

淡水養魚場におけるギンザケのリゾチーム活性について

山内 洋幸*

Lysozyme activity of Juvenile Coho Salmon in Freshwater Farm

Hiroyuki YAMAUCHI*

キーワード：ギンザケ, 生体防御機能, ヘマトクリット値, リゾチーム

魚類は体内への病原体の侵入に対して生体防御機能を備えている¹⁾。このうち、免疫応答の始まる前に不特定多数の病原体に対して防御を行う非特異的生体防御機能は魚類の健康状態（感染症の罹患の有無）を表す指標と考えられている^{1,2)}。近年、非特異的生体防御機能を簡便に測定する手法「ポンドサイドキットマニュアル」が開発され³⁾、ヒラメ²⁾、ブリ^{4,5)}、マダイ^{2,6)}で養魚場現場における測定事例がある。

宮城県の主要な魚類養殖業であるギンザケ養殖業では、特に海面養殖用種苗を生産している淡水養魚場で、赤血球封入体症候群（Erythrocytic Inclusion Body Syndrome：EIBS）などの魚病被害が問題になっている。ギンザケの健康状態を常時把握し魚病被害を軽減するため、また、海面養殖用に健全な種苗を供給するため、淡水養魚場現場におけるギンザケ生体防御機能の測定と実態把握が必要となっている。そこで本報告では、「ポンドサイドキットマニュアル」の中から、多数のサンプルを簡便に測定できる血漿リゾチーム活性を選択し、定期的に測定することによって、淡水養魚場における飼育魚の健康状態を把握するとともに養魚管理への応用を検討した。

材料と方法

A 養魚場における生体防御機能モニタリング

ギンザケ種苗を生産しているA養魚場で、2000年7月7日から11月1日まで、週1回（7～8月）、または

隔週1回（9月以降）の頻度で、ギンザケの血漿リゾチーム活性を測定した。2001年は6月28日から10月23日まで、ほぼ週1回の頻度で測定した。

また、貧血は魚類感染症の病変の一つとして多くの報告があり、しばしばEIBSの病態の進行度を示す指標として利用されることから⁷⁾、血漿リゾチーム活性と同時にヘマトクリット値（Ht値）を測定した。

水温および溶存酸素量の測定

ギンザケをサンプリングした養魚池の水温および溶存酸素量（DO）を測定した。水温は、防水センサーを装着した温度データロガー（おんどとり,T&D）を養魚池に設置し、1時間おきに測定して1日の平均値を求めた。溶存酸素量は、養魚池の注水部と排水部において水質チェッカー（WQC-20A,TOA）を用いて測定した。

ギンザケおよび血液・血漿のサンプリング

特定の養魚池（7～8万尾収容）から、ギンザケを毎回20個体ずつサンプリングした。ギンザケの尾柄部を解剖鋏で切断し、血液をヘパリン処理済みプラスチック毛細管（ヘマトロンL,萱垣）に集めた。これをヘマトクリット用遠心機（KH-120M,KUBOTA）で12,000rpm・5分間遠心分離し、Ht値を測定した。血漿はHt値測定後の毛細管から血漿部分をカッターで切り出し、マイクロピペットで吸い取って採取した。同時に、切断したギンザケの尾柄部から血液をスライ

ドグラスに塗沫し、実験室に持ち帰った後に高橋ら(1992)の方法で Pinacyanol chloride 染色を行い⁸⁾、赤紫色に染まる赤血球細胞質中の封入体を観察して EIBS 感染を診断した。魚体は実験室に持ち帰った後に体重を測定した。さらに腎臓をサンプルとして、BHI 寒天培地・改変 CY 寒天培地を用いた細菌検査および、RTG-2 細胞によるウイルス検査を実施して、魚病細菌と伝染性腭臓壊死症 (IPN)・伝染性造血器壊死症 (IHN) の感染状況を調査した。

