

## 免疫賦活剤を投与したアユの生体防御能の評価

|       |          |
|-------|----------|
| 誌名    | 事業報告書    |
| ISSN  | 02862166 |
| 著者    | 青柳, 敏裕   |
| 巻/号   | 30号      |
| 掲載ページ | p. 7-9   |
| 発行年月  | 2002年12月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



# 免疫賦活剤を投与したアユの生体防御能の評価

青柳 敏裕

アユの冷水病のように、条件性病原体とみなされている疾病では、発病の引き金として魚体の生体防御能が大きく関与しているものと考えられる。また、ワクチンの有効性を検討する上でも、生体防御能の向上は重要な課題と考えられる。

そこで、地下水等の病原体非汚染と想定される用水から、河川水等しばしば病原体汚染が問題となる用水に種苗を移動する場合、または種苗のワクチン処理を想定して、移動やワクチン処理の前に、一定期間免疫賦活剤としてキチン、ビタミンC、ビタミンEを経口投与し、かつその後もビタミンC及びEを継続して投与した時の、生体防御能の向上について検討した。

## 材料及び方法

平成13年8月13日から9月16日までの35日間、試験を行った。供試魚は、当所で継代飼育の海産系人工アユ(F2)で、供試時に280日齢、平均体重12.5gであった。なお、供試前までは市販の配合飼料(日本農産工:あゆソフト。以下、配合飼料という。)を給餌し、飼料添加物は投与しなかった。

供試魚を、6.2×0.9m(5.7m<sup>2</sup>)のコンクリート試験池6面に、1池当たり500尾ずつ、馴致のために8月2日から収容した。11日間の馴致期間中に、異常な行動や魚病の発生がないことを確認後、試験を開始した。

免疫賦活計画として、キチン、ビタミンC、ビタミンEの3種類を7日間、配合飼料に添加した後、1日無給餌として、試験9日目以降、ビタミンC及びEの添加を試験終了時まで継続することとした。

キチンにはイムノプラス25(三鷹製薬、製品1kgに低分子化キチン25g含有)を、ビタミンCにはCオイル100リケン(理研ビタミン、製品1kgにL-アスコルビン酸カルシウム121g含有)を、ビタミンEにはEフィードオイルリケン(理研ビタミン、製品1kgにαトコフェロール100g含有)を使用した。各々の添加量は、イムノプラス25は魚体重1kg・1日当たり0.5g(低分子キチン12.5mg含有)、Cオイル100は餌1kg当たり3,000mg(L-アスコルビン酸カルシウム363mg含有)、Eフィードオイルは餌1kg当たり300mg(αトコフェロール30mg含有)とした。給餌量は魚体重の3%とし、1週間ごとに平均体重から調整した。

設定区の概要を図1に示す。

図1 設定区の概要

|      |     | 供試後日数 | 0-7 | 9 | 10-13 | 14-20 | 21-35日 |
|------|-----|-------|-----|---|-------|-------|--------|
| I区   | 賦活剤 | 非投与   |     |   |       |       |        |
|      | 用水  | 地下水   |     |   |       |       |        |
| II区  | 賦活剤 | 1     |     | 2 |       |       |        |
|      | 用水  | 地下水   |     |   |       |       |        |
| III区 | 賦活剤 | 1     | 3   | 2 |       |       |        |
|      | 用水  | 地下水   |     |   |       | 河川水   |        |
| IV区  | 賦活剤 | 1     | 2   |   |       |       |        |
|      | 用水  | 地下水   |     |   |       | 河川水   |        |
| V区   | 賦活剤 | 非投与   |     |   |       |       |        |
|      | 用水  | 地下水   |     |   |       | 河川水   |        |

1: ビタミンC及びE、キチンを経口投与

2: ビタミンC及びEを経口投与

3: 冷水病不活化菌体を浸漬投与

I, II区(II区のみ2池設定)は地下水かけ流しで飼育し、III~V区は試験21日目から14日間、地下水から河川水に切り替えて飼育した。I, II, III, V区の4池について、試験期間中の水温を水温ロガー(StoreWay社、TidBit)により、2時間間隔で測定したところ、それぞれ18.9±0.72℃、18.8±0.70℃、19.0±0.98℃、19.1±0.89℃であった。

