

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～」

内海遼一・松尾 怜・北村章博

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り（令和3年580t；令和3年漁業・養殖業生産統計）、全国有数の生産地となっている。そのアユ養殖業において被害が多い疾病の一つが真性細菌 *Flavobacterium psychrophilum* の感染によって引き起こされる冷水病である¹⁾。本疾病は養殖業だけでなく主要河川でも発生しており、養殖業、内水面漁業の両方で防除対策は必要である²⁾。

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、抗菌剤の反復使用は薬剤耐性菌の出現が懸念され、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。

本県では、これまでの研究で、不活化ワクチンと冷水病細菌が出す毒素（コラゲナーゼ）を利用したトキシイドワクチンの混合ワクチンによる防除試験と、クエン酸ナトリウム（以下、クエン酸という。）の経口投与による防除方法の開発に取り組んできたが、いずれも効果の安定性に課題があり、水槽実験を重ねる段階でとどまっております。現場普及には及んでいない。

そこで、本研究では混合ワクチン及びクエン酸の効果について昨年度に引き続いて試験を重ね、検証を行った。

方 法

1. ワクチン試験

(1) 供試魚

供試魚は山口県海産系人工産アユを用いた。

(2) ワクチン処置

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）。

ワクチンの処置は、ワクチンを添加した飼料を与える経口処置と、希釈したワクチン溶液に一定時間収容する浸漬処置により行った。経口処置については、配合飼料（フィード・ワン株式会社製、鮎アルファ・メガ2C）にワクチン原液を魚体重 1kg あたり 0.5ml となるよう添加しオイルで添着させたワクチン飼料を作成し、1日1回、魚体重の1%を与えた。試験区として、ワクチン飼料を10日間連続して与える連続投与区と、ワクチン飼料を5日間与えた後、2週間ワクチン無投与の後、再度5日間ワクチン飼料を投与する2回投与区を設定した。浸漬処置については、大型のポリ袋に井戸水で1,000倍に希釈した総魚体重の10倍量のワクチン溶液を入れ、その中に供試魚を収容し、通気しながら120分間浸漬した。この処理を2週間後にも行い、計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容器の外側に井戸水をかけ流した。それぞれの試験で同条件の飼育のもと、ワクチン処置のみ行わない対照区を用意した。今年度は経口処置の試験を3回（1試験区につき100尾（3回目は90尾））、浸漬処置の試験を2回実施した。

(3) 人為感染及び経過観察

人為感染で使用する冷水病細菌は PH0424 株を用いた。この株は 1/2CGY 液体培地 100ml で 15℃、約 2 日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 $1.4 \times 10^7 \sim 3.8 \times 10^8$ CFU/mL に調整して使用した。感染は、2 回目のワクチン処置から 14 日後または 15 日後に、全ての供試魚を、魚体重の 4 倍量の菌液に通気しながら 30 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。感染後は井戸水のかけ流し式で FRP 水槽（水量約 190L）に収容し、各試験区のへい死数を毎日記録しながら 3 週間無給餌で飼育した。各試験区とも 100 尾で実施した。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顕微鏡下で確認、あるいは PCR 検査で冷水病菌かどうかを判定した。

試験終了後、累積へい死率から有効率（ $1 - (\text{ワクチン供与区のへい死率} / \text{対照区のへい死率}) (\%)$ ）を算出した。また Fisher の直接確立計算法（片側検定、有意水準 5%）により有効性の検定を行った。

2. クエン酸試験

(1) 供試魚

供試魚は山口県海産系人工産アユ（試験区ごとの平均体重 8.7g 及び 7.8g）を用いた。

(2) クエン酸投与

クエン酸の投与試験は、クエン酸（くえん酸三ナトリウム二水和物（林純薬工業株式会社製造））のみ（以下、Ci 区という。）、及び昨年度試験を行ったクエン酸＋胆汁酸（水産用ウルソデオキシコール酸 5%「KS」（共立製薬株式会社製造））（以下、CiU 区という。）を添加した飼料を与えて行った。飼料はワクチン試験と同様の配合飼料を用い、クエン酸は餌重量の 1%を、クエン酸＋胆汁酸は餌重量の 1%のクエン酸と 1.33%の胆汁酸（魚体重 1 kg あたり 20 mg のウルソデオキシコール酸を添加）を配合飼料に添加した。1 日の給餌量は魚体重の 3%とし、10 日間供与した。飼料に添加物を加えない対照区も設定した。今年度は同様の試験を 2 回行った。

