

## 高水温期に給餌制限したマハタの血液性状の推移について

宮原 治郎, 松田 正彦

Change of the blood condition in *Epinephelus septemfasciatus* limited food during the high water temperature period

Jirou Miyahara and Masahiko Matsuda

We were examined the blood condition in the Sevenband grouper, *Epinephelus septemfasciatus* fed once a week during the high water temperature period in order to decreased to loss by viral nervous necrosis (VNN) at Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries from June 2006 to March 2007. Survival rate of the fish fed 3 times per week were a little higher than the fish fed 5 times per week and the long period of the fish fed once a week during the high water temperature period. We considered that the blood condition of Triglyceride, Glutamic oxaloacetic transaminase, Alkaline phosphatase, Blood urea nitrogen, Glucose, Total bilirubin and Uric acid weren't influenced by the fish fed once a week during the high water temperature period. We considered that the blood condition of Hematocrit value, Hemoglobin, Red blood cells, Total cholesterol, Total protein, Albumin, Amylase and Creatinine were influenced by the fish fed once a week during the high water temperature period. The fish fed once a week during 25°C up suggested to be hard limited food, because of the blood condition of Hematocrit value, Hemoglobin and Total cholesterol weren't recovered the fish fed 3 times per week level by finish of examination, and Red blood cells was recovered the fish fed 3 times per week level at seventeen weeks later.

ウイルス性神経壊死症 (Viral nervous necrosis : 以下 VNN とする) は, 世界各地でマダラ, マゴチ, バラマンディー, スズキ, キジハタ, クエ, マハタ, シマアジ, カンパチ, ホワイトシーバス, イシダイ, イシガキダイ, マツカワ, ハリバット, ヒラメ, ターボット, トラフグなどの 30 種以上の海産魚類に発生しており, 種苗生産時において大量へい死を引き

起こすことが知られている。魚類養殖においては, 特にハタ類で大きな被害を与えることから, その対策が求められ, ワクチン開発が進められているところである。<sup>1-2)</sup> RGNNV (キジハタの神経壊死症ウイルス) の至適増殖温度は 25~30°C \*1 で, 養殖現場での VNN によるマハ

\*1 平成 13 年ハタ類種苗生産技術交流会 (第 2 回) 資料

タの被害は、夏から秋にかけての高水温期に多いとの報告<sup>3)</sup>があり、本県内のマハタ養殖現場での被害状況と一致している。特に養殖現場では、水温上昇期においても摂餌が活発であるため、過度の給餌となった肥満度の高い状態の飼育魚がVNNによる被害が大きいとされており、ワクチンが開発されるまでの対策としては、高水温期(25°C以上)の給餌制限(週に1~2日給餌)が有効との知見が得られている。<sup>4)</sup>今回、当場の棧橋生簀でマハタ養殖におけるVNN対策として、夏季に給餌制限を行い、成長、生残および血液性状などを調査した結果、高水温期に給餌頻度を週1日に制限して飼育することにより影響が見られる血液性状などの知見を得たので報告する。

## 材料と方法

供試魚は、当場で生産した種苗で2005年11月8日に陸上水槽から棧橋生簀(5m×5m×5m)へ沖出し後、市販のEPを2006年4月下旬までは週6日、5月上旬からは週5日給餌して継続飼育を行ったものである。2006年5月24日に小割生簀(3m×3m×3m)4面へ各500尾ずつ分養した。試験区は、週3日給餌区(1区)、週3日給餌で水温が27°C以上の期間を週1日に給餌制限した区(2区)、同様に水温が25°C以上の期間を週1日に給餌制限した区(3区)および週5日給餌区(4区)とした。飼料には、市販のEPを用い、飽食になるまで与えた。水温測定は、供試魚の遊泳水深を考慮して2m層を給餌日の9~10時に多項目水質計U-21XD(HORIBA社)を用いて行った。魚体測定は、約1ヶ月毎に各区30尾の体重、体長について行い、2006年6月27日から2007年3月26日までは魚体測定に供した個体のうち

