

# 多摩川における魚類の 生息環境と免疫学的研究

1989年

出口吉昭

日本大学農獣医学部水産学科教授

杉田治男

日本大学農獣医学部水産学科専任講師

# 目 次

第 I 章 緒 言 .....	1
第 II 章 魚類血清の殺菌活性測定法の検討 .....	1
(1) 実験方法 .....	1
1. 血清の調製 .....	1
2. 細菌懸濁液の調製 .....	2
3. 殺菌活性の測定 .....	2
4. 抗体価の測定 .....	3
(2) 実験結果 .....	3
1. 血清中の抗体価 .....	3
2. 殺菌活性測定のための至適菌体濃度 .....	3
3. コイおよびフナ血清の殺菌活性 .....	4
(3) 考 察 .....	5
第 III 章 種々の条件で飼育したコイの血清の殺菌活性 .....	6
(1) 実験方法 .....	6
1. 供 試 魚 .....	6
2. 血清の採取および殺菌活性の測定 .....	6
(2) 実験結果および考察 .....	6
1. 給餌量の影響 .....	6
2. 溶存酸素量の影響 .....	7
3. 海水濃度の影響 .....	8
4. 活魚輸送の影響 .....	10
第 IV 章 多摩川に生息するコイおよびフナの血清の殺菌活性 .....	11
(1) 実験方法 .....	11
1. 供試魚の採取 .....	11
2. 血清の調製および殺菌活性の測定 .....	11
3. 環境要因の測定 .....	11
(2) 実験結果および考察 .....	11
1. 環境因子の月別変動 .....	11
2. コイおよびフナ血清の細菌凝集活性および殺菌活性の変動 .....	14
第 V 章 文 献 .....	20

# 第 I 章 緒 言

多摩川において魚類は漁業対象生物であるばかりでなく、釣りなど市民のリクリエーションの対象として極めて重要な存在である。しかし都市河川である多摩川には周辺地域の工場や家庭から多量の汚濁物質が流入している。これら汚濁物質は、直接または間接的に魚類に種々の影響を及ぼしているものと考えられるが、致死的效果を有しない範囲での魚類への影響については殆ど研究が行われていないのが現状である。

しかし、近年養殖魚類を対象に免疫学的手法を用いて魚類の生理状態を定量化する試みが行われ、注目に値する成果が出ている (Sakai 1983, Satoh et al. 1987, 矢野ら 1988)。そこで本研究ではこれら免疫学的方法を用いて魚類の生息環境としての多摩川の状態を検討することを試みた。

まず第 II 章では、標的細胞として従来の赤血球を用いる代わりに、細菌細胞を用いて生体防御能を測定する方法を検討した。第 III 章では、これらの方法を用いて、種々の環境因子がコイの生体防御能に及ぼす影響について検討した。そして IV 章では、多摩川のコイおよびフナの生体防御能を周年測定し、環境因子と関連させて検討を行った。

なお本研究を遂行するにあたり、研究の補助をしていただいた日本大学農獣医学部水産増殖学研究室の大学院生石井 秀氏, Nouama Hajji 女史, ならびに学部学生高橋 淳氏, 秋山俊行氏, 小原 拓氏, 藤松弘一氏, 柄澤 歩氏, 大竹祐治氏, 船崎 薫氏, 井出曜子女史, 山崎寿子女史の各位に深謝する。また、試料を提供して下さった群馬県安中市の田中養鯉場に感謝の意を表す。

## 第 II 章 魚類血清の殺菌活性測定法の検討

魚類血清中の非特異的生体防御因子としては補体代替経路, lysozyme, chitinase, 粘液および interferon などが知られている (Anderson 1974, Funatsu and Tsuru 1977, Lindsay 1986)。近年, Sakai (1983) は魚類の健康状態が補体代替経路の指標である  $SH_{50}$  で推定できることを報告した。さらに, Satoh et al. (1987) および矢野ら (1988) は  $ACH_{50}$  ( $SH_{50}$ ) として測定した補体価を用いて餌料添加物の効果を検討した。また, lysozyme は魚類の生体防御因子として重要であることが多くの研究者によって報告されている (望月・松宮 1981, Lindsay 1986, 高橋ら 1986, 川原・楠田 1988 a, b)。しかしこれらの因子の測定には異なる基質を用いるため、それぞれの活性を直接比較することができない。そこで、本章では細菌細胞を殺傷する能力 (殺菌活性) を指標として魚類血清中の抗体, 補体およびその他の因子の作用を解析する方法を検討した。

### (1) 実験方法

#### 1. 血清の調製

コイ (*Cyprinus carpio*) (体重 370~520 g) は、市販のものを 500 l 容量の循環ろ過式水槽に収容し、1ヶ月以上 25~28 °C で飼育したものを、またフナ (*Carassius carassius*) (同 400~780 g) は 1987 年 11 月に多摩川下流域 (図 1) で採取したものを実験に供した。

MS-222 または 2-phenoxyethanol で麻酔した魚体尾柄部から滅菌注射筒で血液を採取し、室温で数分間、さらに 4 °C で 1 時間放置した後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄液を血清とし、使用直前まで -85 °C で凍結保存した。

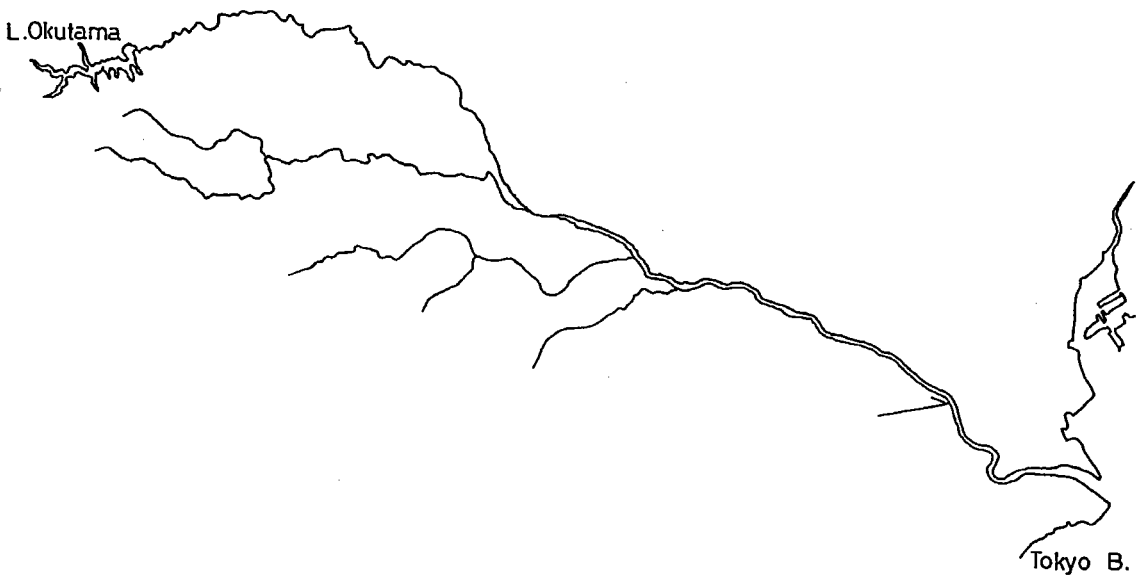


図1 調査地点

## 2. 細菌懸濁液の調製

本実験には Aeromonas hydrophila ATCC 7966, Plesiomonas shigelloides ATCC 14029 および Escherichia coli IAM 1264 (=ATCC 10798) を用いた。殺菌活性測定には Trypticase soy agar (BBL) で 25℃, 48 時間培養した菌体を標的細菌として用いた。また、抗体価測定には, Trypticase soy broth (BBL) で 25℃, 48 時間培養した後, 最終濃度 0.5% になるようホルマリンを加えて殺菌し, その後リン酸緩衝液 (0.12%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.07%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.68%  $\text{NaCl}$ ; pH 7.5) で 3 回洗浄した菌体を使用した。

## 3. 殺菌活性の測定

A. hydrophila, P. shigelloides および E. coli に対するコイおよびフナ血清中の抗体, 補体およびその他の要因の役割を調べるため, 以下の処理を行った血清を用いた。すなわち, ①未処理血清, ②50℃で20分間加熱し (Sakai 1981a, Yano et al. 1986), 補体を非働化した加熱処理血清, ③8 mM の EGTA および 2 mM 塩化マグネシウムを含むリン酸緩衝液で血清中の  $\text{Ca}^{2+}$  をキレート化することによって補体古典的経路を非働化した EGTA 処理血清, ④7 mM EDTA を含むリン酸緩衝液で血清中の  $\text{Ca}^{2+}$  および  $\text{Mg}^{2+}$  をキレート化して補体を非働化した EDTA 処理血清, ⑤  $10^8$  cells/ml の各菌体と 4℃ で 15 分間接触させて血清中の抗体を除去した抗体吸収処理血清, および ⑥ 加熱処理血清 (②) と抗体吸収処理血清 (⑤) を同量ずつ混合した混合血清を用いた。

