



バイオコントロールとは何か？

善玉(有用)微生物を利用して、悪玉(病原)微生物を抑制・防除する方法、いわゆるバイオコントロール(Biocontrol、Biological Control、生物防除、生物学的防除)の有効性が最近になって再認識されている。

水産養殖におけるバイオコントロールについても、1980年代後半にその研究が始まって以来、これまでに国際誌だけでも100編以上の論文が掲載され(前田、2005)、養殖関連の国際学会ではバイオコントロールを主体としたセッションが配置されるようになった。このような研究の進展の背景には、消費者の食品の安全確保への強い要望、これに伴う薬剤使用の制限強化、現場における薬剤の効力の及ばない疾病の増大などが挙げられよう。

この連載では、バイオコントロールの概念、実用化例、および関連する微生物の生態などについて解説していく。まず今回は、微生物の生態や機能についてのありがちな誤解を指摘した上で、バイオコントロールの長所と短所を整理する。



前田 昌調 (まえだ まさちか)

英国王立協会研究員、水産庁養殖研究所餌料生物研究室長、同中央水産研究所生物機能部長、農水省国際農林水産業研究センター水産部長などを経て、現在は宮崎大学農学部教授。専門分野は、微生物、原生動物学。

微生物研究に対する期待の高まり

かつて、クリントン大統領が「ITの次は微生物」と述べたように、微生物学の発展に期待する人は増えていくように思う。これは、発酵食品や医薬における微生物の重要性や、応用微生物学の進展(好熱微生物の生産する核酸分解酵素がなければ、PCR法は発展しなかった等)といった、従来の微生物学の意義を強調するような状況ばかりではなく、微生物によってしか解決できない事態が生じていることにも起因する。

本稿に関連した領域での例を挙げると、自然のバランスを保つ上では、これまでに重要視されていなかった、あるいは気づかなかった微生物の機能に着目せざるをえない事態が生じている。なぜ、農地の地力が消失し、こしの無いさらさらとした土壌が出現するのか？なぜ、これほど予防に努めているにもかかわらず家畜や養殖魚の疾病発生頻度が増大しているのか？さらに、地球規模での薬剤耐性菌の種・数の増加や、アレルギー体質の児童数の急増などの解決にも、薬剤の代替としての微生物に関する新たな知見が必要とされている。

微生物への誤解

1) 水中の微生物の生態

現在の養殖方法、とりわけ陸上養殖は、あたかも「微生物が生息しないようにしてしまおう」といった概念で実施されている傾向があるが、養殖水中の微生物の生態には、次のような側面がある。

- ①どこからでも(空気中からも)侵入してくる。
- ②増殖速度が大きい。
- ③常時約 10^6 cells/mlの微生物が生息している。(これ以上の数になると原生動物などが摂食し、これ以下の数になると特定の種が増加して元の数にまで復元する)。
- ④微生物は、養殖施設(水槽壁、生物濾過材、漁網、イカダ支持体など)の表面に濃密に付着しており、この付着微生物が常時水中に遊離している。
- ⑤微生物間、あるいは微生物と魚介類の間には相互作用がある。

上記について若干補足する。

微生物は増殖し、その(分裂)速度は概して数十分～数時間/回の範囲にある。仮に、1細胞の細菌が1時間に1分裂すると、1日では24回分裂し、この間の細胞数の増加は 2^{24} で、約 1.7×10^7 の細胞数となる。空気中からでも1細胞/ml以上の微生物が供給されているので、養殖水中の微生物がいなくなることはまずない。そして、上記の細胞数は、実際の養殖水の細菌数/ml

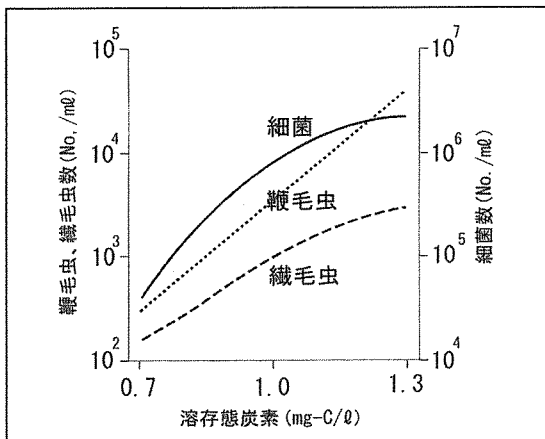


図1 異なった溶存態炭素量の水域における細菌と鞭毛虫と繊毛虫数の変動

外洋水域(溶存態炭素量0.7mg-C/l近辺)や富栄養化水域(同1.3mg-C/l近辺)においても、細菌数には大きな相異はない。

の数十倍に相当している。

また、水中の細菌数は一定数に保たれるように制御されている。例えば、太平洋の沖合では、活性の低い細菌が多いが、増殖するものも多くいて、細菌数は $10^6 \sim 10^8$ cells/mlに達する。すなわち、太平洋の真ん中の清浄な水中でも細菌は増殖する。一方、東京湾や大阪湾の海水中、あるいは養殖環境においても、やはり約 10^6 cells/mlの細菌が分布している。このような富栄養化した水域(環境)では、細菌数は 10^9 cells/mlまでも増殖できるが、増加した細菌は原生動物等によって摂食される。つまり、水中での微生物の増殖には許容値(上限)が設定されている(図1)。

2) 抗生物質およびウイルスとの関係

抗生物質を投与した場合も、当初こそ細菌数は減少するが、10数時間後には増加してくる。これは抗生物質存在下(図1の点線部分)においても分裂できる細菌(耐性菌を含む)が増殖することによる。そして、この細菌群はやはり約 10^6 cells/mlまで増加する。すなわち、この菌数が常時養殖水中で維持される(図2)。

ただし、抗生物質の投与で細菌群集のサイズが減少した場において、上記のように特定の細菌が増殖していくプロセスでは、どのような細菌が増えるのか予測できない状況も生じ、病原菌が増殖する場合もある。

次に、細菌とウイルスとの関係について考えてみる。自然界(養殖環境を含む)には、ウイルスを分解する細菌が多く生息する。詳細は次号で述べるが、ウイルスの外皮(コート)タンパク質は、細菌が細胞外に分泌生

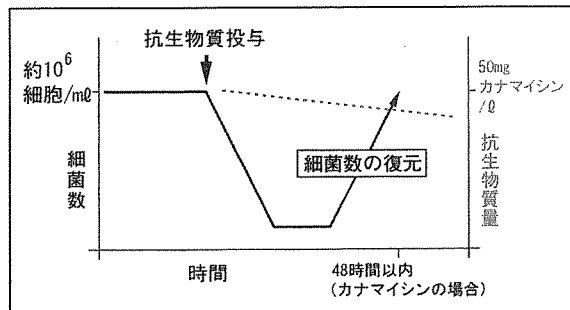


図2 抗生物質投与における養殖水中の細菌数の変動

産するプロテアーゼ等によって分解される場合が多い。このため、抗生物質を使用するとウイルス数が増加する現象が起こる。すなわち、抗生物質は細菌の増殖は抑制するが、ウイルスを抑制することはほとんどないので、抗生物質の添加により、これまでウイルスを抑制・分解していた細菌が消滅してしまうからである。そして、ウイルスは天敵不在のなかで、以前よりも高い頻度で宿主に感染することになる。

