

クルマエビのフサリウム症に対する銅イオン発生装置の効果（新養殖管理技術開発試験）

玉城英信

1. 目的

平成18年度の沖縄県のクルマエビ養殖における魚病被害額は3億3千万円、そのうち真菌性疾病のフサリウム症による被害額は6千万円に達しており、産業的にも大きな問題である。このような背景から、一部のクルマエビ養殖場では銅イオン発生装置によるフサリウム症対策を実施しているものの、その効果は明らかにされていない。そこで、クルマエビのフサリウム症に対する銅イオン発生装置の効果について検討を行った。

2. 方法

1) 養殖場における銅イオン発生装置の効果

銅イオン発生装置を設置している養殖場と設置していない養殖場のフサリウム症防除効果を比較するため、フサリウム症が発症しやすい12月から翌年の5月までの飼育水中の銅濃度とフサリウム菌の出現率を調べた。

飼育水中の銅濃度は銅イオン発生装置を設置しているA養殖場と設置していないBとCの養殖場から月1回の頻度で飼育水を採水してポリフィリン法で銅濃度を測定した。

フサリウム菌の出現率は各養殖場から鮮度の良い斃死エビ500gを月1回の頻度で入手し、体表面を70%アルコールで殺菌後、クリーンベンチ内で左右の鰓弁を摘出してマイコセル寒天培地に接種した。マイコセル寒天培地は25℃に設定したインキュベーター内で7日から10日間培養後、光学顕微鏡下で菌糸や分子子の形態からフサリウム菌とその他の真菌に分類し、その出現率を比較した。

2) 飼育条件別の海水中の銅濃度

銅イオン発生装置の効果を明らかにするために、平成18年11月7日～16日の間に飼育池に銅イオン発

生装置を設置している養殖場3ヶ所、銅線を設置している養殖場3ヶ所、そして何も設置していない養殖場3ヶ所の計9ヶ所から、給水に使用している海水と飼育池の海水を採水した。海水はその日の内に水産海洋研究センターに持ち込み、ポリフィリン法で海水中の銅濃度を測定した。

3) 飼育環境別の銅蓄積部位の比較

銅イオン発生装置を使用した養殖場のクルマエビは使用していない養殖場のクルマエビに比較して、生体100g中に含まれる体内銅濃度の高いことがわかってる（玉城・吉里，2007）。しかし、それが体表面への銅の沈着なのか、臓器内への銅の蓄積なのかはわかっていない。そこで、今年度は内臓部分、可食部分（腹部筋肉）、そしてその他部分（殻、眼球、尾節など）の銅濃度を調べた。検体には銅イオン発生装置を設置していないD、Eの養殖場と10～30ppbの銅濃度で飼育しているF、Gの養殖場のクルマエビを用いた。銅濃度のICP発光分析には少なくとも20gの試料が必要なことから、各養殖場より1kgあたり45尾入りの活エビを購入し、内臓部分は45尾全てを使用して1区、可食部分は15尾ずつの3区、その他の部分も15尾ずつの3区の計7区に分けて、100g中の銅濃度をICP発光分析法で測定した。ICP発光分析は財団法人日本冷凍食品協会に委託した。

4) 銅濃度別フサリウム症感染試験

前年度の試験ではフサリウム症の感染率が低かったため、フサリウム症と銅濃度の関係を明らかにできなかった（玉城，2007）。そこで、試験1では長期飼育による感染率の推移を調べた。また、試験2では片方の鰓弁の一部を切断してフサリウム菌の感染門戸を設けた状態で飼育を開始した。試験1は平成18年2月23日から4月20日（56日間）、試験2は5月30日

