

梅酢の種類および添加濃度を変えた梅酢投与マダイの 成長および抗病性

堅田昌英

和歌山県水産試験場

Growth and Disease Resistance of Red Sea Bream *Pagrus major* (Temminck et Schlegel) Given the Feed Added the Juice of Salted Plums Which Changed the Kind and Addition Concentration

Masahide Katata

Wakayama Prefectural Fishery Experiment Station

緒 言

飼料価格の高騰や魚価の低迷等により、海面魚類養殖の経営は極めて厳しい状況にあり、その対策は喫緊の課題である。このため、養殖業者は経営の安定化を図るべく、製品の品質向上、高付加価値化および販売方法の改善等、様々な努力を行っている。

梅酢は本県の特産物である梅干の製造過程で大量に排出され、その処理が課題であり、有効な利用法が求められている。畜産分野では、食用鶏、採卵鶏へ梅酢を投与することにより、免疫能力、肉質、産卵能力および卵質の向上が確認されている（伊丹ら 2005, 伊丹ら 2006）。生産品は「紀州うめどり」、「紀州うめたまご」の商標で既にブランド食品として市場に流通している。また、水産分野では、梅酢を養殖マダイへ投与することにより、エドワジエラ症およびマダイイリドウイルス病に対する抗病性が示され、血中バイオディフェンス機能が上昇することが報告されている（堅田 2011）。梅酢を投与された養殖マダイは「紀州梅まだい」の商標で既に販売されており、ブランド化されている。

本研究では、梅酢投与マダイのブランド価値に多様性を付加することを目的として、梅酢の種類や配合飼料への添加濃度を変えて、養殖マダイへ投与した場合の成長や各種疾病に対する抗病性および血中バイオディフェンス機能について調べた。

材料および方法

梅酢添加配合飼料 梅酢は、脱塩濃縮処理により製造された「梅 BX70」および脱塩濃縮処理のコストを抑えて製造され、ミネラルの含有分が多い「梅 U55W」（ともに成分を第 1 表に示す。）を使用し、市販の配合飼料（EP）に 0.3 % または 0.5 % の割合で添加して、梅酢添加配合飼料を作製した。

第1表 梅BX70および梅U55Wの成分(100gあたり)

成分	梅BX70 (pH1.6±0.2)	梅U55W (pH1.6±0.2)
水分	24.9 g	43.2 g
タンパク質	2.5 g	2.0 g
脂質	0.1 g	0.1 g
灰分	3.3 g	17.0 g
炭水化物	69.3 g	37.8 g
エネルギー	251 kcal	135 kcal
クエン酸	36.3 g	24.3 g
ナトリウム	1.21 g	5.26 g
カルシウム	56.2 mg	179 mg
カリウム	99.3 mg	1,590 mg
マグネシウム	47.8 mg	112 mg

試験区の設定 当試験場の試験筏(1生簀:3×3×3 m)に梅 BX70 0.3%区, 梅 BX70 0.5%区, 梅 U55W 0.5%区および対照区を設定し, 2009年6月22日にマダイ当歳魚(平均体重10.1 g)を270尾ずつ収容した。

1. **飼育試験** 梅 BX70 0.3%区, 梅 BX70 0.5%区および梅 U55W 0.5%区には梅酢添加配合飼料, 対照区には市販の配合飼料(EP)を投与し, 2009年6月23日から10月末までは1日2回(朝・夕), 11月以降は1日1回(朝)の飽食給餌を週5日行い, 毎月, 魚体重の全測定を実施した。また, 魚体測定間の各期間中の増重量および給餌量から増肉係数を計算した。

2. 抗病性試験

1) マダイイリドウイルス病攻撃試験

(1) **供試マダイ** 2009年6月23日から2ヶ月間飼育試験を行った当歳魚を供した。なお, 供試魚のサイズは, 梅 BX70 0.3%区が平均体重61.6 g, 梅 BX70 0.5%区が同60.0 g, 梅 U55W 0.5%区が同57.2 gおよび対照区が同58.4 gであった。

