マダイの種苗生産過程におけるへい死要因に関する研究

岩田一夫^{*1}・矢野原良民^{*2}・石橋 制^{*1}

(昭和 53 年 4 月 26 日受理)

Studies on Factors Related to Mortality of Young Red Seabream (*Pagrus major*) in the Artificial Seed Production

Kazuo IWATA*, Yoshitami YANOHARA** and Osamu ISHIBASHI*

*Miyazaki Pref. Fish. Exp. Station, Oryuzaco, Miyazaki, Japan

**Faculty of Fish., Kagoshima University, Shimoarata-cho, Kagoshima, Japan

(Received April 26, 1978)

Infection tests were attempted to clarify various conditions which precipitated diseases of young red seabreams. *Vibrio alginolyticus* CY-1 isolated from diseased fish in 1975 was used for the tests.

Young red seabreams showed signs of disease both in the water containing *V. alginolyticus* and in the one with the bacteria and Rotifera. Higher mortality occurred in the latter case.

Red seabreams reared in the seawater with the bacteria and *Chlorella* had a higher surviving rate than those in the seawater without *Chlorella*. It was observed through other experiments that *V. alginolyticus* in the sea water with both Rotifera and *Chlorella* tended to increase in number as the number of *Chlorella* was decreased by the consumption of Rotifera.

マダイ *Pagrus major* の種苗生産過程において、しばしば、ふ化後 15 日頃から腹部がぼろ満して腸閉塞の状態を示し、へい死することが知られている。村田他(1975)はこの疾病が細菌に由来することを示唆した。また安永他(1977)はシオミズボウムシ *Branchionus plicatilis* (以下ワムシ)の培養に用いるパン酵母に存在する夾雑細菌がマダイ稚魚に対して起病性をもっていることを明らかにした。筆者ら(1977)は疾病の原因を究明するため 1975 年から試験を実施し、病魚より分離された *Vibrio alginolyticus* の病原性を明らかにした。そこで筆者らは、ひき続き分離菌の病原性を確認するとともに疾病発生にいたる諸条件を明らかにすることを試みた。

材料および方法

1) 人工感染試験

i. 飼育水に *Vibrio alginolyticus* CY-1 を添加した感染試験

供試菌は 1975 年に腹部ぼろ満症状の病魚から分離した菌株 *Vibrio alginolyticus* CY-1 をもちいた。この *V. alginolyticus* CY-1 を 3% NaCl 加 BHI ブイヨン

で 24 時間培養し、これを飼育海水中に添加し、菌数の異なる試験区を設定した。すなわち、約 10^6 cell/ml の菌量にした試験区、その 1/10 の約 10^5 cell/ml の菌量の試験区、および約 10^6 cell/ml の菌量の飼育水に一定量のクロレラを添加した試験区を設けた。また対照として海水だけで供試菌を添加しない試験区を設けた。それぞれの試験区にふ化後 28 日目の平均体長約 8.5 mm のマダイ稚魚を 35~37 尾供試して 5 日間通気して飼育した。試験の期間は 1976 年 6 月 15 日から 6 月 20 日まで、試験期間中の水温は 20.3°C から 23.2°C の範囲であった。*Vibrio alginolyticus* CY-1 添加海水は、30°C、24 時間増菌培養後 5.27×10^{10} cell/ml の菌量であったものを 20 l の海水で目的菌量まで希釈して調整した。試験は 30 l パンライト水槽で無給餌で実施した。クロレラ添加区のクロレラの量は飼育海水 1 ml あたり 250 万個とした。

ii. ワムシに *Vibrio alginolyticus* CY-1 を摂取させた感染試験

ワムシに *Vibrio alginolyticus* CY-1 を摂取させるために次のような試験区を設けた。すなわち、約 10^6 cell/ml の菌量の飼育水にパン酵母で培養したワムシを添加した試験区、48 時間クロレラで培養したワムシを添加し

*1 宮崎県水産試験場

*2 鹿児島大学水産学部

た試験区、および対照として *Vibrio alginolyticus* CY-1 を添加せずにクロレラで培養したワムシのみを添加した試験区を設けた。

マダイ稚魚はそれぞれの試験区に 35~36 尾供試した。飼育試験の方法、菌液の調整方法、飼育期間、飼育期間中の水温、飼育水槽、飼育水量は飼育水に *V. alginolyticus* CY-1 を添加した感染試験と同様である。添加したワムシ量は 1 日 1 ml あたり約 200 個になるように調整投与した。

