

新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業（平成 23 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 1」

—濁水流入ストレスがニジマスの免疫力に及ぼす影響の解明—

横塚哲也・石川孝典

目的

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。免疫力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免疫力がどのように変化するかについて十分な知見はない。養殖生産現場においては、飼育池に濁水が流入した後に魚病が発生する事例が多いことから、濁水流入ストレスがニジマスの免疫力に及ぼす影響を検証した。

材料および方法

供試魚 供試魚には当场において生産した病歴のないニジマス一腹子（平均体重約 1.9g）を用いた。

ストレッサー 濁水状態を再現するために懸濁物質としてカオリン（和光純薬）を用いた。カオリン水溶液（100g/L）を作成し、飼育水中の濃度が 5g/L となるように投入して濁水流入ストレスを与えた。

試験区および飼育条件 濁水流入ストレスを与えた濁水区および対照区（濁水流入なし）を設けた。300L 容円形 FRP 水槽内に網生簀を設置し、供試魚を 200 尾収容した。換水率が 6 回/日となるように約 15°C の地下水を注水し、飼育水中のカオリン濃度を均一にするために、水中ポンプを用いて水流を付加した。7 日間予備飼育した後、濁水区にカオリンを投入し、7 日後の試験終了時まで定期的に飼育水の懸濁物質量を測定した（図 2）。給餌はマズ用配合飼料（日清丸紅飼料）を 1 日 3% 量与えた。

感染試験 濁水流入 24 時間後に各区 30 尾ずつ供試魚を取り上げ、IHNV による感染試験を行った。感染には IHNV（TV0026 株）を用い、ウイルス液（ $10^{1.6}$ TCID₅₀/mL）に 1 時間浸漬した。感染後は 25L パンライト水槽に収容し、換水率 48 回/日となるように水温約 15°C の地下水を注水した。試験期間は 21 日間とし、死亡魚は毎日取り上げ、腎臓からウイルス分離を行った。ウイルス分離は RTG-2 細胞を用いて行い、CPE の有無を確認した。

サンプリング ストレス曝露前、曝露 12、24、72 およ

び 168 時間後に各区 5 尾ずつサンプリングした。FA-100 を用いて麻酔した後、開腹して頭腎を採取した。頭腎は RNAlater に浸漬し、使用時まで -80°C で保存した。

遺伝子発現量の測定 保存した頭腎から市販の RNA 抽出キット（RNeasy Plus Mini: QIAGEN）を用いて Total RNA を抽出した。その後 RT-PCR 法によって Interleukine-1 β （IL-1 β ）、Immunoglobulin M（IgM）および T-cell receptor（TCR）の遺伝子発現量を測定した。

解析方法 感染試験については Fisher の直接確率法により対照区と濁水区の感染 21 日後の死亡・生残数を、遺伝子発現量については Mann-Whitney U 検定により対照区と濁水区の値を比較した。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

感染試験 感染試験における死亡率を図 1 に示した。対照区では発病せず、死亡は確認されなかった。一方、濁水区では感染 7 日後から死亡が確認され、累積死亡率は 50% となり、全ての死亡魚から IHNV が分離された。濁水区では、濁水流入ストレスによって IHN が発病し死亡したと考えられ、濁水流入は発病の要因になりうる事が明らかとなった。

