

# 魚類養殖における飼料費高騰対策に向けた補償成長の活用

## Ⅱ 長期間の絶食が養殖ブリの免疫に及ぼす影響について

増養殖環境課 岡部 正也・上村 海斗

### 1 背景・目的

養殖現場において、補償成長を安全かつ効果的に利用するためには、絶食が養殖魚の免疫に及ぼす影響を把握しておく必要がある。魚類を含む脊椎動物の免疫系は、大きく以下の2つに分けられる(鈴木・末武 2019)。

**自然免疫**：好中球、マクロファージなどの白血球が、体内に侵入しようとする病原体を非特異的に貪食し排除する

**獲得免疫**：リンパ球が産生する特異抗体によって一度感染した病原体を記憶し、同じ病気にかかりにくくする

魚類では、哺乳類などの高等脊椎動物に比べて獲得免疫が十分に発達していないため、自然免疫が生体防御に重要な役割を担っている(Magnadóttir 2006)。

白血球貪食能は、自然免疫の指標の一つであり、検体から分離・培養した白血球のうち、一定時間内に異物を貪食した白血球の比率(白血球貪食率、以下「貪食率」という。)により評価できる(岡部ら 2006、橋口ら 2015)。しかし、この方法を用いて、長期間の絶食が養殖ブリの自然免疫に及ぼす影響を評価した例はこれまで見当たらない。

そこで本課題では、陸上7トンFRP水槽(以下「陸上水槽」という。)及び海上小割生け簀(以下「海上小割」という。)で絶食試験した養殖ブリ(表1)について貪食率を測定し、長期間の絶食が養殖ブリの自然免疫に与える影響を評価した。

今年度は、以下の3項目について検討した。

#### (1) 大型魚からの頭腎の摘出法の検討

貪食率の測定に用いる白血球細胞は、魚類の主な造血組織である頭腎から得ることができる。頭腎は背骨に沿って伸びる腎臓の先端部分にあり、頭蓋骨の深部に埋没しているため、特に体重1kgを超える大型魚では、白血球細胞の活性を落とさないよう頭腎組織を速やかに摘出し、処理する方法を確立する必要がある。そこで本項目では、大型の養殖ブリについて、取上げから解剖及び頭腎の摘出までの作業を迅速に行うための処理方法を検討した。

#### (2) 頭腎の処理と貪食率の測定法の検討

(1)で採取した頭腎組織を用いて、白血球細胞の分離・培養、ザイモサンの貪食、固定・染色及び標本作製までの工程を検討した。

#### (3) 絶食した養殖ブリの貪食率の測定

(2)の工程により、陸上水槽及び海上小割で飼育した養殖ブリについて給餌、絶食及び給餌再開の各時点で白血球を採取し、貪食率を測定した。測定結果の統計学的検定には、JASP Version 0.95.4 (JASP Team 2025)を用い、Kruskal-Wallis検定により有意差を確認後、Bonferroni補正したDunn検定により供試魚群間の有意差の有無を検討した。

## 2 材料及び方法

### (1) 大型魚からの頭腎の摘出法の検討

供試魚として、海上小割から無作為に抽出した養殖ブリ 5 個体（平均体重±標準偏差 1.37±0.16kg、平均尾叉長±標準偏差 47.1±1.1cm）を用いた。まず、海上小割からたも網で取り上げた供試魚の頭頂部を木槌で打撃して中枢神経を破壊後、酸素ポンペに接続した分散器から純酸素通気した海水中に約 1 分間浸漬した。つぎに、供試魚を海水から取上げ、血液生化学分析用サンプルとして、シリンジ（容量 10ml、針：21G × 1 1/2）を用いて背大動脈から採血した。その後、下鰓骨と尾鰭基部を切断し、再度、純酸素を通気した海水中に約 1 分間浸漬し、脱血処理を施した。

