

## 要 約

橋口 健太郎

世界の養殖生産は年々増加しており現在では総漁獲量の 20%を占めており，その中でもサケマス類の養殖は盛んで，漁獲量の 7 割以上が養殖されている。このように人口の急激な増加を背景に世界の養殖業は重要な産業であり，2030 年には総漁獲量の 50%を超えると予測されている。日本における養殖生産は漁業全体の 20%程度で，その生産量は 25 万トンで，その内訳は 64%がブリ類（ブリ *Seriola quinqueradiata*，カンパチ *Seriola dumerili*，ヒラマサ *Seriola lalandi*），23%がマダイ *Pagrus major* となっている。さらに，ブリ類の総生産量のうち約 6 割，マダイでは約 8 割が養殖魚で占められており，ブリ類およびマダイは日本の主要海産養殖魚となっている。また，ヒラメ *Paralichthys olivaceus* はブリ類およびマダイよりもその生産額は低いが高級魚として人気の高い魚で，日本の養殖業において重要な魚種の一つである。このように養殖業は年々世界での需要の高まりとともに重要な産業となっている。

養殖業の利点として，安全・安心かつ高品質な養殖魚を安定して生産可能であることが挙げられ，我が国においても品質を保証するためにトレーサビリティが定着しつつある。また，予め需要を把握した上で生産ができることから事業計画が作りやすく経営の見通しを立てられることや，丈夫で品質の高い系統を選抜育種することで効率的かつ高品質の水産物を養殖できることも利点として挙げられる。一方，養殖業の問題点の一つに感染症の発生が挙げられ，養殖現場では細菌病，ウイルス病および寄生虫病など種々の感染症が発生し産業的に大きな被害をもたらすことがある。感染症予防のためにワクチン接種を行ったり，感染症の治療のために薬剤を投与することがあるが，これらの処置は養殖魚の品質に対する消費者の不安を煽り，ワクチンや薬剤は価格が高いことから養殖業者にとってコストの増大となるので，できるだけ使用を避けることが消費者や生産者の立場からも望ましい。また，治療薬の抗生物質を誤った方法で投与すると薬剤耐性菌が出現し，薬剤による治療効果が十分に得られなくなる可能性がある。そのため，できるだけ感染症を発生させないように養殖魚を飼育することが強く求められている。

養殖現場における感染症の発生には，魚体に対するストレスが関与していることが報告されている。ストレスとは広義には外的刺激と定義され，およびこれを受けた生物に生理学的変化が認められるものを指す。一方，魚類で言う狭義のストレスとは，外的刺激により引き起こされる非特異的・生物学的な緊張状態の現象すべてのことを指し，対象とする魚の生存に影響を及ぼすような負の現象として定義できる。養殖魚に与えるストレスの原因として，化学的要因（水質，汚染，飼料の質・組成，排泄物など），物理的要因（水温，光，音，溶存ガスなど），生物的要因（収容密度，遊泳空間，微生物，寄生虫など）および管理的要因（ハンドリング，運搬，貯蔵，給餌方法，疾病治療など）が

挙げられる。ストレス反応は、ホルモンの分泌などの刺激に対して防御反応を示す「警告期」、警告期の反応によって個体がさらに抵抗力を増した時期である「抵抗期」、成長阻害や免疫能の低下など刺激に耐えられなくなった「疲弊期」の3段階に分けられる。個体がストレスを受けると一次反応としてコルチゾールなどのホルモンが分泌される。つづいて、二次反応としてそのホルモンの働きにより血中グルコース濃度が上昇することが知られている。グルコースは生物の主要なエネルギー源であり、血中グルコース濃度が上昇すれば血糖や血圧の低下を防げることから、緊急事態に遭遇した際に、即時に生理活性を高めストレス状態を改善することができる。血中グルコース濃度は各種刺激を受けてから早い段階から高まるが、平常値や刺激を受けてからの変化の度合は、魚種によって異なっている。また、同じ魚種でも刺激の種類によって血中グルコース濃度の変動度合いは異なることが報告されている。その後、ストレス反応は生体に様々な影響を与え、魚類においても生理作用、成長、生体防御能および繁殖に影響を与えることが報告されており、これらのほとんどの研究でストレスが生体に悪影響を与えるとされている。そのため、ストレスを与えずに養殖魚を飼育することが望ましいが、ストレスを与えずに飼育することは難しく、養殖業をさらに発展させるためにはストレスを緩和する方法を検討する必要がある。

