平成 25 年度水産学進歩賞

養殖魚の抗病性に関する血液生化学的研究

舞 田 正 志

東京海洋大学大学院海洋科学技術研究科

Studies on the clinical biochemistry relevant to disease resistance in farmed fish

MASASHI MAITA

Graduate School of Marine Bioscience, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477, Japan

動物の血漿には、さまざまな栄養素、代謝による老廃物、酵素、無機成分などが含まれており、外部からの摂取、体内での合成・消費、排泄によってその値が変動するので、血漿中の成分の濃度変化から、各器官の機能の変化や生理状態の変化を推定することが可能である。このことから、血液生化学検査は、医学や獣医学領域では様々な臓器の障害の程度や機能評価、病態の把握のため一般的に行われている。魚類においても、血液生化学的検査は古くから行われ、特に、魚類のストレス反応における多くの研究や感染症における病態解析において重要な評価手法として、¹⁻³⁾ また、各種の環境汚染物質の影響や各種栄養素、飼料添加物の効果の評価を行う場合にも広く用いられてきた。

養殖魚の疾病は感染症が主体であり、持続的な養殖生産における重要な制限要因になっている。養殖魚の感染症は、死亡魚の増加によって発生が認知され、水産用医薬品による治療が行われてきたが、近年、消費者の水産用医薬品の残留に対する懸念や食の安全への関心が高まっていることで、その対策は「治療」から「予防」へと大きく変わってきた。そのため、魚病の予防対策としてワクチンが広く普及しつつあり、大きな効果を上げている。一方で、ワクチンが未開発の疾病では、依然として、水産用医薬品による治療を行うか、治療できないまま放置するほかはなく、抜本的な予防対策をとることはできないのが現状である。

養殖魚の感染症は病原体、環境、宿主の3つの要因の相互関係により発生するという概念が提唱され、⁴⁾ 多くの魚病研究者に受け入れられてきた。このうち、宿主側の要因、すなわち、魚の健康状態を健全に保つことによって魚病発生のリスクを低減させるという視点から、養殖魚の適正な飼育密度、良好な養殖環境の維持、適切

な給餌管理等により養殖魚の抗病性を向上させることが、感染症の予防対策としてコスト的にも、手法としても実用的であり、生産者の期待も高いといえる。養殖魚の健康状態を、ヒトの健康診断と同様に血液生化学検査によって評価できるようにしたいというのが著者の主たる研究テーマであった。血液生化学検査は、ヒトや動物の健康診断では、先に述べたように様々な臓器の障害の程度や機能評価、病態の把握を行う上で高い意義を有する。しかし、養殖魚の血液生化学検査における正常値の設定が困難であることや、養殖魚の疾病が感染症主体であり、魚の健康状態と感染症の発生との因果関係が不明確であったことから適切な診断指標が明らかにされず、血液生化学検査による養殖魚の健康診断の意義が見いだし難かった。

血液生化学検査の診断意義

養殖魚の感染症では、その診断は病原体の分離・同定が第一義であり、感染症に罹病した養殖魚の病態生理学的な知見は、病原体が不明な場合を除いて、重要な意義を持つものではないと考えられてきた。感染症の治療や予防において血液生化学検査の診断意義を確立する上で、「魚のどのような状態」を診断できれば、魚病発生のリスクを低減させることにつながるかを明確にする必要があった。そこで、健康な養殖魚とは、「外見的に正常（外傷や体色の変化がなく、異常な行動がみられず、正常に摂餌し成長している状態）であり、いかなる病原体にも感染していないもの」と定義し、健康状態が悪化する初期の段階においては、外見的に異常は見られなくても、感染症にかかりやすい状態になっている場合がある⁵⁾との想定から、この状態を察知できれば飼育管理を変えることで発病のリスクを減らすことができる。そう