リゾチーム (*Micrococcus lysodeikticus* 溶菌) 活性の測定

概ね改良ポンドサイドキットマニュアル (平成 9 年度版)³⁾に従って測定した。その方法は、32mM KH_2PO_4 と 32mM K_2HPO_4 を混和し pH6.5 に調製した LY 緩衝液を 96 穴マイクロプレートに 60 μL ずつ分注し、これにサンプル血漿 (ブランクは LY 緩衝液) 5 μL を加えた後、*Micrococcus lysodeikticus* (M-3770, SIGMA) 浮遊液 (濃度 3mg/mL LY 緩衝液) を添加しインキュベーター、マイクロプレートリーダー (NJ-2300, 日本インターメッド) で 0 分から 60 分まで 15 分ごと 540nm の吸光度を測定するというものである。ただし、マニュアルと異なりインキュベーター温度は 37°C で、測定結果は下記の式 (※) で計算したインキュベーター開始 30 分後の溶菌率で評価した。

(※) 溶菌率 37°C・30min (%)

$$= \{(\text{OD}_{0\text{m}} - \text{OD}_{30\text{m}}) \div \text{OD}_{0\text{m}}\} \times 100$$

- (ブランクの溶菌率)

($\text{OD}_{0\text{m}}$ は 0 分の吸光度、 $\text{OD}_{30\text{m}}$ は 30 分後の吸光度)

結 果

1 A 養魚場の水温・溶存酸素量とギンザケの成長

(1) 2000 年

2000 年の A 養魚場における水温と排水部の溶存酸素量 (DO) を図 1 に示した。モニタリングを開始した 7 月 7 日から 9 月 26 日まで 15°C を超える水温で推移した。その後、水温は上下動しながら低下したが、9 月 27 日以降には 15°C を上回ることがなかった。DO は養魚池注水部および排水部で常に 6mg/L 以上であった。

ギンザケの体重はモニタリングを開始した 7 月 7

日には平均 14 g であったが、海面に出荷する 11 月には平均 144g へと成長した (図 2)。

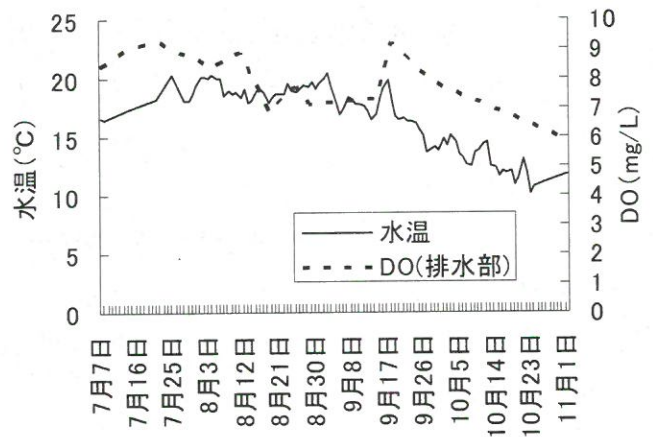


図 1 A 養魚場における水温と DO (排水部) の推移 (2000 年)

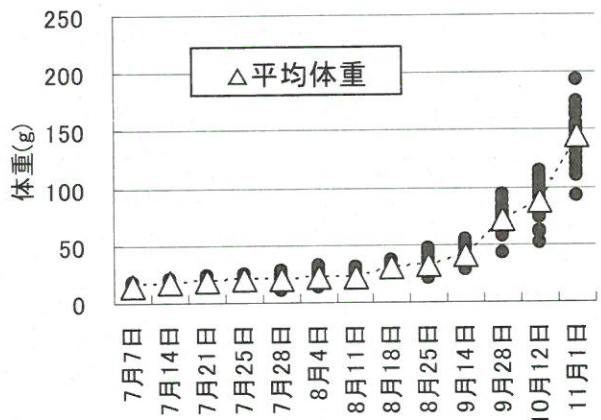


図 2 A 養魚場におけるギンザケ体重の推移 (2000 年)

(2) 2001 年

2001 年の A 養魚場における水温と排水部の DO を図 3 に示した。モニタリングを開始した 6 月 28 日から 9 月 6 日まで 15°C を超える水温で推移した。その後、上下動しながら低下し 9 月 21 日以降は概ね 15°C を下回る水温で推移した。DO は養魚池注水部で常に 6mg/L 以上であった。排水部では渇水期の 7 月から 8 月にかけて 6mg/L を下回ることがあったが、9 月以降は 6mg/L を上回った。