から7月12日（43日間）の間に行った。試験に用いた水槽、注水量、通気方法は前年度と同様にした（玉城，2007）。銅濃度は1～25mAの範囲で電流値を変え、試験1では15、25、50、100、150ppb、試験2では15、25、50、150、250ppbの銅濃度になるように飼育水を調整した。対照区には銅イオン発生装置を設置しない海水区を設けた。試験1は平均体重26.3g、平均頭胸甲長37.7mm、試験2では体重34.6g、頭胸甲長43.7mmのクルマエビを用い、試験1は15尾、試験2は12尾ずつ収容した。餌にはクルマエビ用配合飼料を使用した。給餌量は総重量の1%を目安にし、残餌によって適宜加減した。平成18年2月9日にフサリウム症による大量斃死のあったクルマエビ養殖場から斃死エビを搬入した。斃死エビは各水槽に5尾ずつ収容するとともにマイコセル寒天培地に菌を接種して培養した。培養したフサリウム菌は1週間間隔で経代培養を行うとともに培養菌を各飼育水槽内に添加した。水温の測定は午前9時～10時の間に行い、銅濃度と生残率の測定は週1回の頻度で行った。試験終了時に生残していたクルマエビは肉眼でフサリウム症による鰓黒状態と、銅の沈着による鰓の黒色化を観察した。また、生残個体の左右の鰓弁はマイコセル寒天培地に接種して鰓弁上のフサリウム菌の有無を調べた。

5) 餌料種類別フサリウム症感染試験

フサリウム症の人為感染方法を確立するために、台湾製配合飼料、日本製配合飼料、そして日本製ビタミン強化配合飼料を使用して、餌料別のフサリウム症感染試験を実施した。試験に使用した水槽、飼育の条件は銅濃度別フサリウム症感染試験と同様とした。試験には予めマイコセル寒天培地でフサリウム症に感染していないことを確認した平均体重22.6±1.33gの養殖クルマエビを用いた。各試験区に15尾ずつエビを収容し、試験期間中に飛び出し、脱皮後の衝突などの物理的損傷によって斃死した場合はストック水槽より追加収容して収容尾数を維持する

ようにした。また、各試験区には培養したフサリウム菌の分生子を添加する区とフサリウム症に感染して死んだ個体を5尾ずつ収容する区を設けた。分生子の添加と斃死個体の収容は月に2回の頻度で行った。水温の測定は午前9時～10時の間に行った。試験終了時に生残していたクルマエビは肉眼でフサリウム症による鰓黒状態と、銅の沈着による鰓の黒色化を観察した。また、生残個体の左右の鰓弁はマイコセル寒天培地に接種して鰓弁上のフサリウム菌の有無を調べた。

3. 結果及び考察

1) 養殖場における銅イオン発生装置の効果

銅イオン発生装置を設置している養殖場と設置していない養殖場の飼育水中銅濃度の推移を表1に示した。銅イオン発生装置を設置しているA養殖場の飼育水中の銅濃度は各池の平均で10.8～32.7ppbの範囲であった。それに対して銅イオン発生装置を設置していないB養殖場では0.4～2.6ppb、C養殖場では0.9～2.4ppbの範囲と、銅イオン発生装置を設置した養殖場の飼育水中の銅濃度は明らかに高い値で推移した。

クルマエビ養殖場におけるフサリウム菌の出現率を図1、フサリウム菌以外の真菌の出現率を図2に示した。銅イオン発生装置を設置しているA養殖場では試験を開始した12月にフサリウム症による大量斃死が発生し、12月の出現率は54.8%と高い値であった。それに対して設置していないBとCの養殖場の12月のフサリウム菌の出現率は16.7%と9.5%であった。その後もA養殖場ではフサリウム症による斃死が続き、4月に飼育を中止した。一方、BとCの養殖場ではフサリウム菌は確認されるものの大量斃死は発生せず、フサリウム菌の出現率もB養殖場では0～16.7%、C養殖場では0～18.8%の低い範囲で推移した。4月までのフサリウム菌以外の真菌の出現率はA養殖場で0～8.6%、B養殖場で0～9.1%、そしてC養殖場では0～11.1%の範囲と低い値で推移していた。しかし、5月のBとCの養殖場ではフサリウム菌

表1 銅イオン発生装置を設置している養殖場と設置していない養殖場の飼育水中銅濃度の推移
(濃度の単位はppb)