各5尾について血液検査を行った。採血は、ヘパリンナトリウム処理した2.5mlプラスチックシリンジ(20Gおよび19G注射針)で尾柄部血管より実施し、ヘマトクリット値(Ht値)、ヘモグロビン量(Hb量)、赤血球数(RBC)、総コレステロール(TCHO)、トリグリセリド(TG)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、総タンパク(TP)、アルブミン(ALB)、アルカリ性ホスファターゼ(ALP)、アミラーゼ(AMYL)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、グルコース(GLU)、総ビリルビン(TBIL)および尿酸(UA)を測定した。このうちHt値は、ヘマトクリット遠心分離機MC-201(日立互機社)で12,000rpm、7分間の遠心分離後、測定した。さらにRBCは、0.85%生理食塩水で200倍希釈後、トーマの血球計算盤で計数した。その他の項目は、生化学自動分析装置富士ドライケム3000V(富士フィルム社)で測定した。へい死および瀕死個体のうちVNNの疑いがあるものについては、polymerase chain reaction法(PCR法)で確認を行った。各試験区の成長および血液性状はt検定( $p < 0.05$ )、生残は $\chi^2$ 検定( $p < 0.05$ )で有意差の確認を行った。

## 結 果

### 水温と給餌制限期間

期間中の水温は、Fig. 1aに示したとおり14.3~30.0°Cで推移し、このうち水温が27°C以上であったのは7月17日から9月10日までの8週間、水温が25°C以上であったのは7月3日から9月24日までの12週間で、これらの期間に各試験区(2, 3区)において給餌頻度を週1日に制限した。

### 成長と生残

Fig. 1b に体重の推移を示した。試験開始時は  $178.5 \pm 35.0$  g (平均±標準偏差), 試験終了時の4区は  $479.3 \pm 78.4$  g, 1区は  $469.5 \pm 53.2$  g, 2区は  $446.7 \pm 68.8$  g, 3区は  $437.6 \pm 75.5$  g で給餌制限期間が長いほどやや成長が劣り, 4区と3区で試験区間の有意差が認められた。4区の成長が7月以降は良かったが, 1月以降は1区とほぼ同様の体重になった。給餌制限した区ではその期間中に体重の減少がみられたものの, 給餌頻度を週3日の給餌に戻してからは1区での増加以上の成長がみられ, 3区では10月に, 2区では11月に1区とほぼ同様の体重になったが, 12月以降は1区より成長が劣った。

Fig. 1c に肥満度の推移を示した。試験開始時の35.5が最も高く, 1区は30.6, 2区は27.2, 3区は27.6, 4区は32.0までの範囲で増減した。水温が25℃以上となった7~8月に各区とも減少し, 給餌制限した区ではその期間中の減少が大きかったが, 給餌頻度を週3日の給餌に戻してからは速やかに回復し, 10月以降は各区とも同様に推移した。

Fig. 1d に生残率の推移を示した。8月下旬から11月下旬にVNNおよびネオベネデニア症が主因のへい死がみられ, 試験終了時には1区が87.4%, 2区が83.5%, 4区が81.2%, 3区が80.4%と給餌制限期間が長いほど, また, 給餌日数が多い4区が低く, 1区と3区および4区で試験区間の有意差が認められた。

### 血液性状

Table 1 に2006年6月から2007年3月までの各試験区の測定に伴い各月に行った血液性状の推移を示した。

Ht 値は, 1区が41.68~49.59%, 2区が40.54~46.68%, 3区が38.32~45.16%, 4区が40.24

~47.74%で, 給餌制限を開始してからは8月が4区と3区および2区で, 9月が4区および2区と3区で, 10月が4区と2区および3区, 1区と3区で, 11月が1区と2区で, 12月が1区と3区で試験区間の有意差が認められた。1区と比べると給餌制限した区ではその期間中の減少が大きく, 給餌頻度を週3日の給餌に戻してからはかなり回復し, 2区は12月以降では同様な値で推移したが, 3区は試験終了までやや低く推移し, 4区は全体的に同様に推移した。