脱血後は直ちにポリ袋に入れて氷冷し、実験室へ搬入した。実験室では、以下の手順で頭腎を摘出した。まず、冷凍食品用包丁を用いて、供試魚の頭部を背鰭前部から腹鰭後部に向かって切断した。続いて、ハサミで鰓蓋、下顎、下鰓骨の順に切り込みを入れて頭蓋骨の腹面を露出させた。次に、上鰓骨の基部にハサミを入れて頭蓋骨から鰓を切り離し、前耳骨を覆う上皮を切開して内部の頭腎を露出させ、ピンセットで摘出した（岸本・青木 2006）。

表 1 絶食試験の概要

試験期間 (2024年)		8月27日	9月11日	9月18日	11月6日		
試験区/経過日数 (日)		0	15	22	71		
海上小割	<b>2W1F区</b> <b>3W区</b>						
試験期間 (2024年)					11月30日	12月12日	12月20日
試験区/経過日数 (日)					0	12	20
陸上水槽	<b>12D区</b>						
<b>2W1F区</b> : 2週間絶食1週間給餌						: 測定日	
<b>3W区</b> : 3週間絶食						: 絶食期間	
<b>12D区</b> : 12日間絶食						: 給餌期間	

### (2) 頭腎の処理と貪食率の測定法の検討

頭腎の処理と貪食率の測定は、岡部ら (2006) 及び橋口ら (2015) の報告を一部改変し、表 2 及び図 1 に示す手順で実施した。採取した白血球については、ギムザ染色を施した塗抹標本を作製し、顕微鏡観察 (100 倍) において、細胞全体が濃く染色された細胞を死細胞と判断し、白血球の生存状態を確認した。

表 2 ブリ大型魚からの頭腎由来白血球の採取手順

作業場所	項目	内容
飼育施設	1 取上	
	2 即殺	頭頂部への打撃による脳の破壊 (仮死状態)
	3 純酸素通気+海水氷に浸漬	酸欠及びストレスの軽減 (心臓は拍動) 1 分間保持
	4 血液採取 (生化学的分析用)	背大動脈からの採血
	5 脱血	尾鰭、鰓の動脈を切断し、海水氷中で脱血 1 分間保持
	6 氷冷	実験室へ移送
実験室	7 体測	
	8 解剖	頭腎の摘出
	9 白血球の培養	
	10 貪食率の測定	

