

魚類養殖試験

羽生和弘・宮本敦史

目的

近年、マダイ養殖では、細菌性疾病のエドワジエラ症による被害が増加傾向にある。本事業では、本症の予防に有効な物質を探索するとともに、本症の発生状況を調査し、飼育方法の改善を図る。

方法

1. ミモザ抽出物によるエドワジエラ症の予防

マメ科植物ミモザの樹皮抽出物は、安価でありながら多量のポリフェノールを含み、強い抗酸化作用を示すため、魚のストレス軽減や疾病予防に役立つ可能性がある。そこで本事業では、ミモザ抽出物をマダイに投与し、マダイの食細胞殺菌能を向上させることにより、エドワジエラ症の予防が可能か検討した。

1) ポテンシャルキリング活性

試験区は、ミモザ抽出物を配合していないモイストペレット (MP) を投与する対照区と、餌重量に対し外割で 0.33% または 0.67% 配合した MP を投与する試験区 2 区の計 3 区とした。各区には、マダイ (平均体重 67g) を 5 尾ずつ収容した容量 100L のアクリル製水槽 1 槽を割り当て、4 週間毎日 1 回、体重の 4% を目安に各区等量給餌した。各水槽には、砂ろ過海水を 1 時間当たり 100L 注水し、適量の通気を施した。また、水温は 25°C に維持した。給餌最終日の翌日、全供試魚から採血し、「改良ポンドサイドキット」マニュアル (平成 9 年度版) に従い、ポテンシャルキリング活性を測定した。

2) 体内侵入菌量

試験区は、1) と同様に設定した。各区には、マダイ (平均体重 55g) を 10 尾ずつ収容した容量 100L のアクリル製水槽 1 槽を割り当て、1) と同様に飼育した。最終給餌の 1.5 時間後、*Edwardsiella tarda* MEE0309 株の菌液 (10^7 CFU/mL) で供試魚を 1.5 時間浸漬攻撃し、水槽に再収容した。攻撃の 24 時間後、血液と腎臓を採取して、直ちにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で適宜希釈し、トリプトソイ寒天培地 (TSA) に塗抹した。25°C 48 時間の培養条件で増殖した TSA 上のコロニーを計数し、血液は 1mL 当たりの、腎臓は 1g 当たりの菌量に換算した。

3) 死亡率

試験区は、ミモザ抽出物を配合していないモイストペレット (MP) を投与する対照区と、餌重量に対し外割で 0.33% 配合した MP を投与する試験区の計 2 区とした。

各区には、マダイ (平均体重 79g) を 18 尾ずつ収容した容量 500L のアクリル製水槽 1 槽を割り当て、1) と同様に飼育した。最終給餌の 1.5 時間後、2) と同様に浸漬攻撃し、その後 4 週間、累積死亡率を観察した。

2. 発生状況調査および室内試験

1) マダイ 1 歳魚のエドワジエラ症による死亡率

0 歳時 (2011 年 2 月) に保菌率 (腎臓における *E. tarda* 陽性率) を調査したマダイ 1 歳魚 (13 群) について、今年度のエドワジエラ症による累積死亡率を 2012 年 2 月に漁業者から聞き取り、0 歳時保菌率と 1 歳時死亡率の関係を調査した。

2) 飼育条件がマダイに及ぼす影響

昨年度実施した保菌率調査において、0 歳魚の保菌率は、収容密度の高い群ほど高く、肥満度の小さい群で高い傾向が認められた。これを踏まえ、過給餌と高密度飼育がマダイ 0 歳魚の①死亡率、外観、血液、腸に及ぼす影響および②体内侵入菌量に及ぼす影響を、室内試験で確認した。

①死亡率、外観、血液、腸

試験区は、収容密度 2 条件 (低密度、高密度) と給餌頻度 2 条件 (高頻度、低頻度) の組み合わせで、計 4 区とし、各区には容量 150L のアクリル製水槽 1 槽を割り当てた。収容密度が低密度と高密度の水槽には、マダイ (平均体重 150g) をそれぞれ 6 尾と 18 尾収容し、給餌頻度が高頻度と低頻度のマダイには、それぞれ毎日 1 回と週 1 回、市販のドライペレットを飽食量給餌した。各水槽には、砂ろ過海水を 1 時間当たり 150L 注水し、適量の通気を施した。水温は 25°C に維持し、飼育期間は 4 週間とした。飼育期間中は累積死亡率を観察し、給餌最終日の翌日には、生残魚の外観症状として各区 6 尾の眼球異常率 (生残尾数のうち、突出、出血、欠損を呈した魚の合計尾数の割合) と尾びれ長率 (脊柱の末端から尾びれ末端までの長さ ÷ 尾又長 × 100%) を測定した。また、その魚から採血も行い、前述のマニュアルに従い、ヘマトクリット値、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元能、ポテンシャルキリング活性を測定した。さらに採血後、腸管を 10% 中性ホルマリンで固定した後、輪切りに薄切して HE 染色し、染色像の画像処理により、腸じゅう毛長、腸外周長および腸じゅう毛長率 (腸じゅう毛長 ÷ 腸管外周長 × 100%) を測定した。