(2) **供試ウイルス液** 和歌山県内の養殖業者から当試験場へ持ち込まれたマダイイリドウイルス病感染マダイ(当歳魚)から脾臓を取り出してマイクロテストチューブに入れ, 10倍量のPBS(-)を添加して攪拌ペッスルで磨砕した。その後, 3,000 rpm, 5分間の遠心分離を行い, 上清を0.45 μmのメンブレンフィルターでろ過して供試ウイルス液とした。

(3) **同居感染実験** 2t円形水槽(水量1.5t)に各区の供試マダイを20尾ずつ収容し, 砂ろ過海水で換水率を1回転/hr.とした。各区の供試マダイには標識を付けて区別できるようにした。その後, 前述のウイルス液を0.1 mlずつ腹腔内注射接種したマダイ当歳魚(平均体重59.3 g)10尾を水槽内に同居させ, 感染源とした。実験期間中は絶食し, 死亡した供試マダイは速やかに取り上げ, 脾臓のスタンプ標本を作製してギムザ染色を実施し, 顕微鏡観察により異型肥大細胞を確認して, マダイイリドウイルス病による死亡であることを診断し, 21日間累積死亡率を追跡した。

2) エドワジエラ症攻撃試験

(1) **供試マダイ** 2009年6月23日から3ヶ月間飼育試験を行った当歳魚を供した。なお、供試魚のサイズは、梅 BX70 0.3%区が平均体重 110.6 g, 梅 BX70 0.5%区が同 106.8 g, 梅 U55W 0.5%区が同 107.9 g および対照区が同 105.6 g であった。

(2) **供試菌株** 和歌山県内の養殖業者から当試験場へ持ち込まれたエドワジエラ症感染マダイ (2歳魚) から分離された *Edwardsiella tarda* Ewing and McWhorter の野生株を TS ブイヨンに懸濁し、マダイ 1歳魚 (平均体重 107.7 g) に 0.1 ml 腹腔内注射接種してエドワジエラ症を発病させ、腎臓から TS 寒天培地 (2 %NaCl) へ釣菌し、分離された株を *E. tarda* 攻撃菌株とした。

(3) **同居感染実験** 2 t 円形水槽 (水量 1.5 t) に各区の供試マダイを 20 尾ずつ収容し、砂ろ過海水で換水率を 1 回転/hr. とした。各区の供試マダイには標識を付けて区別できるようにした。その後、前述の攻撃菌株を TS ブイヨンに懸濁し、0.1 ml ずつ腹腔内注射接種したマダイ 1歳魚 (前述と同サイズ) 10 尾を水槽内に同居させ、感染源とした。実験期間中は絶食し、死亡した供試マダイは速やかに取り上げ、腎臓から TS 寒天培地 (2 %NaCl) へ釣菌を行って、エドワジエラ症による死亡であることを確認し、28 日間累積死亡率を追跡した。

3) バイオディフェンス検査

(1) **供試マダイ** 2009年6月23日から4ヶ月間飼育試験を行ったマダイ当歳魚を供した。なお、供試魚のサイズは、梅 BX70 0.3%区が平均体重 138.2 g, 梅 BX70 0.5%区が同 134.1 g, 梅 U55W 0.5%区が同 130.9 g および対照区が同 132.8 g であった。

