

梅酢投与マダいの抗病性および血中バイオディフェンス機能

堅田昌英*

Masahide KATATA

Key word : 梅酢, 梅マダイ, 抗病性

まえがき

海面魚類養殖は、飼料価格の高騰や魚価の低迷等によって極めて厳しい経営を強いられており、その対策は大きな課題となっている。このため、養殖業者は製品の品質向上、高付加価値化および販売方法の改善等、様々な努力により経営の安定化を図っている。

梅酢は本県の特産物である梅干しの製造過程で大量に排出され、その処理のため有効利用法が求められており、現在、畜産分野において、食用鶏、採卵鶏への梅酢の投与によって免疫能力、肉質、産卵能力および卵質が向上することが確認されている。^{1,2)} また、生産品は「紀州うめどり」、「紀州うめたまご」の商標で既に市場に流通しており、美味しいブランドとして高い評価を得ている。

本研究では、水産分野における梅酢利用の一方法として、消費者に対する安全・安心かつ高品質な食品としての養殖マダいのPRを目的として、梅酢を配合飼料に添加・投与し、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

試験区の設定と供試魚の養成 試験は当試験場筏(1生簀: 3×3×3 m)を用い、梅酢投与マダイ区(以下、梅マダイ区)および対照区を設定し、3歳魚は11尾、2歳魚は50尾、当歳魚は250尾ずつ収容して行った。梅マダイ区には市販配合飼料(EP)に梅酢(梅BX70; 株式会社紀州ほそ川製)を0.3%添加したものの、対照区には配合飼料のみを、3歳魚では1日1回、2歳魚および当歳魚では1日2回(朝・夕)、週5回飽食給餌した。

1. バイオディフェンス機能検査

供試魚 平成20年6月19日から5ヶ月間養成したマダイ2歳魚(梅マダイ: 平均体重916.5 g, 対照マダイ: 同928.8 g) および当歳魚(梅マダイ: 同161.4 g, 対照マダイ: 同170.3 g)を供した。

採血 ヘパリン処理した注射器(1 ml)を用いて心臓から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。

検査項目 改良ポンドサイドキットマニュアル³⁾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。

2. 抗病性試験

1) エドワジエラ症感染試験

供試魚 平成19年11月1日から7.5ヶ月間養成を行った3歳魚(梅マダイ: 平均尾叉長38.9 cm, 平均体重1,253.0 g, 対照マダイ: 同44.1 cm, 1,767.7 g)を供した。

供試菌株 三重県水産研究所から分与された*Edwardsiella tarda*野生株(マダイ当歳魚由来; MEE0301)をTSブイオンに懸濁し、マダイ1歳魚(平均尾叉長25.3 cm, 平均体重341.8 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。

感染方法 2 t円形水槽(水量1.5 t)に梅マダイ(右胸鰭をカットして標識)および対照マダイ(左胸鰭をカットして標識)を11尾ずつ収容し、砂ろ過海水で換水率を1回転/hr.とした。前述の攻撃菌株をTSブイオンに懸濁し、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。なお、感染源としたマダイ1歳魚が死亡した後は、新たなマダイ1歳魚に前述の攻撃菌

* 和歌山県水産局(Wakayama Prefectural Fisheries Bureau, 1-1 Komatsubaradori, Wakayama City, Wakayama 640-8585, Japan).

梅酢投与マダいの抗病性および血中バイオディフェンス機能

表 1 バイオディフェンス機能検査結果 (平均値±標準偏差)

バイオディフェンス機能	2 歳魚		当歳魚	
	梅マダイ	対照マダイ	梅マダイ	対照マダイ
ヘモグロビン濃度 (g / 100 mL 血液)	8.66 ^a ± 0.89	7.46 ^b ± 0.79	6.90 ± 1.15	7.00 ± 0.93
NBT 還元能 (O.D.540 nm)	0.028 ± 0.010	0.030 ± 0.006	0.029 ± 0.006	0.031 ± 0.008
ポテンシャルキリング活性 (O.D.540 nm)	0.013 ± 0.006	0.013 ± 0.006	0.014 ± 0.005	0.015 ± 0.006
血漿リゾチーム活性 (unit / mL 血漿)	39.058 ± 34.140	35.914 ± 36.516	60.775 ^a ± 44.285	12.311 ^b ± 5.206
白血球貪食率 (%)	33.7 ^a ± 7.9	15.8 ^b ± 4.8	25.6 ^a ± 6.0	14.2 ^b ± 6.9
白血球貪食指数 (個体 / 細胞)	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
ヘマトクリット値 (%)	32.3 ^a ± 2.1	29.8 ^b ± 2.1	35.0 ^a ± 2.9	31.7 ^b ± 3.4

