

IV 養殖魚の生体防御機能実態調査事業*1

服部未夏・小川 健

目 的

近年、養殖業は餌魚の減少による飼料費の高騰、治療対策の確立していない疾病による被害の多発などにより極めて厳しい環境におかれている。さらに、養殖魚介類に使用する医薬品の残留についても、食品としての安全性の観点から消費者の懸念が強く、出来るだけ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。そこで、魚病被害の軽減を図り、健康で安全かつ高品質な養殖魚の生産技術を確立するために、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、養殖魚介類の生体防御機構を把握するとともに、魚類生体防御測定マニュアル*2（ポンドサイドキット）を魚種別に予備適用し、各測定項目が各魚種のバイオディフェンス機能を反映するものであるか否かを検討した。

材 料 と 方 法

供試魚

本年度は陸上水槽で飼育している県内養殖業者のヒラメを供した。供試魚の体重および飼育水温は表1のとおりである。

表1 供試ヒラメの体重および飼育水温

試験時期	体重 (g)	飼育水温 (℃)
1回目('96.9)	390±23(n=6)	25
2回目('97.3)	852±96(n=5)	15

方法

白血球貪食能および血漿リゾチーム活性の測定は先に述べた魚類生体防御測定マニュアルに準じて行い、採血後の血液保存時間の影響についても調べた。

供試魚は外見的に正常な個体を取り上げ、ヘパリン処理したプラスチックシリンジを用いてその場でキュービュ氏管より採血した。採血から実験開始までの時間を変えて、1996年9月実施の1回目は採血直後、採血1および2時間後、1997年3月実施の2回目は採血直後、採血3、6および24時間後に実験を実施し、それぞれについて白血球貪食能と血漿リゾチーム活性を測定した。なお、サンプルの保存は水中で行った。

白血球貪食能の測定では、予め調整しておいたザイモサン浮遊液50μlと同量の血液を25℃で30分間反応させた後、血液をスライドグラスに塗抹した。塗抹標本は直ちに風乾した後にメイ・グリュンワルドーギムザ染色を施し、貪食細胞および貪食陽性細胞を計数した。貪食率は貪食細胞100個に占める貪食陽性細胞の比率として算出した。残った血液を4℃、1,500Gで10分間遠心分離して血清を採取し、血漿リゾチーム活性の測定に供した。PBS 5μl (pH6.5) および血漿5μlに予め調整しておいたマイクロコッカス溶液90μlを各々加え37℃で反応させ、反応開始直後、15、30、45および60分後にマイクロプレートリーダー(波長540nm)で吸光値を測定した。リゾチーム活性は以下の式で近似値を得た。

活性値 (units/ml) = (吸光度の最大値 - 吸光度の最小値) × (血漿の最終希釈倍率 : 20倍)

結果および考察

白血球貪食能

ヒラメの白血球貪食能に及ぼす血液保存時間の影響について表2および図1、2に示した。

一般的に貪食率は1回目より2回目測定時の方が低かった。1回目の貪食率は採血直後、採血1時間

*1 養殖魚の生体防御機能実態調査事業費による。

*2 取りまとめ：富山県水産試験場宮崎統五氏。

表2 ヒラメの白血球貪食能に及ぼす血液保存時間の影響

実験開始時間	貪食率 (%)	
	平均値	標準偏差
一回目 採血直後	10.6	9.8
一回目 採血1時間後	10.1	7.3
一回目 採血2時間後	12.1	6.7
二回目 採血直後	6.0	3.0
二回目 採血3時間後	4.7	1.5
二回目 採血6時間後	3.9	1.7
二回目 採血24時間後	3.6	2.3

※血液は水中で保存

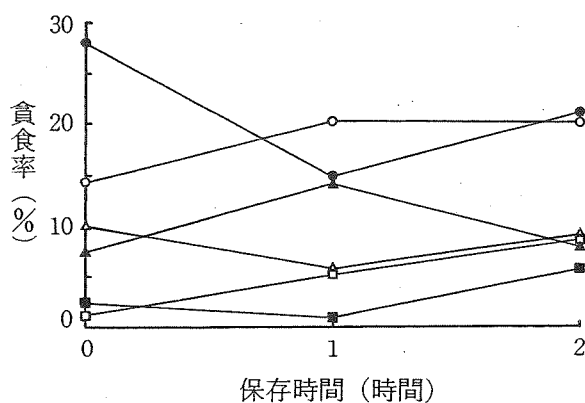


図1 ヒラメの白血球貪食能に及ぼす血液保存時間の影響 (1回目)