測定には、各処理血清 0.1 ml および  $1.6 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^7$  cells/ml の濃度に調製した細菌懸濁液（標的細菌）0.1 ml をリン酸緩衝液 0.8 ml に加えた。ただし、混合血清（⑥）を用いるときには血清 0.2 ml および細菌懸濁液 0.1 ml をリン酸緩衝液 0.7 ml に加えた。また、コントロールとして血清の代わりに同量のリン酸緩衝液を加えたものを用いた。予備実験において 25℃ で 3 時間の反応ではコントロールで細菌数の顕著な変動が認められなかったため、この条件で測定を行った。ただし、これらの操作はすべて無菌的に行った。

反応終了後、反応液を滅菌リン酸緩衝液で定量的に希釈し、Trypticase soy agar に接種し、37℃ で 2 日間培養し、生残菌数（CFU/ml）を測定し、次式から殺菌活性を求めた。

$$\text{殺菌活性} = \log_{10} (\text{コントロール中の生残菌数}) - \log_{10} (\text{各血清中の生残菌数})$$

#### 4. 抗体価の測定

各細菌株に対する血清の抗体価測定にはマイクロタイター法を用いた。すなわち V 型のマイクロプレートに生理食塩水を 25 μl ずつ分注し、ダイリューターを用いて血清を 2 倍ずつ希釈した。さらに、 $2.0 \times 10^9$  cells/ml に調整した細菌懸濁液（抗原）を 25 μl ずつ加えて混合し、25℃ で 1 時間反応させた後、4℃ で 1 晩放置した。その後、細菌凝集の有無を観察し、凝集の生じた希釈段階のうち、最も高い希釈倍率を抗体価とした。

## (2) 実験結果

### 1. 血清中の抗体価

コイ血清の抗体価は、A. hydrophila 抗原で  $< 4 \sim 128$ （平均 22）、P. shigelloides 抗原で  $4 \sim 32$ （同 11）であり、E. coli 抗原で  $< 4 \sim 512$ （同 115）であった。一方 フナ血清では、A. hydrophila 抗原で  $< 2 \sim 4$ （平均 2）、P. shigelloides 抗原で  $2 \sim 16$ （同 6）、そして E. coli 抗原で  $4 \sim 128$ （同 68）の抗体価を示した。以上の結果からコイおよびフナ血清は 3 菌株のうち、E. coli 菌体に対する抗体価が最も高いことが判明した。

### 2. 殺菌活性測定のための至適菌体濃度

種々の反応菌体濃度（ $1.6 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^8$  cells/ml）におけるコイ血清の殺菌活性値を図 2 に示した。

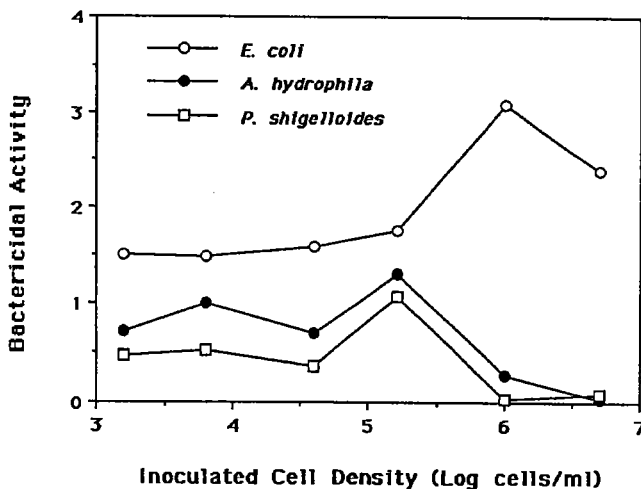


図 2 種々の標的細菌濃度におけるコイ血清の殺菌活性

最大殺菌活性値は A. hydrophila および P. shigelloides を標的細菌としたときには  $2.0 \times 10^5$  cells/ml であり, E. coli を用いたときには  $1.0 \times 10^6$  cells/ml であった。そこで, 以後の実験にはこの濃度に調整した標的細菌を用いることにした。

### 3. コイおよびフナ血清の殺菌活性

種々の処理を行ったコイ血清の3菌種に対する殺菌活性を図3に示した。E. coli に対する未処理血清の殺菌活性値は平均2.71であり, A. hydrophila (0.93) および P. shigelloides (0.97) よりもかなり高い値を示した。加熱処理およびEDTA処理によって補体を非動化した血清の殺菌活性は, E. coli に対してはわずかながら活性が認められたものの(0.76), 他ではほとんど活性がなかった(-0.54 ~ 0.10)。EGTA処理血清, 抗体吸収処理血清および混合血清の殺菌活性はいずれの細菌種においてもほぼ未処理血清と同様の値を示した。

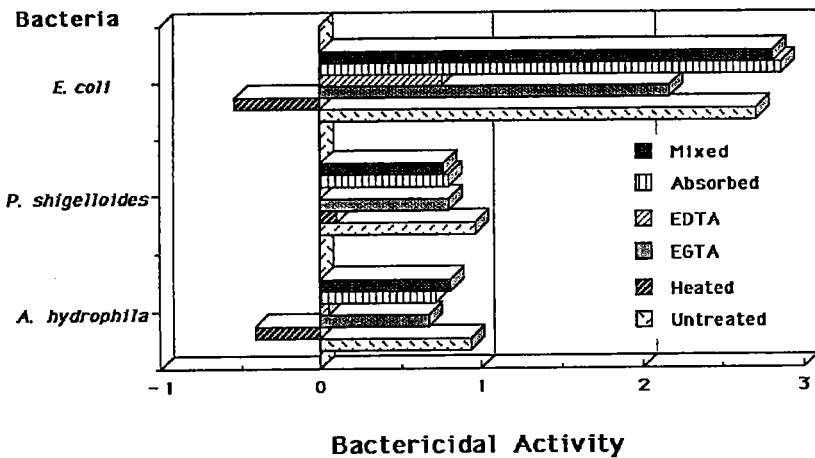


図3 3菌種に対するコイ各処理血清の殺菌活性(平均)

フナの殺菌活性もコイとほぼ同様な傾向を示した(図4)が, 標的細菌種によってその活性値が異なることが判明した。

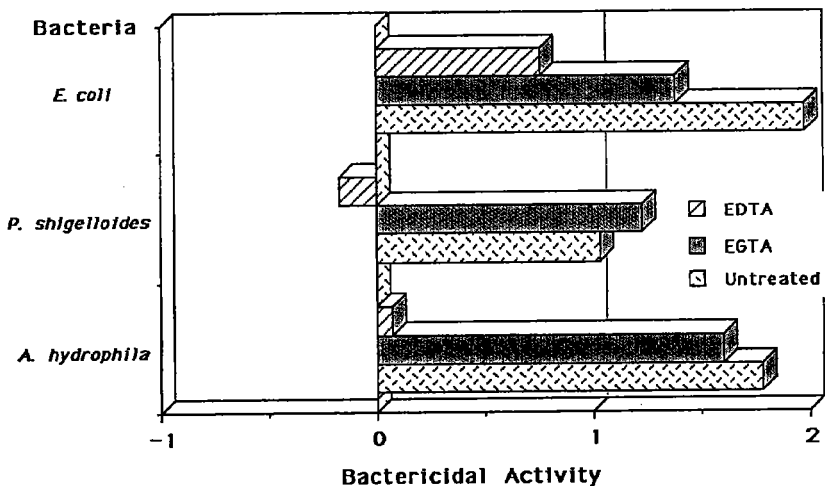


図4 3菌種に対するフナ各処理血清の殺菌活性(平均)

### (3) 考 察

補体には古典的および代替経路が存在し、それらが活性化されると phospholipase が産出され、それによって赤血球や微生物の細胞膜が破壊されることが知られている(近藤 1980)。古典的経路の活性化には免疫グロブリン IgM または IgG が要求されるが、代替経路は細菌の細胞壁, lipopolysaccharide などによって直接活性化される。高等動物では外来の細胞がマクロファージや好中球によって速やかに捕食されるため、代替経路が主導的に働くことは極めてまれである。そこで、Alexander (1985) は本経路が古いタイプ (ancient) であると考えた。

Sakai (1983) は代替経路の活性の指標である SH<sub>50</sub> (non-specific haemolytic activity) がサケ科魚類の健康評価に有効であることを報告した。しかしながら、SH<sub>50</sub> や通常ヒトの臨床検査で用いられている ACH<sub>50</sub> の測定には、新鮮な動物赤血球が必要であるため(近藤 1980, Sakai 1981b, Yano et al. 1988), 通常の実験室ではその準備に手間がかかることや、魚類の血液が溶血しやすいため、判定が困難なことがあるなどの問題があった。そこで本研究では比較的調製が容易である細菌を標的細胞として用いる方法を検討した。

A. hydrophila, P. shigelloides および E. coli を標的細胞として用いたところ、殺菌活性値に顕著な差異が認められた。Munn et al. (1982) は魚病細菌 Aeromonas salmonicida の補体抵抗性には菌体表面の A-protein および lipopolysaccharide が関与していることを報告した。この報告は、A. hydrophila/P. shigelloides と E. coli に対する殺菌活性値の差異が同様の機序による可能性を示唆している。A. hydrophila および P. shigelloides は淡水魚類の腸内に常在する細菌であることから、これらの細菌が魚類血清の殺菌作用に抵抗力を有することは腸管への定着を考えると、重要な性質であることが考えられる。

