

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

日本大学大学院 生物資源科学研究科

石川孝典

2014

## 目次

	頁
第 1 章 序論	1
第 2 章 高濃度アスコルビン酸 (AsA) の長期投与がニジマスに及ぼす影響	6
第 1 節 緒言	
第 2 節 材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
図表	
第 3 章 高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類の AsA 組織含有量の変化	19
第 1 節 緒言	
第 2 節 材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
図表	
第 4 章 高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類のストレス耐性向上効果の検討	30
第 1 節 緒言	
第 2 節 材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
図表	
第 5 章 高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類の抗病性向上効果の検討	40
第 1 節 緒言	
第 2 節 材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
図表	
第 6 章 高濃度 AsA 投与がニジマスの IFN $\gamma$ 産生に及ぼす影響	68
第 1 節 緒言	
第 2 節 材料および方法	
第 3 節 結果	
第 4 節 考察	
図表	
第 7 章 総合考察	94
要旨	
謝辞	
引用文献	

## 第 1 章 序論

国内の漁業・養殖業生産量は、1984年のピーク時の1,282万トンから近年の2011年には477万トンと半減した（水産庁，2012b）。加えて、国内の食用魚介類の自給率は年々低下し、平成23年度の概算値で58%まで減少している（水産庁，2012a）。このような状況は、天然資源に頼らない養殖産業による食用魚介類の国内供給の重要性が今後より増していくことを意味する。

サケ科（*Salmonidae*）魚類はこれまで11属70種が知られており、そのうち国内に生息するのはサケ属（*Oncorhynchus*）、イワナ属（*Salvelinus*）、イトウ属（*Hucho*）の10種である（石黒・西田，2004）。養殖対象種としての歴史も古く、1877年にはアメリカからニジマス *Oncorhynchus mykiss* の卵が輸入されている（桐生，2005）。ニジマスの国内生産量は減少傾向にあるが、2002年では7,474トンに至り、国内内水面養殖生産量の約20%を占めている（桐生，2005）。近年では大型サケ科魚類が国外のノルウェーやチリを中心に盛んに養殖生産され、日本国内へ安定的に輸入されている（丹波，2007；緑書房編集部，2007）。一方、国内でも輸入される養殖大型サケ科魚類に対抗し、主に内水面養殖において、ヤシオマス（栃木県）、信州サーモン（長野県）、ギンヒカリ（群馬県）、絹姫サーモン（愛知県）など各地でバイオテクノロジー技術を利用した高品質な大型サケ科魚類のブランド魚生産が振興されている（澤田ら，2007）。しかし、養殖生産過程では感染症を中心とした魚病が頻発しており、生産量は伸び悩んでいる。また、生産コストの上昇および安定供給ができないといった問題も浮上してきており、養魚経営を圧迫している（全国養鱒振興協会，私信）。国内における平成23年度の養殖サケ科魚類の推定魚病被害量および額はそれぞれ約270t、約3.2億円にも達しており（(社)日本水産資源保護協会，私信）、その生産性を安定させるためには、魚病被害の低減が極めて重要である。

サケ科魚類養殖における魚病対策としては、侵入してしまった感染症に対しての抗生物質や合成抗菌剤の使用するアンチバイオティクスが一般的である（Aoki，1975）。しかし、薬剤使用量の増加による薬剤耐性菌の出現や、ブリ属やヒラメなど

に比べ経済規模が小さく新薬の開発が進まないことなど、アンチバイオティクスによる魚病対策には限界がある (Aoki *et al.*, 1974; Zhao *et al.*, 1992; 森井・吉井, 2001)。加えて、近年、安全・安心な養殖魚づくりが消費者から求められるようになってきており、水産用医薬品の使用には慎重にならざる負えない状況下にある (水谷, 2009)。

