

養殖魚の生体防御機能実態調査事業*

嶋 本 有 志・竹 内 照 文

目 的

養殖は限られた水槽や生け簀に高密度の魚を収容し、集約的に飼育することにより行われるが、この過程で魚にストレスを与えることが多く、病気の発生を引き起こしている。近年、養殖魚の疾病は多様化するとともに増加の一途にあるが、病気の発生時には水産用医薬品による治療が行われている。ところが、医薬品の使用については食品としての安全性の観点から消費者の懸念が強く、医薬品に依存しない予防的な魚病対策を確立することが重要な課題となっている。

この事業は魚介類に本来備わっている生体防御機能（以下バイオディフェンス機能と略する）に着目し、その機能を把握するとともに活用し、魚病被害の軽減を図るとともに消費者ニーズにあった健康で高品質な養殖魚の生産技術を確立するものである。

平成11年度は平成8~10年度¹⁻³⁾に引き続き、ヒラメの陸上養殖における種々の飼育技術がバイオディフェンス機能に与える影響について検討した。

方 法

1 採血とバイオディフェンス機能の測定

採血 供試魚は外観的に正常な個体を取り揚げ、ヘパリン処理した注射器(5ml)を用いて尾部血管から1ml採取した。なお、ヘパリンナトリウム溶液はヒラメ800U/mlとした。

ヘモグロビン濃度 シアンメトヘモグロビン溶液1mlに血液5 μ lを加えて攪拌し、3時間以上放置して発色を待つ。その後、マイクロプレートに200 μ lずつ3穴に分注し、マイクロプレートリーダーで波長540nmの吸光度を測定した。なお、ヘモグロ

ビン濃度は以下の計算式によって求めた。

$$\text{Hb濃度}(g/100ml\text{血液}) = \text{吸光度} \times 201(\text{希釈倍率}) \times 0.279$$

NBT還元能およびポテンシャルキリング活性 血液100 μ lを毛細管に充填して、1000G、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離する。毛細管を遠心分離器から取り出した後、赤血球の混入を出来るだけ避けて白血球層と赤血球層の境界面を切断し、白血球層から2cmまでの血漿と白血球を含む部分を50 μ lのRPMI1640で空のマイクロチューブに流し出す。細胞を分散させるため氷中でピペッティングを行う。これを予めRPMI1640溶液、NBT溶液およびZymosan加NBT溶液(5mg/ml)を15 μ lずつ分注しておいたマイクロチューブに、等量ずつ加えて20 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする。1時間後DMF400 μ lを各マイクロチューブに加えてピペッティングで混和し、1500G、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離する。上清250 μ lを石英マイクロプレートリーダーで540nmの吸光度を測定した。なお、評価はOD値で表し、以下の計算式によった。

NBT還元能=

$$\text{OD(NBT溶液)} - \text{OD(RPMI1640溶液)}$$

ポテンシャルキリング活性=

$$\text{OD(Zymosan加NBT溶液)} - \text{OD(NBT溶液)}$$

白血球貪食能 Zymosanを5mg/mlとなるようにRPMI1640に浮遊させ、氷冷しながら超音波処理(30秒、4回)した後、マイクロチューブに50 μ lずつ分注後凍結保存し、使用するごとに解凍した。まず、Zymosan浮遊液50 μ lに血液を等量加え、ピペッティングで攪拌し、合計100 μ lを毛細管に充填した後、20 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした。その後、1000G、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離し、白血球

*養殖魚の生体防御機能実態調査事業による。

層と赤血球層の境界面で毛細管を切断し、血漿、白血球および少量の赤血球を含む部分をスライドグラスに直接滴下する。直ちに塗抹、風乾した後、メイグリュンワルド・ギムザ染色し、封入後検鏡する。なお、食食率および食食指数は以下の式で求めた。