養殖場	測定月日						平均	偏差	最大	最小
	12月5日	1月17日	2月14日	3月15日	4月16日	5月14日				
A1号池 (設置)	16.4	32.9	14.2	22.1			21.4	8.3	32.9	14.2
A2号池 (設置)	7.5	33.6	24.7	20.6			21.6	10.9	33.6	7.5
A3号池 (設置)	9.7	17.2	13.1	3.4			10.8	5.8	17.2	3.4
A5号池 (設置)	23.9	24.3	20.6	62.1			32.7	19.6	62.1	20.6
B1号池	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	1.1	0.4	1.1	1.1	0.0
B2号池	N.D.	2.6	0	0	2.6	N.D.	1.3	1.5	2.6	0.0
B3号池	N.D.	1.9	N.D.	N.D.	3.4	N.D.	2.6	1.1	3.4	1.9
C1号池	N.D.	4.9	N.D.	0			2.4	3.4	4.9	0.0
C2号池	0	2.2	N.D.	0			0.9	1.2	2.2	0.0
C3号池	0	N.D.	0	N.D.	2.6	2.6	1.3	1.5	2.6	0.0

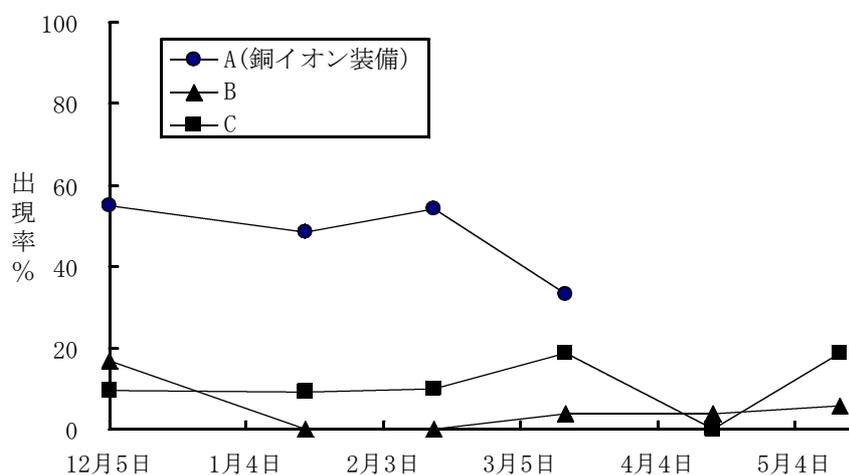


図1 クルマエビ養殖場におけるフサリウム菌の出現率

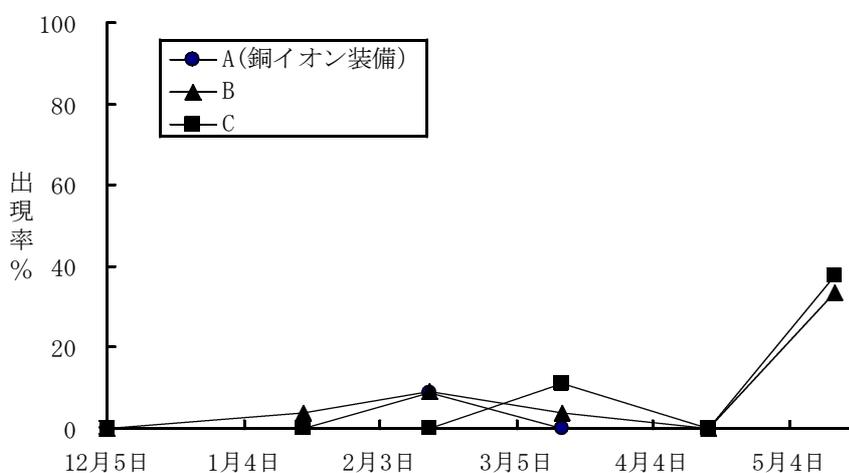


図2 クルマエビ養殖場におけるフサリウム菌以外の真菌の出現率

以外の真菌の感染率が33.3%と37.5%と著しく増加した。以上のように、今年度は銅イオン発生装置を設置した養殖場でフサリウム症による大量斃死が発生し、銅イオン発生装置によるフサリウム症の防除効果に疑問が残された。

2) 飼育条件別の海水中の銅濃度

クルマエビ養殖場における飼育条件別飼育水中の銅濃度を表2に示した。給水に使用している海水の銅濃度は0~1.8ppbの範囲と各養殖場間に差を認められなかった。それに対して飼育池の銅濃度は銅イオン発生装置を設置している養殖場は15.6~33.8ppbの範囲で平均24.3ppb、銅線を設置している養殖場では1.35~2.43ppbの範囲で平均2.01ppb、そして設置していない養殖場では1.61~2.61ppbの範囲で平均

