

養殖マダイとヒラメの非特異的生体防御機能について

竹内照文・服部未夏¹

農林水産総合技術センター水産増殖試験場

Nonspecific Defense Mechanisms in Cultured Fish of Sea bream and Flounder

Terufumi Takeuchi and Mika Hattori

Fisheries Farming Experimental Station

Wakayama Research Center of Agriculture, Forestry and Fisheries

緒 言

養殖漁業は魚を生け簀や水槽に高密度に収容して、集約的に飼育、生産することにより行われるが、この過程で魚は種々のストレスを受けている。また、魚類は生息環境である水中から絶えず病原微生物の侵入を受けている（高橋,1994）。このようなことから養殖魚類は健康を害しやすく、病気の発生を引き起こしやすい状況にある。

一方、魚類はストレスや外敵の侵入に対して生体防御機能（特異的生体防御機能、非特異的生体防御機能）を備えている（矢野,1998）。このうち、免疫応答の始まる前に不特定多数の外敵に対する防御を行う非特異的生体防御機能は魚の健康度を表す指標と考えられており、主に顆粒球や単球による貪食と殺菌活性および体液性因子であるリゾチーム活性等によることが知られている（矢野,1998；伊藤・飯田,1998）。

近年、養殖現場では非特異的生体防御機能を増強することを目的に飼料に多くの免疫賦活剤が添加されている（酒井,1994）。しかし、これらは必ずしも作用機構や効果が明らかにされていない。また、非特異的生体防御機能が日常の飼育管理において応用されることはなく、健康状態は遊泳や摂餌状況の観察により行われている。

ところで、養殖漁業では魚病の発生が大きな問題となっており、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ことが緊急な課題となっている。

そこで、魚類が本来備えている非特異的生体防御機能の実態を把握するとともに養殖管理に応用することを目的に県内の養殖漁業で生産量が最も多いマダイと陸上養殖をしているヒラメを対象にして成長と飼育水温が非特異的生体防御機能に与える影響について検討した。

なお、非特異的生体防御機能の測定は改良ポンドサイドキットマニュアル 平成9年度版（日本水産資源保護協会,1998）を用い、Hb量、NBT還元能、ポテンシャルキリング活性、白血球の貪食能と貪食率およびリゾチーム活性を測定した。

材料および方法

供試魚

マダイは1998年8月3, 4日（以下、高水温期と略す）、10月15, 16日（以下、中水温期と略す）と12月8, 9日（以下、低水温期と略す）に、また、ヒラメは1998年6月18, 19日（以下、中水温期と略す）、8月7, 8日（以下、高水温期と略す）と12月14, 15日（以下、低水温期と略す）に各々、小、中、大サイズのを12尾ずつ採血した（第1表）。なお、両種とも養殖業者が通常の飼育をしているものを購入して用いた。

第1表 供試魚

魚種	採血月日	水温 (°C)	尾数	体重 (g)	全長 (cm)
マダイ	1998.9.3, 4	29.7— 30.5	12	75—115	15.0—17.4
			12	380—690	26.0—31.6
			12	1,090—1,370	36.8—39.2
	1998.10.15, 16	25.0	12	105—150	17.2—18.6
			12	360—740	26.0—32.8
			12	730—1,190	33.8—39.6
	1998.12.8, 9	17.2— 18.9	12	125—270	18.2—22.8
			12	620—880	30.0—34.2
			12	1,190—1,380	37.6—41.0
ヒラメ	1998.6.18, 19	23.3	12	176—394	25.4—31.2
			12	462—612	35.4—38.0
			12	741—1,059	43.0—44.6
	1998.8.7, 8	28.0	12	205—320	26.0—31.2
			12	400—570	33.0—37.8
			12	840—1,020	40.6—43.6
	1998.12.14, 15	18.0	12	203—290	26.0—29.8
			12	383—592	32.0—38.0
			12	712—1,145	40.0—46.0

採血

ヘパリン処理した注射器 (5 ml) を用いて尾部血管から 1 ml 採血した。ヘパリンナトリウム溶液はヒラメ 800 U/ml, マダイ 300 U/ml とした。

