

## 挿核手術後のアコヤガイ血中細菌の消長について

誌名	愛媛県水産試験場研究報告
ISSN	03882098
著者	和田, 有二
巻/号	5号
掲載ページ	p. 43-55
発行年月	1992年6月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 挿核手術後のアコヤガイ血中細菌の消長について

和田 有二<sup>\*1</sup>

### The Variation of Bacterial Flora and Serum Protein in Blood of Japanese Pearl Oyster, *Pinctada fucata*, after Nucleus Insertion

Yuji WADA

アコヤガイの細菌による病害に関する研究は少なく、小竹<sup>1)</sup>が徳島県那佐湾において、グラム陰性陰性桿菌および双球菌による挿核後の軟体部の液化現象を報告している。また小竹<sup>2)</sup>は、阿南市橋湾のへい死アコヤガイから *Vibrio* spp. および *Pseudomonas* spp. を分離し報告している。さらに、近年アワビの細菌性疾患<sup>\*2</sup>として一部の *Vibrio* が重要視されているが、いずれの場合も病現性の復元が困難なこともあり、分離菌が偏性病原菌であるのか、腐敗細菌的な性格をもつものなのか確認されてない状況にある。

筆者は、1985年愛媛県津島町においてアコヤガイのへい死調査を行い、挿核貝および母貝の血中細菌数を測定したところ、調査貝の80% (18/19個) の血液から細菌が検出され細菌数は  $10^1 \sim 10^4$  CFU/ml であった。分離菌はすべて *Vibrio* spp. に分類され、そのうち1種は *V. alginolyticus* に同定された。(未発表)

このような経過から、本研究では挿核後のアコヤガイ血中細菌数の変動および消長について、海水中の細菌叢との関連も含めて調査を行い、また合わせて、挿核時の手術道具およびピースの消毒の効果について検討した。さらに、アコヤガイの健康度の指標として注目されている血清タンパク量<sup>3)</sup>の変動についても調査したので報告する。

なお、本研究の一部は全国真珠養殖漁業協同組合連合会養殖技術研究会 (1987年2月27日伊勢市) において発表された。

#### 材料および方法

**供試アコヤガイ** 1984年愛媛県内海産稚貝を、愛媛県宇和島市遊子漁場で養殖した満2年貝 (平均重量41g) を、同漁場において1985年12月~1986年4月の間抑制を行った後供試した。

\*1 愛媛県中予水産試験場

\*2 福岡県栽培漁業公社、剥離以降の飼育について (話題提供) : 昭和61年度アワビ種苗生産担当者会議資料

1986年4月14日に抑制貝のうち10個を選別し、採血後、個体識別のために貝殻外面に標識を付けた。挿核は同年4月29日に行い、20日間の養生後、5月19日に沖合養殖漁場に沖出した。抑制漁場、養生漁場および養殖漁場は図1に示す通りである。沖出し後の養殖管理は、遊子漁場における一般的な方法に従った。供試貝の区分は、挿核後に消毒作業を行った5貝をSTR-1~5、消毒作業を行わなかった5貝をCON-1~5とした。また、採血処理の影響を調べるための対照貝として、STR、CONともに、供試貝とは別にそれぞれ5貝に挿核し同様に養殖した。

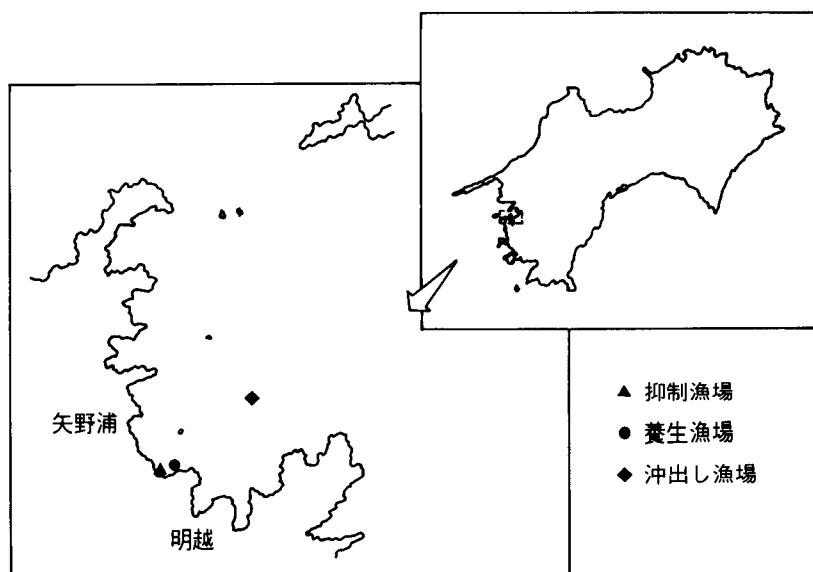


図1 調査漁場

**手術道具およびピースの消毒** 手術道具（開口器、メス、挿入器、細胞台）は、使用前に0.1% 塩化ベンゼトニウム溶液（三共株式会社ハイアミン液）に10分間浸漬後、水道水で洗浄した。ピースは、外套膜採取後、あらかじめ消毒した細胞台上で細片にした後、ニフルスチレン酸ナトリウム（上野製薬株式会社 水産用エルバジン N100）20~30mcg/ml 溶液をスポイドで滴下した。消毒された手術道具およびピースを用いて、常法により挿核手術を行った。

**血液採取** 船越ら<sup>3)</sup>の方法に従い、毎月1回、STR-1~5およびCON-1~5の閉殻筋から滅菌シリンジを用いて0.6~0.8mlの血液を採取した。採血は午前11~12時の間に行い、採血後の血液試料は滅菌容器に入れ、氷冷して実験室に持ち帰った。