血清の殺菌作用における抗体、補体およびその他の物質の役割を解析するため、種々の処理を行った血清を用いて殺菌活性を測定した。加熱処理または EDTA 処理を施して補体を非働化した血清では活性値が著しく低かったが、EGTA 処理、抗体吸収処理および混合血清は未処理血清と同程度の高い活性値を示した(図 1, 2)。これらの処理血清中には抗体や Ca<sup>2+</sup> が存在しないことから、コイやフナ血清の殺菌活性には補体代替経路が主要な役割を演じていることが判明した。

しかしながら、E. coli を標的細胞としたとき、加熱処理血清にはほとんど殺菌活性が認められなかったが、EDTA 処理血清には僅かながら殺菌活性があることが判明した。これは、活性が 50℃ で 20 分間の加熱によって失活するが、Ca<sup>2+</sup> および Mg<sup>2+</sup> を要求しないことを示し、それが補体代替経路とは異なった物質によることを意味する。川原と楠田 (1988 a, b) および高橋ら (1986) は魚類血清中には lysozyme が存在し、それらが EDTA によって僅かに阻害されることを報告している。また、近藤 (1980) は lysozyme の活性は細菌種によって異なることを報告している。これらの報告はコイやフナ血清の殺菌活性には補体代替経路のほか lysozyme が関与していることを強く示唆するものであろう。

従来、補体活性の測定には赤血球が、また lysozyme の測定には Micrococcus lysodeikticus が用いられてきたが、これらの方法では同一試料中の各々の活性の強弱を直接比較することができない。しかし、今回新たに開発した方法を用いることによって、これらの比較が可能であることが判明したので、以後この方法を用いて研究を進めることとした。

### 第Ⅲ章 種々の条件で飼育したコイの血清の殺菌活性

第Ⅱ章では、大腸菌 E. coli を標的細胞として用いることによって魚類血清の生体防御能、特に補体古典的経路、代替経路および lysozyme 様物質の活性を各々測定できることが判明したので、本章においてはこの方法を用いて種々の条件で飼育したコイ血清の殺菌活性を測定することにより、環境因子がコイの生体防御能に及ぼす影響について検討した。

#### (1) 実験方法

##### 1. 供試魚

供試魚には体重 490～1941 g のコイを用いた。これらのコイを循環ろ過槽を設定した 400 ℓ 容量のプラスチックタンクに収容し、以下の条件で飼育した。

##### 1-1 給餌量

4組の水槽にコイを6尾ずつ収容し、毎日体重の0～1%の配合飼料(コイ育成用、日本配合飼料)を2週間投与した。

##### 1-2 溶存酸素量

3組の水槽にコイを6尾ずつ収容し、その後1週間で各水槽水の溶存酸素量を2.8, 4.4および6.2 ppmの3段階に調製し、さらに1週間その状態で飼育した。

##### 1-3 海水濃度

0～25%に調製したHerbstの海水(NaCl 30g, KCl 0.7g, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.8g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5.4g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1g)(河合ら1988)を満たした3組の水槽にコイを6尾ずつ収容した。

##### 1-4 輸送

群馬県安中市内の養魚池で飼育されたコイを取り上げ、ビニール袋に入れ、酸素を注入した後、封入し、約120 kmを約3時間半かけて研究室に運んだ。

##### 2. 血清の採取および殺菌活性の測定

上記の実験を開始する直前と実験終了後の魚体から第Ⅱ章で報告した方法により血清を採取し、未処理血清、EGTA処理血清およびEDTA処理血清のE. coliに対する殺菌活性を測定した。

#### (2) 実験結果および考察

##### 1. 給餌量の影響

毎日体重の0, 0.25, 0.5および1%の配合飼料を投与して2週間飼育したコイの結果を表1に示した。実験直前のコイ血清の平均殺菌活性値は未処理血清で2.91～3.47, EGTA処理血清で2.35～3.12, そしてEDTA処理血清で0.39～1.08であり、2週間後のものでは未処理血清で2.90～3.50, EGTA処理血清で2.28～3.03およびEDTA処理血清で0.17～1.02であった。以上の結果を統計処理(F検定)したところ、0%給餌群のlysozyme様活性(EDTA処理血清)においてのみ有意な減少が認められたものの、補体活性や他の給餌群の血清では顕著な殺菌活性の増減は認められなかった。



表1 種々の給餌量で飼育したコイの殺菌活性

給餌量 (%)	血清	実験前	実験後
0	未処理血清	3.47±0.68*	2.90±0.31**
	EGTA処理血清	2.90±0.39	2.64±0.22
	EDTA処理血清	0.39±0.73	0.17±0.26
0.25	未処理血清	2.91±0.59	3.26±0.68
	EGTA処理血清	2.35±0.49	2.38±1.09
	EDTA処理血清	0.86±0.49	1.02±0.92
0.5	未処理血清	3.03±0.93	3.14±0.57
	EGTA処理血清	2.42±0.90	2.28±0.83
	EDTA処理血清	1.08±0.33	0.41±0.15
1	未処理血清	3.37±0.87	3.50±0.87
	EGTA処理血清	3.12±1.05	3.03±0.87
	EDTA処理血清	1.06±0.38	0.75±0.58

\* 平均殺菌活性±標準偏差(n=6).

\*\* 有意差 (p<0.05) .

## 2. 溶存酸素量の影響

溶存酸素濃度を 2.8, 4.4 および 6.2 ppm に調整した水中で飼育したコイの結果を表 2 に示した。実験直前のコイ血清の平均殺菌活性値は未処理血清で 2.54~2.95, EGTA 処理血清で 1.51~2.62 および EDTA 処理血清で 0.30~1.07 であり, 実験終了時のものでは未処理血清で 2.18~3.01, EGTA 処理血清で 1.53~2.72 および EDTA 処理血清で 0.00~0.54 であり, 2.8 ppm 群の EDTA 処理血清 および 4.4 ppm 群の未処理血清の殺菌活性において有意な減少があったものの, 他の処理血清や 6.2 ppm 群のコイにおいては顕著な活性の変動は認められなかった。

表2 種々の溶存酸素量で飼育したコイの殺菌活性

酸素量 (ppm)	血清	実験前	実験後
2.8	未処理血清	2.54 ± 0.66*	2.18 ± 0.77
	EGTA処理血清	1.51 ± 0.69	1.53 ± 0.75
	EDTA処理血清	0.30 ± 0.45	0.00 ± 0.05**
4.4	未処理血清	2.58 ± 0.64	2.22 ± 0.27***
	EGTA処理血清	2.17 ± 0.66	1.95 ± 0.73
	EDTA処理血清	0.71 ± 0.59	0.54 ± 0.42
6.2	未処理血清	2.95 ± 0.76	3.01 ± 0.55
	EGTA処理血清	2.62 ± 0.49	2.72 ± 0.44
	EDTA処理血清	1.07 ± 0.48	0.38 ± 0.80

\* 平均殺菌活性 ± 標準偏差 (n=6).

\*\* 有意差 (p<0.01).

\*\*\* 有意差 (p<0.05).

### 3. 海水濃度の影響

0, 10 および 25% に希釈した人工海水中で 2 週間飼育したコイの結果を表 3 に示した。実験直前のコイ血清の平均殺菌活性値は未処理血清で 2.95 ~ 4.70, EGTA 処理血清で 2.51 ~ 3.92 そして EDTA 処理血清で 0.39 ~ 1.79 であり, 2 週間後のものでは未処理血清で 2.97 ~ 4.31, EGTA 処理血清で 2.27 ~ 3.70 および EDTA 処理血清で 0.25 ~ 1.53 であった。0% 群の lysozyme 活性に若干の有意な減少が認められたものの, 全体としてはあまり顕著な変動は認められなかった。

表3 種々の海水濃度で飼育したコイの殺菌活性

実験	海水濃度 (ppm)	血清	実験前	実験後
1	0	未処理血清	3.45±1.09*	3.61±0.68
		EGTA処理血清	2.95±0.72	3.70±0.88
		EDTA処理血清	0.54±0.58	0.54±0.45
	10	未処理血清	3.28±1.12	3.46±0.83
		EGTA処理血清	2.86±1.58	2.87±1.48
		EDTA処理血清	1.15±1.24	1.01±1.15
	25	未処理血清	4.70±0.43	4.31±0.49
		EGTA処理血清	3.92±0.87	3.94±0.65
		EDTA処理血清	1.79±0.96	1.53±0.88
2	0	未処理血清	3.62±0.96	3.23±0.85
		EGTA処理血清	2.79±0.80	2.28±0.43
		EDTA処理血清	0.39±0.34	0.26±0.11**
	10	未処理血清	2.95±0.68	3.27±0.80
		EGTA処理血清	2.51±0.48	2.61±1.04
		EDTA処理血清	0.70±0.26	0.33±0.15
	25	未処理血清	3.30±0.72	2.97±0.62
		EGTA処理血清	2.92±0.72	2.27±0.60
		EDTA処理血清	0.60±0.43	0.25±0.23

\* 平均殺菌活性±標準偏差.