ギンザケの体重はモニタリングを開始した 6 月 28 日には平均 19 g であったが、海面に出荷する 11 月には平均 150g へと成長した (図 4)。途中、不調時の給餌制限による成長停滞があった (9 月 4 日~18 日)。

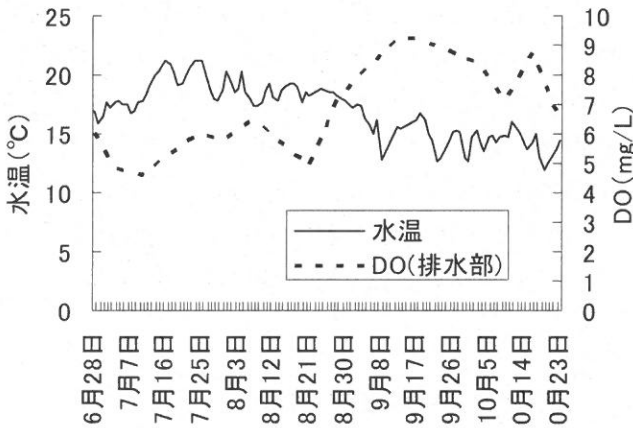


図 3 A 養魚場における水温と DO (排水部) の推移 (2001 年)

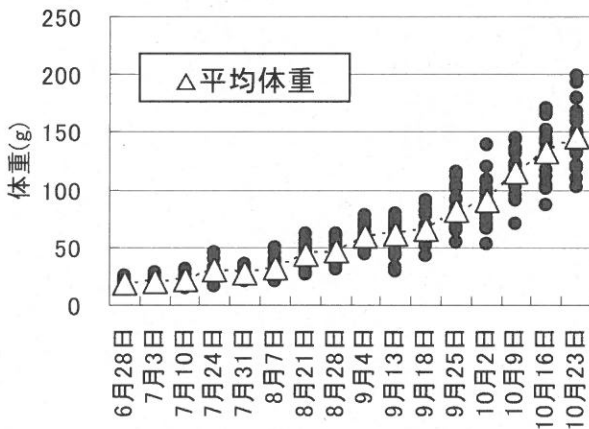


図 4 A 養魚場におけるギンザケ体重の推移 (2001 年)

2 ヘマトクリット値の推移と魚病診断結果

(1) 2000 年

モニタリング期間中、ヘマトクリット値 (Ht 値) は平均値 28.2~34.1%で推移した (図 5)。期間中、7 月 7 日を除いて常に Ht 値が 29%未満の個体が出現した。

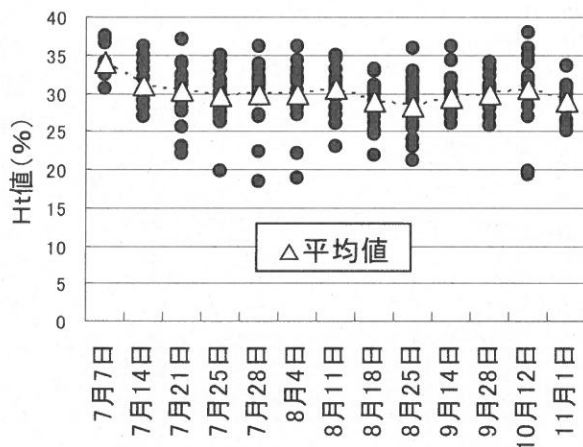


図 5 ヘマトクリット値の推移 (2000 年)

モニタリング期間中、赤血球細胞質中に封入体は検出されなかった。また、サンプル魚の腎臓から魚病細菌・IPN ウイルス・IHN ウイルスは検出されなかった。しかし、7 月 24 日から 8 月 8 日までへい死が見られ、特に 8 月 1 日から 8 月 4 日は 1500 個体/日以上へのい死があった (図 6)。

