エドワジエラ症に伴ってみられたヒラメ集団の血液成分及び 血中生体防御指標の変動係数の変化

宮崎 統五

(2001年12月 3 日受付)

Changes in Variance Value of Immunological and Hematological Parameters Observed in a Population of Japanese Flounder Suffering from Edwardsiellosis

Tougo Miyazaki

Toyama Prefecture Sea Farming Center, 15-1, Sugata, Himi, Toyama, 935-0411, Japan.

(Received December 3, 2001)

ABSTRACT—A group consisting of 20 individuals of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* was reared for 178 days, during which edwardsiellosis occurred. Monitoring of immunological (phagocytic rate, NBT reduction and potential killing activity of blood phagocytes and lysozyme activity in the plasma) and hematological (protein concentration and glucose concentration in the plasma) parameters were carried out throughout the period, using the blood periodically collected from each fish. Relative standard deviation (SD/average) values of most of the parameters were expanded several weeks before mortality started. The expansion of these values is thought to be caused by increased physiological differences between normal and infected fish in the group. The variance value of these parameters is suggested to be useful to recognize a sign of outbreaks of infectious diseases.

Key words: *Paralichthys olivaceus*, *Edwardsiella tarda*, immunological parameter, hematological parameter, oxygen radical, phagocytosis, lysozyme, plasma protein

筆者は、富山県水産試験場で飼育していたヒラメ集団の生体防御指標（血中食細胞の貪食活性、血中食細胞のNBT還元能、血中食細胞のポテンシャルキリング活性及び血漿リゾチーム活性）及び血液性状（血漿蛋白濃度及び血漿ブドウ糖濃度）を継続的に観察していたところ、観察期間中にエドワジエラ症の発生がみられた。この自然発症例では、死亡が出る以前から、各生体防御指標及び血液性状の分散値の上昇及び一部の測定項目の平均値の上昇または下降がみられたのでそれらの値の変動を紹

介する。

材料及び方法

飼育方法

富山県水産試験場で飼育していた 492.0 ± 61.0 g（平均 $\pm$ SD）のヒラメ20尾を新たに面積5.5 m²の水槽に収容して、1999年3月23日から1999年9月17日までの178日間飼育した。供試魚集団には、試験開始前2カ月間は死亡はみられなかった。飼育水には砂濾過海水を用い、換水率を10回/日以上とした。飼育水温は、11.1°Cから27.1°Cの間であった。供試魚には、市販の配合飼料を週当たり1から3回飽食するまで投与した。

富山県栽培漁業センター

* Corresponding author

E-mail: saibaicenter01@pref.toyama.jp

血液成分及び生体防御指標の測定法

給餌後48時間から72時間の間に、3週当たり1回の間隔で、全ての供試魚から繰り返し採血した。採血には、容量1 mLのツベルクリン注射器に内径0.65 mm×長さ32 mmの注射針(24G;1 1/2)を装着して用い、採血前に滅菌したヘパリン-生理食塩水溶液(800 U/mL; Sigma)でフラッシングすることで血液凝固を阻止した。採血の際には魚を無麻酔のまま頭部と尾部を固定し、血液1 mLを速やかに尾部血管から採取し、直ちにマイクロチューブに移し氷冷した。採血後、魚は直ちに水槽へ戻して飼育を継続した。

血液は、採血2時間以内に食細胞貪食能検査、NBT還元能及びポテンシャルキリング活性の測定に供した後、0°C、3,000×gで10分間遠心分離し、得られた血漿を-80°Cで保存した。その後解凍してリゾチーム活性、血漿蛋白濃度及び血漿ブドウ糖濃度の測定に用いた。

血中食細胞の貪食能は、堀内・長谷川(1982)の方法に準じて測定した。血液50 µLを等量のザイモザン浮遊液(0.5 mg ザイモザン/mL RPMI 1640)と混和してプラスチック毛細管に充填し、一端を封じた後、20°Cで30分間培養した。毛細管を1,000×gで5分間遠心し、白血球層と赤血球層の間で切断して血漿及び白血球を流出させ、ピペッティングで混和した後スライドガラスに塗抹した。塗抹標本にメイグリュンワルド-ギムザ染色を施し、100細胞以上の単球または好中球を観察してザイモザンを貪食した細胞数の割合(以下貪食率)を求めた。

NBT還元能の測定はSiwicki and Anderson(1993)の原理に従い、試料を25 µLにスケールダウンして行った。

リゾチーム活性(以下Ly活性)及びポテンシャルキリング活性(以下PK活性)は、それぞれMiyazaki(1998a)及びMiyazaki(1998b)の方法を用いて測定した。

