

学 位 論 文 題 名

Ecology of abalone pathogenic *Vibrio harveyi* in
aquaculture environments

（アワビ養殖環境における *Vibrio harveyi* の生態に関する研究）

学位論文内容の要旨

アワビは世界規模で流通されている水産物の一つである。世界のアワビ生産量は 1968 年にピークに達した後、1994 年までは減少し続け、日本の生産量もほぼ同様の傾向にある。最近 5 年間では中国及び韓国でアワビ養殖技術が向上し世界生産量の急速な回復が見られるのに対し、日本の生産量は横ばい状態である。日本のアワビ生産量の低下の主たる原因は乱獲及び微生物感染症である。

北海道の熊石アワビ養殖場は年間約 200 万個体の種苗生産が可能であり、北海道のアワビ資源の安定供給に大きな役割を担ってきた。しかし、1990 年代以降、夏の高水温期に *Vibrio harveyi* の感染を原因とする養殖エゾアワビ（*Haliotis discus hannai*）の大量死が発生し北海道のアワビ生産事業の大きな障害になっている。この感染症で死亡した個体は心臓・腎臓が位置する鰓の基部周辺に浮腫を伴い、外観所見では腹部の膨満が観察されることから「腹部膨満症」として知られている。

V. harveyi の感染による海洋動物の大量死は、世界 19 ヶ国、35 魚種で報告されているが、エゾアワビへの感染例の報告はいままでにない。アワビの種苗生産事業をより安定的に行うためには、本菌のアワビへの感染動態を明らかにし、防除対策を構築する必要がある。そこで、本研究ではエゾアワビ養殖環境での *V. harveyi* の生態を解明することを目的とし、本菌の迅速で正確な特異検出法の構築、この方法を用いたアワビ養殖環境における本菌の分布と変動、それに影響を及ぼす環境要因の解明を行った。さらに環境やヒトに対し無害なハーブの本菌に対する抗菌効果を調べた。

はじめに、*V. harveyi* を迅速かつ正確に検出する 2 種類の方法を開発した。第 2 章の第 1 節ではコロニー PCR 法を構築した。*V. harveyi* の標準株の 16S rRNA 遺伝子配列を再解析し、

データベース上の塩基配列が誤読領域を含むことを見いだした。その領域に VHARR プライマーが会合するよう塩基配列を調整し、アニーリング温度 60°C、サイクル数を 20 回とした PCR 反応を行うことにより、*V. harveyi* の特異検出が可能となることを明らかにした。この PCR 条件は細菌集落を鋳型 DNA としても特異性が維持されたことから、*V. harveyi* のコロニー PCR 法を構築することができた。本法を用いることにより、環境試料の培養から始めて *V. harveyi* を 3 日以内に検出及び定量することが可能になった。第 2 節では培養をすることなく *V. harveyi* の定量が可能な real-time PCR 法を構築した。*V. harveyi* の 16S rRNA に見られる特異領域を RTVHA プローブが会合するように設計し、アニーリングと伸長温度を 68°C とする条件で *V. harveyi* の特異検出が可能になった。レジンを用いた鋳型 DNA の抽出法と併用することで、わずか 1mL の海水から 6.0×10^1 CFU/mL の *V. harveyi* を検出することに成功した。本法により 5 時間以内に海水中の *V. harveyi* を定量できる。両検出法ともこれまで *V. harveyi* と区別が困難であった近縁菌種を見極めることができた。

次にアワビ養殖場周辺環境における *V. harveyi* の分布と変動を明らかにした。2003 年～2007 年の間、毎年 7 月～9 月に、熊石アワビ養殖場の海水およびアワビ個体を採取し、本研究で開発した特異検出法を用いて *V. harveyi* 生菌数を定量した。第 3 章の第 1 節では養殖場における *V. harveyi* の分布と変動を調べた。アワビの大量死が発生する 2 週間前では養殖場周辺の沿岸海水で *V. harveyi* の検出率は 58%、その菌数は 10^3 - 10^4 CFU/L と高かった。この結果は *V. harveyi* の初期感染源が養殖場周辺の沿岸域であることを示唆する。そして大量死の 1 週間前では飼育用水および飼育水槽水の全ての試料から *V. harveyi* が検出され、それらの菌数は飼育用水で 10^2 CFU/L、飼育水槽水で 10^2 - 10^5 CFU/L であった。大量死が発生した水槽では 10^4 - 10^6 CFU/L に菌数が増加した。さらに real-time PCR 法により大量死が発生した水槽からは 1.8×10^2 CFU/mL の菌数が定量された。大量死発生前のアワビのエラからは 9.0×10^1 CFU/abalone の *V. harveyi* が検出された。大量死発生中にはエラに加え内臓でも *V. harveyi* の菌数が増加し内臓で 10^4 CFU/abalone 以上となった。これらの結果からアワビ大量死の発生頻度を高める *V. harveyi* 菌数の閾値は、水槽水で 10^4 CFU/L、エラ及び内臓でそれぞれ 10^4 - 10^5 CFU および 10^5 - 10^6 CFU/abalone であると推察した。従って *V. harveyi* の菌数をこれら以下に保つことが大量死を防ぐ手段になると考えられた。