食食率＝

$$\frac{\text{(Zyomosanを食した食食細胞数/観察した食食細胞数)} \times 100}{\text{食食細胞数}}$$

食食指数＝

食食されたZyomosan数/食食陽性細胞数
血漿リゾチーム活性 マイクロプレートの穴にリゾチーム活性測定用バッファー60 μ lを入れ、血漿5 μ lを加える。M.lysodeikticus浮遊液60 μ lを加え、マイクロプレートリーダーにセットし、0、15、30、45および60分後に吸光度を測定する。マイクロプレートリーダーで測定する時以外は25℃でインキュベートした。活性は吸光度の1分間当た

表1 換水率(注水量)試験について設定した試験区

区	供試尾数	全長(cm)	体重(g)	換水率(回/日)	水深(cm)
1	30	14.5~17.0	26.0~44.0	10	30
2	30	14.3~17.0	27.0~43.0	15	30
3	30	15.0~17.0	27.0~46.0	20	30

表2 飼育水深試験について設定した試験区

区	供試尾数	全長(cm)	体重(g)	換水率(回/日)	水深(cm)
1	20	12.2~16.3	32.1~70.7	15	30
2	20	13.6~16.4	37.6~67.8	15	50
3	20	14.2~18.0	35.2~61.7	15	70

表3 絶食試験について設定した試験区

区	供試尾数	全長(cm)	体重(g)	換水率(回/日)	水深(cm)	絶食期間(日)
1	20	12.2~18.8	20.9~80.0	15	30	0
2	20	14.6~16.0	37.0~46.4	15	30	7
3	20	13.6~16.4	31.1~49.8	15	30	21

りの変化率で評価し、勾配の最も大きい任意の2点間の値を時間で割って測定値(-mOD/min)とする。

2 各種の飼育技術がヒラメのバイオディフェンス機能に与える影響

換水率(注水量) 飼育水槽の注水量がヒラメのバイオディフェンス機能に与える影響を検討するため、換水率を10、15、20回転/日に試験区を設定した(表1)。供試魚はヒラメ稚魚で、2tの循環水槽で飼育した。飼育水温は、26.9~29.1℃である。採血は、スタート時(10尾)、11日目(各区7尾)、22日目(各区7尾)に行い、バイオディフェンス機能の各項目を測定した。

飼育水深 飼育水深がヒラメのバイオディフェンス機能に与える影響を検討するため、飼育水深を30、50、70cmに試験区を設定した(表2)。供試魚はヒラメ稚魚で、1tのコンクリート水槽で飼育した。飼育水温は、27.8~30.2℃である。採血は、スタート時(9尾)、10日目(各区7尾)、17日目(各区8尾)に行い、バイオディフェンス機能の各項目を測定した。

絶食 絶食がヒラメのバイオディフェンス機能に与える影響を検討するため、試験区を絶食なし(1区)、7日間絶食(2区)、21日間絶食(3区)に設定した(表3)。また、2、3区については絶食終了後、毎日給餌し、34日目まで飼育した。供試魚はヒラメ稚魚で、2tの循環水槽で飼育した。飼育水温は、24.1~29.4℃である。採血は、スタート時(8尾)、7日目(各区8尾)、21日目(各区8尾)、34日目(各区8尾)に行い、バイオディフェンス

表4 飼育密度試験について設定した試験区

区	供試尾数	全長(cm)	体重(g)	換水率 (回/日)	水深(cm)	飼育密度 (kg/m ³)
1	80	16.4~18.8	58.7~78.1	15	50	4
2	40	15.0~18.8	45.7~76.7	15	50	2
3	20	13.8~16.8	32.2~62.8	15	50	1

表5 薬浴試験について設定した試験区

区	供試尾数	全長(cm)	体重(g)	換水率 (回/日)	水深(cm)	薬浴
1	20	19.4~24.8	79.0~146.9	15	50	なし
2	20	18.4~21.4	65.1~104.0	15	50	あり

表6 投薬試験について設定した試験区

区	供試尾数	全長(cm)	体重(g)	換水率 (回/日)	水深(cm)	投薬量
1	52	20.2~23.8	64.7~109.0	15	50	なし
2	52	20.4~23.4	73.7~119.4	15	50	通常
3	52	20.4~24.0	78.5~103.4	15	50	2倍