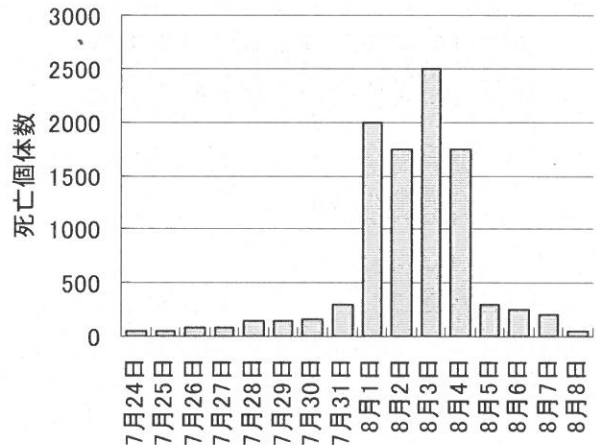


図 6 へい死個体数の推移 (2000 年)

(2) 2001 年

モニタリングを開始した 6 月 28 日から 7 月 10 日まで、Ht 値は平均値 35%以上で推移した (図 7)。7 月 23 日以降、徐々に Ht 値 29%未満の個体が出現し、平均値も徐々に低下した。9 月 10 日から 12 日にかけて台風 15 号の通過に伴う降雨で養魚場内に濁水が流入した後、Ht 値は急激に低下し、9 月 18 日には Ht 平均値が 21.5%まで低下し、モニタリング期間最低値を示した。

Ht 平均値が最低となった 9 月 18 日には、20 個体中 4 個体の赤血球細胞質中に封入体を確認した。封入体を確認された個体は Ht 値が 20.9~26.8%であった。また、20 個体中 7 個体で EIBS に特徴的な症状である肝臓の黄土色化を確認した。以上より、A 養魚場のギンザケは EIBS に感染しているものと判断された。

9 月 18 日以降は、9 月 25 日に Ht 値が 15%を下回る個体が見られたものの、Ht 平均値は回復し始めた。10 月 2 日以降は全個体で Ht 値が 25%以上に回復し、10 月 16 日以降は全個体が 29%以上に回復した。

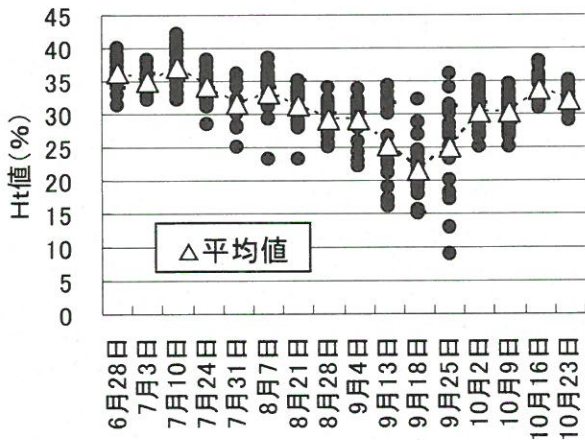


図7 ヘマトクリット値の推移
(2001年)

モニタリング期間中、サンプル魚の腎臓から魚病細菌・IPN ウイルス・IHN ウイルスは検出されなかった。また、ほとんどへい死はなかった。

3 リゾチーム (*Micrococcus lysodeikticus* 溶菌) 活性

(1) 2000年

リゾチーム (*Micrococcus lysodeikticus* 溶菌) 活性は、モニタリングを開始した7月7日、および8月4日、9月14日に溶菌率が50%以上の値を示した。低下時は20%台の値であった(図8)。

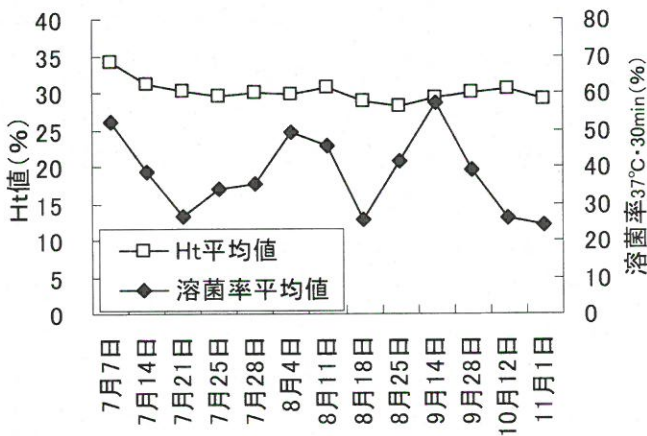


図8 ヘマトクリット値とリゾチーム活性の推移
(2000年)

