

農林水産業競争力アップ技術開発事業

「抗菌剤を使用しないアユ冷水病防除技術の開発

～早期実用化への試み～」

河合俊輔

目 的

アユは本県の養殖対象魚種の中で、マダイ、クロマグロに次ぐ生産量を誇る重要魚種である（584t；令和元年漁業・養殖業生産統計）。そのアユで冷水病は被害が多い代表的な疾病の一つとなっている。養殖業だけでなく主要河川でも毎年発生しており、河川漁協の遊漁料収入の減少に直結するため、冷水病はアユ養殖業と河川漁協の経営をひっ迫させる要因となっている。

現在、冷水病の治療薬として2種類の抗菌剤が承認されているが、しばしば再発することが確認されている。また、抗菌剤は適正に使用しないと薬剤耐性菌の出現を助長することが知られている。そのため、抗菌剤を使用しない防除対策技術の開発は急務である。

その技術として前年度まで使用してきた超音波処理ワクチンは、ワクチンに使用する冷水病不活化菌体及びコラゲナーゼ発現大腸菌を超音波処理により破碎することで、ワクチンがアユの体内へ浸入及び抗原認識されやすくすることを狙ったものであるが、効果の再現性が低く、ワクチン製造側の観点からしてもコスト削減や製造工程の簡便性が課題となっている。そのため今年度のワクチン試験は、超音波処理を施さないワクチンの有効性について検討した。なお、前年度は供試魚として人工産アユ（以下、人工産）を用いたが、今年度は人工産に加え海産アユ（以下、海産）についても試験を行った。

クエン酸ナトリウムを使用した防除試験については、前年度は1%又は5%添加飼料を27日間給与することで冷水病感染によるへい死を抑制する効果を確認したが、今年度は給与日数の短期化について検討した。

方 法

1. ワクチン試験

(1) 供試魚・試験区

供試魚は冷水病感染歴の無い人工産及び海産（平均体重2.1g）とした。試験区は超音波処理していないワクチンを使用した無処理区、超音波処理ワクチンを使用した処理区、及び対照区の3つとし、人工産及び海産で各2組（試験1、2及び試験3、4）を設定した。人工産は約190LのFRP水槽を、海産は約96Lの亚克力水槽を使用し、供試魚をそれぞれ34～44尾、17～25尾収容した。

(2) ワクチン

供試ワクチンは前年度と同様、冷水病細菌SG150804株及びPH0424株、並びに冷水病細菌の毒素である非活性型コラゲナーゼ菌体内発現大腸菌をいずれもホルマリンで不活化し、両者を混合したものとした（一般財団法人松岡科学研究所作成）。菌体とコラゲナーゼ発現大腸菌を不活化した後に10分間超音波で処理したものを超音波処理ワクチンとし、処理を施さなかったものを無処理ワクチンとした。

ワクチンの魚体への処理は、井戸水で10倍に希釈した総魚体重の4倍量のワクチン溶液に通気しながら30分間浸漬した。この処理を2週間間隔で2回行った。浸漬中の溶液の水温は20℃を超えないよう、ウォーターバス方式で浸漬水槽の外側に井戸水をかけ流した。

(3) 人為感染

人為感染で使用する冷水病細菌は PH0424 株とした。当株は 1/2CGY 液体培地 100ml で 15℃, 48 時間振とう培養した後、さらに 1L の 1/2CGY 液体培地に 1 回目の培養液を全量入れ、48 時間攪拌培養し、生菌数を $1.8 \times 10^4 \sim 3.3 \times 10^6$ CFU/ml に調整して使用した。感染は、2 回目のワクチン接種から 14 日後に、全ての供試魚に魚体重の 4 倍量の菌液で通気しながら 60 分間浸漬した。感染時の水温は 20℃を超えないようウォーターバス方式で感染水槽の外側に井戸水をかけ流した。感染後は水温が 20℃を超えないよう注水量を調整したかけ流し水槽に收容し、各区のへい死数を記録しながら 3 週間無給餌で飼育した。へい死魚は症状を確認した後、鰓組織の抽出液又は患部からの菌分離により得られたコロニーを PCR で冷水病菌かどうかを判定した。終了後の累積へい死率から有効率（ $1 - (\text{ワクチン接種群のへい死率} / \text{ワクチン非接種群のへい死率}) (\%)$) を算出した。