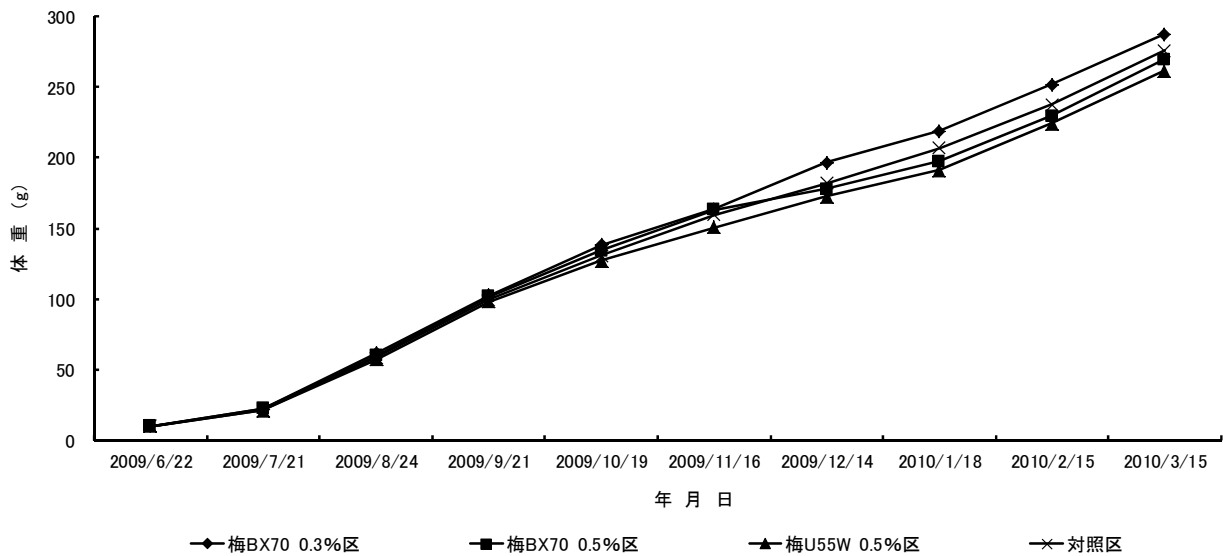
(2) **採血** ヘパリン処理した注射器 (1 ml) を用いて各区 5 尾ずつ心臓から 1 ml 採血した。なお、ヘパリンナトリウム溶液は 300 U/ml とした。

(3) **バイオディフェンス検査** 改良ポンドサイドキットマニュアル (社団法人 日本水産資源保護協会 1998) に従って、ヘモグロビン濃度、NBT 還元能、ポテンシャルキリング活性、血漿リゾチーム活性、白血球貪食能 (貪食率および貪食指数) およびヘマトクリット値を測定した。

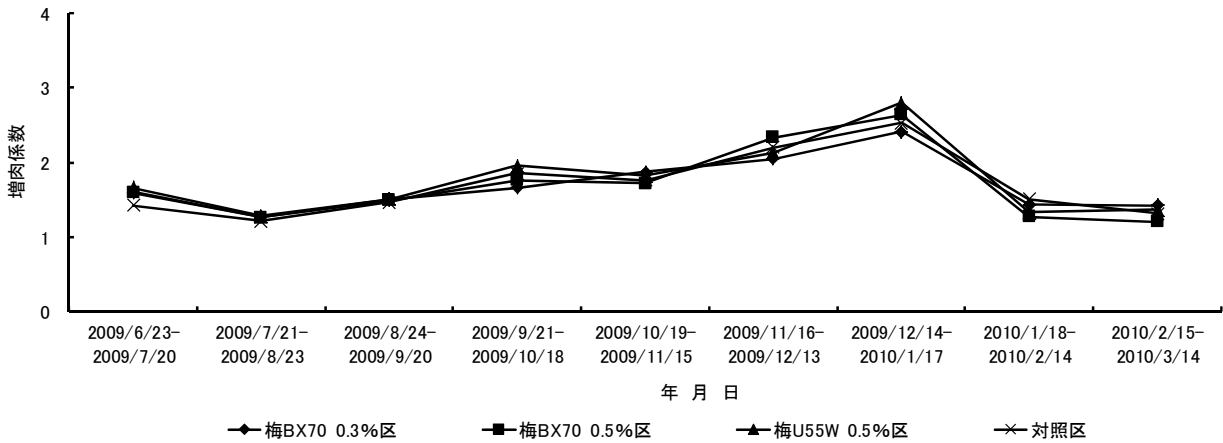
有意差の検定 累積死亡率は χ^2 検定、魚体測定結果およびバイオディフェンス検査結果はフィッシャーの LSD 法により有意差の検定を行った (新城 1996)。

結 果

1. **飼育試験** 供試マダイ各区の魚体重の推移を第 1 図に、増肉係数の推移を第 2 図に示す。夏季から秋季にかけては各区の魚体重の増加に特に差は認められなかったが、12 月以降は梅 BX70 0.3 % 区の成長が最も良好になり、対照区、梅 BX70 0.5 % 区、梅 U55W 0.5 % 区の順に続いた。なお、増肉係数に関しては、各区とも試験期間中は同様の変動傾向を示しており、特に顕著な差は認められなかった。



