

7) 乳酸菌によるアユのシュードモナス病経口感染予防試験

二宮浩司・山本充孝

【背景】シュードモナス病は、薬剤による治療が困難なため、予防対策を確立することが重要な課題となっている。一方、シュードモナス病菌の経口投与で本疾病の人為感染が成立することが確認されている。

【目的】シュードモナス病菌とともに乳酸菌をアユに経口投与し、乳酸菌によるシュードモナス病の経口感染の予防の可能性について検討を行った。

【成果概要】アユを用いて、表1に示すように4回の試験を実施した。

1. 乳酸菌液：本実験に供した乳酸菌は、*Latobacillus acidophylus* (滋賀県畜産技術振興センターから分与) である。表1に示すように試験1および2では、*Lactobacillus MR S*寒天培地を用いて、25℃で24～48時間培養を行った後、菌体を滅菌生理食塩水に懸濁させ乳酸菌液とした。また、試験3および4では、*Lactobacillus MRS*液体培地を用いて、25℃で24時間培養し、菌体とともに培養液全体を乳酸菌液とした。
2. 試験液の調整：所定濃度のシュードモナス病菌液（供試菌株-SG960118B株、API20NE数値プロファイル1-140-457）1.5mlと所定濃度の乳酸菌液1.5mlを混合したものを試験液とした。試験液にCMCを0.8%添加し、カテーテルを用いて1魚体当たり0.1mlを強制的に胃内に注入した。対照区は乳酸菌液の代わりに生理食塩水を使用し、試験区と同様な方法で処理を行った。11～14日間飼育観察し（水温19.7～20.2℃）、死亡魚を計数するとともに、死亡魚の細菌検査を行い、シュードモナス病による死亡か否かを判定した。
3. 予防効果の評価：シュードモナス病以外によるへい死尾数を除き、次の計算式から14日目における有効率を算出するとともに、Fisherの直接確率計算法により予防効果を評価した。有効率(%) = $[1 - (\text{試験区死亡率} / \text{対照区死亡率})] \times 100$
4. 結果および考察
 - ・寒天培地で培養した乳酸菌を滅菌生理食塩水に懸濁させて乳酸菌液とした試験1および2では、乳酸菌区と対照区の死亡率に差はなく、有効性は認められなかった。（図1）
 - ・液体培地で培養し、菌体とともに培養液全体を乳酸菌液とした試験3および4では、対照区と比べて、乳酸菌区の死亡は顕著に少なく、有効率はそれぞれ100%、92.8%となった。Fisherの直接確率計算ではともに $P < 0.001$ となり、有意水準5%で検定すると、有意差があり、有効性が認められた。（図1）
 - ・試験管レベルの実験から、菌体を除去した乳酸菌培養液のみでもシュードモナス病菌に対して強い殺菌作用があることがわかったので、試験3および4の効果は、乳酸菌による競合的排除というよりは、培養過程における乳酸菌生産物の殺菌効果によるものと考えられた。（表2）

【成果の活用】乳酸菌が高密度でアユの消化管内で定着するか検討する必要がある。

表1 乳酸菌試験の実施要領

項目	試験1	試験2	試験3	試験4
乳酸菌の培養法	平板培養	平板培養	液体培養	液体培養
乳酸菌液の調整方法および生菌数(CFU/ml)	菌体を生理食塩水に懸濁 6.1×10^9	菌体を生理食塩水に懸濁 1.5×10^{10}	菌体とともに培養液全体を使用 3.3×10^9	菌体とともに培養液全体を使用 2.7×10^9
シュードモナス病菌液の生菌数(CFU/ml)	1.8×10^8	7.2×10^8	3.6×10^8	4.8×10^8
供試魚の平均体重(g)	6.8	9.4	12.4	10.8

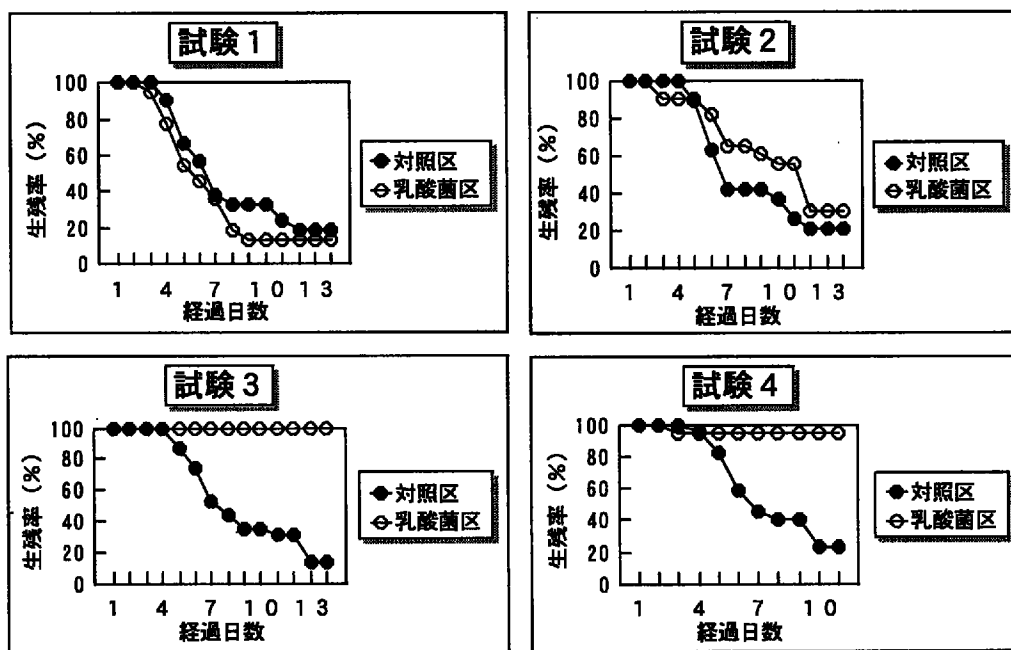


図1 乳酸菌試験のまとめ。

表2 乳酸菌培養液のシュードモナス病菌に対する¹⁾抗菌作用

試験液	シュードモナス病菌の生菌数 (CFU/ml)		
	実験開始時	3時間後	24時間後
菌体+培養液	1.6×10^8 ²⁾ (1.0×10^9)	³⁾ 検出なし (1.7×10^9)	⁴⁾ 検出なし (1.5×10^9)
培養液	1.6×10^8	³⁾ 検出なし	⁴⁾ 検出なし
菌体+生理食塩水	1.6×10^8 (1.2×10^9)	7.0×10^7 (1.2×10^9)	1.3×10^8 (1.4×10^9)
MRS液体培地	1.6×10^8	1.8×10^8	2.4×10^8
生理食塩水	1.6×10^8	9.8×10^7	1.7×10^8

1) 実験の実施要領

MRS液体培地で乳酸菌を培養(菌体+培養液)→遠心分離およびGSフィルタ-で菌体と培養液に分離(培養液)→菌体を生理食塩水に懸濁(菌体+生理食塩水)→菌体+培養液、培養液、菌体+生理食塩水、MRS液体培地、生理食塩水の各1.5mlとシュードモナス病菌液1.5mlをそれぞれ混合し、3、24時間後にシュードモナス病菌および乳酸菌の生菌数を計数。

2) ()内は乳酸菌の生菌数(CFU/ml) 3) 検出限界 $<5.0 \times 10^2$ CFU/ml

4) 検出限界 $<5.0 \times 10^1$ CFU/ml