

バイオフィェンス機能活用健康魚づくり技術開発事業

田中真二・井上美佐・栗山功・西村昭史

目的

薬剤による治療が困難な薬剤耐性菌による細菌病やウイルス病に対しては、飼育管理内容を改善することで魚が本来持っているバイオフィェンス（生体防御）機能を高め、病気を予防することが望ましい。そのためには日常的にバイオフィェンス機能を測定できる手法を確立するとともに、飼育管理とバイオフィェンス機能との関わりについて明らかにしておく必要がある。本事業では、昨年度までにバイオフィェンス機能を測定するための手法としてポンドサイドキットをマダイに適用し、その最適な測定条件を明らかにした。今年度は本キットを用い、採血後の時間経過と測定値の変動との関連を調べ、本キットによる測定が可能な血液の保存時間を明らかにするとともに、様々なストレス下のマダイを用いて測定することにより、本キットによる測定値がマダイのバイオフィェンス機能の変動を捉えているか否かを検討する。なお試験の詳細な結果は関連報文にとりまとめたので、ここでは概要を記す。

材料および方法

1. 血液の保存時間が測定値に及ぼす影響

平成11年2月1日（第1回目測定）および平成11年2月18日（第2回目測定）に海面小割網で飼育中のマダイ1歳魚（体重約900g）10尾から採血して5℃の冷蔵庫で保存し、採血直後、3時間後、6時間後および24時間後にポンドサイドキットによる測定を行った。なお採血時の水温は約15℃であった。

2. 様々なストレス下のマダイの測定

以下の4例のマダイを用いてポンドサイドキットによるバイオフィェンス機能の測定を行うとともに、血液化学自動分析システム（スポットケムSP-4410；京都第一科学）による血漿化学成分の分析を行った（ただしリン脂質はコリンオキシダーゼ DAOS法により、分光光度計を用いて測定した）。

1) 白点病自然発病魚

陸上水槽で飼育中に白点病が発生したマダイ1歳魚

（体重約170g）10尾および白点病終息から約1ヶ月後の同群のマダイ6尾について測定した。飼育中の水温は26.5～27.5℃であった。

2) 銅イオンに曝露された魚

20尾のマダイ1歳魚（体重約230g）を0.26gのCuCl₂・2H₂Oを懸濁させた200ℓの海水（0.5ppm Cu）で止水飼育し、0、24および48時間後にそれぞれ6尾または7尾から採血し、測定した。飼育期間中の水温は24.5～27.5℃であった。

3) エドワジエラ症自然発症魚

海面小割網で飼育中にエドワジエラ症が自然発症したマダイ1歳魚（体重約650g）10尾および同群の未発症魚5尾について測定した。測定時の飼育水温は約18℃であった。

4) イリドウイルス人為感染魚

マダイ0歳魚（体重約80g）30尾を水温25℃で19日間馴致飼育し、10尾から感染前の対照魚として採血し、測定した。残りの20尾を2個の200ℓ角形水槽に10尾ずつ分養し、一方のマダイにはイリドウイルス病魚の脾臓由来のウイルス液を腹腔内に0.1mlずつ注射（10^{4.8} TCID₅₀/尾）し、他方のマダイは対照区としてMEMで同様に処理した。これら両区のマダイを25℃で5日間飼育後、測定した。

結果および考察

1. 血液の保存時間が測定値に及ぼす影響

表1に2回の測定結果を取りまとめて示した。2回の測定に共通してみられたのは採血から24時間後の白血球における貪食率の低下であり、第1回目の測定では有意差（ $p < 0.05$ ）がみられた。その他の項目では一定の傾向はみられなかった。これらのことから、本ポンドサイドキットによりバイオフィェンス機能を測定するにあたっては、採血後に血液を冷蔵保存し、6時間以内に測定するのが良いといえる。ただしポテンシャルキリング活性においては、第1回目測定で採血直後の活性が高かった2個体で3時間以降に測定値が低下したことから、ポテンシャルキリング活性の高い個体を用いた測定事例を蓄積する必要がある。