また、冷水病ワクチン試験に関する試行として、Ⅲ区には試験9日目にホルマリン不活化冷水病菌体を浸漬投与した。改変サイトファガ平板で15℃ 5日間培養後、掻き取った菌体を滅菌PBS (-) 300mlに懸濁させた。これに0.3%量 (V/V) のホルマリンを添加し、4℃ で一夜静置して不活化菌液とした。これを最終濃度 $10^{5.3}$ CFU/mlになるよう地下水で調整した希釈液30 lに、250尾ずつ2槽収容し、通気しつつ19℃ で30分浸漬した。

試験1日目、9日目、14日目、22日目、35日目 (試験終了日) の5回、1池あて6尾の尾柄部末梢血を試料として、白血球貪食能<sup>1)</sup> 及び冷水病菌に対する試験管内凝集素価<sup>2)</sup> を測定した。

## 結果及び考察

白血球の貪食率及び貪食指数を、図2, 3に示す。白血球貪食率については、各測定日とも、区間に有意差は認められなかった (クラスカル・ワーリス検定、 $p > 0.05$ )。そのため、今回の試験条件で、貪食率の上昇はみられなかった。

白血球貪食指数については、Ⅲ区で、冷水病不活化菌体を浸漬処理直後に実施した試験9日目の測定値が、同日の他の4区より有意に高かった (クラスカル・ワーリス検定、 $p < 0.05$ )。

この貪食指数の上昇が、免疫賦活剤及び不活化菌体の併用によるものであれば、ワクチン処理に免疫賦活剤の投与を組み合わせることで、ワクチンの有効性を向上させ得る可能性が考えられる。今後、攻撃試験まで含めた検討が必要と考えられる。

その他の測定日の貪食指数には、区間に有意差は認められなかった (クラスカル・ワーリス検定、 $p > 0.05$ )。

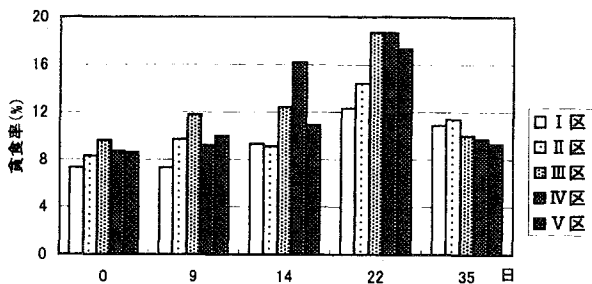


図2 白血球貪食率

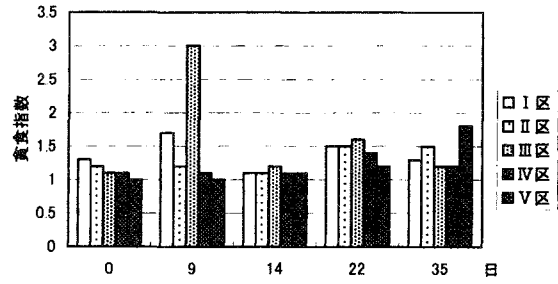


図3 白血球貪食指数

冷水病菌に対する血清凝集素価を、表1に示す。I, II区では、試験35日目まで凝集素価の上昇は認められなかった。

Ⅲ区では、試験14日目、35日目にそれぞれ3/6尾、2/6尾で上昇が認められ、凝集素価はいずれも平均 $1.3 \log_{10}$ であった。凝集素価の上昇がみられたのは一部の個体のみであったため、今後、飼育群内の免疫獲得個体を増やす方法の検討、及び攻撃試験による効果の判定が課題と考えられた。

また、IV, V区でも、試験35日目にそれぞれ1/6尾で上昇が認められ、凝集素価は $1.0 \log_{10}$ 及び $1.3 \log_{10}$ であった。試験期間中に明らかな冷水病の発生は見られなかったが、河川水に冷水病菌が含まれていた可能性も考えられた。

表1 血清凝集素価

|      | 0日目                  |     | 9日目                  |     | 14日目                 |     | 21日目                 |     | 35日目                 |     |
|------|----------------------|-----|----------------------|-----|----------------------|-----|----------------------|-----|----------------------|-----|
|      | 凝集素価 ( $\log_{10}$ ) | 検出率 | 凝集素価 ( $\log_{10}$ ) | 検出率 | 凝集素価 ( $\log_{10}$ ) | 検出率 | 凝集素価 ( $\log_{10}$ ) | 検出率 | 凝集素価 ( $\log_{10}$ ) | 検出率 |
| I区   | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 |
| II区  | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 |
| III区 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 3/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 2/6 |
| IV区  | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | 1.3                  | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 |
| V区   | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 0/6 | <1                   | 1/6 |