Hb量

シアンメトヘモグロビン溶液 (エルマ販売ヘマトロン) 1 ml に血液 5 μ l を加えて攪拌し, 3 時間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 (システム インスツルメンツ製 ImmunoMini NJ-2300) で波長 540 nm の吸光度 (以下 OD と略す) を測定した。ヘモグロビン濃度は以下の計算式によって求めた。

$$\text{Hb量 (g/dl)} = \text{OD} \times 201 (\text{希釈倍率}) \times 0.279$$

NBT還元能と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, 1,000 G, 4 °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 2 cm までの血漿と白血球を含む部分を 50

μ l の RPMI 1640 (和光純薬工業) で空のマイクロチューブに流し出す。その後, 細胞を分散させるため水中でピペッティングを行い, 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 ずつ分注したマイクロチューブに, 等量ずつ加えて 20 °C で 1 時間インキュベートする。1 時間後 DMF 400 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, 1,500 G, 4 °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, マイクロプレートリーダーで 540 nm の OD を測定した。なお, 両項目は以下の計算式によって求めた。

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

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

白血球貪食能

Zymosan を 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

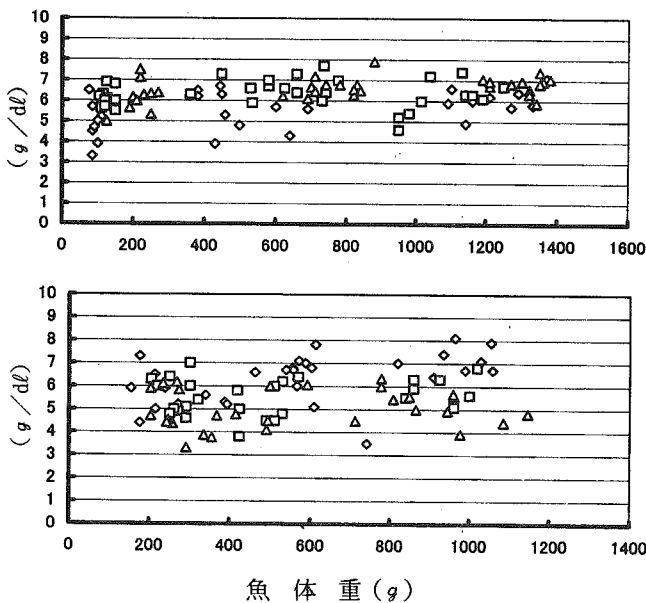
ティングで攪拌し、合計100 μ lを毛細管に充填した後、ヒラメは20 $^{\circ}$ Cで30分間、マダイは25 $^{\circ}$ Cで120分間インキュベートした。その後、1,000 G、4 $^{\circ}$ Cで5分間遠心分離し、白血球層と赤血球層の境界面で毛細管を切断し、血漿、白血球および少量の赤血球を含む部分をスライドガラスに直接滴下する。直ちに塗抹、風乾した後、メイグリュンワルド・ギムザ染色し、封入後検鏡する。なお、食食率と食食指数は以下の式で求めた。

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

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

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。*Micrococcus 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OD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37 $^{\circ}$ Cでインキュベートした。活性はOD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)とした。



