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対策の開発

～効果と普及性向上～」

堅田昌英

目　　的

現在の養殖業は集約化が進んでおり，養殖魚には多種多様な病気，とりわけ病害微生物による感染症が多発している[1)]。和歌山県のアユ養殖業は全国有数の生産量を誇っている[2)]が，*Flavobacterium psychrophilum* の感染によって引き起こされる冷水病は，アユ養殖において最も被害が大きい疾病である[3)]。また，本疾病は河川でも頻発しており[4)]，アユ冷水病対策が内水面漁業等において課題となっている[5)]。

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[6)]が，抗菌剤を反復して使用すると薬剤耐性菌の出現が懸念される[7)]ことから，抗菌剤を使用しない防除対策の開発が急務である。

そこで，本研究では，抗菌剤を使用しないアユ冷水病防除技術を開発することを目的に，経口ワクチン，浸漬ワクチン及びクエン酸ナトリウム投与による防除効果について検討を行った。

方　　法

1. 供試アユ

本研究には，和歌山県内水面漁業協同組合連合会から購入した山口県産海産系人工アユを用いた。供試したアユの体重は，2.8～13.9 g であった。

2. 供試ワクチン

供試ワクチンは，*F. psychrophilum* をホルマリンで不活化した菌体と，当菌が産生する毒素（コラゲナーゼ）を大腸菌に発現させて混合したものを用いた。なお，当該供試ワクチンは，本研究の共同研究機関である一般財団法人 松岡科学研究所で作製された。

3. 供試クエン酸ナトリウム

クエン酸ナトリウムは，くえん酸三ナトリウム二水和物（試薬一級　林純薬工業株式会社製）を用いた。

4. 供試菌株

本研究の攻撃試験では，*F. psychrophilum*PH0424 株を用いた。

5. 供試配合飼料

本研究では，配合飼料あゆアルファメガ 2C（フィード・ワン株式会社製）を用いた。なお，給餌量は魚体重の 3 %とした。

6. 経口ワクチン試験

経口ワクチン試験における配合飼料へのワクチン添加量及び投与期間は表 1 に示すとおりとし，30 尾の供試アユを 200 l 水槽（水量 100 l）へ収容して試験を行った。なお，対照区には経口ワクチンを添加していない配合飼料を投与した。

7. 浸漬ワクチン試験

浸漬ワクチン試験におけるワクチン希釈倍率，浸漬回数及び浸漬時間は表 2 に示すとおりとし，浸漬時以外は 30 尾の供試アユを 200 l 水槽（水量 100 l）へ収容して飼育した。ワクチンの希釈はアユの飼育水と同じ地下水で行い，魚体重の 10 倍量のワクチン希釈液により 18 l 入りバケツで通気しながらワクチン浸漬を行った。*F. psychrophilum* はアユ体表の傷口が主な侵入門戸となる[8]ため，ワクチン浸漬の前には，供試アユを水中から取り上げてトリカルネットの上で 30 秒間放置することで，魚体表面に微細な傷を付けた。なお，対照区はワクチンを添加していない地下水（魚体重の 10 倍量）で同様に浸漬を行った。

8. クエン酸ナトリウム投与試験

クエン酸ナトリウム投与試験における配合飼料へのクエン酸ナトリウム添加量及び投与期間は表 3 に示すとおりとし，30 尾の供試アユを 200 l 水槽（水量 100 l）へ収容して試験を行った。クエン酸ナトリウムの配合飼料への添加は，飼料重量の 10 %の蒸留水にクエン酸ナトリウムを溶解させ，バットに広げた配合飼料へ霧吹きによって噴霧することで行った。その後，4 ℃の冷蔵庫内で 1 晩乾燥させた上で投与した。なお，対照区にはクエン酸ナトリウムを添加していない配合飼料を投与した。

クエン酸ナトリウムを添加した直後の配合飼料を図 1 に示す。養殖業者からの聞き取りによる自動給餌器使用に支障を来さない配合飼料への加水量は，飼料重量の 1 %以下の水とされているが，飼料重量の 1 %以下の水では必要量のクエン酸ナトリウムを十分に溶かすことができないため，本事業では飼料重量の 10 %の蒸留水にクエン酸ナトリウムを溶解させた。加水量が多くなったが，このクエン酸ナトリウム溶液をバットに広げた配合飼料へ霧吹きによって噴霧することで，配合飼料が固まりにならず，満遍なく添加することができた。また，1 晩乾燥させることによって，自動給餌器にセットしても目詰まりを防ぐことが可能になり，使用に支障を来さないようにすることができた。



