

リゾチーム活性等によるヒラメ仔稚魚の生体防御機能測定を試み

メタデータ	言語: Japanese
	出版者:
	公開日: 2025-06-25
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: 森田, 哲男
	メールアドレス:
	所属:
URL	https://fra.repo.nii.ac.jp/records/2014670

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License.



リゾチーム活性等によるヒラメ仔稚魚の生体防御機能測定を試み

森田哲男

(小浜栽培漁業センター)

種苗生産過程において仔稚魚期に疾病を発生させないためには、感染経路を遮断して病原体の侵入を阻止するほか、仔稚魚自体が本来持っている生体防御機能を高めることが重要である。

生体防御機能には、体液性生体防御因子と細胞性生体防御因子があり、前者については、種々の抗菌性因子の存在が報告されている。その1つであるリゾチームは動植物界に広く分布する溶菌酵素であり、魚類では血清、粘液、消化管、肝臓、腎臓、脾臓などに存在する。また、レクチンは糖鎖を認識して統合するタンパク質や糖タンパク質の総称であり、抗菌性因子の一つとして広く知られている。殺菌活性は好中球を中心とした活性酸素による異物の殺菌作用である。しかし、その測定方法は成魚ではマニュアル化されているものの¹⁾、仔稚魚では測定手法に関する基礎的知見は知られていない。

そこで、本研究では、全国で広く種苗生産されているヒラメ *Paralichthys olivaceus* 仔稚魚を用いて、リゾチーム活性、レクチン活性および殺菌活性が測定可能かを検討したので報告する。

材 料 と 方 法

供試魚および試料の調整 試験には、2002年に宮古栽培漁業センターでふ化し、同センターで飼育した日齢0～30のヒラメ仔稚魚を用いた。採集したヒラメ仔稚魚は-80℃で凍結保存し、測定開始前に小浜栽培漁業センターまで-20℃で凍結輸送し、測定直前に自然解凍した。各日齢の仔稚魚数尾から数十尾をまとめて湿重量を計測し、その一定倍量（2～128倍）のリン酸緩衝液（以下、PBS）で希釈したのちポリエチレン製乳棒を用いてホモジナイズし、希釈体液を作製した。希釈体液は、測定直前に試験管ミキサーで均一に攪拌して測定用試料に供した。

培地の調整 pH6.5に調整した32mM KH_2PO_4 と32mM K_2HPO_4 の混合液に1%アガロース（DIFCO）と0.1g/100mlの *Micrococcus luteus*（Sigmaの乾燥粉末）を懸濁させ、この懸濁液をオートクレーブで滅菌処理した後、10mlずつシャーレに注いでリゾチーム活性測定培地（以下、リゾチーム培地）とした。

活性の測定 リゾチーム活性の測定は、ストローで直径4mmの正円穴を開けたリゾチーム培地に希釈体液10μlを注入し、37℃でインキュベート後、溶菌円

の直径を測定して面積を算出した。レクチン活性の測定は、希釈体液の2倍希釈系列（25μl）をマイクロプレートで作製し、PBSで洗浄した5%ウサギ赤血球25μlを加えてプレートミキサーで10秒間攪拌後、25℃で24時間静置して凝集反応の有無を観察した。殺菌活性の測定は、希釈体液50μlと約 10^5 CFU/mlの大腸菌 *Escherichia coli* IAM 1239 50μlの混合液をロータリー攪拌機により攪拌し、25℃で一定時間静置して反応させ、PBSを用いて10倍希釈系列を作製した。それぞれの希釈液100μlをトリプトソーヤ寒天培地に塗抹し、25℃で72時間インキュベート後コロニー数を測定した。

リゾチーム活性の至適反応条件 リゾチーム培地のpHを5.5～7.0に調整し、各pHにおける24時間インキュベート後のリゾチーム活性を測定し、至適pHを調べた。また、PBSを用いて2～128倍の希釈体液を作製し、各希釈体液のリゾチーム活性を測定して測定可能な希釈率を調べた。さらに、リゾチーム活性の測定に適した反応時間を検討するため、反応時間を24～144時間に設定して、2～128倍の希釈体液におけるそれぞれのリゾチーム活性を測定し、至適反応時間を調べた。各測定には日齢30のヒラメ稚魚を用いた。