Hb 量は, 1区が10.54~11.62 g/dl, 2区が9.62~10.90 g/dl, 3区が9.20~11.06 g/dl, 4区が9.72~11.12 g/dl で, 給餌制限を開始してからは8月が4区および1区と2区および3区で, 9月が1区および4区と3区で, 10月が1区および4区と2区および3区で, 11月が1区と2区で, 12月が1区と3区で試験区間の有意差が認められた。1区と比べると給餌制限した区ではその期間中の減少が大きく, 給餌頻度を週3日の給餌に戻してからはかなり回復し, 2区は2月以降では同様な値で推移したが, 3区は試験終了まで少し低く推移し, 4区は全体的に同様からやや低く推移した。

RBC は, 1区が  $1.91 \sim 2.15 \times 10^6$  cells/mm<sup>3</sup>, 2区が  $1.73 \sim 2.08 \times 10^6$  cells/mm<sup>3</sup>, 3区が  $1.78 \sim 2.14 \times 10^6$  cells/mm<sup>3</sup>, 4区が  $1.70 \sim 2.15 \times 10^6$  cells/mm<sup>3</sup> で, 給餌制限した区ではその期間中の減少が大きかった。給餌制限を開始してからは8月が1区と3区および2区, 4区と2区で, 10月が1区および4区と3区で, 11月が1区と2区および4区で試験区間の有意差が認められた。1区と比べると, 給餌頻度を週3日の給餌に戻してからの2区は9~1月に同様な値を示したが, 2月以降に低く, 3区は1月に同様な値になった以外は低く推移し, 4区は全体的に同様からやや低く推移した。

TCHO は、1区が213.2~398.5 mg/dl, 2区が190.8~396.7 mg/dl, 3区が195.2~369.4 mg/dl で、4区が177.6~370.3 mg/dl で、給餌制限した区ではその期間中はやや増加あるいは減少し、給餌制限していない区との差は大きかった。給餌制限を開始してからは8月が1区および4区と2区および3区で、10月が1区および4区と2区および3区で試験区間の有意差が認められた。1区と比べると、給餌頻度を週3日の給餌に戻してから2区は、9月および2月以降に同等であったが、10~1月では低く、3区は、試験終了まで低く推移し、4区は全体的に同様に推移した。

TG は、1区が113.4~257.6 mg/dl, 2区が143.8~259.5 mg/dl, 3区が137.4~280.8 mg/dl で、4区が134.4~252.4 mg/dl で、8月の2区が高く、2区と3区および1区、4区と1区で試験区間の有意差が認められた。

GOT は、1区が73.3~311.0 IU/l, 2区が68.2~339.8 IU/l, 3区が67.0~305.0 IU/l, 4区が62.0~192.8 IU/l で、全体的に6月と7月が高かったが、その後減少傾向となり、給餌制限を開始してからは試験区間の有意差は認められなかった。

GPT は、各区とも全ての測定月で測定範囲の1,000 IU/l を超える個体が3尾以上みられた。

TP は、1区が5.50~6.44 g/dl, 2区が5.36~6.38 g/dl, 3区が4.80~6.16 g/dl, 4区が5.40~6.24 g/dl で、給餌制限を開始してからは7月が1区と2区で、8月が1区および4区と2区および3区で、9月が2区と3区で、11月が1区と2区および4区で試験区間の有意差が認められた。給餌制限した区ではその期間中に減少がみられ、特に3区の減少が大きかった。給餌頻度を週3日の給餌に戻してからは速やかに回復し、1区と比べると、2区は9月以降、3区は