3) 濾過・殺菌による“浄化”の限界

微細フィルターによる養殖水の濾過、紫外線やオゾンによる滅菌などの場合をみても、これらの装置を通過した直後には微生物数が減少するが、その後に養殖水槽壁や漁網等に付着している微生物が水中に遊離してくるため、結局水中には滅菌前と同数の微生物が生息することになる。逆に、濾過材に病原菌が生息・増殖している場合には、病原菌の供給源になる。実際、ウナギ養殖ハウス等では、生物濾過槽にエドワジエラ菌が生息している場合が多い。

その他にも例えば、「水が清浄であれば魚にはよい」ということで、陸上養殖で流水飼育が盛んになった時期があった。しかし、魚介類稚仔の生存結果は思わしくなく、現在は部分換水の飼育方法が主流となっている。流水飼育は、微生物学的にみれば、魚介類の生育に有効な微生物群が増殖した好適環境を、流水によって消滅させていることになる。すなわち、健康な人間の腸内にビフィズス菌が多いと同様に、魚介類が順調に生育している条件下には善玉菌が多い。

4) 微生物食物連鎖

有用魚類の種苗生産が開始された頃には、その稚仔の餌に植物プランクトンが用いられていた。稚仔はこの植物プランクトンを摂食し、その消化管内に「グリーンマス」として観察されたが、結局は無給餌の稚仔と

同期間しか生存しなかった。このため、今では微細藻類そのものが魚類稚仔の餌になると考える人は少なくなり、少量の鶏糞や油かす等の有機物を養殖水に添加する、いわゆる「水作り」が行われるようになった。そして、この水作りによって増加した細菌が稚仔の餌になっていることが判明している。

このような微生物食物連鎖が、従来の植物プランクトンを起点とする生食連鎖よりも重要であることは、今や海洋研究分野では定説となっている。

微生物を利用する

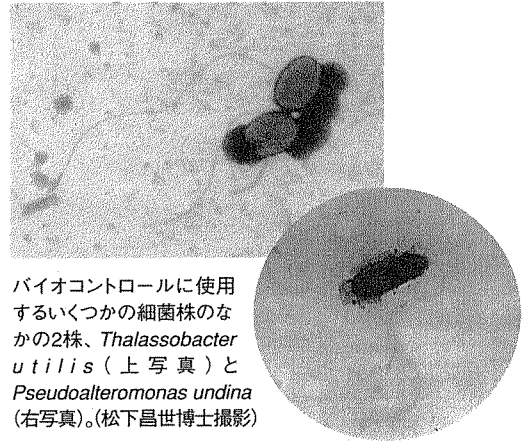
1) 善玉菌と悪玉菌の共存

このように、養殖環境水から微生物を取り除くことができるとする考えには無理がある。実際、これまでに高頻度で薬剤を使用し、また、高性能の養殖水滅菌装置を設置しても、魚介類の疾病発生は減少するどころか、かえって増加している。このため、養殖水中には微生物が約 10^6 cells/mlというかなりの数で常時生息している、と考えたほうが適当である。また、この微生物群のなかにはどのような種類がいるのかの予測も難しい。したがって、自然界微生物群集における場合と同様に、善玉菌もいれば悪玉菌もいて、両者の平衡関係において魚介類が生育していると考えたほうがより適切といえる。

魚介類と環境水との接点(インターフェイス)における微生物の機能は、この水族動物の生残や成長等に様々な作用を及ぼすと考えられている。例えば、魚類の体表面やその周辺の有用微生物と有害(病原)微生物との相互関係において、有害微生物が優勢な場合には、魚介類が感染・罹病する機会も増大し、一方、病原菌の増殖を抑制する有用微生物が優勢な状態では、魚介類の疾病感染頻度は減少する可能性がある。病原菌が優占していなくても、魚体の抵抗力が弱い場合などには疾病は発生するが、伝染性疾病のように健康と考えられていた魚介類が短期的に感染する過程では微生物間の相互作用や平衡関係も関与していると考えられる。

2) 微生物間の拮抗作用

このような微生物の相互作用には、中立、共生(片利、相利等)、競争等がみられるが、このなかで、競争は自然界では恒常的に進行している現象といえる。微生物は、他の生物と同様に、隣接する生物や環境要



バイオコントロールに使用するいくつかの細菌株のなかの2株、*Thalassobacter utilis* (上写真)と*Pseudoalteromonas undina* (右写真)。(松下昌世博士撮影)

因に対応して生存しなければならないが、とくに微生物群集の場合は、増殖が速く、生物量も多いため、他の生物よりも競争の度合いは大きいと考えられる。この競争の例には、後述する微生物間の拮抗作用もあり、また、概して栄養塩が十分存在する生息場の少ない自然環境では、微生物間で物質をめぐる競争が起きる。

バイオコントロール製剤とプロバイオティクス

1) 天敵生物の利用

バイオコントロールは、自然界に進行している生物間の競争のなかで、主として拮抗作用を利用した方法であり、天敵生物を増殖させることによって病原生物の防除を行う目的で開発された。農業分野における実用化の例では、①外部より天敵生物を(多くの場合は増殖させた後に)移入する直接的な技術、②有害微生物を阻害あるいは低減するような植物を植栽するなどして当該生産植物を保護するといった間接的技術、③両者の特徴を併用する方法、などが採用されている。

2) プロバイオティクス

プロバイオティクス(Probiotics)という用語は、当初、「原生動物の生産物で他の原生動物の増殖を促進する物質」を表す語彙として提唱されたが、その後、「動物の腸内細菌相に効果的な作用を及ぼす栄養補助剤」の語彙で用いられるようになり、さらに最近では、「宿主の腸内細菌相組成を、宿主の健康増進あるいは成長促進に有効な状態に保つ微生物」と定義されている。

プロバイオティクスの意義は、例えば無菌の動物はより容易に罹病することからも推察できる。若鶏に、成長した健康なニワトリの腸内容物や少量の糞を投与し

た場合、若鶏の病原菌 *Salmonella infantis* への抵抗性は増大する。これは若鶏の消化管内において、新しく構成された細菌群が *S. infantis* の侵入・定着を阻止したと考えられる。すなわち、プロバイオティクスは、病原菌に対して直接的な拮抗作用を発現するというよりは、場の競合などにより、結果として病原菌の定着を阻害する微生物を表す。

3) バイオコントロール製剤

これに対し、バイオコントロール製剤 (Biocontrol agents) は、「病原生物を殺滅するか、その増殖を阻害する作用を及ぼし、同時に生産を目的とする動植物に対しては少なくとも無害であるか、あるいは成長促進、代謝増進効果を及ぼす生物」と定義され、プロバイオティクスとは区別される。