第1図 マダイとヒラメの魚体重とHb量の関係

上段：マダイ

◇：8月3、4日、□：10月15、16日、△：12月8、9日

下段：ヒラメ

◇：6月18、19日、□：8月7、8日、△：12月14、15日

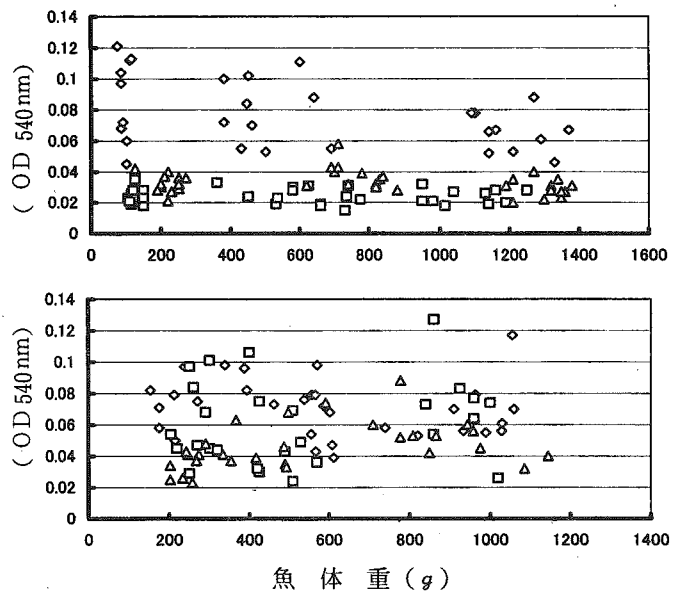
結果

Hb量

供試したヒラメとマダイは外観的、解剖学的に病変が認められず、ほぼ健康と考えられた。これらのHb量を測定したが、マダイは 6.18 ± 0.84 g/dl、ヒラメは 5.65 ± 1.06 g/dlで、ヒラメの方がいくぶん低く、変動幅が大きかった。また、マダイは1 kg以下のサイズのものでは高水温期にいくぶん低くなったが、ヒラメは魚体重との間にこのような関係は見られなかった(第1図)。

NBT還元能

食食細胞が異物に付着した時の酸化活性であるNBT還元能を測定したが、マダイは 0.043 ± 0.026 OD540nmで、成長に伴う差は認められなかったが、水温による差が著しく、高水温期には 0.077 ± 0.022 OD540nmであったが、中水温期と低水温期には 0.029 ± 0.008 OD540nmになった。一方、ヒラメは 0.061 ± 0.027 OD540nmで、成長に伴う差は認められなかったが、低水温期には中、高水温期よりも低くなる傾向が認められた(第2図)。



第2図 マダイとヒラメの魚体重とNBT還元能の関係

上段：マダイ

◇：8月3、4日、□：10月15、16日、△：12月8、9日

下段：ヒラメ

◇：6月18、19日、□：8月7、8日、△：12月14、15日

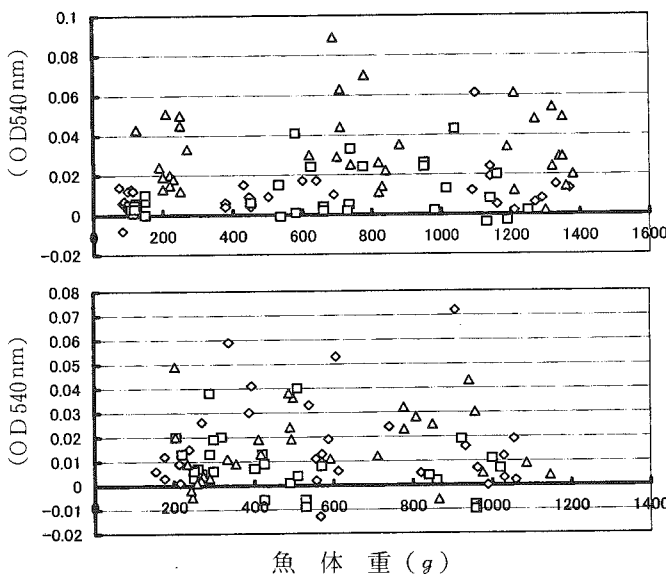
ポテンシャルキリング活性

白血球が異物を貪食した時にその刺激によって変動する酸化活性であるポテンシャルキリング活性を測定したが、マダイは 0.019 ± 0.018 OD540nm で、成長に伴って変動幅が大きくなるとともにいくぶん上昇する傾向が認められた。また、低水温期には中、高水温期に比べると有意に高くなった。ヒラメは 0.022 ± 0.027 OD540nm で変動幅が極めて大きく、成長や水温による差はほとんど認められなかった(第3図)。

貪食率と貪食指数

マダイとヒラメの白血球によるZymosanの貪食像を写真1に示す。マダイは顆粒球(好酸性)と単球による貪食が明瞭で、数多く貪食されていたが、ヒラメは顆粒球(好中性)と単球によるものが多く観察された。

