

真空採血管を用いた魚類からの採血法

杉 山 秀 樹

(秋田県水産振興センター)

血液の機能は、それが体内をくまなく循環すること、及びその物理化学的性状を概ね一定に保つ性質によって特徴づけられ、呼吸機能のほか、栄養物、排泄物、ホルモン等の運搬機能、浸透圧調整機能、異物に対する防衛機能等多くの機能を有している (板沢1977)。このことから、血液を用いた健全性の指標、魚病診断、種族判別、核型分析、雌雄判別等多くの報告があり^{*}、魚類から血液を得ることは重要な技術となっている。

しかし、採血法に関しては、採血部位や連続採血法については報告があるが、採血器材に関するものは少ない。今回、魚類から安全に、簡単に、かつ、多数の個体から採血する方法として、我々の研究室で行っている真空採血管による採血法を紹介する。

本文に入るに先立ち、貴重な多数の分献を貸与された東京大学瀬崎啓次郎博士に深謝するとともに、内容について多くの御助言をいただいた富山県水産試験場宮崎統五氏にお礼申しあげる。

1. 真空採血管による採血法

(1) 採血器材

真空採血法に使用する器材は、図 1 に示すとおり次の 3 部品であり、いずれも市販されている。

① 採血針

1 回の穿刺で複数の採血ができるもの (マルチプル針) と、1 本採血専用のもの (シングル針) とがある。針の太さ (ゲージ) も各種あり、対象魚種に合わせて選択する。我々の研究室では、普通、長さ 38mm、ゲージナンバー 22 のマルチプル針を使用している。採血針は使い捨てで、1 個体ごとに取り換える。

② ホルダー

採血針をねじ込み固定するとともに、採血管を保持するためのもので、これ自身は血液に触れないことから繰り返し使用ができる。採血管のサイ

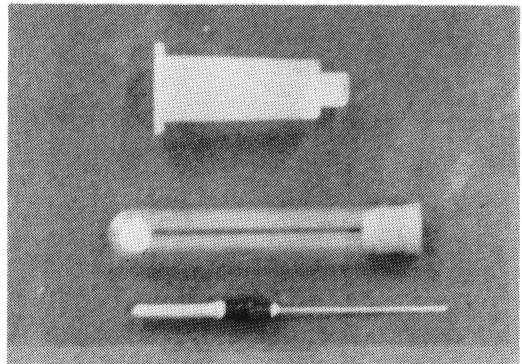


図 1 真空採血法に使用する器材
(上からホルダー、採血管、採血針、
採血管内の白い物質は抗凝固剤)

^{*} これらに関する報告は 1,000 件を超えており、池田ら 1986、尾崎 1968、石岡 1984、昭和 38 年度日本水産学会年會シンポジウム魚類血液学の水産への応用 (日水誌 1963) 等に詳しく述べられている

ズに合わせ、大型または小型のホルダーを選択する。

③ 採血管

ゴム製のキャップが付き、内部が真空になっているもので、採血針がゴム栓を刺通すると陰圧により採血が行われる。採血管の容量は各種あり、目標とする採血量に合わせ選択する。また、採血管にはEDTA、ヘパリンナトリウム、ヘパリンリチウム等の抗凝固剤が予め入っているものもあり、目的に応じて使い分ける。我々の研究室では、普通、ヘパリンナトリウム粉末が入っている3 mlまたは5 mlの採血管を使用している。

(2) 採血手順

ホルダーに採血針を取り付け、真空採血管を入れる。この状態で、川津(1980)に従い、尾柄部正中線上に注射針を挿入し、注射針の先端が脊椎骨に軽く触れるようにする。ここで、採血管を先端方向に押し、採血針後端の針を採血管ゴム栓に刺通させる。これにより、血液が採血管内に入ってくる。血液が吸引されない場合は、わずかに注射針先端を移動させたり、心持ち注射針を引くようにする。採血量が所定量に達したら、注射針を抜く。この時、注射針を残し、採血管だけを抜き取り、別の採血管を押し入れることにより、再び採血ができる。採血後は管を良く振り、管内の抗凝固剤と良く混和させる。

