HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハナサキガニ幼生の大量死に関する細菌学的研究：原因菌の性状と病原性
Author(s)	渡辺, 研一; 吉水, 守; 尾花, 博幸; 鎌田, 研一; 杉澤, 輝文; 澤辺, 智雄; 絵面, 良男
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 50(1), 19-32
Issue Date	1999-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/24181
Type	bulletin (article)
File Information	50(1)_P19-32.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

北 大 水 産 彙 報
50(1), 19-32. 1999.

ハナサキガニ幼生の大量死に関する細菌学的研究
―原因菌の性状と病原性―

渡辺　研一[1)]・吉水　守[2)]・尾花　博幸[1)]・鎌田　研一[2)]
杉澤　輝文[2)]・澤辺　智雄[3)]・絵面　良男[3)]

Bacteriological Study on the Mass Mortality of Cultured Hanasakicrab Larvae
— Causative bacterial characteristics and infection trial —

Ken-ichi WATANABE, Mamoru YOSHIMIZU, Hiroyuki OBANA, Ken-ichi KAMATA, Teruhumi SUGISAWA, Tomoo SAWABE, and Yoshio EZURA

Abstract

Mass mortality occurred in zoea-III and glaucothoe stages of Hanasakicrab *Paralithodes brevipes* larvae. The typical symptom of the diseased larvae was cloudiness of intestine and mid-gut. *Vibrio* sp. was isolated dominantly from diseased larval intestine. From characteristics tests, it was suggested that the *Vibrio* sp. was nearly the same species to *V. splendidus* biovar I. But DNA hybridization experiment proved that the strain was different species from *V. splendidus*.

By infection trial, the *Vibrio* sp. preserved pathogenicity and reproductivity in healthy larvae. Therefore, it was suggested that the *Vibrio* sp. was the pathogen of Hanasakicrab larvae. In addition, medical treatment at the zoea-III was effective to control the disease.

Key words: Hanasakicrab, *Paralithodes brevipes*, *Vibrio* sp., Infection trial

緒　　言

栽培漁業の重要対象種として期待されているハナサキガニ *Paralithodes brevipes* BRANDT の種苗生産過程で幼生の消化管および中腸腺が白濁する（以下白濁個体）ことを特徴とする疾病が発生した。前報（渡辺ら，1998）で，種苗生産過程で用いる飼育用水，餌料および発病群を含むハナサキガニ幼生の細菌叢を比較検討したところ，この白濁個体から *Vibrio* 属細菌が多数優勢に検出され，この疾病が細菌性疾病であることが強く示唆された。

本報では白濁個体から分離された *Vibrio* 属細菌の性状検査と，この細菌によるハナサキガニ幼生に対する感染試験を行った結果について報告する。

[1)] (社) 日本栽培漁業協会厚岸事業場
(*Akkeshi Station of Japan Sea-Farming Association*)
[2)] 北海道大学水産学部生物化学工学講座(旧：微生物学講座)
(*Laboratory of Biochemical Process Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)
[3)] 北海道大学水産学部生物海洋学講座(旧：微生物学講座)
(*Laboratory of Biological Oceanography, Faculty of Fisheries, Hokkaido University*)

材 料 と 方 法

白濁個体から分離された *Vibrio* 属細菌の性状検査

性状検査には，1993 年の種苗生産過程で出現した白濁個体の消化管から Muroga et al. (1987) の方法にしたがって分離した 10 株を用いた。供試菌株の継代には海水培地 (Yamamoto et al., 1982) を用いた。

供試菌株の性状は，絵面・清水 (1990) の方法により，属レベルの分類を行った。すなわち，分離菌株を海水培地で 20°C, 48 時間培養した後，常法通りグラム染色性，菌型，運動性，鞭毛の有無を観察して形態学的性状を検査し，グルコースの酸化発酵性を Leifson の方法により観察して生化学的性状を検査した。

属レベルの分類を行った株のうち，*Vibrio* 属細菌について Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1 (1984) の記載性状を基に以下の生化学的性状および分子生物学的性状を検査し，種レベルの同定を試みた。検査に用いた菌株は，上述の条件下で培養した。

1) 硝酸塩還元能：半斜面に固めた硝酸塩寒天培地の斜面部に塗布すると共に高層部にせん刺して 20°C で培養。1 週間後，スルファニル酸 0.8 g を 5 N 酢酸水 100 ml に溶解した試液 1 と α ナフチルアミン 0.5 g を 5 N 酢酸水 100 ml に溶解した試液 2 の両液を等量にまぜ斜面部にそって流し，赤色を呈したものを硝酸塩還元菌とした。

2) インドール産生能：インドール産生試験用ペプトン水に 20°C, 48 時間培養後，パラメチルアミノベンズルアルデヒド 5 g をアミルアルコール 75 ml，濃塩酸 25 g に溶解した試液を培養液 5 ml に対し 0.2～0.3 ml 加えよく振り静置した。上層部が赤紫色になったものをインドール産生菌とした。