※ 2 歳魚および当歳魚のそれぞれにおいて、同じ列で異なる上付き文字を持つものは有意差のあることを示す ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。

株を 0.1 ml ずつ腹腔内注射接種して水槽内に追加した。死亡した梅マダイおよび対照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診断し、64 日間累積死亡率を追跡した。

2) イリドウイルス病感染試験

供試魚 平成 20 年 6 月 19 日から 2 ヶ月間養成を行った当歳魚 (梅マダイ: 平均尾又長 15.9 cm, 平均体重 83.3 g, 対照マダイ: 同 15.8 cm, 86.9 g) を供した。

供試ウイルス液 和歌山県内の養殖業者から当該試験場へ持ち込まれた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 μ m 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。

感染方法 2 t 円形水槽 (水量 1.5 t) に梅マダイ (右胸鰭をカットして標識) および対照マダイ (左胸鰭をカットして標識) 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。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 (平均尾又長 15.8 cm, 平均体重 86.9 g) 10 尾を水槽内に同居させ、感染源とした。なお、感染源としたマダイ当歳魚が死亡した後は、新たなマダイ当歳魚に前述のウイルス液を 0.1 ml ずつ腹腔内注射接種して水槽内に追加した。死亡した梅マダイおよび対照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施し、顕微鏡観察により異形肥大細胞を確認して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。

3) 海産白点病感染試験

供試魚 前述の 2) イリドウイルス病感染試験と同サイズの当歳魚を供した。

感染方法 海産白点病を発生させている 1 t 円形水槽 (水量 0.7 t; 以下、海産白点病感染水槽) に梅マダイ (右胸鰭をカットして標識) および対照マダイ (左胸鰭をカットして標識) を 20 尾ずつ収容した。砂ろ過海水で換水率を 1 回転 / hr. とし、本疾病による供試マダイの死亡状況を 5 日間観察した。また、梅マダイおよび対照マダイを 10 尾ずつ 1 夜のみ前述の海産白点病感染水槽へ収容した後の鰓 25 mm² 当たりの海産白点虫の寄生数を調べた。

4) ビバギナ寄生数のモニタリング

供試魚 梅マダイおよび対照マダイの当歳魚を供した。

モニタリング 梅マダイおよび対照マダイから養成開始後毎月 10 尾ずつサンプリングを行い、鰓全体に寄生しているビバギナを計数した。

3. 有意差の検定 累積死亡率は χ^2 検定、寄生数およびバイオディフェンス検査結果は t 検定により有意差の検定を行った。⁴⁾

結果および考察

1. バイオディフェンス機能検査 検査結果を表 1 に示す。ヘモグロビン濃度は 2 歳魚で梅マダイの方が対照マダイよりも有意に高かった ($p < 0.01$) が、当歳魚では両者に差は認められなかった ($p > 0.05$)。NBT 還元能およびポテンシャルキリング活性は 2 歳魚