**海水の採取** 調査日の養殖漁場の表層水を、滅菌ポリ容器に採取し、氷冷して実験室に持ち帰った。

**生菌数測定用培地** 上記試料の一般海洋細菌数測定用には、ZoBell 2216E 寒天培地（Bacto-peptone 5.0g, Ferric phosphate 0.1g, Bacto-yeast extract 1.0g, Bacto-agar 15.0g, Sea water 1000ml, pH 7.6）を用いた。白糖分解菌数測定用には、BTB ティーボール寒天培地（栄研化学株式会社）を、腸球菌数測定用培地には AE 寒天培地（Bacto-peptone 10.0g, Bacto-yeast ex-

tract 5.0g, NaCl 5.0g,  $K_2HPO_4$  4.0g,  $KH_2PO_4$  1.5g,  $NaN_3$  0.5g,  $FePO_4 \cdot H_2O$  0.5g, Esculin 1.0g, Bacto-agar 15.0g, DW 1000ml, pH 8.0) を用いた。

**生菌数の測定** 血液試料および海水試料の原液、 $10^{-1}$ 希釈液、 $10^{-2}$ 希釈液、 $10^{-3}$ 希釈液のそれぞれ0.1mlを生菌数測定用培地に塗抹し、ZoBell 2216E 寒天培地およびBTB ティーボール寒天培地は25°C、48時間、AE 寒天培地は、37°C、72時間培養後、出現したコロニー数を計数し、原液1ml当たりの生菌数を求めた。

**菌株の分離および同定** ZoBell 2216E 寒天培地に発育した細菌をコロニーの性状により識別しコロニー1種類あたり5株を分離、保存し、多賀<sup>4)</sup>の同定図式に従って属レベルまでの分類を行った。

**血清タンパク量の定量** 細菌数測定後の血液試料は、直ちに8000rpm、5分間遠心処理を行い上澄液をタンパク分析用試料とした。タンパク質量の測定は、船越<sup>3)</sup>らの方法に従いLowry法により行った。標準液には牛血清アルブミン (SIGMA 社) を用いた。

## 結果および考察

海水の細菌数および細菌叢の季節変化を図2に、消毒作業員における血中細菌数、細菌叢および血清タンパク量の変化を図3に、対照員における血中細菌数、細菌叢および血清タンパク量の変化を図4に示した。また、それぞれの供試員における血中細菌数、細菌叢および血清タンパク量の変化を付図1～10に示した。

### 海水の細菌数および細菌叢の季節変化

海水の細菌数は、年間を通して $10^2 \sim 10^3$ CFU/mlであり、夏季(6～9月)に多く、秋季～冬季(10～11月)にやや減心する傾向がみられた。

細菌叢は、6月および12月を除いて *Vibrio* および *Aeromonas* 属が優占種で、分離菌株の60～100%を占めた。他の菌種では、*Achromobacter* (4月32%)、*Acinetobacter* (6月81%、8月15%、9月20%)、*Flavobacterium* (9月0.3%) および *Micrococcus* (7月11%) が分離された。また12月の調査では *Vibrio* および *Aeromonas* 属が6%に減少したのに対し、*Staphylococcus* が76%、*Streptococcus* が8%と、腸球菌類が全体の84%を占めた。

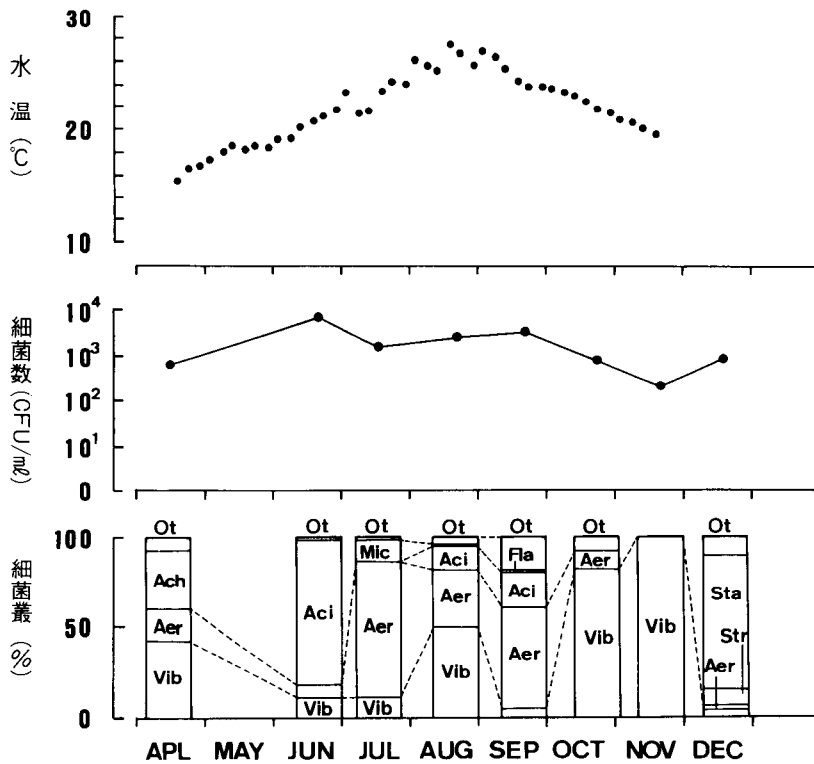


図2 海水の細菌数および細菌叢の季節変化

Vib : Vibrio	Aer : Aeromonas
Aci : Acinetobacter	Ach : Achromobacter
Fla : Flavobacterium	Cyt : Cytophaga
Mic : Micrococcus	Sta : Staphylococcus
Str : Streptococcus	Ot. : その他および未同定