3) VP 試験：小試験管に 2 ml ずつ分注したブドウ糖リン酸塩ペプトン水に接種，48 時間経過後，5～6% アルファナフトール・エタノール溶液 1.2 ml および水酸化カリウム溶液 0.4 ml を加え 2～5 分間激しく振とうした。1 時間後までに紅色ないし深紅色があらわれたものをアセトイン，ディアセチル産生菌とした。

4) MR 試験：ブドウ糖リン酸塩ペプトン水 1 ml に 4～5 日培養後，メチルレッド溶液を 1～2 滴を加え，赤色となったものをメチルレッド陽性とした。

5) 硫化水素産生能：半斜面にしたゼラチン・鉄培地の斜面部に塗布すると共に高層部にせん刺して培養。20°C で 4 日培養し，黒色を呈したものを硫化水素産生菌とした。

6) アミノ酸脱炭酸試験：リジンの脱炭酸について，Muller の方法により観察した。

7) O/129 感受性：O/129 感受性について O/129 ディスクを用いて観察した。

8) Tween 80 耐性：海水寒天培地に Tween 80 を 1% 加えた培地に菌を接種しコロニーを形成したものを Tween 80 陽性とした。

9) ONPG 試験：β-ガラクトシダーゼについてニッスイの ONP ディスクを用い観察した。

10) 発育至適温度：4°C, 30°C, 35°C, 40°C で 1 週間培養し発育の有無を観察した。

11) 高分子分解能：海水培地に 1% の可溶性デンプンを加えた培地に菌を接種し 1 週間培養，透明帯を形成したものをアミラーゼ産生菌とした。

同様に海水培地にゼラチンを 0.5% 加えた培地に菌を接種し，1 週間培養後，塩酸昇こう水をかけ，透明帯を形成したものをゼラチナーゼ産生菌とした。

さらに，海水培地にキチンを 1% 加えた培地に菌を接種し，1 週間培養後，透明帯を形成したものをキチナーゼ産生菌とした。

12) 糖の利用性：D-キシロース，L-アラビノース，D-マンノース，D-ガラクトース，スクロース，トレハロース，セロビオース，メリビオース，ラクトース，サリシン，D-マンニトール，D-ソル

ビトール，D-リボース，D-グルコース，D-フルクトース，マルトース，イノシトール，ラムノース，グリセロール，エリスリトール，イヌリン，グリコーゲン，ラフィノース，デキストリン，アドニトール，ダルシトールの各糖類の利用性について Leifson の方法を用いて観察した。

13) アミノ酸の利用性：L-α-アラニン，D-α-アラニン，β-アラニン，L-セリン，L-ロイシン，L-ヒスチジン，L-チロシン，L-スレオニン，L-アルギニン， L-オルニチン，グリシンの各アミノ酸の炭素源としての利用をアンモニウム・カンテン培地を用いて観察した。

14) その他の有機化合物の利用性：D-グルコン酸，バレリン酸，ピルビン酸，エタノール，p-ヒドロキシ安息香酸，N-アセチルグルコースアミン，酢酸，酪酸，カプリン酸，プロパノール，クエン酸の各有機化合物の炭素源としての利用をアンモニウム・カンテン培地を用いて観察した。マロン酸 の炭素源としての利用を栄研のマロン酸培地を用いて観察した。

以上の各培地の製法は坂崎ら (1988) にしたがった。

15) GC モル% および DNA-DNA 相同性の測定：ハナサキガニ白濁個体から分離した *Vibrio* sp. V 365 株および *Vibrio* 対照株の DNA は Marmur (1961) の方法に従って抽出した。V 365 株の DNA GC モル% は Tamaoka and Komagata (1984) の方法に従い，P1 ヌクレアーゼを用いた DNA の完全分解後，生じるヌクレオチドの組成を HPLC で分析定量して算出した。また，DNA-DNA ハイブリダイゼーション実験はマイクロプレートを用いた間接酵素標識法により行い (Ezaki et al., 1988 ; Sawabe et al., 1998)，蛍光基質を用いて DNA-DNA 相同性を測定した (Ezaki et al., 1989).

感染試験

日本栽培漁業協会厚岸事業場において，1994 年の種苗生産過程で出現した白濁個体から分離した菌株の代表株 V-365 株を用いて感染試験をおこなった。菌株の分離方法は上記と同様である。

1995 年 3 月 6 日に厚岸事業場で養成中のハナサキガニ親ガニから得られたふ化ゾエアを用いて予備飼育を行った。飼育は，前報 (渡辺ら，1998) の方法に準じて行った。すなわち 0.5 m^3 黒色ポリエチレン水槽にふ化ゾエアを収容し，タラシオシラ *Thalasiossira* sp. とアルテミア *Artemia salina* のノープリウスを給餌してゾエア 2 齢期の 2 日目となった 3 月 16 日まで予備飼育を行った。水温は 3.9～8.6°C の範囲であり，生残率は 98% であった。