なれば、血液生化学検査による診断意義が高くなると考えた。

「外見的に異常は見られなくても、感染症にかかりやすい状態」は、養殖魚の感染症に対する抗病性が低下した状態を指すことは理解しやすい。このとき、抗病性の低下は養殖魚の免疫機能の低下と解釈され、多くの場合、その評価には感染実験や各種免疫指標の測定などの方法が用いられてきた。しかし、これらの方法は測定に手間を要することや特別な設備や技術が必要なものも多い。臨床的には、血液検査と免疫機能検査を組み合わせたポンドサイドキットのような評価法も提唱されているが、⁶⁾ 免疫指標の測定を短時間で多数検体の処理を行うことは難しく、群として飼育される養殖現場への実用化は困難である。これに対し、血液生化学検査は自動化された測定装置やキットを使用すれば短時間に、多項目の検査を行うことができるという大きな利点を有している。この利点を養殖魚の抗病性評価に生かすためには、どの血漿化学成分が抗病性と関連して、どのように変動するかを明らかにする必要があった。

養殖魚の抗病性と血液生化学的所見

いくつかの研究では、免疫指標と感染実験による死亡率との間に明瞭な相関性が見られないことが報告されている。⁵⁾ 養殖魚の抗病性を評価する場合、産業的には感染症による死亡が経済的な損失をもたらすことから、感染実験による死亡率との相関を重視した。すなわち、感染実験や自然発病による死亡率と発病前の血液生化学検査の結果、さらには抗病性の低下をもたらす原因となった栄養学的要因や環境要因との関連性から解析をおこなうことで、感染症による死亡率と相関のある検査項目を検討することにした。

生け簀で飼育されている外見的に正常な一群のブリおよびニジマスを用いて、供試魚にタグを付けて個体識別し、少量の血液を採取して血漿化学成分を測定した後感染実験を行った。その結果、生き残った魚と死亡した魚の、感染実験前の血漿成分の測定値を比較すると血漿総コレステロール値が低い魚の死亡率は高く、血漿総コレステロール値が高いほど死亡率が低いことがわかった。⁷⁾ その他の血漿化学成分には有意な差は見られず、血漿総コレステロールが感染実験による死亡率と相関のある診断指標であることが示唆された。本実験では、発病歴のない一魚群の中でも血漿総コレステロール値の低い魚が死亡しやすいということを明らかにしたものであり、一魚群の中で血漿総コレステロールが低値を示した原因は摂餌不足や遺伝的な要因が考えられるが、それについてはさらなる検討が必要である。ヒトでは、家族性高コレステロール血症が知られている。虚血性心疾患等の高リスクグループとして認識されているが、家族性高

コレステロール血症の家系では、終戦直後の結核による死亡率が低かったという情報もあり、低コレステロール血症と感染症に対する感受性における遺伝的要因にも今後注目していきたい。

養殖魚の抗病性に及ぼす栄養学的要因

1980年代前半は、養殖ブリでは、連鎖球菌症による被害が大きく、この当時の養殖用餌料はマイワシなどの生餌が主体で、特にチアミナーゼによるビタミンB₁欠乏が養殖ブリの抗病性低下に関与していた面が多くあったと考えられる。養殖現場で健康診断を試みたところ、発病していない魚群でも血漿尿素窒素値および総コレステロール値の有意な低下が見られた。^{8,9)} 当時の状況から、養殖ブリが餌料の影響を受けて抗病性の低下がもたらされた場合の所見として、血漿総コレステロール値の低下が検出されていたものと考えている。

ブリ用配合飼料の魚粉代替タンパク質に関する一連の栄養学的研究において供試魚の血液生化学検査による健康評価を行う機会を得た。¹⁰⁻¹⁵⁾ 飼料中の魚粉配合率を低下させた実験では、粗脂肪含量がほぼ同じ試験飼料であるにも関わらず、魚粉配合率が30%を下回ると血漿総コレステロールは有意に低下し、感染症に対する抗病性も低下してくる。ブリやマダイなどの海産魚に無魚粉飼料を給餌すると高率で緑肝症が発生するが、¹⁶⁾ その後、その原因が無魚粉飼料で不足しているタウリンによるものであることが明らかにされた。¹⁷⁾ 無魚粉飼料を給餌したブリでは、緑肝症の発症前から早期に低コレステロール血症および抗病性の低下が起こることを見いだした。¹⁸⁾ 血漿コレステロール値は、餌に含まれるコレステロール（外因性コレステロール）と肝臓で合成されるコレステロール（内因性コレステロール）の総和である。餌に含まれているコレステロールは吸収されてから一旦肝臓にプールされ、リポタンパク質という形で血液中に分泌される。無魚粉飼料を給餌したブリに見られた低コレステロール血症の原因は、餌に由来するコレステロールが少ないことと、タウリンの不足による内因性コレステロールが低下することの両方によるものと考えられる。