10月以降、同様な値を示して推移し、4区は全体的に同様に推移した。

ALB は、1区が1.50~1.94 g/dl, 2区が1.34~1.94 g/dl, 3区が1.08~1.88 g/dl, 4区が1.38~1.88 g/dl で、給餌制限を開始してからは8月が4区および1区と2区および3区、2区と3区で、9月が4区と3区で、10月が1区と2区および3区、4区と3区で、11月が1区と4区で、1月が1区および3区と2区で、2月が2区と4区で試験区間の有意差が認められた。給餌制限した区ではその期間中の減少が大きく、特に3区の減少が大きかった。給餌頻度を週3日の給餌に戻してからはかなり回復したが、1区と比べると低く推移し、3区は1月に、2区は2月に同様となり、4区は全体的に同様に推移した。

ALP は、1区が261.2~382.8 IU/l, 2区が234.8~400.0 IU/l, 3区が224.6~401.8 IU/l, 4区が222.0~402.8 IU/l で、各区とも8月をピークに増加し、その後減少し、給餌制限を開始してからは9月が3区および2区と4区で、12月が1区および4区と3区で、3月が1区と4区および3区で試験区間の有意差が認められた。

AMYL は、1区が606.8~762.8 IU/l, 2区が462.8~718.0 IU/l, 3区が417.8~765.4 IU/l, 4区が439.2~767.4 IU/l で、給餌制限を開始してからは7月が1区と2区および4区で、8月が4区および1区と2区および3区で、9月が4区と3区で、10月が1区、4区および2区と3区で試験区間の有意差が認められた。1区と比べると給餌制限した区ではその期間中で特に3区が低く推移し、給餌頻度を週3日の給餌に戻してからも11月を除けば低く、4区は9月以降では同様に推移した。

BUN は、1区が1.42~8.02 mg/dl, 2区が2.32~10.32 mg/dl, 3区が1.98~8.16 mg/dl,

4区が2.20~8.40 mg/dlで、各区とも7月をピークに増加し、その後減少し、給餌制限を開始してからは7月が2区と4区、3区および1区で、8月が2区と1区で、10月が2区と4区および1区で、11月が2区と3区で、2月が4区と1区で試験区間の有意差が認められた。

CREは、1区が0.26~0.86 mg/dl、2区が0.30~0.70 mg/dl、3区が0.26~0.86 mg/dl、4区が0.26~1.20 mg/dlで、給餌制限した区ではその期間中は低く推移し、給餌制限を開始してからは8月が4区と1区、2区および3区、1区と2区および3区で、9月が1区、4区および2区と3区で、12月が3区と1区で試験区間の有意差が認められた。

GLUは、1区が41.6~153.0 mg/dl、2区が33.2~128.4 mg/dl、3区が32.8~162.0 mg/dl、4区が33.6~133.8 mg/dlで、給餌制限した区では8月の減少がやや大きかったが、給餌制限期間中における試験区間の有意差は認められなかった。

TBILは、1区が0.10~0.38 mg/dl、2区が0.14~0.32 mg/dl、3区が0.10~0.34 mg/dl、4区が0.10~0.36 mg/dlで、各区とも7月をピークに増加し、その後減少傾向となった。給餌制限を開始してからは8月が3区および4区と1区で、10月が4区、2区および3区と1区で、11月が1区と2区で、1月が2区および4区と1区および3区で、2月が1区と3区および4区で試験区間の有意差が認められた。

UAは、1区が0.22~0.78 mg/dl、2区が0.18~1.00 mg/dl、3区が0.28~1.10 mg/dl、4区が0.26~0.68 mg/dlで、各区とも7月に減少し、その後増減したが、11月以降は同様に推移し、給餌制限期間中における試験区間の有意差は認められなかった。

## 考 察

1歳魚の高水温期(25℃以上)に給餌頻度を週1~2日に制限すると、比較的へい死が少ないとの知見をもとに、25℃以上の高水温期に給餌頻度を週1日に制限したが、成長は週5日給餌(4区)が25℃以上の給餌制限(3区)より有意に優れ、給餌頻度が高いほど成長が良い傾向であった。生残は週3日給餌(1区)が3区および4区より有意に優れ、1歳魚の高水温期に週5日給餌は多すぎ、また、25℃以上の水温期間(12週間)での週1日の給餌は給餌不足であると考えられ、週3日程度の給餌頻度であれば、特に高水温期に追加して給餌制限を行わなくともよい可能性も示唆された。

