

ニホンウナギ仔魚の魚病原菌Aureispira sp. 防除法の検討

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-09-28 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 里見, 正隆, 梶浦, 義浩, 荒川, 友子 メールアドレス: 所属: 水産研究・教育機構
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/86

ニホンウナギ仔魚の魚病菌 *Aureispira* sp.の防除法の検討

里見正隆（水産機構技術研）

梶浦義浩（シナネンゼオミック）

荒川友子（LaLa product）

【ウナギ仔魚の魚病菌】

ニホンウナギの養殖において、魚病菌疾病対策は重要で、これまでに様々な魚病菌が分離され、その防除法について研究されてきた¹⁾。主なものとして、*Aeromonas hydrophila*（ウナギ頭部潰瘍症）、*A. salmonicida*（せっそう病）、*Cytophaga* sp.（滑走細菌性鰓病）、*Edwardsiella tarda*（パラコロ病）、*Flavobacterium columnare*（カラムナリス症）、*Pseudomonas anguilliseptica*（赤点病）、*Vibrio anguillarum*（ビブリオ病）などがあげられる。このようにシラスウナギ以降の飼育で問題となるような病原菌については豊富な知見があるものの、ウナギ仔魚の魚病菌については、飼育事例が少ないこと、特に大規模飼育の事例が少ないため、その知見は十分とはいえない。近年、ウナギ仔魚の飼育において、細菌による感染症により大量へい死が発生し、その原因菌として *Aureispira* sp.が分離された（湯浅ら投稿中）。その後、筆者の所属する水産技術研究所南伊豆庁舎でも *Aureispira* sp.が原因と考えられる細菌性疾病による大量へい死が発生した。本稿では、大量へい死を引き起こした原因菌の分離とその微生物学的性状および防除法について検討したので紹介する。

【*Aureispira* sp.によるウナギ仔魚大量へい死】

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) 仔魚飼育(82日齢)において水産技術研究所南伊豆庁舎にて細菌性とみられる疾病が発生し、仔魚が大量へい死した(図1左)。症状としては、頭部が黄色から茶色に変色し、その後、速やかに死亡した。症状の進行は急速で、朝8時の巡回で頭部が黄色に変色した死亡個体が数百尾(水槽中の仔魚10~20%程度)確認されたのち、正午ごろには水槽全体に広がり、約半数がへい死した。異常個体が見られてから直ちに抗生物質による薬浴を行ったため、水槽全滅は免れた。なお、前日夕方の巡回では目立ったへい死などは確認されていない。顕微鏡にて死亡および衰弱個体を観察したところ、変色部には糸状またはらせん状の細菌が菌塊を形成していた(図1右)。衰弱個体の変色部分かららせん状菌を分離し、DNAを抽出し、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を調べたところ、湯浅らが分離した *Aureispira* sp. 南勢株と同一の配列を有していた。また、分離菌を止水・無

給餌条件で健常な 50~80 日齢のウナギ仔魚に接種したところ、本菌の感染が認められ、接種後 2 日以内に半数以上の個体が死亡した。上記感染試験で死亡した個体からも本菌が再分離されたことから、南伊豆庁舎で起きた大量へい死は *Aureispira* sp. 南勢株による感染症であることが明らかとなった。

【*Aureispira* sp. 分離株の性状】

Aureispira 属は 2006 年に Hosoya *et al.*²⁾ により提唱された Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes (CFB) グループの Saprospiraceae 科に属する、グラム陰性の長いフィラメント状のらせん菌群である。絶対好気性で、発育に海水を要求し、滑走性を示し、菌体脂肪酸としてアラキドン酸を有しているのが特徴である。現在、本属は *A. marina* と *A. maritima*³⁾ の 2 種類で構成され、両菌種とも温暖な海域の海洋生物などから分離されている。2007 年に発表された *A. maritima* は大腸菌やビブリオに対して貪食性を示す⁴⁾。本属細菌の魚病性については報告されていない。