機能の各項目を測定した。

飼育密度 飼育密度がヒラメのバイオフィェンス機能に与える影響を検討するため、飼育密度を4, 2, 1 kg/m³に試験区を設定した(表4)。供試魚はヒラメ稚魚で、1tのコンクリート水槽で飼育した。飼育水温は、23.5~29.0℃である。採血は、スタート時(8尾)、14日目(各区8尾)、35日目(各区8尾)に行い、バイオフィェンス機能の各項目を測定した。

薬浴 薬浴がヒラメのバイオフィェンス機能に与える影響を検討するため、薬浴をした区(2区)としない区(1区)を設定した(表5)。供試魚はヒラメ稚魚を用い、1tのコンクリート水槽で飼育した。飼育水温は19.7~21.5℃である。薬浴は、エルバージュ 200ppm(ニフルスチレン酸ナトリウム)を1日1回、2時間を3日間行った。採血は、薬浴直前(8尾)、薬浴直後(各区8尾)、薬浴後7日目

(各区8尾)に行い、バイオフィェンス機能の各項目を測定した。

投薬 投薬がヒラメのバイオフィェンス機能に与える影響を検討するため、試験区を投薬なし(1区)、通常量の投薬(2区)と通常の2倍量の投薬(3区)に設定した(表6)。供試魚はヒラメ稚魚で、1tのコンクリート水槽で飼育した。飼育水温は、17.0~22.3℃である。なお、総魚体重を5kgとするため各区52尾とした。市販のドライタブレット(約26.0g/日)に魚体重1kg当たりテラマイシン(塩酸オキシテトラサイクリン)が0.5gと1.0gになるように添着し、24日間投与した。採血は、スタート時(8尾)、6日目(各区8尾)、14日目(各区8尾)、24日目(各区8尾)に行い、バイオフィェンス機能の各項目を測定した。

また、投薬によるバイオフィェンス機能への影響を細菌感染によって検討するため、投薬試験終了

後に、残ったヒラメ（各区15尾）に連鎖球菌β型を0.1ml腹腔内接種した。なお、感染試験中は、市販のドライペレットを毎日飽食量（約15.0g）給餌した。

結 果

換水率（注水量） バイオディフェンス機能の測定結果を図1に示す。本県においてヒラメ養殖の換水率は、通常、18～20回転/日（3区）で飼育されている。この換水率より低く（1区）すると、NBT還元能と貪食指数が3区より低く、貪食率は3区より高くなった。また、ポテンシャルキリング活性と血漿リゾチーム活性は、1区と3区では11日目では同じような傾向を示したが、1区は3区より22日目にはポテンシャルキリング活性が低く、血漿リゾチーム活性が上昇した。

飼育水深 バイオディフェンス機能の測定結果を図2に示す。本県においてヒラメ養殖の水深は、通常、50cm（2区）程度で飼育されている。この水深より浅く（1区）すると、10日目にはNBT還元能が低く、ポテンシャルキリング活性が高くなったが、17日目には両項目とも同じような値となった。血漿リゾチーム活性は、10日目では同じような傾向を示したが、17日目には水深を深くした区（2、3区）より浅くした区（1区）の方が高くなった。また、ヘモグロビン濃度と貪食率は10日目では同じような傾向を示したが、17日目には水深を浅くした区（1区）が低くなった。

絶食 バイオディフェンス機能の測定結果を図3に示す。ヘモグロビン濃度、NBT還元能と血漿リゾチーム活性は、絶食をしなかった区（1区）に比べると絶食をした区（2、3区）はたえず低めに推移している。一方、ポテンシャルキリング活性、貪食率と貪食指数は、絶食を続けると高くなった。絶食を続けることにより、バイオディフェンス機能の項目によって高低差があるため、ヒラメに何らかの影響を与えていると考えられる。