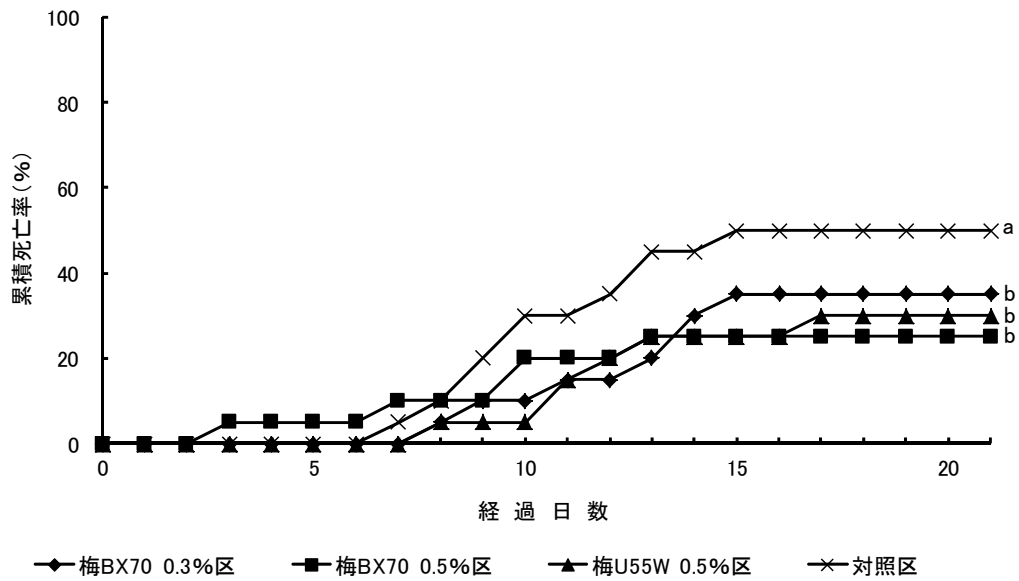
第1図 飼育試験中の供試マダイ体重推移



第2図 飼育試験中の供試マダイ増肉係数推移

2. 抗病性試験

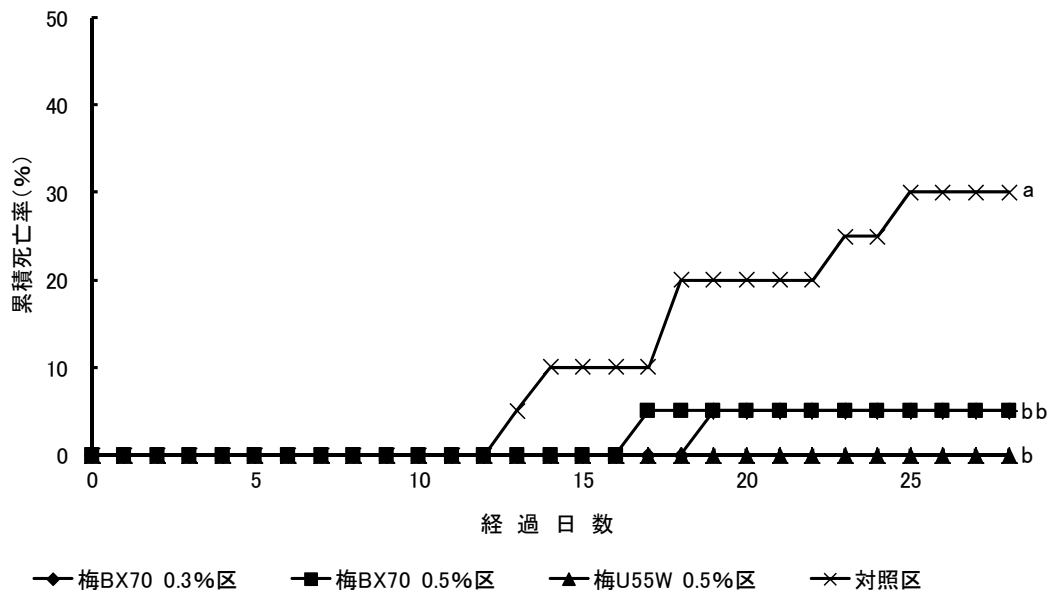
1) マダイイリドウイルス病攻撃試験 マダイイリドウイルス病攻撃試験による供試マダイの累積死亡率を第3図に示す。試験期間中の水温は25.0～26.7℃であった。対照区は7日目から死亡するようになり、累積死亡率が50%に達したのに対して、梅BX70 0.3%区は35%、梅BX70 0.5%区は25%および梅U55W 0.5%区は30%となり、対照区の累積死亡率は各種梅マダイ区よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。なお、各種梅マダイ区間の累積死亡率は、有意差が認められなかった ($p > 0.05$)。



