

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 2」

-水温上昇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、飼育水温が変化した後に魚病が発生する事例が多いことから、水温上昇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 供試魚には民間養魚場において生産された病歴のないニジマス（平均体重約 45g）を用いた。

ストレス ヒーターを用いて水温を 5℃上昇させた飼育水を注水することで水温上昇ストレスを与えた。

試験区および飼育条件 水温上昇ストレスを与えた昇温区および対照区（水温上昇なし）を設けた。300L 円形 FRP 水槽内に供試魚を 120 尾収容した。換水率が 6 回/日となるように約 15℃の地下水を注水した。7 日間予備飼育した後、昇温区の水温を 2 時間かけて 5℃上昇させ、7 日後の試験終了時まで水温を維持した（図 1）。給餌はマス用配合飼料（日清丸紅飼料株式会社製）を 1 日 2%量与えた。

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、ヘパリンで処理したシリンジを用いて採血し、血漿を得た。また、魚体を開腹して頭腎を採取し、RNAlater に浸漬した。採取した血漿および頭腎は、使用時まで-80℃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)、T-cell receptor (TCR) および interferon-gamma (IFN γ) の遺伝子発現量を測定した。

血中 IFN γ 量の測定 インダイレクト ELLISA 法により血漿中の IFN γ 量を測定した。

解析方法 遺伝子発現量および血中 IFN γ 量について、Mann-Whitney U 検定により対照区と昇温区の値を比較した。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

遺伝子発現量 各遺伝子における発現量の変動を図 1 に示した。IL-1 β は水温上昇 72 時間後に有意に上昇した。IgM は水温上昇 168 時間後に有意に上昇した。TCR は対照区同様の値で推移した。IFN γ は水温上昇 72 および 168 時間後に有意に上昇した。水温上昇 72 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、水温上昇ストレスによって炎症反応が生じたことが推察される。また、水温上昇 72 時間後以降に抗体である IgM や抗ウイルス因子である IFN γ の発現量が上昇したが、これらも炎症反応が生じた結果だと推察される。前掲の濁水流入ストレスと比較して、今回の水温上昇ストレスでは免疫反応に変化が生じるまでに時間がかかり、3 日後から 1 週間後に免疫力に影響を及ぼすことが示唆された。

血中 IFN γ 量 血中における IFN γ 量は、水温上昇 12 時間後および 72 時間後に有意に低下した。IFN γ はウイルス病に対する抗病性指標として知られていることから、水温上昇ストレスは IHN などのウイルス病に対する抗病性を低下させる可能性が考えられる。

以上の結果から、水温上昇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。養殖生産現場では、河川水や地下水の用水変更時や活魚輸送における水温調節の際に飼育水温が上昇しやすい。また、近年では猛暑や渇水によって夏季に高水温状態となる養殖生産現場も増えている。魚病発生を予防するため、水温上昇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。

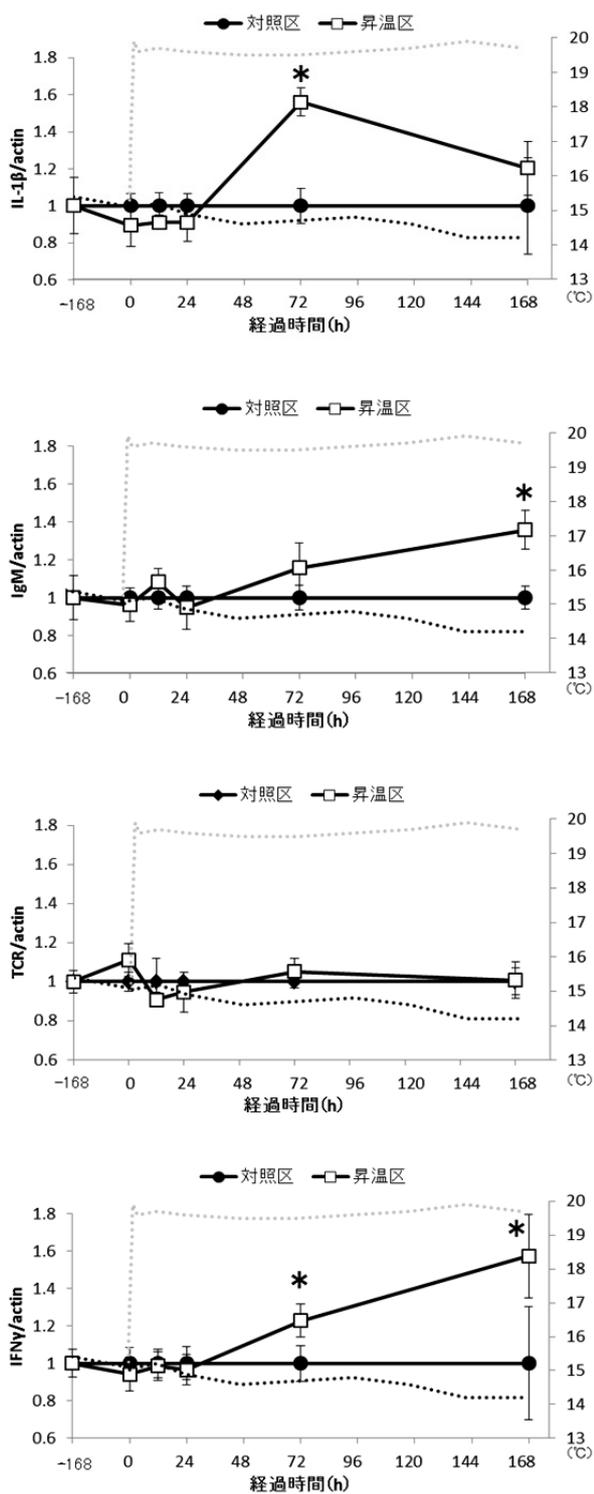


図1 各遺伝子における発現量の変動

測定時の対照区における発現量を1とし、昇温区ではその相対値を示した。飼育水温の推移を点線に表示した。アスタリスクは区間で有意な差があったことを示す。

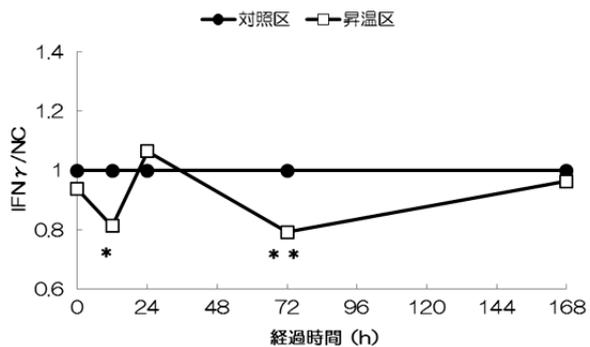


図2 血中におけるIFNγ量の変動

測定時の対照区におけるIFNγ濃度を1とし、昇温区ではその相対値を示した。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)