

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業（平成 22 年度／国庫委託）

「養魚環境における免疫低下時期および要因の解析試験」

横塚 哲也・石川 孝典

目 的

マス類養殖において魚病が発生しやすい時期を特定するため、養殖過程において生体防御能が低下する時期を調査した。養殖生産現場で魚病発生予防策を効果的に実施するためには、飼育魚の魚病発生リスクを把握しておくことが重要である。生体防御能の低下は魚病発生リスクを高めるが、養殖生産の各過程で生体防御能がどのように変化するのかについて十分な知見はない。そこで養殖過程において頻繁に発生する「魚を網で揚げる作業（網揚げ空中曝露ストレス）」がニジマスの生体防御能に及ぼす影響を調査した。試験 1 では網揚げ空中曝露ストレスが血清成分および頭腎における免疫関連遺伝子の発現量に与える影響を、試験 2 では表皮組織における免疫関連遺伝子の発現量に与える影響を調査した。

材料および方法

供試魚 試験には病歴のないニジマス当歳魚を用いた。

ストレスサー 目合い 3.8mm の網を用いて、3 分間の網揚げ空中曝露を行った。

試験区 試験 1, 試験 2 ともに網揚げ空中曝露ストレスを与えた空中曝露区と無処置の対照区を設けた。

飼育条件および測定項目 各試験における飼育条件等を表 1 に示した。給餌は日清丸紅飼料株式会社製のマス用配合飼料を飽食に至るまで与えた。

表 1 各試験における飼育条件等

	試験 1	試験 2
魚体重(g)	12.0	70.8
飼育尾数(尾)	100	50
水量(L)	250	250
水温(°C)	17.8-18.2	15.0-15.4
換水率(回/日)	30	48
餌	スーパー稚魚 2	鱒育成用 P-4
測定項目	GLU, TCHO, IL-1 β , IgM, sIgM, TCR	CXC, Ictacalcin

サンプリング 試験 1 ではストレス曝露前、曝露 12, 24, 72 および 168 時間後に各区 5 尾ずつをサンプリングした。試験 2 については上記に加え、ストレス曝露 3 および 6 時間後にもサンプリングを実施した。試験 1 では供試魚を取り上げ、FA-100 を用いて麻酔をした後、

注射器を用いて尾柄部から採血し、血清を得た。採血後は直ちに開腹して頭腎を採取し、RNAlater に保存した。試験 2 では試験 1 と同様に供試魚に麻酔をした後、スライドガラスで体表をかき取るようにして表皮組織を採取し、RNAlater に保存した。それぞれの試験において採取したサンプルは測定時まで-80°C で保存した。

血清成分 グルコース量 (GLU) および総コレステロール量 (TCHO) をドライケム 5500 (富士フィルム) を用いて測定した。

遺伝子発現量 RNAlater に保存した組織から市販の RNA 抽出キット (FastPure RNA Kit™: TaKaRa 社製) を用いて Total RNA を抽出した。その後 RT-PCR 法によって試験 1 については Interleukine-1 β (IL-1 β), Immunoglobulin M (IgM), Secretory Immunoglobulin M (sIgM) および T-cell receptor (TCR) の遺伝子発現量を測定した。試験 2 については Chemokine type CXC (CXC) および Ictacalcin の遺伝子発現量を測定した。

解析方法 対照区と空中曝露区の値を比較し Mann-Whitney U 検定により検討した。この検定において P<0.05 を有意な差とみなした。

結果および考察

血清成分および遺伝子発現量の変動を図 1 に示した。

試験 1 血清成分 GLU については各区に差は見られなかった。TCHO については空中曝露により低下する傾向を示し、72 時間後に有意に低下した。Maita *et al.*¹⁾ はニジマスにおいてビブリオ病を対象に抗病性と血漿化学成分の関連について調べたところ、抵抗力の弱い魚では TCHO が低かったことから、TCHO の低下は抗病性低下の指標になりうると報告している。本試験では網揚げ空中曝露後に TCHO が有意に低下しており、空中曝露により細菌病に対する抗病性が低下した可能性が考えられた。

