19) Steward, G. F., D. C. Smith, and F. Azam. (1996): Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi Seas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **131**, 287-300.
- 20) Magnusson, S., C.-E. Hedström, and E. Lycke (1966): The virus inactivating capacity of sea water. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, **66**, 551-559.
- 21) Fujioka, R. S., P. C. Loh, and L. S. Lau (1980): Survival of

- human enteroviruses in the Hawaiian Ocean environment : evidence for virus-inactivating microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., **6**, 1105-1110.
- 22) Toranzo, A. E., J. L. Barja, and F. M. Hetrick (1982): Antiviral activity of antibiotic-producing marine bacteria. Can. J. Microbiol., **28**, 231-238.
- 23) Toranzo, A. E., J. L. Barja, M. L. Lemos, and F. M. Hetrick. (1983): Stability of infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in untreated, filtered and autoclaved estuarine water. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol., **3**, 51-53.
- 24) Direkbusarakom, S., M. Yoshimizu, Y. Ezura, L. Ruangpan, and Y. Danayadol (1998): *Vibrio* sp., the dominant flora in shrimp hatchery against some fish pathogenic viruses. J. Mar. Biotechnol., **6**, 266-267.
- 25) Suttle, C. A. and F. Chen (1992): Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 3721-3729.
- 26) Bockemuhl, J., R. Pan-Urai, and F. Burkhardt (1971): *Edwardsiella tarda* associated with human disease. Pathog. Microbiol., **37**, 393-401.
- 27) 安永統男・小川七朗・畑井喜司雄 (1982): 数種の海産養殖魚から分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について. 長崎県水産試験場研究報告, **8**, 157-165.
- 28) 水野芳嗣 (2009): 最近のマダイのエドワジエラ症. 養殖, **2009**(1), 40-43.
- 29) 伊藤敬・仲居裕・稲野俊直・田口智也・前田昌調 (2006): アユ冷水病菌の増殖を抑制する拮抗細菌の分離. 海の研究, **15**(5), 417-423.
- 30) Endo, M., C. Arunlertaree, L. Ruangpan, A. Ponponrnpisit, T. Yoshida, and T. Iida (1997): A new method for collecting neutrophils using swim bladder. Fisheries science, **63**(4), 644-645.
- 31) 和合治久 (2003): 微生物による魚の免疫賦活飼料開発. 養殖, **2003**(6), 20-23.
- 32) A. Irianto, and B. Austin (2002): Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, **25**(6), 333-342.
- 33) ZoBell, C. E. (1943): The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol., **46**, 39-56.
- 34) Garcia-Martines, J., S.G., Anton, A. I., and F. Rodrigues-Valera (1999): Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. J Microbiol Methods **36**, 55-64
- 35) Casida Jr, L. E. (1992): Competitive Ability and Survival in Soil of *Pseudomonas* Strain 679-2, a Dominant, Nonobligate Bacterial Predator of Bacteria. Appl Environ Microbiol. **58**(1): 32-37.
- 36) Dopazo, C. P., M. L. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. L. Barja, and A. E. Toranzo (1988): Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. J. Appl. Bacteriol., **65**, 97-101.
- 37) 野口浩介・前田昌調 (2006): ウナギ病原菌の増殖を抑制する拮抗細菌. La Mer, **44**, 157-160.
- 38) 皆川武夫, 中井敏博, 室賀清邦 (1983): 養殖環境中における *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, **17**, 243-250.
- 39) Wakabayashi, H. and S. Egusa (1973): *Edwardsiella tarda* (*Paracolobacterium anguillimortiferum*) associated with pound-cultured eel disease. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **39**, 931-936.
- 40) 宮崎照雄・江草周三 (1976a): ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究 - I. 自然感染 - 化膿性造血組織炎型. 魚病研究, **11**, 33-43.
- 41) 宮崎照雄・江草周三 (1976b): ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究 - II. 自然感染 - 化膿性肝炎型. 魚病研究, **11**, 67-75.
- 42) 宮崎照雄・江草周三 (1976c): ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究 - III. 自然感染 - 稚ウナギ. 魚病研究, **11**, 127-131.
- 43) Aoki, T. and T. Kitao (1981): Drug resistance and transferable R plasmids in *Edwardsiella tarda* from fish culture pounds. Fish pathol., **15**, 249-255.
- 44) Aoki, T., A. kashi, and T. Sakaguchi (1986): Phylogenetic relationships of transferable R plasmids from *Edwardsiella tarda*. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **52**, 1173-1179.
- 45) Aoki, T., T. Sakaguchi, and T. Kitao (1987): Multiple drugresistant plasmids from *Edwardsiella tarda* in eel culture pounds. Nippon Suisan Gakkaishi, **53**, 1821-1825.
- 46) Aoki, T., T. Kitao, and M. Fukudome (1989): Chemotherapy agent infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. Fish Pathol., **24**, 161-168.