各試験区のワムシおよび病魚の保菌状況を組織標本によって調べた。なお組織標本の染色法はグットパスチャー法を用いた。

2) ワムシおよび飼育水による比較飼育試験

クロレラを添加した海水とクロレラを添加しない海水に、クロレラで培養したワムシとパン酵母で培養したワムシをそれぞれ加え、マダイ稚魚をふ化仔魚から飼育し、飼育水別による成育状況を生残尾数から検討した。

設定した試験区は次のとおりである。

- i. クロレラ添加海水+パン酵母培養ワムシ
- ii. クロレラ添加海水+クロレラに 30 分浸漬したパン酵母培養ワムシ
- iii. 海水+クロレラに 30 分浸漬したパン酵母培養ワムシ
- iv. クロレラ添加海水+クロレラに 60 分浸漬したパン酵母培養ワムシ
- v. 海水+クロレラに 60 分浸漬したパン酵母培養ワムシ

飼育水中のクロレラ数は 85 万~200 万 cell/ml を保持した。試験は 1976 年 4 月 18~5 日 11 月日まで実施し、試験開始時の供試尾数は各区とも約 18,000 尾である。飼育は 500 l パンライト水槽で、微通気、止水飼育を行った。

3) ワムシ・クロレラ・細菌間の相互関係について

クロレラ添加海水にワムシを添加した場合の海水中およびワムシ体内の細菌の消長を BTB テイポール寒天培地に発育する白糖分解菌の菌数の変動をみることに

て検討した。

菌数計算は、海水についてはクロレラを除去する目的で 1.2 μ ミリポアフィルターで濾過し、濾液 1 ml についての細菌数を計算した。

ワムシについては、ワムシを添加したクロレラ添加海水 200 ml を東洋 No. 2 濾紙で濾過し残ったワムシを濾紙ごと磨砕して 10 ml の滅菌生理食塩水に稀釈してその 1 ml 中の菌数を計数した。試験開始時の 1 ml 中のクロレラ数は $1,146 \times 10^4$ であった。

結 果

1) 人工感染試験

- i. 飼育水に *V. alginolyticus* CY-1 を添加した感染試験

表 1 に示すように *V. alginolyticus* CY-1 の添加量を 10^6 cell/ml にした飼育水でマダイ稚魚を飼育した場合と、同じ *V. alginolyticus* CY-1 の添加量で、クロレラを添加した飼育水でマダイ稚魚を飼育した場合はそれぞれ 50% 以上のへい死率を示した。また *V. alginolyticus* CY-1 の量を 10^6 cell/ml にした飼育水でマダイ稚魚を飼育すると約 30% 近いへい死率であった。*V. aglino-*
lyticus およびクロレラの両者とも加えない海水だけで飼育した対照区のマダイ稚魚のへい死率は約 11% であった。

- ii. ワムシに *V. alginolyticus* CY-1 を摂取させた感染試験

飼育水に *V. alginolyticus* CY-1 を添加した感染試験と同様に、菌量が 10^6 cell/ml になる飼育水にワムシを添加してマダイ稚魚の飼育をおこなった。表 2 にみられるようにへい死率はパン酵母で培養したワムシを添加した試験試験区で 80% を示し、クロレラで培養したワムシを添加した試験区は約 70%、クロレラだけ添加した飼育水でマダイ稚魚を飼育した対照区では約 17% のへい死率を示した。この試験に供試したワムシは図 1 に示すように確実に体内に細菌を取り込んでいた。また発病したマダイ稚魚の消化管は図 2 に示すように細胞の壊死

表 1. 飼育水に *Vibrio alginolyticus* CY-1 を添加した感染試験結果

区 分	供試尾数	経過日数およびへい死数					へい死数 合計	へい死率 (%)
		1	2	3	4	5		
10^6 菌液区	35	2	9	3	2	2	18	51.4
クロレラ+ 10^6 菌液区	35	2	8	2	5	2	19	54.3
10^6 菌液区	35	0	7	0	3	0	10	28.6
海水区 (対照区)	37	0	4	0	0	0	4	10.8

表 2. ワムシに *Vibrio alginolyticus* CY-1 を取込ませた感染試験結果

区 分	供試尾数	経過日数およびへい死数					へい死数 合計	へい死 率(%)
		1	2	3	4	5		
イーストワムシ+10 ⁸ 菌液区	36	21	7	3	1	0	32	88.8
クロレラワムシ+10 ⁸ 菌液区	35	16	6	3	0	0	25	71.4
クロレラワムシ+海水区 (対照区)	35	0	5	0	1	0	6	17.1