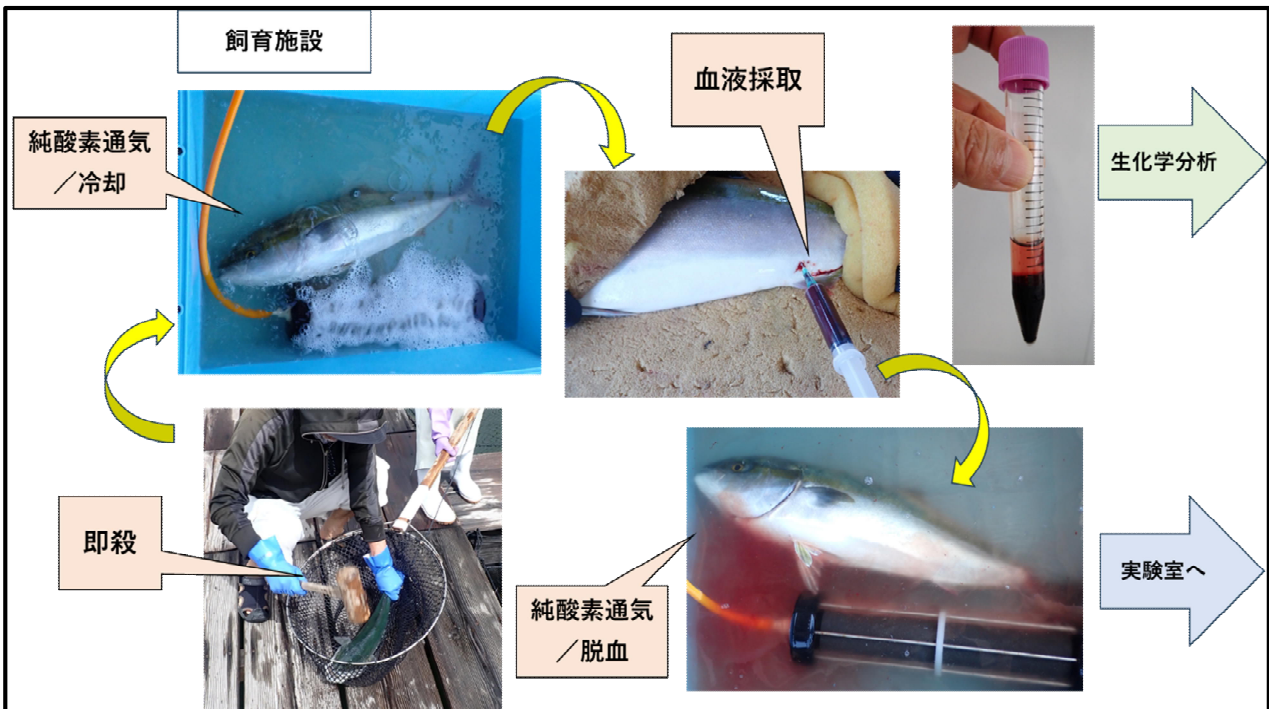
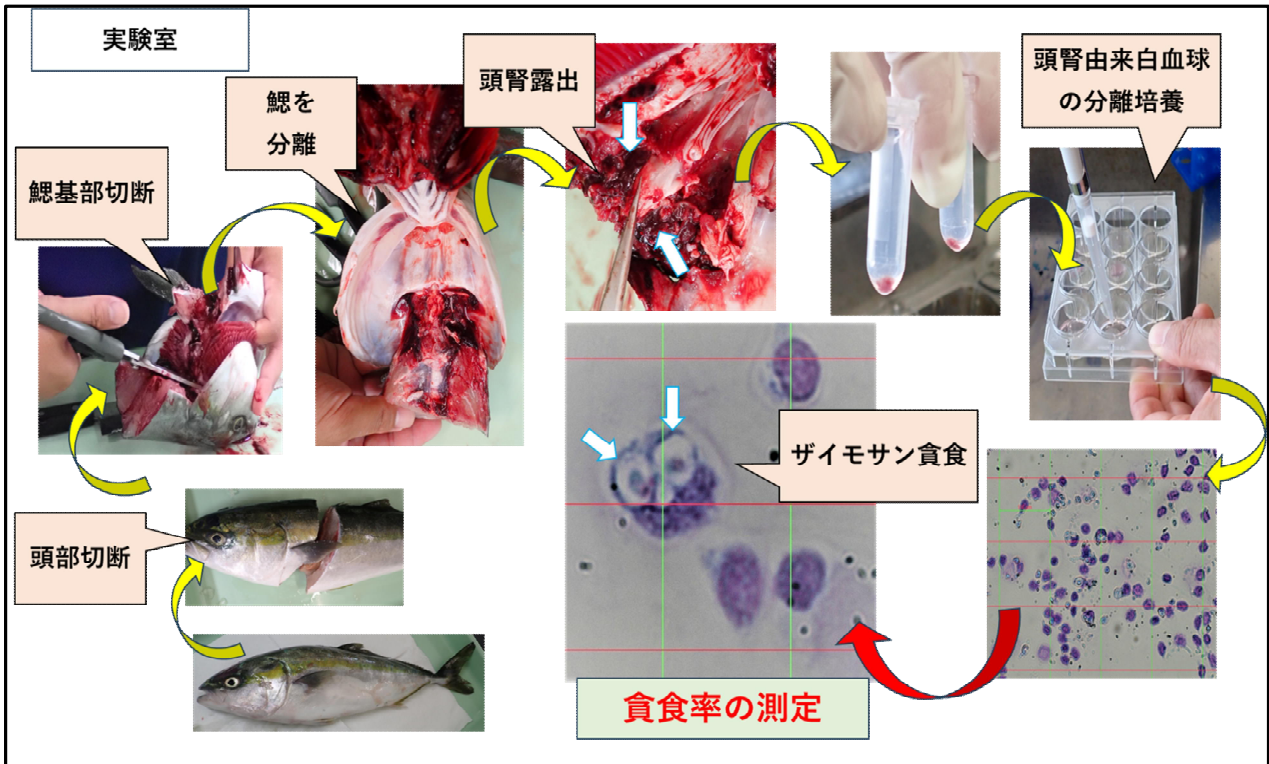


