

クロダイ仔魚の腹部膨満症における消化管内細菌数の変化

泉川晃一・植木範行・元谷 剛

Changes of Bacterial Numbers in the Enteron of
Black Seabream *Acanthopagrus schlegeli* Larvae with Intestinal Swelling

Koichi IZUMIKAWA, Noriyuki Ueki, and Tsuyoshi MOTODANI

キーワード：クロダイ，腹部膨満症，消化管内細菌数，PCR法

クロダイ *Acanthopagrus schlegeli* の種苗生産は、西日本を中心に各地の栽培漁業センターで行われている。しかし、その飼育過程でしばしば発生する疾病が、種苗生産事業を進めるうえで大きな障害となっている。クロダイ仔魚期の大量へい死の主な原因となっている疾病に腹部膨満症がよく知られており、原因菌として *Vibrio alginolyticus* などの複数の細菌の関与が疑われている¹⁾。

岡山県水産試験場栽培漁業センター（以下、栽培センター）においても、ここ数年、本症が連続して発生し、大きな被害を及ぼしている²⁻⁴⁾。そこで、本症が細菌感染症の一種と疑われることから、1995年4～5月に種苗生産中のクロダイ仔魚の消化管内及び餌の細菌数を測定し、本症発生時における消化管内の細菌数の推移について調査した。

また、ウイルス性疾病によるへい死も疑われたのでPCR法によりウイルス性神経壊死症（VNN）の検査も行った。

材料と方法

'95年に栽培センターで行われた3回の種苗生産を対象に、計10回のサンプリングを行い（表1）、クロダイ仔魚の消化管における細菌数を測定した。この3回の生産回次のいずれにおいても腹部膨満症が発生した⁴⁾。また、クロダイ種苗生産中、仔魚の餌料として用いたシオミズツボワムシ *Brachionus plicatilis*（以下、ワムシ）についても細菌数を測定した。用いたワムシはS型で、栽培センターの屋内水槽でナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* 及びパン酵母で培養し、餌として使用する前の1～2日間油脂酵母及び油脂酵母レッドを与えて栄養強化したものであった。表2に細菌

表1 消化管内細菌数の測定に使用したクロダイ供試魚

回次	水槽 No.	サンプリング日	ふ化後日数	健康状態
1	21	'95. 4. 18	9	良
	"	4. 25	16	"
	"	5. 2	23	"
	"	5. 11	32	腹部膨満症
	"	5. 18	39	"
2	9	6. 1	10	良
	"	6. 7	16	腹部膨満症
	"	6. 14	23	"
	"	6. 22	31	"
3	7	6. 22	10	腹部膨満症

数の測定に用いたワムシの経歴を示した。供試したワムシは、ニフルスチレン酸ナトリウム（以下、NFS）2 mg/l の濃度で2～6時間の薬浴を行ったワムシと行わないワムシを使用した。

表3にPCR法によるVNN検査に用いた検体を示した。なお、各検体はサンプリング後、検査まで83～88日間、-80℃に保存した。

消化管内及びワムシの細菌数の測定：Murogaらの分離方法⁵⁾に準じた。すなわち、底面にガーゼを張った

表2 細菌数の測定に用いたワムシ

クロダイ 種苗生産回次	サンプリング日	NFS薬浴の 有無
1	'95. 4. 18	有
	"	無
	4. 25	有
	"	無
	5. 2	有
2	6. 1	有
	"	無
	6. 7	有

表3 VNN検査に用いた検体

回次	検体 No.	水槽 No.	ふ化後 日数	生存魚・へい死魚	検査結果
1	1	21	3	生存	陰性
	2	"	16	"	"
	3	"	35	へい死	"
	4	"	43	"	陽性
2	5	7	16	へい死	陽性
	6	8	32	生存	"
	7	9	16	"	"
	8	"	26	へい死	"
	9	"	31	生存	"
	10	8~10混合	44	"	"
3	11	7	10	生存	陽性
	12	"	39	"	陰性

プラスチック製の筒（直径約4 cm, 長さ約7 cm）にクロダイ供試魚0.1 g（湿重量）を入れ、0.1%塩化ベンザルコニウム液に1分間浸漬した後、水道水で30秒間水洗した。そして、滅菌生理食塩水を2 ml加え、ガラスホモジナイザーを用いてすりつぶし原液とした。その液を滅菌生理食塩水を用いた10倍希釈系列で希釈して、それぞれの希釈液0.1 mlをBTBティポール寒天培地（日水）上にとり、コンラージ棒を用いて塗布した。25°Cで2日間培養した後、生えてきたコロニーを計数して、供試魚の湿重量1 g当たりの消化管内細菌数（BTB細菌数）を求めた。