表 3. マダイ稚魚のワムシおよび飼育水による比較飼育試験結果

区分	飼 育 水	添加ワムシの種類	試験開始時 の供試尾数	生残数	生残率 (%)
1	クロレラ添加海水	イースト培養ワムシ	18,000	5,900	32.8
2	クロレラ添加海水	イースト培養ワムシをクロレラに 30 分浸漬	18,000	2,344	13
3	海 水	イースト培養ワムシをクロレラに 30 分浸漬	18,000	1,938	10.8
4	クロレラ添加海水	イースト培養ワムシをクロレラに 60 分浸漬	18,000	2,332	12.9
5	海 水	イースト培養ワムシをクロレラに 60 分浸漬	18,000	1,771	9.8

表 4. クロレラ添加海水に異なる量のワムシを加えた場合のクロレラ添加海水およびワムシ体内の細菌数の経時的変化

区 分	添加ワムシ量 個体数/ml	経 過 時 間				
		0	1	3	6	24
クロレラ添加海水	348	178	39	168	2.9×10^3	6.89×10^4
	119	40	12.5	44	289	1.77×10^4
ワムシ体内	348	102	2.4×10^3	4.23×10^3	1.93×10^4	6.65×10^4
	119	227	380	293	8.25×10^3	1.21×10^4

表 5. クロレラ添加海水にワムシを加えた場合のクロレラ数の経時的変化

添加ワムシ量 個体数/ml	検 査 項 目	経 過 時 間				24時間後のワムシ 個体数 (1 ml 中)
		0	1	3	6	
1 ml 中のクロレラ量		$1,146 \times 10^4$	575×10^4	155×10^4	45×10^4	373
	ワムシのクロレラ摂取率(%)	0	49.8	86.5	96.1	
1 ml 中のクロレラ量		$1,146 \times 10^4$	955×10^4	860×10^4	440×10^4	133
	ワムシのクロレラ摂取率(%)	0	16.7	24.9	61.6	

崩壊をきたし、細菌が組織内で増殖している。

2) 種々の条件下におけるマダイ稚魚飼育試験

表 3 にみられるようにクロレラを添加した海水でマダイ稚魚を飼育した場合は 13% から 32.8% の範囲内での生残率であった。また海水のみで飼育した場合は約 10% の生残率を示した。

3) ワムシ・クロレラ・細菌間の相互関係について

クロレラ添加海水にワムシを加えた場合のクロレラ添

加海水およびワムシ体内の細菌数の変化をみた。海水中の細菌数の変化についてみると表 4 に示すように試験開始 6 時間後にはワムシの量が約 100 個体/ml 区では 10^3 cell/ml, 約 300 個体/ml 区では 10^3 cell/ml であった。また 24 時間後にはそれぞれの区とも 10^4 cell/ml のオーダーになった。

次にワムシ体内の細菌数をクロレラ添加海水 200 ml 中のワムシについてみると、試験開始 6 時間後にはワムシの量が約 300 個体/ml 区は約 10^4 cell に 100 個体/ml

表 6. 1975 年におけ *Vibrio alginolyticus* CY-1 による感染試験結果

区 分	供試尾数	経過日数およびへい死数					へい死数 合計	へい死率 (%)
		1	2	3	4	5		
10 ⁶ 菌液区	15	15	0	0	0	0	15	100
10 ⁶ 菌液+ワムシ混合区	18	7	0	0	0	2	9	50
10 ⁵ 菌液+ワムシ混合区	21	1	2	0	0	0	3	14
対照区 (ワムシ区)	23	5	0	0	0	0	5	21

試験期間: 1975 年 7 月 5 日~7 月 9 日

平均水温, 23.3°C; 供試魚平均体長, 9.0 mm; ワムシの量; 6.5 個体/ml.

区は約 10³ cell になり 24 時間後には両区とも約 10⁴ cell の菌数を示した。表 5 にこのワムシの消化の状況を示すが、クロレラの液中に約 300 個体/ml のワムシが存在すると 6 時間後には開始時の約 96% のクロレラを摂取し、またクロレラの液中に約 100 個体/ml のワムシが存在すると 9 時間後には約 61% のクロレラを摂取した。