\*\* 有意差 (p<0.05) .

#### 4. 活魚輸送の影響

約3時間半かけて輸送したコイ血清の殺菌活性値の結果を表4に示した。輸送直前のコイ血清の平均殺菌活性値は未処理血清で2.44~3.01, EGTA処理血清で1.64~2.46およびEDTA処理血清で0.04~0.16であったのに対し, 輸送後では未処理血清で2.01~3.10, EGTA処理血清で1.96~2.72およびEDTA処理血清で0.24~0.58であり, いずれの季節の試料においても lysozyme 様活性の上昇が認められた。また, 未処理血清やEGTA処理血清においても有意な変動が認められた。

表4 活魚輸送したコイの殺菌活性

月	血清	実験前	実験後
5	未処理血清	2.47±0.03*	2.46±0.33
	EGTA処理血清	2.46±0.10	2.24±0.23
	EDTA処理血清	0.08±0.12	0.51±0.32**
8	未処理血清	3.01±0.12	2.19±0.51***
	EGTA処理血清	1.99±0.20	1.96±0.73
	EDTA処理血清	0.16±0.10	0.58±0.37**
11	未処理血清	2.55±0.17	3.10±0.12***
	EGTA処理血清	1.64±0.53	2.72±0.56**
	EDTA処理血清	0.05±0.04	0.57±0.32***
2	未処理血清	2.44±0.30	2.01±0.28**
	EGTA処理血清	2.04±0.16	2.20±0.32
	EDTA処理血清	0.04±0.08	0.24±0.11**

\* 平均殺菌活性±標準偏差(n=6).

\*\* 有意差 (p<0.05) .

\*\*\* 有意差 (p<0.01) .

以上の結果から, コイ血清中の lysozyme 様活性は2週間無給餌または低酸素状態で飼育すると僅かに減少するが, 3時間半程度の短時間の輸送ストレスに対しては逆に若干上昇することが判明した。これらの結果は, 短時間のストレスと2週間程度の長時間のストレスではコイの対応が著し

く異なることを示唆するものであろう。

Sakai et al. (1983)はサケ科魚類を10~20日間絶食させたり、病原菌 *Aeromonas salmonicida* を接種して発病させることにより補体代替経路の活性 ( $SH_{50}$ ) が減少することから、本活性が魚類の健康評価に有効であることを報告した。しかしながら、本研究でコイを無給餌、低酸素または高塩分の状態で飼育したり、活魚輸送しても補体活性の顕著な減少は認められなかった。その理由としてコイは2週間程度の絶食、2.2 ppm程度の溶存酸素量および25%程度の海水濃度では補体活性を減少させる程度にストレスを受けてないことが考えられるが、このほかに、コイの殺菌活性値に大きな個体差があることも関与するものと考えられる。そのため、EDTA処理血清における lysozyme 様活性の方が補体よりも比較的敏感に反応するようにも思われるが、いずれにしても、魚類の健康評価を行うためには、さらに詳細な検討が必要である。

## 第IV章 多摩川に生息するコイおよびフナの血清の殺菌活性

本章では、多摩川下流域において採取したコイおよびフナ血清の殺菌活性および抗体価を周年測定することによって、コイおよびフナの生体防御能と環境因子との関連について検討した。

### (1) 実験方法

#### 1. 供試魚の採取

1988年4月から1989年3月にかけて多摩川丸子橋付近(図1)においてコイおよびフナを釣獲し、その場で麻酔し、血液を採取した。血液は水冷し、研究室に運んだ。

#### 2. 血清の調製および殺菌活性の測定

血清の調製、*E. coli*に対する殺菌活性および細菌凝集活性の測定は前述の方法(第II章)に準拠して行った。

#### 3. 環境要因の測定

水温は棒状水銀温度計で、また水中の溶存酸素量(DO)および化学的酸素要求量(COD)は河合らのマニュアル(1988)に準拠して測定した。水中の細菌数は、試水を10倍ずつに希釈し、Sugita and Deguchi (1983)の1/20 PYBGF 寒天培地(0.05% Trypticase peptone (BBL), 0.025% phytone peptone (BBL), 0.001% Lab-lemco powder (Oxoid), 0.01% Bacto-yeast extract (Ditco), 0.01% グルコース, 1% Agar No. 1 (Oxoid))に接種し、20℃で10日間好気的条件下で培養し、出現したコロニー数から求めた。

### (2) 実験結果および考察

#### 1. 環境因子の月別変動

多摩川下流域の河川水の環境因子の月別の値を図5~7に示した。1988年は異常気象のため、夏季水温が例年(Sugita et al. 1983, Sugita et al. 1989)より数℃程度低かった(図5)。このため、最高気温は5月の25.5℃、また最低気温は1月の7.9℃であった。