なお、採血中に魚が暴れ採血針が血管から外れると空気を吸引し、それ以上の採血ができなくなることがあるので注意が必要である。また、この尾部血管からの採血は、脊椎骨腹側に尾動脈と尾静脈が並行しているため、動脈血か静脈血かを特定できない(川津1980)。

以上の手順に従い、慣れれば3~5 mlの採血は20秒程度で終わることができる。採血状況をサケ、ハタハタ、クロソイ、ヒラメについて図2~5に示す。



図2 真空採血法によるサケからの採血
(5 mlの採血管を使用)

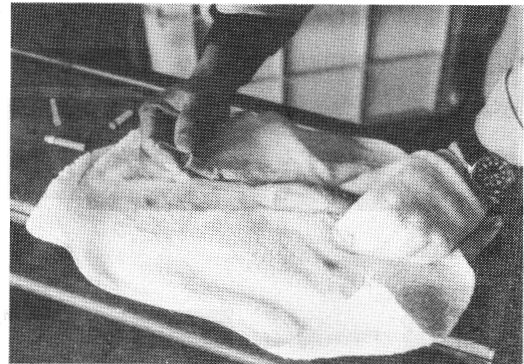


図3 真空採血法によるハタハタからの採血
(3 mlの採血管を使用)

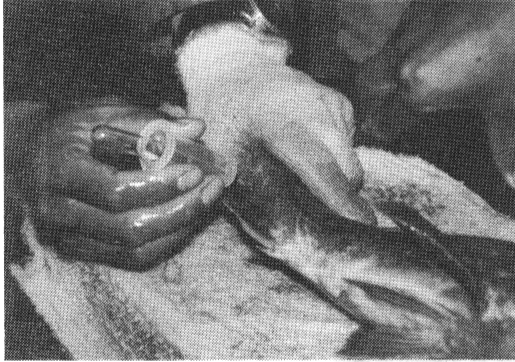


図4 真空採血法によるクロソイからの採血
(採血針は採血管ゴム栓を刺通してない状態)



図5 真空採血法によるヒラメからの採血

2. 血液の処理及び分析

採血後、採血管は直ちに氷蔵し分析に供する。分析項目は、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、血清（血漿）浸透圧等が一般的であり、遠沈後の血球成分についてアイソザイム分析を行うこともある。

真空採血管を用いた時は、注射筒の場合のように、サンプルを別の試験管に移す必要はなく、良く振った後にキャップを取り、そのままヘマトクリット毛細管による試料採取が可能である。また、我々の研究室では、血清（血漿）分離に際し、採血管に直接血清（血漿）分離剤（市販名、シュアーセップJ R. セパレイド栄研）を入れ、所定の時間冷却遠心を行っている。なおここで、抗凝固剤の入った採血管を用いると血漿が得られ、これが入っていない採血管を用い、分離剤を入れる前に血餅を取り出しておくことと血清が得られる（最近では、血清分離剤入りの真空採血管も市販されている）。

真空採血法により採取し、上記の方法により分析した例として、ハタハタ親魚約200尾について行ったもの（杉山1987）を図6～7に示す。また、サケ来遊親魚（約150尾）について同様の方法で分