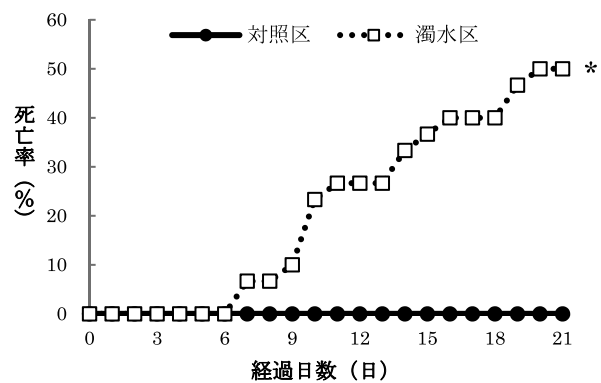


図 1 感染試験における死亡率

アスタリスクは死亡・生残数に区間で有意な差があったことを示す。

遺伝子発現量 各遺伝子における発現量の変動を図 2 に示した。IL-1 β は濁水流入 12 時間後に有意に上昇した。IgM については濁水流入 24 時間後に有意に上昇した。TCR については濁水流入 24 時間後に有意に上昇した後、72 時間後に低下し、168 時間後に再び上昇した。濁水流入 12 時間後に炎症性サイトカインである IL-1 β の発現量が上昇していることから、濁水流入ストレスに起因する炎症反応が生じたものと推察される。また、濁水流入 24 時間後に、抗体である IgM や T 細胞受容体である TCR の発現量が上昇したが、これらも炎症反応が起きた結果だと推察される。さらに、168 時間後に T 細胞受容体である TCR が再び上昇したことから、今回のような単発的な急性ストレスであっても 1 週間程度にわたり免疫力に影響を及ぼすことが示唆された。

以上の結果から、濁水流入ストレスはニジマスの免疫力に影響を与え、魚病発生リスクを高める可能性があると考えられる。濁水の流入は、台風や豪雨の際に頻発し、河川水を使用している養殖生産現場では避けられないストレスである。濁水の流入が予想される際には、事前に免疫賦活剤等を投与して免疫力の低下を防ぐことが望ましい。

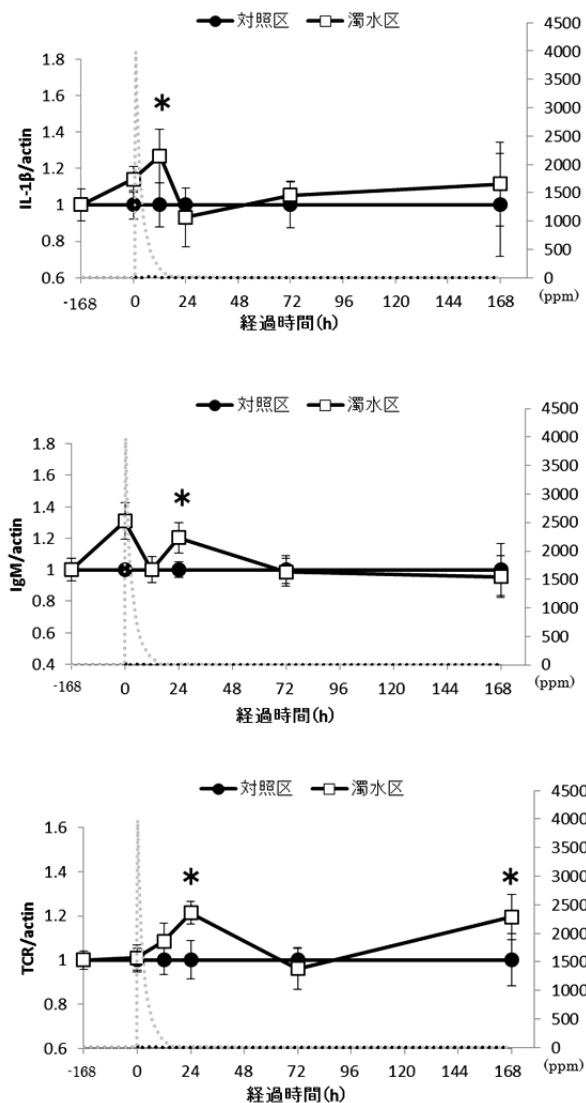


図 2 各遺伝子における発現量の変動

測定時の対照区における発現量を 1 とし、濁水区ではその相対値を示した。懸濁物質の推移を点線で表示した。アスタリスクは区間で有意な差があったことを示す。

(水産技術部)