

# 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（令和2年630t；令和2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。

その技術としてワクチンについては、前年度にワクチンの超音波処理における妥当性について検討したところ、その効果は限定的であることが分かった。現状のワクチン製造コストは依然高く、さらなるコスト削減を目指す必要があるため、今年度は希釀したワクチンの効果について検討した。また、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、1%添加飼料の10日及び30日給与における効果は確認されず、5%添加飼料の10日給与で効果を確認した。しかし、養殖現場において飼料重量の5%のクエン酸ナトリウムを添加するためには、溶解させる水が多くなり、飼料の乾燥に時間を要するデメリットが浮上する。そのため現状、効果が限定的である1%添加飼料の高い死抑制効果を向上させるため、クエン酸との共存下で食中毒細菌への増殖阻害作用を増強する効果が報告されているコール酸（胆汁酸）<sup>1)</sup><sup>2)</sup>の添加による効果向上を検討した。

#### 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アユ（平均体重3.0g）とし、約190LのFRP水槽に供試魚を13～44尾収容した。超音波処理無しの1,000倍に希釀したワクチンを接種したワクチン区及びワクチンを接種しない対照区を1試験として設定し、計6回実施した。

###### (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、それら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）。前年度に超音波処理の効果向上を検討したが、効果が限定的であったため、今回は無処理とした。

ワクチンの魚体への処理は、井戸水で1,000倍に希釀した総魚体重の4倍量のワクチン溶液に通気しながら120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SG150804株とした。これらの株は1/2CGY液体培地100mlで5℃、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  $2.3 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^6$  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、全ての供試魚を、魚体重の4倍量の菌液へ、通気しながら60分間浸漬した。感染時の水温は20°Cを超えないようウォーターパ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°Cを超えないよう注水量を調整したかけ流し式のFRP水槽（約190L）に収容し、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-（ワクチン接種群のへい死率/ワクチン非接種群のへい死率）%）を算出した。

## 2. 胆汁酸を添加したクエン酸ナトリウム試験

供試魚は平均体重2.1gの人工種苗とし、4基の720L水槽に50尾ずつ収容した。試験飼料はクエン酸ナトリウム1%添加飼料（以下Ci飼料）、Ci飼料に胆汁酸を添加した飼料（以下CiU飼料）及び無添加飼料とし、Ci飼料と無添加飼料は前年度と同じ方法<sup>3)</sup>で作成した。CiU飼料はCi飼料に胆汁酸の一種を含む水産用ウルソデオキシコール酸5%「KS」（共立製薬株式会社）を1日量として魚体重1kgあたり20mgとなるよう添加し、その後の乾燥・油の展着はCi飼料と同じ方法とした。試験区はCi飼料、CiU飼料、無添加飼料を給与する区をそれぞれ、Ci区、CiU区、対照区とし、1日3回、給餌率4%で、10日間給与した（間に2日の無給与日を設定）。最終給与日から5日後に各区の供試魚の半数を人為感染させ、残りの供試魚を最終給与日から17日後に人為感染させた。人為感染方法は浸漬とし、浸漬方法、感染後の飼育方法、へい死魚からの冷水病判定方法、試験の評価方法は、ワクチン試験と同じ方法とした。それに加え、へい死魚のうち重篤症状の穴あき症状を呈する個体の数を集計し、各試験区のへい死魚に占める穴あき症状魚の比率を算出した。

## 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。ワクチン試験結果を表1に示した。試験3と5で有効率が高く、それぞれ74%、68%となった。PH0424株を感染させた試験1、2及び3は44%以上の有効率を示したが、SG150804株を感染させた試験4は、ワクチン区のへい死率が対照区を上回ったため有効率が-14%と最も低い値となり、試験6も7%と低い値を示した。

有効率60%以上で効果ありとするビブリオ病ワクチン試験<sup>4)</sup>の合格基準を適用すると、今回の6回の試験中有効性が確認されたのは試験3と5の2回であり、希釈ワクチンの効果は限定的であると考えられる。しかし、前年度まで使用した10倍希釈ワクチンの高くない再現性を考慮し、1,000倍希釈でもへい死を抑制する効果が確認されたこと、及びワクチンの製品化実現可能性の観点からみた1,000倍希釈の妥当性、これらを鑑みると、ワクチン接種条件を見直す等の検討を継続することで、ワクチンの効果が向上する可能性があるものと考えられる。また、感染株をSG150804株とした場合よりもPH0424株とした場合の方がおおむね有効率が高かった。両株はワクチン製造株であるため、両株の比率の検討、他株の調合など製造工程を見直すことでワクチンの効果が向上する可能性があると考えられた。

### 2. 胆汁酸を添加した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1に示した。5日後感染試験について、感染後2日目にCi区でへい死が確認されたが、3日目には対照区が上回った。7日目の累積へい死数は多い順に対照区、Ci区、CiU区となり、累積へい死率はそれぞれ59%、33%、14%となった。21日後もその傾向は変わらず、累積へい死率は69%、39%、24%となり、有効率はCi区が43%、CiU区が65%となった。17日後感染試験区について、感染後3日でCiU区と対照区でへい死が確認されたが、その後対照区の累積へい死率が急増した。7日目の累積へい死率は多い順に対照区、Ci区、CiU区となり、それぞれ52%、30%、24%となった。21日後の累積へい死数も傾向は変