既知の *Aureispira* 属細菌は海洋細菌用の培地であるマリンアガー平板培地などでコロニーを形成するが、南伊豆庁舎で分離された菌株は通常の寒天平板培地や栄養分を制限した各種平板培地でコロニーを形成することができなかった。また、マリンプロスや海水添加 LB などの液体培地でも増殖しなかった。そこで、培地・培養条件を検討し、ウナギ仔魚死亡個体を海水に懸濁し、オートクレーブ滅菌したものを培地（以下、仔魚培地とする）とすることで良好に増殖することを見出した。本培地を用いて限界希釈法にて感染魚かららせん菌を純粹分離した（図 2）。分離菌株の培養性状を調べた結果、分離株は増殖に海水を要求する好気性の海洋性細菌で、ナリジクス酸やオキシリン酸に耐性を示した。また、25℃における増殖曲線を描いたところ、仔魚培地に接種した場合、接種後 30 時間で定常期に達した（図 3）。そのため、本菌が水槽内に侵入し、仔魚に感染した場合は急激に増殖し、水槽全体に伝播すると考えられた。

【*Aureispira* sp. 分離株の銀イオン感受性】

ウナギ仔魚飼育において使用が正式に許可されている抗生物質などの薬剤はなく、疾病対策にはウナギ仔魚の発育に適正な飼育環境を維持することが重要である。過去の研究例⁵⁾では、飼育水槽中に硝酸銀を添加することで、銀イオンの抗菌性により水槽中の微生物数が減少し、その結果ウナギ仔魚の飼育環境が改善されたとの報告がある。各研究機関においては感染症防除策の一環として硝酸銀の添加が行われているが、魚病菌に対する直接的な効果はまだわかっていない。筆者らは前述した *Aureispira* sp. の増殖を抑制する薬剤、培養環境を検討する中で、銀イオンの添加が分離菌株に対して低

図 2

図 3

図 4

濃度でも増殖抑制効果があることを見出した。図 4 は分離菌株と比較対象の *Vibrio* sp. (ウナギ仔魚飼育水槽由来) をウナギ仔魚培地に接種し、濃度を変えて銀イオンを添加し、培養した時の両菌株の増殖を観察したものである。増殖した様子が良くわかるように増殖したウェルをオレンジ色に着色した。分離菌株は銀イオン濃度およそ 100ppb で増殖が阻害されるのに対し、*Vibrio* sp. は 500ppb まで増殖可能である。既報⁵⁾ では水槽内の硝酸銀濃度を 1ppm 程度にすることで微生物数の低減効果があるとされている。つまり、*Aureispira* sp. については現場で使用されている銀イオン濃度よりもかなり低い濃度で効果があると考えられた。

さて、分離菌株は銀イオンにのみ感受性を示すのであろうか？銀イオンとともに手軽に入手でき、抗菌効果が高い金属に銅があげられる。そこで、銀イオンと銅イオンを分離菌株に投与し、それら金属の抗菌性を比較した(表 1)。銀イオン添加ではやはり 100ppb 程度で増殖が阻害されるのに対し、銅イオンについては 500ppb でも効果はみられなかった。銀は比較的人体に安全で、様々な抗菌グッズにも使われている⁶⁾。ウナギ仔魚の魚病菌である *Aureispira* sp. の増殖抑制という観点では、銀は銅に比べて抗菌活性が強く、さらに使用規制がないことから、ウナギ仔魚の飼育環境への応用に適していると考えられた。しかしながら、銀イオンを *Aureispira* sp. の培地に加えたまま培養した場合は増殖抑制効果が見られたが、実際の現場では、銀イオン添加後、止水で飼育というわけにはいかない。さらに言えば、銀イオンといえども長期間ウナギ仔魚に曝露し続ければ成長生残に影響が及ぶことが予想される。そこで、銀イオンを含む海水に分離菌株を一定時間曝露し、その生残性を検討した。図 5 は分離菌株を 500ppb の銀イオンを含む海水に、曝露した場合の生菌数の変化を示している。銀イオン濃度 500ppb において、生菌数は曝露後速やかに減少し、15 分後には検出限界以下となった。さらに、銀イオンの有効最小濃度を調べるため、200 および 250ppb の銀イオンを含む海水に曝露し、経時的に生残性を観察した(表 2)。その結果、銀イオン濃度 200ppb の場合、60 分間の曝露でも生残していたのに対し、250ppb の曝露では 15 分以内に死滅(または増殖不能状態)となった。そのため、水槽内の銀イオン濃度を 250ppb 以上とし、15 分間以上銀イオン浴をすることで本菌の増殖を抑制できると推察された。