第3図 マダイイリドウイルス病攻撃試験による累積死亡率

※異なるアルファベット間では有意差あり($p < 0.05$)

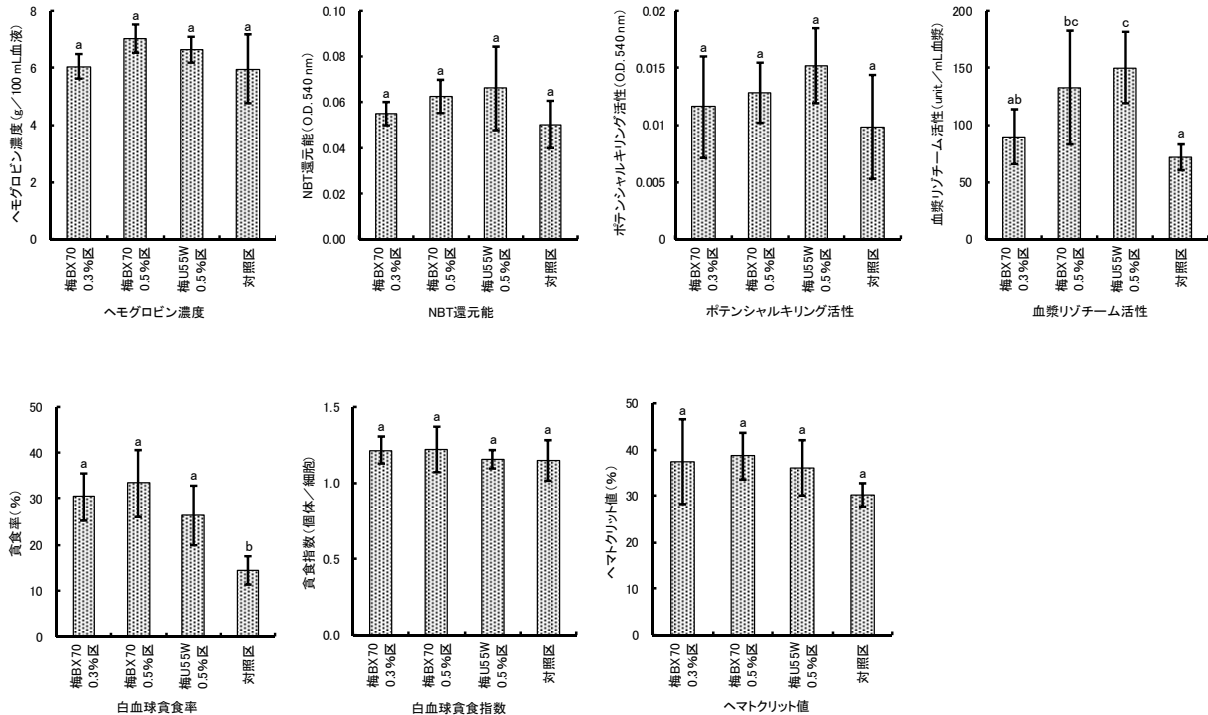
2) エドワジエラ症攻撃試験 エドワジエラ症攻撃試験による供試マダいの累積死亡率を第4図に示す。試験期間中の水温は23.3~25.3℃であった。対照区は13日目から死亡するようになり、累積死亡率が30%に達したのに対して、梅BX70 0.3%区および梅BX70 0.5%区は5%、梅U55W 0.5%区は0%であり、対照区の累積死亡率は各種梅マダイ区よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。なお、各種梅マダイ区間の累積死亡率は、有意差が認められなかった ($p > 0.05$)。



第4図 エドワジエラ症攻撃試験による累積死亡率

※異なるアルファベット間では有意差あり($p < 0.01$)

3) バイオディフェンス検査 供試マダイのバイオディフェンス検査結果を第5図に示す. ヘモグロビン濃度, NBT還元能, ポテンシャルキリング活性, 白血球貪食指数およびヘマトクリット値は, 全ての各種梅マダイ区が対照区より同等以上の数値を示したものの, 各試験区の間で有意差は認められなかった ($p > 0.05$). 血漿リゾチーム活性は全ての各種梅マダイ区が対照区より活性が上がっており, 梅 BX70 0.5%区および梅 U55W 0.5%区は対照区よりも有意に高かった ($p < 0.01$). また, 白血球貪食率は全ての各種梅マダイ区が対照区より高く, 有意差が認められた ($p < 0.01$).