養殖環境でも、他の自然生態系と同様に、多数の細菌や微小藻類および原生動物等が分布し、これらの微生物は直接的あるいは間接的に相互作用を及ぼし合っているが、近年これらの微生物のプロバイオティクスおよびバイオコントロール製剤としての利用が目されるようになった。

微生物製剤の長所と短所

農業におけるバイオコントロールの研究は、1960年代後半より始まっており、このなかで、害虫防除および病原菌防除に天敵微生物が利用されている。この生物防除製剤 (農業領域では「バイオ農薬」ともいう) の長所は、①人畜に危害がない、②病原生物に作用する選択性が高く、生態系を大きく攪乱することがない、等となる。一方、短所としては、①速効性を欠き、対象生物の発育段階や生息密度により効果の変動が大きい、②微生物は増殖停滞や死滅等の変化を起こしや

すいため、製剤の均一性や安定性に工夫を必要とする、③微生物株によって活性に異があったり、保存株の活性低下が生じる、等がある。

化学農薬を連続して多量に使用すると、自然界の有用生物を殺滅し、あるいは土壤中の微生物相を乱し、結果的には地力を低下させる。また、人畜に対する毒性、農薬残留による環境汚染、薬剤耐性に伴う薬効の低下等の問題も生じる。このため、化学農薬の使用によって短期間の作物収量が増加したとしても、長期的に見れば効果は上がっていないことになる。これらの点において、生物防除製剤の使用には優位性があるといえるが、この製剤は生物であり、攻撃対象も生物であるため、生物と生物との作用 (相互関係) は単純ではなく、使用効果も安定しないという問題がある。

バイオコントロールには、他にもいくつかの問題点がある。例えば、病害生物防除のために導入した外来生物による (攻撃対象への選択特異性が低い場合などにおける) 自然生態系の攪乱、当初ターゲットの病原生物を防除しても、新たな病害生物が発生する悪循環、さらに、概して在来生物に起因する病害等は回復可能 (いわゆる可逆的) であるが、外来生物の導入によって不可逆的な負荷を自然に与える場合があること、等が指摘されている。

このように、バイオコントロールには長所とともに短所もあり、その解決に向け、いっそうの研究を必要としている。

次号では、バイオコントロールの具体例などについて述べる。

(つづく)

参考書

前田昌調 (2005): 水圏の環境微生物学. 講談社、204頁。

「第1回 バイオコントロール研究会」開催のご案内

来たる5月12日13時より、福岡市のアークホテル博多ロイヤルにおいて、バイオコントロール研究会 (前田昌調代表) 主催による表記研究会が開催される。微生物を利用した生物的防除 (とくに疾病対策) の普及と発展を目指した「情報交流の場」であり、多数の参加を呼びかけている。

【開催日時】 2006年5月12日 (金) 13時～17時 (18時より親睦会)

【会場】 アークホテル博多ロイヤル (福岡市中央区天神3-13-20)

【参加申込締切】 4月15日 (土)

【講演】 (聴講無料)

①「バイオコントロール研究の現状と展望」

：前田昌調氏 (宮崎大学農学部教授)

②「プロバイオティクスと機能性食品への応用」

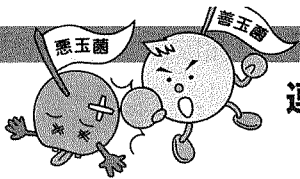
：三沢宏氏 (株) ヤクルト 中央研究所 主任研究員

③「抗ウイルス性細菌のスクリーニングとその有効利用」

：吉水守氏 (北海道大学水産学部教授)

【問合せ先】 クロレラ工業 (株) 技術特販部 (斎藤氏)

TEL0942-52-1261 FAX0942-51-7203



バイオコントロールとの出会い

ある書籍を求めて書店へ赴いた際、目的のそれと一緒に、近くにあったちょっと目についた本を購入し、後者のほうが面白かったということがある。筆者がバイオコントロールの研究

を始めた経緯もこの部類であったが、早いもので以来約20年が経過した(途中、研究職を離れた時期もあったが)。また、当初目的とした研究もけって無駄にはなっていない。

今回は、筆者自身がバイオコントロール研究に取り組む契機となった、東南アジアのウシエビ養殖における大量へい死問題について記し、さらにプロバイオティクスやバイオコントロール製剤として期待される細菌株の評価を行う際の留意点について述べる。



前田 昌調 (まえだ まさちか)

英国王立協会研究員、水産庁養殖研究所飼料生物研究室長、同中央水産研究所生物機能部長、農水省国際農林水産業研究センター水産部長などを経て、現在は宮崎大学農学部教授。専門分野は、微生物、原生動物学。農学博士。

失敗談:エビの餌料となる原生動物の探索

1987年に、初めて東南アジアにおけるウシエビ(ブラックタイガー、*Penaeus monodon*)の養殖場で研究を始めた頃は、養殖池の原生動物の生態を調べようと考えていた。この原生動物は、微生物(細菌等)―微小動物プランクトン(原生動物等)―小型動物プランクトン(コペポダ、魚介類稚仔等)にわたる食物連鎖(微生物食物連鎖)の鍵種の1つとして注目されており、この食物移行経路は、生食連鎖(植物プランクトンに対する摂食を起点とする食物連鎖)よりもエネルギー移行量が多く、重要と認識され始めた頃であった。筆者も、“海洋において小型動物プランクトンが、植物プランクトンの多く分布する水域よりも、細菌などの多い場に集まること”を自分のデータとして得ていた(このような事象は1970年代から指摘されていたが、その理由は謎とされていた)、微生物食物連鎖および原生動物の生態には少なからず関心を持っていた。

海洋に多く分布する微小動物プランクトン(大きき200 μm 以下の浮遊動物プランクトン)のなかでは、原生動物群集が優占し、その代表種に少毛類があるが、このグループの分類体系は完成しておらず、生態研究の1つの障壁となっていた。そこで筆者は、大英博物館自然誌部門に客員研究員として在籍した機会を利用して、この全種(約200種)の再記載を行い、英文分類マニュアルを刊行した。

このような経過があったため、東南アジアのウシエ

ビ養殖池でも原生動物が餌料になっているであろうと考えた。すなわち、養殖池内のウシエビには配合飼料等が与えられているが、エビは池内の天然餌料も摂食しており、その主なものは原生動物であろうと考えたのである。そして実際に、エビ養殖池の水から上記の原生動物少毛類の代表的な種である *Strombidium sulcatum* (図1)を見つけ、これを培養することができた。当時、少毛類の培養は難しいとされていたので、この発見とその後の実験では大いに意気が揚がったことを覚えている。しかし、最終的には失敗したため、その落胆の度合いも大きかった。

この *S. sulcatum* の培養では、原生動物の虫体を養殖池の水とともにプラスチックシャーレに入れ、数日間放置したところ、虫体が増殖してきた。このとき、シャーレの特定の部分に虫体がかたまっていたので、その部位から複数の細菌を分離した。そして、それぞれの細菌を純培養株とし、各々を当該原生動物に過分量になるように投与した。このようにして、原生動物虫体の増殖に適した細菌株をいくつか特定することができた。さらに、細菌株のなかで、少なくともウシエビの成長を阻害しない、あるいは促進するような株を選定した。こうして *S. sulcatum* を増やした後、ウシエビ幼生に投与したところ、エビがよく摂食することがわかった。エビなどが原生動物を摂食するといった報告はほとんどなされていなかったため、これで数報の論文が稼げると考えたものである。

