

マガキ幼生の細菌性壊死症に対する抗菌剤の治療効果

松原弾司^{1*}・田中 實¹・惣明陸枝¹・平川浩司¹・土居竜司²・中井敏博²

(2002年7月25日受付)

Therapeutic Effects of Antimicrobial Compounds against Bacillary Necrosis of Larval Pacific Oyster

Danji Matsubara^{1*}, Makoto Tanaka¹, Yoshie Soumyou¹, Kohji Hirakawa¹,
Ryuji Doi² and Toshihiro Nakai²

¹Hiroshima Prefectural Farming Fisheries Association, Takehara 729-2313, Japan

²Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University,
Higashihiroshima 739-8528, Japan

(Received July 25, 2002)

ABSTRACT—Eight antimicrobial compounds were examined to evaluate their therapeutic effects against experimentally or naturally induced vibriosis of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. In experimental infections with a strain of *Vibrio splendidus* biovar II, a causative agent of bacillary necrosis of cultured triploid oyster larvae, chloramphenicol (CP) exhibited complete protection against challenges at 10^5 or 10^6 CFU/mL, and erythromycin (EM), novobiocin (NB), gentamicin and streptomycin (SM) were effective to reduce the mortality, but nalidixic acid or oxytetracycline was not. CP and EM were also highly effective against experimental infections with other six strains of *Vibrio* species (*V. splendidus* biovar II, *V. pelagius* I, *V. campbellii*, and *V. tubiashii*) which had been isolated from oyster larvae or the rearing water, but NB and SM were less effective. On the other hand, not only CP and EM but also NB and SM exhibited higher protection against the natural infection.

Key words: *Crassostrea gigas*, chemotherapy, bacillary necrosis, *Vibrio splendidus*, Pacific oyster

広島県栽培漁業協会では、広島県水産試験場において開発された三倍体マガキ *Crassostrea gigas* 種苗の量産技術を用いて、1993年よりその生産事業化試験を行っている。三倍体作出処理後に得られた卵は1日後にD型幼生となり、*Pavlova lutheri*を餌料として与えると、約20日後には付着能力を持った成熟幼生になる(赤繁・楠木, 1996)。しかし、この幼生期の初期(2~8日齢)に大量死亡が頻発し、種苗の安定供給を図る上で障害となっている。大量死の原因は、三倍体化処理により障害を受けた奇形幼生の死亡と、それが引き金となって発生すると考えられる細菌性壊死症 bacillary necrosis または幼生期ビブリオ病 larval vibriosis (Tubiash *et al.*, 1965;

Sindermann, 1988)であり、1997年における本大量死について検討した Sugumar *et al.* (1998a)は、その原因細菌を *Vibrio splendidus* biovar II に同定している。また、その後の検討により、*V. splendidus* biovar II 以外にも起病力の高い *Vibrio* 属細菌がカキの飼育環境中に潜在的に存在することが確かめられている(未報告)。

種苗生産過程の二枚貝類の幼生期に細菌感染による大量死が発生することは古くから世界的に知られていて、その原因細菌の多くは *Vibrio* 属細菌である (Jeffries, 1982; Elston, 1993)。上述の *V. splendidus* またはその類縁菌はヨーロッパホタテガイ *Pecten maximus* 幼生 (Nicolas *et al.*, 1996) あるいはその親貝 (Lambert *et al.*, 1999) の大量死に関与し、最近、フランスでのマガキ幼生の大量死の原因体としても報告された (Lacoste *et al.*, 2001)。我が国では、マガキ幼生以外にトリガイ *Fulvia*

¹ 広島県栽培漁業協会

² 広島大学大学院生物圏科学研究科

* Corresponding author E-mail: matubara@hiroshima-pffa.or.jp

mutica の種苗生産期に *Vibrio* sp. による大量死が報告されている (藤原ら, 1993)。これらの二枚貝類の細菌感染症の防除にはペニシリン, クロラムフェニコール, ストレプトマイシン等の抗生物質が有効であるとされている (Walne, 1958; Tubiash *et al.*, 1965; DiSalvo *et al.*, 1978; Jeffries, 1982; 藤原ら, 1993; Nicolas *et al.*, 1996)。広島県栽培漁業協会における三倍体マガキ種苗の細菌性壊死症においてはストレプトマイシンの投与 (8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) が有効であることが実験的に確かめられている (Sugumar *et al.*, 1998a), ストレプトマイシン存在下でも時として細菌感染による大量死亡が発生する。