ヒラメの日齢とリゾチーム及びレクチン活性の関係 日齢0～30のヒラメ仔稚魚を用いて、各日齢におけるリゾチーム活性とレクチン活性を測定した。

殺菌活性測定における至適攪拌時間と静置時間 希釈体液と大腸菌の攪拌時間を30秒間とする区（30秒攪拌区）と2時間とする区（2時間攪拌区）を設定し、殺菌活性測定に有効な攪拌時間を調べた。また、攪拌後の静置時間を2時間とする区（2時間静置区）と24時間とする区（24時間静置区）を設定し、殺菌活性測定に有効な静置時間を調べた。対照区には滅菌したPBSと大腸菌を混合したものを作製し、希釈体液と大腸菌を混合した大腸菌数を比較した。各測定には日齢30のヒラメ稚魚を用いた。有意差の検定にはt検定を用い、危険率を5%とした。

結 果

リゾチーム活性の至適反応条件 リゾチーム培地のpHと溶菌面積の関係を図1に示した。各pH条件下における溶菌面積はpH7.0では120mm²、pH6.5で155mm²となり最高のリゾチーム活性を示した。pH

が6.1, 5.5と酸性度が高くなるに伴い溶菌面積は小さくなった。体液の希釈倍率と溶菌面積の関係を図2に示した。体液の希釈倍率が2倍では、溶菌面積は200mm²であった。希釈倍率が4倍, 8倍と増加するのに比例して溶菌面積も小さくなり, 128倍希釈では溶菌面積は80mm²になった。しかし, 128倍に希釈した体液からも目視により判定が可能な溶菌反応が観察された。各希釈倍率における反応時間と溶菌面積の関係を図3に示した。反応時間が長くなると溶菌面積は大きくなった。体液の希釈倍率が増加するに従い溶菌面積は小さくなる傾向があり, 反応時間が24時間の時

に顕著であった。

ヒラメの日齢とリゾチームおよびレクチン活性の関係 異なる日齢のヒラメ体液におけるリゾチーム活性による溶菌面積の変化を図4に示した。日齢0～30のいずれの体液からもリゾチーム活性が認められた。日齢0の体液では溶菌面積は25mm², 日齢24では120mm²となったが, 日齢と溶菌面積の大きさに明確な関係は認められなかった。また, 異なる日齢のヒラメにおけるレクチン活性による凝集反応の変化を図5に示した。レクチン活性は, 日齢10では認められなかったが, 日齢20と24の体液から認められ, 日齢20の体

