

## 技術情報

## 食酢塩水処理がサケ稚魚の嗅覚に与える影響

たかはし さとる

高橋 悟 (北海道区水産研究所 徳志別さけます事業所)



## はじめに

サケ稚魚を飼育する中で、イクチオボド、トリコジナ、キロドネラといった原虫が寄生する場合があります。こういった原虫が寄生すると、ひどい場合には餌食いが悪くなったり、細菌性鰓病を併発したり、海水適応能が低下し大量減耗を引き起こしたりしてしまいます。原虫の駆除にはこれまでホルマリンが有効とされてきましたが、2003年の薬事法改正後は使用が禁止され、その後は塩水やそれに食酢を混ぜたものにサケ稚魚を浸漬（以下、食酢塩水処理）することにより駆除するようになってきました。こういった駆除方法は、技術者・研究者が試行錯誤をくり返し、駆除効果が高く、なおかつ処理によるサケ稚魚の減耗が少ないものとして用いられ始めたものです。その一方で、食酢塩水処理はいわば酸による処理であることから、サケ稚魚が母川記銘する際に重要となる嗅覚への影響が懸念されました。

そこで、今回の実験では食酢塩水処理後のサケ稚魚に匂い刺激を与えたとき、処理前と同様の反応（匂い応答）が得られるか比較することにより、本処理がサケ稚魚の嗅覚に与える影響を調べることができました。

## 匂い刺激に対する嗅覚受容器の反応

サケ稚魚は、我々人間と同じように鼻腔内にあ

る嗅覚器により匂いを感じ取っています。匂いを感じ取ると、鼻腔内の嗅上皮表面で陰性電位が生じます。この現象を Electro-olfagram (EOG) とい、EOG の振幅は匂いの強さに対数比例します（図 1）。今回の実験では、サケ稚魚に対して食酢塩水処理を行った前後で EOG を測定することにより影響を調べました。食酢塩水処理は、サケ稚魚の鼻腔内に 1.5% 食塩水を 45 分、次に 1.5% 食塩水と 1.0% 食酢の混合液を 15 分、流速 2 ml/分 で流すことにより行いました。これは北水研の飼育事業で行っている処理の中でも濃い食酢濃度です。通常の飼育事業では体表などに寄生している原虫を落とすための処理なのでサケ稚魚を処理液中で遊泳させますが、今回は嗅覚への影響のみを調べることを目的としていましたので処理液を鼻腔内に流す方法をとっています。

実験は以下のように行いました。まず、食酢塩水処理を施す前に匂い刺激としてアミノ酸を流して EOG を測定し、その後食酢塩水処理を行って一定時間毎にアミノ酸による刺激を与えて EOG を測定しました。図 2 は匂い刺激にアミノ酸の一種である L-セリンを用いた一例です。処理直後の EOG の電位変化が処理前と比較して大きく減少しています。このような反応はその他の個体においても同様な測定結果が得られています。しかし、処理後 3 分、6 分における EOG は処理前とほぼ同じ波形を示していることから回復しているものと判断され、嗅覚への本処理の影響は一時的なも

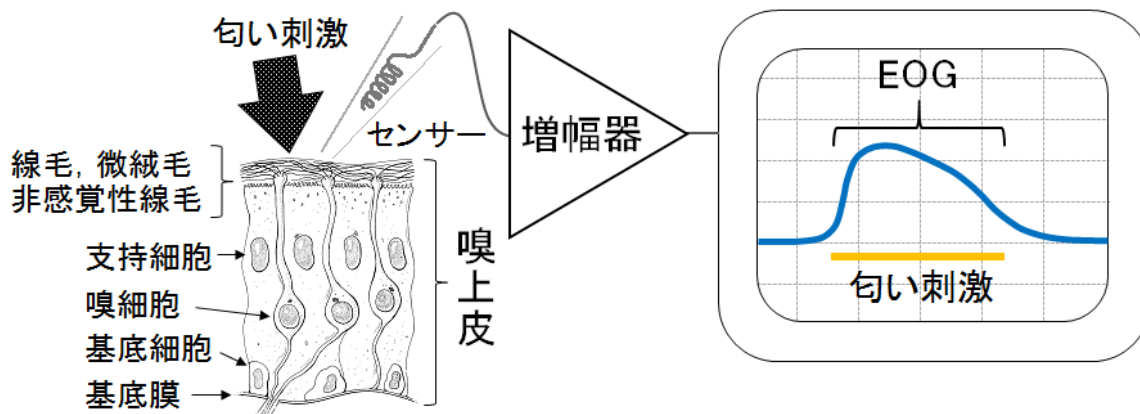


図 1. 嗅上皮の構造と EOG の測定概略図。EOG は、匂い刺激に対する嗅細胞の受容器電位を表す。匂い刺激に対して嗅覚器がどの程度の強度で興奮しているのか測定することができる。