●個体No.1 ○個体No.2 ▲個体No.3
△個体No.4 ■個体No.5 □個体No.6

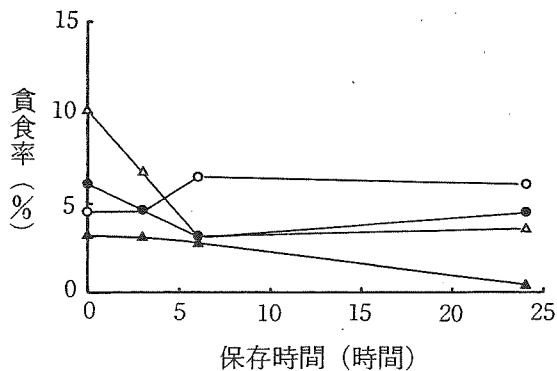


図2 ヒラメの白血球貪食能に及ぼす血液保存時間の影響 (2回目)

●個体No.1 ○個体No.2 ▲個体No.3 △個体No.4

後で各々10.6, 10.1%とほぼ同じであったが, 採血2時間後では12.1%と高くなった. 一方2回目では採血直後, 採血3, 6, 24時間後で各々6.0, 4.7,

3.9, 3.6%と, 保存時間に伴って貪食率の低下が見られた. ただ, 何においても個体数のばらつきが目立つため, 血液の保存時間の影響についてはっきりとした傾向をつかむことは難しいと思われる. 今回, 血液塗抹標本観察の際, ザイモサンの塊が所々に見られ, 観察する視野および時によって貪食率が異なった. ちなみに同じ塗抹標本を2個体について約1週間後に再び計数した結果, 1回目計数時に比べ2回目の方が貪食率が半分あるいはそれ以下に低下した. これは塗抹標本を観察する視野や計数者の貪食陽性細胞の判定基準が前回と若干変わったことが主な理由と考えられる.

今後, ザイモサン溶液を均一にすることはもちろんのこと, 貪食陽性細胞の判定基準の統一, 血液凝固の阻止法および供試魚の個体数について検討する必要がある.

血漿リゾチーム活性

ヒラメの血漿リゾチーム活性に及ぼす保存時間の影響について表3と図3, 4に示した. 反応時間は

表3 ヒラメの血漿リゾチーム活性に及ぼす血液保存時間の影響

実験開始時間	活性値 (units/ml)	
	平均値	標準偏差
一回目 採血直後	0.14	0.06
一回目 採血1時間後	0.15	0.14
一回目 採血2時間後	0.13	0.06
二回目 採血直後	1.73	0.45
二回目 採血3時間後	1.56	0.26
二回目 採血6時間後	1.07	0.24
二回目 採血24時間後	1.45	0.32

※血液は水中で保存

1回目は60分, 2回目は90分まで延長したが, 活性値の算出にはどちらも60分までの吸光度を用いた.

1回目は採血2時間後まで活性値がほぼ同じであったが, 2回目測定時には, 6時間後に最低値となるものの24時間後に再びリゾチーム活性が上がる傾向が見られた. また, リゾチーム活性値が1回目は全個体で0.5units/ml以下であったのに対し, 2回目は全て0.5units/ml以上で活性値が有意に高くなっ