翌 3 月 17 日にゾエア 2 齢期の 3 日目のゾエアを感染試験水槽 (5l ビーカー) に 100 尾ずつ収容した。試験区は対照区，菌餌薬浴区，菌餌区の 3 区とし，対照区には種苗生産に使用する餌料 (タラシオシラ 2,000 細胞/ml を維持および通常の濾過海水を用いてふ化させたアルテミアノープリウス 1 日 8,000 個体) を，菌餌薬浴区と菌餌区には以下の方法で作製した菌餌 (餌料の種類と数量は同一) を給餌して飼育した。純粋培養した代表株を液体海水培地に 1 白金耳量接種し，20°C で 2～3 日間好気的に培養し 10^8～10^9 CFU/ml となった菌液を遠心分離 (4,000 rpm, 15 分間) して菌のペレットを得た。得られたペレットに，0.2 μm の中空糸濾過膜濾過装置 (三井造船製) で濾過した除菌海水を菌液の 1/0 量添加し，試験管ミキサーで充分混合した後，餌料培養液中に代表株の菌数が 10^6 CFU/ml 以上となるように添加した。給餌はタラシオシラでは 2～3 時間後に，アルテミアノープリウスでは 6 時間以上経過後に行った。飼育水にはオゾン処理装置 オゾンバリア (荏原実業製) により殺菌したオゾン処理海水を用い，水質維持の目的でナンノクロロプシスを 50 万細胞/ml となるように添加した。飼育水温は恒温器を利用して 8°C に保った。また，飼育水の水質維持と幼生の状態を観察する目的で，1 日に 20～30% の飼育水を新しい海水と交換するとともに，死亡個体を取り揚げ，3 日に 1 回底掃除を行った。試験期間は 30 日間とし，グラウコトエ期の 17 日目になった 4 月 16 日に生存している全ての個体を取り揚げた。

Table 1. Characteristics of *Vibrio* isolated from cloudy diseased Hanasakicrab larvae.

Character	*V. splendidus* biovar I	strain									
		365	367	369	371	373	375	377	378	379	380
Pigmentation :											
Yellow-orange	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Blue-black	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Red	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reduction of NO_3^- to NO_2^-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas from D-glucose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Production of acetoin and/or diacetyl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Growth at :											
4°C	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	d	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
40°C	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Production of :											
Amylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alginase	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of :											
D-Xylose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
L-Arabinose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Garactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	d	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−
Lactose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Salicin	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-Gluconate	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Valerate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Pyruvate	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Sorbitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Ethanol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
P-Hydroxybenzoate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
L-α-Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-α-Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β-Alanine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
L-Serine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Leucine	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
L-Histidine	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Tyrosine	d	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Malonate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
n-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acetate	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Butyrate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Caprate	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Erythritol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Glycerol	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propanol	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Glycine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Threonine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Ornithine	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

また，疾病発生防除のためにハナサキガニ幼生の消化管内生菌数を下げる目的で，アモキシシリン 1 mg/l による薬浴を，試験開始 6 日目のゾエア 3 齢期の 3 日目になった 3 月 23 日と，21 日目のグラウコトエ期の 8 日目になった 4 月 7 日に，対照区と菌餌薬浴区で行った。

飼育水およびタラシオシラについては試験過程に沿って 6 回滅菌試験管を用いて試料を採取し，生菌数を測定した。アルテミアについては試験開始時に 2 回備え付けの網を用いて培養液を濾過して採取し，ストマッカーポリ袋に移した。供試ハナサキガニ幼生については試験過程に沿って 9 回上記の方法により，試料を採取した。採取した試料は 75% Herbst 人工海水を用いた 10 倍希釈法による希釈液列を作製して，海水培地平板に塗抹し，20°C で好気的に培養し，出現コロニー数から生菌数を常法により算出した。なお，生菌数は飼育用水，飼育水およびタラシオシラについては 1 ml 当たり，他は湿重量 1 g 当たりとして算出した。

各試験区のハナサキガニ幼生から得られた試料について，上記の方法により属レベルの検討を行った。

菌餌区から出現した白濁個体について，上記の供試菌株を得た方法により細菌を分離し，代表株 20 株について上記の方法により種レベルの検討を行った。

結　　果

白濁個体から分離された *Vibrio* 属細菌の性状検査

白濁個体から分離された *Vibrio* 属細菌の生化学的性状検査の結果を Table 1 に示した。本菌は，検査した範囲ではメリビオース，ピルビン酸，L-オルニチンの利用性を除いて，*V. splendidus* biovar I と同一の性状を示した。

さらに，ハナサキガニ白濁個体から分離された *Vibrio* 属細菌 V 365 株を代表株として選び，その GC モル% および DNA-DNA 相同性を測定した結果を Table 2 に示した。V 365 株の GC モル%は 46.7% であった。V 365 株は供試した *Vibrio* 属および *Photobacterium* 属標準株とは 5.2% から 21.4% の DNA 相同性しか示さず，一般性状が最も類似していた *V. splendidus* との DNA 相同性は 10.7% と低かった。また，V 365 株とガザミゾエア病原菌 *Vibrio* sp. 85Z-1 および 87Z-1 と

Table 2. DNA relatedness between *Vibrio* sp. V365 and *Vibrio*/*Photobacterium* reference strains.