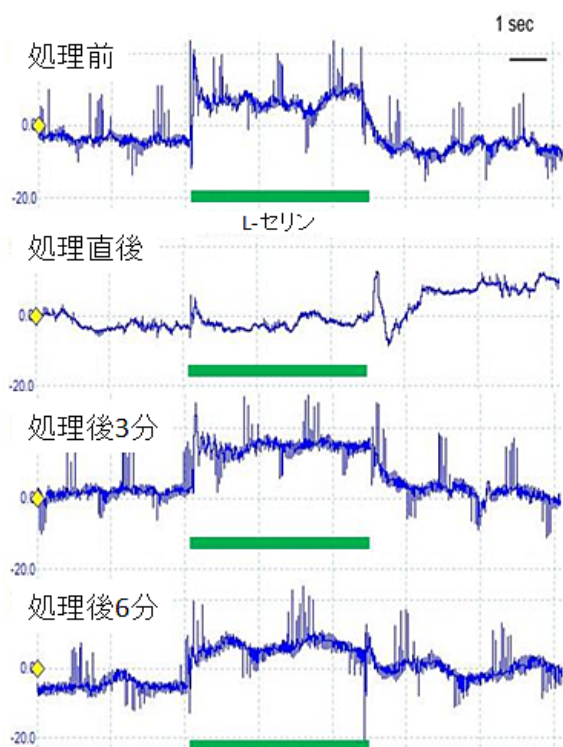


図 2. 匂い刺激にアミノ酸の一種である L-セリンを用いたときの EOG 測定結果の一例。緑色のバーは、L-セリンを流した時の反応を示す。

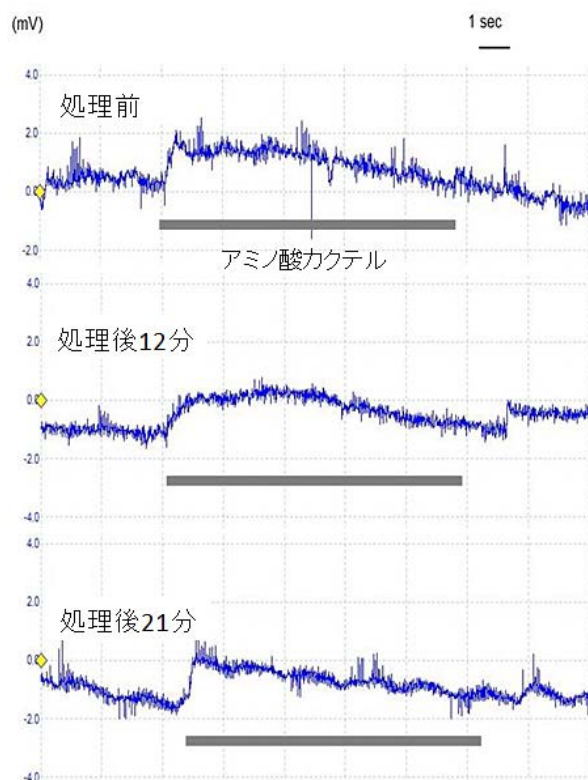


図 3. 匂い刺激にアミノ酸カクテル (L-セリン, L-リジン, L-グルタミン酸ナトリウム, L-メチオニン) を用いたときの EOG 測定結果の一例。灰色のバーは、アミノ酸カクテルを流した時の反応を示す。

のであり、回復可能であると考えられました。

また、複合的な匂い刺激に対する応答への影響も調べるため、アミノ酸カクテル (L-セリン, L-リジン, L-グルタミン酸ナトリウム, L-メチオニン) を用いた測定を行ったところ、図 3 のように EOG は処理後 20 分程度でほぼ完全に回復していました。

このような測定結果から、食酢塩水処理はサケ稚魚の嗅覚を一時的に低下させるものの、処理後 1 時間以内で回復する傾向が見受けられました。なお、この測定では EOG による電気的な反応を確認しましたが、嗅覚行動の観察による評価も不可欠であると考えられたことから行動観察も行いました。