血漿蛋白濃度(以下Pt濃度)はSiwicki and Anderson(1993)の方法に準拠し、スケールダウンして測定した。すなわち、マイクロプレートウェル内で血漿5 µL及び蛋白発色試薬(硫酸銅1.5 g、酒石酸ナトリウム・カリウム・4H₂O 6 g、水酸化ナトリウム30 g/L DW)200 µLを混和し、室温下で15分間震盪しながら発色させ、マイクロプレートリーダーを用いて540 nmにおける吸光度を測定した。市販の牛血清アルブミン(Sigma)の系列希釈液を用いて検量線を作成し、試料中のPt濃度を求めた。

血漿グルコース濃度(以下Gl濃度)は、市販の測定キット(和光純薬)を用い、通常の方法をスケールダウンして測定した。すなわち、マイクロプレートウェル内で発色試薬200 µL及び血漿5 µLを混和し、室温下で30分間発色させ、マイクロプレートリーダーを用いて波長

505 nmにおける吸光度を測定し、標準グルコース液を系列希釈して作成した検量線から試料中のGl濃度を求めた。

死亡原因調査

試験期間中に供試魚が死亡した場合には、死後出来るだけ早く取り上げ、症状の観察を行うとともに、細菌検査を行った。細菌分離にはブレインハートインフュージョン寒天培地(日水製薬)を用い、腎臓の一部を塗抹して20°Cで培養した。細菌集落が見られた場合には皆川ら(1983)の方法に従って簡易同定を行った。

結 果

死亡状況の概要

飼育集団内では、6月22日から7月29日までの37日間に8尾が死亡し(累積死亡率;40.0%)、この間の平均日間死亡率は1.1%であった。試験期間中に起きた死亡状況をもとに、死亡魚がみられなかった時期を無発症期、死亡が起きていた期間を流行期及び試験終了までの死亡がみられなかった期間を流行期後とした(Fig. 1)。

死亡魚全てで腹水貯留が認められ、半数の個体では脱肛がみられた。死亡魚全てから1種と考えられる細菌がほぼ純培養的に分離され、全ての分離菌の性状は、グラム陰性、運動性を有する桿菌、チトクロームオキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性、硫化水素産生能陽性、インドール産生能陽性、ラクトース分解能陰性、シュクロース分解能陰性、グルコース分解能陽性、マンニトール分解能陰性、ONPG反応陰性及びリジン脱炭酸能陽性であったことから、分離株は*Edwardsiella tarda*と同定された。病魚の症状及び分離菌種から、流行的な死亡の原因はエドワジエラ症が飼育集団内で発生したことによると判断された。

なお、試験期間中にヘモグロビン濃度も併せて測定したが、採血回数に伴う濃度の変化がみとめられなかったことから、同一個体から繰り返し採血した影響はなかつ

Fig. 1. Survival rate of a Japanese flounder population naturally infected with edwardsiellosis.

たと判断された。

生体防御指標値の変動

血中食細胞の貪食率の変動係数（標準偏差値／平均値）は、流行期3週前に1以上他の時期より上昇した。供試集団全体の平均貪食率は、無発症期前半では20から30%であったが、流行期にかけて徐々に低下し、死亡が最も激しかった流行期中期には5%と無発症期に比べて著しく低くなり、流行期後には無発症期と同程度へと回復した（Fig. 2）。

NBT還元能の変動係数は、流行期9週前から流行期直前までの間で1から2.5を示し、他の時期より高かった。平均NBT還元能は、無発症期には0.01から0.02の間であったが、流行期以降では0.03以上へと上昇した（Fig. 3）。

PK活性の変動係数は、無発症期前半には0.4から0.5を示し、流行期前に0.6以上へと上昇した後、流行期以降は0.4から0.7の間を上下した。平均PK活性は、無発症期前半の0.05から無発症期後半の0.08へ上昇した後、流行期中期には0.05へと低下し、流行期後には0.06から0.07

Fig. 2. Changes in relative standard deviation and mean of phagocytic rate of blood phagocytes measured among a Japanese flounder population naturally infected with edwardsiellosis. Vertical bars indicate SD.

Fig. 3. Changes in relative standard deviation and mean of NBT reduction of blood phagocytes measured among a Japanese flounder population naturally infected with edwardsiellosis. Vertical bars indicate SD.