#### 消毒作業員における血中細菌数、細菌叢および血清タンパク量の変化

**生残率** 非採血員では、調査期間中にへい死は認められず、消毒作業によるアコヤガイへの直接的な影響はないものと思われた。採血員では、6月19日、10月22日、11月19日にそれぞれ1貝ずつのへい死があり、生残率は40%であった。血中細菌とへい死の間には、後述するように直接的な関連はないように思われ、これらへい死は採血による影響と考えられた。船越ら<sup>31</sup>によると、閉殻筋からの0.1~0.2mlの連続採血によりアコヤガイのへい死は認められないとされているが、本調査では、1回の採血量が0.6~0.8mlと、船越らに比べ多量であったため採血による影響が出たものと考えられ、今後、閉殻筋からの連続採血においては採血量に充分注意すべきであると思われた。

**血清タンパク量** 挿核前の平均血清タンパク量は1.43mg/mlであった。挿核後の平均血清タンパク量は0.62mg/mlで挿核前の43%であり、9月下旬までタンパク量の回復は認められなかった。生残員では10月以降徐々にタンパク量の回復が認められ、11月の調査時には1.75mg/mlと挿核前のレベルにまで上昇した。

**血中細菌数および細菌叢** 血液試料からの細菌の検出率は、4月80% (4/5貝)、5月100% (5/5貝)、6月75% (3/4貝)、7月75% (3/4貝)、8月50% (2/4貝)、9月25% (1/4貝)、10月33% (1/3貝)、11月50% (1/2貝)、12月50% (1/2貝)であった。挿核前の平均細菌数は $1.5 \times 10^3$ CFU/mlで、細菌叢は *Vibrio* 52%、*Aeromonas* 11%、*Acinetobacter* 13%、*Achromobacter* 22%であり、海水中の細菌叢にはほぼ類似していた。挿核直後は、すべての試験貝の血液から細菌が検出され、細菌数は $1.4 \times 10^4$ CFU/mlで挿核前の10倍であった。細菌叢は *Vibrio* が圧倒的に多く全体の92%を占めた。6月以降血中細菌数は徐々に減少し、11月の生残貝では7CFU/mlであった。細菌叢は一部の調査日を除き *Vibrio* が優占種で全体の70~100%を占めた。12月の調査時まで生残した2貝 (STR-1、5) における血中細菌数の変化をみると、挿核後の血中細菌数が挿核前のレベルに下がるには、4~5ヶ月の期間を要すると考えられた。

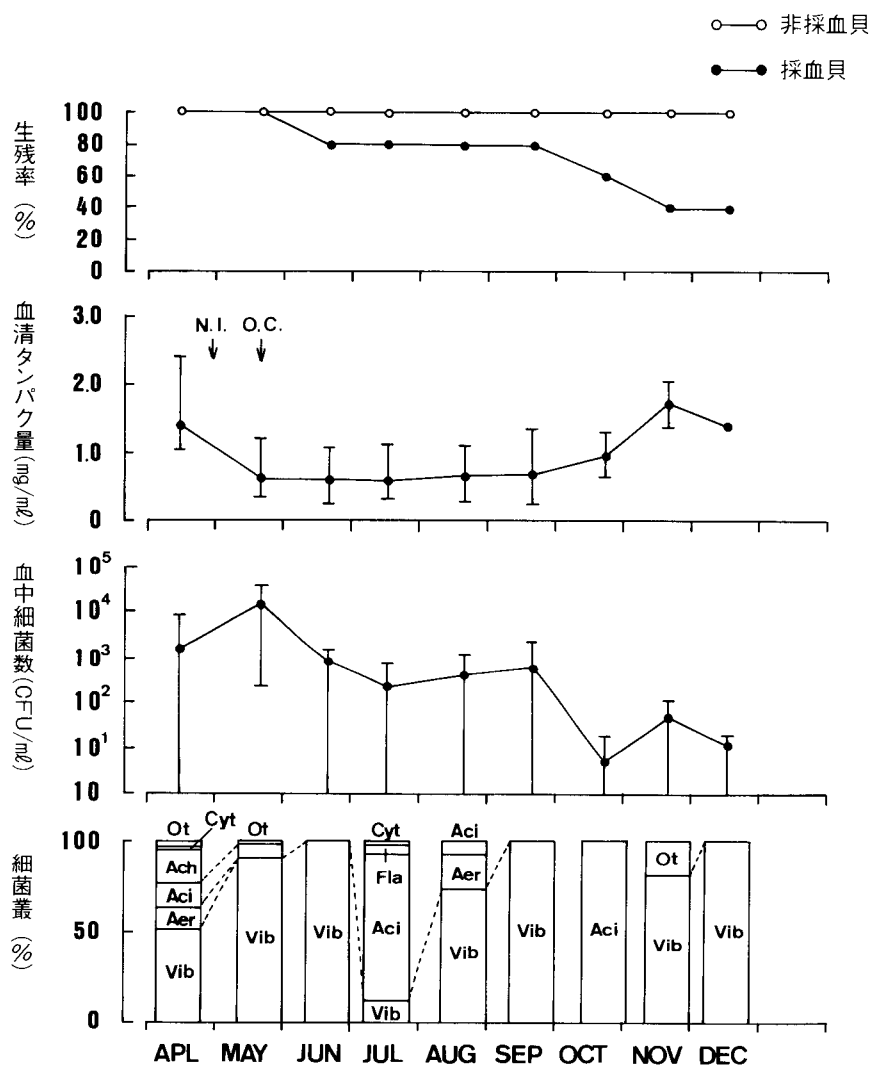


図3 消毒作業員 (STR) における生残率、血清タンパク量、血中細菌数および細菌叢の変化  
(N.I.:挿核、O.C.:沖出し)