試験 1 遺伝子発現量 IL-1 β については空中曝露 12 時間後に有意に上昇した。IgM についても IL-1 β と同様に 12 時間後に有意に上昇した。sIgM については IgM と同様の変動傾向が見られたが、有意差は認められなかった。TCR については 12 時間後に有意に上昇したのうち、72 時間後に有意に低下した。空中曝露 12 時間後における各遺伝子発現量の上昇は、炎症性サイトカインである IL-1 β の発現量が増加していることから、網揚げ

空中曝露に起因する炎症反応によるものと考えられた。炎症反応の結果、抗体である IgM や T 細胞受容体である TCR の発現量も上昇したのと考えられた。また、72 時間後における TCR の発現量の低下は、頭腎において T 細胞数が減少したことを示すものと推察された。

試験 2 遺伝子発現量 CXC の発現量は空中曝露 6 時間後に有意に上昇した。CXC は炎症性サイトカインとして知られており、その発現量の上昇から、網揚げ空中曝露に起因する炎症反応が生じたものと推察された。Ictacalcin については空中曝露 3, 6 および 168 時間後に有意に上昇した。Ictacalcin はカルシウム結合タンパク質で抗菌活性を示す因子として知られているが、その機能について調べた知見は少ない。本事業の共同研究機関である日本大学では、アスコルビン酸を投与したニジマスにおいて表皮組織の CXC は低下、Ictacalcin は上昇することを明らかにした。また、当場ではアスコルビン酸を投与したニジマスにおいてビブリオ病や β 溶血性レンサ球菌症に対する抗病性が向上することを確認しており、²⁾ CXC, Ictacalcin が抗病性に関与している可能性も考えられる。今回の試験では網揚げ空中曝露ストレスを与えることにより Ictacalcin が上昇した。魚がストレスを受けた結果として生体防御能が上昇する事例も報告されており、今後さらにストレスと生体防御能や抗病性との関連性について明らかにしていく必要がある。

以上の結果から、網揚げ空中曝露ストレスはニジマスの生体防御能に影響を与え、魚病発生リスクを高める可能性があると考えられた。網揚げ空中曝露は選別や分養、活魚輸送など養魚場で行われる様々な作業において発生するため、それらの作業を行う際には事前に免疫賦活剤等を利用して生体防御能の低下を防ぐことが望ましい。

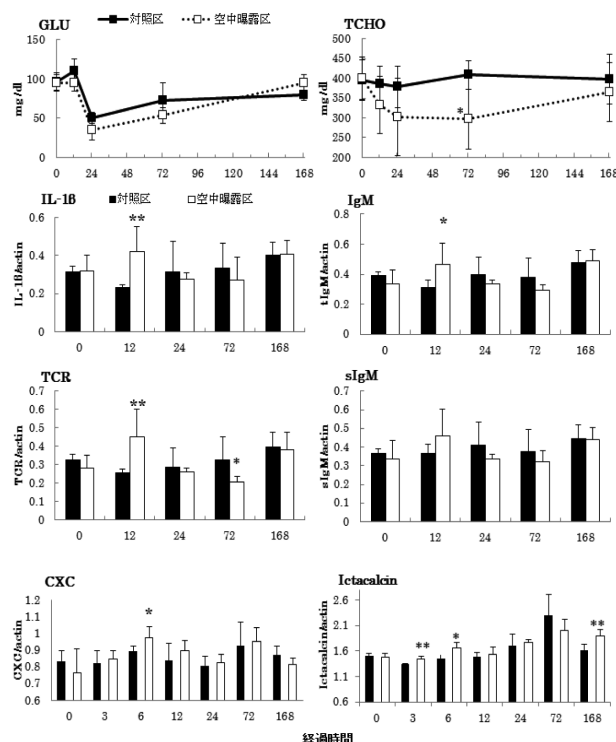


図1 血清成分および遺伝子発現量の変動

参考文献

- 1) Maita M, Satou K, Fukuda Y, Lee H, Winton JR, Okamoto N. Correlation between component levels of cultured fish and resistance to bacterial infection. *Fish Pathol.* 1998; 33: 129-133.
- 2) 石川孝典, 横塚哲也. 新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業. 栃木県水産試験場研究報告 2010; 54: 41-42.

(水産技術部)