図 1　クエン酸ナトリウムを添加した直後の配合飼料

9. 攻撃試験

攻撃試験は，経口ワクチン試験，浸漬ワクチン試験及びクエン酸ナトリウム投与試験ともに，供試終了 2 週間後に，供試菌株を注射接種してアユに冷水病を人為的に発生させた 200 l 水槽（水量 100 l；以下，感染水槽）へそれぞれの供試アユを同居させることで行った。試験区と対照区の供試アユが区別できるように，感染水槽内に網かご（容量 20 l）を 2 つ設置し，それぞれの網かごへ試験区及び対照区の供試アユを 20 尾ずつ収容した。その後，3 週間にわたって死亡状況を追跡し，累積死亡率を算出した。なお，死亡したアユは速やかに取り上げて細菌分離検査を行い，死因が冷水病であることを確認した。

10. 検定及び有効率（RPS）の算出

試験区及び対照区の累積死亡率の統計学的検定は，Fisher の直接確率計算法（片側検定，有意水準 5 %）により行った。また，有効率（RPS）は次の数式により算出した。

（1－ワクチン区累積死亡率／対照区累積死亡率）×100

（1－クエン酸ナトリウム投与区累積死亡率／対照区累積死亡率）×100

結果及び考察

1. 経口ワクチン試験

経口ワクチン試験の結果を表 1 に示す。有効率（RPS）は 10.0～21.4 %であり，試験区と対照区との間で有意差は見られなかった。水産用ワクチンの中では，経口ワクチンはブリ属魚類のα溶血性レンサ球菌症において唯一承認されているが，魚体重 1 kg 当たり 1 日量としてワクチン 0.5 mL を飼料に混ぜて投与することとされている[6]。今回の経口ワクチンでは，魚体重 1 kg に対して 1 日当たり 0.5～1.5 mL の投与を行ったにも関わらず，ワクチン効果が見られなかったのは，ワクチン成分が魚体内へ十分に取り込まれなかったことが原因であると考えられる。

表 1　経口ワクチン試験結果

	ワクチン添加量（魚体重 1kg に対して）	投与期間	累積死亡率（%）		RPS（%）	有意差	*p* 値
			ワクチン区	対照区			
1 回目	0.5 mL／日	5 日間×2 回	44.0	56.0	21.4	$p>0.05$	0.0598
2 回目	0.5 mL／日	5 日間×4 回	52.0	60.0	13.3	$p>0.05$	0.1593
3 回目	1.0 mL／日	5 日間×2 回	45.0	55.0	18.2	$p>0.05$	0.1015
4 回目	1.0 mL／日	5 日間×4 回	55.0	65.0	15.4	$p>0.05$	0.0969
5 回目	1.5 mL／日	5 日間×2 回	50.0	60.0	16.7	$p>0.05$	0.1004
6 回目	1.5 mL／日	5 日間×4 回	45.0	50.0	10.0	$p>0.05$	0.2856

2. 浸漬ワクチン試験

浸漬ワクチン試験の結果を表 2 に示す。対照区との間で有意差が見られた試験もあったが，有効率（RPS）は 9.1～14.3 %であり，浸漬ワクチンによる効果を認めることはできなかった。ワクチン浸漬の前に魚体表面に付けた微細な傷口からはワクチン成分の取込は十分に行われなかったと考えられる。また，ワクチン希釈倍率を低くして，浸漬液中のワクチン含有量を多くしても浸漬ワクチンの効果が認められなかったことから，魚体表のみならず，鰓からのワクチン成分の取込も十分に行われていないと考えられる。

表 2　浸漬ワクチン試験結果

	ワクチン希釈倍率	浸漬回数	浸漬時間	累積死亡率（%）		RPS（%）	有意差	*p* 値
				ワクチン区	対照区			
1 回目	1,000 倍	2 回(隔週)	2 時間／回	72.0	84.0	14.3	$p<0.05$	0.0298
2 回目	1,000 倍	4 回(毎週)	2 時間／回	76.0	84.0	9.5	$p>0.05$	0.1078
3 回目	500 倍	2 回(隔週)	2 時間／回	70.0	80.0	12.5	$p>0.05$	0.0706
4 回目	500 倍	4 回(毎週)	2 時間／回	65.0	75.0	13.3	$p>0.05$	0.0823
5 回目	300 倍	2 回(隔週)	2 時間／回	60.0	70.0	14.3	$p>0.05$	0.0910
6 回目	300 倍	4 回(毎週)	2 時間／回	50.0	55.0	9.1	$p>0.05$	0.2856