### 非消毒作業員における血中細菌数、細菌叢および血清タンパク量の変化

**生残率** 非採血貝では調査期間中にへい死は認められなかった。採血貝では8月21日に2貝、10月22日に1貝のへい死があり、生残率は40%であった。

**血清タンパク量** 挿核前の平均血清タンパク量は1.08mg/mlであった。挿核後の平均血清タンパク量は0.52mg/mlで挿核前の48%に減少した。生残貝では、消毒作業員と同様に9月以降徐々にタンパク量の回復がみられ、11月の調査時には1.26mg/mlであった。

**血中細菌数および細菌叢** 全血試料からの細菌の検出率は、4月80% (4/5貝)、5月100% (5/5貝)、6月60% (3/5貝)、7月60% (3/5貝)、8月33% (1/3貝)、9月0%、10月0%、11月50% (1/2貝)、12月0%であった。挿核前の平均血中細菌数は $8.2 \times 10^2$ CFU/mlで、細菌叢は *Vibrio* 56%、*Aeromonas* 12%、*Acinetobacter* 27%であり、消毒作業員と同様、海水中の細菌叢にほぼ類似していた。挿核直後はすべての試験貝の血液から細菌が検出され、細菌数は $9.7 \times 10^3$ CFU/mlで挿核前の10倍で、細菌叢は *Vibrio* が99%であった。その後の細菌数および細菌叢の変化は消毒作業員と同様の経過を示した。12月の調査時まで生残した2貝 (CON-2、5) の血中細菌数の変化も消毒作業員と同様の推移を示した。

死亡貝における血中細菌数は、へい死前に増加しているものが2貝 (STR-3、4)、減少しているものが3貝 (CON-1、3、4) であり、血中細菌数とへい死との間には明確な関連は認められなかった。

挿核手術に伴って、海洋細菌がアコヤガイの体内に侵入することは容易に推察できる。一方で、アコヤガイは開放血管系を持つことから、体表面および消化器系からの細菌の侵入も常にあると考えられる。

奥積ら<sup>5)</sup> は、広島湾における養殖カキの細菌フローラの季節変化を調査し、 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mlの細菌がカキ軟体部に存在し、分離菌の91%が *Vibrio* spp. に同定され、海水細菌叢と明らかに異なることを報告している。また、外国産のハマグリ (beam clam, northern razor clam, gaper clam, soft shell clam)、ニオイガイ (mud piddock) の消化管細菌フローラに関する研究<sup>6), 7)</sup> の結果においても、供試動物の細菌フローラにおける優占率は *Vibrio* spp. であった。

Simidu *et al.*<sup>8)</sup> は、千葉県外房沿岸海水中の動物および植物プランクトンに付着している細菌の70%以上を *Vibrio*-*Aeromonas* 属が占めているという報告をしていることから、これら貝類の消化管細菌フローラは餌料プランクトンに由来すると考えられる。

これらのことは、アコヤガイにおいても体内細菌フローラが存在することを示唆しており、細菌の体内侵入がすべての場合アコヤガイの生理機能に悪影響を与えるとも考え難い。

調査結果から、アコヤガイの血中細菌叢においては、ほぼ全期間を通して *Vibrio* spp. が優占であり、血中細菌数とへい死の間には明確な関連が認められなかったことから、アコヤガイにおいても細菌フローラとしての *Vibrio* spp. の存在が示唆された。今後は、消化管細菌フローラと血中細菌フローラとの関係について検討する必要があると考えられた。

小竹<sup>1)</sup> が分離したアコヤガイ病原細菌は、性状試験結果より、*Enterobacteriaceae* および *Streptococcus* spp. に分類されると考えられた。また、小竹<sup>2)</sup> はへい死アコヤガイから分離した細菌を *Vibrio* spp. および *Pseudomonas* spp. に同定している。

*Enterobacteriaceae* および *Streptococcus* spp. は、海水環境中では陸上由来の汚染指標菌として存在しており、*Pseudomonas* spp. は魚類の体表に存在し、死後の腐敗に関与する細菌であることから抑制漁場または養生漁場がこれらの細菌の汚染を受けた場合、これらの細菌がアコヤガイ