第 2 節では *V. harveyi* の初期感染源と考えられた沿岸域を対象とし、過去 5 年間の 8-9 月に得られた *V. harveyi* の菌数及びアワビ死亡数と相関が認められる環境要因を調べた。その

結果 *V. harveyi* の平均菌数と強い相関が認められた環境要因は、平均水温($r_s=0.80$)、アワビ累積死亡数($r_s=0.90$)及び Chla 平均濃度($r_s=-0.8$)であった。*V. harveyi* の平均菌数と平均水温あるいはこれとアワビ累積死亡数の重相関係数はそれぞれ $R=0.955$ 及び $R=0.931$ であった。この相関解析で導き出された回帰式に基づくと $n^{\circ}\text{C}$ の水温上昇により *V. harveyi* 菌数は 2.5^n 倍に、アワビ死亡数は 21^n 倍に増加することが明らかになった。IPCC の A2 シナリオに従うと 100 年後のこの養殖場周辺海域の水温は最大で 2°C 上昇すると予測され、得られた回帰式から 100 年後の年間アワビ死亡数は 2,200 万に達すると予測された。*V. harveyi* は多様な海洋動物への感染性が報告されていることから、将来、地球温暖化による水温上昇傾向が続けば、*V. harveyi* の感染リスクはアワビに留まらず、海洋動物の生物多様性に大きな負の影響を及ぼす可能性がある。

第 4 章では、*V. harveyi* の感染によるアワビ大量死の抑制対策としてスパイスの *V. harveyi* に対する抗菌効果を調べた。供試した 25 種のスパイスの中で高い抗菌活性を示したものは、クローブ、ガーリック及びマジョラムであった。また、ガーリックとマジョラムの抽出液は海水中での作用が安定であり *V. harveyi* に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.125% であった。この濃度で 10^3 - 10^4 CFU/mL の *V. harveyi* に作用させると 12 時間以内に検出限界以下となった。マジョラム抽出液に比べガーリック抽出液のアワビに対する急性毒性 (LD_{50}) は 0.033% と高くアワビへの使用は困難であった。そこで 0.125%(w/v) のマジョラム乾燥粉末をガーゼで包みアワビ飼育水槽に垂下した後、*V. harveyi* 菌液に暴露したアワビを供試して飼育試験を行ったところ、エラに付着する *V. harveyi* の菌数は 6 時間後までに 1/10 に減少した。これらの結果はマジョラムがアワビ飼育水及びアワビのエラに付着した *V. harveyi* 菌数を減少させるのに効果的であることを示す。

以上、本研究で得られたアワビ養殖環境における *V. harveyi* の生態に関する知見から *V. harveyi* の感染によるアワビ大量死を防ぐための実践的な方策として、① リモートセンシングデータを活用したアワビ養殖場周辺水域の水温上昇パターンの監視とこのデータに基づく大量死発生の予測を行いながら、② スパイスを活用したアワビ飼育環境下の *V. harveyi* 菌数の制御及び ③ 熊石の地域性を生かした海洋深層水によるアワビ飼育水の水温制御、を組み合わせることを提案する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 澤 辺 智 雄

副 査 教 授 吉 水 守

副 査 教 授 荒 井 克 俊

学 位 論 文 題 名

Ecology of abalone pathogenic *Vibrio harveyi* in aquaculture environments

(アワビ養殖環境における *Vibrio harveyi* の生態に関する研究)

Vibrio harveyi は多種多様な海洋動物に病原性を持つ細菌である。北海道の基幹エゾアワビ養殖場では本菌の感染によるアワビ大量死が発生し、種苗生産事業の障害となっている。アワビ養殖場における本菌の分布や変動及びアワビへの感染動態は未解明の課題である。本論文はアワビの *V. harveyi* 感染症の防除対策の構築に向けた基礎的知見を得ることを目的として、養殖環境における本菌の生態を明らかにした。特に評価される成果は以下のとおりである。