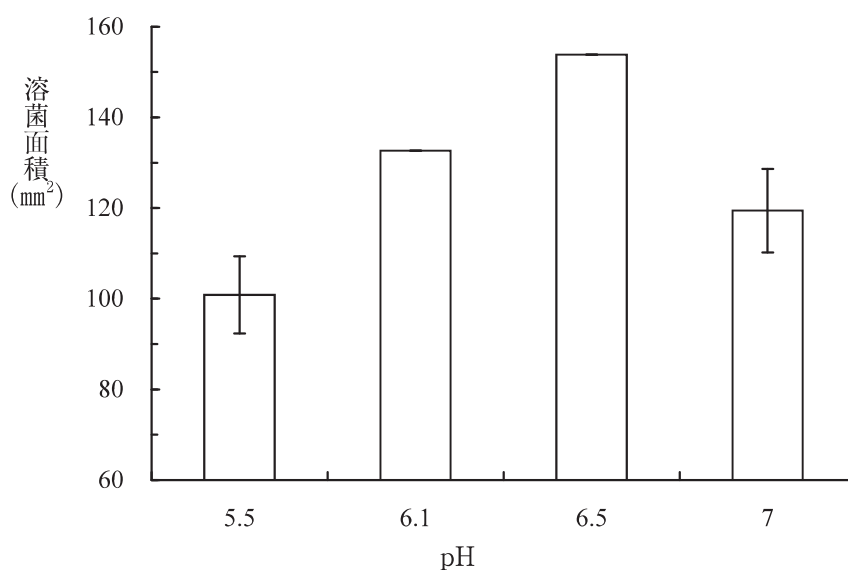


図1 pH とリゾチーム活性の関係

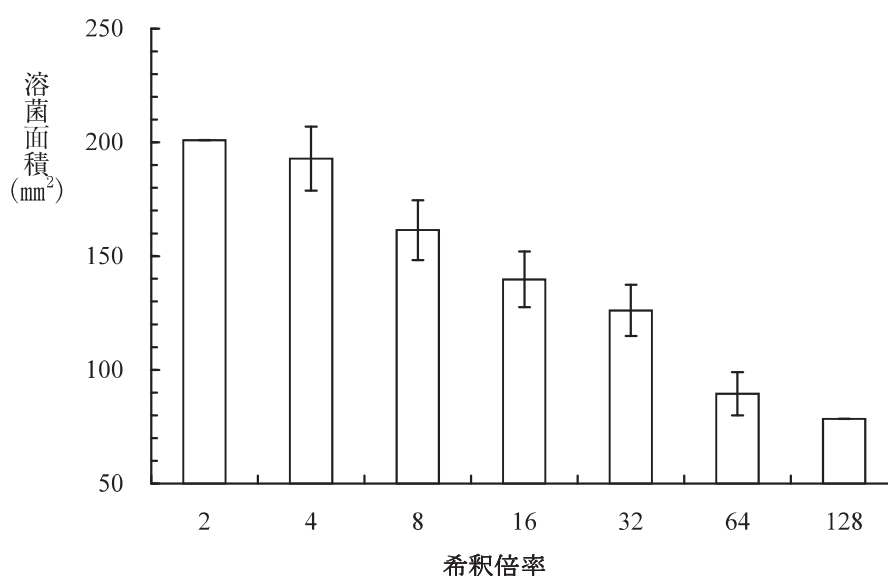


図2 希釈倍率とリゾチーム活性による溶菌面積の関係

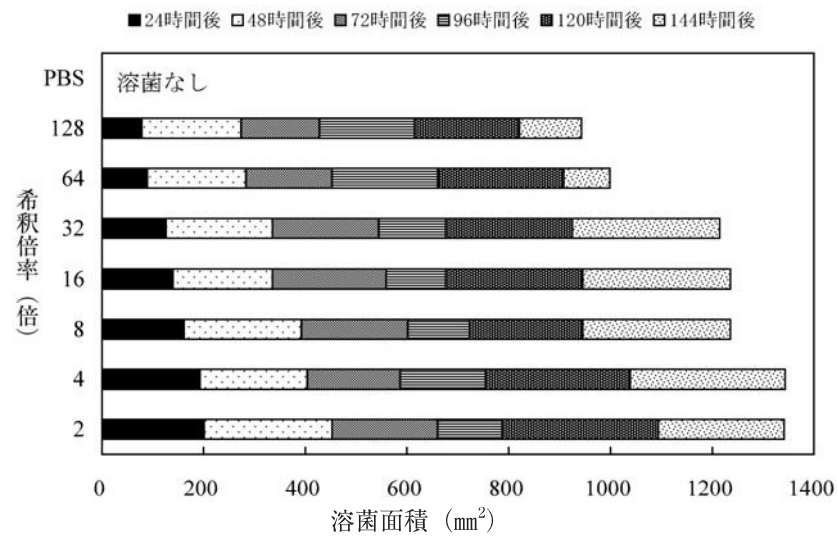


図3 反応時間とリゾチーム活性による溶菌面積の関係

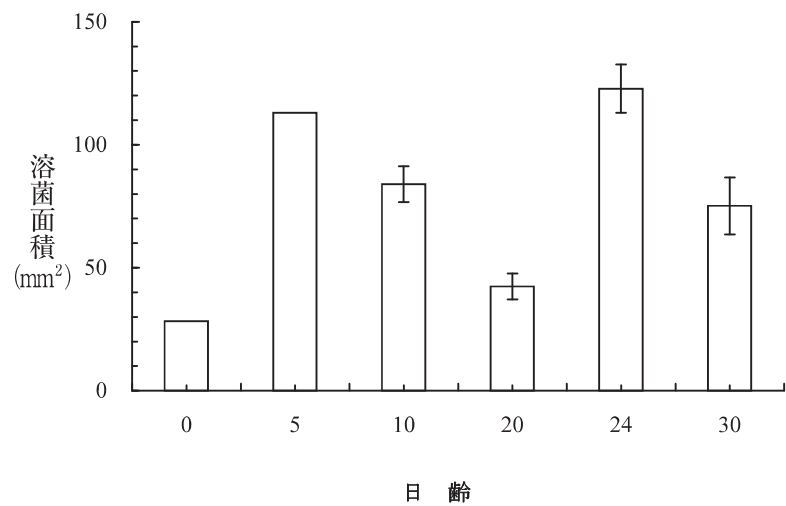


図4 異なる日齢のヒラメにおけるリゾチーム活性による溶菌面積の変化

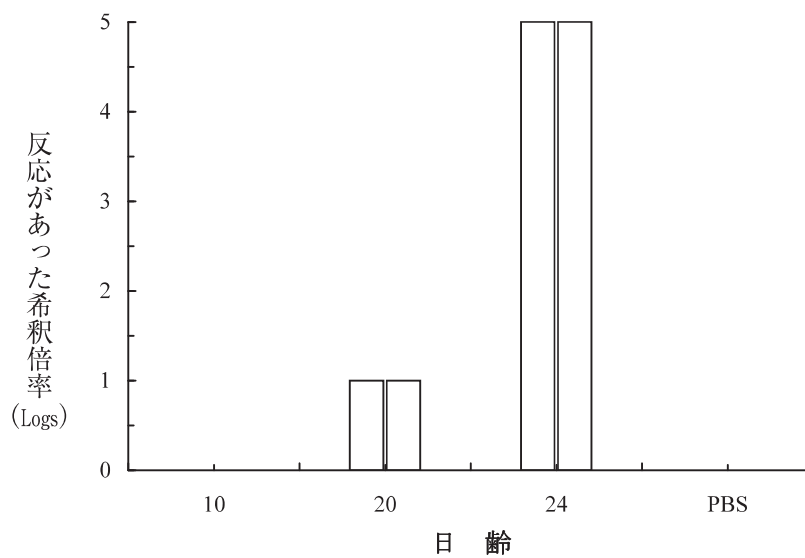


図5 異なる日齢のヒラメにおけるレクチン活性による凝集反応の変化

