

平成21年 5月 8日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580219
 研究課題名（和文） プロバイオティクスを用いたヒラメ種苗生産過程の衛生管理法の確立
 研究課題名（英文） Hygienic management in the seed production system for Japanese flounder by probiotic techniques
 研究代表者
 杉田 治男（SUGITA HARUO）
 日本大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号：50139052

研究成果の概要：魚類が細菌感染したときに用いられる化学療法には多くの問題があるため、新たな対処方法が望まれている。本研究では、プロバイオティクス技術を魚類の養殖に応用し、細菌感染症の防除法を確立することを目的とした。乳酸菌やビブリオを魚類腸管から分離して、魚類に投与したところ、魚類飼育水中の病原細菌数が顕著に減少したことから、これらの細菌がヒラメなど多くの魚類のプロバイオティクス菌として有望であることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：プロバイオティクス、ヒラメ、種苗生産、衛生管理、乳酸菌、*Lactococcus lactis*、*Listonella anguillarum*、キチナーゼ

1. 研究開始当初の背景

我が国の主要養殖魚類であるヒラメは完全養殖法が確立しており、授精した卵からふ化した仔魚にはワムシやアルテミアのノープリウス幼生などの餌料生物を投与し、その後、配合飼料などに代えて飼育している。これら餌料生物を摂餌する発生初期段階においては種々の疾病が発生して種苗生産に大きな打撃を与えている。これらヒラメの種苗生産過程では、衛生管理が疾病予防の必須条件となるが、ワムシなどの培養槽は*Vibrio*属などの細菌の温床となっており、殺菌処理を行ってもこ

れらの病原細菌を完全に消滅させることは不可能である。

一般に過密状態で魚類を飼育する養殖場では、大きなストレスが魚類に生じることによって細菌性疾病が多発する。これら感染症の治療には通常、化学療法が採られているが、多用すると薬剤耐性菌の発生を招くことが知られている。一部が残餌や糞便などに残存して養殖場周辺水域に拡散することによって、環境浄化能の低下が危惧されている。さらに食の安全・安心に対する消費者の強い関心を考慮すると、これまでの化学療法に依存する

養魚管理法から防疫中心の養魚管理法に移行することが強く求められている。

2. 研究の目的

研究代表者らは、水産総合研究センター小浜栽培漁業センター構内のヒラメ種苗生産施設における魚病細菌 *Listonella anguillarum* の生態学的研究を行い、本菌がワムシやアルテミアを介在としてヒラメ仔稚魚に運び込まれることを見いだした。この事実は、ヒラメ種苗生産過程における衛生管理を効果的に行うためには、ヒラメだけでなく、これら餌料生物の衛生管理を行う必要があることを強く示すものである。

そこで本研究はプロバイオティクスの技術を用いて、ヒラメ種苗生産過程における防疫法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1)魚類腸管内容物や餌料生物、飼育環境から抗菌活性を有する細菌を分離し、(2)その分類学的位置づけを明らかにするとともに、(3)胃酸および胆汁酸抵抗性や付着性などを測定することによって腸内定着性や病原性などプロバイオティクスとして必要な条件を満たす菌株をスクリーニングするとともに、(4)ワムシおよびアルテミアなどの餌料生物の細菌叢や魚類に投与したときの効果などについても調べた。

以上の研究を遂行するに当たり、基本的な実験方法は以下の通りである。

(1) 細菌の分離・培養には液体培地による増菌培養と寒天培養法を組み合わせを行った。とくに乳酸菌の分離・計数には MRS 培地を基礎培地に用いた。

(2) 分離した細菌の同定には、グラム染色性、細胞形態、運動性、孢子形成能、OF 試験、オキシダーゼおよびカタラーゼなどの表現形質のほか、16S rDNA 塩基配列を解読し、DDBJ/GenBank/EMBL のデータベースから検索した近縁種のデータとの類縁関係を解析して同定した。

(3) 分離した細菌の抗菌活性は、主に二重寒天法を用いて測定した。

(4) 魚病細菌 *Listonella anguillarum* については、35°C で 24 時間培養した TCBS 寒天培地で黄色のコロニー形成を確認した後、VHA 遺伝子の保有を PCR で確認して同定した。