飼育密度 バイオディフェンス機能の測定結果を図4に示す。本県においてヒラメ養殖は、通常このサイズの魚は2kg/m²（2区）程度で飼育されている。NBT還元能と血漿リゾチーム活性は、密度が高くても差がみられなかったが、密度を低くすると低い値で推移していた。貪食指数は、通常より他の区の方が高い値となっている。

薬浴 バイオディフェンス機能の測定結果を図5に示す。ヘモグロビン濃度は薬浴直後には2区間で違いはなかったが、7日目に薬浴をしていない区（1区）の値は薬浴をした区（2区）より高くなった。また、ポテンシャルキリング活性は、薬浴直後に差があったが7日目には薬浴直前とほぼ同じ値となった。2区は1区より、NBT還元能は低め、血漿リゾチーム活性は高めに推移するようになった。

投薬 バイオディフェンス機能の測定結果を図6に示す。血漿リゾチーム活性は、14日目に1、3区は減少し、2区は増加した。貪食率は、1、2区は同じような傾向を示したが、3区は14日目に増加し、24日目に減少した。貪食指数は、24日目に2、3区は減少し、1区は増加した。また、その他の3項目についてはそれぞれの区に変化がなくほぼ同じ値で推移した。

薬浴試験終了後、連鎖球菌β型による感染試験を実施したヒラメのへい死状況を図7に示す。1～3区のへい死状況をみると、無投薬区（1区）は4日目からへい死が始まり、へい死率は60.0%であった。通常投薬区（2区）は5日目からへい死が始まり、へい死率は46.7%であり、また、2倍投薬区（3区）は7日目からへい死が始まり、へい死率は33.3%であった。投薬量を多くすることにより、へい死率が低くなった。

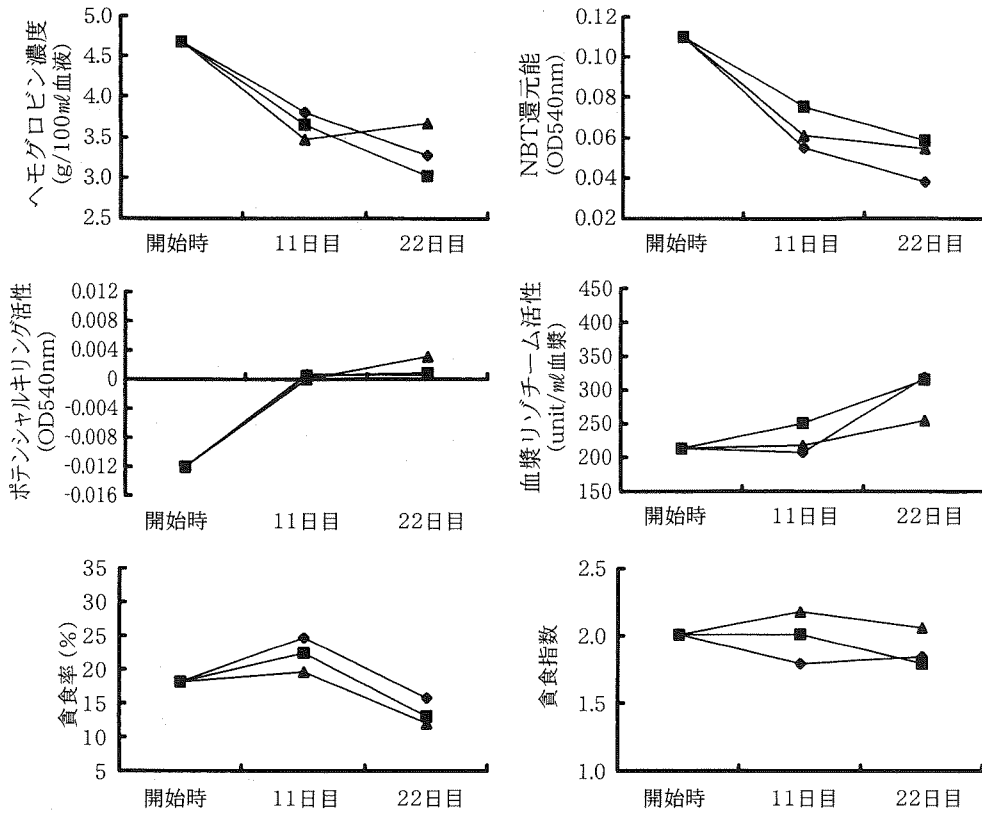


図1 換水率(注水量)がバイオディフェンス機能に与える影響

◆ 1区(10回/日) ■ 2区(15回/日) ▲ 3区(20回/日)