飼育試験と併行した血液性状をみると、生残が良かった週3日給餌(1区)と比較して高水温期に給餌制限を行った2区と3区で数値的に影響が現れにくいのはTG、GOT、ALP、BUN、GLU、TBILおよびUAと考えられた。よって、これらの項目については、給餌制限の指標にはならないと判断された。

その他の項目は、飢餓の影響が現れたと考えられ、高水温期に給餌制限を行った後、週3日給餌に戻した場合、週3日給餌(1区)のレベルに回復するまでに要した期間は、27℃以上の給餌制限(2区)ではALBが26週間、Hb量が24週間、Ht値およびAMYLが15週間、RBC、TCHO、TPおよびCREが2週間、25℃以上の給餌制限(3区)ではHt値、Hb量およびTCHOが週3日給餌のレベルに回復せず、RBCが17週間、ALBが17週間、AMYLおよびCREが9週間、TPが4週間であった。特に25℃以上の給餌制限(3区)では貧血のパロメーターとなるHt値およびHb量が週3日給餌のレベルに回復せず、RBCが17週間もかか

っていること、免疫のバロメーターとなる TCHO が週 3 日給餌のレベルに回復していないことから、過度の給餌制限であったことが伺われた。

GPT は、測定範囲の 1,000 IU/l を超える個体が多かった。当場で飼育した健康なブリでは採血に手間取らない限り 20 IU/l 以下であり、測定装置の異常ではない。尾鷲市水産課のマハタ養殖試験での GPT は約 40~350 IU/l (体重約 1,100~1,900 g) であり、その差は大きく、魚体の大きさや測定装置の違いだけでは説明が難しいと考えられ、引き続き知見を重ねることによりその原因を明らかにしていきたい。

以上のことから、給餌制限すると値が変動する項目は、Ht 値、Hb 量、RBC、TCHO、TP、ALB、AMYL および CRE の 8 項目であると判断された。マハタの 1 歳魚の高水温期 (25℃以上) における血液性状については参考となる知見がないため、本試験結果のみでの推定ではあるが、生残が良かった週 3 日給餌を基本とすれば、Ht 値は 40%以上、Hb 量は 10 g/dl 以上、RBC は  $1.9 \times 10^6$  cells/mm<sup>3</sup> 以上、TCHO は 250 mg/dl 以上、TP は 5.6 g/dl 以上、ALB は 1.5 g/dl 以上、AMYL は 600 IU/l 以上、CRE は 0.7 mg/dl 以上が望ましいのではないかと考えられた。今後は飼育症例を重ねることにより、これら 8 項目が給餌制限などに関する指標に適しているか検討していきたい。

今回の試験では高水温期でも給餌頻度を週 1 日に抑えることなく、週 3 日の給餌を継続しても影響が少ない可能性が示唆されたことから、

VNN ワクチンが開発されるまでは、週 3 日の給餌を基本とする 27℃以上の高水温期での給餌制限あるいは給餌頻度を変えた試験を行い、へい死が少なく、成長や今回の試験で変動がみられた血液性状の影響も少ない飼育方法を確立していきたい。

## 文 献

- 1) 江草周三：魚介類の感染症・寄生虫病。恒星社厚生閣，東京，2004，pp.81-86.
- 2) 畑井喜司雄，小川和夫：新魚病図鑑。緑書房，東京，2006，pp.198-252.
- 3) 熊井英水編：水産増養殖システム1 海水魚。恒星社厚生閣，東京，2005，pp.252-256.
- 4) 松田正彦，宮原治郎：マハタの海面養殖試験-II。長崎水試事報，154-155 (2005)。
- 5) 舞田正志：アクアネット。湊文社，109，18-22 (2007)。
- 6) 尾鷲市水産課：II。マハタ養殖実験事業の経過。マハタ養殖実験事業，平成7年度年間レポート，12-29 (1996)。