4. 研究成果

研究成果の概要は以下の通りである。

(1) 非汚濁水域であり、近隣に養魚場のない下田市田ノ浦湾の海産魚類の腸管内容物、海砂および海水における魚病細菌

Listonella anguillarum の分布状況を調べた結果、それぞれ 31%、50% および 17% であり、最大密度は 4×10^8 CFU/g、 8×10^2 CFU/g および 5×10^4 CFU/mL に達した(表 1)。供試した魚類はいずれも疾病の徴候がないことから、本菌が、健康な魚類に広く分布する日和見感染菌であるとのこれまでの報告を裏付けた。本菌は、ヒラメの種苗生産環境にも常在するなど、ヒラメと密接な存在であり、単純に養魚用水を殺菌するなどの処理だけでは本菌を防除することは困難であることが判明した。そのため、本菌に対して抗菌活性を有する細菌をプロバイオティクスとして使用することが有効であると示唆された。

表 1. 下田市田ノ浦湾における *Listonella anguillarum* の分布

試料	全試料数	陽性試料数
魚類 (30 種)	88	27
海砂	6	3
海水	6	1
合計	100	31

そこでヒラメの稚魚に魚類腸内細菌 *Vibrio* sp. を経口投与したところ、海水魚類の日和見感染菌である *Vibrio* 属細菌 (*Vibrio* sp. を含まず) の生菌数が 1 桁以上減少していることから、本菌がヒラメのプロバイオティクス菌として有効であることが判明した。

プロバイオティクス菌としてアルテミアなどの甲殻類に投与する場合、細菌から生産されるキチン分解酵素が甲殻類の飼育に作用する可能性があるため、*Vibrio* 属細菌 (*V. proteolyticus* および *V. parahaemolyticus*) 由来のキチナーゼの遺伝子解析を行った。また *V. proteolyticus* の培養液をアルテミアに作用させたところ、致死作用があることが判明した。

(2) 対照実験として、ナマズ腸内容物から分離した抗菌活性陽性の乳酸菌について、分子系統解析および表現形質による同定を行ったところ、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* と同定された。これらの菌株の一部は過酸化水素を生産して魚病細菌の増殖を阻害することが明らかとなった。そこで本菌をキンギョに経口投与したところ、飼育水中の日和見感染菌である *Aeromonas* 属細菌の生菌数が 1 ~ 3 桁程度減少したことから、乳酸菌の経口投与が日和見感染菌の制御に有効であることが判明した (図 1)。

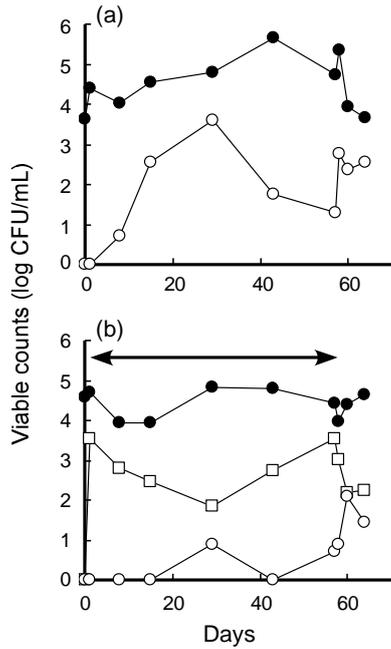


図1.対象区(a)および乳酸菌投与区 (b)における総生菌数 (●), *Aeromonas* (○)および*L. lactis* (□)の経時的变化. 矢印は乳酸菌の投与期間を示す.

以上のように乳酸菌は魚類のプロバイオティクス菌として有望であることから、クサフグ腸内容物から乳酸菌を分離し、16S rDNA塩基配列に基づいて系統分類を行ったところ、本菌は*L. lactis* subsp. *lactis*と同一であった(図2)。

さらにクサフグおよびナマズ由来の乳酸菌*L. lactis* subsp. *lactis*の性状を比較したところ、両者共に37°Cで高い増殖速度を示したものの、前者は高塩分、高海水濃度でも高い増殖能を有することから、海水環境に適していることが判明した。

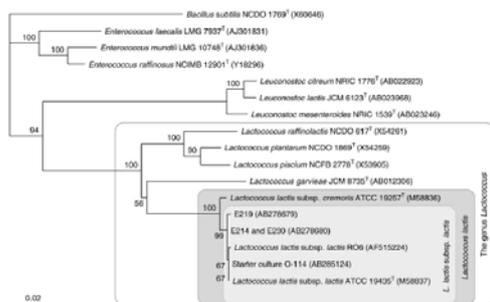


図2. 16S rDNA塩基配列に基づくクサフグ由来の乳酸菌の分子系統樹(近隣結合法).