図1 ブリ大型魚からの頭腎由来白血球の採取法の概要

### (3) 絶食した養殖ブリの貪食率の測定

#### 1) 陸上水槽

2024年7月10日に陸上水槽にブリ40個体を収容し、143日間馴致飼育を行った。その後、28個体を無作為に抽出し、14個体ずつ2槽に分け、一方を対照区(通常通り給餌)もう一方を絶食区(12日間絶食、以下「12D」という。)として設定した(表1)。給餌は自動

魚類養殖における飼料高騰対策に向けた補償成長の活用  
 II 長期間の絶食が養殖ブリの免疫に及ぼす影響について

給餌器により行い、毎日午前 8 時 30 分から約 1 時間、ブリ用配合飼料（EP、直径 7mm）を飽食量給餌した。供試魚の採取は絶食開始時、絶食終了時及び再給餌終了時の 3 回実施し、各試験区から 5 個体を無作為に取り上げ、(1) の手順に従って頭腎を摘出した。摘出した頭腎から (2) の手順により白血球を分離し、貪食率を測定した。測定は 1 個体あたり 2 標本を作製し、光学顕微鏡（1000 倍）で約 200 細胞を観察し、その中でザイモサンを貪食した細胞の割合（%）を求めた（表 3）。

表 3 頭腎由来白血球を用いた貪食率の測定の手順

項目	操作
頭腎の摘出と洗浄	1.5mlサンプルチューブに頭腎を入れる RPMI1640培地（以下「培地」という。）500 $\mu$ lを注入 ペッスルで頭腎を潰して分散 10分間静置 600G、3分間遠心分離し、上澄を除去 培地500 $\mu$ l注入、600G、3分間遠心分離し、上澄を除去（2回） 上澄を捨て、培地500 $\mu$ lを注入 ピペッティングし、細胞を懸濁させる
白血球の分離・培養	12穴マルチプレートにカバースリップを入れ、細胞懸濁液のペレット上層にできた白血球の層を約100 $\mu$ lとり、カバーの中心に置く 25°C、1時間インキュベート 各ウェルを培地で3回洗浄し、底に付着しなかった白血球を除去
ザイモサンの貪食	各ウェルに0.5%ザイモサン500 $\mu$ lを入れ、25°C、1時間インキュベート 各ウェルを培地で5回洗浄し、貪食されなかったザイモサンを除去
固定	風乾 各ウェルに-20°Cエタノールを注入し、1分間固定 蒸留水で3回洗浄 風乾
ディフクイック染色	固定液 30秒 染色液Ⅰ 30秒 染色液Ⅱ 30秒
標本の作製	風乾 カバースリップをウェルから取り出し、組織が付着している方を上にしてスライドグラスにマニキュアで貼り付け
白血球貪食率の測定	光学顕微鏡1000倍で検鏡し、白血球約200細胞中、ザイモサンを取り込んだ白血球の割合を算出

製品名	品番	メーカー
PRMI1640培地	R8758	Sigma-Aldrich
ザイモサン	Z4250	Sigma-Aldrich
カバースリップ	83.1840.002	SARSTEDT
12穴マルチプレート	353503	Becton Dickinson

## 2) 海上小割

飼育条件等については、「I ブリにおける補償成長効果の確認」の記載のとおりで、食食率の測定は1) に準じて行った。

## 3 結果及び考察

### (1) 大型魚からの頭腎の摘出法の検討

ブリは、中枢神経を破壊した後も心臓が数分間にわたり自律的に拍動を続けることが知られている。この状態で魚体を溶存酸素濃度が低い冷海水に浸漬すると、低酸素の血液が体内を循環し、速やかに酸欠状態となる。これにより、血液の凝固や循環の停滞が生じ、体内深部の冷却が著しく遅延する(有光ら 2023) ことが、健全な頭腎由来白血球を得るための課題であると考えられた。そこで本課題では、純酸素通気した海水氷を処理に用いる方法を検討した。