考 察

1975 年に病魚より分離した菌株 *Vibrio alginolyticus* CY-1 がマダイ稚魚に病原性を有することが感染試験で確認された。マダイ稚魚は飼育水中の病原細菌の存在下で発病し、ワムシがマダイ稚魚に細菌を媒介する可能性が強いことも判明した。このことは、*V. alginolyticus* CY-1 添加海水中でワムシを餌としてマダイ稚魚を飼育するとへい死が著しく、病魚の消化管における組織中に細菌の増殖が認められること、およびワムシ体内に細菌が存在することから裏づけられた。なおこの場合パン酵母で培養したワムシにもクロレラで培養したワムシにも細菌は存在した。飼育水中の細菌の量と発病の関係は表 6 に示す 1975 年の実験結果と同様に約 10⁶ cell/ml の菌量では高いへい死率を示したのに対し、約 10⁵ cell/ml の菌量ではへい死率が著しく低かったことから、実際の種苗生産の過程で飼育水中の細菌数 (白糖分解菌) を 1 ml あたり 10⁵ cell 以下に抑えることも種苗のへい死事故をさける一つの方法と考えられる (表 1)。しかしこの場合腸炎ビブリオ等白糖非分解菌がハマチに病原性をもたらす報告が畑井他 (1975) によってなされているので白糖分解菌だけで判断することの危険性は常に考えておく必要があろう。飼育水について、クロレラを添加した飼育水でマダイ稚魚を飼育すると生残率は海水のみで飼育したマダイ稚魚に比較し良好な結果が得られた。しかしクロレラで培養したワムシとパン酵母で培養したワムシによる相違は明白にすることは出来なかった。ただ飼育水中のクロレラとワムシ、および細菌間には相互関係が認め

られ、ワムシによりクロレラが消化されクロレラの減少があると飼育水中の細菌の量が増加した。この傾向はワムシの量が多いほど著しく、このことからクロレラは細菌の繁殖に対する何らかの抑制効果をもつことが推察される (表 4)。藻類の抗菌作用については植物プランクトンおよび海藻類に対してグラム陽性菌が強い感受性をもつことが、すでに多賀 (1974) によって報告されており、その中で BRUCE *et al.* (1967) は黄色鞭毛藻類から抗菌物質としてクロロフィル a 誘導体を抽出したことを記載している。さらに多賀はその他種々の藻類からも抗菌物質が分離されていることをのべている。このようなことからクロレラも何らかの抗菌物質を有し、それが細菌の繁殖を抑制していることが推察される。また福所 (1977) はインダイ稚魚にクロレラ浸漬ワムシを投与しクロレラを取り込んだワムシの栄養価からクロレラ浸漬ワムシが種苗生産に適していることを報告している。今回の試験でマダイ稚魚に疾病をもたらす諸要因のうち細菌とワムシとの関係が非常に大きいことが判明し、またクロレラの存在が飼育水中の細菌の繁殖を抑制することによって細菌感染に対する予防効果を有することが判明した。

謝 辞

本研究実施にあたりワムシおよび病魚の組織標本作成、とりまとめについて御助言、御指導をいただいた宮崎大学農学部教授木村正雄博士、菌株の保存、各実験について御助言御指導をいただいた同大学農学部教授北尾忠利博士に篤く御例甲しあげます。

要 約

1) 1975 年に腹部ぼう満症状を呈するマダイ稚魚より分離した *Vibrio alginolyticus* CY-1 はマダイ稚魚に疾病をもたらすことが確認され、マダイ稚魚に対し病原細菌を伝播する媒介者としてワムシの疑いが濃厚となった。

2) クロレラを添加した海水でマダイ稚魚を飼育した場合は、海水のみで飼育した場合に比較し、生残率が高い傾向に認められた。

3) クロレラ添加海水にワムシを添加すると、ワムシによってクロレラが消費され、海水中の細菌が増加する傾向が認められた。

文 献

岩田一夫・石橋 制・北尾忠利・青木 宙 (1977): マダイ種苗生産過程におけるへい死の原因について—I. 昭和 50 年度宮崎県水産試験場事業報告, 23-29.
多賀信夫編 (1974): 植物プランクトンおよび海藻類

による抗菌性物質の生産. 海洋学講座第 11 巻海洋微生物, 143-144.

畑井喜司雄・岩橋義人・江草周三 (1975): 養殖ハマチより分離した腸炎ビブリオについて. 魚病研究, 10 (1), 31-37.

福所邦彦 (1977): インダイ仔魚におよぼすクロレラによる栄養強化ワムシの餌料効果. 長崎県水産試験場研究報告, 第 3 号, 152-154.

村田 修・原田輝雄・泰 興世 (1975): タイ科インダイ科魚類の仔稚魚の疾病に関する研究—II. 昭和 50 年度日本水産学会秋季大会講演要旨, 82.

安永統男・山本宣征 (1977): ワムシ培養用パン酵母からの検出細菌と稚マダイに対する起病性. 長崎県水産試験場研究報告, 第 3 号, 149-151.

図版説明

図 1. ワムシ体内に取り込まれた細菌

図 2. 細菌添加飼育水中でワムシを餌料として発病したマダイ稚魚の消化管における壊死像および組織内における細菌群