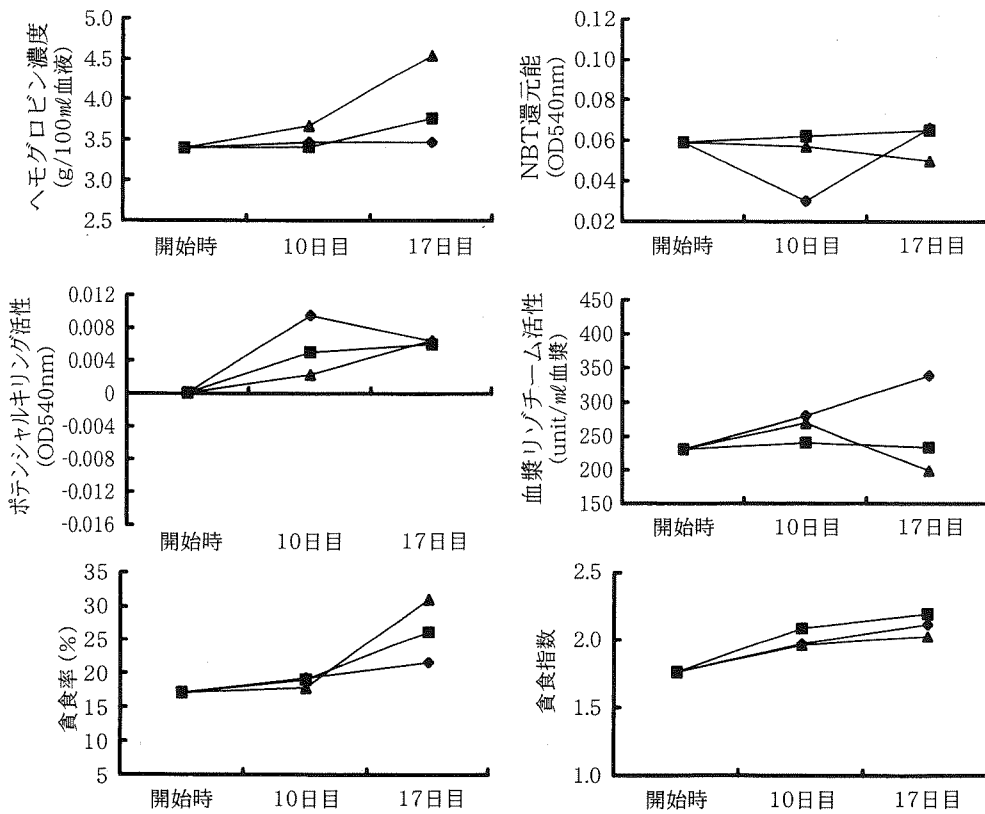


図2 飼育水深がバイオディフェンス機能に与える影響

◆ 1区(30cm) ■ 2区(50cm) ▲ 3区(70cm)