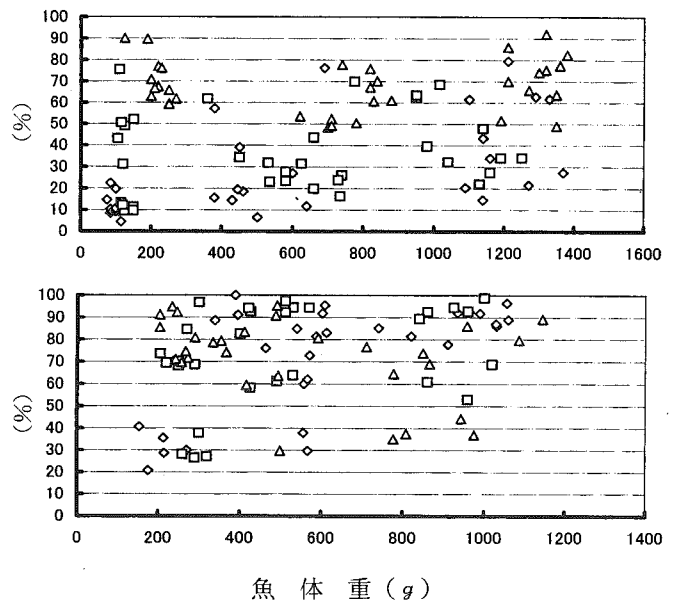
貪食率はマダイでは $44.4 \pm 24.7\%$ で、高水温期には成長に伴って高くなる傾向が認められたが、全体としては変動幅が大きく、一定の傾向は認められなかった。また、1kg以下の魚では水温の上昇に伴って貪食率が低下していた。一方、ヒラメは $71.7 \pm 22.7\%$ で、マダイに比べると貪食率が高く、しかも、変動幅が少なかった。しかし、成長や水温による差は認められなかった(第4図)。



第3図 マダイとヒラメの魚体重とのポテンシャルキリング活性関係

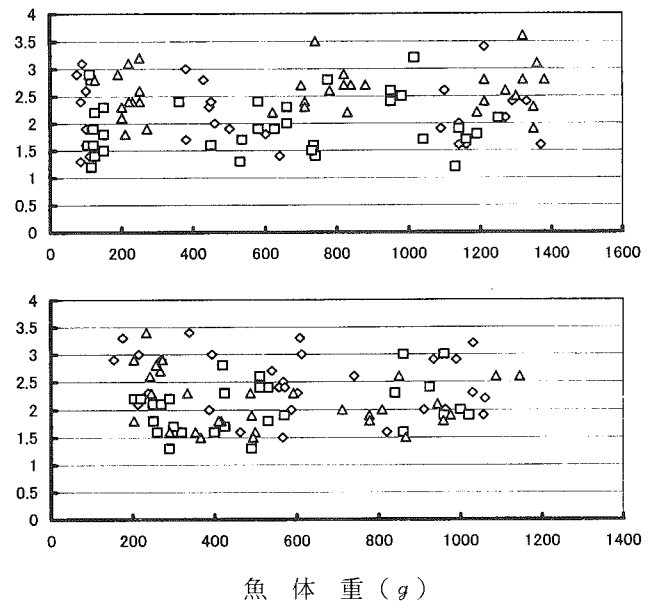
上段：マダイ
 ◇：8月3,4日, □：10月15,16日, △：12月8,9日
 下段：ヒラメ
 ◇：6月18,19日, □：8月7,8日, △：12月14,15日

一方、貪食指数はマダイが 2.2 ± 0.6 、ヒラメが 2.3 ± 0.6 で両種とも成長と水温による差はほとんど認められなかった(第5図)。



第4図 マダイとヒラメの魚体重と貪食率の関係

上段：マダイ
 ◇：8月3,4日, □：10月15,16日, △：12月8,9日
 下段：ヒラメ
 ◇：6月18,19日, □：8月7,8日, △：12月14,15日