2.15ppbと銅イオン発生装置を設置した養殖場の飼育海水中の銅濃度は明らかに高かった。しかし、銅線を設置している養殖場と設置していない養殖場では銅濃度に差のないことが明らかになった。銅線は海水中で表面が緑色の緑青といわれる塩基性炭酸銅となり、この緑青の状態では水、酸、アンモニア水などに不溶となるため(久賀, 1994)、今回のような測定結果になったと推察した。以上のように、銅線を海水中に設置しても、銅線が緑青になった状態では銅イオン濃度は増大しないことがわかった。

3) 飼育環境別の銅蓄積部位の比較

飼育環境別の銅蓄積部位の比較を表3に示した。いずれの養殖場のクルマエビも内蔵部分の銅濃度が最も高く、次にその他の部分、そして可食部分の順

表2 クルマエビ養殖場における飼育条件別飼育水中の銅濃度

(濃度の単位はppb)

飼育条件	発生装置を設置				銅線を設置				設置なし			
			平均				平均				平均	
給水海水	1.50	1.80	0.00	1.10	0.75	0.87	1.31	0.98	0.99	0.87	0.93	1.10
飼育池	33.8	15.6	23.5	24.3	1.35	2.24	2.43	2.01	1.61	2.24	2.61	2.15

表3 飼育環境別銅濃度の蓄積部位の比較

養殖場	平均体重±偏差 (g)	内蔵部分 (ppm)	可食部分 (ppm)	その他の部分 (ppm)
D: 設置していない	23.4±2.18	22	9.2	15
			8.5	24
			8.7	19
			7.6	21
E: 設置していない	24.5±3.56	28	6.9	23
			4.1	16
			平均	25.0
F: 設置している	25.9±1.61	180	11	35
			11	41
			11	44
			19	41
G: 設置している	25.6±1.92	140	10	45
			12	36
			平均	160.0

であった。このことより、銅は内蔵部分に多く蓄積することが明らかになった。また、銅イオン発生装置を設置していないDとE養殖場のクルマエビの内蔵部分100g中の銅濃度は22ppmと28ppmであったのに対し、銅イオン発生装置を設置しているFとGの養殖場の内蔵部分の銅濃度は180ppmと140ppmであり、銅イオン発生装置の設置によって内蔵部分への銅の蓄積が増加することを確認した。しかし、銅イオン発生装置を設置している養殖場のクルマエビ内蔵部分100g中の銅濃度は平均で160ppmと高い値であるが、100gの内蔵部分を摂取するには体重25gのクルマエビ225尾を食べる必要があり、摂取するのは難しいと思われる。また、銅の食事摂取基準は上限量で10mg/日、国際機関による暫定的許容1日摂取量は0.5mgCu/kg体重、清涼飲料水の製造基準では1.0mg/L以下となっていることから、今回のクルマエビ内蔵部分の160ppm/100gは許容範囲である。各

環境下で飼育されたクルマエビの可食部分とその他の部分の100g中の銅濃度をボンフェローニ補正法とTukey法による多重検定によって比較した結果では、E養殖場の可食部分とG養殖場の可食部分に $P<0.05$ の確立で有意差が認められたものの、その他の部分には有意差はなかった。これらのことから、銅イオン発生装置から溶出する銅はクルマエビの可食部分やその他部分にはあまり蓄積しないことがわかった。一方、養殖クルマエビの可食部に含まれる銅濃度は4.2ppmであることから（香川，2001），今回のクルマエビの可食部分の銅濃度9.9ppmはやや高いが、天然のサクラエビの20.5ppmやホタルイカの34.2ppmと比較すると低い値であった（香川，2001）。