その結果、この処理を行った供試魚では、酸欠による狂奔や血液の凝固がほとんど見られなかった。このことから、純酸素通気した海水氷を用いた処理方法は、体内への酸素供給と体内深部の冷却効率を向上させ、細胞の破壊を軽減する上で有効であると考えられた。さらに、供試魚の解剖～頭腎の摘出までの作業を体系化したことにより、複雑な頭蓋骨内に位置し、特定が困難であった頭腎組織への到達が短時間で可能となった。

### (2) 頭腎の処理と食食率の測定法の検討

(1) の手法を用いて摘出した頭腎から白血球を分離し、ギムザ染色して形態観察を行ったところ、濃染される死細胞の割合は極めて低かった。このことから、本課題で確立した処理法により得られた白血球は、生存率が高く、食食率の測定に十分な活性を維持していると判断した(図2)。

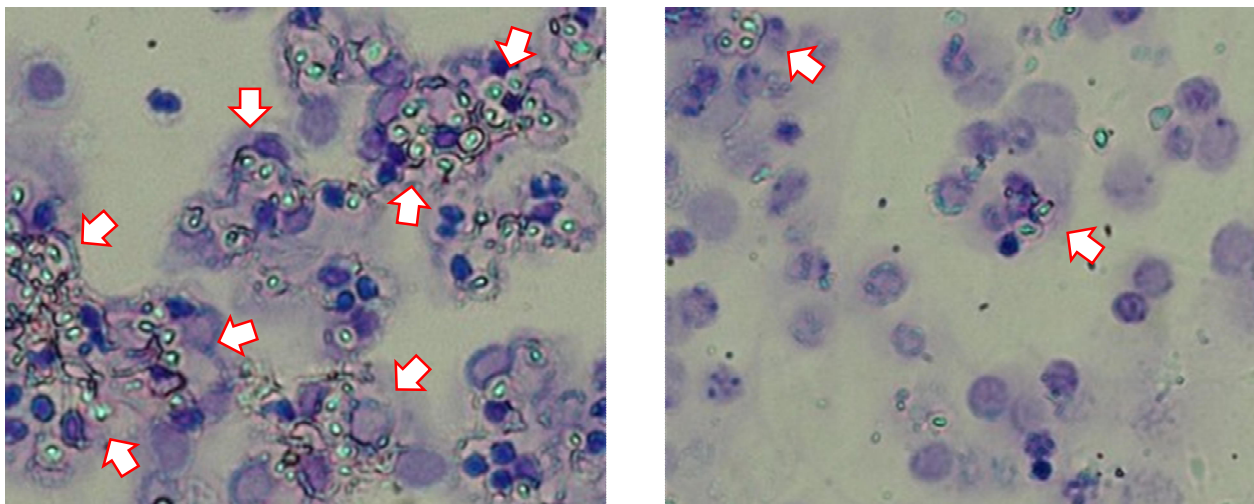


図2 ザイモサンを食食させた白血球の Diff-Quick 染色像 (左：給餌区、右：絶食区)

(⇨)：白血球に食食されたザイモサン. 給餌区のほうが多い

### (3) 絶食した養殖ブリの食食率の測定

#### 1) 陸上水槽

**平均体重の推移**：データロガーにより1時間ごとに記録した試験期間中の飼育水温(平均±

標準偏差、最高-最低)は、 $18.0 \pm 1.2^\circ\text{C}$ 、 $20.2^\circ\text{C} - 15.8^\circ\text{C}$ と、ブリの飼育適水温(下茂ら2000)の範囲内で推移し(図4 左)、各区にへい死は認められなかった。12Dの平均体重は絶食終了時点で給餌区を下回り、再給餌終了時において有意に低い値を示した( $p < 0.05$ ) (図3)。

**食食率の推移:** 12Dの食食率は、絶食開始時から大きく低下し、12日間の絶食終了時には給餌区より有意に低い値を示した( $p < 0.05$ )。しかし、再給餌開始後後8日目には給餌区とほぼ同じ水準に回復した。一方、給餌区の食食率には、試験期間を通じて低下が見られなかった(図4)。