2. クエン酸ナトリウム試験

供試魚は平均体重 8.7g の人工産とし、5 基の 720L 水槽に 103~115 尾收容した。試験飼料はクエン酸ナトリウム 1%, 5% 添加飼料及び無添加飼料を前年度と同じ方法¹⁾で作成した。試験区は 1% 添加飼料の 10 日給与区、30 日給与区、5% 添加飼料の 10 日給与区及び無添加飼料を給与する無添加区 1 を設定し、1 日 3 回、給餌率 4% で給与した。所定日数給与後、1% 区、5% 区及び無添加区 1 の供試魚に、 3.9×10^5 CFU/ml に調整された冷水病細菌を 1 個体あたり 0.1ml 注射器で腹腔内に接種した。感染方法を浸漬ではなく注射とした理由は、魚体重 8g 程度の個体の場合、浸漬感染でへい死しにくいためである。また、腹腔内注射による魚体への影響を確認するため、1/2CGY 培地を 1 個体あたり 0.1ml 腹腔内に接種した無添加区 2 を設けた。感染後の飼育方法、へい死魚の感染確認方法及び効果検証方法はワクチン試験と同様とした。

結果及び考察

1. ワクチン試験

感染後のへい死魚は、口周辺又は体表に発赤の症状を呈し、PCR 検査により陽性が確認されたため、冷水病によるへい死であることが確認された。感染後の累積へい死率の推移を図 1 に、ワクチン試験結果を表 1 に示した。人工産では感染後 1 日でへい死が確認され、試験 1 では、累積へい死率が対照区で 97% だったのに対し、無処理区で 93%、処理区で 79% となり、有効率はそれぞれ 18%、4% と処理区が無処理区を上回った。試験 2 では累積へい死率が対照区で 86% だったのに対し、無処理区で 34%、処理区で 67% となり、有効率は 22%、60% と無処理区が処理区を大きく上回った。また、海産の試験 3 と 4 では、全ての試験区でへい死率が 50% 以下と人工産より低くなった。試験 3 では処理区、無処理区の有効率は 76%、48%、試験 4 では 51%、46% となり、いずれも処理区が無処理区を上回った。

今回の試験で、処理区が無処理区の有効率を上回り超音波処理ワクチンの有効性が高かったのは海産のみで、人工産では超音波処理ワクチンの有効性が低かったことから、超音波処理によるワクチンの有効性向上効果は限定的であることが示唆された。また海産は人工産に比べて有効率が高かったため、供試ワクチンは海産に対して有効性が高いものと考えられた。

2. クエン酸ナトリウム試験

へい死魚は注射患部に発赤の症状を呈し、PCR 検査で陽性と判定されたため、冷水病によるへい死であることが確認された。累積へい死率の推移を図 2 に示した。無添加区、1% 添加 10 日区及び 1% 添加 30 日区はいずれも感染後 2 日以内にへい死が確認されたが、5% 添加 10 日区は感染後 14 日で初めてへい死が確認された。また、1% 添加 10 日区は感染後 2 日で、1% 添加 30 日区は 10 日で無添加区の累積へい死率を上回り、21 日後までその傾向が続いた。21 日後の累積へい死率は 1% 添加 30 日区、1% 添加 10 日区、無添加区、5% 添加 10 日区の順に低くなり、それぞれ 24%、15%、11%、4% となった。有効率は 5% 添加 10 日区が最も高くなり 66% となったが、1% 添加 10 日区及び 30 日区は累積へい死率が無添加区を上回り、有効率はいずれも低い値を示した（-127%、-39%）。培地のみを注射した無添加区 2 は期間を通してへい死がなかったことから、試験区全体として注射による魚体へのダメージは無かったものと推察された。

前年度、1%添加飼料については、27日給与でへい死抑制効果が確認されたが、今回は10日給与区だけでなく30日給与区でも効果が確認されなかった。一方、5%添加飼料の給与期間について、前年度は27日で効果が確認されたが、今回は10日でも66%と高い有効率を示す効果が得られたため、5%添加飼料であれば給与期間の短期化は可能であることが示唆された。