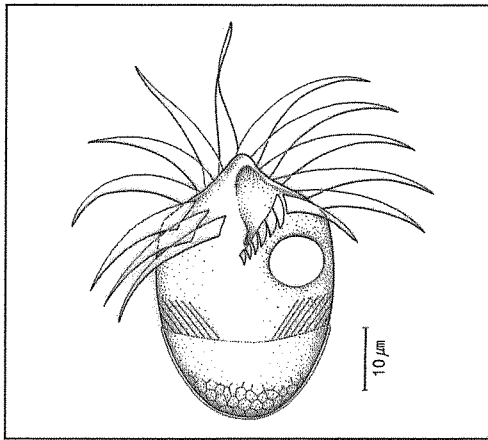


図1 エビの餌料となる原生動物纖毛虫(少毛類)、*Strombidium sulcatum*。

ところが、原生動物には寿命がある。すなわち、同一クローンから無性的に増殖した原生動物は、培養環境条件等に関係なく、一定期間後に死滅する。上記のクローンはいくつかの研究室に分与していたのだが、一斉に同時期に死んでしまった。ちなみに、異なったクローン間で、核を交換する有性生殖を行った場合には、虫体はより長く(永久といえる程度に)再生産を繰り返す。

かくして、原生動物についての研究は、論文1報を著したところで頓挫してしまった。また、その後数年間、同一場所やその周辺で本種を探索したが、下記の薬剤の使用なども原因となり、見つけることはできなかった。

プランクトンや微生物のいない養殖池

原生動物を探索するために多くのウシエビ養殖池を巡っている間に、不思議な池の多いことがわかった。そのような池は、とくにバキュロウイルス病が発生し、エビの大量へい死が起きた年(1988)以降に増加したように思う。池の水は薄緑色を呈し、微細藻類の増殖の盛んな様子が窺われたが、顕微鏡下では微生物やプランクトン類がまったく見られない。そして、その原因は染色剤マラカイトグリーンの添加によることが判明した。

核酸(DNA)の染色剤であるマラカイトグリーンは、染色すなわち固定によってDNA構造を壊す。このため、外部環境と細胞内のDNAとの距離の近いウイルスや細菌では容易にその機能が停止するのである(それゆ

え、疾病の発生防止に有効とされてきた)。しかし、この薬剤はすでに、人体への危険物質として、多くの国で使用が禁止されている。ごく最近も、中国・台湾でのウナギへの本剤使用が発覚し、日本への輸入が禁止された。また、一昔前までは(?)緑色や青色の発色の強いウシエビが小売店等に並べられていたが、やはりマラカイトグリーンに起因するものが少なくなかったと思う。

この他、ホルマリン等もウシエビ養殖池に添加されてきたが、このような薬剤の使用はエビをも弱体化させ、さらにそれら薬剤が池底に蓄積すれば、その養殖池は放置せざるを得なくなる。東南アジアには、この4半世紀で70%以上のマングローブ林がウシエビ養殖のために消滅したとされる国もあり、そこではウシエビの生産不良に伴って次から次へと新たな池が切り開かれたため、古い池はまるで月のクレタのような様相を呈して残存している。このような放置された池では、残留薬剤の影響もあり、マングローブがなかなか再生せず、欧米からは自然の使い捨て型産業として非難されている。

ウシエビの大量へい死をもたらした構造的問題

1980年から90年にかけての東南アジアでのウシエビ養殖には、概して次のような特徴が見られ、今なおその影をひいているように思える。

- ①抗生物質混合飼料の恒常的使用。
- ②親エビ飼育・産卵、種苗生産、出荷サイズまでの育成の各段階をそれぞれ別業者が担当する分業体制。
- ③海水の取水場所と排水場所が近い。
- ④研究への認識不足。

補足すると、②では、各々の分担において責任意識が欠如している場合が散見され、具体的には、活力の弱い孵化稚エビ(3~4番仔や、眼柄切除による強制産卵由来の稚仔等)の販売や、種苗生産方法の不備(水作りや餌料選定上の不備、暗所での飼育等)が挙げられる。ウシエビ担当の研究者は、このような状況の改善に努めたが、増産へひた走っていた養殖業界には、研究の重要性を受け止めるだけの謙虚さが無かったように感じる。こうして、1988年に最初のウシエビ大量へい死が起きた。

筆者は、一連のウシエビ大量へい死には、上記の①も大きく関係していると考えている。実際、東南アジアの著名な微生物学者からも「抗生物質を使用しなけれ

ばエビはできない」といった話を聞いたことがあるほどに、薬剤は多用されていた。ここで、抗生物質は細菌の増殖を抑制するが、ウイルスの抑制能には乏しい事実を考えれば、「抗生物質投与」→「ウイルスを分解(抑制)する細菌数の低下」→「ウイルス数の増加」→「大量のウイルスを基盤とした交雑による病原ウイルスの出現」→「エビへの感染」のプロセスを推察することができる。抗生物質が盛んに使用されるようになってからウイルス病が大発生するまでには数年間のタイムラグがあるが、交雑種(ウイルス)の出現までに要した年月と考えれば、とくに不思議ではない。

バイオコントロールに利用できる細菌の発見

1) エビに対する善し悪しの判定

上述のように、エビの餌料となる原生動物は死んでしまったが、原生動物の増殖を促進する細菌は獲得することができた。また、それら分離株については、エビの成長促進の可否についても試験を行っていた。原生動物に摂食される細菌が、その原生動物を摂食するエビにとっても良い微生物であるとは限らないため、この試験は必要である。食物連鎖の上位摂食者に食べられないための、原生動物の防衛策と考えることもできるからだ。そこで、この現象を「ネガティブフードチェーン」と定義して国際誌に発表した。その後この言葉が広まったようには思えない。

分離した細菌株のエビに対する善し悪しの判定は、稚エビの生残、脱皮率、さらに遊泳能力を目安に行った。ゾエア期のエビは非常に脆弱であり、悪条件下では数時間で死滅する。このため、短時間での判定が可能であり、実験動物としては適当といえる。さらに、死滅する前に遊泳力を失うので、**図2**のようにエビ飼育容器の一方から光照射を行うと、活力のあるエビのみが光源に向かって遊泳する。したがって、この遊泳個体を計数することで、細菌株のエビ活力に及ぼす作用を判定することができる。