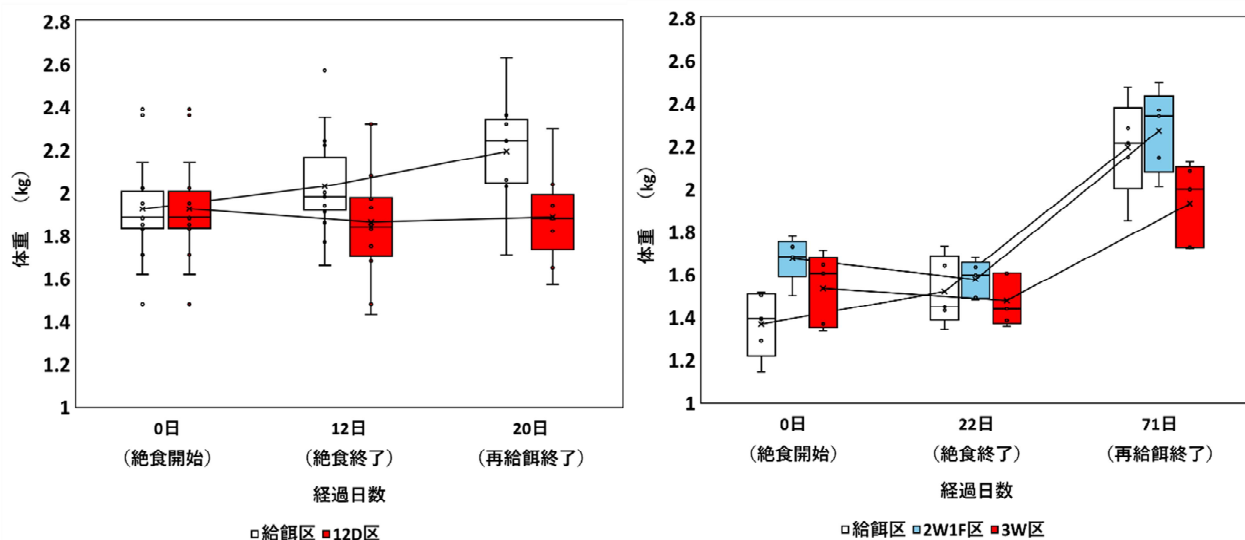


図3 陸上水槽(左)及び海上小割(右)における養殖ブリの体重の推移

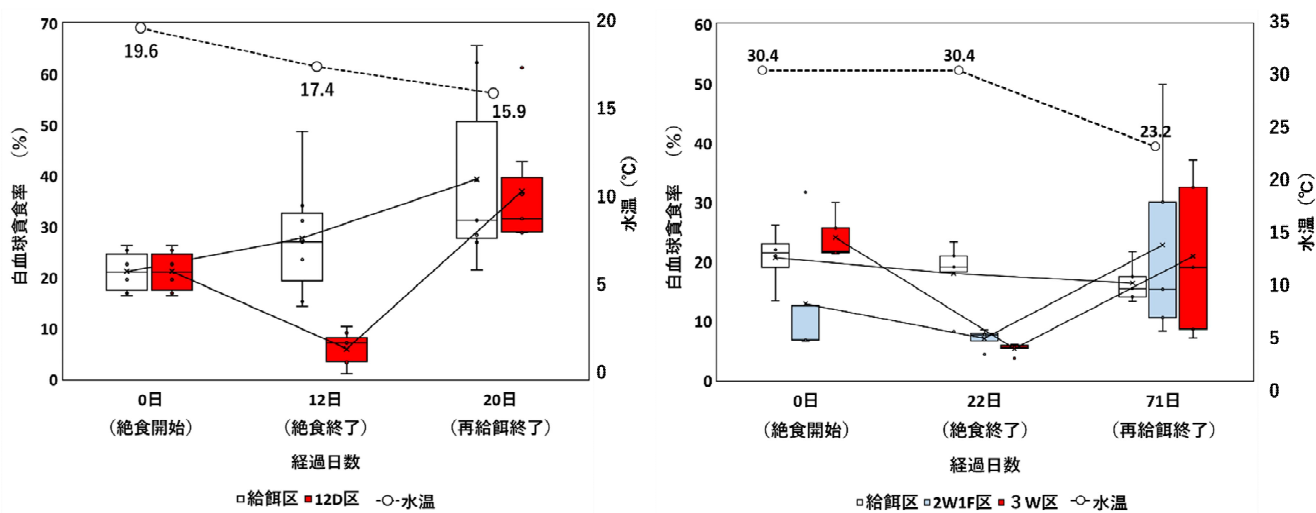


図4 陸上水槽(左)及び海上小割(右)における養殖ブリの白血球食食率の推移

## 2) 海上小割

**平均体重の推移:** 絶食開始時において、各群の平均体重には大きなばらつきが認められた。その要因として、馴致飼育期間が極めて不適な高水温環境下にあったことが挙げられる。期間中、海上小割内の海水温はブリの生息適水温の上限である $30^\circ\text{C}$ を頻繁に上回り、特に試験

開始10日前の8月16日には、ブリの致死的水温(下茂ら2000)に相当する32.8°Cを記録した。このような過酷な環境下でのストレスが、個体ごとの成長に不均一な影響を及ぼしたものと推察される。一方、再給餌終了後の体重は、すべての試験区で増加傾向を示した。このことは、絶食終了から再給餌終了までの海水温が30.4°Cから23.2°Cへと、飼育に適した温度帯まで低下したことにより、高水温のために停滞していた摂餌が活発になったためと考えられる(図3)。

**貪食率の推移:** 2W1F及び3Wの貪食率の推移は12Dと同様の傾向を示し、終了時の3Wの貪食率は絶食開始時から有意に低下した( $p<0.01$ )。再給餌開始50日目には給餌区とほぼ同水準まで回復した。一方、給餌区の貪食率には、試験期間を通じて有意な低下が見られなかった(図4)。

#### 4 まとめ

養殖ブリを12日以上絶食させた結果、自然免疫の指標である白血球貪食能に有意な低下が認められた。

- ・12D、2W1F、3Wのいずれの区においても、絶食により貪食率が低下した。