プレバイオティクスとは消化管で消化されずに腸まで届き、腸内細菌を活性化させる物質の総称で、腸内細菌のうち特定の菌の代謝を活性化し増殖させることによって生体の健康が維持増進される。代表的なプレバイオティクスとしては、イヌリンなどの食物繊維やフラクトオリゴ糖およびガラクトオリゴ糖などのオリゴ糖類についてよく調べられている。プレバイオティクスの研究は魚類でも行われており、プレバイオティクスを投与することで成長促進、生体防御能の上昇および抗病性の上昇など有益な効果をもたらすことが報告されている。また、プレバイオティクスを投与することで塩分ストレスに対するストレス耐性が上昇することも報告されている。しかし、魚類にプレバイオティクスを投与してストレスを負荷後に、生体防御能や抗病性にもたらす影響を検証した研究は少なく、ブリ類についてはこれまでに研究報告はない。

ビタミンは微量で動物の栄養状態を支配する有機化合物で、炭水化物、タンパク質、脂質と異なり、生体内の代謝を営む種々の生理現象に潤滑油的な役割を演じ、動物体内ではほとんど生合成されないものである。その中で、ビタミンC（アスコルビン酸）やビタミンE（ $\alpha$ -トコフェロール）は活性酸素等のフリーラジカルからDNAやタンパク質などの細胞高分子を保護するための抗酸化剤として働くことが知られており、ビタミンCまたはビタミンEを経口投与することで、成長の促進や生体防御能を上昇させるといった効果が多くの魚種で報告されている。また、ビタミンCまたはビタミンEを投与した際のストレス耐性についても様々な魚種で調べられており、これらを投与することによってストレス耐性が上昇することが報告されている。しかし、ブリ類についてのビタミンCおよびビタミンEの投与効果は、成長や生体防御能に影響を与えることが報告

されているが、ストレス耐性についての報告はない。

これまでに各種研究の結果から感染症の発生とストレスの間には密接な関係性があると考えられているにも関わらず、わが国の主要養殖魚におけるストレス応答に関する研究はほとんどない。そのため、養殖現場で日常行われている作業によって、魚類がどの程度ストレスの負荷を受けているのかは不明である。今後、魚類の感染症とストレスの関連性を明らかにしていく上で、各種刺激に対するストレスの程度を把握しておくことは重要である。また、ストレスが生体防御能や抗病性に悪影響を与えるのであれば、その対策についても検討する必要がある。

そこで本研究では、日本の主要海産養殖魚であるブリ、マダイおよびヒラメに加え、世界的に重要な養殖魚であるニジマス *Oncorhynchus mykiss* を対象動物として、養殖現場で日常行われていると考えられる各種刺激 {網による空中保持 (10 秒間空気に暴露)、水位低下 (供試魚の背鰭が出る程度まで水位を落とす)、淡水浴 (淡水に 5 分間浸漬する) または塩水浴 (塩濃度 3% の塩水に 30 分間浸漬)、ホルマリン浴 (ホルマリンの濃度を 200ppm となるように調製した水槽に 30 分間浸漬) および腹腔内注射 (生理食塩水を 100  $\mu$ L 腹腔内に接種)} を付与した後の血液性状および非特異的生体防御能ならびに感染症に対する感受性の変化について調べた。また、感染症に対する感受性が上昇したストレスに対して、ストレス緩和効果が期待されるインスリン、ビタミン C およびビタミン E を経口投与してその効果を調べた。

