

2003 年度 委託研究概要報告

ホルマリン処理キートセラス投与による
アコヤ貝の免疫機能に及ぼす影響

旭 川 医 科 大 学
吉 田 貴 彦

2004 年 4 月

ホルマリン処理キートセラス投与によるアコヤ貝の免疫機能に及ぼす影響

貝の飼育、プランクトンの培養　ともに人工海水を使用

キートセラスにホルムアルデヒド処理： 約 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ のキートセラスが浮遊する人工海水 1 リットルにホルムアルデヒド最終濃度 50ppm にて 3 日程度飼育。その後、8000rpm(12000G)、30 分遠心し、ホルムアルデヒドが残留する海水上清を除去し、新鮮人工海水 1 リットルに再浮遊。当初 10ppm にて処理を行い白色化が見られたが、なぜか白色化しにくくなったために、念のために濃度を上げて処理をおこなう事とした。

貝へのキートセラス投与： ステンレスタンクに 10 リットルの人工海水を満たし、6 個のアコヤ貝をいれて飼育。エアリングを行う。海水温は 19－20℃程度。約 $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ の無処置キートセラス浮遊液 1 リットルをコントロール群に与える。ホルムアルデヒド処理キートセラス人工海水浮遊液 1 リットルを曝露群に与える。各群 2 つのタンクとする。人工海水の交換および、新鮮な飼料投与は、2 日に 1 回行う。曝露総飼育期間は 2 週間である。

測定項目： ①総血球数、②血球分画、③食作用、④NBT 還元能、⑤血球遊走能、⑥血清凝集素価

飼育中に気がついたこと：

飼料（キートセラス）投与 2 日後 対象群では人工海水がやや混濁（飼料投与直後よりは清明）シタンク底面に糞と思われる沈殿物多数。一方、曝露群では人工海水は清明でタンク底面の沈殿物も少なく、かすかに白色の沈殿物あり。これはホルムアルデヒド処理キートセラスの食べ残しが沈殿したものかも知れない。写真 2 枚添付。

【結果（添付のエクセル表参照）とその解釈】

⇒曝露群にて対象群に比して血リンパ細胞数が有意に増加

哺乳類において、白血球数の増加は、感染症を疑う変化である。

またはストレスが加わった場合に観察される現象である。

⇒曝露群にて対象群に比して NBT 還元能陽性細胞数比率の有意な減少

NBT 還元能陽性細胞は無顆粒球の亜分画であって、外来異物や病原体などを貪食の後に殺菌、消化する能力を持つ細胞群である。こうした細胞群の減少は、外来病原体に対する抵抗力が低下していることを意味する。先に行った、ホルムアルデヒド 10ppm 曝露実験でも、同様の結果が得られている。

⇒曝露群にて対象群に比して血リンパ細胞の遊走能の有意な低下

血リンパ細胞数が外来の病原体等に向かって遊走し攻撃する能力が低下している事を示すものである。病原体による攻撃から身を守られず病原体の増殖、感染部位の拡大を招きやすい。先に行なった、ホルムアルデヒド 10ppm 曝露実験でも、同様の結果が得られている。

【結論】

キートセラスに対しホルムアルデヒドを処置する事により、条件が良ければ 10ppm にて十分に白濁の形成が見られる。これらは、ホルマリン使用海域で観察される白いモヤモヤの本体と考えて間違いがないと考える。実証するためには、白いモヤモヤを採取し顕微鏡観察すれば済むことである。

キートセラスをホルムアルデヒド処理した後に遠心分離にてホルムアルデヒドを除去した上で再浮遊液として、飼料としてアコヤ貝に投与しているので、今回観察された現象は、ホルムアルデヒドによる直接の影響ではなく、ホルムアルデヒド処理したキートセラスを飼料として摂取したために起こった現象であると考えるのが相当。ホルムアルデヒドが海洋に放流された後に、速やかにその濃度が低下する事をもって、ホルムアルデヒドが検出されないことをもって、アコヤ貝に起こった斃死などの問題にホルムアルデヒドが関与していないという事はできない。直接ではないが、ホルムアルデヒドが海洋に放流され、それらが海域中のプランクトン類に作用し、おそらくは死滅し、消化しにくい？凝固物となり海域中にとどまる。ホルムアルデヒドはその過程で消費され、フリーで存在する量は僅かとなろう。ホルムアルデヒドに遭遇し、変性・変質したキートセラスが海域に微量に浮遊し長期に渡ってアコヤ貝に摂取され、もしくは、現場から報告されていたように気象に変化により海底に堆積していた変性・変質したキートセラス団塊が養殖場に近く漂うことにより大量にアコヤ貝に摂取され、今回観察されたような変化が起こっても何ら不思議ではない。

病理学的観察による消化管壁の崩壊は、外部から生体内を隔離している生体防御のバリアーが壊れていることなので、病原体の進入が起りやすい状況を作り上げる。病原体の進入すなわち感染が起こると、血リンパ細胞数の増加につながる。また、感染が起こっていない段階であっても、生体構造が破壊されつつある場合には、炎症が起こっていると考えられ、やはり血リンパ細胞数の増加につながる。先のホルムアルデヒドによる直接影響の実験で観察されたのと同じ現象が観察されたことについては、ホルムアルデヒド投与実験で人工海水が飼育アコヤ貝体表や貝殻に残留していた微量のプランクトン類に反応し、それをアコヤ貝が摂食したために起こった現象か、あるいは、今回の実験で摂食されたホルムアルデヒド処理によって変性・変質したキートセラスから、消化管内にてホルムアルデヒドが遊離しフリーのホルムアルデヒドとして作用した事が考えられる。いずれの現象が起こっているかは、今回の研究からは明らかでない。

ホルマリン処理キートセラス投与によるアコヤ貝の免疫機能に及ぼす影響

検討項目	コントロール群(無処置キートセラス投与群)	曝露群(HCHO処理キートセラス投与群)
血リンパ細胞数 (/mm ³)	772±213	1316±478 ↑
血リンパ細胞分画		
顆粒球	27.2±13.1	24.6±12.2
無顆粒球	46.2±12.6	43.9±6.3
膨潤細胞	26.6±15.7	31.5±15.0
NBT還元能細胞比率 (%)	16.8±8.5	9.2±4.3 ↓
凝集素 (凝集素価・log)	5.42±0.67	5.50±1.17
食作用陽性細胞比率 (%)	33.9±10.8	31.9±8.5
遊走能	74.2±14.2	41.3±8.2 ↓

【アコヤ貝飼育関連写真】



飼育のようす（左が対照群、右が曝露群のエサ投与）



対照群は飼育水がやや混濁し、曝露群は清明