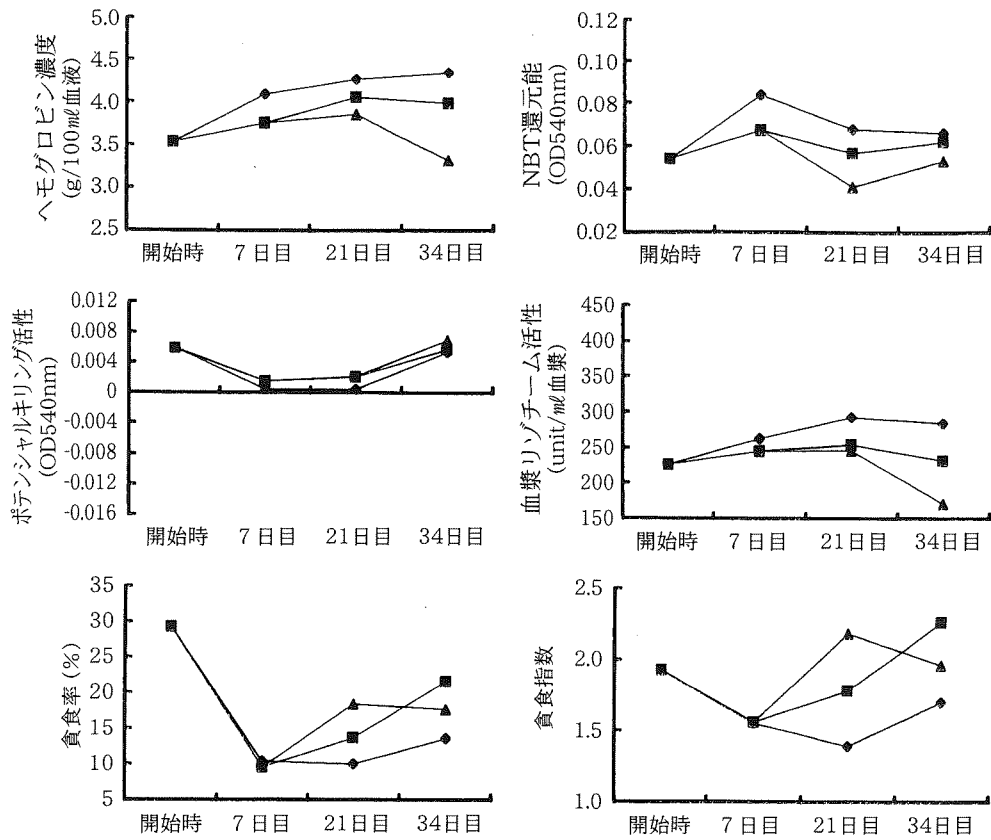


図3 絶食がバイオディフェンス機能に与える影響

◆ 1区(なし) ■ 2区(7日間) ▲ 3区(21日間)