ブリに同一配合で異なる製造方法で作製した無魚粉EP飼料を給餌した場合の血漿化学成分と類結節症の自然発病による死亡率との関係を調べてみたところ、胃の中においてペレットの保型性が悪い（滞留時間が短い）もので、ヘマトクリット値、総コレステロールおよびトリグリセリドが有意に低く、自然発病による死亡率は有意に高かった。なお、ここで示している血漿化学成分の測定値は類結節症が自然発生する約2週間前のもので、外見的に正常な魚で得られた結果である。この実験は、飼料の物性に起因する栄養素の吸収率低下による栄養状態の悪化が魚の抗病性に影響を与えた例であると思

われる。

養殖魚は我々の給与する餌しか口にすることはできないので、飼料中に含まれる特定の栄養素の欠乏は養殖魚にさまざまな欠乏症をもたらすが、現在、配合飼料を使用している限りにおいては必須栄養素の欠乏症はほとんど発生することはなくなった。しかし、消化管の物理的な損傷や寄生虫、飼料の物性に起因する栄養素の吸収率低下、魚の年齢やサイズによる栄養要求の変化などによって栄養状態の悪化や特定の栄養素の不足は起こりうると考えられる。このような養殖魚の総体的な栄養状態の悪化は抗病性の低下を招くことが指摘されており、血漿コレステロール値の低下が殆どの症例で見られることから、栄養学的要因により引き起こされる養殖魚の抗病性低下の指標になりうるであろう。

は乳類では、明確な栄養欠乏症状を呈する前に、さまざまな免疫機能が低下することが示されている。無魚粉飼料を給与したブリでは、早期に低コレステロール血症を呈するが、その間、免疫機能の著しい低下は見られなかった。低コレステロール血症の魚がなぜ抗病性が低いのかについては、今後さらに検証していく必要がある。

低酸素環境と養殖魚の抗病性

環境要因の中で、養殖魚の抗病性に最も影響を与えるのは、溶存酸素量であろう。溶存酸素量が魚の感染症による死亡率に影響を与える要因であることは古くから知られていた。著者らは、低溶存酸素量の影響を調べるにあたり、酸素健全臨界値下限付近の溶存酸素量（酸素飽和度 50% 程度）の影響に着目した。酸素健全臨界値以上の溶存酸素量があれば正常に摂餌し、成長すると考えられるのであるが、抗病性という観点からの酸素健全臨界値の設定がなされているとはいえなかったからである。酸素健全臨界値下限付近の低溶存酸素量で感染実験を行うと有意に死亡率が上昇する。このことは従来の研究結果と一致するものであるが、同時に、死亡率が上昇することには水平感染が起こりやすくなることが関与していることを明らかにした。¹⁹⁻²¹⁾ また、感染実験終了時の生残魚について、脳、肝臓、腎臓などの病原菌数を調べると、溶存酸素量の多い環境で飼育した魚では、いずれの臓器も 1×10^7 CFU/g 以上の菌が存在していたことから、溶存酸素量が多い環境下では、病原体による感染そのものを防止できているというよりは、感染した魚が死ににくいということを示唆していると考えられた。実際に、長期間低酸素環境下で飼育した魚に病原菌を接種した後、高酸素環境へ移して経過を観察すると死亡率は有意に低下することがわかり、ヒラメのエドワジェラ症および連鎖球菌症においては、溶存酸素量のコントロールにより死亡率を低減させる方法が、実用可能な技術として養殖場で実際に使用され効果を上げている。一方、

