

初期餌料イソヒメミミズに 抗菌成分を付加する試み

筆者は、本誌2016年12月号に「イソヒメミミズのアルテミア代替餌料としての可能性」と題して寄稿した。イソヒメミミズ(*Pachydrilus nipponica* Yamaguchi)は海浜の潮上帯から潮間帯に棲息する貧毛類で、「破片分離」と呼ばれる無性生殖で大繁殖する。そのため、アルテミアを代替あるいは補完する生物餌料になり得るのでは?と考え、増殖実験、DHA・EPAの強化実験、供試個体の脂肪酸・アミノ酸組成の分析、魚介類稚仔による摂餌選択性実験などを行った結果をレポートしたもので、「有用魚介類の初期餌料として有効である」というのが筆者の「結論」だった。その後、実際に観賞魚の世界で用いられている。

今回は、そのイソヒメミミズに抗病成分を付加することもできるのでは?と考えて行った実験の結果を紹介させていただく。それが可能であれば、飼育対象の魚介類稚仔の生残率向上が期待できる。

ミミズ類の重金属蓄積能に注目

付加する抗菌成分としては、アスコルビン酸と3価鉄イオンの錯体(以下、アスコルビン酸-3価鉄イオン)、およびラクトフェリンと3価鉄イオンとの錯体(以下、ラクトフェリン-3価鉄イオン)を用いることにした。アスコルビン酸(ビタミンC)とラクトフェリンそれぞれによる魚類等の生態防御能賦活機能については、本誌読者であればすでにご存知だと思う。鉄イオンとの錯体に注目したのは、①アスコルビン酸と3価鉄イオンの錯体(アスコルビン酸により還元されて2価鉄イオンとなり腸管から吸収される)はアスコルビン酸単独の100~2000倍という強力な殺菌作用を有することが報告されている、②ラクトフェリンは3価鉄イオンと親和性が高く強固な錯体を形成することが知られている、③ミミズは体内に重金属(4以上の金属。鉄、鉛、水銀、カドミウム、亜鉛など)を蓄積することが知られ

杉本 正志 (すぎもと まさし)

(株)イケテック 代表。東京経済大学経営学部卒、東京水産大学水産経営学研修生を経て、1984年に小笠原村商工会経営指導員。1986年(株)国際水産技術開発入社。主に民間の貝類養殖経営のコンサルタント、JICA 専門家等に従事した後、1996年に独立し、現職に至る。

ているため、金属錯体の方が蓄積率が高いのでは?と考えた、からである。

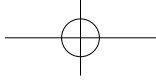
実験方法

アスコルビン酸-3価鉄イオンおよびラクトフェリン-3価鉄イオンを含有する試験飼料を作成し、イソヒメミミズの成体に摂餌させ、その生体内の含有量を調べた。また、試験飼料を摂餌したイソヒメミミズを、海洋性発酵細菌を塗布した寒天培地の一部に上塗りし、当該細菌の増殖の様子を観察した。

1) 抗菌成分の体内蓄積量の評価

まず、牛乳250 mLにアスコルビン酸50 mg、寒天パウダー4 g、塩化第二鉄(FeCl₃) 100 mgを加え、攪拌機で混合・溶解させた「A液」、牛乳250 mLに市販のラクトフェリン(森永乳業製)50 mgと塩化第二鉄100 mgを加え、攪拌機で混合・溶解させた「B液」を作成し、それぞれ、アスコルビン酸-3価鉄イオン、ラクトフェリン-3価鉄イオンを形成させた。そして、牛乳のタンパク質に含まれる消化酵素やアスコルビン酸の働きで3価鉄を2価鉄に還元し、吸収効率の良いヘム鉄にした上で、そのA液とB液を等量合わせた500 mL混合溶液を作って5分ほど加熱、それを冷却してゲル状の牛乳寒天500 gを作成した。

その牛乳寒天500 gをサイコロ状に切り分けたものを試験飼料とし、底面に砂を敷いた飼育容器内のイソヒメミミズ成体(体長5~15 mm)70 gに対して、残餌が出ないように、2日おきに30 gを計3回(計90 g)与えた。