このような背景から、新たな魚病対策技術として免疫賦活剤の活用が注目されている。免疫賦活剤とは、非特異的な免疫機能を向上させる作用をもつ物質の総称である (高橋ら, 2000)。魚類の養殖生産過程では、飼育水温、溶存酸素量やアンモニア量、溶存重金属、飼育密度、ハンドリング操作および活魚輸送など複数のストレス要因 (ストレッサー) が存在する (Martin *et al.*, 1998; Ortuño *et al.*, 2001; Foss, 2003; Iguchi *et al.*, 2003; Siraj and Usha, 2003; Nikoskelainen *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004; Dror *et al.*, 2005)。そしてストレス環境下にある魚体は、抗体産生 (Thompson *et al.*, 1993) や補体活性が低下 (Yin *et al.*, 1995) することが報告されており、ストレスが生体防御能を低下させることは明らかである。魚類の感染症の多くは、ストレス等に伴い生体防御能が低下した個体に感染能を有する日和見感染症であると考えられており (飯田, 2001)、免疫賦活剤はストレス耐性を向上させ生体防御能を低下させない、魚病の発生を未然に防ぐアイテムとして期待できる。

免疫賦活剤には様々な種類があり、菌体・菌体成分、炭水化物複合体、合成化合物、栄養素、動植物由来成分、生体防御子、ホルモン類および核酸が知られる (酒井, 2001)。既に、ビタミン類、ラクトフェリン、およびポリフェノールなどは、養魚生産の現場で多用されている (岡村, 2008; 越塩, 2008a; 2008b; 崎浦, 2008)。しかし、多くの免疫賦活剤の作用機序は未だ不明であり、水産用医薬品に比べ投与効果も安定していない (栃木県養殖魚漁協同組合, 私信)。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のし易いものが求められている。そこで著者は、免疫賦活作用として実績も

あり、飼料添加物の一つとしても利用されているアスコルビン酸（Ascorbic Acid : AsA）に着目した。

AsA はビタミン C とも呼ばれ、還元力を有するラジカル捕捉型の抗酸化物質である（倉田, 1994）。そのため、体内に取り込まれると水溶性酸化剤として活性酸素やラジカル種の消去に優れた特性を持つことが知られており（Nishikimi, 1975; Cabelli and Bielski, 1983; Bendich *et al.*, 1986; Frei *et al.*, 1989）、最近では動植物の酸化ストレスに対する防御物質としても広く認識されている（倉田, 1994; Sauberlich, 1994; Stocker and Frei, 1996）。

AsA は、既に多くの魚種においてストレス耐性や抗病性の向上効果が確認されている（Verlhac and Gabaudan, 2005）。ストレス耐性については、コトヒキにおける水温変動（Chien *et al.*, 2001）、イシダイ *Oplegnathus fasciatus* およびニジマスにおける低酸素（Ishibashi *et al.*, 1992; Dabrowski *et al.*, 2004）などに対するストレス向上効果が確認されている。また、抗病性の向上効果についても感染実験や免疫指標を基に検討が行われており（Lim *et al.*, 2000a; Gannam and Schlock, 2001; Verlhac and Gabaudan, 2005）、感染実験ではブリ *Seriola quinqueradiata* における細菌性溶血性黄疸（伊藤ら, 2000）、チャネルキャットフィッシュ *Ictalurus punctatus* における腸管敗血症（Durve and Lovell, 1982; Li and Lovell, 1985; Lim *et al.*, 2000b）、タイセイヨウサケ *Salmo salar* におけるせっそう病（Waagbø *et al.*, 1993）、ニジマスにおける *Yersinia ruckeri*（Wahli *et al.*, 1998）や *Vibrio anguillarum* 感染症（Navarre and Halver, 1989）、ニジマスにおける伝染性造血器壊死症（IHN; 鈴木・阿井, 1989）、ウイルス性出血性敗血症（VHS; Wahli *et al.*, 1998）などにおいて生残性の向上効果が報告されている。主な免疫指標をみても、チャネルキャットフィッシュにおけるマクロファージの走化性の増加（Lim *et al.*, 2000b）、補体（古典経路）の活性および *Edwardsiella ictaluri* に対する抗体産生量の増加（Li and Lovell, 1985）、ターボット *Scophthalmus maximus* における血清リゾチーム活性の上昇（Roberts *et al.*, 1995）、タ