溶存酸素量は夏~冬季に比較的安定した数値を示したが、春季に大きく変動した。最高値は5月の11.1 ppm、また最低値は6月の3.2 ppmであった(図6)。

CODは概ね春季および冬季に高く、夏季に低い傾向が認められた(図7)。最高値は6月の6.4 ppm、また最低値は10月の1.7 ppmであった。

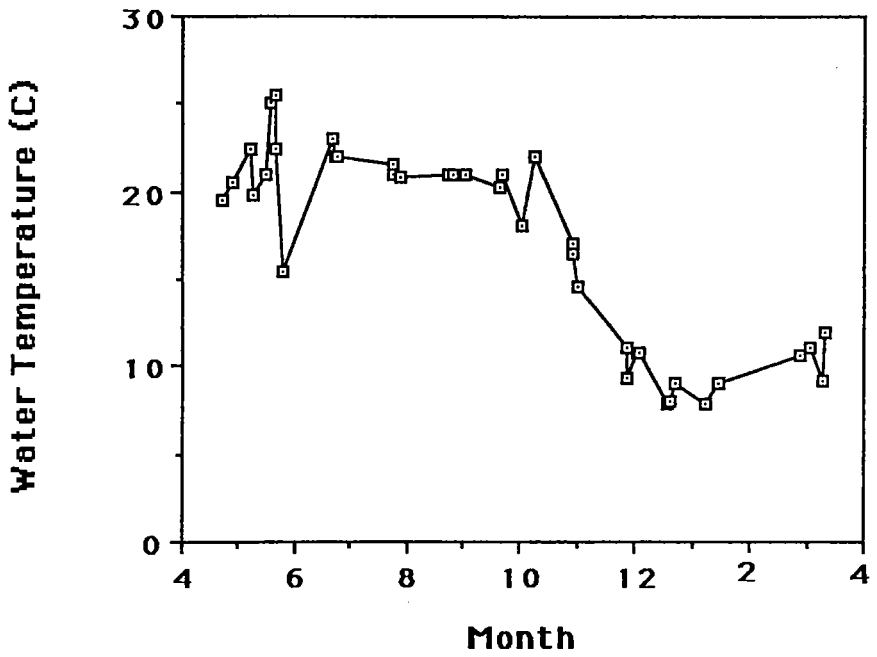


図5 多摩川下流域における水温の周年変化

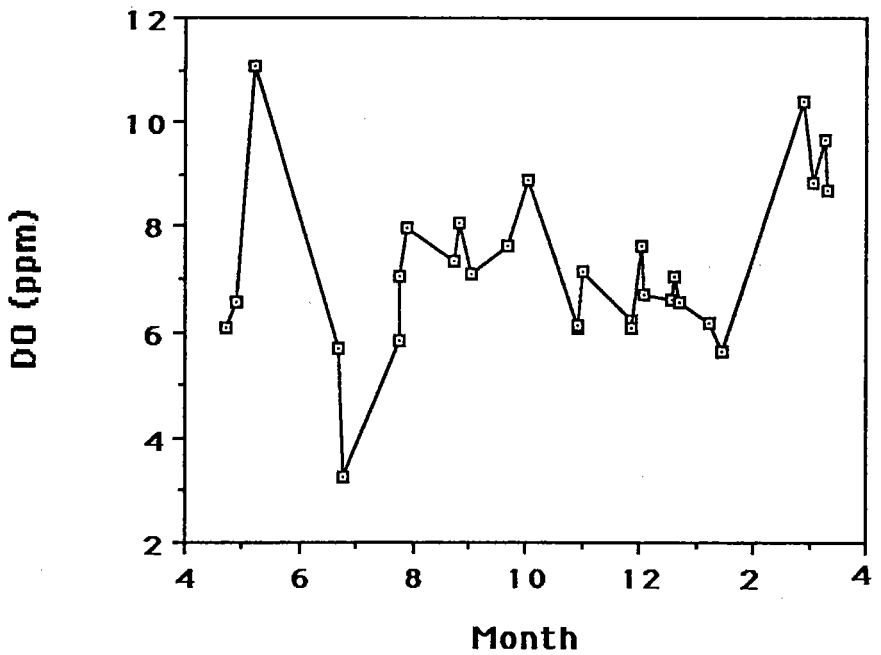


図6 多摩川下流域におけるDOの周年変化

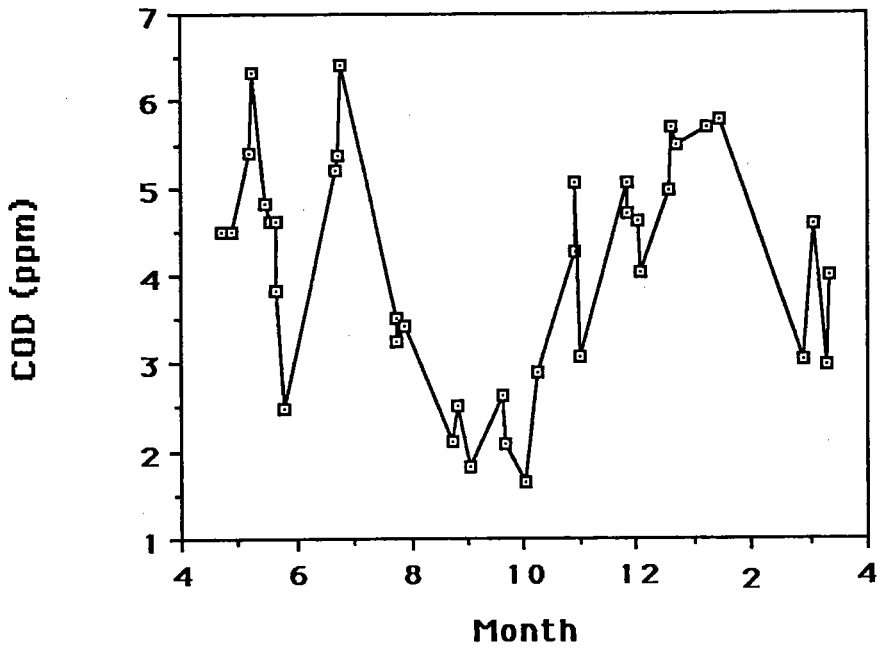


図7 多摩川下流域におけるCODの周年変化

細菌数は周年比較的安定しており、最高値は  $3.8 \times 10^5$  CFU/ml、最低値は  $5.8 \times 10^4$  CFU/ml であった(図8)。

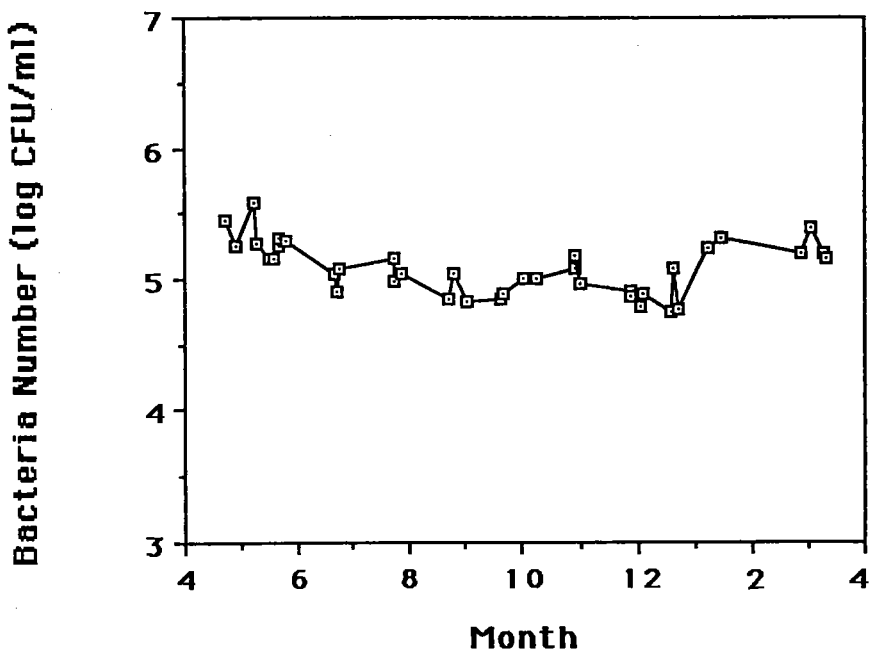


図8 多摩川下流域における従属栄養細菌数の周年変化

2. コイおよびフナ血清の細菌凝集活性および殺菌活性の変動

1988年4月から1989年3月に捕獲したコイおよびフナは各々129および58尾であり、体重は各各0.21～5.65 kgおよび0.36～1.06 kgであった。なお、月別の採捕試料数を図9に示した。

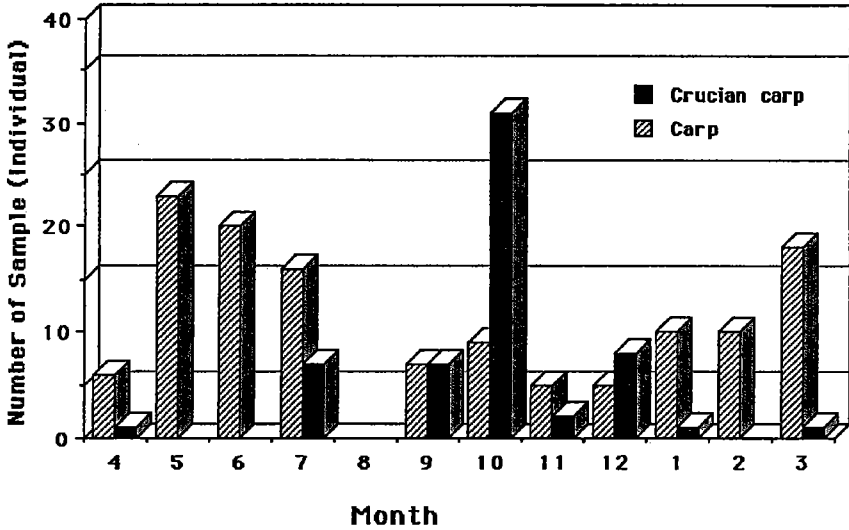


図9 採捕したコイおよびフナの毎月の個体数

コイ血清の *E. coli* 凝集活性は、8～12月に高い傾向が得られた(図10)。未処理血清の殺菌活性は8～11月に若干低い傾向が観察された(図11)。EGTA処理血清の殺菌活性はある程度の変動はあるものの、ほぼ同様な値を示した(図12)。EDTA処理活性は測定毎の変動が極めて大きく、特定の傾向は見いだせなかった(図13)。

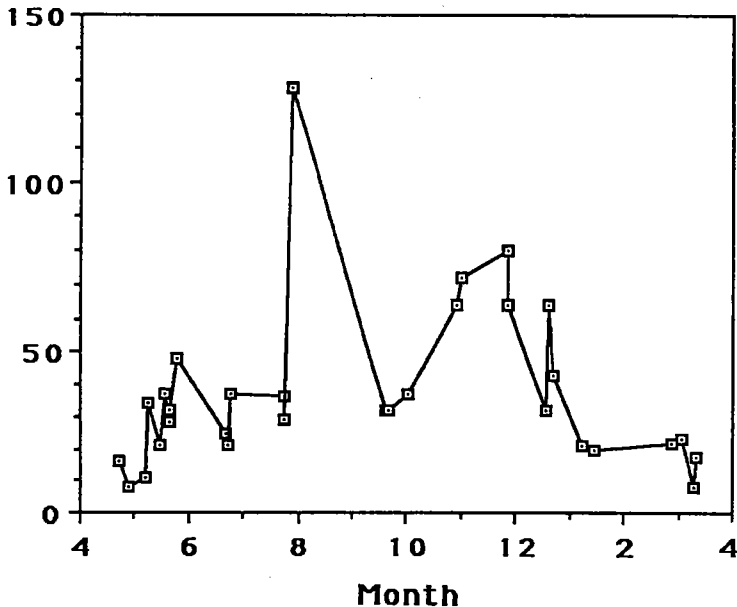


図10 コイ血清の細菌凝集活性(titer)の周年変化(平均)