- ・絶食により低下した貪食率は、給餌再開後8日以上経過すると絶食前の水準に回復した。

以上により、12日以上絶食はブリの白血球貪食能を低下させ、自然免疫力を低下させるおそれがあると考えられた。したがって、補償成長を安全かつ効果的に活用するためには、より短い絶食期間の設定を検討する必要がある。

#### 5 引用文献

有光伸吾・前田 親・岡部正也・柳川晋一(2023)ブリフィレ加工過程における身割れ抑制の取組。海水氷への酸素通気が活け締めしたブリの腹腔内温度に及ぼす影響。令和3年度水産業改良普及事業報告書。高知県水産業振興課, 7-12.

JASP Team (2025). JASP (Version 0.95.4)[Computer software]. <https://jasp-stats.org/>

Magnadóttir B. (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish & shellfish Immunology*, 20, 137-151.

橋口健太郎・河合研兒・今城雅之・大嶋俊一郎(2015)ブリのストレス応答に及ぼす淡水浴の影響。水産増殖。63(1),79-78.

岸本浩和・青木光義(2006)Ⅲ 内部形態の観察。魚類学実験テキスト。岸本浩和・鈴木伸洋・赤川泉 編。東海大学出版会, pp 41-64.

岡部正也・池部慶太・佐伯 昭(2006)アユ冷水病の病害発生阻止に関する研究。冷水病耐病性育種研究。平成16年度事業報告書。高知県内水面漁業センター, 21-27.

下茂 繁・秋本 泰・高浜 洋(2000)海生生物の温度影響に関する文献調査。海生研研報。2, 152-153.

鈴木 譲・末武弘章(2019)第12章 生体防御。増補改訂版 魚類生理学の基礎。会田勝美・金子豊二 編。恒星社厚生閣, pp234-248.