イセイヨウサケにおけるリンパ球のマイトジェン活性の向上 (Verlhac and Gabaudan, 1994)、頭腎のリゾチーム活性 (Waagbø *et al.*, 1993)、血清補体活性の上昇 (Hardie *et al.*, 1991)、ニジマスにおけるリンパ球のマイトジェン活性の上昇 (Verlhac and Gabaudan, 1994)、補体活性 (alternative pathway) の活性 (Verlhac *et al.*, 1996)、*Yersinia ruckeri* に対する抗体産生量の増加 (Dunier *et al.*, 1995) などが確認されている。

興味深いことに、上述した多くの研究報告において、AsA の濃度と有効性に相関関係が認められており、ニジマスにおける補体 (Alternative pathway) の活性の例で見ると、150mg/kg diet の AsA 添加量では未添加区と差異がみられなかったのに対し、1,000 および 4,000mg/kg diet の添加魚では有意な上昇が認められている (Verlhac *et al.*, 1996)。他にも、ニジマスにおけるリンパ球のマイトジェン活性の上昇 (Verlhac and Gabaudan, 1994)、特異抗体の産生量の増加 (Li and Lovell, 1985; Dunier *et al.*, 1995)、*Y. ruckeri* や *V. anguillarum* の人為感染に対する生残性向上 (Wahli *et al.*, 1998; Navarre and Halver, 1989) などが報告されており、いずれも概ね 1,000mg/kg diet 以上の高濃度投与時に効果が認められている (Verlhac and Gabaudan, 2005)。AsA は必須栄養素として、要求量を十分に超える量が市販配合飼料に添加されているが、同餌料に 1000mg/kg 餌料を超える AsA を更に添加することで、サケ科魚類養殖において多くの感染症を予防できる手法となるものと予想された。なお、AsA の市販価格は 1kg 当たり 2,000 円程度であり、高濃度投与を連続しても十分に収益を確保することが可能である。

そこで本研究では、国内の内水面養殖業で盛んに生産されているニジマスを中心としたサケ科魚類を対象に、高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類への有効性を確認し、その作用機序の解明を試みた。すなわち、第 2 章では高濃度 AsA 投与に伴うニジマスへの悪影響の有無を確認するため、100 日間の長期投与によりその影響を検証した。また第 3 章では、最低必要となる投与期間や投与終了後の効果持続期間を推測するため、高濃度 AsA 投与による体内蓄積量の変化について測定した。第 4 および第

5章では、前章までに確定した高濃度 AsA の投与手法の有効範囲を明らかにするため、各種ストレスおよび感染症に対する生残性からその効果を検証した。第6章では、第5章で認められた IHN に対する高濃度 AsA 投与の抗病性向上機序の一端の解明を目指し、AsA が抗ウイルス因子の一つである IFN $\gamma$  の発現に及ぼす影響について解析を行った。そして最終章では、本研究で得られた知見をまとめ、内水面サケ科魚類の生産現場において、経済的なメリットが大きい高濃度 AsA 投与の用途用法を提案した。

## 第2章 高濃度アスコルビン酸 (AsA) の長期投与がニジマスに及ぼす影響

### 第1節 緒言

AsA は栄養学的にはビタミン C とも呼ばれ、新鮮な果物や野菜・緑茶に豊富に存在し、動物体内では特に副腎組織に多く認められる水溶性ビタミンである (大塚, 1996)。同物質はラジカル補足型の抗酸化作用を示し (倉田, 1994)、体内で生じたスーパーオキシド ( $O_2^-$ )、ヒドロキシラジカル ( $-OH$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの活性酸素の消去に優れる (Nishikimi, 1975; Cabelli and Bielski, 1983; Bendich *et al.*, 1986; Frei *et al.*, 1989)、生物の酸化ストレスに対する防御物質として広く認識されている (倉田, 1994; Sauberlich, 1994; Stocker and Frei, 1996)。