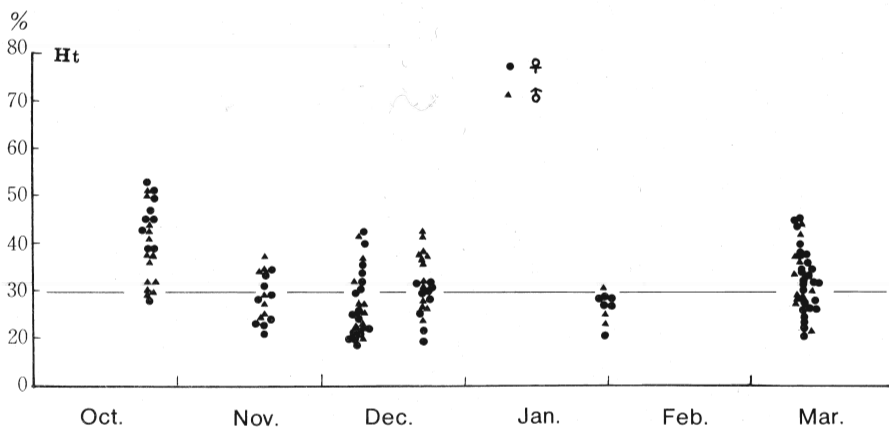


図6 真空採血法によるハタハタ血液のヘマトクリット値経月変化

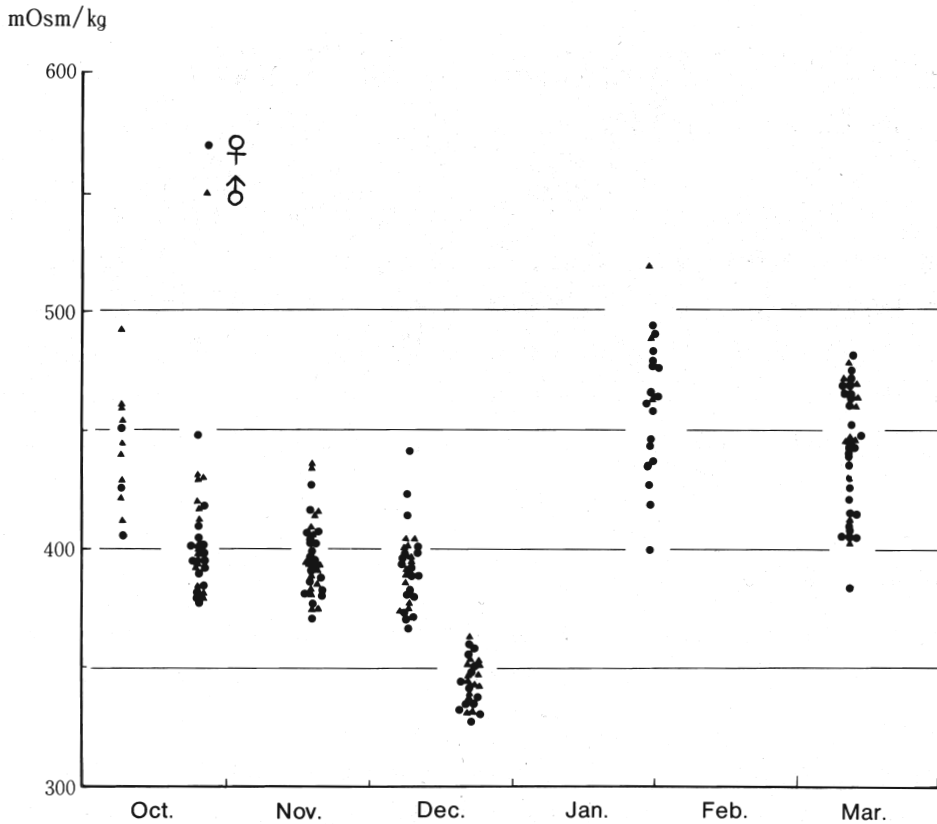


図7 真空採血法によるハタハタ血漿浸透圧の経月変化

析した例（大竹1989）や、クロソイ養成親魚約300尾の血漿分離後の血球成分についてアイソザイム分析した例（中嶋ほか未発表）がある。

3. 注射器を用いた採血法との比較

真空採血管を用いた採血法と、従来の注射器（ディスポシリンジ）による方法とを比較すると次のとおりとなる。

1) 採血部位

注射器では、魚種あるいは目的に応じ、心臓、動脈球、キュービエー氏管（SANG1960）、背大動脈（SCHIFFMAN1959）、尾動脈（ITAZAWA1957）、尾部血管等からの採血が行われている。その場合、動脈球ではその搏動に合わせ吸引したり、その他の場合でも、状況に応じ吸引の度合を調節できる。

しかし、真空採血法では真空採血管の陰圧で吸引することから、その微妙な調節はできない。このため、採血部位は尾部血管に限られる（魚種によっては他の部位でも可能と考えられるが、筆者は試みてない）。