本研究では, ストレプトマイシンも含め三倍体マガキ幼生の細菌性壊死症に有効な化学療法剤を検索することを目的として, マガキ幼生に対して病原性を有する *Vibrio* 属細菌による人為感染および自然感染に対する各種薬剤の感染防除効果を調べた。

材料および方法

1) 供試菌株および培養

広島県栽培漁業協会のマガキ飼育施設において分離され, マガキ幼生に対して強い病原性 ($\text{LD}_{50} = 10^4 - 10^5$ CFU/mL) を有する *Vibrio* 属細菌 4 種 7 株を供試した (Table 1)。このうち *V. splendidus* biovar II No. 60 は Sugumar *et al.* (1998a) により三倍体マガキ幼生の細菌性壊死症の原因体として分離, 同定され, 他の 6 株はマガキ幼生あるいはその飼育水から分離され, 清水 (1990) および Alsina and Blanch (1994a, b) の簡易同定図式に従って同定されたものである。これらの菌株はマガキ幼生に対する病原性を確認後, 凍結乾燥保存した。実験に際して Marine Agar 2216 (Difco) を用いて 25°C で 1 日培養し, 10 mM PBS (pH 7.4) に懸濁して 10^9 CFU/mL の菌液を作製し, それを適宜希釈して使用した。

Table 1. Source of *Vibrio* strains used in this study

Species	Strain	Year	Isolated from
<i>V. splendidus</i> biovar II	No. 60	1997	Dead larvae
	M12	1998	Rearing water
<i>V. pelagius</i> biovar I	V22	1998	Normal larvae
	V26	1998	Dead larvae
	V44	1998	Dead larvae
<i>V. campbellii</i>	V24	1998	Normal larvae
<i>V. tubiashii</i>	V43	1998	Dead larvae

2) 供試抗菌剤

ゲンタマイシン硫酸塩 (GM), ストレプトマイシン硫酸塩 (SM), オキシテトラサイクリン塩酸塩 (OTC), コリスチン硫酸塩 (CL), クロラムフェニコール (CP), エ

リスロマイシン (EM), ナリジキシン酸 (NA), およびノボピオシンナトリウム (NB) の 8 種類を使用した。EM は Sigma 社製を, その他の薬剤は和光純薬工業 (株) 社製のものを使用した。これらの抗菌剤は, Sugumar *et al.* (1998a) が *V. splendidus* biovar II に対して行ったディスク法による感受性試験の結果に基づいて選択した。各薬剤液は中空糸膜 (0.2 μm) 濾過海水で所定の濃度となるよう作製した。

3) 抗菌剤の感染防除試験

人為感染: 5 日齢 (平均殻長 100 μm) または 6 日齢 (120 μm) の正常な三倍体マガキ幼生を以下の人為感染実験に使用した。組織培養用 6 穴プレート (Falcon) を使用して, 中空糸膜濾過海水 8.8 mL を入れたウエルに, 平均 40 個の幼生 (1 mL) と前述の方法で調整した各株の菌液 ($10^6, 10^7, 10^8$ CFU/mL) を 0.1 mL 添加した。これに 8 種類の各抗菌剤液 0.1 mL を 5, 10, または 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう添加し, 25°C で静置した。抗菌剤または菌を接種しないウエルを対照区とした。24 (± 2) 時間後に, まず幼生の死亡個体を計数し, 続いてヨード剤を添加して生きている幼生を不活化させて全個体数を求めた。各区 2 ウエルずつ設けた。生死の判定では, パスツールピペットでウエル内に水流を起こして幼生を中心に集め, 3 分間経っても繊毛運動の認められないものを死亡個体とした。