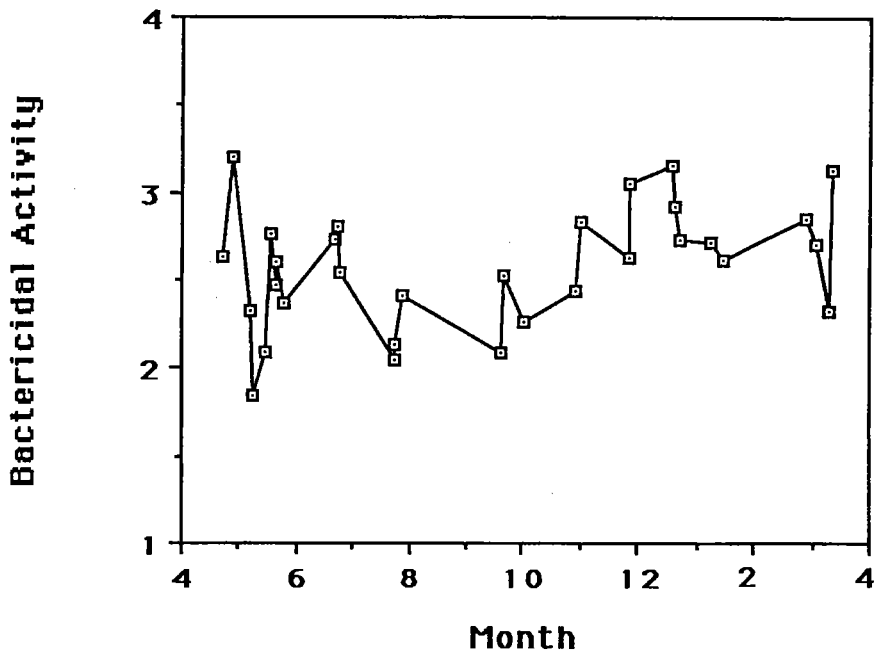


図 11 コイ未処理血清の殺菌活性の周年変化(平均)

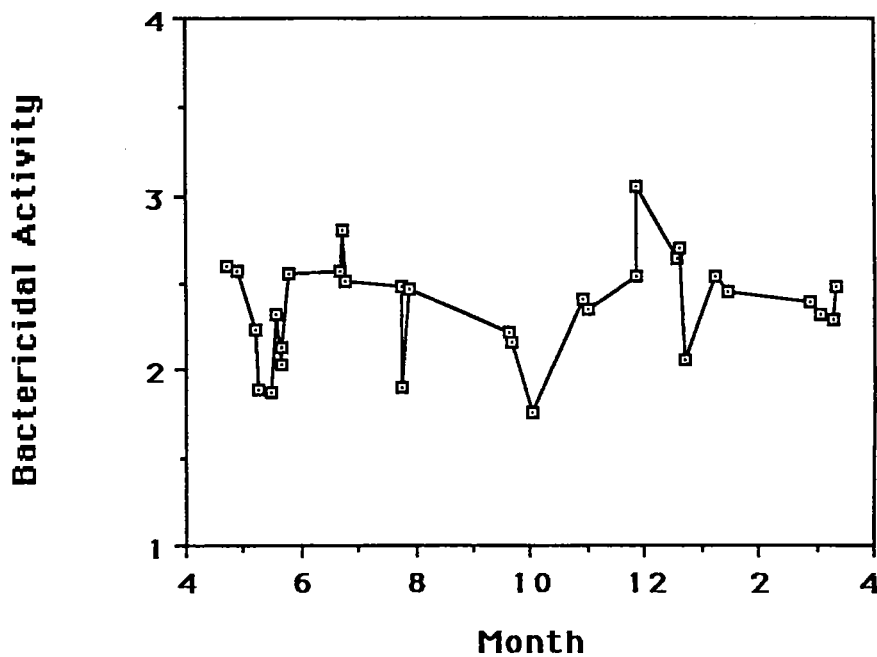


図 12 コイ EGTA 処理血清の殺菌活性の周年変化(平均)

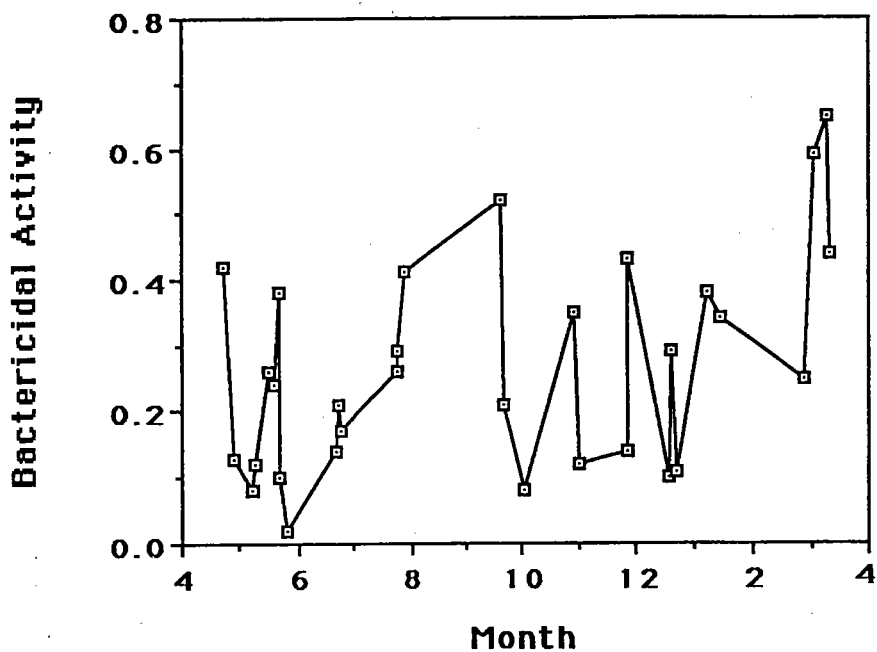


図13 コイ EDTA 処理血清の殺菌活性の周年変化(平均)

フナ血清の *E. coli* 凝集活性は、10~12月に高い値が観察された(図14)。血清の殺菌活性は、試料数が特定の月に偏っていることもあり、一定の傾向は認められなかった(図15~17)。

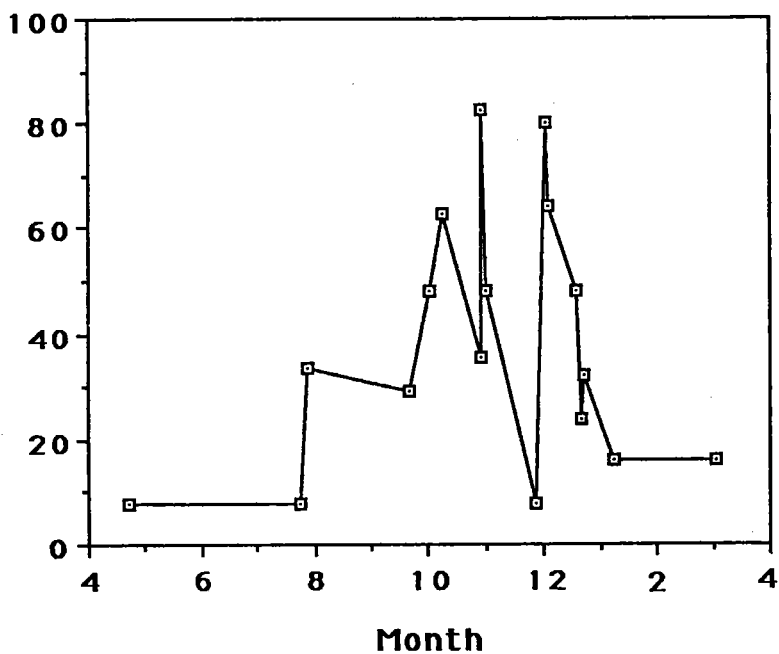


図14 フナ血清の細菌凝集活性(titer)の周年変化(平均)

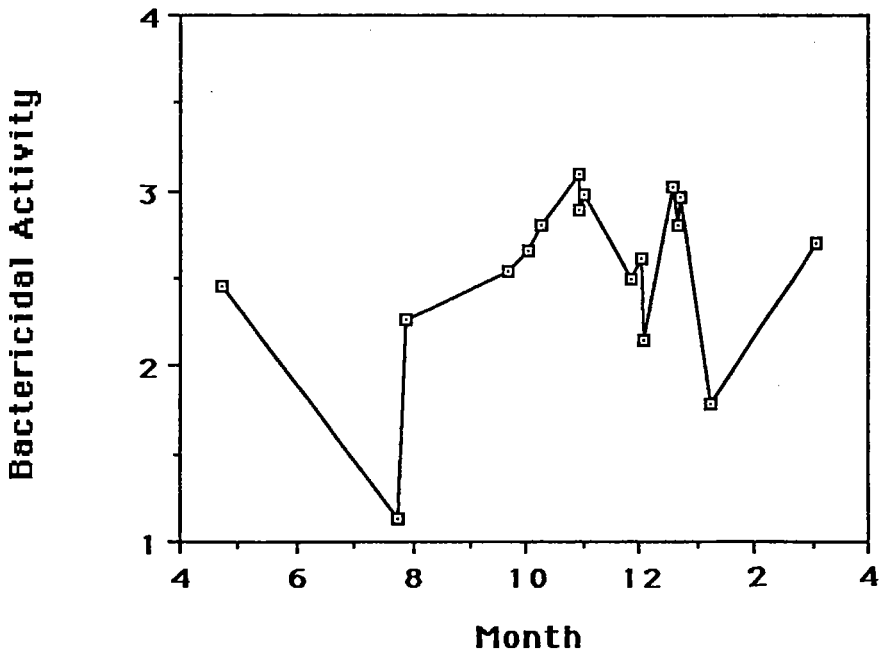


図 15 フナ未処理血清の殺菌活性の周年変化(平均)