- 47) Song, Y. L. and G. H. Kou (1981): The immuno-responses of eel (*Anguilla japonica*) against *Edwardsiella anguillimortifera* as studied by the immersion method. Fish Pathol., **15**, 249-255.
- 48) Trongvanichnam, K., T. Iida, and H. Wakabayashi (1994): Use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to detect serum antibodies in eel vaccinated by immersion administration. The 3rd Asian fisheries Forum (ed. By L.M. Chou *et al*), Asian Fish Soc., pp. 328-331.
- 49) Salati, F., K. Kawai, and R. Kusuda (1983): Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathol., **18**, 135-141.
- 50) Salati, F., K. Kawai, and R. Kusuda (1984): Immunoresponse of eel to *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide. Fish Pathol., **19**, 187-192.
- 51) Lio-Po, G. and H. Wakabayashi (1986): Immuno-response in tilapia *Sarotherodon niloticus* vaccinated with *Edwardsiella tarda* by hyperosmotic infiltration method. Vet. Immunol. Immunopathol., **12**, 351-357.
- 52) Igarashi, A. and T. Iida (2002): A vaccination trial using live cells of *Edwardsiella tarda* in tilapia. Fish Pathol., **37**, 145-148.
- 53) Salati, F., M. Hamaguchi, and R. Kusuda (1987): Immunoresponse of red sea bream to *Edwardsiella tarda* antigens. Fish Pathol., **22**, 93-98.

- 54) 前田昌調 (2005): 水圏の環境微生物学. 講談社. 204pp
- 55) 小野信一, 若林耕治, 永井彰 (2007): 養殖ウナギのウイルス性血管内皮壊死症の原因ウイルスの分離. 魚病研究, **42**, 191-200.
- 56) Meyer, F. P. and G. L. Bullock (1973): *Edwardsiella tarda*, a new pathogen of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Appl. Microbiol., **25**, 155-156.
- 57) 窪田三朗, 界外 昇, 宮崎照雄, 宮下敏夫 (1982): テラピアのエドワジエラ症の病理組織学的研究-I 自然感染例. 三重水研報, **9**, 155-165.
- 58) Amandi, A., S. F. Hiu, J. S. Rohovec, and J. L. Fryer (1982): Isolation and characterization of *Edwardsiella tarda* from Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Appl. Environ. Microbiol., **43**, 1380-1384.
- 59) 朴 守一, 若林久嗣, 渡辺佳一郎 (1983): 養鰻池に分布する *Edwardsiella tarda* の血清型と病原性. 魚病研究, **18**, 84-89.
- 60) Sae-Qui, D., K. Muroga, and T. Nakai (1984): A case of *Edwardsiella tarda* infection in cultured colored carp *Cyprinus carpio*. Fish Pathol., **19**, 197-199.
- 61) 森井秀昭, 大場崇徳, 孟 飛, 金井欣也 (2007): 魚病原細菌 *Edwardsiella tarda* の薬剤耐性とその伝達性. 長崎大学水産学部研究報告, **88**, 109-118.
- 62) Walsh, P. S., D. A. Metzger, and R. Higuchi (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BioTechniques, **10**, 506-513
- 63) Murphy, J and J. P. Riley (1962): A modified single solution method for phosphate in natural waters. Anal. Chim. Acta, **12**, 162-176.
- 64) Searle P. L. (1984): The berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen A review. Analyst, **109**, 549-568.
- 65) 反町稔・江草周三 (1971): 養殖ウナギの腸内好気性細菌について. 魚病研究, **6**(1), 1-7.
- 66) 渡辺佳一郎・古橋宏基 (1981): ウナギのパラコロ病に関する研究-ハウス式養鰻池の病原菌の消長. 昭和55年度静岡県水産試験場事業報告, 247-249.
- 67) 石原秀平・楠田理一 (1982): 種々の環境水中における *Edwardsiella tarda* の発育性および生存性. 日水誌, **48** (4), 483-488.
- 68) 松岡 学・中井敏博 (2004): ヒラメ養殖場における *Edwardsiella tarda* およびそのバクテリオファージの動態. 魚病研究, **39**, 145-152.
- 69) 三重県内水面水産試験場 (1978): ウナギに対するアンモニアの慢性毒性について. 水産増養殖用資源の有効利用技術開発研究報告書, 55-62.
- 70) Maeda, M. (1988): Microorganisms and protozoa as feed in mariculture. Prog. Oceanog., **21**, 201-206.
- 71) Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965): Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. Science, **147**, 747-748.
- 72) Parker, R. B. (1974): Probiotics. The other half of the antibiotics story. Anim. Nutr. Health, **29**, 4-8.
- 73) Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol., **66**, 365-378.
- 74) Nurmi, E. and M. Rantala (1973): New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. Nature (London), **241**, 210-211.
