

論文の内容の要旨

氏名：石川 孝典

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：高濃度アスコルビン酸投与によるサケ科魚類の疾病予防法の開発

平成 15 年の薬事法の改正に伴い、養殖産業における水産用医薬品の使用は厳しく制限された。また、近年の「食の安全・安心」に対する消費者の期待から、水産用医薬品に依存しない健康な魚づくりが求められている。このような状況を背景に、魚類の免疫機能を向上もしくは低下させない飼育技術の研究が進められており、特に幅広い魚種で使用可能な免疫賦活剤の活用が期待されている。同剤については既に複数の製品が販売・利用されているが、多くは作用機序が明らかでなく、水産用医薬品に比べ投与効果も安定性に欠けるといわれる。また、魚価が低迷する養殖業では魚病対策に費やせるコストの問題もあり、免疫賦活剤についても安価で安定的に入手できるものが求められている。そこで申請者は、既に免疫賦活作用として実績があり、飼料添加物の一つとして利用されているアスコルビン酸（Ascorbic Acid : AsA）に着目した。

AsA は、水溶性ビタミンの一種で、還元力を有するラジカル捕捉型の抗酸化物質であり、多様な魚種の免疫能やストレス耐性を向上させることが報告されている。興味深いことに、多くの既報において魚体への AsA の投与濃度とその有効性に相関関係が認められており、特に飼料 1kg 当り 1,000mg 以上の AsA を添加（1,000 mg/kg diet）すると高い抗病性やストレス耐性をもたらすことが確認されていた。そこで本研究では、1,000 mg/kg diet 以上の濃度で AsA を飼料に添加する高濃度 AsA 投与について、ニジマスを中心としたサケ科魚類を対象に検討を行い、生産現場において有効かつ経済的に使用可能な疾病予防法を確立した。

1. 高濃度 AsA の長期投与がニジマスに及ぼす影響

AsA の高濃度投与は、ヒトでは骨からのカルシウム流失、尿酸尿、および腸管障害などの副作用が報告されている。そこで、高濃度 AsA をニジマスに 100 日間経口投与し、その障害性を評価した。

AsA を 0、100、1,000 または 5,000 mg/kg diet となるように添加した市販配合飼料をニジマス（体重 1.9g）に給餌し、経時的にサンプリングを行い、魚体重、AsA 含有量、血漿成分、免疫能、および生体防御能を測定した。また、投与 100 日後に各投与区から 100 尾ずつ無作為に選別して高水温ストレス実験を行い、生残状況を比較した。結果として AsA の添加濃度に比例し AsA 含有量は上昇した。一方、成長や血漿成分については試験区間で有意な差は認められず、特に最も高濃度の AsA 給餌区として設定した 5,000 mg/kg diet 区においては対照区と比べ免疫能や高水温ストレス耐性において有意な上昇が確認された。これらの結果を踏まえ、高濃度 AsA 投与によるニジマスへの障害性は無いと結論した。

2. 高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類の AsA 蓄積量の変化

免疫賦活剤を利用する上で養殖生産現場の負担を軽減するためには、適正な投与期間や投与効果持続期間を確認しておく必要がある。そこで、AsA 投与に伴う同剤の組織含有量の変化を検討することで、高濃度 AsA 投与における最短および効果持続期間を推定した。

実験にはニジマス（体重 6.2g）を使用し、AsA が 5,000mg/kg diet となるように添加した市販配合飼料を 30 日間給餌後、12 日間通常の配合飼料を給餌した。経時的にサンプリングを行い、HPLC 法により肝臓、腎臓、鰓および腸管中の AsA 含有量を測定した。なお、通常飼料に切り替えた後は、肝臓のみを測定した。

結果として、投与 3 日後から全ての臓器で AsA 含有量は有意に上昇し、いずれの臓器も投与 3~7 日後には最大値に達した。また、通常飼料に切替えた 6 日後までは対照区より有意に高かった。AsA 含有量は腸管が最も多く、肝臓、腎臓、鰓の順であったが、いずれの臓器もほぼ同様の傾向が認められたことから、高濃度 AsA 投与は 7 日間で十分量に達し、1 週間は効果が持続するものと推察された。

3. 高濃度 AsA 投与によるサケ科魚類の抗病性向上効果の検討

免疫賦活剤は、多様な魚種で使用できる一方、養殖生産現場では効果が安定しないことが指摘されている。そこで本研究では、サケ科魚類養殖で問題となっている伝染性造血器壊死症 (IHN genogroup U(低病原性), genogroup JRt(高病原性))、サケ科魚類ヘルペスウイルス病 (OMVD)、 β 溶血性レンサ球菌症 (原因菌 : *Streptococcus iniae*) に対する有効性について、検討を行った。