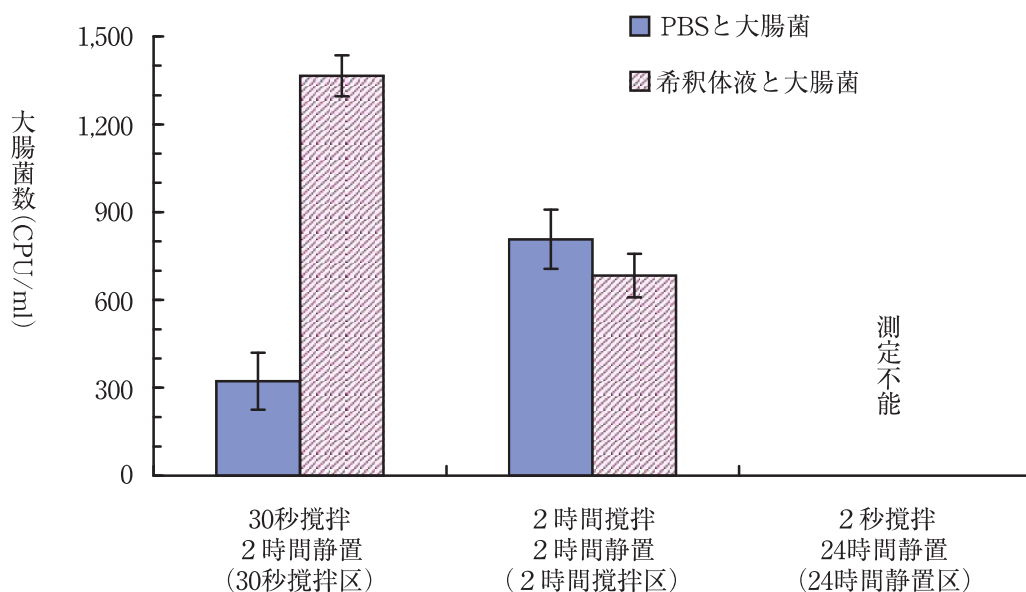


図6 殺菌活性における撹拌時間と静置時間による大腸菌数の変化

液では2倍希釈液系列（合計3倍×2倍＝6倍）、日齢24では32倍希釈液系列（合計96倍）まで反応が得られた。

殺菌活性における至適撹拌時間と静置時間の検討

殺菌活性測定における撹拌時間、および撹拌後の静置時間と大腸菌数との関係を図6に示した。30秒撹拌区の大腸菌数は1,300CFU/mlであり、対照区の300CFU/mlに対して有意に多くなった。2時間撹拌区の大腸菌数は700CFU/mlであり、対照区の800CFU/mlに対して有意差は生じなかった。また、24時間静置区では大腸菌が大量に増え、いずれの区も計測ができなかった（図6）。