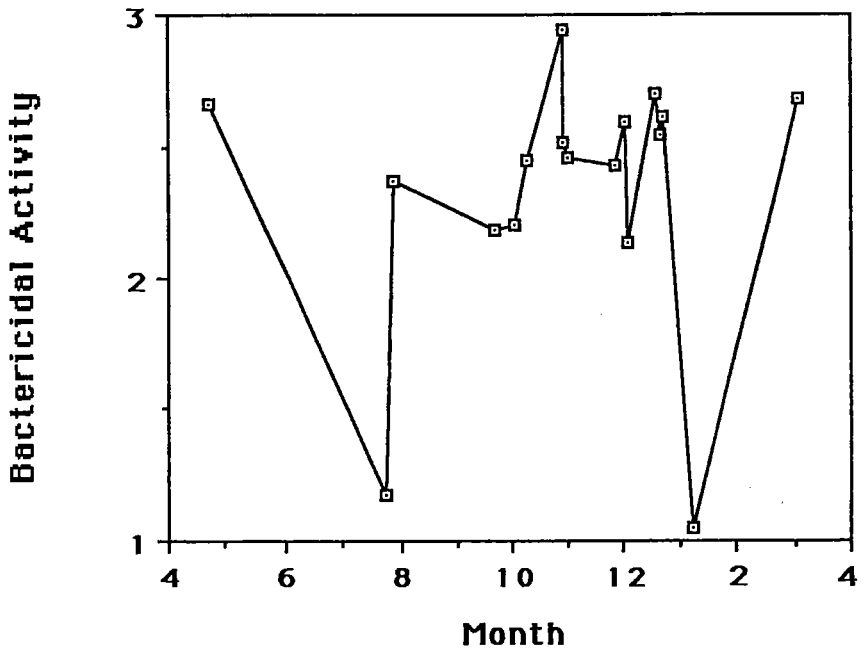


図 16 フナ EGTA 処理血清の殺菌活性の周年変化(平均)

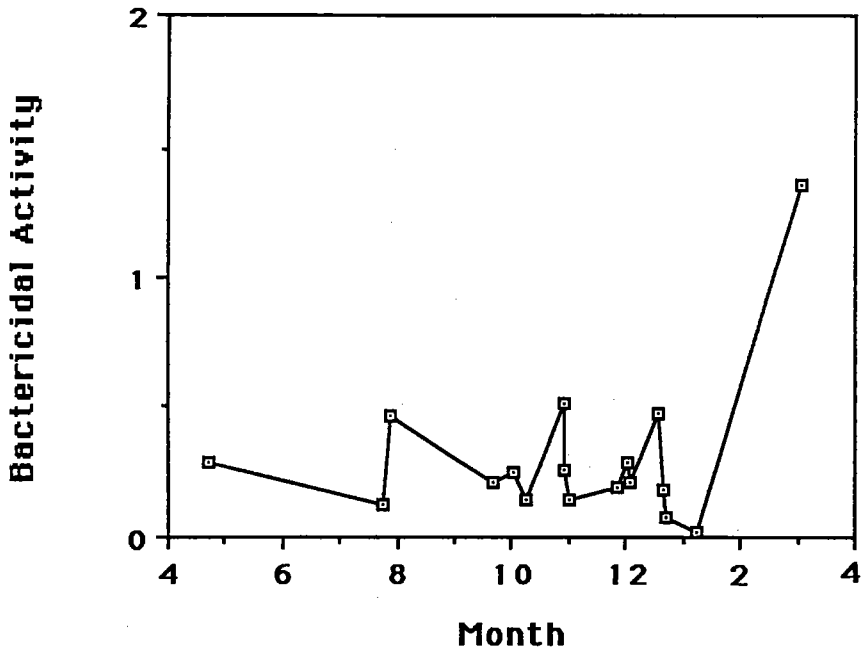


図17 フナ EDTA 処理血清の殺菌活性の周年変化（平均）

これらの数値を基に各項目間の相関係数を求め、表5～6にまとめた。未処理血清とEGTA処理血清の殺菌活性が比較的高い相関を示したが、これはコイおよびフナ血清の殺菌活性がおもに補体代替経路に起因する事実（第Ⅱ章）によるものであろう。この他、コイでは、未処理血清と水温、補体代替経路と水温および溶存酸素量、またフナでは未処理血清と抗体価、lysozyme 様活性と細菌数および溶存酸素量において比較的高い相関（ $-0.35 \sim -0.43$ ， $0.39 \sim 0.53$ ）が得られた。このことはフナの試料が特定の時期に採取されたことのほかに、同じコイ科魚類であってもコイとフナとでは血清中の生体防御因子が影響を受ける環境因子が異なっていることを示すものであるとも考えられる。また、第Ⅲ章で判明したように、たとえ同一の条件で飼育されたコイでもその生体防御因子に大きな個体差があることも見逃せない。

比較的良好な環境（流水式養魚）で飼育されている養殖ゴイと多摩川のコイを比較すると、補体活性にはあまり大きな差異は認められなかったものの、lysozyme 活性が概して後の方が大きいことから、なんらかのストレスを受けていることが示唆されるが、この点については一層の検討が必要である。今後は、飼育実験と併用しながらこれらの環境因子との関係について詳細に検討する必要がある。

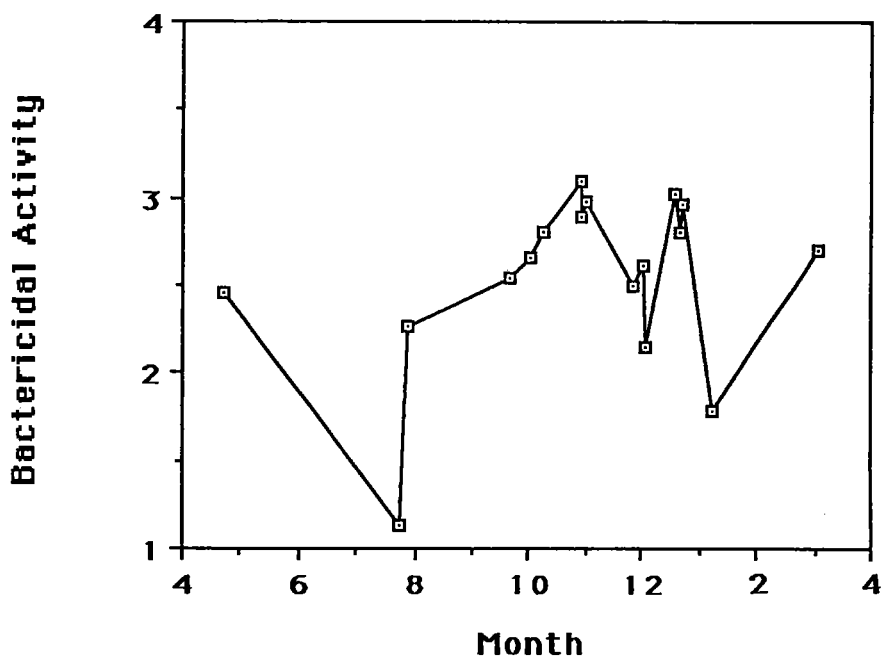


図 15 フナ未処理血清の殺菌活性の周年変化(平均)

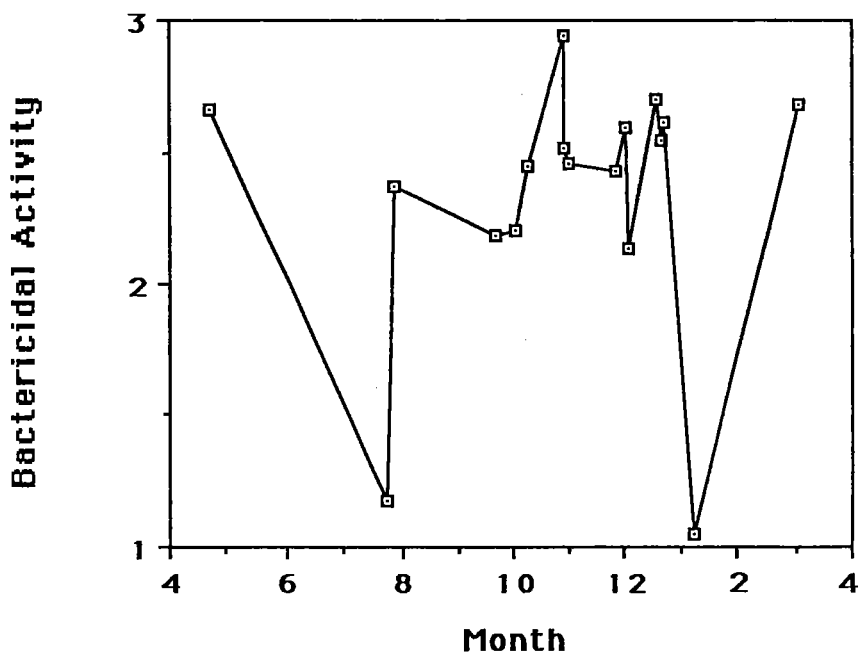


図 16 フナ EGTA 処理血清の殺菌活性の周年変化(平均)