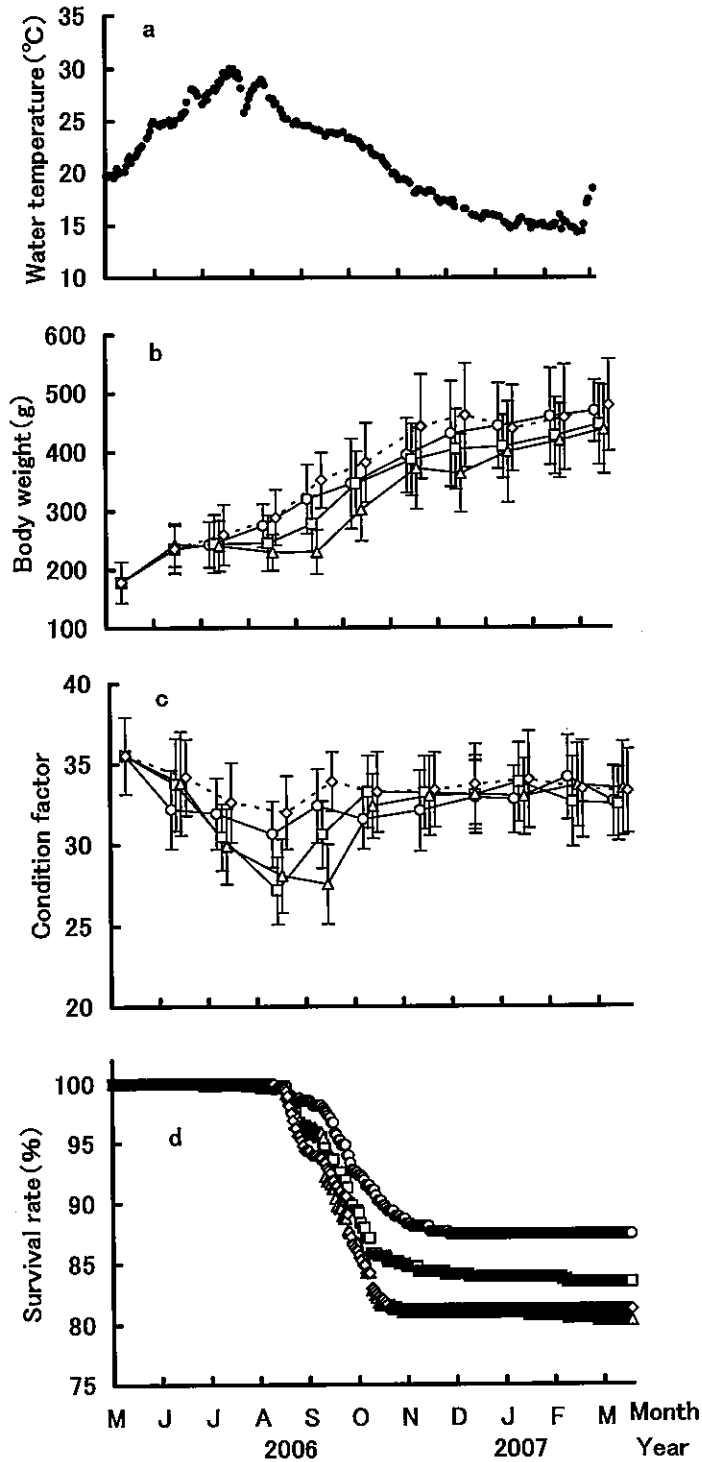


Fig.1. Changes in water temperature of 2m depth, body weight, condition factor and survival rate of sevenband grouper at Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries from May 2006 to March 2007. Open circle, open square, open triangle and open lozenge indicate Experimental group 1, 2, 3 and 4, respectively.