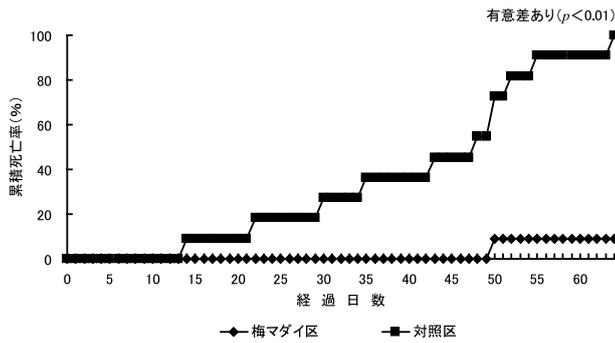


図1 エドワジエラ症攻撃試験による供試マダイの累積死亡率

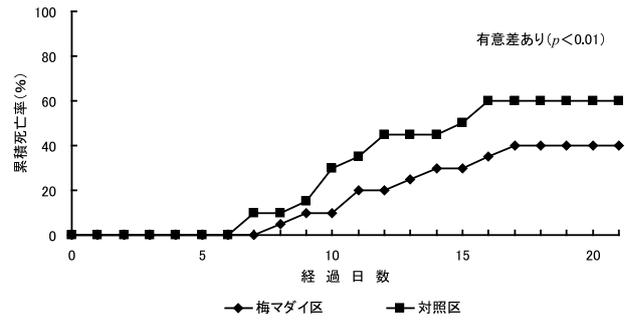


図2 イリドウイルス病攻撃試験による供試マダイの累積死亡率

および当歳魚ともに梅マダイと対照マダイと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当歳魚において梅マダイの方が対照マダイよりも有意に高く ($p < 0.01$)、白血球貪食率は2歳魚および当歳魚ともに梅マダイの方が対照マダイよりも高く、両者に有意差が認められた ($p < 0.01$)。しかし、白血球貪食指数は2歳魚および当歳魚ともに梅マダイと対照マダイとの間に差は認められなかった ($p > 0.05$)。また、ヘマトクリット値は2歳魚および当歳魚ともに梅マダイの方が対照マダイよりも有意に高かった ($p < 0.05$)。以上の結果から、当歳魚で血漿リゾチーム活性が有意に高くなっていたものの、2歳魚および当歳魚ともに白血球貪食率が有意に上がっていたことから、養殖マダイに梅酢を投与することにより、細胞性防御因子の向上が誘導されることが推察された。

2. 抗病性試験

1) エドワジエラ症感染試験 累積死亡率を図1に示す。試験期間中の水温は20.6～28.1℃であった。対照マダイは14日目から死亡するようになり、累積死亡率が100%に達したのに対して梅マダイは9.1%で、両者に有意差が認められ ($p < 0.01$)、梅マダイはエドワジエラ症に対して抗病性を有していると考えられた。

2) イリドウイルス病感染試験 累積死亡率を図2に示す。試験期間中の水温は24.9～26.6℃であった。対照マダイは7日目、梅マダイは8日目から死亡が見られるようになったが、実験期間中の累積死亡率は対照マダイが60%であったのに対し、梅マダイは40%で両者に有意差が認められ ($p < 0.01$)、梅マダイはイリドウイルス病に対しても抗病性を有していると考えられた。

3) 海産白点病感染試験 試験期間中の水温は累積死亡率の実験が24.9～25.9℃、一夜の寄生数の実験が24.9～25.1℃であった。感染試験により対照マダイは4日目に、梅マダイは5日目に全滅し、両者に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。また、供試

マダイ10尾の海産白点虫の平均寄生数は梅マダイが10.3個体/鰓25mm²、対照マダイが7.9個体/鰓25mm²で、両者に有意差は認められず ($p > 0.05$)、梅マダイは海産白点病に対しては抗病性を有しないと考えられた。

4) ビバギナ寄生数のモニタリング サンプルングした全期間を通して梅マダイと対照マダイの鰓へのビバギナ寄生数に有意差は認められず ($p > 0.05$)、梅マダイはビバギナ症に対しては抗病性を有しないと考えられた。

薬用ハーブをモイストペレットに添加してマダイに投与すると、ヘモグロビン濃度や液性防御因子である血漿リゾチーム活性が対照区よりも有意に上昇し、*Vibrio anguillarum*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。⁵⁾ 梅酢を配合飼料に添加してマダイに投与した本研究では、バイオディフェンス機能において梅マダイと対照マダイとの間に差のない項目もあったが、細胞性防御因子である白血球貪食率は2歳魚および当歳魚ともに梅マダイの方が対照マダイよりも有意に高く、本機能の向上によって病原体が魚体内に侵入するエドワジエラ症およびイリドウイルス病に対して抗病性を示した可能性が推察される。しかし、血液中にまで侵入しない海産白点虫やビバギナに対しては抗病性を発揮できないものと思われた。

要 約

梅酢添加配合飼料 (EP) を給餌して飼育した梅マダイの抗病性について検討した。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等、梅マダイの方が対照マダイよりも有意に高くなっていた。また、感染試験の結果、エドワジエラ症およびイリドウイルス病については梅マダイの方が通常の配合飼料 (EP) を給餌して飼育した対照マダイよりも累積死亡率が有意に低かった。しかし、海

産白点病およびピバギナ症に対する感染試験では両者の累積死亡率および寄生数に差は認められなかった。

謝 辞

本研究を進めるに当たり、データ収集にご協力頂きました和歌山県農林水産総合技術センター水産試験場の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) 伊丹哲哉, 香川高士, 細川清, 吉村幸則. 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 2005 ; 42 : 209-216.
- 2) 伊丹哲哉, 上田雅彦, 香川高士, 黒田順史, 吉村幸則. 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 2006 ; 43 : 103-109.
- 3) 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. 社団法人 日本水産資源保護協会, 東京. 1998 ; 4-12.
- 4) 新城明久. 「生物統計学入門—計算マニュアル—」朝倉書店, 東京. 1996.
- 5) Ji SC, Takaoka O, Jeong GS, Lee SW, Ishimaru K, Seoka M, Takii K. Dietary medicinal herbs improve growth and some non-specific immunity of red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.* 2007; 73: 63-69.