考 察

リゾチーム活性の測定は、魚類、頭足類、貝類など広い分野で行われている。魚類では、コイ²⁾、サケ³⁾、キンメダイ³⁾、アユ⁴⁾など海水魚、淡水魚を問わず認められている。しかし、そのほとんどが成魚の血液や組織液から測定しており、海産魚の仔稚魚の希釈体液から測定した事例はみあたらない。本試験により、ヒラメ仔稚魚には高いリゾチーム活性もしくは*Micrococcus luteus*を溶菌する酵素群が存在することが明らかとなった。また、日齢0の仔魚からリゾチーム活性が認められ、ふ化直後の仔魚における重要な生体防御機能の1つである可能性が考えられた。血液によるリゾチーム活性を計測する手法としては、ポンドキッドサイトマニュアル¹⁾が確立しており、ヒラ

メ成魚における至適pHは6.1とされている。本試験により日齢30のヒラメ稚魚における至適pHは、成魚のそれよりもやや高く6.5となり、コイ²⁾やアユ⁴⁾の体表粘液における至適pHと同じであった。また、反応時間が一定時間以上であれば溶菌反応を認めることが可能であるが、24時間後の測定が最も簡便で顕著に差が生じる結果となった。さらに、リゾチーム活性は128倍もの高倍率の希釈体液でも認められており、湿重量の小さい仔魚の個体別計測も可能であると期待される。しかし、体液の希釈倍率と溶菌面積が一致した希釈倍率は32倍と64倍の間であることから、日齢30のヒラメ稚魚の体液を使用しリゾチームを測定する場合は、32または64倍に希釈することが必要であると考えられた。

レクチンについては、ウイルスから哺乳類まで生物界に広く分布し、その生体防御機能については異物認識や細菌凝集、食細胞の機能の活性化など様々な働きがあることが推測され、魚類ではウナギ、ナマズ、ネズミゴチ、クサフグなどで高い凝集反応があることが知られている。レクチン活性の検出には、一般に血液に対する凝集反応が用いられているが、リゾチーム活性同様に成魚における測定事例がほとんどである。本試験の結果、ウサギ赤血球の凝集反応により、日齢20と24のヒラメ体液においてレクチン活性が認められ、仔稚魚においてもレクチン活性の測定が可能であることが分かった。

殺菌活性では、静置時間を24時間と長くすると、大腸菌が増殖し活性の差を判断することが不可能であっ

た。また、本試験では30秒攪拌区より2時間攪拌区の方が測定には適している結果となったが、希釈体液による大腸菌数に有意な減少は認められなかった。再試験を行っても24時間静置では菌数の計数は不可能であり、30秒攪拌区、2時間攪拌区では再現性がなく、むしろ希釈体液の菌数が多くなることもあることから、仔稚魚で殺菌活性を計測することは困難であると考えられた。

本研究の結果、仔稚魚のレクチン活性の測定は、成魚の測定手法を改良することにより可能となった。また、リゾチーム活性の測定条件として、pH、反応時間、体液希釈倍率について検討した結果、仔稚魚でリゾチーム活性を数値化することが可能となった。今後は、種苗生産されたヒラメ稚魚のリゾチームおよびレクチン活性のデータを蓄積し、飼育方法の違いが、生産された稚魚の生態防除能に及ぼす影響について検討をす

る必要があると考えられる。

文 献

- 1) 日本水産資源保護協会(1998) バイオディフェンス機能活用健康魚づくり技術開発事業研究成果実績報告書. pp. 140.
- 2) 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. 日水誌, **52**, 1209-1214.
- 3) 望月 篤・松宮正弘(1981) 海産魚のリゾチーム分布. 日水誌, **47**, 1065-1068.
- 4) 伊丹利明・高橋幸則・川原逸郎(1986) アユにおける溶菌性物質の分布ならびに性状. 日水誌, **52**, 1443-1447.