2. 様々なストレス下のマダイの測定

昨年度に行ったエドワジエラ症人為感染マダイの測定結果も含め、様々な飼育状況下のマダイを用いたポンドサイドキットおよび血漿化学成分の測定結果を取りまとめて表2および表3に示した。ポンドサイドキットによるバイオディフェンス機能の測定結果をみると、いずれの事例でもヘモグロビン濃度は低下し、また銅イオンに曝露された事例を除けばポテンシャルキリング活性と血漿リゾチーム活性は高くなる事例が多かった。銅イオンに曝露された事例ではその他の項目も低くなっており、バイオディフェンス機能全体を低下させる作用があると考えられる。今回の測定事例から、極端なストレス下にあるマダイのバイオディフェンス機能の変動をポンドサイドキットにより捉えうることが確認された。来年度以降は通常の養殖現場で起こりうる範囲で異なる飼育条件を設定してマダイを飼育し、バイオディフェンス機能の

変動をポンドサイドキットにより評価しうるか否かを検討する必要がある。

血漿化学成分の測定結果をみると、総コレステロールとリン脂質は測定した全ての事例で低くなっており、健康度の評価に有用な指標であることが確認された。またグルコースは高くなる事例が多く、エドワジエラ症自然発症魚では低くなっているものの、これは発症による長期の摂餌不良による可能性が考えられることから、摂餌状態と併せて評価すれば健康度の指標となるかもしれない。今後もポンドサイドキットと併せてこれらの血漿化学成分の項目についても測定を行い、バイオディフェンス機能と健康度の関連について検討したい。

関連報文

水産庁：平成10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

表1 血液の保存時間とポンドサイドキットによる測定値の関連

	Hb濃度 (g/dl)	NB T還元能 (ODat540nm)	ポテンシャルキリング 活性 (ODat540nm)	リゾチーム活性 (unit/ml)		白血球食食能		
				原血漿	10倍希釈	食食率(%)	食食指数	
								(平均値±標準偏差)
第1回目測定	採血直後	6.5±1.0	0.047±0.011	0.019±0.040	-5.1±47.8	40.3±138.3 ^a	31.2±17.0 ^a	2.3±0.3 ^a
	3時間後	6.6±0.6	0.049±0.007	0.008±0.014	27.9±50.3	493.0±420.7 ^b	26.9±18.7 ^a	2.7±0.8 ^a
	6時間後	6.5±0.7	0.049±0.007	0.014±0.035	-2.1±31.4	-150.3±220.8 ^c	24.7±19.6 ^a	1.9±0.5 ^b
	24時間後	6.2±0.7	0.056±0.008	0.007±0.010	0.9±18.5	-19.9±309.0 ^d	2.2±3.7 ^b	2.2±0.3 ^a
第2回目測定	採血直後	6.9±0.7	0.039±0.006	0.000±0.006	16.9±30.8 ^a	343.4±257.8 ^a	14.7±9.3	2.2±1.1
	3時間後	6.9±0.7	0.043±0.006	-0.004±0.003	46.3±48.7 ^b	353.4±195.4 ^a	14.8±10.2	2.5±1.3
	6時間後	6.9±0.7	0.042±0.006	0.002±0.010	-4.1±25.6 ^a	124.0±123.2 ^b	16.2±10.7	3.3±1.7
	24時間後	6.7±1.2	0.043±0.0016	0.006±0.026	63.8±35.6 ^a	792.3±362.9 ^a	6.7±10.0	2.6±1.5

異符号間に有意差あり (p<0.05)

表2 様々な飼育状況によるバイオディフェンス機能の変動

	総タンパク	尿素窒素	グルコース	総コレステロール	リン脂質	トリグリセリド ^a	アルカリ性 フォスファターゼ ^b
エドワジエラ症人為感染	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
白点病自然感染	低	(検出限界未満)	高	低	低	低	(検出限界未満)
銅イオン曝露	—	—	高	低	低	—	低
エドワジエラ症自然感染	—	高	低	低	低	高	(検出限界未満)
イリドウイルス病人為感染	低	高	高	低	低	低	—

NT：測定せず、—：対照魚と差なし
高：対照魚より高い、低：対照魚より低い
(囲い文字の高と低は有意差 (p<0.05) あり)

表3 様々な飼育状況による血漿化学成分の変動

	Hb濃度	NB T還元能	ポテンシャル	リゾチーム活性		白血球食食能	
			キリング活性	原血漿	10倍希釈	食食率	食食指数
エドワジエラ症人為感染	NT	—	高	高	NT	高	—
白点病自然感染	低	高	—	—	高	高	—
銅イオン曝露	低	低	—	低	—	低	低
エドワジエラ症自然感染	低	低	高	—	—	低	高
イリドウイルス病人為感染	低	—	高	高	高	低	高

NT：測定せず、—：対照魚と差なし
高：対照魚より高い、低：対照魚より低い
(囲い文字の高と低は有意差 (p<0.05) あり)