### 匂い刺激に対する行動的反応

匂い刺激に対する行動実験は浮上魚 (BW 0.5g) および飼育魚 (BW 1.2g) をそれぞれ 10 尾ずつ用いて、食酢塩水処理を行う前後における匂い刺激 (L-グルタミン酸ナトリウム) に対する行動変化を動画解析により調べました (図 4)。最初に匂い物質を予め学習させた供試魚を試験水槽に 1 尾入れて静置させ、静常時の行動を 1 分間記録し、

さらに匂い物質を上流部から流した後の行動を 4 分間記録しました。次に、1.5% 食塩水に 45 分、さらに 1.5% 食塩水と 1.0% 食酢の混合液に 15 分浸漬させ、同様に匂い物質に対する行動を観察しました。食酢塩水処理直後において処理前より匂いに対する反応が低下した場合には 2 時間後に同様の行動観察を行い、回復状況を確認しました。

その結果、浮上魚では 10 尾中 6 尾、飼育魚では 10 尾中 2 尾が処理直後に匂い刺激に対する反応が低下しました。反応が低下した個体について処理 2 時間後に同様の観察を行うと、浮上魚は 6 尾中 3 尾、飼育魚では 2 尾中 2 尾が処理前と同等の反応を示しました。

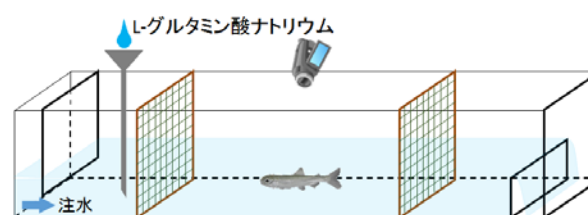


図 4. 匂い刺激 (L-グルタミン酸ナトリウム) に対する反応行動の観察方法。

このように、処理後に反応が低下する個体もみられたことから、食酢塩水処理の影響が全く無いわけではありませんが、処理後2時間には概ね全ての個体が回復しているため、EOGの測定結果と同様に嗅覚への影響は一時的であることが考えられました。また、観察結果を魚の大きさと比較したところ、魚体が大きいほど食酢塩水処理の影響を受けにくく、回復が早いことも分かりました。

### 組織観察（サクラマス幼魚より）

食酢塩水による嗅覚への影響を組織学的にも調べてみました。組織学的観察にはより細かい観察が可能となるよう蛍光色素も同時に使用しました。蛍光色素としてFM1-43FX（Molecular Probes社）を用いましたが、この色素は嗅覚受容の応答強度に比例して嗅細胞に取り込まれることが分かっています。すなわち、蛍光強度によって嗅覚応答の大きさを定量出来るわけです。ここでは、濃度や鼻腔内へ流しこむ流速を変えた場合の影響も確認しました。

供試魚には組織検査が明瞭であるサクラマス幼魚を用い、まず、1.5%食塩水を45分、次に1.5%食塩水と1.0%食酢の混合液を15分、鼻腔内に20ml/分（自由遊泳状態と比べると大きい値）で流して処理1とし、処理1の2倍濃度の処理液を同様に流したものを処理2、処理1と同様の処理液に浸漬処理したものを処理3としました。

その結果、嗅板断面の蛍光染色による観察から処理2>処理1の順に損傷が大きく、処理3は比較的損傷が少ないことが分かりました（図5）。

また、処理1と処理3について嗅上皮表面を走査型電子顕微鏡によって観察したところ、浸漬処理の処理3は線毛型嗅細胞、微絨毛型嗅細胞および支持細胞の非感覚性線毛がほぼ正常な状態で観察されたのに対し、処理1では粘膜表面が損傷を受け、嗅細胞が配列する層が剥がれて基底膜が露出している部分が多く見られました（図6）。

これらのことから、処理1程度の濃度でも鼻腔内を一定の速度で流れるとかなり損傷を受けることが分かりました。また、食酢塩水の濃度が同一でも鼻腔内を一定の流量で流れた場合の方が、浸漬したときよりも嗅上皮細胞を損傷することが分かりました。このことは、鼻腔内へ大量に処理液が流入するような条件下では嗅覚に対する影響が大きくなることを示しています。すなわち同一の濃度による食酢塩水浴を行った場合でも水槽内で活発に遊泳した場合は損傷が大きくなることを示唆します。したがって、食酢塩水処理中は遊泳活性を下げるよう注意が必要だと思われます。ただし、濃度の面については、処理3は前述しているように飼育事業で用いられている処理の中でも比