往々にして、とくに微生物研究者は、病原菌の抑制にばかり注意が向き、使用する微生物株の魚介類に対する影響を調べないことがあるが、それは本末転倒といえる。

2) 抗菌能の判定

次に、分離菌株が病原微生物の増殖を抑制するかどうかの検定を行った。

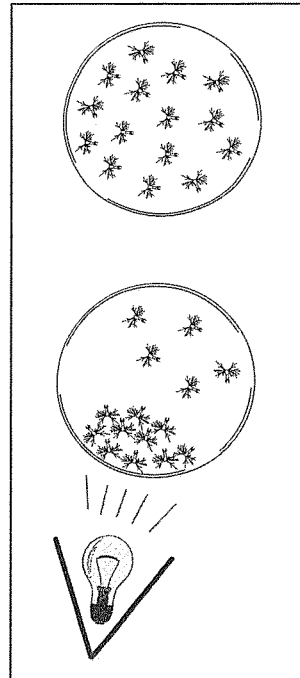


図2 エビの遊泳能の検定方法

上図：光を照射する前の飼育容器、下図：飼育容器に光を照射すると、活力のあるエビは光源に向かって遊泳する。

抗菌活性は**写真1**のように、寒天培地上において、供試菌株の間に移植した病原菌のスマア(滲んだ帯状のコロニー)の増殖抑制によって判定した。なお、**写真2**は供試菌と病原菌とを十字形に移植した場合の菌の増殖を示しているが、供試菌が病原菌の上に増殖している様子が見える。この2つの試験から、細菌株が病原菌の増殖を抑制するプロセスでは、抗菌物質の生産と細菌の直接的な攻撃のあることがわかる。その他に、細菌間における場所の取り合い(場の競合)や栄養塩の取り合いなどによって、他の微生物を抑制するプロセスもある。

3) ウイルス不活化能の判定

分離菌株によるウイルスの不活化試験では、まず宿主となる細胞を培養したのちにウイルス感染系を作製する。次に、供試菌株の培養上澄液をこの感染系に加えて、培養細胞の崩壊(cytopathic effect)の抑制の程度を検定する。この細胞崩壊が阻止された場合には、供試菌培養液に抗ウイルス活性があるといえる。我々の研究では、病原細菌の増殖を抑制する多くの供試菌が抗ウイルス活性を保持することが判明しているので、最初に抗病原菌の検定によって菌株のセレクションを行い、そのなかで抗ウイルス能の有無を調べている。

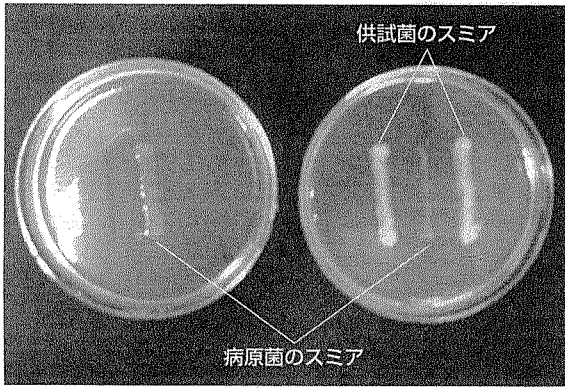


写真1 細菌の病原菌抑制能の検定 I

左側のシャーレ(寒天培地)では、病原菌のみを真ん中付近(縦方向)に塗抹してある。右側のシャーレは、同じ病原菌を塗抹したところの左右に供試菌を塗抹したもの。試験の経過時間や温度等の条件は左右とも同じだが、右側のシャーレでは真ん中の病原菌は増殖が抑制されており、スミアが小さい。

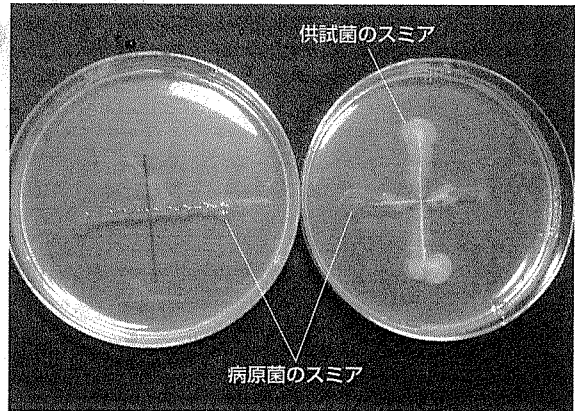


写真2 細菌の病原菌抑制能の検定 II

左側のシャーレ(寒天培地)では、病原菌のみを真ん中付近(横方向に)塗抹してある。右側のシャーレでは、病原菌と十字を形成するように、供試菌を縦方向に塗抹してある。試験の経過時間や温度等の条件は左右とも同じだが、右側のシャーレでは供試菌が病原菌の上に増殖し、その周辺の病原菌は増殖が抑制されている。

国内外の養殖現場における実施例

種々の細菌を養殖水に添加する研究例や、実際の現場で有用細菌を使用した生産例については、東南アジアおよび南北アメリカにおけるエビ養殖での事例が知られており、ヨーロッパでは養殖サケへの使用例が多い。一方、日本ではエビ・カニとともに種々の魚類(タイ、ヒラメ、ウナギ、アユ等)を中心に実施されているが、栽培漁業が行われているため、種苗への実用化例が、成魚の場合と同様に多数報告されている。

これらの研究の報文をみると、成魚に投与する細菌株の場合には「プロバイオティクス」としての記載が多く、結果として魚の成長促進とともに疾病防除の効果が挙げられている。また、種苗生産に使用する場合には、環境水の制御という意味合いが強くなるので、「バイオコントロール」の用語が用いられている(プロバイオティクスとバイオコントロール製剤の違いについては前回述べた)。成魚への生菌剤の使用例ではほとんどが配合飼料への混合によって投与されており、種苗生産では生菌剤あるいはその培養液をそのまま環境水へ添加するケースが多い。さらに、生物餌料のワムシに菌を取り込ませて種苗に投与することもある。

生菌剤の投与効果の検証に際しての留意点

これら生菌剤の投与効果の検証では、もっぱら病原

菌の抑制効果について言及し、その魚体への影響についてはほとんど触れていない報文がかなりある。これは、魚体に悪影響のあるような菌株でも、種苗の場合にはへい死といった顕著な現象が現れるが、成魚の場合には短期間ではその影響の見えにくいことに起因していよう。しかし、成魚についても、例えば内臓の代謝活性を測定することで個々の生菌剤の影響の善し悪しを確認できるので、そのような方法によって菌株のセレクションを行うことが望ましい。

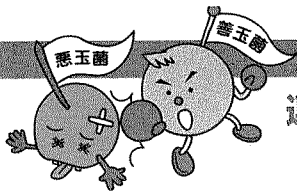
また、使用する菌株の分類同定を行っていない場合が多く見られるが、人間への病原菌の可能性もあるので注意を要する。また、陸上動物への毒性の有無については、マウスを使用した試験も行うことを推奨したい。

「昔話が2割以上を占めたら引退を考えよ」といわれているが、今回はこの禁を破ってしまった。次号は休載させていただき、第3回目となる7月号では、より前向きな姿勢で、バイオコントロールの実施例について、さらに具体的に述べる予定である。

(つづく)

参考資料

前田 昌調(2005):水圏の環境微生物学. 講談社、204頁。



バイオコントロールの実施例 と今後の課題

バイオコントロールでは、病原菌の増殖を抑制する有用微生物(細菌など)を養殖環境等に投与(添加)するが、その方法は、間接的投与と直接的投与が主体である。今回は、有用細菌投与の実施方法およびその具体例について、農業分野の事例も参照しながら紹介する。さらに、有用微生物を探索する上での留意点、バイオコントロール研究の今後の課題についても述べる。