(3) 人為感染及び経過観察

冷水病の人為感染の方法はワクチン試験と同様に行った。各試験区で 200 尾を供し、最終投与日から 5 日後に半数の 100 尾を、15 日後に残り半数の 100 尾を人為感染させた。感染後は井戸水のかけ流し式で FRP 水槽（水量約 720L（対照区は約 1,000L））に収容し、ワクチン試験と同様の経過観察を行った。

結果及び考察

1. ワクチン試験

1) 経口処置

へい死魚は冷水病罹患魚にみられるような口周辺、体表並びに尾部周辺に発赤、穴あき等の症状を呈し、検鏡または 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と判断した。結果は表 1 に示す。3 回の試験では、試験終了時のへい死率は対照区が 47～89%であったのに対し、ワクチン連続投与区は 36～89%、2 回投与区は 21～76%であり、有効率は連続投与区が 1 回目の試験からそれぞれ 34.5、11.2 及び 33.3%、2 回投与区がそれぞれ 61.8、14.6 及び 33.3%となった。有効率はワクチン試験において有効であるとされる 60%となったのは 1 試験区のみで、また対照区とワクチン処置区では有意な差がみられた試験もあったが安定はしておらず、これまでの試験同様、対照区のへい死率も含め再現性が課題であると考えられる。

2) 浸漬処置

へい死魚は経口処置試験同様、冷水病によるへい死と判断した。結果は表 2 に示す。2 回の試験では、試験終了時へい死率は対照区が 98 及び 92%であったのに対し、ワクチン処置区は 81 及び 93%であり、有効率は

14.3 及び-1.1%であった。いずれの試験もへい死率が高く、ワクチンの有効性が示される結果は得られなかった。

表 1 ワクチン経口処置の結果

	供試魚 平均体重 (g)	ワクチン処置期間		人為 感染日	累積へい死率			ワクチン有効率 (RPS)		Fisherの直接確立法 (p 値)	
		連続投与区	2回投与区		対照区	連続投与区	2回投与区	連続投与区	2回投与区	連続投与区	2回投与区
1回目	6.5	5/6-5/15	4/22-26, 5/11-15	5/30	55%	36%	21%	34.5%	61.8%	0.005	0.000
2回目	4.6	6/26-7/5	6/12-16, 7/1-5	7/19	89%	79%	76%	11.2%	14.6%	0.014	0.004
3回目	9.3	9/7-9/16	8/24-28, 9/12-16	9/30	47%	31%	31%	33.3%	33.3%	0.023	0.023

表 2 ワクチン浸漬処置の結果

	供試魚 平均体重	ワクチン処置日		人為 感染日	終了時累積へい死率		ワクチン 有効率 (RPS)	Fisherの 直接確立 法 (p 値)
		1回目	2回目		対照区	ワクチン区		
1回目	5.7	4/22	5/6	5/21	98%	84%	14.3%	0.0004
2回目	8.6	6/1	6/15	6/29	92%	93%	-1.1%	—

2. クエン酸試験

へい死魚はワクチン試験と同様、冷水病によるへい死であると判断した。結果は表 3 に示す。それぞれの試験で対照区のへい死率は 60% 台と安定した値となったが、クエン酸のみ添加，あるいはクエン酸＋胆汁酸添加の違いも明瞭な差はみられず，10 日間投与後の人為感染までの経過日数においても同様であった。

表 3 クエン酸試験の結果

	供試魚 平均体重 (g)	投与期間	人為感染日		累積へい死率			有効率 (RPS)		Fisherの直接確立法 (p 値)	
					対照区	Ci区	CiG区	Ci区	CiG区	Ci区	CiG区
1回目	8.7	6/3－12	投与5日後	6/17	63%	43%	52%	31.7%	17.5%	0.004	0.076
			投与15日後	6/27	64%	54%	56%	13.9%	12.7%	0.043	0.156
2回目	7.8	7/8－17	投与5日後	7/22	60%	53%	56%	11.7%	6.7%	0.196	0.334
			投与15日後	8/1	60%	57%	72%	11.3%	-13.3%	0.388	0.072

文 献

- 1) 内海遼一・松尾 怜 (2025) 水産衛生対策 (内水面). 令和 4 年度和歌山県水産試験場事業報告, —
- 2) 農林水産省 (2008) アユ冷水対策協議会とりまとめ. 農林水産省ホームページ,
https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/ayu_reisui/attach/pdf/index-4.pdf