自然感染: 0 日齢の三倍体マガキ幼生 (平均殻長 67–68 μm) を 2 L ビーカーに収容し, 4 種類の抗菌剤 (CP, EM, NB, SM) をそれぞれ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるよう添加した。水温 26°C で微通気し, 3 日間観察した。その間 *P. lutheri* を投与し (10,000 細胞/mL), 2 日目には底掃除と半分量の換水をおこなった。3 日目に 45 μm ネットで幼生を 50 または 100 mL のビーカーに回収し, よく攪拌しながらその 1 mL を採取して (5 回), 前述のように幼生の生死を判定した。実験は 1999 年 7 月から 10 月にかけて 3 回行った。実験 1 では, D 型幼生 (三倍体化率 89%) を各試験区に 20,000 個体 (10 個体/mL), 実験 2 および 3 では幼生 (同各 95%) を各 8,000 個体 (4 個体/mL) 収容した。実験 3 では OTC の効果もみた。なお, 実際の生産での幼生の収容密度は, 3–4 個体/mL である。実験 1 と 2 では各区それぞれ 2 ビーカーずつ用いた。

4) 最小発育阻止濃度の測定

4 種抗菌剤 (SM, CP, EM, NB) の各菌株に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を液体培地希釈法により測定した。抗菌剤は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの 10 濃度 (2 倍段階希釈) を設定した。Marine Broth (Difco) で 25°C 一晩振とう培養した菌を 10 mM PBS (pH 7.4) で 3 回遠心洗浄し (13,000 $\times g$), この洗浄菌を終濃度が

10⁵ CFU/mL となるよう各試験液に接種した。試験培地には 1/10 濃度の Marine Broth を用い、25°C で一晩静置培養した後、MIC を求めた。

5) 自然感染における細菌数の動態

2001年10月に小規模飼育水槽での自然感染試験を行い、幼生および飼育水における細菌数を経時的に測定した。対照として SM 添加区 (10 µg/mL) を設けた。中空糸ろ過海水 25 L を入れたパンライト水槽に、三倍体マガキ幼生 (0 日齢) を約10万個体収容した。SM 添加区、非添加区をそれぞれ 4 区ずつ設け、そのうちの 1 区から毎日上層部 (20 L) と下層部 (5 L) より細菌数測定のための飼育水を採取した。各層の飼育水 1 mL を低速遠心した後 (1,500×g, 1分)、その上清および沈降した幼生を PBS (3 mL) で磨砕したものを適宜希釈し、Marine Agar および TCBS Agar (Difco) に接種した。残る 3 区は、毎日 1 区ずつを幼生の回収と死亡率の測定に用いた。飼育水全量から 45 µm ネットで幼生を 200 mL のビーカーに回収し、よく攪拌しながらその 1 mL を採取して (3 回)、前述の方法で幼生の生死を判定した。

結 果

1) 人為感染に対する抗菌剤の効果

V. splendidus biovar II No. 60 株に対する 8 種類の抗菌剤の感染防御効果を Table 2 に示す。2 ウエルの結果に殆ど差が認められなかったため、表にはそれらの平均値を示した。抗菌剤を添加していない対照区の死亡率は、攻撃菌濃度が 10⁶ と 10⁵ CFU/mL でいずれも 100%、10⁴ CFU/mL で 11% となった。抗菌剤添加区では、CP は 10⁶ CFU/mL の攻撃に対しても 5 µg/mL で優れた防除効果が認められ、EM, GM, NB がこれに次ぐ防除効果を示した。なお、CP はさらに低濃度 (1.25 µg/mL) でも十分な効果を発揮した。SM と CL の効果は比較的弱く、OTC

Table 2. *In vivo* effects of eight antimicrobial agents against *V. splendidus* biovar II (No. 60 strain) infection in oyster larvae

Conc. of drug (µg/mL)	Dose of bacteria (CFU/mL)	Mortality of oyster larvae (%)									
		CP	EM	GM	NB	SM	CL	OTC	NA		
5	7.4 × 10 ⁶	6	100	100	100	100	100	98	100		
	10 ⁵	2	19	38	98	91	80	95	100		
	10 ⁴	0	3	0	4	20	14	26	31		
10	7.4 × 10 ⁶	2	13	28	46	100	100	100	100		
	10 ⁵	0	5	0	8	80	32	100	100		
	10 ⁴	2	0	0	3	7	5	14	68		
20	7.4 × 10 ⁶	2	0	16	4	6	76	100	100		
	10 ⁵	0	0	0	2	3	10	83	96		
	10 ⁴	0	0	0	2	0	0	2	23		