有用微生物の間接的投与方法

1) 農業分野における実績

間接的投与とは、自然界にある病原菌を防除する有用細菌を現場で増やす方法をいい、そのためには有機物源を供給する。これは、農業ではいわゆる「古来のバイオコントロール」として実践されてきており、その一例として、“落葉、米ぬか、糖類などを苗床に添加し(踏み込んで)、その上に土を乗せて苗を植える方式”、すなわち「踏み床」がある。それら有機物の供給によって、根の伸長とともに根面で微生物が繁殖するが、野菜類は永年作物ではないので、苗床で形成された微生物群とは一生のつきあいとなる。形成された微生物群集は、病原菌の抑制とともに、死滅すれば添加した有機物よりも組成に富んだ栄養源となり、また、食物連鎖の起点となって微生物を食べる小動物(例えば線虫)が増殖して土壌を攪拌し、植物の成長に有効に作用する。

農業において、このような間接的な手法が効果を発揮する理由としては、①根が植物の成長に適当な微生物を増殖させる(涵養する)機能をもつ、②セルロースに富んだ有機物の供給によって放線菌等が増殖しやすくなり、この放線菌には抗菌物質を生産する種が多い、③土壌の団粒構造によって病原菌の急速な増殖が妨げられる、などが挙げられる。

2) 水産養殖分野における間接的投与の難しさ

このような手法は、水産養殖や種苗生産における



前田 昌調 (まえだ まさちか)

英国王立協会研究員、水産庁養殖研究所飼料生物研究室長、同中央水産研究所生物機能部長、農水省国際農林水産業研究センター水産部長などを経て、現在は宮崎大学農学部教授。専門分野は、微生物、原生動物学。農学博士。

「水作り」や、東南アジアなどで行われてきた施肥養殖と類似する。しかし、筆者らは何度か種苗生産水に少量の有機物を添加したことがあるが、疾病の発生している環境では、増殖速度のより大きい病原菌(例えばVibrio病原菌)が増殖して、種苗が斃死する苦い経験をした。このように、養殖環境は水のみが媒体であるため、善玉菌を育成する間接的手法の実用化は難しいように思う。しかし、エビ養殖における底砂や、陸上養殖における生物濾過槽などでは、微生物の涵養が可能である。

有用微生物の直接的投与方法

一方、直接的投与では、以下のような方法が採用されている。

- ①培養液(生菌剤)の投与
- ②キャリアーに吸着させて投入
- ③魚介類に接種する
- ④混合養殖の利用

などである。それぞれについて少し詳しく説明しよう。

1) 培養液(生菌剤)の投与

成魚が投与対象の場合には、生菌剤の配合飼料への混合(5~20%、容量/重量)が一般的な方法となる。投与した有用菌が腸(消化管)内で病原菌(病原細菌、ウイルス等)と遭遇すれば、その抑制効果が期待でき、また、有用細菌に宿主動物の代謝増進作用がある場合には、免疫機能を高める耐病性向上効果な

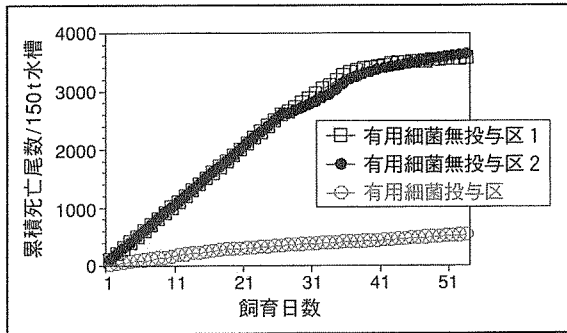


図1 有用細菌の投与・無投与生産区におけるウナギの死亡尾数(宮崎市佐土原町・児玉養鰻場での試験結果) 前田(2005)より

ども期待できる。ただし、添加した細菌は魚類消化管内で優占するが、1週間投与を中断した場合には添加菌が消失した事例も知られており、魚種や魚の状態によって菌の定着の有無やその期間が変動すると考えられる。

図1は、ウナギに有用細菌を投与した場合の死亡数の推移を示している。有用細菌(濃度約 10^9 cells/ml)は、10%(容量/重量)になるように配合飼料に混合し、その“混合飼料”を毎日(約50日間)ウナギに与えた。この結果、約2万尾の飼育尾数において、菌投与区の死亡魚は約500尾にとどまったのに対し、菌無投与区では3500尾が斃死した。

また、図2には、ヒラメ稚魚に約30日間にわたって有用細菌を投与(培養液を種苗生産水へ添加=写真1)した場合の結果を示した。約50万尾の稚魚における斃死魚数は、菌投与区で約5000尾、菌無投与区では35万尾であり、こちらも菌投与の有効性が確認された。

2) キャリアーに吸着させて投入

基盤に付着(固定化)させた微生物(図3参照)は「バイオフィリアクター」と呼ばれており、そもそも、糖をアルコールに変換するシステム等として開発されたが、すでに水質浄化や製薬など多分野で同様のシステムが開発され利用されている。

図3に示したように、バイオフィリアクターには主に「菌体包括固定化法」と「菌体吸着法」がある。前者では、担体上の菌体がカラギーナンやセルロースの薄膜で包括されており、菌由来の酵素などがこの薄膜を通過して外側の物質に作用する。すなわち、菌体は触媒のような働きをし、菌体自体が減耗しないので、その作用に

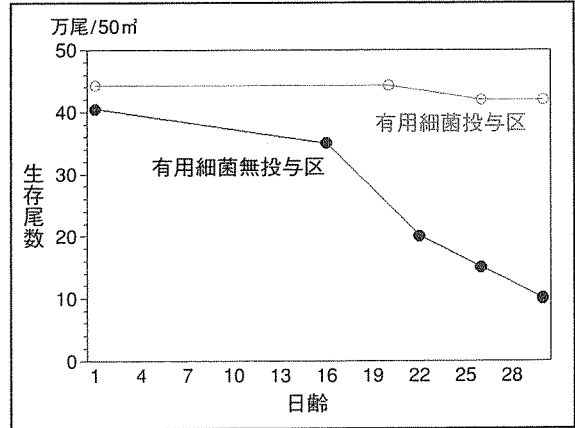


図2 有用細菌の投与・無投与生産区におけるヒラメの生残尾数(鹿児島県隼人町・MBC開発(株)隼人養殖場での試験結果) 前田(2005)より

写真1 ヒラメ種苗生産水槽への有用細菌の添加の様子(鹿児島県隼人町・MBC開発(株))