第5図 マダイとヒラメの魚体重と貪食指数の関係

上段：マダイ
 ◇：8月3,4日, □：10月15,16日, △：12月8,9日
 下段：ヒラメ
 ◇：6月18,19日, □：8月7,8日, △：12月14,15日

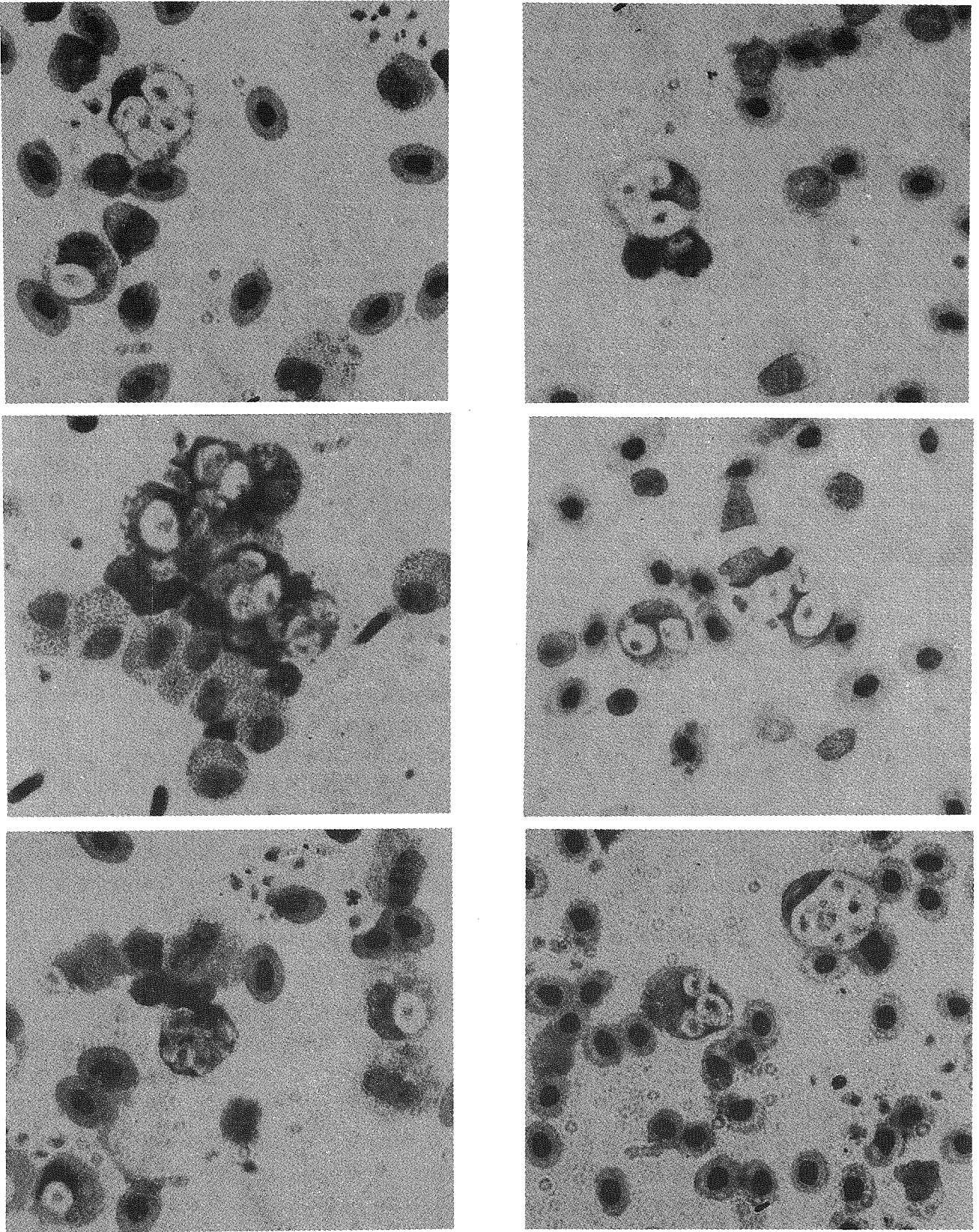
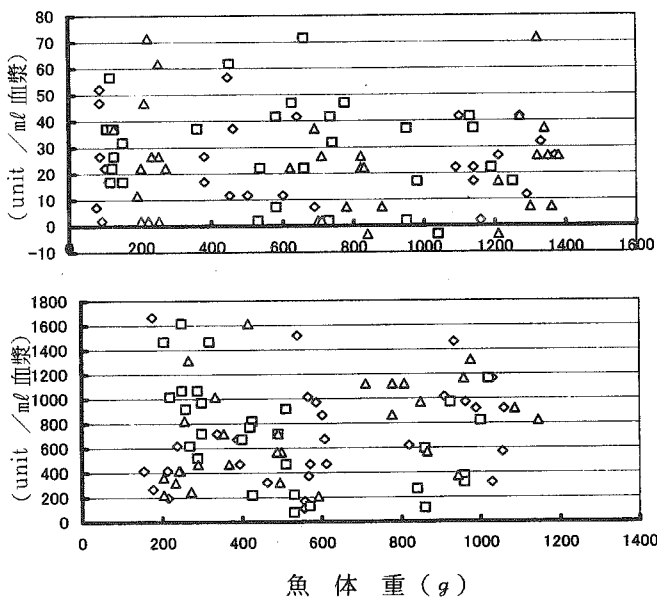