IHN、OMVD、および *S. iniae* による感染実験ではニジマスもしくはヒメマス、水腫症ではイワナを供試魚とした。2.と同様の手順で AsA を添加した市販配合飼料を 7 日間給餌後、各感染症の病原体浮遊溶液に魚体を浸漬させることにより人為感染を行い、その生残性から効果を検証した。また、水腫症については投与開始 7 日後に自然発症した水槽飼育群を解析に供した。

人為感染 14~21 日後の累積死亡率を通常飼料を給餌していた対照区と比較したところ、IHN 高病原性株および *S. iniae* において有意な効果が確認された。また、水腫症も高濃度 AsA を投与し、更に注水量を多くした区においてのみ、有意な生残効果が認められた。一方、IHN 低病原性株および OMVD においては有意な効果は確認できず、高濃度 AsA 投与法は感染症の種類や病原体の系統によって有効性が異なることが明らかとなった。

4. 高濃度 AsA 投与がニジマスの IFN γ 産生に及ぼす影響

3. において、高濃度 AsA 投与は特に国内のサケ科魚類養殖に甚大な被害をもたらしている IHN 高病原性株に対して高い効果が確認された。しかし、その有効機序については明らかではない。そこで本研究では、抗ウイルス因子の一つであるインターフェロンガンマ (IFN γ) に着目した。IFN γ は抗ウイルス作用を持つタンパクの一種で、マクロファージや NK 細胞の活性化等の機能が報告されているサイトカインである。魚類でも遺伝子発現解析により、ウイルス感染に伴う動態が解析され、機能の推定が試みられているが、タンパク質レベルでの量の動態や産生細胞を解析した知見はない。そこで本研究では、ニジマス IFN γ の遺伝子組換え体 (rIFN γ) を作出し、その特異抗体を作製することで、高濃度 AsA を投与したニジマスの血漿中の IFN γ 量の動態や同物質産生細胞の局在を解析した。

2.と同様の手順でニジマス (23.2g) に AsA を添加した市販配合飼料を 7 日間給餌した。経時的にサンプリングを行い、採血して ELISA 法により血中 IFN γ 量を測定した。また、同時に肝臓を切り出し、2.と同様の手順で AsA 含量を測定した。更に、鰓、脾臓、および腎臓を採取して常法に従いパラフィン薄切標本を作製し、免疫染色法により産生細胞の局在を解析した。

結果として、ニジマス肝臓中の AsA 含有量と血中 IFN γ 量は相関性を示し、投与 1 日後から有意な上昇が認められた。また、高濃度 AsA 投与 3~5 日後において、脾臓や鰓組織で IFN γ 産生細胞の増加が観察された。IHN 高病原性株はサケ科魚類の鰓組織に重大な障害をもたらすことが知られており、高濃度 AsA 投与に伴う鰓組織における IFN γ 産生細胞の増加がニジマスの抗病性向上に寄与しているものと考えられた。

5. 総括 (養殖生産現場における使用)

本研究の結果、100 日間にわたるニジマスを対象とした高濃度 AsA 投与では、実験期間を通して魚体への副作用は確認されず、高水温のようなストレス要因に対して高い抵抗力を獲得できることが明らかとなった。また投与条件として、AsA の組織含有量の推移から最低投与必要日数を 7 日間と設定した。すなわち、AsA を 5,000mg/kg diet の割合で添加した市販配合飼料を 7 日間以上給餌することで、高い予防効果が得られるものと考えられた。なお、養殖現場における高濃度投与法の一つの課題はその使用単価にあるが、AsA 粉末は 1kg あたり 2,000 円程度であり、市販配合飼料 1 袋 (20kg) あたり 200 円のコスト増に留まり、サケ科魚類養殖においても採算性に問題はない。

ただし、本法は万能ではなく、病原体の系統や感染症によっては効果が発揮されないことが予測された。つまり、高濃度 AsA 投与の効果を十分に発揮させるには、使用する養殖現場毎に発生している感染症の種類や病原体の系統などを事前に確認しておく必要がある。幸い、国内のサケ科魚類養殖生産現場で発生する魚病の種類は地域や水系毎に予測可能な状態である。また、魚病好発時期についての情報も蓄積されており、本法の導入により高い生残効果 (歩留まり) が期待される。