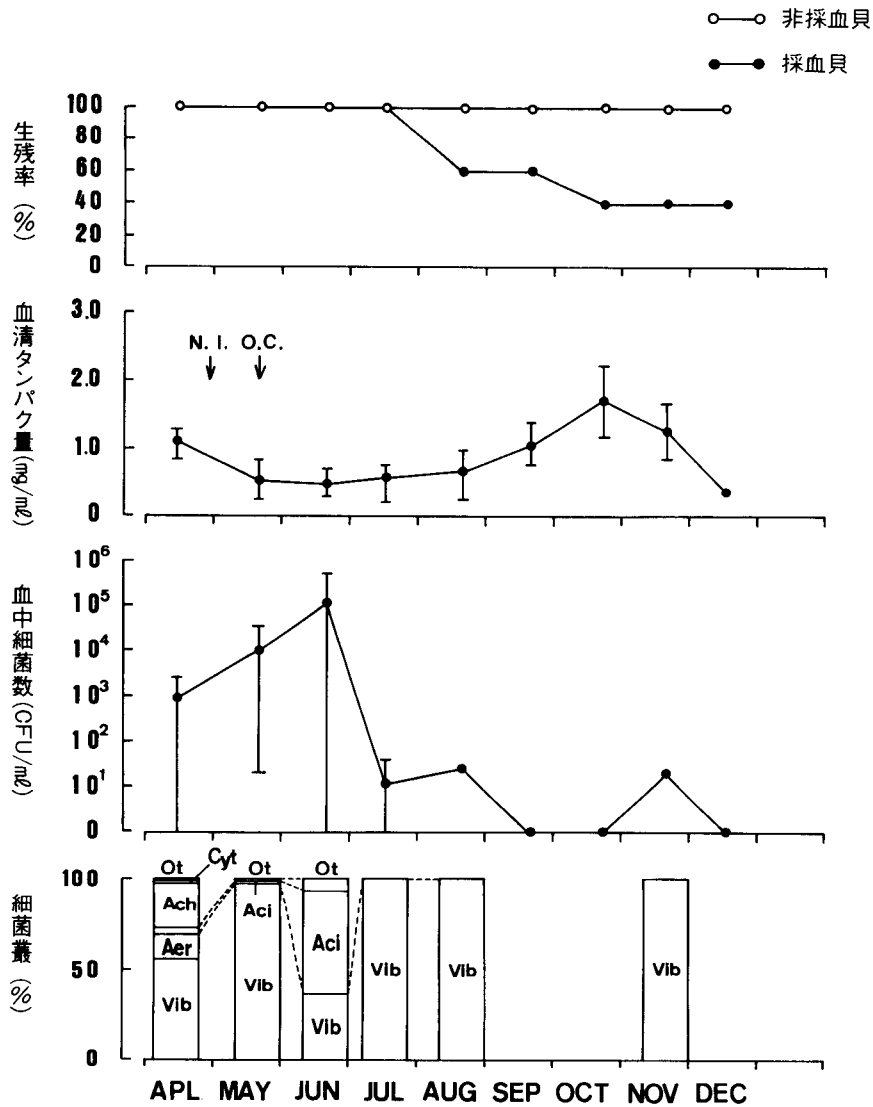


図4 対照貝 (CON) における生残率、血清タンパク量、血中細菌数および細菌叢の変化  
(N.I.:挿核、O.C.:沖出し)

イの体内に侵入し軟体部を侵襲、分解することが推察される。今回の調査では、4～11月の間には汚染指標菌または腐敗細菌と思われる細菌は、海水およびアコヤガイ血液からは分離されなかったが、12月17日調査時の海水細菌叢において、*Staphylococcus* が76%、*Streptococcus* が8%存在したことから、これらの細菌が供試貝の体内に侵入したかどうか確認する必要があると思われた。また、海水およびアコヤガイから分離された個々の細菌について、アコヤガイに対する病原性を検討する必要があると考えられる。

陸上由来の汚染指標菌の防除を考える上で、手術道具およびピースの消毒は意義あるものと考えられたが、消毒作業による血中細菌数の軽減効果は認められなかった。このことは、挿核



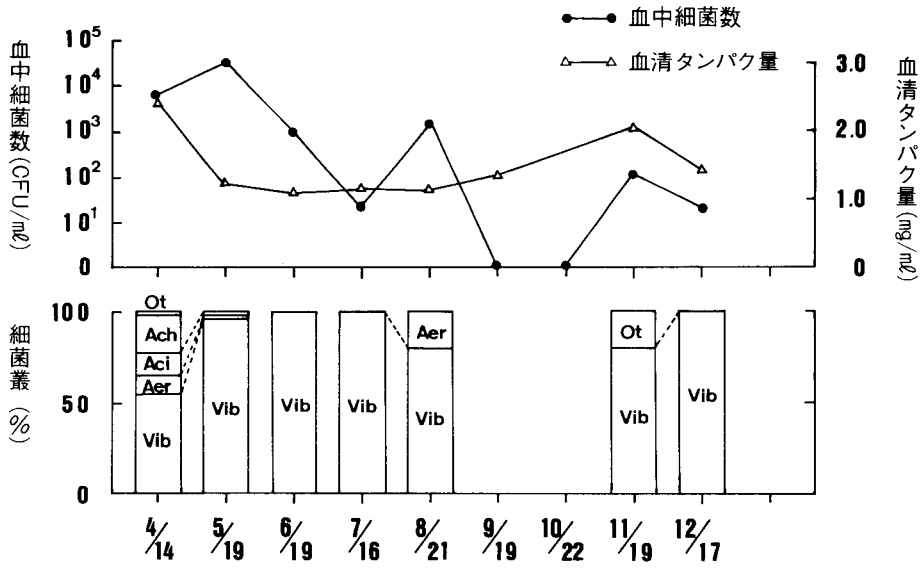
手術時にアコヤガイの体内に侵入する細菌の大部分が、養生期間中に手術時の傷口から海水を媒介にして侵入するものと考えられたため、今後は、養生漁場の環境細菌叢とアコヤガイの体内細菌叢との関連について詳細に調査する必要があると思われた。アコヤガイの体内に侵入した細菌が排除されるには、アコヤガイの個体差により、2～5ヶ月の期間がかかるものと考えられ、また、手術に伴う血清タンパク量の減少についても、挿核前のレベルに回復するには4～5ヶ月の期間がかかるものと思われた。しかし、現在のところアコヤガイ血清タンパク量および血中細菌数の季節的变化の詳細が明らかにされていないことから、アコヤガイの持つ恒常的な生理活性の季節変化を明らかにした上で、挿核作業の生理活性に及ぼす影響を検討する必要があると考えられる。