写真1 マダイとヒラメの貪食像

リゾチーム活性

細胞壁の特定結合を加水分解する溶菌性酵素であるリゾチーム活性を測定したが、マダイは100 unit/ml血漿以下 (25.7 ± 17.5 unit/ml血漿) で変動幅が大きく、成長と水温による差がほとんど認められなかった。一方、ヒラメは 747.3 ± 440.5 unit/ml血漿で、マダイに比べると活性が著しく高かった。また、中水温期には成長に伴っていくぶん上昇していたが、高水温期には小サイズが最も高い活性を示した(第6図)。



第6図 マダイとヒラメの魚体重とリゾチーム活性の関係
 上段: マダイ
 ◇: 8月3, 4日, □: 10月15, 16日, △: 12月8, 9日
 下段: ヒラメ
 ◇: 6月18, 19日, □: 8月7, 8日, △: 12月14, 15日

考 察

魚類の非特異的生体防御機能については魚種によって異なること(川原・楠田, 1988; 矢野ら, 1988)や飼育条件によって変動すること(矢野, 1998)が知られている。ここでは養殖マダイとヒラメを用いて非特異的生体防御機能を表す測定項目であるNBT還元能, ポテンシャルキリング活性, 白血球の貪食能と貪食率およびリゾチーム活性を測定した。その結果, ヒラメはマダイに比べると血漿リゾチーム活性が約30倍程高い値を示し, 大きな特

徴であった。また, 白血球の貪食率やNBT還元能もヒラメの方が高い値を示した。ここで用いたマダイは海面の生簀, またヒラメは陸上水槽で飼育されたものであり, 両種の養殖方法や飼育環境が大きく異なっているが, 養殖魚である両種の差異を表したものと考えられる。

また, ここでは, 水温帯の異なる時期にサイズの異なる魚を同時にサンプリングし, マダイとヒラメの成長や飼育水温が非特異的生体防御機能に与える影響を検討した。その結果, マダイではポテンシャルキリング活性が成長に伴っていくぶん上昇する傾向が認められ, 高水温期に限ると白血球の貪食率も成長に伴って高くなる傾向が認められたが, その他の項目では明瞭な差はなかった。一方, ヒラメは中水温期にはリゾチーム活性が成長に伴っていくぶん上昇していたが, その他の項目では成長による差が認められなかった。中西(1998)によると稚魚期は成魚に比べると液性免疫応答が低く, 免疫の持続期間も短いことからふ化直後から特異的免疫機能が成熟するまでの間は受動免疫に頼らざるを得ないことが指摘されている。また, マダイとヒラメは種苗生産されたものが養殖種苗として用いられ, 一般に両者とも10g以下のサイズから養殖が開始される。ところが, ここではマダイが75g以上, また, ヒラメは175g以上で養殖開始後数カ月を経過したものを用いた。そこで, 循環器系が完成し, 生体防御機能が成熟していたため, 測定項目と魚のサイズとの間に大きな変動が認められず, ほぼ一定であったものと考えられる。今後, 養殖段階でのより小さい魚を用いて非特異的生体防御機能を明らかにすることが必要である。