へい死前の7月14日と、1500個体/日を超えるへい死のあった8月4日、へい死回復後の8月18日に注目し、全個体のHt値と溶菌率の分布を調べた(図9)。7月14日にはHt値29%未満の個体が15個体中3個体出現した。リゾチーム活性も溶菌率50%を超える個体が15個体中2個体見られ、15個体中5個体が40%

台であった。その後、8月1日から8月4日に1500個体/日を超えるへい死があったが、8月4日時点で20個体中6個体がHt値29%未満で、そのうち1個体はHt値18.9%まで低下していた。リゾチーム活性も20個体中8個体で溶菌率50%を超えていた。その後、8月18日にはHt値29%未満の個体が9個体観察されたものの、リゾチーム活性は全個体が溶菌率40%を下回った。

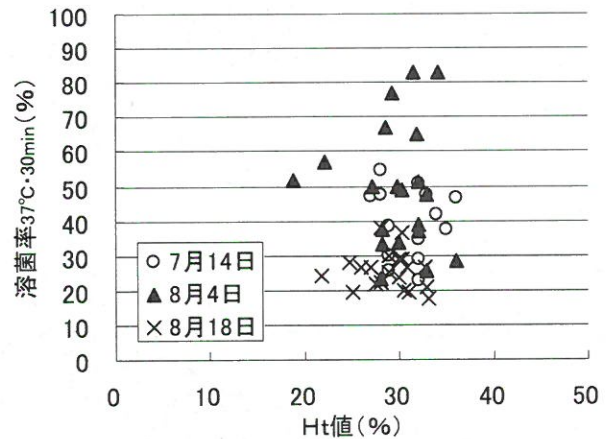


図9 Ht値とリゾチーム活性の分布
(2000年)

(2) 2001年

リゾチーム活性は、モニタリングを開始した6月28日から7月3日まで、溶菌率23%で推移した(図10)。7月10日から溶菌率40%台に上昇した。8月に入ると溶菌率は50%を超え、台風15号に伴う濁水流入後の9月13日には、溶菌率が75%まで上昇し、モニタリング期間中の最高値を示した。その後、Ht平均値が最低であった9月18日には、溶菌率は低下を始め、9月25日以降は50%を下回り、10月2日以降は40%を下回って推移した。

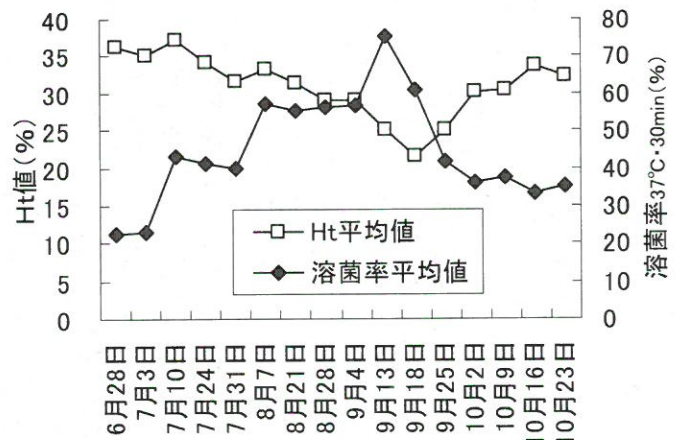


図10 ヘマトクリット値とリゾチーム活性の推移
(2001年)

モニタリングを開始した6月28日と、Ht 平均値最低の9月18日、Ht 値回復後の10月23日に注目し、全個体の Ht 値と溶菌率の分布を調べた (図 11)。全個体で Ht 値が 30%以上であったモニタリング開始時には、全個体の溶菌率が 40%未満に分布していたが、Ht 平均値が最低となった9月18日には、20 個体中 13 個体が溶菌率 60%以上に分布した。9月18日には溶菌率平均値は低下が始まっており、他の7 個体は溶菌率 50%以下であった。その後、全個体で Ht 値が 29%以上に回復した10月23日には、ほとんどの個体 (20 個体中 17 個体) で溶菌率が 50%以下に低下し、モニタリング開始時に戻った。