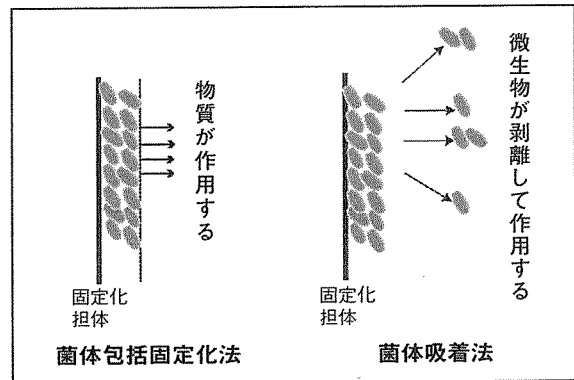
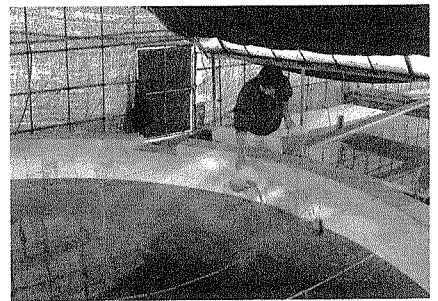


図3 バイオフィリアクター(固定化微生物担体)の模式図

持続性がある。一方、菌体吸着法は、担体上で増殖した菌が剥離して水中に供給される。その際、細菌は遊離の状態にいるより基盤に付着する傾向が強いので、この担体上の細菌がすべて剥離することはない。なお、細菌がどのような基盤に強く吸着するかについては多くの報告があるが、親水性基盤よりも疎水性基盤

(テフロンなど)のほうが付着強度は大きい(詳細は、文末の参考資料1を参照されたい)。

ちなみに、菌体吸着法による菌の供給量は予想外に多い。表1は、木炭に細菌を吸着させ、これを滅菌した水中に静置して、菌の剥離(供給)の状態を調べたものである。木炭を静置する水には、宮崎市青島の沿岸水を綿濾過とオートクレーブ滅菌した上で使用し、24時間毎に全量を交換した。その結果、3週間後でも水中には $10^7 \sim 10^8$ cells/mlの菌が計数された。水中の基盤(担体)の大きさによって遊離する菌数は異なってくるが、この実験系では、少なくとも微生物が担体(木炭)上で3週間以上増殖し続けることが明らかになった。

また、筆者の研究室において、木炭に付着させた有用細菌をニジマス飼育水に懸架したところ、ニジマスの死亡数が大幅に低減する結果を得た(図4)。このようなシステムは、陸上水槽や海面養殖場(網生簀など)に設置してバイオコントロールのために用いることができ、また、海底土に置けば底土(ヘドロ)の浄化(分解)に有効と考える。

3) 魚類に接種する方法

農業では、イモやワタの幼苗をバイオコントロール製剤(有用細菌)に浸漬すると、苗の生育が促進されるとともに、微生物製剤が増殖して植物体上に拡がり、土壌から侵入してくる病原菌への感染を防ぐ効果を示

すことが知られている。そしてこれによって、イモの収量増加やワタ幼苗の立枯病防除効果が現れることが報告されており、この手法は「バクテリアゼーション」と呼ばれている。

このような方法は、魚介類にも用いることができる。例えば、魚卵を菌液(有用細菌)に浸漬することによって病原菌の侵入防除に効果を発揮し、また、菌液浸漬やワムシ経由で魚類幼稚仔の消化管に移植した場合には、魚の成長に伴って有用細菌の効果が長期間認められる(参考資料1参照)。ただし、魚類の消化管中の微生物については、定着種があるとする見方と、環境中の微生物組成に容易に変換するという見方があるので、定着の有無や滞留期間などを魚類毎に確認する必要がある。

4) 混合養殖の利用

農業において、ニラとトマトを混植した場合に、ニラに定着しやすい微生物がトマトに有効に作用する。この微生物はトマトには定着しないので、ニラを混植することにより有用微生物がトマトに供給されることになる。

類似例として、東南アジアにおけるウシエビ(ブラックタイガー)とティラピアとの混合養殖によってウシエビの疾病が防除されるとした報告がある。この例では、ティラピアによってバイオコントロール機能のある微生物が供給されていると考えられるが、エビとティラピアとを同一池で飼育するよりも、ティラピア飼育池の水をエビ飼育池に導入するやり方のほうが、エビ池の管理や水質保全の面からも好ましいといえる。

表1 滅菌海水中にバイオリクターを静置した場合の遊離細菌数の推移

		細菌数(No./ml)			
		10^6	10^7	10^8	10^9
0日	1時間後	+	-	-	
	2時間後	+	+	+	
	3時間後	+	+	+	
1日		+	+	+	
2日		+	+	+	
3日		+	+	+	
4日		+	+	+	
5日		+	+	+	
6日		+	+	+	
7日		+	+	+	
2週間		+	+	+	-
3週間		+	+	-	-

前田(2005)より

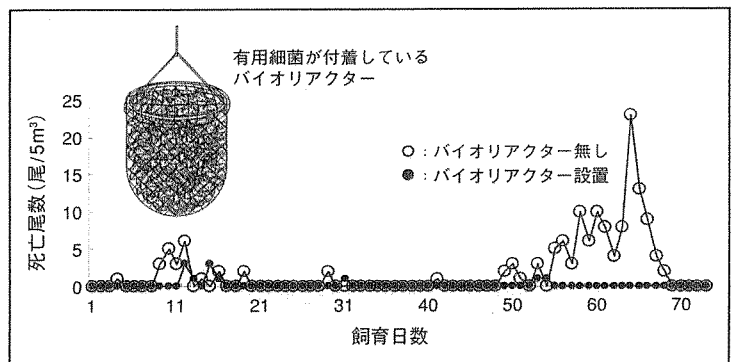


図4 バイオリクターを設置した飼育水槽におけるニジマスの死亡尾数(宮崎県水産試験場小林分場での試験結果)

前田(2005)より

有用微生物の探索の仕方

微生物はあらゆる場に生息しているため、無作為に採集すると膨大な菌数となり、そのなかから有用微生物を検定・確保するにはかなりの時間を費やすことになる。したがって、魚介類の成長を促進するような有用微生物についても、それを短期的に、できれば数少ない供試菌株のなかから見つけられるようにするには、探索する場の選択が重要となる。

この場の選択においては、当該魚介類が順調に生育している飼育環境は適当な場の1つといえる。ただし、魚介類が生育している好適環境といえども病原菌は皆無ではなく、病原菌と有用細菌の双方を含んだ細菌群集内で平衡関係が成り立っていると考えるべきである。換言すれば、魚介類にとっての好適環境からも病原菌が分離される可能性は十分にある。

また、自然界では、微生物が他の微生物を排除しようとする拮抗作用は恒常的に起きる事象であるため、ある魚介類に対して成長促進作用を示す微生物が、病原菌の増殖を抑制する機能を併せ持つことは希ではない。さらに、筆者らの研究により、浮遊細菌群よりも付着細菌群のほうが、抗病原細菌や抗ウイルス活性を有する有用細菌を含有する割合の高いことが分かった。このため、現在はスライドガラスを養殖水等に懸架し、経時的にガラス上の付着細菌を分離することによって、抗菌力のある有用細菌をより効率よく分離している。