ワムシは、プランクトンネット(42 μm)でこし取り、ろ紙で水気を吸い取った後湿重量で0.1 g採取し、9倍量の滅菌生理食塩水を加えてガラスホモジナイザーですりつぶした。以下、クロダイの方法と同様に、湿重量1 g当たりのBTB細菌数を求めた。

PCR法によるVNN検査：Nishizawa *et al.*⁶⁾の方法により行った。すなわち、仔稚魚の全体、または眼球から核酸を抽出し、SJNNV（VNN原因ウイルス）のプライマーを用いてPCRを30サイクル行い、SJNNV遺伝子の検出を試みた。

結果と考察

へい死状況：種苗生産1回次には、5月11日～17日にかけてふ化後32日以降の仔魚で遊泳緩慢な状態がみられた。仔魚の消化管は膨満しており、顕微鏡観察の結果、消化管内には未消化の生物餌料が多く存在していた。そして、一部の未消化ワムシの内部では、運動性の細菌が確認された。給餌は5月12日までワムシが与えられ、13日以降はアルテミア *Artemia salina* 幼生と配合飼料が

与えられていた。腹部膨満症の対策として、通常の換水の他に毎日1/2水量の換水を行った。さらに、病魚のみられた5月11日からは1 mg/l濃度のNFS浴及び水産用パラザン5 ml/槽を35~75 gの配合飼料に吸着して投与したが、効果はなくへい死が続いた。発病期間中のへい死率は最高で50%に達した。

2回次では、ふ化後16~45日で、3回次ではふ化後10日で、同じく遊泳が緩慢となり、消化管の膨満が認められた。2及び3回次のへい死率は、それぞれ、最高95%、100%と高い値であった。このように、腹部膨満症の発生は生産回次を追ってふ化後早期からみられ、へい死率も高くなる傾向を示した。

消化管内及びワムシの細菌数：種苗生産1回次及び2回次の魚体重1 g当たりの消化管内細菌数の推移を図1に示した。両回次とも細菌数はふ化後16日目までは、 10^3 CFU/g以下と低い値であった。その後、1回次では、ふ化後32日、2回次では、ふ化後23日に 10^7 CFU/gまで増加した。また、3回次の水槽No. 7の細菌数は、ふ化後10日に 1.0×10^6 CFU/gであった。

腹部膨満症発生時期と消化管内細菌数の関係をみると、1回次の本症発生時期（ふ化後32日以降）及び2回次の発生時期（ふ化後16日以降）には、細菌数が非常に増加していた。3回次では、本症発生時（ふ化後10日）にすでに 10^6 CFU/gという高い値を示していた。こ

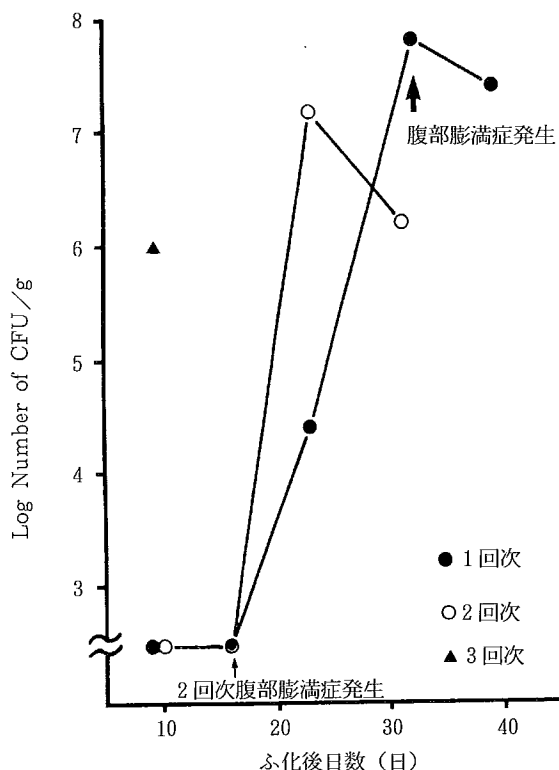


図1 クロダイ消化管内細菌数の推移

のように、本症発生時期と細菌数の増加傾向は、ほぼ同時期であった。また、クロダイにおける本症の発病サイズはふ化後10~30日といわれており⁷⁾、今回の事例とほぼ一致した。ふ化後4~32日の正常なクロダイ仔稚魚の消化管内細菌数(BTB菌数)は、 $10^1 \sim 10^4$ CFU/尾と報告されている⁸⁾。今回の病魚における消化管内細菌数は、仮に全長10mmの大きさの魚として考えてみるとその体重は約0.012gであり⁹⁾、1尾当たり換算するとおそらく $10^5 \sim 10^6$ CFUになると推定される。この値を前述の正常な仔稚魚の細菌数と比較すると、10倍から100倍になっていた。