酸素健全臨界値下限付近の溶存酸素量で飼育したブリ²²⁾やニジマス²³⁾の血漿コレステロール値が有意に低下することも明らかとなり、血漿コレステロール値の低下を指標とした抗病性評価では、感染症による死亡率増加につながる低酸素による影響をも察知可能であると考えられた。つまり、血漿コレステロール値をモニタリングしながら溶存酸素量の制御を行うことが可能になると考えられ、より効果的な飼育環境の制御による魚病被害軽減対策の実用化につながることを期待される。

血液生化学検査による養殖魚の抗病性評価の今後

魚類では、魚種、餌、水温、成長段階などによって正常値が異なり、ヒトや家畜などのように正常値を多数検体の測定による統計処理（通常、平均値 ± 2 S.D. を正常値の範囲としている）で設定することは困難である。このことが、血液生化学検査による抗病性評価を困難にする大きい要因である。魚種別、水温別、成長段階別に正常値を設定するのは、時間とコストがかかるため、実用化にあたって正常値を設定することが妥当かどうか懸念をもたれる。正常値を設定することなく、血液生化学検査による抗病性評価を実用化するには、ベースラインアプローチの導入が最も良いと考えられる。ベースラインアプローチとは、定点観測により、本来、あるべき値の範囲から逸脱した値が検出されたときにリスクがあると判断するものであり、水温や成長段階により変動する値をもとにベースラインとなる値の範囲を決めておけば、正常値を設定することなく、養殖現場での抗病性評価が可能になるものと思われる。

一連の研究の結果、血漿コレステロール値の低下が普遍的に養殖魚の抗病性低下を示す指標として有用であることが示唆されたが、他の血漿化学成分の測定が不要というわけではない。いくつかの症例では、原因によって血漿コレステロール値の他に、尿素窒素量、アルカリ性ホスファターゼ活性、血糖値、中性脂肪値に上昇または低下を伴う場合がある。したがって、いくつかの血漿化学成分の変動と組み合わせて評価することによって、抗病性をもたらした原因の推定ができる可能性もある。抗病性低下をもたらした原因が特定できることは、栄養学的要因および飼育環境の適切な管理により養殖魚の感染症に対する抗病性が改善され、水産用医薬品に頼らない魚病の予防対策を確立することにつながると考えられるので、今後さらに症例を積み重ねていきたい。

近年、欧州では養殖魚の管理に動物福祉の概念が取り入れられつつある。動物福祉は食用動物の飼育中のストレスをできるだけ軽減することであり、多くの場合、飼育密度や環境悪化など飼育管理によるストレスの影響を最小にすることを意味する。特に、適正な飼育密度は魚場の特性によって一律に決められるものではないと考え

られる。適切な指標をもってストレス状態を評価することで漁場の特性に応じた適正飼育密度を決めることが、養殖魚の福祉を考慮した養殖魚の適正管理を行うために重要であり、このことへの血液性化学検査の応用も検討を進めていきたいと考えている。

謝 辞

これまでの研究を行うにあたり、松生（池田）彌生先生、岡本信明先生には学生時代も含めご指導、ご助言を賜った。また、大分県水産研究センターの皆様には、多大なるご協力をいただいたことをここに記し、御礼に代えさせていただきたい。さらに、一連の研究に関与し、支えていただいた同僚、学生諸氏にもお礼を申し上げたい。