また, 魚類は変温動物であるため生体防御機能は水温に依存した変動を示すことが指摘されている(矢野, 1998)。ここでの結果から, マダイは高水温期にNBT還元能が高くなったり, 低水温期にポテンシャルキリング活性が高くなり, 水温に依存した変動を示した。一方, ヒラメは低水温期にNBT還元能が低くなったが, この項目を除くと水温による差は少なく, マダイとヒラメでは水温による影響が異なっていた。ここではサンプリング時の飼育水温に注目して検討したが, マダイの飼育環境である養殖場の環境は水温以外に溶存酸素量などが周年をとおして大きく変化する。一

方、ヒラメの陸上水槽では水温は同じように変動するが、溶存酸素量等の環境因子はマダイの飼育環境に比べるとあまり変動することがなく、一定していると考えられる。そこで、マダイでは水温による変動が大きく、ヒラメではあまり認められなかったものと考えられる。

ここでは養殖マダイとヒラメの健康時における非特異的生体防御機能を測定したが、今後、これらの項目のうちどの項目が魚の健康度を的確に表すかを検討することが必要であるが、そのためにも養殖現場における飼育密度、網換え、低酸素時、また、投薬など日常の飼育管理においてストレスが予想される時にこれらの数値が示す変動を明らかにすることが必要である。

摘 要

養殖マダイとヒラメを用いて非特異的生体防御機能を表す測定項目であるNBT還元能、ポテンシャルキリング活性、白血球の貪食能と貪食率およびリゾチーム活性を測定した。その結果、ヒラメはマダイに比べると血漿リゾチーム活性が約30倍、また、白血球の貪食率やNBT還元能もヒラメの方が高い値を示し、魚種による差が認められた。マダイは高水温期にNBT還元能が高くなったり、低水温期にポテンシャルキリング活性が高くなり、水温に依存した変動を示したが、ヒラメでは明瞭な差が認められなかった。また、両種とも魚体重の増加に伴って変動することがなく、成長との関係は認められなかった。

今後、日常の飼育管理においてストレスが予想される場面でこれらの数値がどのような変動を示すかを明らかにすることが必要である。

引用文献

- 池田弥生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎. 1986. 魚類血液図鑑. PP.361. 緑書房. 東京.
- 伊藤琢也・飯田貴次. 1998. 魚類好中球の生体防御における役割. P.135-139. 総特集 魚類防疫-魚病と人間の関わり-. 月刊海洋. 海洋出版株式会社. 東京.
- 川原逸朗・楠田理一. 1988. 主要養殖魚類のリゾチーム活性. 日本水産学会誌. 54(4). 581-584.
- 中西照幸. 1998. 魚類ワクチン開発における問題点と課題. P.149-153. 総特集 魚類防疫-魚病と人間の関わり-. 月刊海洋. 海洋出版株式会社. 東京.
- 日本水産資源保護協会. 1998. 平成9年度バイオディフェンス機能活用健康魚づくり技術開発研究成果実績報告書. PP.140.
- 酒井正博. 1994. 免疫賦活物質による魚病予防の可能性. P.177-179. 養殖. 緑書房. 東京.
- 高橋幸則. 1994. 魚病発生のメカニズム. P.44-48. 養殖. 緑書房. 東京.
- 矢野友紀. 1998. 魚類の生体防御機能. P.124-130. 総特集 魚類防疫-魚病と人間の関わり-. 月刊海洋. 海洋出版株式会社. 東京.
- 矢野友紀・畑山幸宏・松山博子・中尾実樹. 1988. 主要養殖魚の補体代替経路活性の測定法について. 日本水産学会誌. 54(6).1049-1054.