## 謝 辞

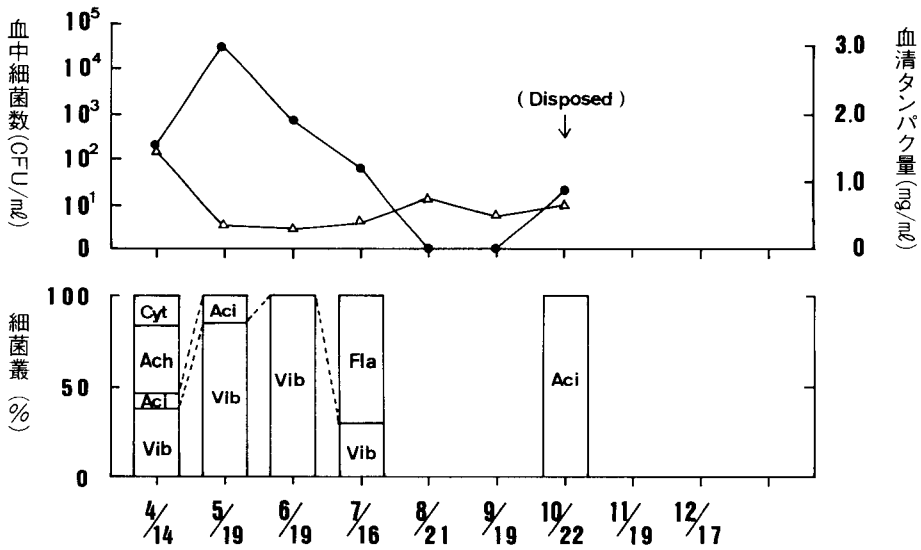
本研究を行うにあたり、供試アコヤガイの挿核および養殖管理に協力を賜った愛媛県遊子漁業協同組合真珠養殖部会松下務氏他漁業後継者の方々に感謝致します。

## 文 献

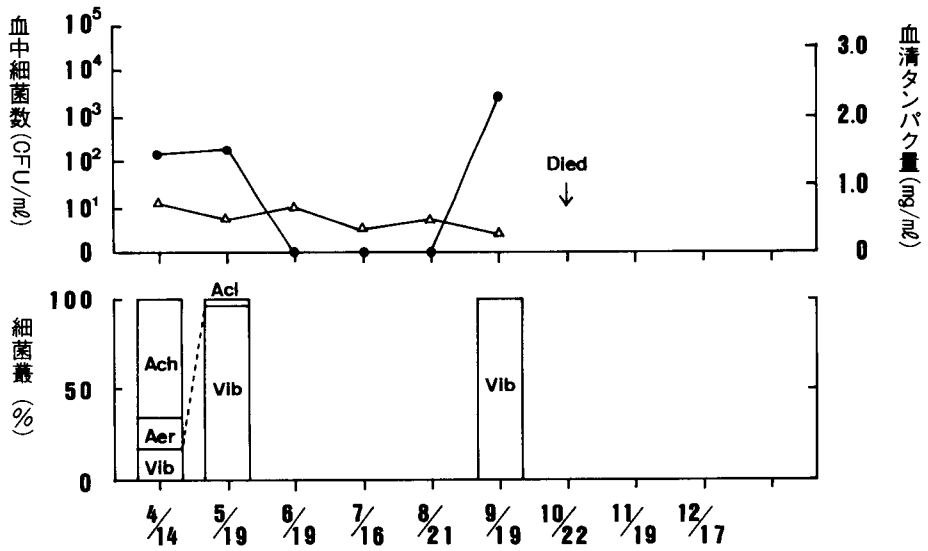
- 1) 小竹 子之助 (1953) : アコヤガイ異常へい死について, 昭和27・28年徳島県水産試験場事業報告.
- 2) 小竹 子之助 (1967) : アコヤガイから分離された好気性細菌について, 昭和42年度水産庁指定研究「魚病研究(魚介類の疾病に関する研究)」, 徳島県水産試験場.
- 3) 船越 将二他 (1985) アコヤガイ血清蛋白質量の測定条件および季節変化, 昭和60年度日本水産学会秋季大会講演要旨集.
- 4) 多賀 信夫編 (1974) : 海洋微生物, 東京大学出版会.
- 5) 奥積 晶世他 (1979) : カキの細菌フローラ, 日本水産学会誌, 45(9).
- 6) Beeson, R.J. and Johnson, P.T. (1967) : Bacterial Flora of bean clam, *J.Invert.Path.*, 9, 104.
- 7) Klug, M.J. and DeMoss, R.D. (1971) : Tryptophanase-positive bacteria in the marine environment, *J.Bacteriol.*, 106.
- 8) Simidu *et al.* (1971) : Bacterial flora of phyto- and zoo-plankton in the inshore water of Japan, *Can.J.Microbiol.*, 17.



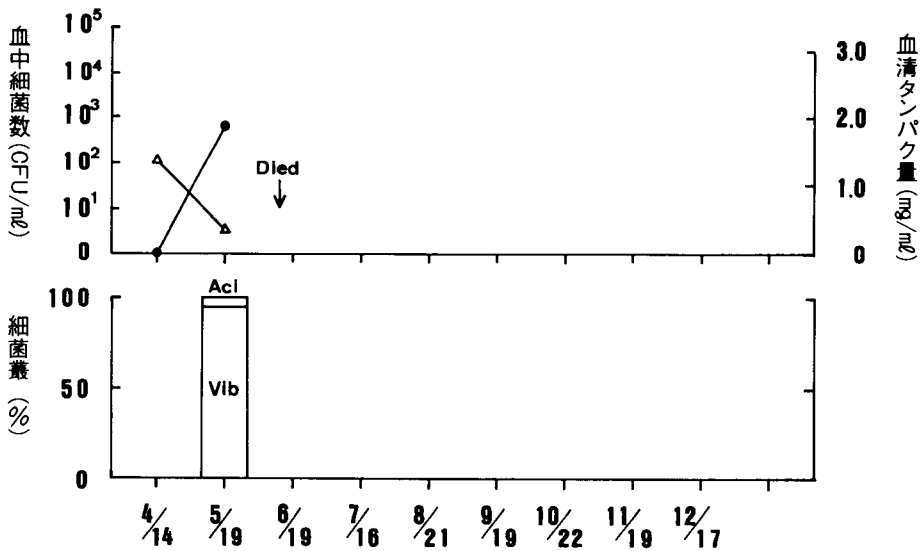
付図1 消毒作業員 (STR-1) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