Fig. 4. Changes in relative standard deviation and mean of potential killing activity of blood phagocytes measured among a Japanese flounder population naturally infected with edwardsiellosis. Vertical bars indicate SD.

Fig. 5. Changes in relative standard deviation and mean of plasma lysozyme activity measured among a Japanese flounder population naturally infected with edwardsiellosis. Vertical bars indicate SD.

を示した（Fig. 4）。

無発症期前半から流行期の間のLy活性の変動係数は0.4から0.8を示し、流行期後の0.4以下より一般的に高かった。Ly活性の平均値は、無発症期前半で約200 U/mLを示した後、無発症期後半から流行期では300から600 U/mLへと上昇傾向がみられた（Fig. 5）。

血液成分の変動

Pt濃度の変動係数は、無発症期前半の0.1以下から流行期の0.2以上へと上昇した後、流行期後では低下した。平均Pt濃度は、無発症期前半では約45 mg/mLであったが、流行期3週前に51 mg/mLへと上昇した後、流行期には42 mg/mLへと下降する変動を示し、流行期後は40から50 mg/mLの間を上下した（Fig. 6）。

GI濃度の変動係数は、流行期6週前から流行期終了時まで0.25以上を示し、他の時期より高かった。平均GI濃度は、無発症期前半には約13 g/dLを示したが、流行期3週前に23 g/dLへと上昇した後、流行期にかけて15 g/dL以下へと低下し、流行期後には15から22 g/dLへと上昇した（Fig. 7）。

Fig. 6. Changes in relative standard deviation and mean of total plasma protein concentration measured among a Japanese flounder population naturally infected with eswardsiellosis. Vertical bars indicate SD.

Fig. 7. Changes in relative standard deviation and mean of plasma glucose concentration measured among a Japanese flounder population naturally infected with eswardsiellosis. Vertical bars indicate SD.

考 察

本試験においては、ヒラメ集団をエドワジエラ症の流行期間を含む178日間飼育し、各個体の血中の生体防御指標値及び血液成分を経時的に測定した。その結果、エドワジエラ症による死亡が始まる以前から食食率、NBT還元能及びPK活性の変動係数の上昇がみられたほか、無発症期後半から流行期のPt濃度及びGI濃度の変動係数は、他の時期より高い傾向がみられた。なお、PK活性の変動係数は流行期後にも一時的に高い値を示したが、この原因は不明である。また、Ly活性の変動係数では、流行期が始まる直前に原因不明の下降がみられたが、無発症期から流行期にかけての値は流行期後より高いことが多かった。本症例では、*E. tarda* がいつの時点で集団内に侵入したかや集団内で病原体が蔓延した時間的経過は不明であるが、以上に示したように、ヒラメ集団にエドワジエラ症が流行する過程では、各測定値の変動係数の拡大傾向がみられた。保科(1962)は、鰯赤病に罹患して発症したウナギ(*Anguilla japonica*)群の血清蛋白濃度の分散は、健康群のそれに比べて大きかったこと

を報告しているほか、畑井ら(1984)のデータでも、*Aphanomyces piscicida*に自然感染したアユ(*Plecoglossus altivelis*)群の血漿蛋白濃度の分散は健康群のそれに比べて大きかったことが示されている。また、池田・見奈美(1982)のデータでは、*Lactococcus garvieae*に自然感染したブリ群の血中グルコース濃度の分散は健康群のそれよりも大きかったことが示されている。以上の報告及び本試験の結果から、感染に伴う血液成分の分散の拡大は、魚種や病原体が異なっても共通した現象である可能性が推測された。

細菌感染症が集団内で流行する過程では、まず少数の個体が死亡し始め、その後急激に死亡個体数が増加する経過をたどる例が多いことから、飼育環境へ侵入した病原体はまず少数の個体に感染して病原体数を増やし、体外へ排出された病原体は他の個体に次々に侵入して感染魚数を増やし、集団内で急激な死亡数増加を引き起こす段階へ移行すると考えられる。すなわち、集団内で感染個体数が増加する過程では、非感染魚、不顕性感染魚及び発症魚と様々な段階の魚が混在する時期が生ずると考えられる。細菌感染症に罹患して発症した個体や人為感染させた個体の血液成分や生体防御指標値は、健康時のそれらに比べて変化することが知られており(Mulcahy, 1971; 畑井, 1972; Wedemeyer and Ross, 1973; Wobeser, 1973; 池田ら, 1976; 木村・栗倉, 1977; Ingram, 1980; Sakai, 1983; 楠田・二宮, 1992; Møyner et al., 1993), 本試験でみられた変動係数の上昇は、各個体間で血液成分及び生体防御能における差が大きくなったことを表現しており、集団内に非感染魚、不顕性感染魚及び発症魚の混在状態が生じた結果を反映していたと考えられる。