第5図 バイオディフェンス検査結果

※各グラフ中の異なるアルファベット間で有意差あり($p < 0.01$)

考察

飼育試験において, 夏季から秋季にかけては各区の魚体重の増加に特に差は認められなかったが, 12月以降は梅 BX70 0.3%区の成長が最も良好になり, 対照区, 梅 BX70 0.5%区, 梅 U55W 0.5%区の順に続いた (第1図). 従って, 成長への影響は梅 BX70 の 0.3%の添加ならば問題ないが, 添加濃度が高くなると冬季の魚体重の増加スピードがやや遅くなり, 梅 BX70 よりもミネラルを多く含有する梅 U55W (第1表) では, この傾向がより強く現れるものと考えられた. 海水魚は, 体内の浸透圧が約 400mOsm/kg であり, 環境水 (海水) の浸透圧 (1,000mOsm/kg) を下回っており, 体内から水分が流出するため, 多量の海水を飲む (畑井ら 2007). 同時に, ミネラルが体内に侵入することから, エネルギーを使って能動的に過剰なミネラルを体外へ排出している (畑井ら 2007). ミネラルを多く含有する餌を投与すると, 能動的なミネラルの排出のために余分にエネルギーを費やす

必要があるため、梅 U55W を投与した区の成長が最も遅れたと考えられた。また、増肉係数に関しては、各区とも試験期間中は同様の変動傾向を示しており、特に顕著な差は認められなかった（第 2 図）。このことと上述の冬季における魚体重の増加結果を考え合わせると、冬季には梅酢の添加濃度が高くなれば魚の摂餌量が下がり、ミネラルの含有量が増えると更に摂餌量が低下するということが言える。この結果、梅 BX70 0.5 %区および梅 U55W 0.5 %区の冬季における成長が梅 BX70 0.3 %区よりもやや遅れたと考えられた。

マダイイリドウイルス病およびエドワジエラ症による攻撃試験では、対照区の累積死亡率は各種梅マダイ区よりも有意に高かった（第 3 図、第 4 図）。堅田（2011）は、梅 BX70 を 0.3 %配合飼料に添加してマダイに投与した研究で、マダイ当歳魚がマダイイリドウイルス病に対して、マダイ 3 歳魚がエドワジエラ症に対してそれぞれ抗病性を示すことを報告している。本研究では、マダイ当歳魚において、梅 BX70 0.3%区のみならず、梅 BX70 0.5%区および梅 U55W 0.5%区でもマダイイリドウイルス病に対して抗病性が認められた。これは、梅 BX70 は配合飼料への添加濃度を 0.5%に増加させても同等に抗病性を発揮することを示しており、ミネラルを多く含有する梅 U55W でも抗病性が証明された。更に本研究では、マダイ当歳魚でもエドワジエラ症に対して抗病性が認められた。これは、梅 BX70 の 0.3%投与がマダイ 3 歳魚（堅田 2011）のみならず、マダイ当歳魚に対しても抗病性の向上に寄与することを示している。また、梅 BX70 は配合飼料への添加濃度を 0.5%に増加させてもエドワジエラ症に対して抗病性を発揮することが示され、梅 U55W でも同等に抗病性が認められた。