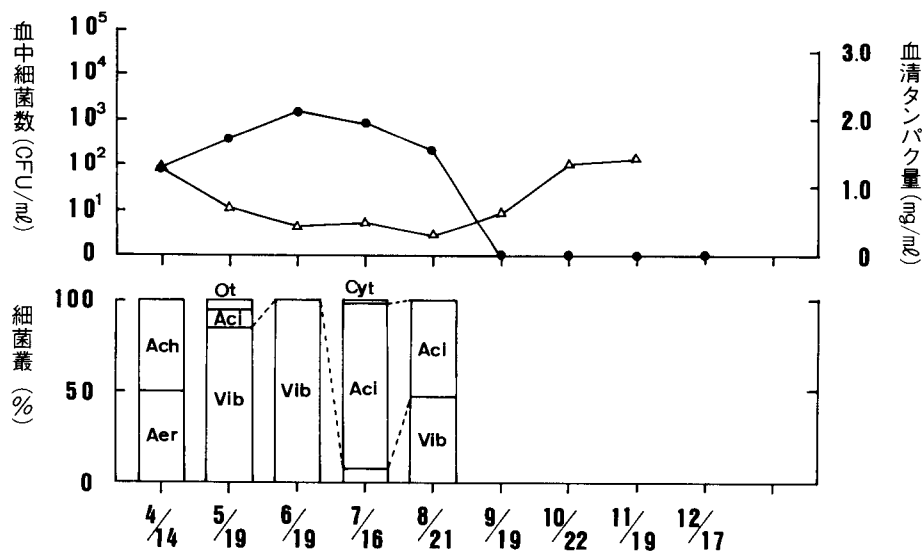
付図2 消毒作業員 (STR-2) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



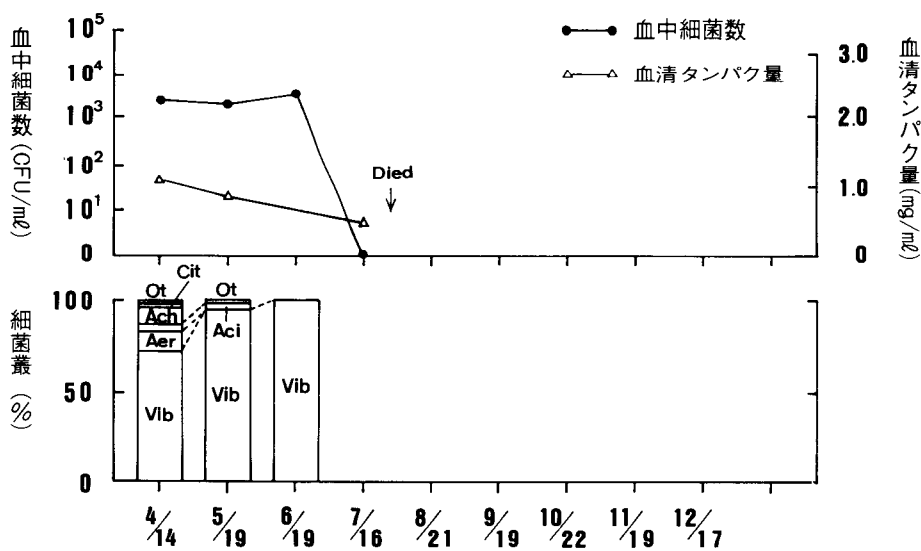
付図3 消毒作業員 (STR-3) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



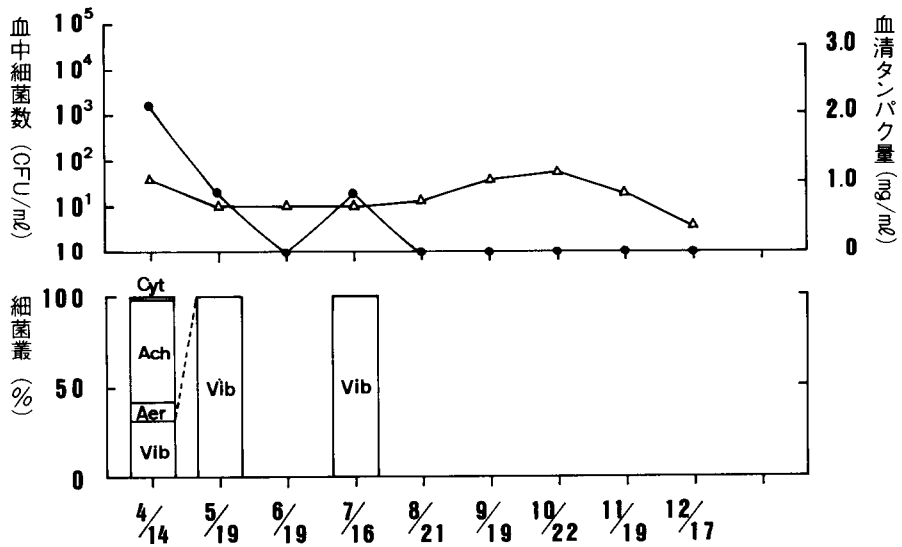
付図4 消毒作業員 (STR-4) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