2) 採血量及び採血時間

真空採血法による採血可能量は、魚種、サイズ、魚の状態などにより大きく異なるが、80g程度のハ

タハタで2 ml前後、500 g程度のクロソイで10 ml前後である。また、採血に際しては、注射針が血管に良い位置で当たった場合、血液は採血管内に噴水状に吸引され、10秒程度で採血を終えることができる。しかし、血管への挿入位置が悪い場合や、途中で位置が動いた場合は1分以上を要することもある。

一方、注射器による採血量は、尾部採血では真空法とほぼ同程度の量が得られるが、採血時間は長くかかる。また、量及び時間は習熟程度により大きく相違する。

なお、体重0.5～1.2 kgの養成クロソイ約300尾から真空採血法により1個体当たり3 ml前後の採血を行い、そのまま水槽に戻し飼育を続けたが、これに起因すると推察される斃死は認められなかった。

3) 血液の処理

真空採血管を使用する場合、予め抗凝固剤が入っているため、採血前にシリンジを抗凝固処理する必要がない。また、採血管でそのまま遠沈処理ができることから、採血後に血液を試験管に移し換える必要がなく、これに要する時間及び血液のロスがない。

なお池田ら(1986)は、塗抹標本で安静状態の血球像を得る為には注射器採血は望ましくないとしており、この点に関し留意する必要がある(真空採血法については言及してないが同様と考えられる)。

4) 経 費

真空採血法に要する経費は、採血針17円/本、ホルダー10円/本、ヘパリンナトリウム処理採血管30円/本、程度であることから、1回の採血は50円前後で済む(テルモ社製)。一方、注射針の付いたディスポシリンジは30～50円/本であるが、抗凝固処理、移し換えの試験管等の経費を考慮すると、両者の差はほとんど認められない。

以上述べたとおり、真空採血法と従来の注射器による採血法にはそれぞれ一長一短があるが、前者の場合、特別な技術や習熟を必要とせず、採血前後の処理が簡便であり、1回に多数の個体を処理するのに適した方法であると言える。今後とも真空採血法に関する多くの事例を蓄積し、その利用について更に検討する必要があると考える。

文 献

- 池田彌生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎(1986) 魚類血液図鑑. 緑書房, 東京, 361pp.
- 石岡宏子(1984) マダイのストレス反応に関する生理生化学的研究. 南西水研報, (17), 1-133.
- ITAZAWA, Y. (1957) Gas content of the blood in response to that of medium water in fish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 23(2), 71-80.
- 板沢靖男(1977) 改訂増補魚類生理. 川本信之編, 3-45. 恒星社厚生閣, 東京, 605pp.
- 川津浩嗣(1980) 養殖魚における病害の予防に関する研究. 農林水産技術会議事務局研究成果, 128, 17-20.
- 大竹 敦(1989) 来遊親魚調査(成熟度調査). 昭和62年度さけ・ます増殖振興事業報告, 秋田県, 43-59.

- 尾崎久雄 (1968) 魚類生理学講座 1 血液・循環. 第 5 版, 緑書房, 東京, 326pp.
- SANO, T. (1960) Haematological studies of the culture fishes in Japan 4. Method for repeated drawing of blood from Cuvierian duct. *J. Tokyo Univ. Fish.*, 46 ($\frac{1}{2}$), 89-90.
- SHIFFMAN, R.H. (1959) Method for repeated sampling of trout blood. *Prog. Fish cult.*, 21(4), 151-153.
- 杉山秀樹 (1987) ハタハタ親魚の成熟にともなう血清浸透圧の変化. ハタハタ研究協議会議事録, 30-37.

[質疑応答]

- 池原 (日水研) 採血時には麻酔をかけるか。
- 杉山 (秋田水振セ) クロソイや大型魚, 暴れる魚等は麻酔をするが, ハタハタ等の小型魚の場合
はしない。
- 宮崎 (富山水試) セパレイドやシュアセップの役割は血球成分を物理的におさえ込むことと考
えてよいか。また, セパレイドやシュアセップは滅菌が可能か。
- 杉山 セパレイドやシュアセップは血球成分を物理的に分離するものである。セパレイドは滅菌で
きないが, シュアセップは滅菌されていると思う。
- 中西 (日水研) 短時間で採血した場合, 血液性状等に変化はないのか。
- 杉山 詳細な検討は行っていない。