薬用ハーブをモイストペレットに添加して当歳マダイに投与すると、ヘモグロビン濃度や血漿リゾチーム活性が対照区よりも有意に上昇し、*Vibrio anguillarum* Bergman の攻撃試験による累積死亡率が有意に低下することが報告されている（Ji *et al.* 2007）。また、梅 BX70 を 0.3 %配合飼料に添加してマダイに投与した研究では、当歳魚において、血漿リゾチーム活性および白血球貪食率が対照区よりも梅マダイ区の方が有意に高かった（堅田 2011）。本研究では、バイオディフェンス機能において各種梅マダイ区と対照区との間に差のない項目もあったが、白血球貪食率は各種梅マダイ区の方が対照区よりも有意に高かった（第 5 図）。また、血漿リゾチーム活性は梅 BX70 0.3%区で対照区とは有意差が見られなかったものの、梅 BX70 0.5%区および梅 U55W 0.5%区は対照区よりも有意に活性が上がっていた（第 5 図）。本研究により、梅 BX70 を 0.3 %投与した場合のみならず、配合飼料への添加濃度を 0.5%に増加させても、また、梅酢の種類を梅 U55W に変えても、マダイのバイオディフェンス機能が向上することが明らかになった。本機能の向上によって、病原体が魚体内に侵入するマダイイリドウイルス病およびエドワジエラ症に対して、抗病性を発揮した可能性が推察された。

各種梅マダイ区の中では、統計的な有意差は見られなかったものの、梅酢の種類に関わらず、添加濃度が高くなるとマダイイリドウイルス病による累積死亡率が低くなる傾向にあり（第 3 図）、バイオディフェンス能力も概ね高くなった（第 5 図）ことから、梅酢の添加濃度を高くした方が抗病性を向上させるものと考えられた。なお、エドワジエラ症に対する累積死亡率は、梅酢の種類や添加濃度による差が特に認められなかった（第 4 図）。これは、エドワジエラ症に対するマダイの感受性が影響を及ぼしているのではないかと推察される。マダイのエドワジエラ症は、養殖現場では主に 1 歳魚以上の大型魚を中心にして被害をもたらしている（黒原ら 2009）。すなわち、マダイ当歳魚は元々エドワジエラ症に対する感受性が低いため、梅酢の種類や添加濃度の違いによる抗病性効果の差が表面化しかなかったと考えられた。

摘 要

梅酢の種類および添加濃度を変えた配合飼料（EP）を給餌して飼育した各種梅マダイの成長および抗病性について検討した。飼育試験の結果、梅 BX70 0.3 %区の成長が最も良好だったが、増肉係数は各試験区の間で顕著な差は認められなかった。攻撃試験の結果、マダイイリドウイルス病およびエドワジェラ症については、各種梅マダイ区の方が対照区よりも累積死亡率が有意に低かった。また、血液中のバイオディフェンス機能を検査した結果、血漿リゾチーム活性や白血球貪食率が対照区よりも各種梅マダイ区の方が上昇しており、有意に高くなっている区も認められた。

本研究を進めるにあたり、データ収集にご協力いただきました和歌山県水産試験場の皆様に感謝申し上げます。

引用文献

- 畑井喜司雄・宗宮弘明・渡邊翼. 2007. 魚病学 改訂第二版. P. 16-17., P. 27-28. 学窓社. 東京.
- 伊丹哲哉, 香川高士, 細川清, 吉村幸則. 2005. ニワトリの産卵性および卵質に及ぼす脱塩濃縮梅酢の影響. 日本家禽学会誌. 42 : 209-216.
- 伊丹哲哉, 上田雅彦, 香川高士, 黒田順史, 吉村幸則. 2006. 採卵鶏の免疫応答に及ぼす脱塩濃縮梅酢の影響. 日本家禽学会誌. 43 : 103-109.
- Ji, S.C., O. Takaoka, G.S. Jeong, S.W. Lee, K. Ishimaru, M. Seoka and K. Takii. 2007. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. Fish. Sci. 73:63-69.
- 堅田昌英. 2011. 梅酢投与マダイの抗病性および血中バイオディフェンス機能. 和歌山県農林水産総合技術センター水産試験場研究報告. 2 : 20-23.
- 黒原健朗・木村喜洋・関口洋介・川合研兒. 2009. エドワジェラ症原因菌の海水中での生存性とマダイ *Pagrus major* に対する毒性. 水産増殖. 57 : 227-232.
- 社団法人 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事業研究成果実績報告書. P. 4-12. 東京.
- 新城明久. 1996. 生物統計学入門—計算マニュアル—. P. 50-53., P. 110-112. 朝倉書店. 東京.