【*Aureispira* sp. 分離株の防除法の検討】

ウナギ仔魚の魚病菌として分離された *Aureispira* sp. は銀イオンに対して強い感受性を示すことは明らかであるが、銀イオンに曝された菌体は感染力も消失しているのであろうか？海洋細菌(特にビブリオの例が有名である)

表 1

図 5

表 2

の中には飢餓や紫外線照射などによるストレスに曝されると培養できないけど生きている状態（VBNC）の細胞となることが知られている⁷⁾。また、食中毒菌についての細菌の研究では、加熱や薬剤添加による殺菌処理で死滅しなかった菌体は損傷菌と呼ばれる（負傷しているため選択培地では発育しないが食中毒起因菌としての能力を保持している）状態で生き残り、食中毒の原因になっている可能性が高いとされている⁸⁾。そのため、分離された *Aureispira* sp.も銀イオン曝露により、一時的あるいは長期的に増殖能を失っているが、生きている状態で海水中を浮遊し、宿主であるウナギ仔魚に遭遇すると付着感染することも想定される。そこで、分離株を銀イオンに曝露し、ウナギ仔魚への感染性の有無について検討した。表3は感染実験の結果を示したものである。ビーカーにウナギ仔魚を収容し、細菌株培養液を接種後、60分間感染させた後、12穴マイクロプレートに1尾/wellとなるように仔魚を収容した。また、銀イオン処理区として、細菌株培養液添加後に終濃度1ppmとなるように硝酸銀溶液を添加し、60分間反応させた後、マイクロプレートに収容した（収容時10倍希釈：硝酸銀終濃度100ppb）。菌株未接種のものをコントロールとした。なお、菌株未接種で銀イオン添加のものを銀イオン添加の陰性対照とした。飼育は23°C暗所で6日間行い1、2、6日後の生残率を比較した。その結果、生菌を感染させた場合、感染後2日後に生残数は半減し、感染6日後には全滅した。一方、銀イオン曝露菌体を仔魚に接種した場合、菌体接種6日後でも生残率は80%を超え、明らかに生残性は改善された。硝酸銀のみを仔魚に添加した場合も対照と比較して生残率に差はなく、銀イオンによる中毒などは観察されなかった。日齢を変えて数回試験したが、結果に大差はなかった。したがって、銀イオンを *Aureispira* sp.分離株に曝露することで、本菌の感染性を抑制できることが明らかとなった。

表 3

【今後の課題】

銀イオンを使用することで、ウナギ仔魚の病原菌である *Aureispira* sp.の増殖または仔魚への魚病性を抑制できることが示唆されたが、飼育中の仔魚への投与方法について課題が残っている。研究目的では銀イオンの供給源として硝酸銀が使用されているが、硝酸銀は劇薬に指定されており、食用として供給されるべく飼育されているウナギ仔魚に使用することは好ましくない。そこで、硝酸銀に代わる銀イオン供給源を模索する必要がある。筆者の所属する南伊豆庁舎は、シナネンゼオミック社製の銀イオンビーズをカラムに詰め、飼育海水にて銀イオンを溶出させ、一定時間ウナギ仔魚飼育水槽に供給し、銀イオン浴を施している。実験室レベルではあるが、良好な飼育成

績を得ることができた。今後は大規模飼育施設への応用を検討する予定である。ウナギ仔魚飼育の現場では「硝酸銀の添加はおまじない」と言いつつも「添加するとなぜか調子が良い」と言われている。調子が良くなる本当の理由は他にあるのかもしれないが、魚病菌 *Aureispira* の抑制においては、硝酸銀の添加は意味のある“おまじない”であるようだ。

【文献】

- 1) 飯田貴次 (2006) b. 細菌性疾病、水産大百科事典 (独立行政法人水産総合研究センター編)、朝倉書店、東京、334-336 頁。
- 2) Hosoya, S., Arunpairojana, V., Suwannachart, C. et al. (2006) *Aureispira marina* gen. nov., sp. nov., a gliding, arachidonic acid-containing bacterium isolated from the southern coastline of Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56: 2931-2935.
- 3) Hosoya, S., Arunpairojana, V., Suwannachart, C. et al. (2007) *Aureispira maritima* sp. nov., isolated from marine barnacle debris. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 57: 1948-1951.
- 4) Furusawa, G., Hartzell, P., Navaratnam, V. (2015) Calcium is required for ixotrophy of *Aureispira* sp. CCB-QB1. *Microbiology*, 161:1933-1941.
- 5) 岡村明浩、山田祥朗、堀江則行ら (2009) ウナギ卵・仔魚の飼育における銀イオンの添加：毒性と抗菌作用、日本水産学会誌、75：786～792 頁。
- 6) 宮山貴光、荒井裕太、平野靖史郎 (2012) 生活環境における銀曝露とその健康影響、日衛誌、67：383～389 頁。
- 7) 澤辺智雄、美野さやか、澤辺桃子 (2020) 3 腸炎ビブリオ、食品製造・検査における芽胞・損傷菌とその検出・制御技術 (土戸哲明、古田雅一監修)、シーエムシー出版、東京、172～175 頁。
- 8) Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D. et al. (2011) German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *New England J. Med.*, 365:1763-1770.