Controls without drugs: 7.4 × 10⁶ (100%), 10⁵ (100%), 10⁴ (11%)

Table 3. *In vivo* effects of four antimicrobial agents (10 µg/mL) against experimental infections with seven bacterial strains in oyster larvae

Species	Strain	Dose (CFU/mL)	Mortality of oyster larvae (%)					
			CP	EM	NB	SM	Control	
<i>V. splendidus</i>	No. 60	5.4 × 10 ⁶	12	36	26	99	100	
		10 ⁵	3	4	6	18	100	
		10 ⁴	0	0	1	0	26	
	biovar II	M12	4.6 × 10 ⁶	6	59	71	100	95
			10 ⁵	4	6	22	100	96
			10 ⁴	0	0	3	16	14
<i>V. pelagius</i> biovar I	V22	3.5 × 10 ⁶	6	58	100	100	100	
		10 ⁵	0	5	10	72	75	
		10 ⁴	0	0	0	6	6	
	V26	3.5 × 10 ⁶	11	22	99	100	100	
		10 ⁵	2	1	18	85	67	
		10 ⁴	0	0	1	9	16	
<i>V. campbellii</i>	V44	3.4 × 10 ⁶	6	36	75	97	100	
		10 ⁵	3	9	17	19	98	
		10 ⁴	0	0	2	6	39	
	V24	1.8 × 10 ⁶	5	5	6	98	100	
		10 ⁵	0	0	0	12	15	
		10 ⁴	0	0	0	0	13	
<i>V. tubiashii</i>	V43	1.1 × 10 ⁶	15	61	6	100	96	
		10 ⁵	0	1	0	22	13	
		10 ⁴	0	0	0	1	4	

と NA には 20 µg/mL においても顕著な効果は認められなかった。

上述の防除効果の程度に基づいて 4 種類の薬剤 (CP, EM, NB, SM) を選択し、No. 60 株を含む *Vibrio* 属 7 株の感染に対するそれらの防除効果を調べた (Table 3)。ここでは各薬剤の濃度を 10 µg/mL とした。10⁶ CFU/mL 攻撃菌濃度についてみると、対照区での死亡率はすべての株でほぼ 100% であったのに対し、CP 添加区のそれはいずれも低く (5-10%)、また EM は CP ほどではないにしてもすべての株に対して効果が認められた。NB は 10⁶ CFU/mL 攻撃濃度では No. 60, V24, V43 の 3 株に、他の 4 株では 10⁵ CFU/mL の攻撃濃度に対して顕著な効果がみられた。SM は No. 60 と V44 の 2 株に対してのみ効果を示した。

2) 自然感染に対する効果

自然感染に対する CP, EM, NB, SM または OTC (OTC は実験 3 のみ使用) の効果を Fig. 1 に示す。実験 1 および 2 では、2 つのビーカーでの結果に殆ど差が認められなかったため、それらの平均値を示した。幼生を高密度 (10 個体/mL) で収容した実験 1 では、対照区の死亡率が 100% であったのに対し、CP, EM, NB, SM 添加区でそれぞれ死亡率は 11%, 38%, 43%, 53% と低かった。低密度 (4 個体/mL) で幼生を収容した実験 2 では、