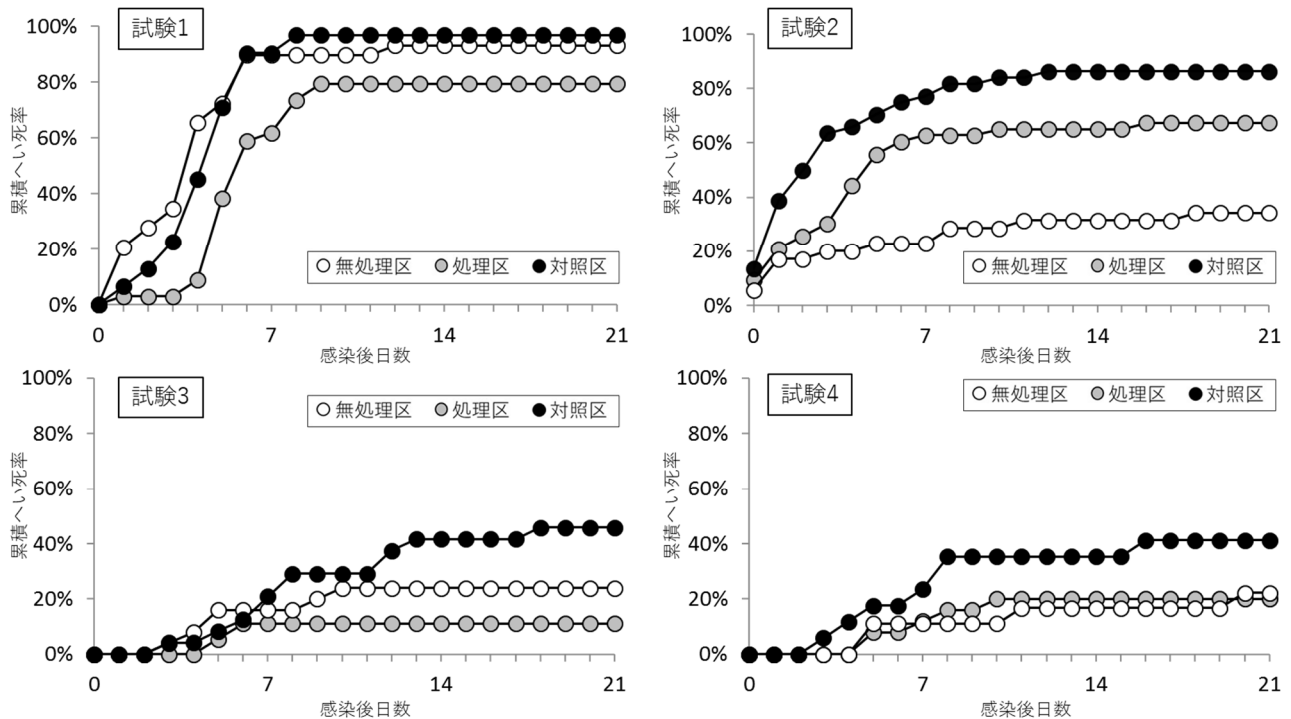


図1 ワクチン試験における累積へい死率の推移

表1 ワクチン試験結果

試験	供試魚	試験区名	攻撃濃度 (CFU/ml)	累積 へい死率	有効率
1	人工産	処理区	3.2×10^6	79.4%	17.9%
		無処理区		93.1%	3.8%
		対照区		96.8%	—
2	人工産	処理区	1.8×10^4	67.4%	21.9%
		無処理区		34.3%	60.3%
		対照区		86.4%	—
3	海産	処理区	3.3×10^6	11.1%	75.8%
		無処理区		24.0%	47.6%
		対照区		45.8%	—
4	海産	処理区	1.3×10^6	20.0%	51.4%
		無処理区		22.2%	46.0%
		対照区		41.2%	—

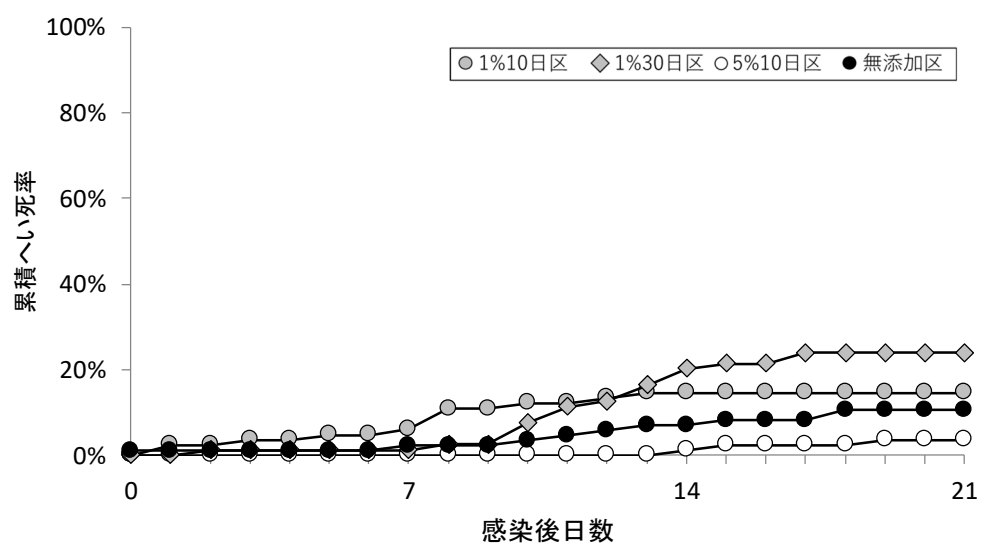


図2 クエン酸ナトリウム試験における累積へい死率の推移

文 献

- 1) 河合俊輔（2025）農林水産業競争力アップ技術開発事業「抗菌剤を使用しないアユ冷水病防除技術の開発～早期実用化への試み～」。令和元年度和歌山県水産試験場事業報告，66-69。