本試験では、流行的な死亡が起こる以前から平均食食率の低下ならびに平均NBT還元能及び平均Ly活性の上昇傾向がみられたが、これらの変動には水温などの環境要因が影響した可能性も否定できず、平均値の変動と疾病の発生との関係はさらに調査する必要があると思われる。

増養殖現場において定期的に飼育集団の保健状態を推定することは、死亡個体が出現する前に同集団の生理的な異常を見出し、換水率の増加、収容密度の低減及び餌止めなどの処置を早期に行うことを可能とし、疾病による被害を低減させるうえで役立つと考えられる。本試験でみられた各測定項目の変動係数の変動は、集団の保健状態を推定し、何らかの疾病発生の前兆をとらえるのに有効な指標となる可能性があると思われる。

謝 辞

本稿を御校閲頂くとともに、極めて有益なご助言を頂いた東京水産大学水産学部資源育成学科岡本信明教授に

感謝いたします。また、文献収集にご協力頂いた富山県水産試験場内水面課長角祐二氏に感謝いたします。

文 献

- 畑井喜司雄 (1972) : 魚における血流中接種細菌の動態に関する研究Ⅱ. ウナギの血流中における *Aeromonas* 菌の消長に伴う白血球の変動. 魚病研究, **7**, 34-41.
- 畑井喜司雄・高橋 誓・江草周三 (1984) : 真菌性肉芽腫症起病真菌に関する研究-Ⅳ 人為感染および自然感染アユの血液性状. 魚病研究, **19**, 17-23.
- 保科利一 (1962) : ウナギの鰭赤病に関する研究. 東水大研報, **6**, 1-104.
- 堀内 篤・長谷川広文 (1982) : 食能検査法. *Medical Technology* (臨時増刊号), **10**, 658-664.
- 池田弥生・見奈美輝彦 (1982) : プリの連鎖球菌症における血液性状. 日水誌, **48**, 1383-1388.
- 池田弥生・尾崎久雄・早山萬彦・池田静徳・見奈美輝彦 (1976) : ノカルジア菌を接種したハマチの血液成分に関する診断学的研究. 日水誌, **42**, 1055-1064.
- Ingram, G. A., (1980) : Substances involved in the natural resistance of fish to infection—A review. *J. Fish Biol.*, **16**, 23-60.
- 木村喬久・栗倉輝彦 (1977) : わが国で初めて見出された養殖サケ科魚類の細菌性腎臓病 (Bacterial Kidney Disease) について. 日水誌, **43**, 143-150.
- 楠田理一・二宮 学 (1992) : ビジョンシステムを用いた *Enterococcus seriolicida* プリ実験感染魚の血液性状の変化の測定. 水産増殖, **40**, 323-328.
- 皆川武夫・中井敏博・室賀清邦 (1983) : 養鰻環境中における *Edwardsiella tarda*. 魚病研究, **17**, 243-250.
- Miyazaki, T. (1998a) : Influences of pH and temperature on lysozyme activity in the plasma of Japanese flounder and Japanese char. *Fish Pathol.*, **33**, 7-10.
- Miyazaki, T. (1998b) : A simple method to evaluate respiratory burst activity of blood phagocytes from Japanese flounder. *Fish Pathol.*, **33**, 141-142.
- Møyner, K., K. H. Røed, S. Sevatdal and M. Heum (1993) : Changes in non-specific immune parameters in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., induced by *Aeromonas salmonicida* infection. *Fish Shellfish Immunol.*, **3**, 253-265.
- Mulcahy, M. F. (1971) : Serum protein changes associated with ulcerative dermal necrosis (UDN) in the trout *Salmo trutta* L.. *J. Fish Biol.*, **3**, 199-201.
- Sakai, D. K. (1983) : The assesment of the health condition of salmonids by non-specific haemolytic (SH50) activity of serum. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **49**, 1487-1491.
- Siwicki, A. K. and D. P. Anderson (1993) : Nonspecific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. in "Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods", FAO-project GCP/INT/526/JPN, pp. 105-111.
- Wedemeyer, G. A. and A. J. Ross (1973) : Nutritional factors in the biochemical pathology of corynebacterial kidney disease in the coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **30**, 296-298.
- Wobeser, G. (1973) : An outbreak of redmouth disease in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in Saskatchewan. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **30**, 571-575.