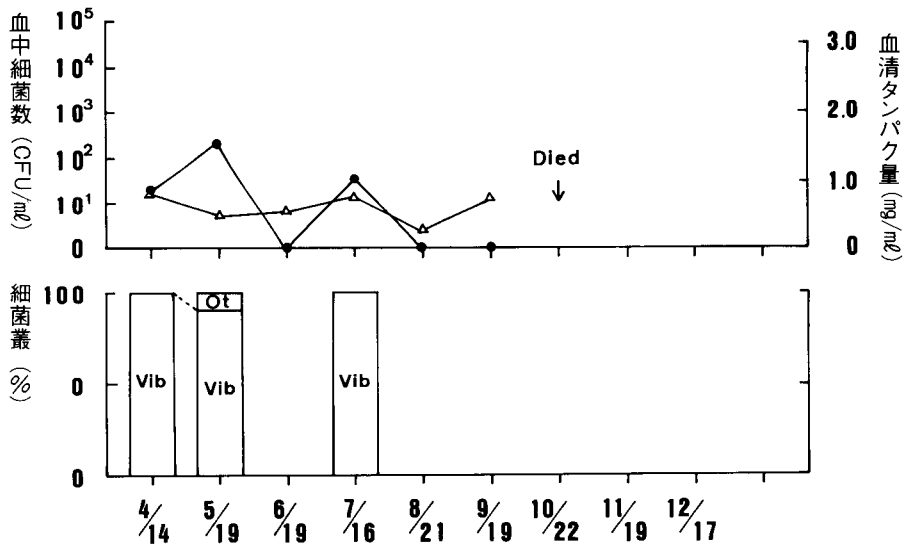
付図5 消毒作業員 (STR-5) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



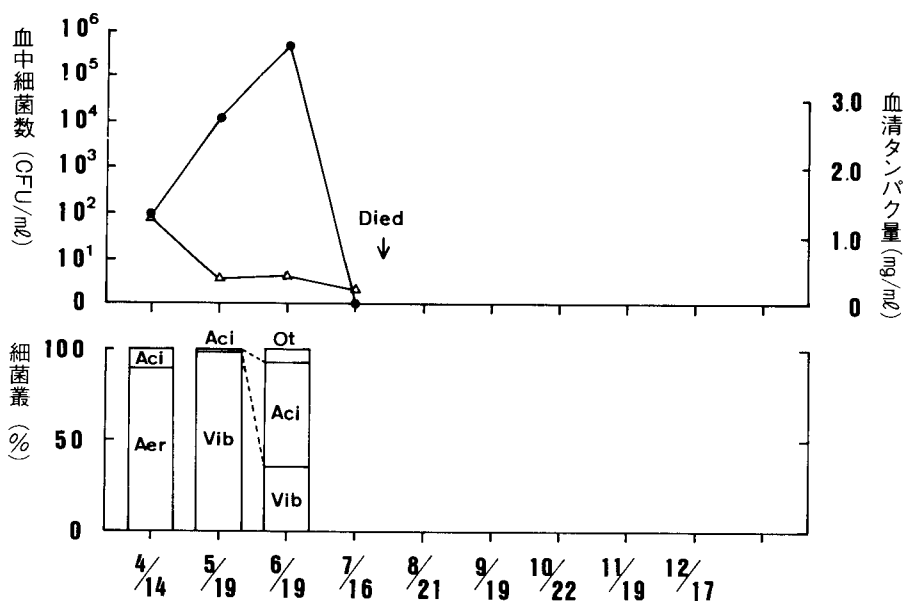
付図6 対照員 (CON-1) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



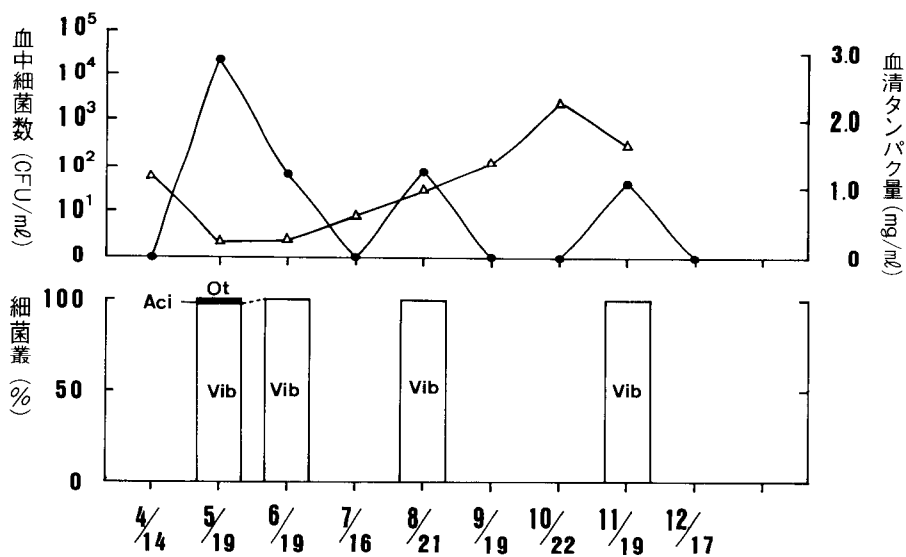
付図7 対照員 (CON-2) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



付図8 対照員 (CON-3) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



付図9 対照具 (CON-4) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化



付図10 対照具 (CON-5) における血中細菌数・細菌叢、血清タンパク量の変化