- 75) Tanasomwang, V., T. Nakai, Y. Nishimura, and K. Muroga (1998): *Vibrio*-inhibiting marine bacteria isolated from black tiger shrimp hatchery. Fish Pathol., **33**, 459-466.
- 76) Jayanth, K., G. Jeyasekaran, and R. J. Shakila (2001): Biocontrol of fish bacterial pathogens by the antagonistic bacteria isolated from the coastal waters of Gulf of Mannar, India. Bull. European Assoc. Fish Pathol., **21**(1), 12-18.
- 77) Ruiz, C. M., G. Román, and J. L. Sánchez. (1996): A marine bacterial strain effective in producing antagonisms of other bacteria. Aquaculture Internat., **4**, 289-291.
- 78) Rico-Mora, R., D. Voltolina, and J. A. Villaescusa-Celaya (1998): Biological control of *Vibrio alginolyticus* in *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) cultures. Aquaculture Eng., **19**, 1-6.
- 79) Moriarty, D. J. W. (1998): Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. Aquaculture, **164**, 351-358.
- 80) Jöborn, A., J. C. Olsson, A. Westerdahl, P. L. Conway, and S. Kjellberg (1997): Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal extracts by *Carnobacterium* sp. Strain K1. J. Fish. Dis., **20**, 383-392.
- 81) Smith, P. and S. Davey (1993): Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad. J. Fish. Dis., **16**, 521-524.
- 82) Gatesoupe, F. J. (1997): Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. Aquat. Living Resour., **10**, 239-246.
- 83) Nakamura, A., K. G. Takahashi, and K. Mori (1999): *Vibriostatic* bacteria isolated from rearing seawater of oyster brood stock: Potentiality as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. Fish. Pathol., **34**, 139-144.
- 84) Riquelme, C., G. Hayashida, R. Araya, A. Uchida, M. Satomi, and Y. Ishida (1996): Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. J. Shellfish Res., **15**, 369-374.
- 85) Brown, M. E. (1974): Seed and root bacterization. Ann. Rev. Phytopath., **12**, 181-197.
- 86) Austin, B., L. F. Stuckey, P. A. W. Rohertson, I. Effendi, and D. R. W. Griffith (1995): A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. J. Fish. Dis., **18**, 93-96.
- 87) Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, and T.

- F. Nielsen (1999): Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, 969-973.
- 88) Gibson, L. F., J. Woodworth, and A. M. George (1998): Probiotic activity of *Aeromonas media* on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. *Aquaculture*, **169**, 111-120.
- 89) Gatesoupe, F.-J., T. Arakawa, and T. Watanabe (1989): The effect of bacterial additives on the production rate and dietary value of rotifers as food for Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **83**, 39-44.
- 90) Gatesoupe, F.-J. (1991): *Bacillus* sp. spores as food additive for the rotifer *Brachionus plicatilis*: improvement of their bacterial environment and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. In *Fish Nutrition in Practice*, Kaushik, S. J. and P. Luquet (eds.), Institut National de la Recherche Agronomique, Les Colloques, Paris, Vol. **61**, p.561-568.
- 91) Maeda, M. and I. C. Liao (1992): Effect of bacterial population on the growth of a prawn larva, *Penaeus monodon*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, No. **21**, 25-29.
- 92) Maeda, M., K. Nogami, and N. Ishibashi (1992): Utility of microbial food assemblages for culturing a crab, *Portunus trituberculatus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, No. **21**, 31-38.
- 93) Nogami, K. and M. Maeda (1992): Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**, 2373-2376.
- 94) Maeda, M. and I. C. Liao (1994): Microbial processes in aquaculture environment and their importance of increasing crustacean production. *Japan Agr. Res. Quart.*, **28**(4), 283-288.
- 95) Maeda, M., K. Nogami, M. Kanematsu, and K. Hirayama, (1997): The concept of biological control methods in aquaculture. *Hydrobiol.*, **358**, 285-290.
- 96) Nogami, K., K. Hamasaki, M. Maeda, and K. Hirayama (1997): Biocontrol method in aquaculture for rearing the swimming crab larvae *Portunus trituberculatus*. *Hydrobiol.*, **358**, 291-295.
- 97) Okami, Y. (1986): Marine microorganisms as a source of bioactive agents. *Microb. Ecol.*, **12**, 65-78.
- 98) Lemos, M. L., A. E. Toranzo, and J. L. Barja (1985): Antibiotic activity of epiphytic bacteria isolated from intertidal seaweeds. *Microbial. Ecol.*, **11**, 149-163.
- 99) Burgess, J. G., E. M. Jordan, M. Bregu, A. Meanrns-Spragg, and K. G. Boyd (1999): Microbial antagonism: a neglected avenue of natural products research. *J. Biotechnol.*, **70**, 27-32.
- 100) Park, S. C. and T. Nakai (2003): Bacteriophage control of *Pseudomonas plecoglossicida* infection in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.* **53**, 33-39.