3. クエン酸ナトリウム投与試験

クエン酸ナトリウム投与試験の結果を表 3 に示す。有効率（RPS）は 6.1～15.4 %であり，試験区と対照区との間で有意差は見られなかった。クエン酸ナトリウム投与の効果が認められなかったのは，添加量が少なかったことに加え，投与期間が短かったため，クエン酸ナトリウムの効果[8,9]が十分に発揮されなかったことが原因であると考えられる。

表 3　クエン酸ナトリウム投与試験結果

	クエン酸ナトリウム添加量	投与期間	累積死亡率（%）		RPS（%）	有意差	*p* 値
			クエン酸区	対照区			
1 回目	飼料重量の 1 %	5 日間×2 回	62.0	66.0	6.1	$p>0.05$	0.3293
2 回目	飼料重量の 1 %	5 日間×4 回	60.0	68.0	11.8	$p>0.05$	0.1512
3 回目	飼料重量の 2 %	5 日間×2 回	50.0	55.0	9.1	$p>0.05$	0.2856
4 回目	飼料重量の 2 %	5 日間×4 回	60.0	65.0	7.7	$p>0.05$	0.2796
5 回目	飼料重量の 3 %	5 日間×2 回	55.0	65.0	15.4	$p>0.05$	0.0969
6 回目	飼料重量の 3 %	5 日間×4 回	40.0	45.0	11.1	$p>0.05$	0.2837

4. 今後の取組

上記の結果に加え，一般財団法人 松岡科学研究所による第 19 回アユ冷水病研究会での「アユ冷水病研究会の成果のまとめ（2008 年度～2022 年度）」と題した報告によると，浸漬の冷水病ワクチンにおいては魚体内へのワクチン成分の取込が困難なことが明らかになってきたため，浸漬ワクチン試験は中止し，今後は経口ワクチン試験において投与濃度を更に高めることで魚体内への取込を促していく必要がある。また，クエン酸ナトリウム投与試験については，クエン酸を多く含む梅酢を投与したマダイにおいて，数ヶ月間程度投与してから攻撃試験を行った結果，抗病性が向上することが確認されている[9,10]ので，今後はアユでも数ヶ月間程度の長い期間の投与で試験を行っていくことが必要である。そして，有効性が認められる条件を突き止めた上で追試験を行い，再現性を検証していくことが重要である。

謝　辞

供試アユの飼育にご協力いただきました和歌山県水産試験場 内水面試験地の職員各位に感謝申し上げます。

文　献

1) 江草周三・若林久嗣・室賀清邦（2004）魚介類の感染症・寄生虫病，恒星社厚生閣，東京，5-7.
2) 農林水産省（2024）令和4年漁業・養殖業生産統計．2 内水面養殖業収穫量（全国・都道府県別）（1）魚種別収獲量.
3) 農林水産省（2024）主要魚種別魚病被害の推移．農林水産省ホームページ，https://www.maff.go.jp/j/syouan/suisan/suisan_yobo/disease/attach/pdf/gyobyou_higai_jyoukyou-12.pdf.
4) 熊谷　明（2016）細菌性冷水病．魚病研究，**51**，153-157.
5) 農林水産省（2008）アユ冷水病対策協議会取りまとめ．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.
6) 農林水産省（2024）水産用医薬品について　第37報.
7) 青木 宙（2013）魚介類の微生物感染症の治療と予防，恒星社厚生閣，東京，283-302.
8) Miwa, S. and C. Nakayasu (2005) Pathogenesis of experimentally induced bacterial cold water disease in ayu *Plecoglossus altivelis*. *Dis. Aquat. Org.*, **67**, 93-104.
9) 堅田昌英（2011）梅酢投与マダイの抗病性および血中バイオディフェンス機能．和歌山県農林水産総合技術センター水産試験場研究報告，**2**，20-23.
10) 堅田昌英（2016）梅酢の種類および添加濃度を変えた梅酢投与マダイの成長および抗病性．和歌山県農林水産試験研究機関研究報告，**4**，123-130.