Species	Strain	GC moles (%)	DNA homology (%)
Vibrio sp.	V365	46.7	100.0
Vibrio sp.	85Z-1		9.2
Vibrio sp.	87Z-1		15.1
V. alginolyticus	V447	45-47	16.2
V. pelagius	ATCC 25916^T	46.0	10.6
V. campbelii	ATCC 25920^T	46-48	18.7
V. fischeri	ATCC 7744^T	39-41	13.9
V. splendidus biovar I	HUPF 9117^T	45-46	10.7
V. parahaemolyticus	HO5	46-47	17.0
V. harveyi	NCMB 1280^T	46-48	21.4
V. halioticoli	LAM 14596^T	41.6-43.1	5.2
P. leiognathi	NCMB 391^T	42-44	15.0
P. phoshoreum	IAM 12085^T	41-42	16.0

Table 3. Results of infection trial tests of Hanasakicrab larvae with *Vibrio* sp. isolated from cloudy diseased larvae.

Group	Experimental period	Number of challenged larvae (a)	Number of deaths (b)	Number of sampling (c)	Number of unknown (d)	Mortality*1 (%)	Number of cloudy diseased larvae (e)	Appearance rate of cloudy diseased larvae*2 (%)
Control	17, Mar.-17, Apr.	100	21	30	2	32.9	0	0.0
Infection trial and medical treatment	17, Mar.-17, Apr.	100	27	32	1	41.2	2	4.8
Infection trial	17, Mar.-17, Apr.	100	31	25	8	52.0	25	41.0

*1: $(b+d)\times 100/(a-c)$
*2: $e\times 100/(a-b-c-d+e)$

の DNA-DNA 相同性も，それぞれ 9.2% および 15.1% と低かった。

感染試験

試験結果の概要を Table 3 に示した。ここで白濁個体は，白濁が確認された後，最長で 3 日目までには死亡することが知られていることから，白濁個体はすべて死亡したものとして取り揚げて計数した。また，不明尾数は死亡個体が分解されて確認できなかったものと考え，死亡したものとした。

試験期間を通した死亡率は，対照区で 32.9% であったのに対して，菌餌薬浴区と菌餌区では 41.2%, 52.0% と高かったが，危険率 5% で χ^2 検定を行うと，死亡率が最も低い対照区と最も高い菌餌区の間では有意差が認められた ($0.010<P<0.025$) ものの，他の区の間では認められなかった (それぞれ $P>0.10$)。

白濁個体は，飼育餌料に細菌を添加しなかった対照区では出現しなかったが，細菌を添加した菌餌薬浴区と菌餌区では白濁個体が出現し，出現率はそれぞれ 4.7% (2 尾)，35.2% (25 尾) であった。白濁個体の出現率について危険率 5% で $\chi 2$ 検定を行うと，対照区と菌餌薬浴区の間に有意差は認められなかった ($P>0.10$) が，菌餌区は他の 2 区に対して有意に白濁個体の出現率が高かった (それぞれ $P<0.010$)。

各区の死亡率と白濁個体の出現率を Fig. 1 に示した。本図において死亡率は，不明となった個体がいつの時点で死亡したか不明であるため (累積死亡尾数＋累積白濁個体数)÷(収容尾数－サンプリング尾数－不明尾数)×100 で算出した。

対照区では試験開始 4 日目から死亡個体が発生し，原因不明のものもあったが初期の死亡は主に脱皮不全によるものであった。薬浴を実施した飼育開始 6 日目以降 4 日間と飼育開始 21 日目以降の 3 日間は死亡数は増加しなかった。また，グラウコトエ期への変態が確認された 12 日目以降 15 日目にかけてまでは脱皮不全によるゾエアの死亡がほとんどであった。しかしながら，4 尾/日

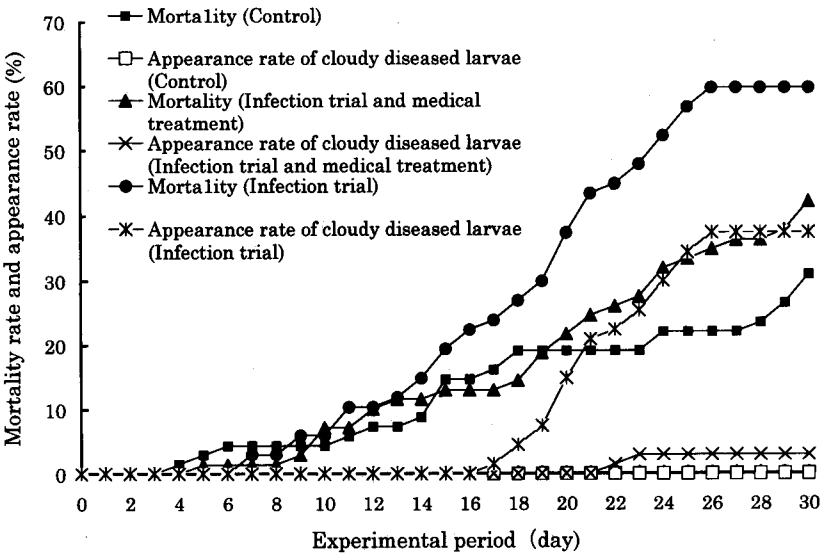

Fig. 1. Mortality and appearance rate of cloudy diseased larvae.