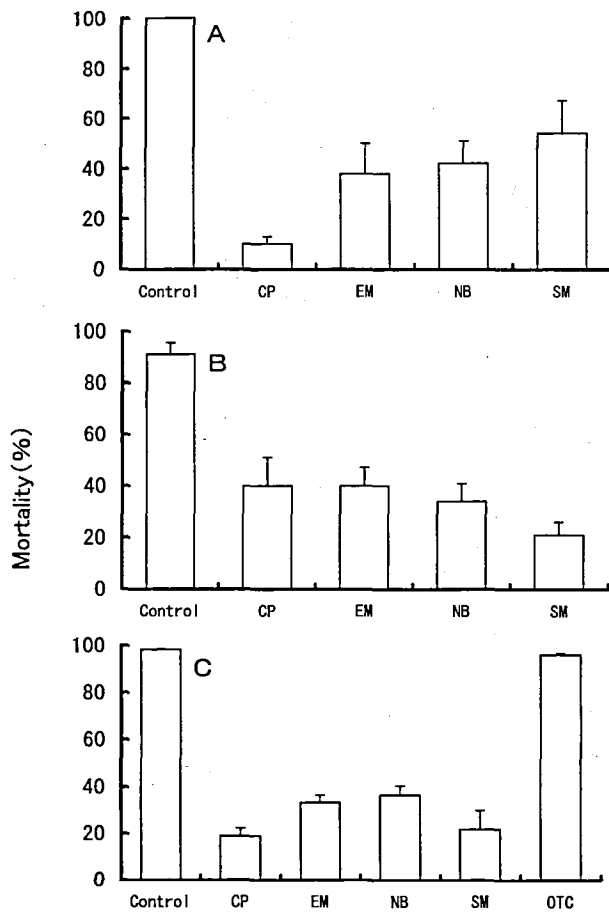


Fig. 1. Therapeutic effects of antimicrobial agents against natural infections of bacillary necrosis in triploid larvae of Pacific oyster. Larvae were kept at a higher density (10 larvae/mL) in Experiment 1 (A) and at lower density (4 larvae/mL) in Experiments 2 (B) and 3 (C). CP: chloramphenicol, EM: erythromycin, NB: novobiocin, SM: streptomycin, OTC: oxytetracycline

対照区の平均死亡率が91%に対して、CP, EM, NB, SMのそれらは40%, 40%, 35%, 21%であった。実験2と同じ収容密度で行った実験3では、対照区の死亡率が98%であったのに対し、CP, EM, NB, SMの死亡率はそれぞれ19%, 33%, 37%, 22%であったが、OTC添加区では96%と対照区と差がなかった。

3) *Vibrio* 菌に対する4種抗菌剤のMIC

CP, EM, NB, SM各薬剤に対する7菌株のMICをTable 4に示す。CPのMICはいずれの株に対しても0.8-6.3 µg/mLと最も低く、EMとNBのそれはそれぞれ6.3-25 µg/mL, 12.5-25 µg/mLと同程度であった。SMはNo. 60およびV44に対しては比較的低いMICを示したが、残る4株に対するMICは50ないし100 µg/mL以上であった。

Table 4. *In vitro* sensitivity of seven bacterial strains against four antimicrobial agents

Species	Strain	MIC (µg/mL)				
		CP	EM	NB	SM	
<i>V. splendidus</i>	No.60	6.3	25	25	25	
	biovar II	M12	6.3	6.3	12.5	>100
<i>V. pelagius</i>	biovar I	V22	3.1	12.5	25	>100
		V26	6.3	12.5	25	>100
		V44	0.8	12.5	12.5	25
<i>V. campbellii</i>	V24	6.3	12.5	25	100	
<i>V. tubiashii</i>	V43	0.8	25	12.5	50	

4) 自然感染における細菌数の動態

小規模飼育試験での自然感染における幼生の死亡率をFig. 2に示す。ここでは、上述したビーカー試験の結果において安定した防除効果を示したSMを使用し、薬剤非添加区と比較した。1-3日後に水槽上層から回収した幼生の死亡率は、SM非添加区で15-26%、添加区で1-11%であった。一方、下層から回収した幼生の死亡率は、非添加区で2日後に100%となったのに対し、添加区では3日間を通して11-30%であった。

Marine Agarによる飼育水からの分離菌数は両区とも1-2日後にかけて増加し、3日後は横ばい状態にあった(Table 5)。上層と下層で菌数に差はなかった。幼生のMarine Agar菌数は両区で顕著な差はなく、概ね 10^2-10^3 CFU/larvaであった。一方、飼育水のTCBS菌数は、