文 献

- Wedemeyer GA. Basic physiological function. Physiology of fish in intensive culture system. Chapman & Hall, New York. 1996; 10-59.
- Houston AH. Blood and circulation. Methods for fish biology. In: Schreck CB, Moyle PB (eds). Am. Fish. Soc. Bethesda. 1990; 273-334.
- Stoskopf MK. Clinical pathology. Fish medicine. Stoskopf MK (eds). W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1993; 113-131.
- Snieszko SF. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious disease of fish. *J. Fish Biol.* 1974; **6**: 197-208.
- 舞田正志, キロンヴィスワナス. 魚類の栄養と健康, 改訂 魚類の栄養と飼料 (渡邊 武編), 恒星社厚生閣, 2009; 251-269.
- 舞田正志. 血液検査および生理学的検査法. 魚病学概論 (小川和夫編) 第2版, 恒星社厚生閣, 2012; 251-269.
- Maita M, Satoh K, Fukuda Y, Lee HK, Winton JR, Okamoto N. Correlation between plasma component levels of cultured fish and disease resistance to bacterial infection. *Fish Pathology.* 1998; **33**: 129-133.
- 舞田正志, 塩満捷夫, 池田彌生. 血液検査による養殖ブリの健康診断例. *日水誌* 1984; **50**: 1991-1998.
- 舞田正志, 塩満捷夫, 池田彌生. 血液検査からみたクライモグラフによる養殖ブリの健康診断. *日水誌* 1985; **51**: 205-211.
- Watanabe T, Viyakarn V, Aoki H, Tsuda H, Sakamoto H, Maita M, Satoh S, Takeuchi T. Utilization of alternative protein sources as substitute for fish meal in a newly developed soft-dry pellet for yellowtail. *Suisanzoshoku* 1994; **42**: 499-506.
- 渡邊 武, 青木秀夫, V. ウイヤカーン, 舞田正志, 山形陽一, 佐藤秀一, 竹内俊郎. プリ用ソフトドライペレットにおける魚粉代替プリ用ソフトドライペレットにおける魚粉代替. *水産増殖* 1995; **43**: 511-520.
- Watanabe T, Aoki H, Shimamoto K, Hazuma M, Maita M, Yamagata Y, Kiron V, Satoh S. A trial to culture yellowtail with non-fish diets. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 505-512.
- Maita M, Aoki H, Yamagata Y, Satoh S, Okamoto N, Watanabe T. Plasma biochemistry and disease resistance in yellowtail fed a non-fish meal diet. *Fish Pathology* 1998; **33**: 53-58.
- Aoki H, Sanada Y, Furuichi M, Kimoto R, Maita M, Akimoto A, Yamagata Y, Watanabe T. Partial or complete replacement of fish meal by alternate protein sources in diets for yellowtail and red sea bream. *Suisanzoshoku* 2000; **48**: 53-63.
- Watanabe T, Aoki H, Watanabe K, Maita M, Yamagata Y, Satoh S. Quality evaluation of different types of non-fish meal diets for yellowtail. *Fish. Sci.* 2001; **67**: 461-469.
- 舞田正志, 青木秀夫, 山形陽一, 渡邊哉子, 佐藤秀一, 岡本信明, 渡邊 武. 無魚粉飼料を給餌したブリにみられた緑肝症について. *日水誌* 1997; **63**: 400-401.
- Takagi S, Murata H, Goto T, Ichiki T, Endo M, Hatate H, Yoshida T, Sakai T, Yamashita H, Ukawa M. Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 1191-1199.
- Maita M, Maekawa J, Satoh K, Futami K, Satoh S. Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fish. Sci.* 2006; **72**: 513-519.
- 福田 稔, 舞田正志, 佐藤公一, 山本 浩, 岡本信明, 池田彌生. ヒラメのエドワジエラ症および連鎖球菌症における死亡率に及ぼす溶存酸素の影響. 大分県水産試験場調査研究報告 1996; **16**: 44-51.
- 福田 稔, 舞田正志, 佐藤公一, 岡本信明. 飼育水の溶存酸素量がブリの実験的腸球菌症における死亡率に及ぼす影響. *魚病研究* 1997; **32**: 129-130.
- 福田 稔, 舞田正志, 佐藤公一, 山本 浩, 岡本信明, 池田彌生. ブリの腸球菌症実験感染における *Enterococcus seriolicida* 水平感染に及ぼす溶存酸素の影響. *魚病研究* 1997; **32**: 43-49.
- 舞田正志, 福田 稔, 佐藤公一, 岡本信明, 池田彌生. ブリの血漿化学成分に及ぼす溶存酸素の影響. *日水誌* 1998; **64**: 288-289.
- 舞田正志, 吉安友二, 岡本信明, 池田彌生. 低酸素環境下での長期間飼育がニジマスの血液成分に及ぼす影響. *日水誌* 1997; **63**: 992-993.