すなわち、給餌日は、1日目、4日目、7日目である。イソヒメミズは1~2日で体重と同じ量を摂餌し、消化・排泄するとされており、そうであれば10日目には腸内に残餌はないはずだが、もう1日待って11日目に成体50gを冷凍し、(一財)日本食品分析センターに郵送して鉄分含有量を分析してもらった。結果、豚レバー並みの12.4mg/100gの鉄分が含有されていた。もし7日目給与の試験飼料が腸内に半分残っていたとしても鉄分含有量は計算上4.2mg/100g、全量残っていたとしても8.5mg/100gである。また、今回は対照区の設定および分析は行っていないが、3年前に行った海浜に生息していたイソヒメミズの分析結果(蛍光物質に関する共同研究の中で実施)では鉄分は0だったことなどから、飼料中の鉄分およびそれと錯体を形成しているアスコルビン酸およびラクトフェリンは体内に蓄積することが示唆された。

2) 有効成分を付加した虫体の抗菌作用

純水1Lにポリペプトン5g、酵母エキス3g、塩化ナトリウム30g、硫酸マグネシウム0.1g、カツオエキス3g、グリセリン3mL、寒天25gを加えて80℃に加熱し、完全に溶解させた後、寒天が固まる前に4個のシャーレに分注した。そして、そのうちの2個にビブリオ・フィシエリ (*Vibrio fischeri*) を、残りの2個にフォトバクテリウム・フォスフォリウム (*Photobacterium phosphoreum*) を塗布した。どちらも海洋性発光細菌であるが、塗布した時点では菌体数が少ないため、発光していない。

次いで、それぞれの発光細菌を塗布したシャーレの一方(2個中1個)にアスコルビン酸-3価鉄イオンを含有するイソヒメミズを、もう一方にラクトフェリン-3価鉄イオン含有するイソヒメミズを、各々中心部にみに重ねて塗布した。どちらのイソヒメミズも生体10gを冷凍後にホモジナイズしたものである。すなわち、4個のシャーレは、「ビブリオ・フィシエリ+アスコルビン酸」「ビブリオ・フィシエリ+ラクトフェリン」「フォトバクテリウム・フォスフォリウム+アスコルビン酸」「フォトバクテリウム・フォスフォリウム+ラクトフェリン」の4種類になる。

これらを21℃の恒温器で8時間培養したところ、どちらの菌種も発光したが、アスコルビン酸およびラクトフェリンを含むイソヒメミズを塗布した部分は発

光していなかった。一方、上記以外に対照区として設けていた、抗菌成分の付加を行っていないイソヒメミズを重ねて塗布したシャーレでは、その部分も発光していた。このことから、通常のイソヒメミズは、抗菌成分を持っていたとしてもごくわずかであることも示唆された。

乾燥飼料化の可能性

イソヒメミズ生体に含まれるタンパク質分解酵素は、生細胞には作用しないが、死細胞に対しては瞬時に作用し、生体時の成分の変化も進む。これを防止するため、アスコルビン酸およびラクトフェリンを付加したイソヒメミズ生体10gを5℃で休眠状態とした上で、ちりめんじゃこ風に薄く広げ、-20~-40℃で急凍結して酵素の作用を抑制した。さらに、24時間の自然乾燥を行うことで腐敗臭のない淡黄色の“乾燥飼料”とすることができた。分析は行っていないが、褐変していないことからアスコルビン酸は残存していると考えている。この乾燥飼料は吸水性にも優れており、カクレクマノミ (*Amphiprion ocellaris*) とジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の成魚で摂餌選択性を調べたところ、問題なく摂餌されることが確認できた。

謝辞

本実験を進めるにあたり、イソヒメミズの同定などのご協力をいただいた横浜国立大学の西栄二郎博士に深く感謝の意を表す。

引用・参考文献

- 1) 村田晃、日高敏勝、神田康三、加藤富民雄(2008): 2価鉄の殺菌作用と作用機構、佐賀大学農学部彙報、第93号。
- 2) 角田出、佐藤利夫、川口明廣(1997): ラクトフェリン投与による海産魚の体表粘液分泌亢進、日本海水学会誌、51(1)。
- 3) 吉田実、星井博(1978): ミミズの栄養価について、日本家畜学会誌15(6)、308-311。
- 4) 室賀清邦・中井敏博(1990): 種苗生産におけるヒラメ仔稚魚の病気、水産増殖、38(4)、396-397。
- 5) 杉田創・駒井武・井本由香利・原淳子・今泉博之(2013): 発光バクテリアを用いた重金属等の土壤汚染簡易評価法の開発、地下水学会誌、55(4)、329-347。
- 6) 神谷貴文・金子信博(2005): 重金属汚染地におけるミミズの体内蓄積、日本生態学会、第11回地下水・土壤汚染とその防止対策に関する研究集会要旨集、5-8。