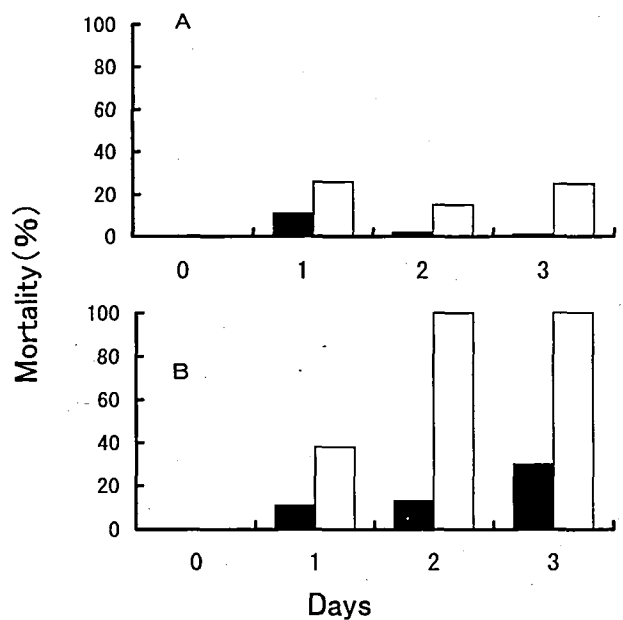


Fig. 2. Mortality of Pacific oyster larvae (triploid) due to natural occurrence of bacillary necrosis in a 25 L tank. Samples for larval mortality were collected from upper layer (A) and lower layer (B) of the tank. ■: streptomycin-treated □: streptomycin-untreated

Table 5. Bacterial counts in oyster larvae and water in streptomycin-treated or -untreated tanks

Day	Sample	Marine Agar (CFU/mL or larva)		TCBS Agar (CFU/mL or larva)	
		SM-	SM+	SM-	SM+
0	Larvae	<10	ND	<10	ND
	Water (upper)	10 ^{2.7}	ND	<10	ND
	(lower)	10 ^{2.7}	ND	<10	ND
1	Larvae (upper)	10 ^{2.5}	10 ^{1.7}	10 ^{1.7}	<10
	(lower)	10 ^{2.8}	10 ^{2.2}	10 ^{2.7}	<10
	Water (upper)	10 ^{4.6}	10 ^{3.7}	10 ^{2.8}	<10
	(lower)	10 ^{4.7}	10 ^{3.6}	10 ^{2.4}	<10
2	Larvae (upper)	ND	<10	ND	<10
	(lower)	10 ^{3.1}	10 ^{2.3}	10 ^{2.0}	<10
	Water (upper)	10 ^{5.1}	10 ^{4.3}	10 ^{3.6}	<10
	(lower)	10 ^{4.9}	10 ^{4.5}	10 ^{3.8}	<10
3	Larvae (upper)	ND	<10	ND	<10
	(lower)	10 ^{2.1}	10 ^{2.7}	10 ^{1.1}	<10
	Water (upper)	10 ^{4.3}	10 ^{4.6}	10 ^{3.6}	<10
	(lower)	10 ^{4.5}	10 ^{4.6}	10 ^{3.6}	<10

SM: streptomycin
ND: not determined

SM 添加区では3日間を通して検出限界以下 (<10 CFU/mL) であったのに対し、非添加区の飼育水からは常に10² - 10⁴ CFU/mL の菌が検出された。SM 非添加区では2日以降浮遊幼生が殆ど認められなくなったため下層のみの結果ではあるが、幼生から10¹ - 10³ CFU/larva で検出された。

考 察

冒頭で述べたように、二枚貝類幼生の細菌性壊死症の防除に、ペニシリン、CP、SM 等の抗生物質が有効であることは古くから知られており、なかでも、フランスのヨーロッパホタテガイ種苗生産場では十数年にわたってCP (8 µg/mL) の有効性が確かめられている (Nicolas *et al.*, 1996)。本研究では、三倍体マガキ幼生の細菌性壊死症の原因菌である *V. splendidus* biovar II (No. 60 株) の人為感染に対する8種薬剤の防除効果を調べた結果、CP、EM、GM、およびNBは低濃度 (5 µg/mL) でも顕著な効果を示し、SM および CL はその効果はやや低く、NA と OTC には使用した最高濃度 (20 µg/mL) でも防除効果は認められなかった (Table 2)。なお、これらの薬剤のうち EM、NB、NA および OTC は水産用医薬品として認可されている。有効性の高かったこれらの薬剤 (CP、EM、GM、NB) は飼育環境中に常在すると考えられるその他の潜在的病原体 (ビブリオ属細菌) の感染に対しても同様の防除効果を示し、SM は一部の株に対してのみその効果が認められた (Table 3)。薬剤のこの *in vivo* での効果はそれらの各菌株に対する *in vitro* 抗菌活性 (MIC 値) とよく一致した (Table 4)。さらに、CP、EM、NB、および SM には、自然感染に対しても同様の