4) 銅濃度別フサリウム症感染試験

銅濃度別フサリウム症感染試験1の水温と生残率の推移を図3、銅濃度別フサリウム症感染試験1の結果

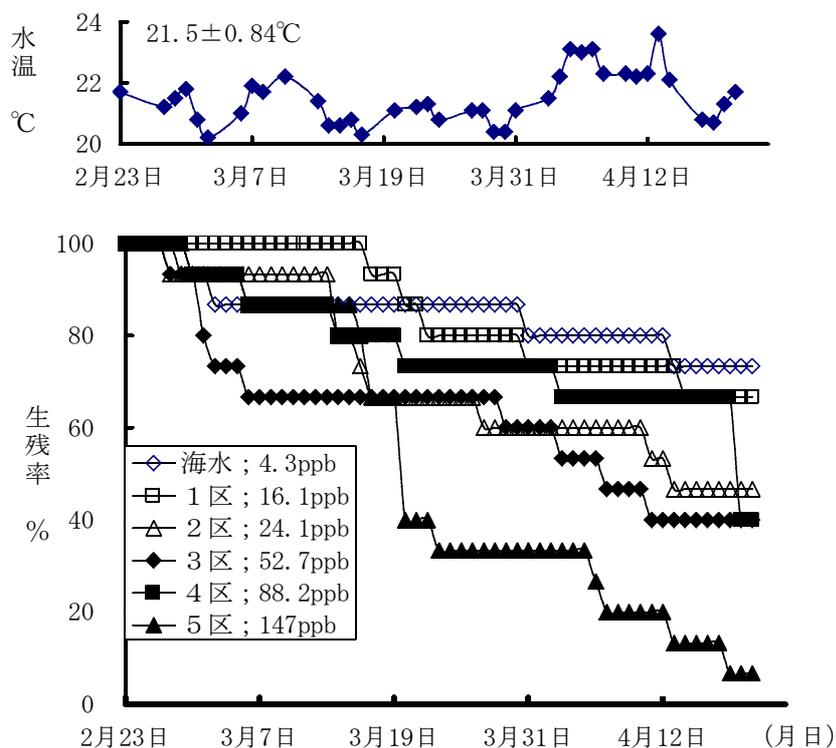


図3 銅濃度別フサリウム症感染試験1の水温と生残率の推移

表4 銅濃度別フサリウム症感染試験1の結果

	海水	1区	2区	3区	4区	5区
収容個体	15	15	15	15	15	15
銅濃度 (ppb)	4.30±3.44	16.1±5.87	24.1±9.35	52.7±15.9	88.2±8.45	147±20.2
生残個体	11	10	7	6	6	1
生残率 (%)	73.3	66.7	46.7	40.0	40.0	6.7
鰓黒個体	0	0	0	0	0	0
鰓の黒色個体	0	0	0	0	0	0
分離培養率 (%)	100	100	100	100	100	100