の死亡が認められた15日目以降の死亡はグラウコトエ期の個体で認められ,飼育期間を通した死亡はグラウコトエ期の個体で多く出現した。これらの死亡個体が白濁を呈して死亡したか否かは,死亡個体の体全体が濁るために確認できなかった。

菌餌薬浴区では,試験開始5日目から死亡個体が出現し,原因は脱皮不全によるものであった。薬浴を実施した飼育開始6日目以降2日間は死亡個体の出現は認められなかったが,10日目に3尾が死亡した。これらの個体はゾエア3齢期であった。グラウコトエ期への脱皮は12日目以降に確認されたが,脱皮不全による死亡は1尾のみであった。グラウコトエ期が出現してから6日経過した18日目からグラウコトエ期の個体の死亡が始まり,3日間で7尾が死亡した。対照区と同様の理由で死亡個体が白濁を呈していたか否かについては,確認できなかった。飼育開始21日目

Table 4. Viable bacterial counts of seawater for rearing.

Sampling date	Group	Viable bacterial counts (CFU/ml)
17, Mar.	Filtrated seawater	1.2×10^{3}
17, Mar.	Ozonized seawater	1.7×10^{3}
17, Mar.	Hollow fiber menbrane filtrate seawater	5.9×10^{-1}
23, Mar.	Filtrated seawater	1.0×10^{3}
23, Mar.	Ozonized seawater	1.0×10^{1}
23, Mar.	Hollow fiber menbrane filtrate seawater	3.2×10^{-1}

Table 5. Viable bacterial counts of rearing sea water.

Sampling date	Group	Viable bacterial counts (CFU/ml)
17, Mar.	Preparation tank	7.8×10^{5}
17, Mar.	Control	1.4×10^{4}
17, Mar.	Infection trial	7.3×10^{5}
23, Mar.	Control	1.2×10^{6}
23. Mar.	Infection trial and medical treatment	2.0×10^{6}
23, Mar.	Infection trial	1.6×10^{7}
24, Mar.	Control	1.7×10^{6}
24. Mar.	Infection trial and medical treatment	3.0×10^{5}

Table 6. Viable bacterial counts of feed for Hanasakicrab larvae.

Sampling date	Group	Viable bacterial counts (CFU/ml)
17, Mar.	*Thalassiosira* sp. (control)	1.3×10^{5}
17, Mar.	*Thalassiosira* sp. (infection trial)	1.4×10^{7}
17, Mar.	*Artemia salina* (control)	4.0×10^{6}
17, Mar.	*Artemia salina* (infection trial)	4.3×10^{7}
23, Mar.	*Artemia salina* (infection trial)	2.1×10^{8}

にはアモキシシリンによる薬浴を行ったが，翌日には白濁個体の出現が確認された。その翌日にも白濁個体が出現したものの，白濁個体の出現はこれらの2尾にとどまった。死亡個体の出現は飼育終了までだらだらと続き，飼育期間を通した死亡はグラウコトエ期の個体で多く認められた。

菌餌区では，飼育開始7日目から死亡個体が発生し，それは脱皮不全によるものであった。その後は，少数ながら毎日のように死亡個体が確認された。また，飼育開始17日目に白濁個体の出現が確認された後は，毎日白濁個体が出現した。しかしながら飼育開始26日目以降は死亡個体および白濁個体は確認されなかった。本区でも他の区と同様の理由で死亡個体が白濁を呈していたか否かについては，確認できなかった。

飼育用水の生菌数を採水日とともにTable 4に示した。原水は1.0～1.2×10^3 CFU/mlであったが，オゾン処理海水では1.0×10^1～1.7×10^3 CFU/ml，中空糸濾過膜除菌海水で3.2～5.9×10^{-1} CFU/mlと殺菌または除菌効果が見られた。

飼育水の生菌数を採水日とともにTable 5に示した。試験開始時の3月17日には対照区で1.4×10^4 CFU/ml，菌餌を給餌した区で7.3×10^5 CFU/mlであり，予備飼育水槽の7.8×10^5 CFU/mlと同レベルか1オーダー低かったが，薬浴を実施する直前の3月23日には対照区で1.2×10^6 CFU/ml，菌餌薬浴区で2.0×10^6 CFU/ml，菌餌区で1.6×10^7 CFU/mlと増加した。アモキシシリンによる薬浴を実施した直後の3月24日には対照区で1.7×10^6 CFU/mlと薬浴の効果は認められなかったものの，菌餌薬浴区では3.0×10^5 CFU/mlと1オーダー菌数が減少した。

飼育に使用した餌料の生菌数を試料の採取日とともにTable 6に示した。菌餌処理をしたタラシオシラでは1.4×10^7 CFU/mlであったのに対して，通常のタラシオシラでは1.5×10^5 CFU/mlと2オーダーの差が見られた。また，菌餌処理したアルテミアノープリウスでは4.3×10^7～2.1×10^8 CFU/gであったのに対して通常のアルテミアでは4.0×10^6 CFU/gと1～2オーダーの差が見られた。