検出率:  $\log_{10}$ titerが1以上の試料/検査試料数

平均:  $\log_{10}$ titerが1以上の試料の凝集素価の平均

へい死状況を図4、表2に示す。地下水飼育のI、II区では、免疫賦活剤投与の有無により、へい死率に差は見られなかった ( $\chi^2$ 検定、 $p > 0.05$ )。

河川水飼育のIII～V区では、IV区で2回、V区で1回、注水停止事故の際に大量死が発生したが、へい死状況及び魚病検査結果から、へい死は酸欠によるものと考えられた。

表2には、酸欠によると見られるへい死尾数を除いた値を補正值として示した。補正值で見ると、河川水飼育下では、免疫賦活剤の投与により、有意にへい死率が低下した ( $\chi^2$ 検定、 $p < 0.05$ )。そのため、河川水飼育のように、ストレスを受けやすいと考えられる飼育環境では、免疫賦活剤の投与により生残率が向上する可能性が示唆されるものと考えられた。

また、V区では、試験24日目（河川水飼育に切り替えた3日後）から3日間、共通した症状（体表の白斑と水カビの付着、貧血）によるへい死が発生した。寄生虫及び細菌検査の結果では、一部の個体からAeromonas属の細菌が分離されたのみで、3日でへい死が終息した（治療措置は行っていない）こともあり、へい死の原因は不明であった。その他のへい死は、各区とも散発的なもので、魚病と判断されるへい死はみられなかった。

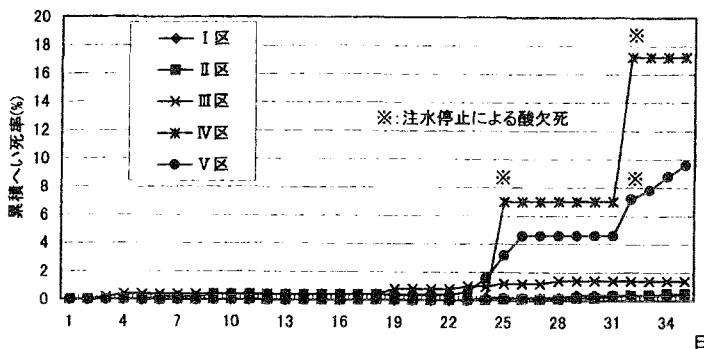


図4 へい死状況

表2 へい死状況

| 設定区  | 各区の概要        | へい死率 (%) |     |
|------|--------------|----------|-----|
|      |              | 補正前      | 補正後 |
| I区   | 賦活剤非投与・地下水   | 0.4      | 0.4 |
| II区  | 賦活剤投与・地下水    | 0.5      | 0.5 |
| III区 | 賦活剤&ワクチン・河川水 | 1.4      | 1.4 |
| IV区  | 賦活剤投与・河川水    | 17.2     | 0   |
| V区   | 賦活剤非投与・河川水   | 9.6      | 7   |

へい死率：補正前は酸欠死を含む数値、補正後は酸欠死を除いた数値

## 要 約

- 1 ワクチンの効果向上、病原体汚染用水（河川水等）への移動時の抗病性強化を目的に、免疫賦活剤による生体防御能の向上について検討した。
- 2 今回の投与条件では、免疫賦活剤の投与だけでは白血球貪食率及び貪食指数の上昇はみられなかった。しかし、免疫賦活剤投与後に、冷水病不活化菌体を浸漬処理した区では、処理直後に白血球貪食指数の上昇が認められた。
- 3 免疫賦活剤投与と冷水病不活化菌体の浸漬処理により、一部の個体で冷水病菌に対する血清凝集素価の上昇が認められた。
- 4 地下水飼育では、免疫賦活剤の投与により、へい死率に差は見られなかった。しかし、免疫賦活剤を継続投与しつつ、地下水から河川水飼育に切り替えた場合、へい死率の低下が認められた。

## 文 献

- 1) 平成10年度魚病技術者研修魚類防疫士養成コース本科第2年次：細菌実習 資料
- 2) 坂崎利一（1987）：図解臨床細菌検査，文光堂，東京，163.