もっとも、抗 *Vibrio anguillarum* 活性を示した菌株のなかで、抗 *Edwardsiella tarda* (ウナギエドワジエラ症原因菌) 活性、あるいは抗 *Flavobacterium psychrophilum* (アユ冷水病原菌) 活性を保持している菌の割合はそれぞれ数%に過ぎないことから、疾病防除を狙って使用する菌株を選定する場合には、各々の病原菌に対する抗菌性試験の実施が必要である。

さらに、魚介類の消化管内は、海産魚でも淡水環境であるため、有用菌株を生物防除製剤として使用する場合には、当該株が海水でも淡水培地中でも増殖できることが要求される。ちなみに、淡水培地で増殖できる細菌は、海産魚介類の消化管からも分離することができる。

今後の課題

1) 微生物の添加方法の検討

これまで述べたように、有用微生物の養殖環境への投与方法としては、養殖水への有機物の添加による有用微生物の増殖促進、配合飼料への混合、バイオリアクター利用、混合養殖の利用などがあるが、例えば養殖水への有機物の添加では、増殖の速い病原菌の増大というリスクが伴うなどの問題があるため、それぞれの方法の長短所について詳細に検討していく必要がある。さらに、藻場や干潟、海面養殖漁場の海底土などを微生物のキャリアーとして利用することについての研究も重要である。

2) 新たな微生物株の探索

上述したように、抗 *Vibrio anguillarum* 活性を示した有用細菌のなかで、抗 *Edwardsiella tarda* 活性、あるいは抗 *Flavobacterium psychrophilum* 活性を保持している菌の割合は各々数%に過ぎない。したがって、それぞれの病原菌の増殖を抑制する拮抗微生物を選定する必要がある。また、生態系ではインプットに対してはネガティブフィードバック(そのインプットによる影響を抑制・削減しようとする反応)が起こる。同一の有用菌株を長く使用した場合にも、その生菌に対する抑制要因が発生する可能性がある。すなわち、有用菌株を使い続けている間に、その効果が低下する恐れがあるため、新たな有用微生物の探索は継続的に行っていく必要がある。ちなみに、人間がこれまで利用してきた微生物の種数は、自然界に生息する微生物種数の0.1%に過ぎないともいわれており、まだまだ探索のしがいがある。

3) 害虫の防除

有害な寄生虫対策としてのバイオコントロールの手法検討は、水産養殖分野ではまだ非常に少ないが、農業分野ではすでに害虫防除がバイオコントロールの主目的の一つとなっている。例えば、殺虫性芽胞細菌 *Bacillus thuringiensis* (BT) と呼ばれる細菌の体中で生産される、蛋白質を構成要素とする結晶性毒素(水には溶けないが、還元剤や昆虫消化液中のプロテアーゼでは溶解する)を用いて、蝶、蛾、ハエ、蚊等やタムシ類の防除が行われている。なお、この殺虫効果のある毒素を生産する遺伝子は、タバコ、トマトなどの植物体中でも発現する。

また、害虫防除効果のあるバキュロウイルス(昆虫ウイルス)が農薬として登録されており、他にも、細胞質多角体病ウイルスや昆虫ボックスウイルスが農薬として使用されている。とくに、これまで最も多く市販されている“バキュロウイルス農薬”は、無脊椎動物に特異的に感染して防除性能が強く、人畜や植物作物に対する感染の可能性は少ない、といった特徴を有している(なお、エビ疾病原因菌にバキュロウイルスの種がある)。

さらに、糸状菌を人為的に使用して害虫を防除する試みが19世紀後半にみられ、コガネムシの幼虫の防除に *Metarhizium anisopliae* が大量培養された。その後、数十種の糸状菌について害虫防除作用が検討されている。また、昆虫に寄生し疾病を引き起こす線虫はそれほど多くないが、Steinernematidae 科と Heterohabtididae 科の種が宿主範囲が広く、大量生産できるので、世界的に注目されており、すでに商業ベースに乗っている。

このように、害虫に対するバイオコントロールは農業分野ではかなり研究が進んでいるので、今後は養殖魚への利用が検討されるであろう。

4) 微生物群集の多様性の維持

微生物の多様性が低下すると、微生物群集中において病原菌が優占する状況に転じる可能性がある。すなわち、有用微生物を連続して長期間投与すると、養殖水中あるいは魚類の腸管内へ投与した菌株が優占する反面、いわゆる単純な(多様性の低下した)細菌相となる。多様性が低下した生態系は外環境からの影響を受けやすくなる恐れがあり、単純な菌相が崩壊して病原菌が増殖する可能性が十分にある。

また、菌投与量や頻度が過剰でも当該菌株が腸内細菌において優占することになるが、その状態が継続した場合の魚体への影響についての知見はまだ少ない。したがって、有用微生物の望ましい投与頻度・期間の検討が必要である。

5) バイオマスの利用

バイオマス(生物由来の有機性資源)のリサイクルが全国的に展開されているが、在庫増大に悩んでいる事業者が案外多い。これは、リサイクル品(例えば、飼料や肥料)全般にいえることであるが、価格が割高な場合が多いにもかかわらず、製品の機能は良くて既存

の普及品と同等にとどまっているため、利用者側が積極的に購入しにくいことが一因である。この対策として、リサイクル品の高付加価値化が考えられる。例えば、抗病性をもった有用微生物でバイオマス発酵を行った場合には、バイオマス自体も抗病性をもつことになる。また、微生物の培地は比較的高価なので、魚介類残滓や焼酎粕などのバイオマスの利用によって培地コストの削減を図る、といったアプローチも期待できる。

6) 市販の微生物製剤の評価

水産養殖用の微生物製剤は10種類以上が製品として販売されているが、この製品の大半は乳酸菌、枯草菌(納豆菌を含む)、EM菌である。種構成が明らかでないEM菌を除いて、これらの菌はプロバイオティクス(整腸剤)としての効果は期待できるが、淡水魚類および海産魚類の消化管においては出現頻度の低い菌群であり、抗菌性も弱いと考えられる。このため、魚類養殖に用いることが適切かどうか、病原菌抑制効果があるか否か等についての検討が必要である。

なお、ファージを使用した病原細菌の防除およびウイルスを抑制する細菌についての詳細は、参考資料2および参考資料3にまとめられているので、参照されたい。

むすび

以上、水産養殖分野におけるバイオコントロールについて3回にわたって述べてきたが、十分に説明しきれないもどかしさも感じており、そのような点については今後、本年5月に設立された「バイオコントロール研究会」(前月号の50-51頁参照)の事業において充足していきたいと考えている。

末筆となるが、この連載では湊文社の池田成己氏に大変お世話になったので、ここに謝意を表す。

(了)

参考資料

- 1) 前田昌調(2005):水圏の環境微生物学, 講談社, 204頁.
- 2) 中井敏博(2005):ファージで魚の細菌感染症を防ぐ, アクアネット, Vol. 8, No. 1-3.
- 3) 吉水 守(1999):有用細菌による細菌叢の安定化—抗ウイルス物質産生腸内細菌による魚類ウイルス病の制御—, アクアネット, Vol. 2, No. 11.