ハナサキガニ幼生の脱皮齢期と消化管内生菌数の推移をFig. 2に示した。ふ化ゾエアでは1.5×10^3 CFU/gであったのに対して，ゾエア1齢期の4日目には6.5×10^4 CFU/g，ゾエア2齢期の0

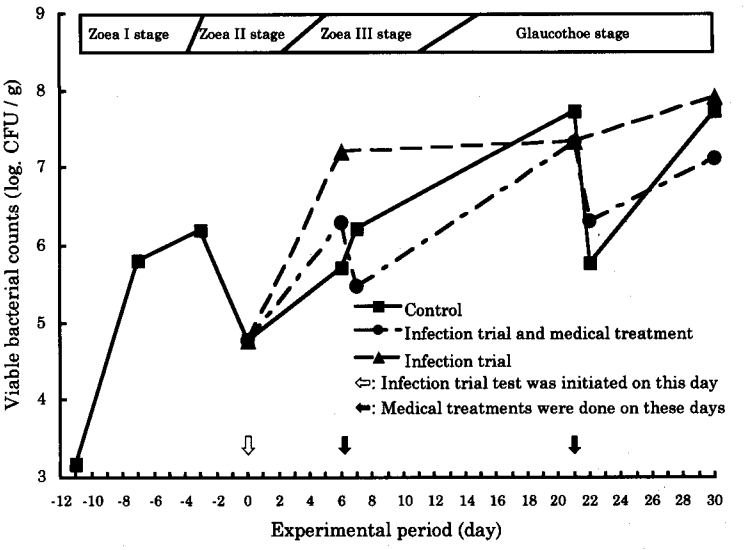

Fig. 2. Intestinal viable bacterial counts of Hanasakicrab larvae.

Table 7. Intestinal bacterial flora of Hanasakicrab larvae from 30 isolated strains at sampling date of Mar. 23.

Genus	Group		
	Control	Infection trial and medical treatment	Infection trial
Flavobacterium	0.0%	0.0%	0.0%
Achromobacter	0.0	0.0	0.0
Moraxella	0.0	0.0	0.0
Cytophaga	0.0	0.0	0.0
Vibrio	100.0	100.0	100.0
Alteromonas	0.0	0.0	0.0
Pseudomonas	0.0	0.0	0.0
Alcaligenes	0.0	0.0	0.0
Bucillus	0.0	0.0	0.0
Coryneforms	0.0	0.0	0.0

Table 8. Characteristics of bacteria isolated from cloudy diseased larvae of infection trial tested Hanasakicrab.

Character	*V. splendidus* biovar I	Infection trial tested strain	Isolated strains		
			16/20	3/20	1/20
Pigmentation	W	W	W	W	W
Cell shape	rod	rod	rod	rod	rod
Gram stain	−	−	−	−	−
Motility	+	+	+	+	+
Flagellum arrangement	pol	pol	pol	pol	peri
OF test	F	F	F	F	O
Salt requirement	M	M	M	M	M
Oxidase	+	+	+	+	±
Catarase	+	+	+	+	−
Production of					
Amylase	+	+	+	+	+
Alginase	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+	−
DNase	+	+	+	+	−
Growth at					
4°C	+	+	+	+	+
37°C	−	−	−	−	−
40°C	−	−	−	−	−
Arginine dihydrolase	−	+	+	−	ND
Lysine decarboxyrase	−	−	−	−	ND

Table 9. Comparison with characteristics of *Vibrio* spp. isolated from some kind of Decapoda.