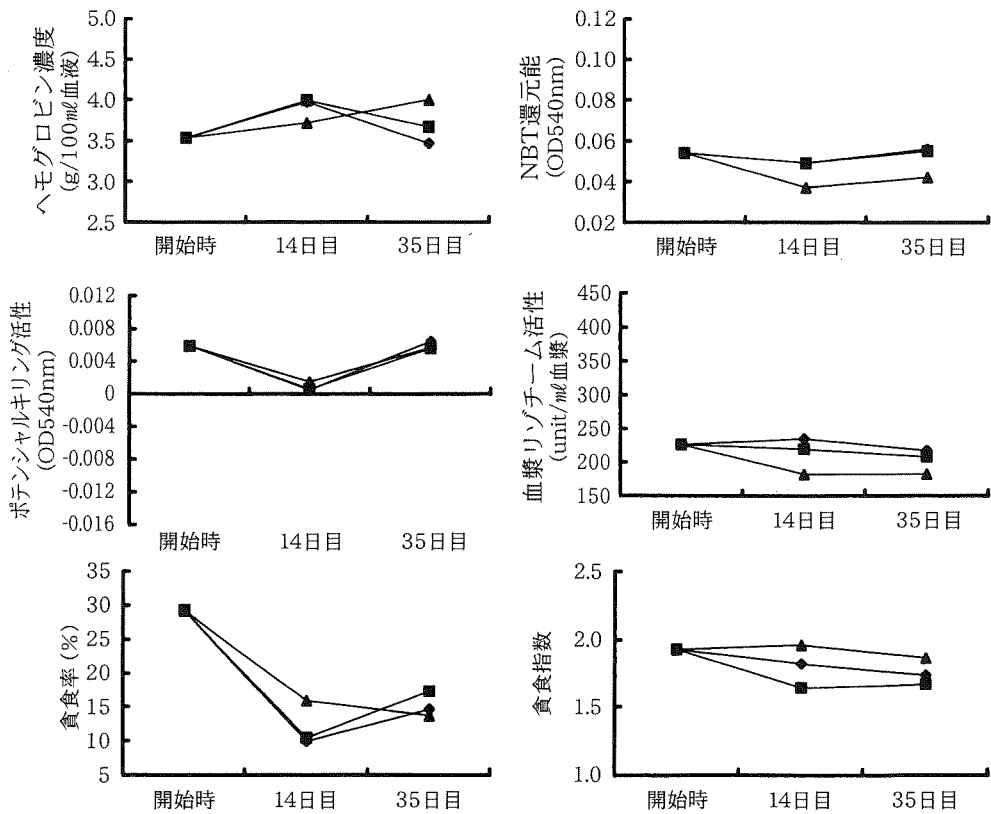


図4 飼育密度がバイオディフェンス機能に与える影響

◆ 1区(4 kg/m²) ■ 2区(2 kg/m²) ▲ 3区(1 kg/m²)

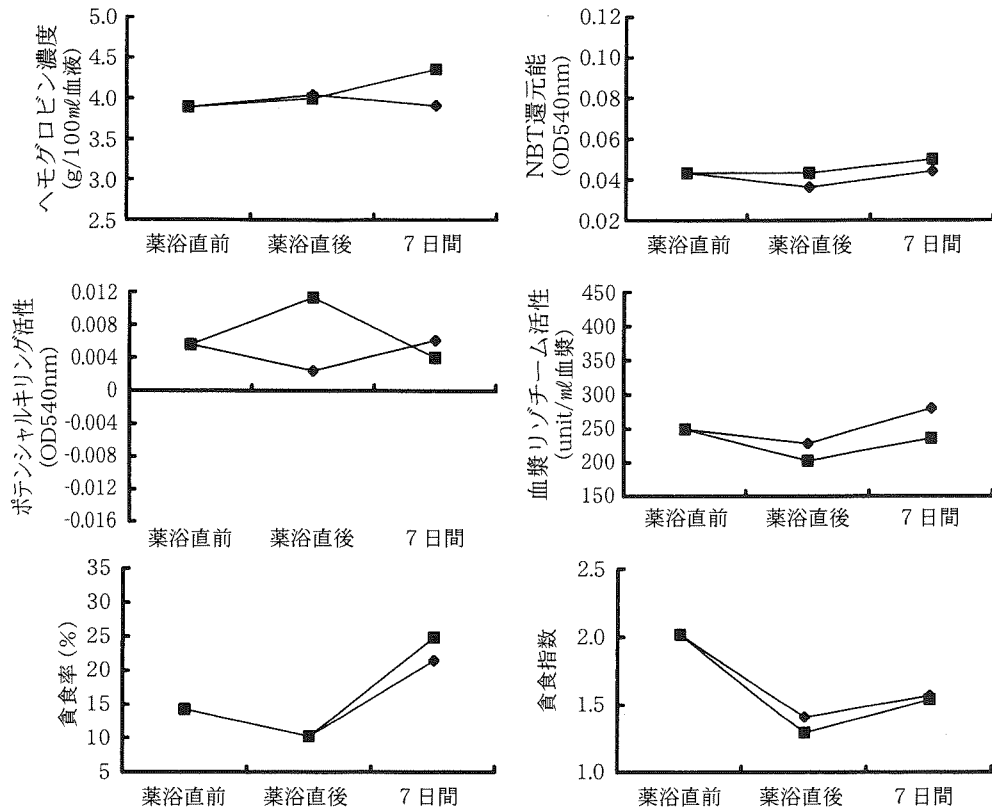


図5 薬浴がバイオフィェンス機能に与える影響

◆ 1区(なし) ■ 2区(あり)

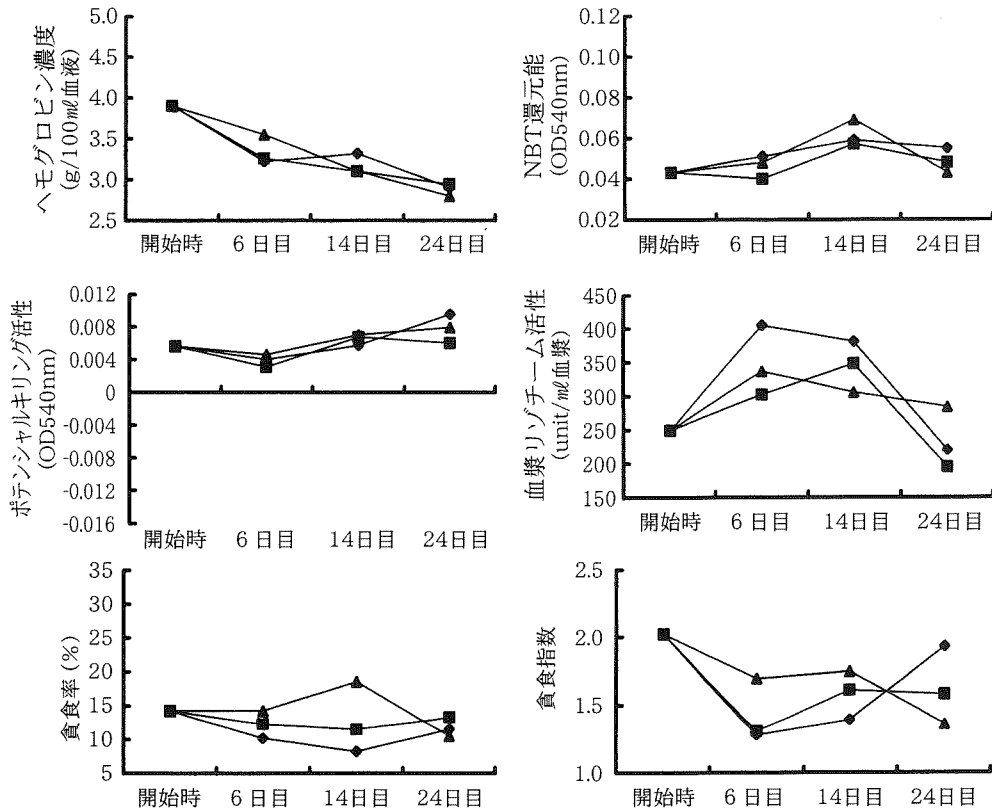


図6 投薬がバイオフィェンス機能に与える影響

◆ 1区(なし) ■ 2区(通常) ▲ 3区(2倍)

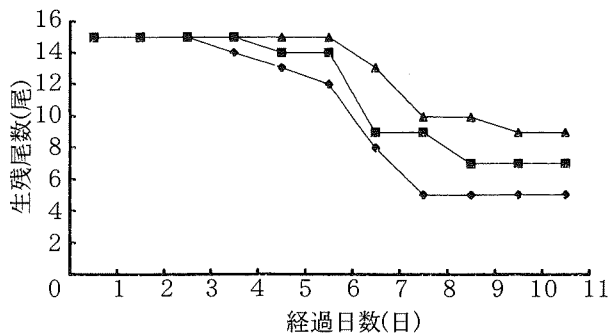


図7 連鎖球菌β型を用いた感染試験によるヒラメのへい死状況

◆ 1区(なし) ■ 2区(通常) ▲ 3区(2倍)

文 献

- 1) 服部未夏・小川 健 (1997) : 養殖魚の生体防御機能実態調査事業. 平成8年度和歌山県水産増殖試験場報告29号, 22-24.
- 2) 服部未夏・竹内照文 (1998) : 養殖魚の生体防御機能実態調査事業. 平成9年度和歌山県水産増殖試験場報告30号, 22-28.
- 3) 服部未夏・竹内照文 (1999) : 養殖魚の生体防御機能実態調査事業. 平成10年度和歌山県水産増殖試験場報告31号, 15-20.