防除効果が得られた (Fig. 1)。ここで注目すべきは、人為感染において効果の低かった SM が、自然感染においては CP、EM、あるいは NB に匹敵する効果を示したことである。実際の量産規模での実験的使用例においても、SM は 8 µg/mL の濃度で幼生期における大量死亡を防除し得ることが確かめられている (Sugumar *et al.*, 1998a)。人為感染において 10⁵ CFU/mL 以上の濃度の菌の存在下では SM に防御効果は認められなかったが、幼生の飼育環境中に常在する *Vibrio* 菌数 (TCBS 培地での菌数) は病気の発生がなければ 10¹ CFU/mL 以下であり (Sugumar *et al.*, 1998a)、また本研究での小規模飼育実験においてほぼ幼生が全滅した時の SM 非添加区飼育水の *Vibrio* 菌数 (=TCBS 菌数) が 10⁴ CFU/mL 以下であったことから (Table 5)、そのような低濃度の菌に対しては本薬剤は十分効果を発揮し得ると考えられる。抗菌活性についての *in vitro* と *in vivo* におけるこのような不一致は DiSalvo *et al.* (1978) にもみられる。本病の発生機序は、飼育における極く初期の小規模感染による菌の増殖および飼育水中でのそれらの病原菌の易増殖性の結果として (Sugumar *et al.*, 1998b)、強毒株菌数が爆発的に増加し、それが幼生の大量死に繋がると推測されることから、薬剤の役割としてはこの初期の菌増殖を抑制することが重要であると考えられる。魚介類の細菌感染症の防除のための適切な化学療法剤の選択には、その効果以外に、経済性等の問題があり一概には論じられないが、本研究で効果の認められた CP、EM、NB、あるいは SM は少なくともその候補となる。これらの薬剤の実際的使用方法に関しては今後量産規模での検討が必要である。広島県栽培漁業協会での現行の対策である 53 µm のネットによる小型個体の除去は、上述した倍數化処理に伴う障害個体 (易感染個体) を除去すると考えられるが、化学療法剤の併用はより一層細菌の温床形成の防止に役立つと考えられる。

SM の効果をみた小規模飼育試験では、幼生の死亡率は上層、下層ともに SM 非添加区で高く、2日以降に下層から回収した幼生の死亡率は100%であった (Fig. 2)。Marine Agar 菌数および TCBS 菌数は飼育水、幼生ともに非添加区で高い菌数が得られた。実験当初は、死亡個体が底面にスポットを形成することにより、それが細菌の温床となってその付近で高率よく感染が進行すると予想していたが、下層の幼生から細菌が多く検出されるものの、飼育水の上層と下層でその差は認められなかった。下層の幼生から高濃度の菌が検出され、また、実験期間中はエアレーションを行っていたことを考慮すると、幼生を温床として放出された *Vibrio* 属細菌がエアレーションによって飼育水全体に拡散して水槽内全体の菌濃度が高まり、感染が拡大していくものと考えられる。