(3) ヒラメなどの海産魚類種苗生産に餌料生物として普遍的に用いられるシオミズツボウムシとアルテミア耐久卵の細菌叢を平板法と16S rDNA塩基配列による同定法を組み合わせを行った。その結果、シオミズツボウムシでは、*Flavobacterium* sp., *Thalassospira* sp., *Pseudomonas* sp.などが優占した。一方、アルテミア耐久卵には *Bacillus* spp., *Salana* sp., *Psychrobacter* spp.などが優占したが、魚病細菌の *Vibrio* 属は検出されなかった。

(4) 以上の結果から、魚類腸内に生息する乳酸菌やある種の *Vibrio* 属細菌のなかにヒラメ種苗生産過程での魚病細菌を効果的に抑制するプロバイオティクス菌が含まれていることが判明した。本研究では時間的制限のため、ワムシおよびアルテミアに直接投与するには至らなかったが、本研究機関終了後も継続して研究を遂行しており、近い将来、ワムシおよびアルテミアにおける防疫はある程度目処がつくものと確信している。このように魚類ではなく、餌料生物のためのプロバイオティクスの研究は前例がなく、確立したときのインパクトは極めて大きいと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計13件)

- ① H. Sugita, T. Fujie, T. Sagesaka and S. Itoi (2009): The effect of *Lactococcus lactis* on the abundance of aeromonads in the rearing water of the goldfish, *Carassius auratus* (Linnaeus). *Aquacult. Res.* (in press), 査読有.
- ② 杉田治男、駒田朋之、吉原喜好(2009): 伊豆下田沖の海底から回収されたナイロンテグス表面に形成されたバイオフィルムの微生物群集. 日水誌 (印刷中), 査読有.
- ③ S. Itoi, K. Yuasa, S. Washio, T. Abe, E. Ikuno and H. Sugita (2009): Phenotypic variation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolates derived from intestinal tracts of marine and freshwater fishes. *J. Appl. Microbiol.* (in press), 査読有.
- ④ H. Sugita, T. Fujie, T. Sagesaka and S. Itoi (2009): Biocontrol of aeromonads in freshwater culture ponds by oral administration of *Lactococcus lactis*. *Proceedings of the WFC 2008*, **6b02**, 1-2, 査読無.
- ⑤ C. Tsuchiya, T. Sakata and H. Sugita (2009):