②体内侵入菌量

試験区は①と同様に設定し、収容密度が低密度と高密度の水槽には、マダイ（平均体重 107g）をそれぞれ 8 尾と 24 尾収容した。飼育最終日の翌日、各区 8 尾については 1. 2) と同様に処理し、体内侵入菌量を測定した。浸漬攻撃とその後の再収容時の尾数は各区 8 尾に統一し、高密度の試験区の未処理の魚は、攻撃作業の直前、飼育水槽から除去した。

結果および考察

1. ミモザ抽出物によるエドワジエラ症の予防

1) ポテンシャルキリング活性

ポテンシャルキリング活性 (OD_{540nm}) は、対照区が 0.010、ミモザ抽出物 0.33% 区が 0.031、0.67% 区が 0.025 であった。0.33% 区と 0.67% 区の方が対照区より有意に高かった。

2) 体内侵入菌量

血中菌量は、対照区が 10^3 CFU/mL、0.33% 区が 10^{21} CFU/mL、0.67% 区が 10^3 CFU/mL であり、腎中菌量は、対照区が 10^7 CFU/g、0.33% 区が 10^5 CFU/g、0.67% 区が 10^6 CFU/g であった。血中菌量と腎中菌量はいずれも、対照区より 0.33% 区の方が有意に少なかった。

3) 死亡率

累積死亡率は、対照区が 94%、0.33% 区が 39% であり、0.33% 区の方が対照区より有意に低かった。

以上より、ミモザ抽出物には、マダイの食細胞殺菌能向上作用とエドワジエラ症の予防効果があると考えられた。

2. 発生状況調査および室内試験

1) マダイ 1 歳魚のエドワジエラ症による死亡率

昨年度調査した 3 漁場のうち、2 漁場では東日本大震災による津波や台風 12 号により、調査対象群で魚が大量死亡したため、本症による死亡率を推定することは困難であった。一方、残りの 1 漁場 (4 群) については、0 歳時保菌率と 1 歳時死亡率の間に高い正の相関が認められた ($r^2=1.00$)。

2) 飼育条件が魚に及ぼす影響

①死亡率、外観、血液、腸

死亡率は、高密度・低頻度区が 28%、それ以外の試験区が 0% であった。その他の項目は、死亡率が試験区間で大きく異なったため比較困難であったが、眼球異常率は、高密度や低頻度の試験区で高い傾向があり、尾びれ

長率は、高密度・低頻度区で低い傾向があった。また、ヘマトクリット値、NBT 還元能、ポテンシャルキリング活性は、低頻度の試験区で低い傾向があった。

②体内侵入菌量

血中菌量は、低密度・高頻度区が 10^{10} CFU/mL であり、それ以外の試験区が $10^{10} \sim 10^{20}$ CFU/mL であった。腎中菌量は、低密度・高頻度区が 10^5 CFU/g であり、それ以外の試験区が $10^6 \sim 10^6$ CFU/mL であった。低密度・高頻度区では、腎中菌量がそれ以外の試験区より有意に少なかった (5.6 分の 1)。

以上より、1 歳魚での本症の発生予防には、0 歳時に本症原因細菌に感染させないことが重要と考えられた。また、0 歳魚の飼育条件のうち、高密度飼育では眼球異常が発生しやすく、過少給餌では眼球異常、尾びれ欠損、腸の萎縮および抗病性の低下が発生しやすいと考えられ、こういった症状により、原因細菌がマダイ体内に侵入しやすくなると考えられた。これらの結果を踏まえ、過少給餌ではない飼育条件での限界収容密度を推定するため、昨年度実施した保菌率調査で「0 歳魚の 2 月時点で肥満度の高かった群 (5 群)」を抜き出して、収容密度と保菌率の関係を再解析した。その結果、両者の間には高い正の相関が認められ ($r^2=1.00$)、 “0 歳魚の 2 月時点での保菌率が 0% となる限界収容密度” は 6.3kg/m^3 と推定された。この値を “0 歳魚の 2 月時点で肥満度の最も高かった群の平均体重 (春仔が 0.20kg、秋仔が 0.38kg) で除した値” は 0 歳魚の限界収容尾数を表していると考えられ、その値は、春仔と秋仔でそれぞれ 31.5 尾/ m^3 と 16.6 尾/ m^3 と推定された。

本事業において、本症の予防に有効な物質が発見され、本症の予防に有効な飼育条件もある程度明らかとなった。今後は、ミモザ抽出物の実用化に必要なデータを収集するとともに、適正な飼育条件を養殖現場に周知していく必要がある。

参考文献

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. 4-12.