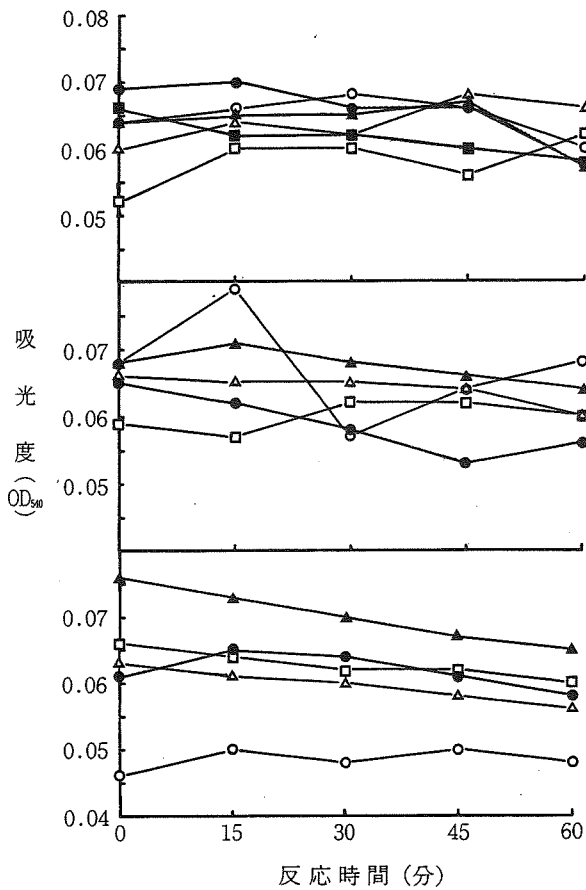


図3 ヒラメ血漿リゾチーム活性測定における吸光度の経時的変化（1回目）

● 個体No.1 ○ 個体No.2 ▲ 個体No.3
 △ 個体No.4 ■ 個体No.5 □ 個体No.6

上から順に採血直後、採血1, 2時間後の血液について各々測定

た。これは、1回目に比べ2回目の方が供試魚の体重が増加したと飼育水温が約10℃低下したことが活性値上昇の原因として考えられる。

今回、活性値の算出には吸光度の最大値と最小値を使用した。これには反応時間が考慮されていないため、2回目測定時について90分までの吸光度を用いた場合、60分までと比べて活性値が高くなる。よって今後単位時間当たりの活性値を求め、その数値について比較・検討を行う必要がある。

測定手法の完成度は高く、今後はマイクロコッカス溶液の調整法を若干見直すとともに、魚体重と飼育水温がリゾチーム活性値に与える影響についても検討する必要がある。

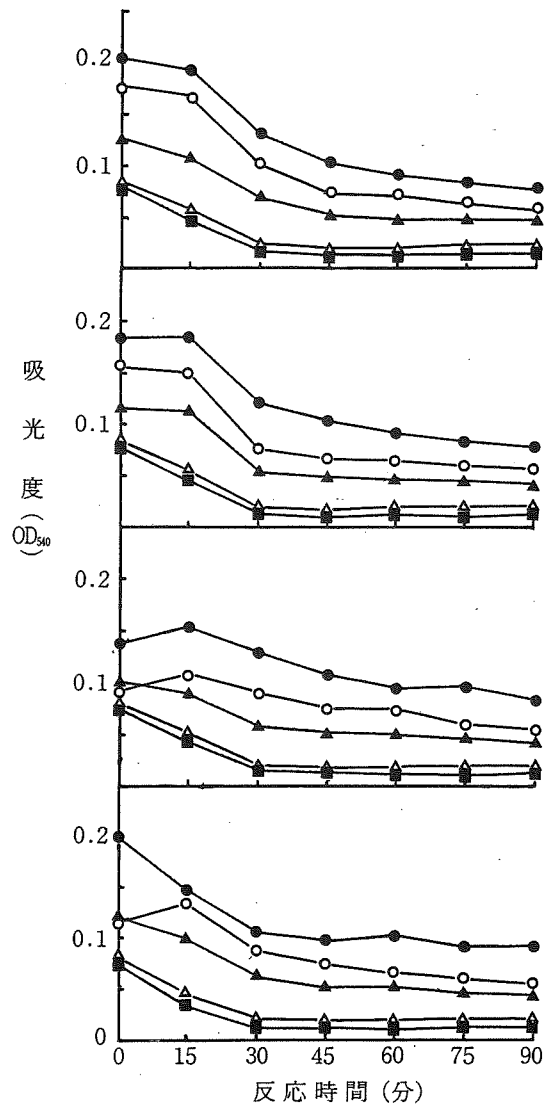


図4 ヒラメ血漿リゾチーム活性測定における吸光度の経時的変化（2回目）

● 個体No.1 ○ 個体No.2 ▲ 個体No.3
 △ 個体No.4 ■ 個体No.5

上から順に採血直後、採血3, 6, 24時間後の血液について各々測定。