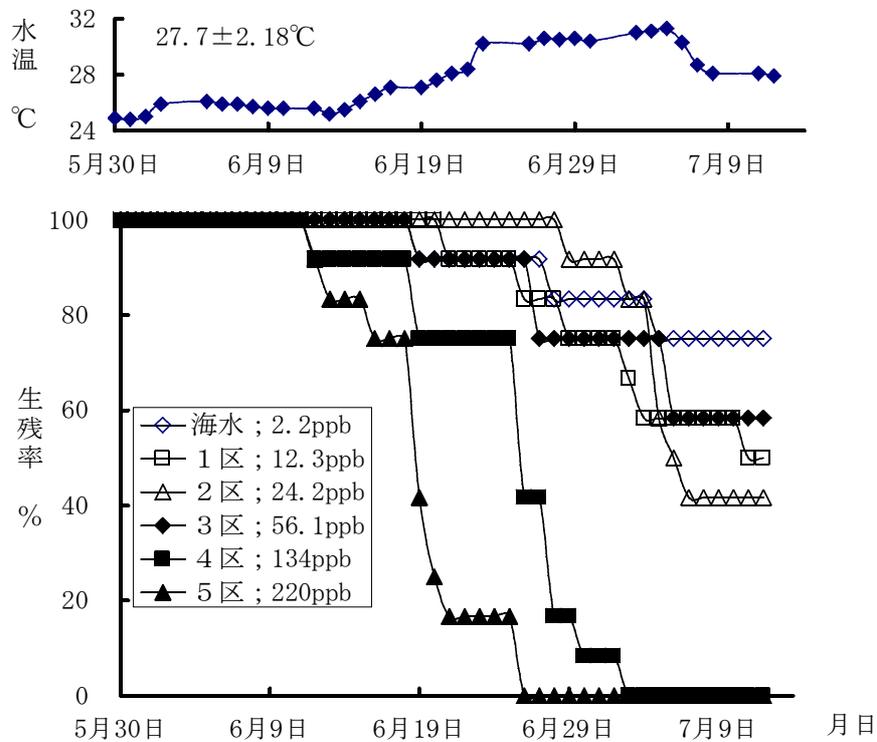


図4 銅濃度別フサリウム症感染試験2の水温と生残率の推移

表5 銅濃度別フサリウム症感染試験2の結果

	海水	1区	2区	3区	4区	5区
収容個体	12	12	12	12	12	12
銅濃度(ppb)	2.17±1.66	12.3±7.19	24.2±8.18	56.1±15.3	134±11.5	220±23.0
生残個体	9	6	5	7	0	0
生残率(%)	75.0	50.0	41.7	58.3	0	0
鰓黒個体	0	0	0	0	N.D.	N.D.
鰓の黒色個体	0	0	0	0	N.D.	N.D.
分離培養率(%)	100	100	100	100	N.D.	N.D.

を表4に示した。試験1の水温は20.2～23.6℃の範囲で、平均は21.5±0.84℃であった。生残率は6.7～73.3%範囲で、対照の海水区が最も高く、次に1区、2区、3区と4区、そして5区と銅濃度の高いほど生残率が低した。特に、5区の生残率は6.7%と著しく低く、斃死個体の鰓や体表面が緑青色に染まっていたことから、銅濃度147ppbの長期飼育ではクルマエビに悪影響があると判断した。しかし、その他の区の斃死したクルマエビは鰓や体表面への銅の沈着は認められず、斃死は脱皮時の衝突や飛び出しによるものであった。一方、フサリウム菌は試験終了時の全てのクルマエビの鰓弁より菌が分離されたことから、フサリウム菌は鰓弁に菌糸または分生子の状態が付着しているもの、鰓弁内へ侵入はクルマエビ自身の免疫力によって防除されたものと思われる。

銅濃度別フサリウム症感染試験2の水温と生残率の推移を図4、銅濃度別フサリウム症感染試験2の結果を表5に示した。試験2の平均水温は27.7±21.8℃で、水温は24.8～31.3℃の範囲で推移した。生残率は0～75.0%の範囲で、対照の海水区が最も高く、次に3区、1区、そして2区の順で、銅濃度134ppbの4区は飼育開始から34日目の7月2日、220ppbの5区は26日目の6月25日に全滅した。しかし、試験1と同様に海水区および1～3区の斃死は脱皮時の衝突や飛び出しによるもので、フサリウム症に感染して死んだ個体は観られなかった。しかし、4区と5区の斃死個体は鰓弁や体表が緑青色に染まっていたことから、高い銅濃度では生残に悪影響を及ぼすと判断した。

以上のように、今回の試験ではフサリウム症の感

染率が著しく低いことから、フサリウム症と銅濃度の関係を明らかにすることはできなかった。しかし、試験1と2の結果で、鰓弁が緑青に染まったクルマエビの斃死個体が多く観られたことから、銅濃度134ppb以上ではクルマエビの生残に悪影響を及ぼすことが明らかになった。

5) 餌料種類別フサリウム症感染試験

餌料別感染試験の水温とフサリウム症による生残率の推移を図5、餌料種類別フサリウム症感染試験の結果を表6に示した。試験中の水温は18.6～24.2℃の範囲で、平均21.2±1.47℃であった。台湾製配合飼料を給餌したクルマエビではフサリウム菌を添加した区で飼育開始から33日目と95日目、斃死個体を収容した区で89日目にそれぞれ1尾ずつの計3尾がフサリ

ウム症に感染して斃死した。日本製配合飼料を給餌した区では斃死個体を収容した区が67日目と101日目にそれぞれ1尾ずつの計2尾がフサリウム症に感染して斃死した。それに対し、日本製ビタミン強化配合飼料では斃死はなかった。また、生残個体のフサリウム症感染は台湾製配合飼料を給餌して斃死個体を収容した区の1尾(感染率7.14%)のみに確認した。一方、生残個体の鰓弁からのフサリウム菌の分離培養率は78.6～100%の範囲とほとんどの個体から分離された。