1. *V. harveyi* を正確かつ迅速に検出する 2 種類の方法を構築した。1 つはコロニーPCR 法であり、*V. harveyi* の細菌集落を鋳型 DNA とし、アニーリング温度を 60°C、サイクル数を 20 回とした PCR 条件とすることで *V. harveyi* の特異検出が可能であることを示し、環境試料の培養から始めて *V. harveyi* を 3 日で検出することが可能になった。もう 1 つはリアルタイム PCR 法であり、これは細菌の培養を行うことなく *V. harveyi* の定量が可能である。アニーリングと伸長温度を 68°C とする条件が *V. harveyi* の特異検出に適しており、キーレックスレジンを用いた鋳型 DNA の抽出法と併用することで海水中の *V. harveyi* を 5 時間以内に定量できることを示した。
2. 開発した上記の特異検出法を用いて、熊石のアワビ養殖場における *V. harveyi* の分布と変動を明らかにした。2003 年から 2007 年の間、毎年 7-9 月に、養殖場の海水及びアワビを採取し、*V. harveyi* の生菌数を定量した。アワビの大量死が発生する 2 週間前の養殖場周辺の沿岸海水では、*V. harveyi* の検出率及び菌数はそれぞれ 58%及び 10^3 - 10^4 CFU/L と高く、*V. harveyi* の初期感染源が沿岸域であることを示した。大量死が発生した水槽ではその菌数は 10^4 - 10^6 CFU/L に増加した。大量死発生前のア

ワビのエラからは 90 CFU/アワビ個体の *V. harveyi* が検出された。大量死発生中には内臓の *V. harveyi* 菌数は 10^4 CFU/アワビ個体まで増加した。アワビ大量死の発生頻度が高くなる *V. harveyi* 菌数は、水槽水で 10^4 CFU/L, エラ及び内臓でそれぞれ 10^4 - 10^5 及び 10^5 - 10^6 CFU/アワビ個体であると推定した。

3. *V. harveyi* 平均菌数及びアワビの累積死亡数と強い相関を示すアワビ養殖場沿岸海水の環境要因を解析した。*V. harveyi* の平均菌数と強い相関が認められた要因は、平均水温 ($r_s=0.80$) 及びアワビの累積死亡数 ($r_s=0.90$) であった。さらに、平均水温と *V. harveyi* の平均菌数あるいはこの水温とアワビ累積死亡数の重相関係数はそれぞれ $R=0.955$ 及び $R=0.931$ であった。この相関解析で導き出された回帰式に基づくと $n^\circ\text{C}$ の水温上昇により *V. harveyi* 菌数は 2.5^n 倍に、アワビ死亡数は 21^n 倍に増加することが明らかになった。IPCC の A2 シナリオでは 100 年後のその養殖場周辺海域の水温は最大で 2°C 上昇すると予測されたことから、この値を回帰式に当てはめたとすると 100 年後の年間アワビ死亡数は 2,200 万に達すると予測された。*V. harveyi* は多様な海洋動物への感染性が報告されていることから、将来、地球温暖化による水温上昇傾向が続けば、海洋動物の生物多様性に大きな負の影響を及ぼす可能性が推察された。
4. *V. harveyi* 感染症の抑止対策としてスパイスの *V. harveyi* に対する抗菌効果を調べた。ガーリックとマジョラムは高い抗菌活性を示した。また、これら抽出液の *V. harveyi* に対する最小発育阻止濃度は 0.125% であった。0.125% (w/v) のマジョラムをガーゼで包みアワビ飼育水槽に沈めた後、*V. harveyi* 菌液に暴露したアワビを供試したところ、エラに付着する *V. harveyi* の菌数は 6 時間後までに 1/10 に減少させる効果を示した。
5. 本研究で得られた知見から *V. harveyi* 感染によるアワビ大量死を防ぐための実践的な方策として、①リモートセンシングデータを活用した養殖場周辺水域の水温上昇パターンに基づく大量死発生の予測を行いながら、②熊石の地域性を生かした海洋深層水によるアワビ飼育水の水温制御、を組み合わせることを提案した。

以上の成果は、5 年間にわたるモニタリング研究によりアワビ養殖環境における *V. harveyi* の生態を明らかにしたのみならず、自然水域の海水温が *V. harveyi* の菌数とアワビの死亡数に影響することをはじめ示したものである。また、研究結果に基づき現場で実行可能な防除対策を提案した。これらの知見はアワビ以外の海洋動物に対する *V. harveyi* 感染症のリスク評価と防除にも応用が期待される。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。