本研究では、はじめに各種刺激付与後の血中グルコース濃度および非特異的生体防御 (食食活性、リゾチーム活性および補体価) を測定し、刺激に対する反応を調べた。

網による空中保持では、ブリおよびヒラメでは 30 分後、マダイでは 1 時間後、ニジマスでは 24 時間後に血中グルコース濃度が最も高くなり同じ刺激でも魚種によって反応が異なることが明らかとなった。水位低下のようにブリやヒラメでは応答を示さない刺激でもマダイにとっては刺激となることや、ホルマリン浴のようにブリ、マダイおよびニジマスでは高いグルコース濃度を示した刺激でもヒラメはあまり応答を示さないことなど魚種によって刺激に対する応答が異なることが明らかとなり、血中グルコース濃度が高くなる刺激も魚種によって異なった。各種刺激を付与した際の生体防御能の変化についても、魚種および刺激によって応答が異なり、食食能が刺激の影響を最も受けやすいことが明らかとなり、その傾向はブリにおいて顕著にみられ、全ての刺激に対して減少した。また、血中グルコース濃度の変化が最も大きかったマダイでは生体防御能の変化はほとんど認められなかったことや、塩水浴を行ったニジマスでは食食率が上昇したことなどストレスを付与しても生体防御能に悪影響を与えるとは一概に言えない結果となった。

続いて、各種刺激付与後に実験感染を行い、感染症に対する感受性にどの程度影響を与えるかを調べた。類結節症原因菌を感染させたブリでは淡水浴および腹腔内注射、滑走細菌に感染させたヒラメでは淡水浴およびホルマリン浴、レンサ球菌を感染させたニ

ジマスでは全ての刺激に対して感染症に対する感受性を高め、ストレスの影響を受けることが明らかとなった。しかし、マダイでは死亡率に有意な差異が認められず、ストレス反応は起こるものの感受性には影響を与えないことが明らかとなった。また、ブリやニジマスにおいても血中グルコース濃度が上昇した刺激でも感受性は上昇せず、反対に血中グルコース濃度が上昇しなかった刺激で感受性が高くなるといった現象も観察された。このことから、ストレスは感染症に対する感受性を高めるとは一概に言えず、原因菌の感染部位や侵入経路、感染時の宿主側の生体防御能の活性度合いおよび飼育環境など様々な要因によって感受性は左右されると考えられる。

ブリでは淡水浴、ニジマスでは塩水浴を与えた際のインスリンの投与によるストレス緩和効果を調べ、マダイおよびヒラメではインスリンを投与し、免疫賦活効果を調べた。ブリでは、インスリンを1週間経口投与することによって生体防御能の上昇が認められ、実験感染では淡水浴前だけでなく淡水浴後にもインスリンを投与することで死亡率が低くなり、ストレス緩和効果が認められた。このことから、インスリンの投与は有効なストレスの対処方法であると考えられる。また、マダイ、ヒラメおよびニジマスについては、本研究においてインスリンの投与効果は認められなかったことから、今後、投与期間や投与量の再検討ならびに他のプレバイオティクスの投与についても検討する必要がある。ビタミンCおよびビタミンEの投与によるストレス緩和効果は、ブリに淡水浴を行った際に検証した。ビタミンCをブリに1週間経口投与したが、生体防御能の上昇や感染症に対する感受性の低下が認められず、ストレス緩和効果を示さなかった。しかし、ビタミンEをブリに1週間経口投与すると生体防御能の上昇は認められなかったが、実験感染においてはインスリンと同様に淡水浴前後でビタミンEを投与することによって死亡率が低下し、ストレス緩和効果が認められた。

以上のことから本研究では、ブリ、マダイ、ヒラメおよびニジマスの各種刺激が血中グルコース濃度、生体防御能（食食活性、リゾチーム活性および補体価）および感染症に対する感受性に及ぼす影響を明らかにした。さらに、インスリン、ビタミンCおよびビタミンEを経口投与することによるストレス緩和効果を検証し、インスリンおよびビタミンEではストレス緩和効果が認められた。淡水浴はブリ類の養殖現場では寄生虫を除去する目的で行われ、有効な対策手段でありブリ類の養殖において必要不可欠であることから、淡水浴のストレスを緩和できたことは特に大きいと考えられる。このように本研究において明らかになったことは、養殖魚の飼育方法の改善および感染症の予防につながり、養殖業のさらなる発展に貢献すると考えられる。しかし、本研究で調べた刺激は養殖魚にかかっていると予想されるストレスの一部にしか過ぎず、他の刺激に対しても本研究と同様にストレスの影響を調べる必要がある。