抗生物質等の化学療法剤の使用は二枚貝類の幼生の成

長に悪影響を与え、また魚類の病原細菌と同様、耐性菌の出現を誘発する可能性が指摘されていることから (Nicolas *et al.*, 1996)、化学療法剤に代わる防除法が望まれるところである。海洋細菌の中に魚類病原細菌に対して抗菌作用を有するものが多く発見されており、これらの細菌を用いたバイオコントロールが期待されている (Dopazo *et al.*, 1988)。ガザミやエビといった海産甲殻類の種苗生産時に発生する細菌感染に対しても、抗 *Vibrio* 活性をもつある種の細菌や *Bacillus* 属細菌の有効性を示す結果が報告されている (Nogami and Maeda, 1992; Moriarty, 1998)。Nakamura *et al.* (1999) は二倍体マガキに発生する細菌性壊死症に対する抗 *Vibrio* 細菌の有効性を、また Takahashi *et al.* (2000) は *V. tubiashii* (ATCC 19106) の実験感染に対する ovoglobulin (鶏卵) の感染阻止効果を報告した。我々は現在、魚類における成功例に倣って (Nakai and Park, 2002)、本病の防除にバクテリオファージの利用を検討しており、今後はこのようなバイオコントロールも期待される。

文 献

- 赤繁 悟・楠木 豊 (1996) : 人為三倍体マガキの作出条件および三倍体幼生の生残。広島水試研究報告書, 19, 1-20.
- Alsina, M. and A. R. Blanch (1994a) : A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 76, 79-85.
- Alsina, M. and A. R. Blanch (1994b) : Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species. *J. Appl. Bacteriol.*, 77, 719-721.
- DiSalvo, L. H., J. Blecka and R. Zebal (1978) : *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 219-221.
- Dopazo, C. P., M. L. Lemos, C. Lodeiros, J. Bolinches, J. L. Barja and A. E. Tranzo (1998) : Inhibitory activity of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 97-101.
- Elston, R. A. (1993) : Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ann. Rev. Fish Dis.*, 3, 259-276.
- 藤原正夢・上野陽一郎・岩尾敦志 (1993) : トリガイ浮遊幼生の斃死因と考えられる *Vibrio* 属細菌について。魚病研究, 28, 83-89.
- Jeffries, V. E. (1982) : Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. *Aquaculture*, 29, 201-226.
- Lacoste, A., F. Jalabert, S. Malham, A. Cueff, F. Gelebart, C. Cordevant, M. Lange and S. A. Poulet (2001) : A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oyster *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). *Dis. Aquat. Org.*, 46, 139-145.
- Lambert, C., J. L. Nicolas and V. Cilia (1999) : *Vibrio splendidus*-related strain isolated from brown deposit in scallop (*Pecten maximus*) cultured in Brittany (France). *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, 19, 102-106.
- Moriarty, D. J. W. (1998) : Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*, 164, 351-358.
- Nakai, T. and S. C. Park (2002) : Mini-review Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. *Res. Microbiol.*, 153, 13-18.
- Nakamura, A., K. G. Takahashi and K. Mori (1999) : Vibriostatic bacteria isolated from rearing seawater of oyster brood stock: Potentiality as biocontrol agents for vibriosis in oyster larvae. *Fish Pathol.*, 34, 139-144.
- Nicolas, J. L., S. Corre, G. Gauthier, R. Robert and D. Ansquer (1996) : Bacterial problems associated with scallop *Pecten maximus* larval culture. *Dis. Aquat. Org.* 27, 67-76.
- Nogami, K. and M. Maeda (1992) : Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus trituberculatus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 49, 2373-2376.
- 清水 潮 (1990) : 細菌叢に関する調査「沿岸環境マニュアル」(日本海洋学会), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 357-372.
- Sindermann, C. J. (1988) : Vibriosis of larval oysters. In "Disease diagnosis and control in North American aquaculture", 2nd ed. (ed. by C. J. Sindermann and D. V. Lightner). Elsevier, Amsterdam, pp. 271-274.
- Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara and K. Muroga (1998a) : *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 33, 111-118.
- Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara, and K. Muroga (1998b) : Pathogenicity of *Vibrio splendidus* biovar II, the causative bacterium of bacillary necrosis of Japanese oyster larvae. *Fish Pathol.*, 33, 79-84.
- Takahashi, K. G., A. Nakamura and K. Mori (2000) : Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.*, 75, 212-217.
- Tubiash, H. S., P. E. Chanley and E. Leifson (1965) : Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.*, 90, 1036-1044.
- Walne, P. R. (1958) : The importance of bacteria in laboratory experiments on rearing the larvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, 37, 415-425.