Character	*V. splendidus* biovar I	Infection trial strain	*Vibrio* isolated form cloudy diseased Hanasakicrab larvae	*Vibrio* isolated from diseased Swimmingcrab zoea	*Vibrio* isolated from diseased Kurumaprawn	*Vibrio* isolated from diseased Toyamaprawn larvae
Gram stain	−	−	−	−	−	−
Motility	+	+	+	+	+	+
Flagellum	SP	SP	SP	SP	SP	SP
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+	+	NT
OF test	F	F	F	F	F	F
Gas from glucose	−	−	−	−	NT	−
Indole production	+	+	+	+	+	−
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+
Geratin liquefaction	+	+	+	+	+	+
Methyl red test	+	+	+	+	+	−
Voges-Proskauer test	−	−	−	−	−	−
Hydrogen sulufide	+	+	+	+W	−	NT
Arginine decomposition	+	+	+/−	−	−	NT
Lysine decarboxylation	+	−	−	+	−	NT
Ornithine 〃	+	+	+	+	−	NT
Leucine	−	−	−	−	NT	NT
Serine	+	+	+	+	NT	NT
Tyrosine	−	−	−	−	NT	NT
Citrate	+	+	+	+	+	−
Tween 80	+	+	+	+	NT	NT
β-galactosidase	+	+	+	+/−	+	NT
Gluconate	+	+	+	−	−	NT
Growth at :						
4°C	+	+	+	−	−	NT
35°C	−	−	−	+	−	NT
42°C	−	−	−	−	−	NT
NaCl tolerance						
0%	−	−	−	−	−	−
0.5%	−	−	−	+	−	−
3%	+	+	+	+	+	+
6%	+	+	+	+	−	NT
8%	−	−	−	−	−	−
10%	−	−	−	−	−	−
Sensitivity to 0/129	+	+	+	+	+	+
Acid from :						
Xylose	−	−	−	−	−	−
Arabinose	−	−	−	−	−	−
Utilization of :						
Mannose	+	+	+	+	+	+
Garactose	+	+	+	+	+	−
Sucrose	+	+	+	+	+	−
Trehalose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	−	+/−	−
Lactose	−	−	−	−	+	−
Salicin	−	−	−	+/−	+/−	−
Mannitol	+	+	+	+	−	−
Sorbitol	−	−	−	−	+/−	−
Inositol	−	−	−	−	−	−
Rhamnose	−	−	−	−	−	−
Glycerol	+	+	+	+	+	NT
Fructose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Erythritol	−	−	−	−	NT	NT
Inulin	−	−	−	−	NT	NT
Glycogen	+	+	+	+	+	−
Raffinose	−	−	−	−	−	−
Dextrin	+	+	+	+	+	+
Adonitol	−	−	−	−	−	−
Dulcitol	−	−	−	+/−	−	−
Clucose	+	+	+	+	+	+

日目には 1.6×10^6 CFU/g と増加した。しかしながら，菌餌試験のために収容した時点のゾエア 2 齢期の 3 日目 (試験開始 0 日目) には 6.0×10^4 CFU/g と減少した。

ゾエア 3 齢期の 3 日目(試験開始 6 日目)には対照区と菌餌薬浴区でアモキシシリンによる薬浴を行った。薬浴前の消化管内の生菌数は対照区で 5.3×10^5 CFU/g, 菌餌薬浴区で 2.1×10^7 CFU/g, 菌餌区で 2.2×10^7 CFU/g と菌餌を給餌した区としない区で消化管内の生菌数に 2 オーダーの差が見られた。薬浴後のゾエア 3 齢期の 4 日目 (試験開始 7 日目) には，対照区で 6.1×10^5 CFU/g, 菌餌薬浴区で 2.1×10^6 CFU/g となり，対照区では薬浴の効果は明確ではなかったものの，菌餌薬浴区では生菌数が 1 オーダー減少し，薬浴の効果が認められた。

グラウコトエ期に脱皮してから 8 日経過した 4 月 7 日 (試験開始 21 日目) には再度対照区と菌餌薬浴区でアモキシシリンによる薬浴を実施した。薬浴前の消化管内の生菌数は対照区で 5.3×10^7 CFU/g, 菌餌薬浴区で 2.1×10^7 CFU/g, 菌餌区で 2.2×10^7 CFU/g であり 3 区間で生菌数に明瞭な差は認められなかった。薬浴後の 4 月 8 日 (試験開始 22 日目) には対照区で 6.1×10^5 CFU/g, 菌餌薬浴区で 2.1×10^6 CFU/g と 1～2 オーダー生菌数が減少し，薬浴の効果が認められた。

生残個体をすべて取り揚げた試験開始から 30 日目の 4 月 17 日には，消化管内の生菌数が，対照区で 5.3×10^7 CFU/g, 菌餌薬浴区で 1.3×10^7 CFU/g, 菌餌区で 8.2×10^7 CFU/g と 3 区間で明瞭な差は認められなかった。

各試験区のハナサキガニ幼生の消化管から 3 月 23 日に分離した菌株の，属レベルの性状検査結果を Table 7 に示した。すべて，*Vibrio* 属細菌であった。

菌餌区の白濁個体の消化管から分離した 20 菌株について，性状検査を行った結果を Table 8 に示した。1 株は *Vibrio* 属細菌ではなかったが，16 菌株 (80%) は給餌した菌株と全く同様の性状を示し，3 菌株 (15%) もアルギニンの利用性を除いて同様の性状を示した。

考　　察

種苗生産過程のハナサキガニに発生した消化管および中腸腺の白濁を伴う疾病に罹病したハナサキガニ幼生から分離された *Vibrio* 属細菌と，数種の甲殻類で病原菌とされている *Vibrio* 属細菌の性状を比較した結果を Table 9 に示した。検査した性状のうち，ガザミゾエアに感染する *Vibrio* 属細菌 (室賀ら, 1989) とは 58 項目中 10 項目，クルマエビの成体に感染する *Vibrio* 属細菌 (高橋ら, 1985) とは 51 項目中 12 項目，トヤマエビの稚エビに感染する *Vibrio* 属細菌 (野上私信) とは 40 項目中 8 項目で全く性状が異なるか一部の株の性状が異なり，これらの病原菌とは別種の細菌と考えられた。

ハナサキガニ幼生から分離された細菌は，*Vibrio splendidus* biovar I の性状と比較したところリジン，メリビオースおよびピルビン酸の利用性を除き，同一の性状を示したことから，同種かまたは非常に類似した菌種であると考えられた。