- Cetobacterium somerae*, a predominant anaerobe in the intestinal tracts of freshwater fish. *Proceedings of the WFC 2008*, **6b01**, 1-2, 査読無.
- ⑥ S. Itoi, T. Abe, S. Washio, E. Ikuno, K. Yuasa and H. Sugita (2009): Novel halotolerant isolates of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, isolated from intestinal tract of coastal fish. *Proceedings of the WFC 2008*, **4b08**, 1-2, 査読無.
- ⑦ R. Ueda, Y. Koide, T. Sato and H. Sugita (2009): Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in marine animals of Japanese coastal waters. *Proceedings of the WFC 2008*, **2a08**, 1-2, 査読無.
- ⑧ S. Itoi, T. Abe, S. Washio, E. Ikuno, Y. Kanomata and H. Sugita (2008): Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *Int. J. Food Microbiol.*, **121**, 116-121, 査読有.
- ⑨ H. Sugita, H. Mizuki and S. Itoi (2008): Prevalence of a fish pathogen, *Listonella anguillarum* in the intestinal tract of fish collected off the coast of Japan. *Aquacult. Res.*, **39**, 103-105, 査読有.
- ⑩ C. Tsuchiya, T. Sakata and H. Sugita (2008): Novel ecological niche of *Cetobacterium somerae*, an anaerobic bacterium in the intestinal tracts of freshwater fish. *Lett. Appl. Microbiol.*, **46**, 43-48, 査読有.
- ⑪ S. Itoi, Y. Kanomata, Y. Koyama, K. Kadokura, S. Uchida, T. Nishio, T. Oku and H. Sugita (2007): Identification of a novel endochitinase from a marine bacterium *Vibrio proteolyticus* strain No. 442. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1774**, 1099-1107, 査読有.
- ⑫ H. Sugita, K. Ohta, A. Kuruma and T. Sagesaka (2007): An antibacterial effect of *Lactococcus lactis* isolated from the intestinal tract of the Amur catfish, *Silurus asotus* Linnaeus. *Aquacult. Res.*, **38**, 1002-1004, 査読有.
- ⑬ K. Kadokura, A. Rokutani, M. Yamamoto, T. Ikegami, H. Sugita, S. Itoi, W. Hakamata, T. Oku and T. Nishio (2007) Purification and characterization of *Vibrio parahaemolyticus* extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **75**, 357-365, 査読有.
- [学会発表] (計 11 件)
- ① 湯浅航平、糸井史朗、阿部剛士、杉田治男: 異なる環境から分離した乳酸菌 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の性状の比較. 2009 年度日本水産学会春季大会、2009 年 3 月 28 日、東京海洋大学.
- ② H. Sugita, T. Fujie, T. Sagesaka and S. Itoi: Biocontrol of aeromonads in freshwater culture ponds by oral administration of *Lactococcus lactis*. 5th World Fisheries Congress, 2008 年 10 月 21-22 日, Pacifico Yokohama.
- ③ C. Tsuchiya, T. Sakata and H. Sugita: *Cetobacterium somerae*, a predominant anaerobe in the intestinal tracts of freshwater fish. 5th World Fisheries Congress, 2008 年 10 月 21-22 日, Pacifico Yokohama.
- ④ S. Itoi, T. Abe, S. Washio, E. Ikuno, K. Yuasa and H. Sugita: Novel halotolerant isolates of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, isolated from intestinal tract of coastal fish. 5th World Fisheries Congress, 2008 年 10 月 21-22 日, Pacifico Yokohama.
- ⑤ R. Ueda, Y. Koide, T. Sato and H. Sugita: Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* in marine animals of Japanese coastal waters. 5th World Fisheries Congress, 2008 年 10 月 21-22 日, Pacifico Yokohama.
- ⑥ H. Sugita and S. Itoi: *Lactococcus lactis* as a possible biocontrol agent against opportunistic pathogens in freshwater aquaculture. World Aquaculture 2008, 2008 年 5 月 20-22 日, Busan, Korean.
- ⑦ 糸井史朗、吉村 聡、幾野英里花、松本 健、杉田治男: ヒメダカの飼育水中の細菌叢について. 2008 年度日本水産学会春季大会、2008 年 3 月 30 日、東海大学.
- ⑧ 杉田治男: プロバイオティクス「魚病対策の新たな方向性」、平成 19 年度第 2 回日本水産学会水産増殖懇話会講演会、2008 年 2 月 10 日、東京大学.
- ⑨ 鹿股悠奈、糸井史朗、内田晋輔、門倉一成、西尾俊幸、奥忠武、杉田治男: *Vibrio proteolyticus* 由来キチナーゼの pH 依存性に及ぼす C 末端領域の影響. 2007 年度日本水産学会秋季大会、2007 年 9 月 26 日、北海道大学.
- ⑩ 糸井史朗、阿部剛士、鷺尾明佳、幾野英里花、鹿股悠奈、杉田治男: 海産魚類の腸管から分離した乳酸菌 *Lactococcus lactis* の性状. 2007 年度日本水産学会秋季大会、2007 年 9 月 26 日、北海道大学.
- ⑪ 鹿股悠奈、糸井史朗、門倉一成、西尾俊幸、奥忠武、杉田治男: 魚類腸内細菌 *Vibrio proteolyticus* 由来エンドキチナーゼの精製および活性におよぼす C 末端領域の影響. 日本水

産増殖学会第6回大会、2007年7月18日、
東京海洋大学。

〔図書〕(計 2件)

- ① 杉田治男 (編著) : 恒星社厚生閣、養殖の水と餌-陰の主役たち. 2008年, 183 p.
- ② 藤井建夫、杉田治男、左子芳彦 (編著) : 恒星社厚生閣、微生物の利用と制御-食の安全から環境保全まで. 水産学シリーズ 155, 2007年, 143 p.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉田 治男 (SUGITA HARUO)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号 : 50139052

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし