

養殖魚の生体防御機能実態調査事業*

服部未夏・竹内照文

目 的

近年、養殖魚の疾病は多様化し増加の一途にある。多くの場合、魚が病気に罹れば水産用医薬品による治療に頼らざるを得ないが、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(バイオディフェンス)機能に着目し、その機能を把握するとともに応用し、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8年度はヒラメを用い、生体防御機能を測定したところ、反応条件や活性値の算出式の見直しなど様々な課題が残されたが、血漿リゾチーム活性は水温25℃より15℃の方が高いことが分かった¹⁾。

本年度は「改良ポンドサイドキットマニュアル」(平成8年度版)を用いて、ヒラメとマダイの成長と季節別のバイオディフェンス機能を測定するとともに、白血球貪食能の測定におけるザイモサン溶液濃度や反応時間について検討した。

材 料 と 方 法

1 採血方法と生体防御機能の測定

供試魚 ヒラメは陸上水槽で養殖中のものを、マダイは当場の試験筏で飼育中のものを用いた。供試魚の体重、全長(又は尾叉長)および採血時の水温は表1に示した。

採血方法 供試魚は外観的に正常な個体を取り上げ、ヘパリン処理した注射器(5ml)を用いて尾部血管から約1ml採血した。なお、ヘパリンナトリウム溶液はヒラメ800U/ml、マダイ300U/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5μlを加えて攪拌し、5分以上放置して発色を待つ。その後、マイクロプレートに200μl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100μlを毛細管に充填して、1000G、4℃で30分間遠心分離する。毛細管を遠心機から取り出した後、赤血球の混入を出来るだけ避けて白血球層と

表1 供試魚の体重、全長(又は尾叉長)および採血時の水温

調査年月	供試魚	魚体重 (g)	全長(又は尾叉長) (cm)	採血時の水温 (℃)
1997.9	ヒラメ	341.2±36.6*	30.8±3.5	26.1
1997.10	〃	323.9±44.5	31.4±1.5	22.6
1997.12	〃	447.0±48.0	34.5±1.1	15.2
1998.1	〃	603.7±71.9	37.7±1.3	14.0
1997.9	マダイ	91.1±7.6	15.4±0.4	28.6
1997.10	〃	125.8±12.6	17.3±0.7	23.1
1997.12	〃	161.7±18.9	19.7±0.9	19.7
1998.1	〃	173.4±20.9	20.2±0.9	15.4

* mean±S.D.

* 養殖魚の生体防御機能実態調査事業費による。

赤血球層の境界面を切断し、白血球層から2 cm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に氷中(9月の実験では室温)でピペティングを行う。これを予めRPMI1640溶液、NBT溶液およびzymosan加NBT溶液(5 mg/ml)を15 μ lずつ分注しておいたマイクロチューブに、等量ずつ加えて環境水温に近い温度で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ティングで混和し、1500 G、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に入れ、540nmの吸光度を測定する。なお、評価はOD値で表し、以下の計算式によった。

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

$$\text{ポテンシャルキリング活性} = \text{OD}(\text{Zymosan加NBT溶液}) - \text{OD}(\text{NBT溶液})$$

白血球貪食能 Zymosanを2 mg/ml (10, 12, 1月の実験では0.5 mg/ml)となるよう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、使用する毎に解凍する。まずZymosan浮遊液50 μ lに血液を等量加え、ピペティングで攪拌し、計100 μ lを毛細管に充填した後、環境水温に近い温度で30分間インキュベートする。30分後1000 G、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離し、白血球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ガ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・ギムザ液で染色し、封入後検鏡する。なお、貪食率および貪食指数は以下の式で求める。

$$\text{貪食率}(\%) = (\text{Zymosanを食した貪食細胞数} / \text{観察した貪食細胞数}) \times 100$$

$$\text{貪食指数} = \text{貪食されたZymosan数} / \text{貪食陽性細胞数}$$

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540nmの吸光度を測定する。マイクロプレートリーダーで測定する時以外は環境水温に近い温度でインキュベートする。活性は吸光度の1分間当た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 ザイモサン溶液濃度と反応時間が白血球貪食能に及ぼす影響

供試魚 試験に用いたマダイの体重、尾叉長と採血時の水温を表2に示した。

表2 マダイの体重、尾叉長および採血時の水温

調査年月	魚体重 (g)	尾叉長 (cm)	採血時の水温 ($^{\circ}$ C)
1997. 10	125.6 \pm 12.3*	17.3 \pm 0.7	23.3
1997. 11	125.2 \pm 18.9	17.9 \pm 0.9	19.7

* mean \pm S. D.

採血方法 前述したとおりである。

測定方法 反応時間を30分間とし、Zymosan溶液を0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mlの4段階を設定した時、またZymosan溶液濃度が0.5 mg/mlで反応時間を30, 60, 90, 120分間の4段階を設定した時の貪食率と貪食指数を求めた。

結果および考察

ヒラメおよびマダイの各項目測定結果を表3に示した。

1 成長に伴う生体防御機能

NBT還元能およびポテンシャルキリング活性 ヒラメおよびマダイの成長とNBT還元能およびポテンシャルキリング活性の関係を図1, 2に示した。

ヒラメのNBT還元能は成長に関係なくほぼ一定であったが、ポテンシャルキリング活性は成長に伴って低下する傾向にあり、特に、12, 1月は9, 10月に比べて吸光度が約0.01低下した。

一方マダイのNBT還元能は12月に0.040まで上がったが、1月は0.029まで下がった。ポテンシャルキ

表3 ヒラメおよびマダイの各項目測定結果

調査年月	供試魚	ヘマトクリット値 (%)	ヘモグロビン濃度 (g/100ml)	赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	NBT還元能 (OD540nm)	ポテンシャルキリング活性 (OD540nm)	食食率 (%)	食食指数	血漿リゾチーム活性 (-mOD/min)
1997.9	ヒラメ	33 \pm 4 ^{*1}	6.13 \pm 0.93	528 \pm 37	0.036 \pm 0.015 ³	0.024 \pm 0.018 ^a	14.6 \pm 11.9	2.5 \pm 1.1	1.9 \pm 0.6 ^{a*2}
1997.10	"	24 \pm 2	5.76 \pm 0.58	402 \pm 33	0.040 \pm 0.010 ³	0.025 \pm 0.026 ^a	2.6 \pm 2.6	1.2 \pm 0.5	3.8 \pm 1.3 ^b
1997.12	"	25 \pm 3	4.79 \pm 0.85	322 \pm 55	0.037 \pm 0.010	0.013 \pm 0.025	16.2 \pm 8.1	1.5 \pm 0.2	4.0 \pm 1.4
1998.1	"	25 \pm 5	5.67 \pm 0.94	354 \pm 49	0.047 \pm 0.016	0.012 \pm 0.010	5.5 \pm 3.4	1.5 \pm 0.6	2.8 \pm 0.7
1997.9	マダイ	53 \pm 5	8.70 \pm 0.91		0.028 \pm 0.009	0.024 \pm 0.015	34.2 \pm 13.7	2.1 \pm 0.4	0.6 \pm 0.3
1997.10	"	40 \pm 4	7.38 \pm 0.64	370 \pm 27	0.028 \pm 0.008	0.006 \pm 0.005	8.6 \pm 4.6	1.4 \pm 0.3	2.6 \pm 0.8
1997.12	"	35 \pm 4	6.50 \pm 0.63	313 \pm 33	0.040 \pm 0.013 ^{a*2}	0.004 \pm 0.004 ^{a*3}	7.1 \pm 4.9 ^a	1.5 \pm 0.3 ^a	1.0 \pm 0.4 ^b
1998.1	"	25 \pm 3	4.97 \pm 0.70	255 \pm 34	0.029 \pm 0.007 ^b	0.009 \pm 0.009 ^b	7.3 \pm 4.2 ^a	1.4 \pm 0.3 ^a	1.0 \pm 0.6 ^a

*1 mean \pm SD

a, b異符号間で有意差あり(*2:p<0.001, *3:p<0.05)

なお、ヒラメは9, 10月について、マダイは12, 1月についてのみ比較

- 測定不可能

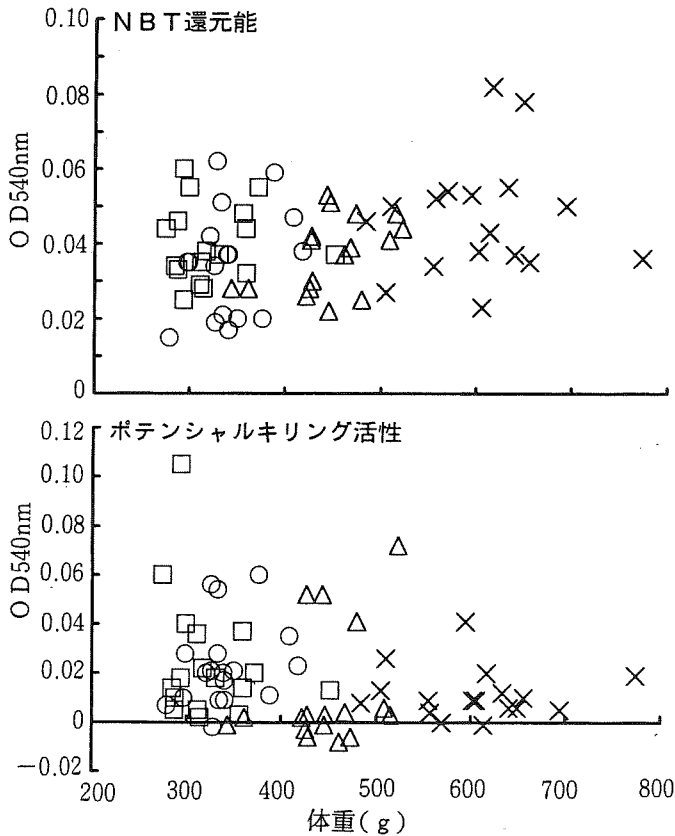


図1 ヒラメの成長とNBT還元能およびポテンシャルキリング活性の関係

○9月, □10月, △12月, ×1月

*毛細管切断後の操作は9月は室温で, 10, 12, 1月は水中で行った。

リング活性は9月の0.024から10月には0.006まで低下し, それ以降もほぼ同じであった。

白血球食食能 ヒラメおよびマダイの成長と食食率および食食指数の関係を図3, 4に示した。ヒラメは10月に反応条件を変えたことにより, 他の月より食食率と食食指数が低くなった。9月は反応時間

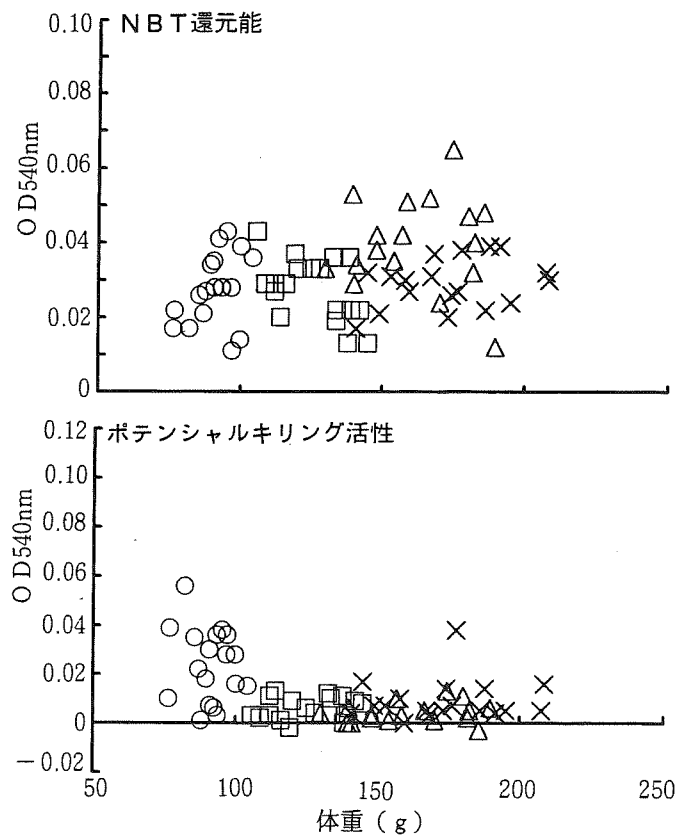


図2 マダイの成長とNBT還元能およびポテンシャルキリング活性の関係

○9月, □10月, △12月, ×1月

*毛細管切断後の操作は9月は室温で, 10, 12, 1月は水中で行った。

が30分間と短かったが, ザイモサン溶液が2.0mg/mlと濃く, 12月はザイモサン溶液が0.5mg/mlと薄かったが, 反応時間は120分間と長かった。そのため, 食食率が各々14.6および16.2%と高くなったと考えられる。また, 同じ反応条件であった12月と1月では前者の方が食食率が高かったことから, 成長に伴っ

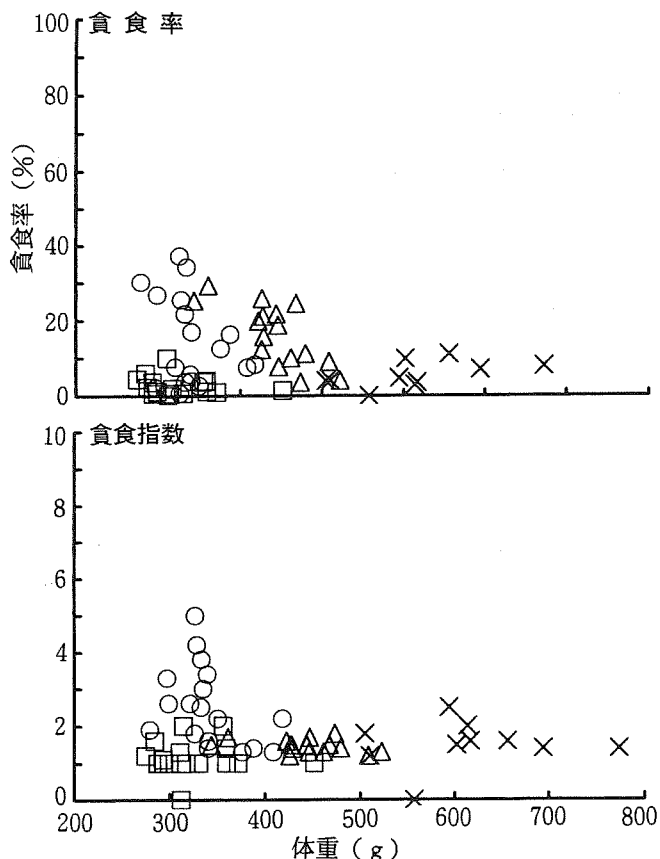


図3 ヒラメの成長と貪食率および貪食指数の関係
○9月, □10月, △12月, ×1月

* ザイモサン溶液と反応時間については各々9月：
2 mg/ml. 30min, 10月：0.5mg/ml. 30min, 12,
1月：0.5mg/ml. 120min

て貪食率が低下する傾向にある。ただし、貪食指数については12, 1月ともほぼ同じであった。

マダイはヒラメ同様9月は貪食率が34.2%と高かったが、10月以降は5~8%に低下した。貪食指数はヒラメと同様に9月を除けばほぼ同じ値であった。

貪食率はNBT還元能やポテンシャルキリング活性と同様に個体間のばらつきが大きかった。ザイモサンを貪食していない貪食細胞を判別するためのアトラスを早急に作成し、判定基準を統一することが今後の課題である。

血漿リゾチーム活性 ヒラメおよびマダイの成長と血漿リゾチーム活性の関係を図5に示した。どの月もマダイに比べてヒラメの方が活性が高くなっている。ヒラメは9, 10, 12月と活性値が増加傾向に

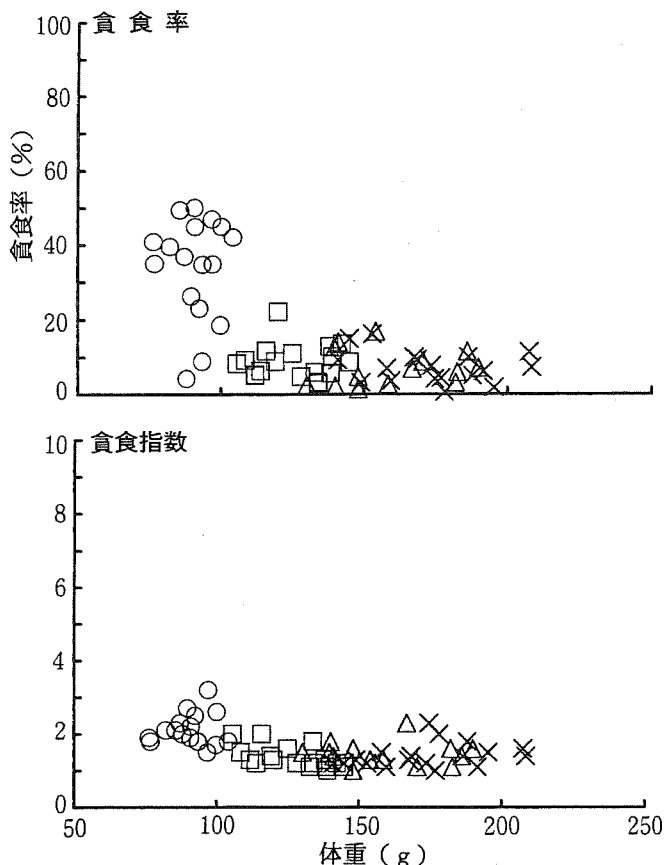


図4 マダイの成長と貪食率および貪食指数の関係
○9月, □10月, △12月, ×1月

* ザイモサン溶液と反応時間については各々9月：
2 mg/ml. 30min, 10月：0.5mg/ml. 30min, 12,
1月：0.5mg/ml. 120min

あり、成長と水温の低下とともに活性が高くなると思われたが、1月に低下した。この原因が更なる水温の低下によるものか、或いは体重の増加によるものかどうかは分からない。

マダイは10月に活性値が最も高くなっているが、ばらつきも大きかった。

2 季節別における生体防御機能

ヒラメおよびマダイの季節別における生体防御機能について図6, 7に示した。今回の実験は供試魚の体重と採血時の水温が各々異なるため、季節別にデータを比較することに問題はあるが、ヒラメの場合、9月と10月に用いた供試魚の体重がほぼ同じであることから水温による影響を比較することが出来る。水温の低下によりヘマトクリット値、ヘモグロ

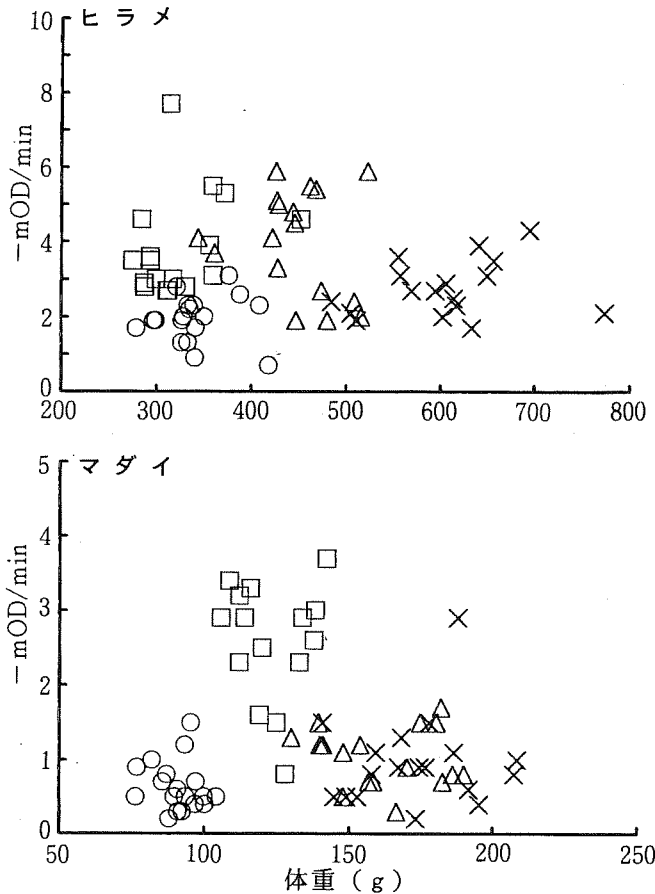


図5 ヒラメおよびマダイの成長と血漿リゾチーム活性の関係
○9月, □10月, △12月, ×1月

ビン濃度, 赤血球数は低下したが, NBT還元能およびポテンシャルキリング活性については有意差は見られなかった。白血球貪食能は反応条件が異なるため, 比較することは出来ないが, 血漿リゾチーム活性は9月より10月の方が, 有意に高くなった ($P < 0.001$)。このことから採血時の水温が26.1°Cから22.6°Cに低下したことによってヒラメのリゾチーム活性が高くなったと考えられる。

一方マダイについては12月と1月の魚体重がほぼ同じことから, 水温による影響を比較することが出来る。ヒラメ同様血液一般性状は水温の低下とともに低下した。NBT還元能は1月の方が有意に低下し ($P < 0.001$), ポテンシャルキリング活性は逆に有意に高くなった ($P < 0.05$)。このことから採血時の水温が19.7°Cから15.4°Cに低下したことによ

て, NBT還元能は低下し, ポテンシャルキリング活性は上昇するという相反する推移を示した。白血球貪食能については反応条件が同じため比較可能であるが, 貪食率, 貪食指数ともに有意差はなかった。血漿リゾチーム活性は12, 1月ともに有意差はなく, 水温の低下による影響は表れなかった。

3 ザイモサン溶液濃度と反応時間が白血球貪食能に及ぼす影響

ザイモサン溶液濃度と反応時間が白血球貪食能に及ぼす影響について, マダイを用いて検討した結果を表4に示した。ザイモサン溶液が2.0mg/mlの時の貪食率が33.8%と一番高かったが, ザイモサンの魂が所々で見られ, 一番汚く, 見づらい標本であった。一方反応時間については90分が23.1%と他に比べ, 有意に高かった。しかし, 反応時間が90分では他の操作と平行して行うことが難しいことから, ザイモサン溶液0.5mg/ml, 反応時間120分が操作性を考慮した上で最適と考えられる。

理想的には貪食率が50%近くあり, かつきれいな標本作製出来る反応条件を設定することがベストである。

本年度はヒラメ, マダイともに同じ群を追って各々の生体防御機能を調べたところ, 水温の低下による影響についてはわずかな知見が得られたが, サイズによる影響については分からなかった。今後は同じ水温下でサイズの異なる個体同志を比較するとともに, 同じ大きさの個体を水温別に調べ, 各要因によって生体防御機能がどのように変化するか調べる必要がある。また, 実験を重ねても各測定値の標準偏差を最小限に抑えることが非常に難しく, 群によって標準偏差が異なることから, 標準偏差によって生体防御機能レベルを推測することが出来ないものかどうか今後検討していきたい。

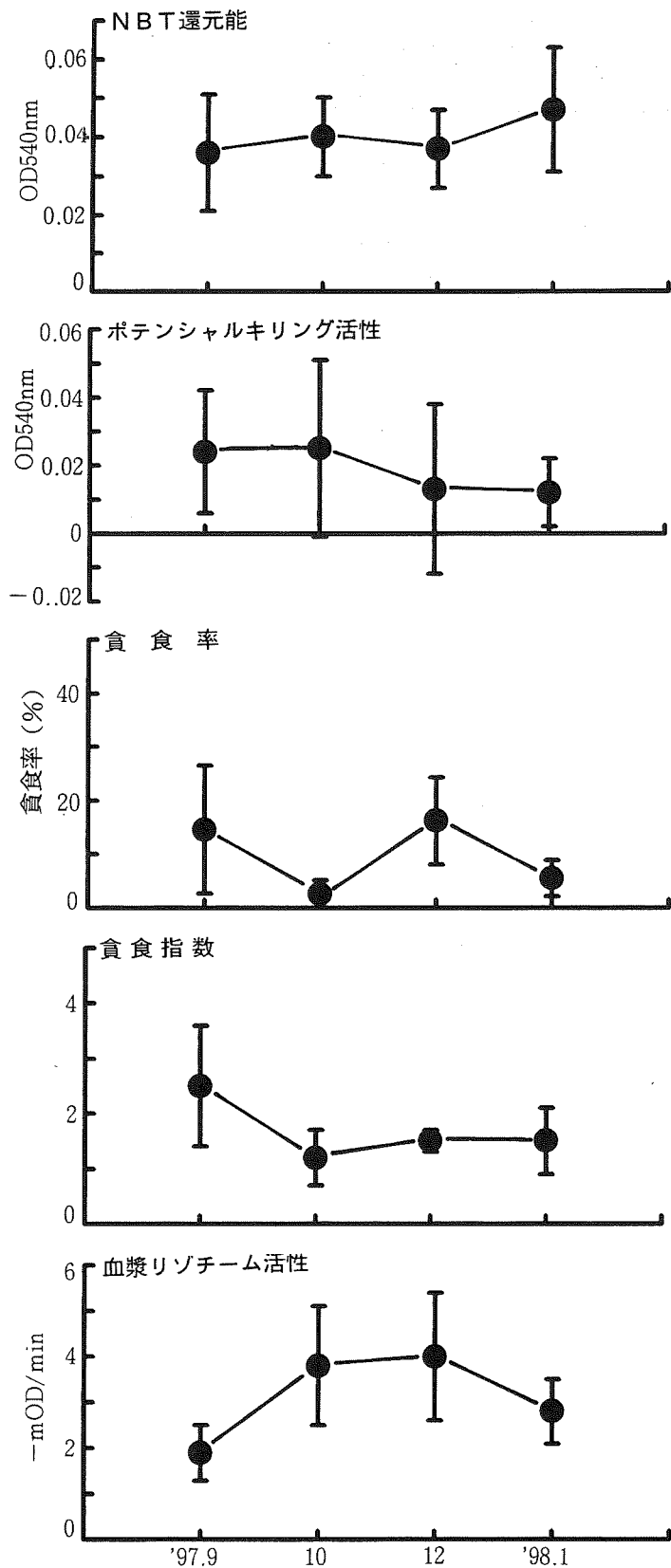


図6 ヒラメの季節別における生体防御機能

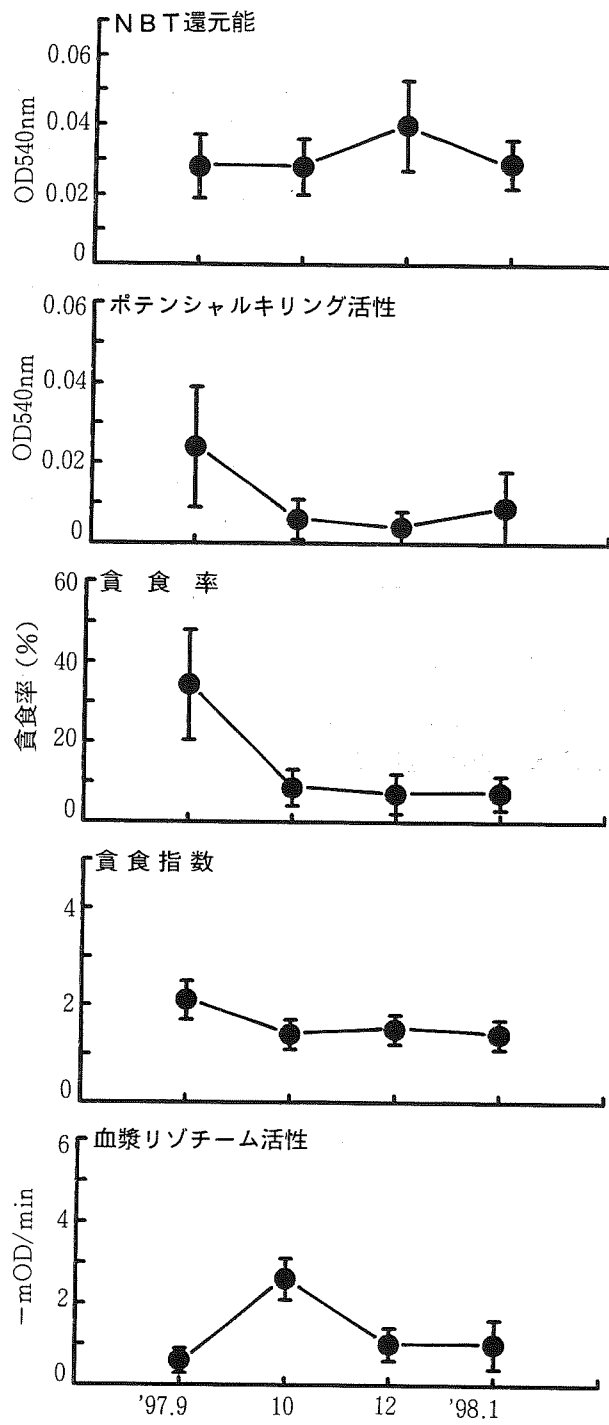


図7 マダイの季節別における生体防御機能

表4 ザイモサン溶液濃度と反応時間がマダイの白血球貧食能に及ぼす影響

	食食率(%) mean ± SD	食食指数 mean ± SD
ザイモサン濃度 (mg/ml) *1		
0.5	10.7 ± 6.9 ^a	1.3 ± 0.2 ^a
1.0	24.4 ± 4.9 ^b	1.6 ± 0.4 ^{ab}
1.5	28.2 ± 4.0 ^b	1.9 ± 0.7 ^{ab}
2.0	33.8 ± 10.8 ^b	1.8 ± 0.3 ^b
反応時間 (min) *2		
30	11.1 ± 2.1 ^a	1.1 ± 0.1 ^a
60	8.4 ± 4.5 ^a	1.5 ± 0.1 ^b
90	23.1 ± 6.6 ^b	1.5 ± 0.2 ^b
120	18.7 ± 7.5 ^{ab}	1.6 ± 0.4 ^{ab}

*1 反応時間は30min *2 ザイモサン溶液濃度は0.5mg/ml
a、b、ab異符号間で有意差有り(p<0.05)

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.