わらず、累積へい死率は 59%, 36%, 31%となり、有効率は Ci 区が 38%, CiU 区が 47%となった。各区のへい死魚に占める穴あき症状魚の比率を図 2 に示す。対照区が最も多く、へい死魚の 88%が穴あき症状を呈したのに対し、CiU 区が 11%と最も低い結果となった。Ci 区は 42%となった。

前年度、1%添加飼料の 10 日及び 30 日給与でへい死抑制効果は確認されなかったが、今回は 10 日給与でも一定の効果が確認された。前年度報告したとおりクエン酸ナトリウム 1%添加によるへい死抑制効果は限定的であることは否めないが、人為感染までの日数に関係なく CiU 区の有効率が Ci 区を上回ったことに加え、冷水病の重篤症状である穴あき症状のへい死率が CiU 区で最も低かったことから、胆汁酸添加によりクエン酸ナトリウム 1%添加のへい死抑制効果の不足分を補える可能性が示唆された。ただ、17 日後感染試験で有効率が低下（65%→47%）したため、養殖現場では感染が増える時期を予測し、あまり間をあけずに定期的に添加飼料を投与していくのが望ましいと考えられる。

表 1 ワクチン試験結果

試験 No.	試験区名	攻撃株・濃度 (cfu/ml)	累積 へい死率	有効率
1	ワクチン区 対照区	PH0424株・ $1.0 \times 10^6$	53% 96%	44% -
2	ワクチン区 対照区	PH0424株・ $1.6 \times 10^6$	33% 62%	46% -
3	ワクチン区 対照区	PH0424株・ $1.6 \times 10^6$	11% 40%	74% -
4	ワクチン区 対照区	SG150804株・ $2.3 \times 10^5$	61% 58%	-14% -
5	ワクチン区 対照区	SG150804株・ $2.3 \times 10^5$	10% 30%	68% -
6	ワクチン区 対照区	SG150804株・ $2.3 \times 10^5$	39% 42%	7% -

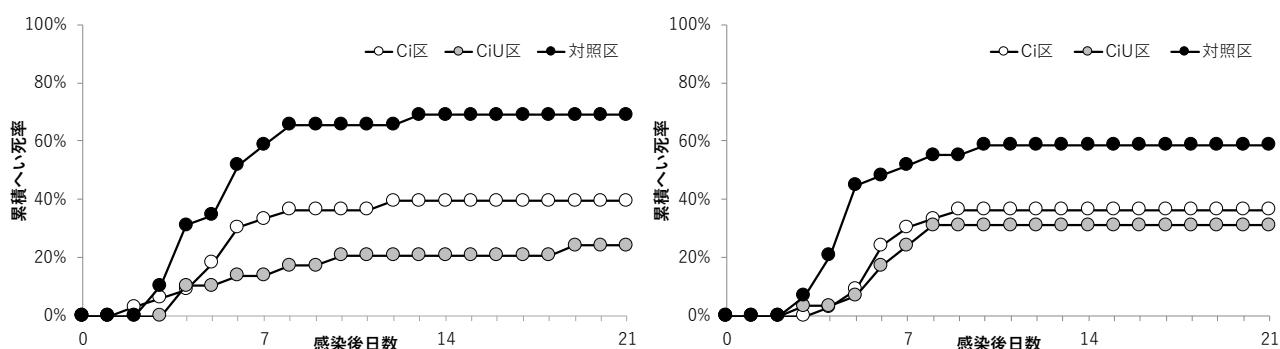


図 1 クエン酸ナトリウムの試験における累積へい死率の推移

(左) 5 日後感染試験 (右) 17 日後感染試験

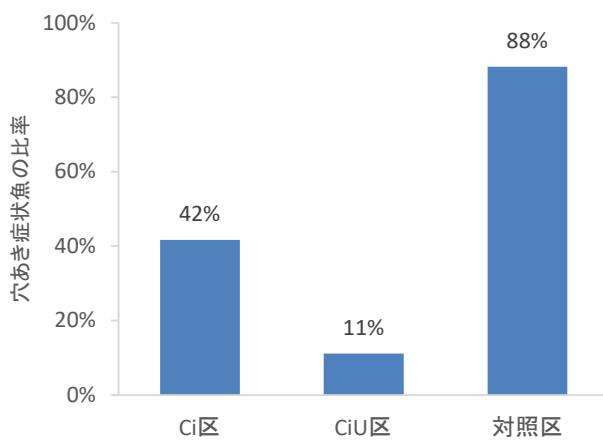


図2 クエン酸ナトリウム試験のへい死魚に占める穴あき症状魚の比率



図3 クエン酸ナトリウム試験におけるへい死魚の症状

(左) 対照区 (右) 胆汁酸添加クエン酸ナトリウム給与区

## 文 献

- 1) 能勢征子, 風戸実香, 坂井千三 (1986) : 腸炎ビブリオの酸損傷からの回復・増殖に及ぼすクエン酸と胆汁酸の影響. 食品衛生学雑誌 vol27, No. 5, 492-500
- 2) 能勢征子, 平田一郎, 新井輝義, 太田建爾, 坂井千三 (1986) : 食中毒起因細菌に及ぼすクエン酸のコール酸共存下における抗菌作用. 食品衛生学雑誌 vol29, No. 1, 38-46
- 3) 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2年度和歌山県水産試験場事業報告, 81-84.
- 4) 見奈美輝彦 (1983) アユのビブリオ病に対するワクチン効果. 昭和56年度和歌山県水産試験場事業報告, 45-50.