しかしながら本菌は，*V. splendidus* とはわずか 10.7% の DNA 相同性しか示さず，同種と認められる範囲 (70% 以上) ではなかった。また，供試した他の *Vibrio* 属，*Photobacterium* 属標準株の中にも，本菌株と同種と認められる細菌はなかったことから，本菌株は *Vibrio* 属の新種である可能性も考えられる。

罹病したハナサキガニ幼生から分離された細菌は，健康と考えられるハナサキガニ幼生に対して病原性を持ち，発病した個体から接種細菌と同一性状を示す細菌が再分離されたことから，本分離菌はハナサキガニ幼生の消化管および中腸腺が白濁し，大量死する疾病の原因菌であると考えられた。しかしながら，どの試験区の幼生の消化管の細菌叢も，100% *Vibrio* 属細菌であったこ

とから，本菌が存在することにより疾病が発生するわけではなく，ある一定レベル以上に消化管内の菌数が達した段階で，死にいたるものと考えられた。本菌がどの様にハナサキガニ幼生を死亡させるのかについては，今後詳細に研究を行って検討する必要がある。

また，本疾病に罹病したハナサキガニ幼生の消化管内を光学顕微鏡で観察すると，無脊椎動物の消化管や組織で生活する原生動物グレガリナの存在が確認される。グレガリナは，無脊椎動物の消化管等に一般的に存在し，エビ類には軽微なダメージを与えるものとされている (Johnson, 1989)。しかしながら，グレガリナがハナサキガニ幼生に対してどのような作用をしているかについては，現在のところ明らかでなく，今後，疾病の発生とグレガリナの関与の有無について検討する必要があろう。

現在，本疾病の防除対策として抗生物質による薬浴が用いられ，効果が認められている (渡辺ら，1998)。今回の試験でも，抗生物質による薬浴を行った区 (対照区および菌餌薬浴区) と行わなかった区 (菌餌区) の間では白濁個体の出現状況に差がみられた。このことから，抗生物質による薬浴で疾病の発生が抑制されたものと考えられ，その効果が再検証された。したがって，その年に出現する病原菌の薬剤感受性試験を行い，適正な薬剤を用いることにより，当面本疾病に対する対策は可能であるものと考えられる。しかしながら，よりよい防除対策を確立するために感染源および感染経路を特定する必要があり，さらに飼育水槽内の生菌数を下げることのできる飼育方法や病原細菌のみを効果的に除去する新たな防除対策の検討および開発が必要と考えられ，これらについて今後研究を進めていく予定である。

謝　　辞

本研究に当たり，山口県内海水産試験場桃山和夫博士には，つたない標本の病理組織学的なご検討をいただき，有益なご助言を賜った。ここに記して深謝の意を表する。

文　　献

Ezaki, T. Hashimoto Y., Takeuchi N., Yamamoto H., S.-.Liu, Miura H., Matsui K. and Yabuuchi E. (1988). Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. *J. Clin. Micribiol.*,. **26**, 1708-1713.

Ezaki, T., Hashimoto Y., Yabuuchi E. (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid-deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.*,. **39**, 224-229.

絵面良男・清水　潮 (1990). 水質・微生物編. p. 9-20, 日本海洋学会 (編), 沿岸環境調査マニュアル II. 恒星社厚生閣, 東京.

Kreig, N.R. and Holt J.G. (1984). Bergey's Manual of Systematic Bacteoriology, vol. 1., Williams and Wilkins, Baltimore, 964 p.

Johnson, S.K. (1989). Handbook of Shrimp Diseases, *Aquaculture*, 25 pp. Texas A & M Sea Grant College Program.

Muroga, K., Higashi M. and Keitoku H. (1987). The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture*, **65**, 79-88.

室賀清邦・鈴木康二・石橋矩久・野上欣也 (1989). ガザミ幼生に発生したビブリオ病. 水産増殖, **37**, 133-141.

坂崎利一・吉崎悦郎・三木寛二 (1988). 新細菌培地学講座 — 下 I — (第二版). 近代出版. 東京.

Sawabe, T., Sugimura I., Ohtsuka M., Nakano K., Tajima K., Ezura Y. and Chiristen R. (1998).

Vibrio halioticoli sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int. J. Sys. Bacteriol.*, **48**, 573-580.

高橋幸則・下山泰正・桃山和夫 (1985). 養殖クルマエビから分離された *Vibrio* 属細菌の病原性ならびに性状. 日水誌, **51**, 721-730.

Tamaoka, J. and K. Komagata (1984). Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiol. Lett.*, **25**, 125-128.

渡辺研一・鎌田研一・杉澤輝文・高橋誠・吉水守 (1998). ハナサキガニ幼生の大量死に関する微生物学的研究 — 幼生および種苗生産水槽の細菌叢 —. 北大水産彙報, **49**, 59-69.

Yamamoto, H., Y. Ezura and T. Kimura (1982). Effects of antibacterial action of seawater on the viability of some bacterial species. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **48**, 1427-1431.