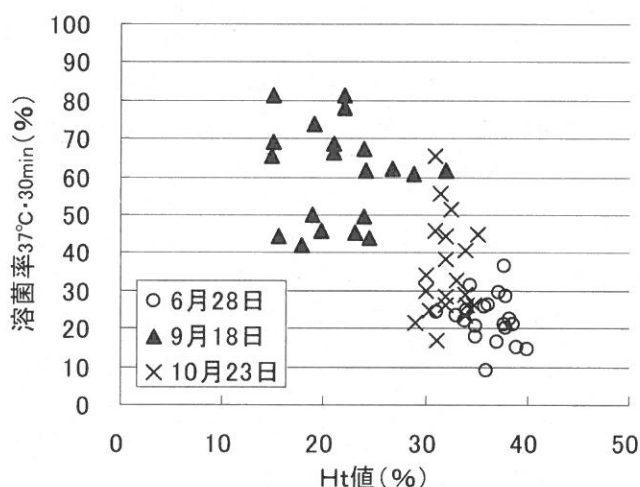


図 11 Ht 値とリゾチーム活性の分布 (2001 年)

考 察

1 A 養魚場における生体防御機能モニタリング

(1) モニタリング期間中の水温条件

EIBS が発症したギンザケは 10℃から 16℃への昇温飼育によりへい死抑制効果が認められ、免疫を獲得することが報告されている⁹⁾。本報告の 2000 年および 2001 年のモニタリング期間中、水温はほとんどの期間で 15℃を超えており、EIBS によるへい死が抑制され、免疫獲得が期待できる環境下にあったと考えられる。2000 年は EIBS と診断されず、7 月末から 8 月初めのへい死原因は特定できなかった。一方、2001 年 9 月は EIBS と診断されたが、へい死はほとんどなかった。

(2) 溶存酸素量とヘマトクリット値

2001 年のモニタリング開始直後から 9 月まで、排水部の DO は 6.0mg/L を下回っていた。水産用水基準ではサケ科魚類の基準値として、DO を 7mg/L 以上としている¹⁰⁾。渇水期の水量不足に伴う DO 不足が考えられた。ニジマスでは環境水の酸素欠乏に伴って Ht 値が上昇すると報告されている^{11,12)}。星合 (1992) が行ったギンザケのミズカビ感染実験から¹³⁾、ギンザケの正常時における Ht 値は 32.3~34.0%程度と考えられる。これと比較すると、モニタリングを開始した 6 月 28 日から 7 月 10 日まで、Ht 平均値が 35%以上で推移し、40%を超える個体も出現したことから、DO 不足の影響があったと考えられた。

2000 年はモニタリング期間中、排水部の DO が 6.0mg/L 以上であり、DO 不足の影響は考えられなかった。一部の個体は 35%以上の値を示したが、Ht 値 40%を超える個体は出現しなかった。

(3) ヘマトクリット値とリゾチーム活性

2001 年は DO 不足によって高い Ht 値を示す状況であったにも関わらず、7 月 23 日以降、徐々に Ht 値 29%未満の個体が出現し、Ht 平均値も徐々に低下した。何らかの原因による貧血症状と考えられた。Ht 値が徐々に低下すると同時に、リゾチーム活性は上昇した。一般にリゾチームはグラム陽性菌のペプチドグリカン層を加水分解して破壊する抗菌性酵素として知られているが、魚類のリゾチームはグラム陽性菌のみならず、グラム陰性菌に対しても抗菌性を示し¹⁴⁾、細菌感染時は著しく上昇する¹⁵⁾。9 月 18 日には EIBS の封入体が確認された。このリゾチーム活性の上昇が EIBS ウイルスの感染に対して防御機能を果たしているかは不明である。EIBS は *Flavobacterium psychrophilum* による冷水病や水カビ病を併発することが報告されており^{16,17)}、EIBS ウイルスに対してではなく、二次的な感染に対してリゾチーム活性が上昇した可能性が考えられる。

2000 年は Ht 値 29%以下の貧血症状を示す個体が一部あり、Ht 平均値は 28.2~34.1%で推移した。リゾチーム活性は 7 月 7 日、および 8 月 4 日と 9 月 14 日をピークに変動した。何らかの感染症が疑われたが、原因を特定できなかった。しかし、8 月 1~4 日には 1500 個体/日以上へのへい死が見られ、魚体に何らかの傷害があったものと考えられた。