表1 仔魚培地中の金属イオン濃度が分離株の増殖に与える影響

金属イオン	銀 (硝酸銀*)					銅		
	50	80	90	100	401**	100	500	1000
増殖	+	+	-	-	-	+	+	-

*硝酸銀の添加濃度 (有効銀イオン濃度は約60%)

**市販の銀イオンビーズから海水で銀イオンを溶出させた溶液の銀イオン濃度

表2 分離菌株の生残に及ぼす硝酸銀曝露の影響

硝酸銀濃度(ppb)	200					250			
曝露時間 (分)	5	15	30	45	60	5	15	30	60
増殖	+	+	+	d	d	+	-	-	-

d : 実験ロットで変わる

表3 *Aureispira* sp. 感染試験結果 (61日齢仔魚)

試験区	菌株添加	1日後	2日後	6日後
		生残率 (%)	生残率 (%)	生残率 (%)
菌体添加	分離株	92	50	0
銀イオン暴露菌体添加*	分離株	92	83	83
銀イオン (10ppb添加)	なし	100	92	92
対照	なし	96	88	83

* : 終濃度1ppmとなるように硝酸銀を添加し、60分間曝露した。その後10倍に海水で希釈し、飼育した。

【図の説明】

図 1. 感染症により死亡したウナギ仔魚（左）、頭部は黄色から茶色に変色している。死亡個体表面の顕微鏡像（右）、仔魚表面に糸状の細菌が増殖している。

図 2. 仔魚培地中の仔魚組織に付着して増殖する分離菌株菌、微小な固形物を核として菌塊を形成している。

図 3. 培地中に銀イオンを添加した時の分離菌に増殖.オレンジ色のウェルは増殖をしたことを示す。*Aureispira* 分離株はビブリオに比べて銀イオンに対する感受性が高いことがわかる

図 4 分離菌株の仔魚培地中での増殖. 仔魚培地に 1/100 量の前培養液を接種し、経時的に生菌数を MPN 法にて測定した。増殖の確認は顕微鏡観察にて行った。

図 5 分離菌株を 500ppb 銀イオンに曝露した時の生菌数の変化. 生菌数は MPN 法にて、増殖の確認は顕微鏡観察および PCR 法で行った。曝露後 15 分以内に検出限界以下まで生菌数は減少した。

【著者プロフィール】

里見正隆

国立研究開発法人水産研究・教育機構 水産技術研究所 シラスウナギ生産部
量産グループ 主任研究員

東京都生まれ。1996 年 東京水産大学大学院博士後期課程修了。博士（水産学）。1997 年から水産庁中央水産研究所（現 水産研究・教育機構）。2018 年から現職。主な研究テーマは水産発酵食品および水産養殖に関する微生物。趣味は水泳とクラシック音楽鑑賞

梶浦義浩

(株)シナネンゼオミック 営業部門 プロジェクト担当 シニアスペシャリスト

1961年愛知県生まれ。1985年 国立岐阜大学 工学部 工業化学科 卒業。
1985年 (株)シナネンゼオミック入社 研究開発、技術サポートなどに従事し、今に至る。主な業務は抗菌、吸着技術を用いた製品の開発及び市場開発。
趣味はゴルフ、映画鑑賞、読書。

荒川 友子

(株)LaLa Product 代表

愛知県生まれ。1990年三重大学水産学部卒業（病理学）。クリオン(株)で水質浄化及び観賞魚飼育材の事業設立に従事。2013年より現職（企業の開発支援）。名古屋大学工学研究科生命分子工学専攻 URA 兼務、主なテーマは魚介類の表皮プロバイオティクス。趣味は音楽鑑賞、落語鑑賞。