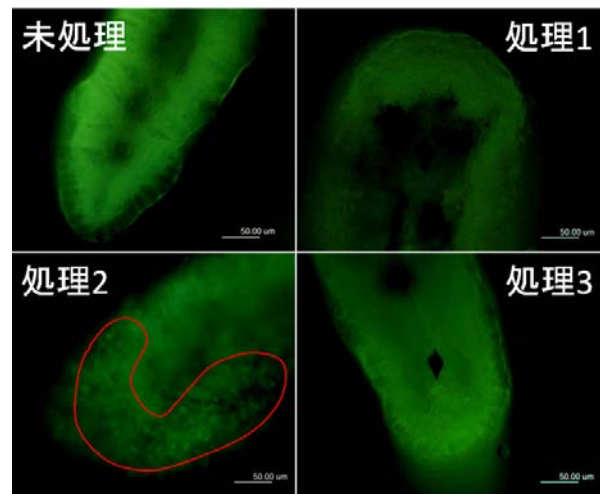


図5. 蛍光染色した嗅板の断面。写真左上は未処理、右上は処理1、左下は処理2、右下は処理3。処理2の赤丸は、粘膜の損傷により組織の乱れが生じていると思われる部分。

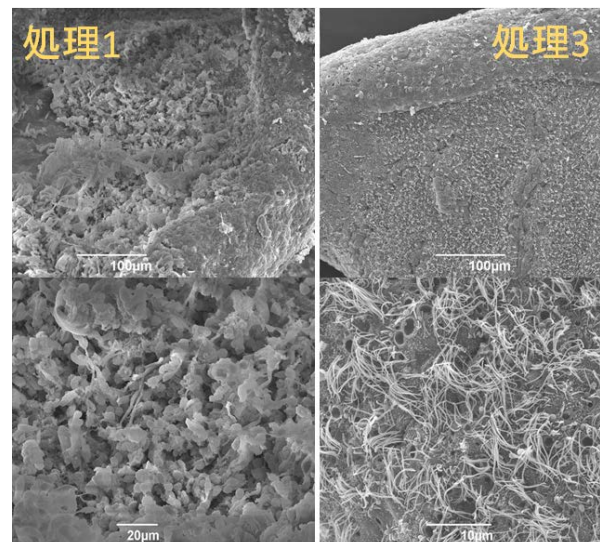


図6. 走査型電子顕微鏡による嗅上皮表面の様子。写真左は処理1、右は処理3で、上段は広域写真、下段は拡大写真。処理3の拡大写真では線毛などが正常な状態で写し出されているが、処理1の拡大写真では剥がれ落ちて基底膜が露出している。嗅上皮の構造は図1を参照。

較的濃い方ですので、これよりも濃く実施するケースは稀かもしれません。

### まとめ

嗅覚受容器の反応状況と行動観察から、食酢塩水処理がサケ稚魚の嗅覚に与える影響は一時的なものであると考えられました。ただし、浮上魚に対する食酢塩水処理は、嗅覚が回復するのに時間がかかる可能性があるため、放流するまでの期間

に留意する必要があるようですが、処理後の即日放流を行わない限りは母川記銘への影響は小さいものと思われます。また、組織観察により、食酢塩水の濃度や、鼻腔内に流れ込む流速により嗅上皮へのダメージが異なることから、これらに留意することで影響をより小さく留められると考えられました。鼻腔内に流れ込む流速について注意する点としては、食酢や塩を溶かすための攪拌作業をサケ稚魚が入った状態で必要以上に継続しない、もしくは継続的な攪拌作業が必要な場合には強さに注意するといった点が該当すると思われます。

## おわりに

近年、食酢によるサケ稚魚の嗅覚への影響を心配する声を耳にすることが多々ありました。もし、食酢を使用したいけれど嗅覚への影響が心配だと

いうときには、本実験の結果を参考にさせていただければ幸いです。また、種々の原虫病対策については前号（SALMON 情報 No.7）24～28 ページの「さけますふ化場で問題となる疾病の実態と対策」でも取り上げられておりますので、それも参考にさせていただければと思います。サケ稚魚を健苗育成するための課題の一つとして、原虫病対策は喫緊の問題ではないかと思えます。今後も北水研では原虫病対策にも取り組んでいきたいと思っております。

本実験結果は、東海大学海洋学部海洋生物学科の庄司隆行教授と実施した共同研究の成果によるものです。実験に際して、格別なご助言、ご指導を賜りました庄司隆行教授、嗅覚受容器の反応および組織観察に携わっていただいた同学科の林大地氏、立道和之氏には厚く御礼申し上げます。