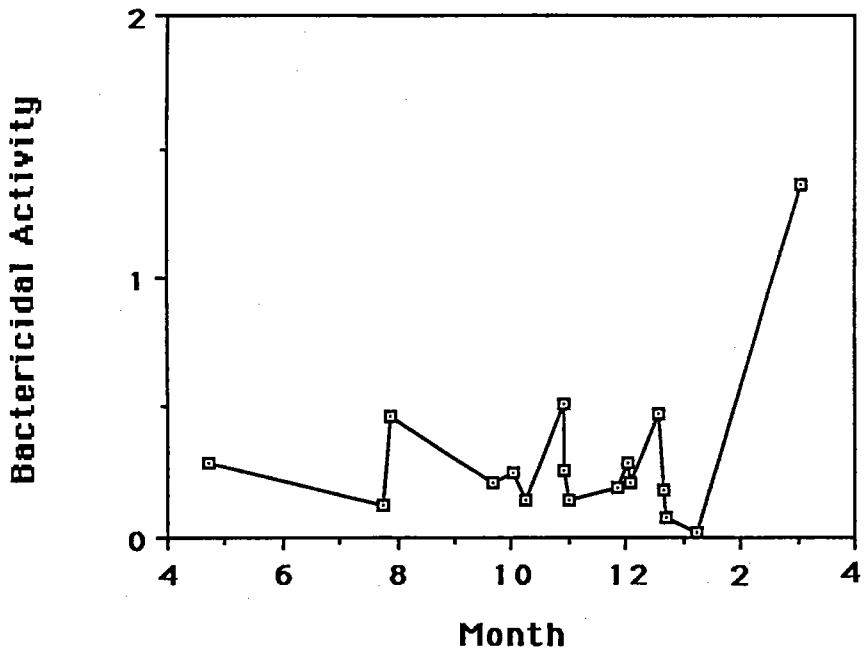


図17 フナ EDTA 処理血清の殺菌活性の周年変化（平均）

これらの数値を基に各項目間の相関係数を求め、表5～6にまとめた。未処理血清とEGTA処理血清の殺菌活性が比較的高い相関を示したが、これはコイおよびフナ血清の殺菌活性がおもに補体代替経路に起因する事実（第Ⅱ章）によるものであろう。この他、コイでは、未処理血清と水温、補体代替経路と水温および溶存酸素量、またフナでは未処理血清と抗体価、lysozyme 様活性と細菌数および溶存酸素量において比較的高い相関（ $-0.35 \sim -0.43$ ,  $0.39 \sim 0.53$ ）が得られた。このことはフナの試料が特定の時期に採取されたことのほかに、同じコイ科魚類であってもコイとフナとでは血清中の生体防御因子が影響を受ける環境因子が異なっていることを示すものであるとも考えられる。また、第Ⅲ章で判明したように、たとえ同一の条件で飼育されたコイでもその生体防御因子に大きな個体差があることも見逃せない。

比較的良好な環境（流水式養魚）で飼育されている養殖ゴイと多摩川のコイを比較すると、補体活性にはあまり大きな差異は認められなかったものの、lysozyme 活性が概して後の方が大きいことから、なんらかのストレスを受けていることが示唆されるが、この点については一層の検討が必要である。今後は、飼育実験と併用しながらこれらの環境因子との関係について詳細に検討する必要がある。

表5 環境因子とコイ血清性状の相関マトリックス

因子	抗体価	殺菌活性 (未処理)	殺菌活性 (EGTA)	殺菌活性 (EDTA)	細菌数	水温	COD	溶存酸素量
抗体価	1.00							
殺菌活性 (未処理血清)	0.00	1.00						
殺菌活性 (EGTA処理血清)	0.19	0.65	1.00					
殺菌活性 (EDTA処理血清)	-0.06	-0.03	0.14	1.00				
細菌数 (log CFU/ml)	-0.38	-0.19	-0.11	0.11	1.00			
水温 (°C)	-0.09	-0.43	-0.35	-0.25	0.17	1.00		
COD (ppm)	-0.08	0.20	0.28	-0.08	0.26	-0.22	1.00	
溶存酸素量 (ppm)	-0.19	-0.10	-0.40	0.17	0.27	-0.07	-0.45	1.00

表6 環境因子とフナ血清性状の相関マトリックス

因子	抗体価	殺菌活性 (未処理)	殺菌活性 (EGTA)	殺菌活性 (EDTA)	細菌数	水温	COD	溶存酸素量
抗体価	1.00							
殺菌活性 (未処理血清)	0.40	1.00						
殺菌活性 (EGTA処理血清)	0.30	0.87	1.00					
殺菌活性 (EDTA処理血清)	-0.12	0.23	0.41	1.00				
細菌数 (log CFU/ml)	-0.31	-0.31	-0.20	0.39	1.00			
水温 (°C)	-0.21	-0.21	-0.08	0.08	0.17	1.00		
COD (ppm)	0.07	0.07	0.08	0.03	0.26	-0.22	1.00	
溶存酸素量 (ppm)	0.17	0.17	0.18	0.53	0.27	-0.07	-0.45	1.00

## 第V章 文 献

- J. B. Alexander 1985: Non-immunoglobulin humoral defence mechanisms in fish. 133-140. In "Fish Immunology" (M. J. Manning and M. F. Tatner ed.), Academic Press, London.
- D. P. Anderson 1974: Fish Immunology. T. F. H. Publications, Neptune.
- 船津 勝・鶴 大典(編) 1977: 溶菌酵素, 講談社, 東京.
- 川原逸朗・楠田理一 1988a: 主要養殖魚類のリゾチーム活性. 日本水産学会誌, 54, 581-584.
- 川原逸朗・楠田理一 1988b: 養殖ウナギのリゾチーム活性の特性. 日本水産学会誌, 54, 965-968.
- 河合 章・杉田治男・出口吉昭 1988: 水族環境学実験. 恒星社厚生閣, 東京.
- 近藤元治 1980: 補体学入門. 南江堂, 東京
- G. J. H. Lindsay 1986: The significance of chitinolytic enzymes and lysozyme in rainbow trout (Salmo gairdneri) defence. Aquaculture, 51, 169-173.
- C. B. Mann, E. E. Ishiguro, W. W. Kay and T. J. Trust 1982: Role of surface components in serum resistance of virulent Aeromonas salmonicida. Infect. Immun., 36, 1069-1075.
- 望月 篤・松宮政弘 1981: 海産魚のリゾチーム分布. 日本水産学会誌, 1065-1068.
- K. Satoh, H. Nakagawa and S. Kasahara 1987: Effect of Ulva supplementation on disease resistance of red sea bream. Nippon Suisan Gakkaishi, 53, 1115-1120.
- D. K. Sakai 1981a: Heat inactivation of complements and immune hemolysis reactions in rainbow trout, masu salmon, coho salmon, goldfish and tilapia. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 47, 565-571.
- D. K. Sakai 1981b: Spontaneous and antibody-dependent hemolysis activities of fish sera and inapplicability of mammalian complements to the immune hemolysis reaction of fishes. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 47, 979-991.
- D. K. Sakai 1983: The assessment of health condition of salmonids by non-specific haemolytic (SH<sub>50</sub>) activity of serum. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 49, 1487-1491.
- 杉田治男・坂田泰造・石田祐三郎・出口吉昭・門田 元 1981: 淡水養殖魚類の消化管内細菌に関する研究-Ⅲ 養殖アユ腸管内における好気性および嫌気性従属栄養細菌. 日本大学農獣医学部学術研究報告, 38, 302-306.
- H. Sugita, K. Oshima, M. Tamura and Y. Deguchi 1983: Bacterial flora in the gastrointestinal of freshwater fishes in the river. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 49, 1387-1395.
- H. Sugita, M. Tamura and Y. Deguchi 1989: Effect of the incubation temperature on the isolation of aerobic heterotrophic bacteria from a river. Nippon Suisan Gakkaishi, 55, 829-835.
- H. Sugita, K. Tokuyama and Y. Deguchi 1985: The intestinal microflora of carp Cyprinus carpio, grass carp Ctenopharyngodon idella and tilapia Sarotherodon niloticus.



- Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 51, 1325-1329
- H. Sugita, M. Tsunohara, T. Ohkoshi and Y. Deguchi 1988: The establishment of an intestinal microflora in developing goldfish (Carassius auratus) of culture ponds. Microbial Ecol. 15, 333-344.
- 高橋幸則・伊丹利明・古根川紀潮 1986: コイの体表粘液から分離したリゾチーム様酵素の性状. 日本水産学会誌, 52, 1209-1214
- 矢野友紀・畑山幸宏・松山博子・中尾美樹 1988: 主要養殖魚の補体代替経路活性の測定法について. 日本水産学会誌, 54, 1049-1054.
- T. Yano, H. Matsuyama and M. Nakao 1986: An intermediate complex in immune hemolysis by carp complement homologous to mammalian EAC1, 4. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 52, 281-286
- 矢野友紀・中尾美樹・古市政幸・米 康夫 1988: マダイの補体活性に及ぼす飼料中のコリン, パントテン酸およびビタミンCの影響. 日本水産学会誌, 54, 141-144.