図2に給餌前のワムシの細菌数の推移を示した。薬浴を行っていないワムシのBTB菌数は $10^6 \sim 10^7$ CFU/gで、これは、山野井・杉山¹⁰⁾の結果($10^7 \sim 10^9$ CFU/g)より、1桁程度低かった。薬浴を行ったワムシのBTB菌数は、 $10^4 \sim 10^6$ CFU/gで、薬浴を行っていないものと比べ、1~2桁の減少がみられ、薬浴効果が一応認められた。しかし、薬浴した後に仔稚魚に投与しているにもかかわらず腹部膨満症が発生したことから、薬浴濃度や時間の不足、あるいは一部の薬剤耐性菌の関与が考えられた。

PCR法によるVNN検査：検査の結果を表3に示した。種苗生産1回次のふ化後43日に、2回次のふ化後16~44日にサンプリングしたすべての検体に、3回次はふ化後10日の検体にそれぞれ陽性がみられた。これら陽性検体のうち、No. 4及び8について広島大学生物生産学部に病理組織学的検査、蛍光抗体法及び電子顕微鏡によ

る観察を依頼した。その結果、VNNに特有にみられる神経細胞の空胞化が認められず、蛍光抗体法も陰性で、SJNNV粒子も確認されなかった。これらのことから、今回のクロダイ仔稚魚の大量へい死はVNNによるものとは考えられなかった。

文 献

- 1) 楠田理一・横山 淳・川合研児, 1986: クロダイ仔稚魚のいわゆる腹部膨満症に関する細菌学的研究. 日水誌, 52, 1745-1751.
- 2) 元谷 剛・萱野泰久, 1994: クロダイの種苗生産, 岡山水試報, 9, 170-174.
- 3) 元谷 剛・萱野泰久, 1995: クロダイの種苗生産, 岡山水試報, 10, 213-218.
- 4) 元谷 剛・尾田 正, 1996: クロダイの種苗生産, 岡山水試報, 11, 147-151.
- 5) Muroga, K., M. Higashi, and H. Keitoku, 1987: The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Aanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, 65, 79-88.
- 6) Nishizawa, T., K. Mori, T. Nakai, I. Furusawa and K. Muroga, 1994: Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. Aquat. Org.*, 18, 103-107.
- 7) 松本紀男, 1983: クロダイの種苗生産過程における魚病問題(日本魚病学会ワークショップ). 魚病研究, 17, 225-226.
- 8) 室賀清邦, 1986: 種苗生産時の病害に関する研究. マダイの初期斃死機構に関する研究. 昭和60年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 1-13.
- 9) 九州・山口ブロック水産試験場マダイ種苗生産研究会, 1977: 「マダイ種苗生産技術の現状と問題点」日本水産資源保護協会, 179pp.
- 10) 山野井英夫・杉山瑛之, 1985: 種苗生産時の病害に関する研究. アユの初期斃死機構に関する研究. 昭和59年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 1-25.

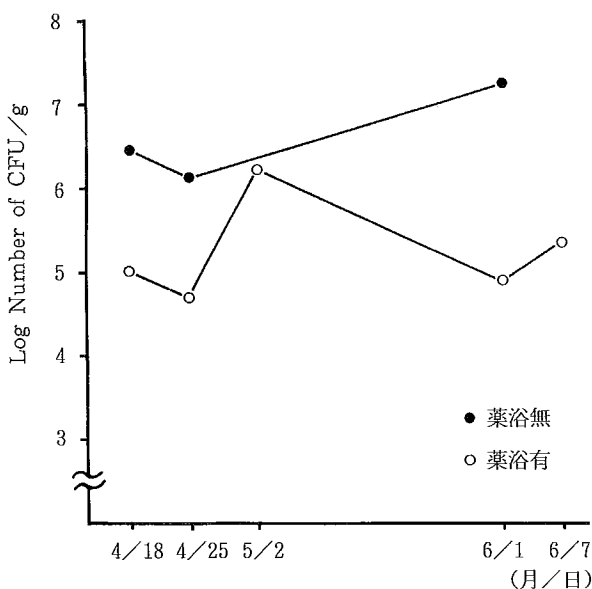


図2 給餌前のワムシの細菌数の推移