2 生体防御機能モニタリングの有効性と基準値

本報告では養魚場現場における測定しやすさを重視し、生体防御機能のうち、体液性の血漿リゾチーム活性を測定した。本報告の結果から、ギンザケは Ht 値と合わせてリゾチーム活性のモニタリングが健康状態の把握に有効であると考えられた。この 2 つはギンザケの尾柄部を切断し、少量の血液を毛細管に取るだけで測定可能であり、魚体の比較的小さい淡水養魚場の種苗生産現場でも十分に利用可能であった。また、本報告のように毎回 20 個体ずつサンプリングし、平均値と個体別のデータを得ることにより、養魚池内のギンザケ集団の状況が概ね推測できるものと考えられた。

生体防御機能モニタリングを実施するに当たっては、健康状態を判断するための基準値が必要となる。こうした基準値は測定事例を蓄積し、統計的な処理によって設定すべきものであるが、測定事例を蓄積する際の参考とするため、本報告の測定事例から暫定的に基準

値を設定した (表 1)。

Ht 値は 35%超を DO 不足の基準とし、また 29%未満を貧血症状の基準とし、EIBS を警戒・監視すれば、昇温治療¹⁹⁾等への対応により本病の被害を最小限にとどめられると考えられる。なお、貧血の程度については、高橋ら (1998) に従い¹⁸⁾、Ht 値 15~25%を中程度、10%以下を極度とした。

リゾチーム活性は溶菌率 40%超で要注意、50%超で何らかの感染症が疑われるという基準で、感染状況を把握できると考えた。

ギンザケで発生している魚病に対しては、EIBS については昇温治療、給餌制限による成長調節といった対策が報告されている^{18,20)}。また、細菌性の魚病については環境の改善や薬剤投与による化学療法が概ね有効である²¹⁾。生体防御機能の監視とともに、早期に適切な治療方法を組み合わせれば、魚病被害を軽減できるものと考えられる。

表 1 本報告で得られた生体防御機能の基準値

症状 指標 値	ヘマトクリット値	低			標準値	高	
		<10%	15~25%	<29%	29~35%	35%<	40%<
	【注意事項】	貧血・EIBS感染 (極度)	貧血・EIBS感染 (中程度)	要警戒		要警戒	DO不足
生体 防御 機能	リゾチーム活性				<40%	40%<	50%<
	【注意事項】					要警戒	感染症

※リゾチーム活性は溶菌率(37°C・30min)

要 約

- 1) 淡水養魚場のギンザケは Ht 値と合わせてリゾチーム活性のモニタリングが健康状態の把握に有効であると考えられた。
- 2) Ht 値とリゾチーム活性は、ギンザケの尾柄部を切断し、少量の血液を毛細管に取るだけで測定可能であり、魚体の比較的小さい淡水養魚場の種苗生産現場でも十分に利用可能であった。
- 3) 生体防御機能のモニタリングと適切な治療方法を組み合わせれば、魚病被害を軽減できるものと考えられた。

謝 辞

本報告を校閲していただいた内水面水産試験場熊谷明博士に御礼申し上げます。また、モニタリングおよ

び執筆の際、お世話になりました内水面水産試験場および水産研究開発センター職員の方々に御礼申し上げます。

本報告では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 (水産庁・日本水産資源保護協会委託) で開発された技術を使用しました。関係各位に謝意を表します。生体防御機能モニタリングは免疫応用健苗確保技術開発事業 (県単独事業) で実施しました。両事業を通じて技術指導をいただいた福山大学・河原栄二郎博士に御礼申し上げます。