以上のように、ビタミンを強化した日本製配合飼料を給餌した区では鰓弁にフサリウム菌の付着はあるもの、フサリウム症を発症しなかった。このこと

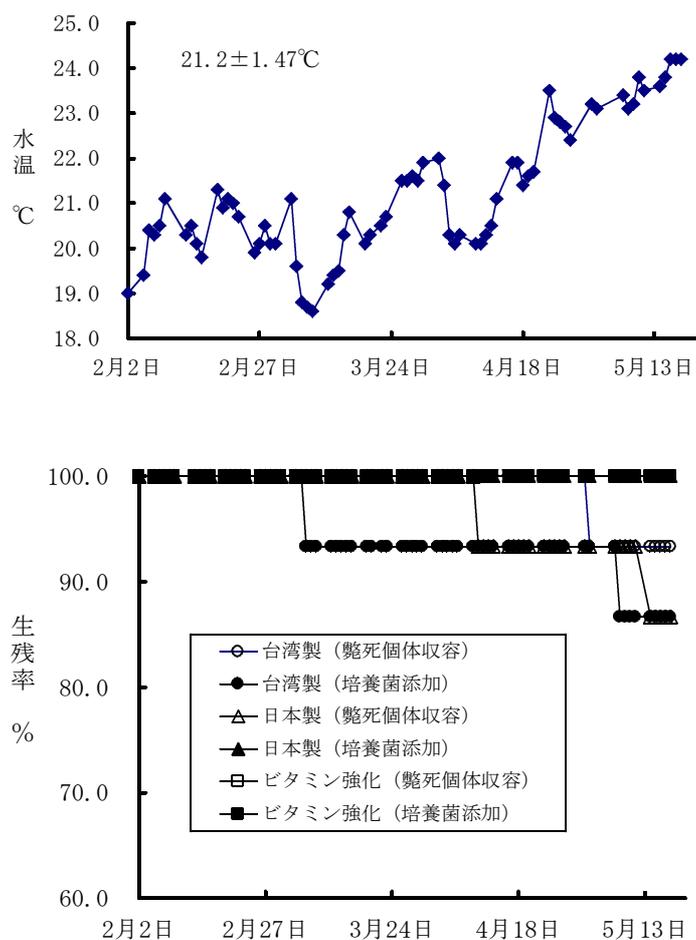


図5 餌料別感染試験の水温とフサリウム症による生残率の推移

表6 餌料別フサリウム症感染試験の結果

餌料種類	台湾製		日本製		日本製ビタミン強化	
	斃死個体	培養菌	斃死個体	培養菌	斃死個体	培養菌
収容個体	15	15	15	15	15	15
フサリウム症による斃死	1	2	2	0	0	0
フサリウム症以外の斃死*	2	1	3	1	3	4
試験終了時の生残個体	14	13	13	15	15	15
生残率 (%)	93.3	86.7	86.7	100	100	100
フサリウム症による斃死率 (%)	6.7	13.3	13.3	0.0	0.0	0.0
生残個体のフサリウム症感染数	1	0	0	0	0	0
生残個体のフサリウム感染率 (%)	7.14	0	0	0	0	0
分離培養率 (%)	78.6	100	100	100	100	100

*：フサリウム症以外の斃死とは、飛び出し、脱皮後の衝突などの物理的損傷による斃死を意味し、斃死した場合はストック水槽から追加収容した。

から、免疫力を強化することによってフサリウム症の発症を抑制できることが証明された。しかし、今回の試験ではフサリウム症の感染は確認できたものの、感染率が低いことから配合飼料間の明確な比較はできなかつた。今後はフサリウム症を発症させるトリガーを明らかにし、銅濃度とフサリウム症のとの関係について再度検討する必要がある。

文 献

- 香川芳子. 五訂食品成分表2001. 女子栄養大学出版, 2001 ; 170-171.
- 久賀俊正. 銅と衛生. 社団法人日本銅センター, 1994 ; 126pp.
- 玉城英信・吉里文夫. クルマエビのフサリウム症に対する銅イオン発生装置の効果. 沖縄県水産海洋研究センター, 2007 ; 112-115.