最後に生体防御機能モニタリングの実施を快諾していただき、多大な御協力をいただいた A 養魚場の皆様に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 飯田貴次 (1996) 魚類の生体防御. 魚病学概論, 9-20, 恒星社厚生閣, 177PP
- 2) 竹内照文・服部未夏 (2000) 養殖マダイとヒラメの非特異的生体防御能について. 和歌山農林水技セ研報, 1, 1-8
- 3) 日本水産資源保護協会 (1998) 改良ポンドサイドキットマニュアル (平成 9 年度版). 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, 3-12, 日本水産資源保護協会, 140PP.
- 4) 福田穰・古川英一 (2001) 養殖ブリの生体防御機能と養殖環境の影響に関する研究. 平成 12 年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 188-194, 日本水産資源保護協会, 223PP
- 5) 川上秀昌 (2001) 養殖ブリの生体防御機能と養殖環境の影響に関する研究. 平成 12 年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 195-204, 日本水産資源保護協会, 223PP
- 6) 田中真二・井上美佐 (2001) 養殖マダイの生体防御機能と飼育条件の関連に関する研究. 平成 12 年度魚病対策技術開発研究成果報告書, 205-212, 日本水産資源保護協会, 223PP
- 7) K.Takahashi, N.Okamoto, M.Maita, J.S.Rohovec and Y.Ikeda (1992) Progression of Erythrocytic Inclusion Body Syndrome in Artificially Infected Coho Salmon. *Gyoby Kenkyu(Fish Pathol.)*, 27, 89-95
- 8) K.Takahashi, N.Okamoto, A.Kumagai, M.Maita, Y.Ikeda and J.S.Rohovec (1992) Epizootics of erythrocytic inclusion body syndrome in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, cultured sea water in Japan. *J.Aquat.Anim.Health*, 4, 174-181
- 9) N.Okamoto, K.Takahashi, A.Kumagai, M.Maita, J.S.Rohovec and Y.Ikeda (1992) Erythrocytic Inclusion Body Syndrome: Resistance to Reinfection. *Gyoby Kenkyu(Fish Pathol.)*, 27, 213-216
- 10) 日本水産資源保護協会 (2000) 基準値. 水産用水基準 (2000 年版), 3-10, 日本水産資源保護協会, 96PP
- 11) G.F.Holeton and D.J.Randall (1967) The effect of hypoxia upon the partial pressure of gases in the blood and water afferent and efferent to the gills of rainbow trout. *J.Exp.Biol.*, 46, 317-327
- 12) 舞田正志・吉安友二・岡本信明・池田彌生 (1997) 低酸素環境下での長期飼育がニジマスの血液成分に及ぼす影響. 日水誌, 63, 992-993
- 13) 星合愿一 (1992) 養殖ギンザケの水カビ病に関する研究. 宮城内水試研報告, 1, 1-117
- 14) B.Grinde (1989) Lysozyme from rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, as an antibacterial agent against fish pathogens. *J.Fish Dis.*, 12, 95-104
- 15) 矢野友紀 (1998) 魚類の生体防御機構. 月刊海洋 総特集魚類防疫-魚病と人間の関わり-, 号外 No.14, 124-130, 海洋出版株式会社, 216PP
- 16) S.C.Piacentini, J.S.Rohovec and J.L.Fryer (1989) Epizootiology of Erythrocytic Inclusion Body Syndrome. *J.Aquat.Anim.Health.*, 1, 173-179
- 17) 岡本信明・高橋清孝・熊谷明・柴崎弘之・舞田正志・田中真・J.S.Rohovec・池田彌生 (1992) 本邦淡水養殖ギンザケにおける EIBS の発生. *Gyoby Kenkyu(Fish Pathol.)*, 27, 207-212
- 18) 高橋清孝・熊谷明・福田穎穂・岡本信明 (1998) 海面養殖ギンザケの疾病. 月刊海洋 総特集魚類防疫-魚病と人間の関わり-, 号外 No.14, 51-57, 海洋出版株式会社, 216PP
- 19) 田中真・岡本信明・鈴木基生・五十嵐保正・高橋清孝・J.S.Rohovec (1994) EIBS 自然発病淡水飼育ギンザケの昇温飼育 (16°C) による治療試験. *Fish Pathol.*, 29, 91-94
- 20) K. Takahashi, N. Okamoto, A. Kumagai, M. Maita, J. S. Rohovec and Y. Ikeda (1994) Relationship between fish growth rate and progression of artificially induced erythrocytic inclusion body syndrome in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). *J.Fish.Dis.*, 17, 77-83
- 21) 若林久嗣 (1996) サケ科魚類および淡水魚の細菌病. 魚病学概論, 51-58, 恒星社厚生閣, 177PP