AsA は、魚類でも必須ビタミンとして飼料に添加されているほか、多くの魚種において 1,000mg/kg diet 以上の高濃度投与により免疫賦活作用やストレス耐性の向上機能が確認されている (Verlhac and Gabaudan, 2005)。一方、同物質の高濃度投与に伴う副作用的な影響について、魚類で検討された事例はない。水溶性ビタミンである AsA は、過剰摂取した際は速やかに体外へ排出されるため、毒性はきわめて低いとされる。しかし、ヒトでは 1 日に 6 g の割合で 3 ヶ月間投与した成人において下痢や嘔吐などが生じた事例があり (平野, 1994b)、骨からのカルシウム流失 (Thornton and Omdahl, 1969)、尿酸尿 (Stein *et al.*, 1976) および腸管障害 (Barness, 1975) といった副作用と推察される事象も報告されている。よって、高濃度 AsA 投与を魚類の疾病予防対策として利用していくためには、まずその安全性を評価しておくことが必要である。

そこで本章では、ニジマスを供試魚として、100 日間にわたり AsA の高濃度投与を行い、魚体の成長、生理代謝、および免疫・ストレス耐性能に及ぼす影響について検討を行った。

### 第2節 材料および方法

#### 1. 供試魚

実験には、栃木県水産試験場で継代飼育されてきた黒磯系ニジマスの稚魚 (平均体重 1.85 g) を用いた。



## 2. 試験飼料

基本飼料には、オリエンタル酵母工業（現日清丸紅飼料）製のマス稚魚用市販飼料（スーパーシリーズ）を用いた。AsA は和光純薬工業製の特級を使用した。

AsA の飼料添加は、市販サラダオイル（キャノーラ油）に AsA 粉末を混合した後、100、1,000 または 5,000 mg/kg diet となるよう市販飼料に外割 5% で展着することにより実施した（試験飼料）。また、サラダオイルのみ展着させたものを 0 mg/kg diet とした（対照飼料）。実験期間中における飼料の調整は毎日行い、使用時まで 4°C の冷蔵庫で保管した。なお、AsA の添加状況を確認するため、本章 4. の手順で飼料中の AsA 含量を測定したところ、対照飼料が 579 mg/kg diet であったのに対し、100 mg/kg diet の試験飼料で 772 mg/kg diet、1,000 mg/kg diet で 1,846 mg/kg diet、5,000 mg/kg diet で 5,441 mg/kg diet と、試験飼料における AsA の添加量と飼料中の AsA 含量が相関することを確認した（Table 1）。

## 3. 飼育試験

飼育試験には、100 mg/kg diet 試験飼料（AsA I）区、1,000 mg/kg diet（AsA II）区、5,000 mg/kg diet（AsA III）区、および対照飼料（Cont）区の計 4 区を設定した（Table 1）。すなわち、試験区毎に 13.0（±1.0）°C に調温したオゾン殺菌河川水を 6.0 L/min の割合で注水したヨーロピアンタイプ FRP 水槽（110×110×65 cm：水量約 500L）に 300 尾/水槽の密度となるように供試魚を収容し、各試験飼料を魚体重の 3.0% の割合で 100 日間毎日にわたり給餌した。

サンプリングは、試験開始直前、試験開始 1、3、10、20、30、42 日後、それ以降は 10 日毎に 100 日後まで合計 14 回行い、各回ともに供試魚を約 20 尾取り上げて体重を測定した。AsA の組織含有量は、試験開始直前および開始 1、3、10 および 60 日後に取り上げた魚体を用いて測定を行った。また試験開始 50 および 100 日後においても各区より 5 尾ずつ取り上げ、血漿成分、皮膚粘液細胞数、およびスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）活性を測定した。なお、腎臓貪食細胞の NBT 反応については、試験開始 60 および 100 日

後の魚体を用いた。各試験の詳細は下記に示す。

#### 4. AsA 含量の測定

AsA 含量の測定は、配合飼料およびニジマス肝臓組織を対象に、五訂増補日本食品標準成分表分析マニュアル（文部科学省，2005）に従い測定した。なお、配合飼料は調整後、4℃で一日保存したものを測定に用いた。また、肝臓組織は5尾ずつプールしたものを1ロットとして測定を行った。

供試魚は氷上で解剖し、肝臓を採取して同臓器の重量を測定した。適量の5%メタリン酸溶液およびケイ砂を加えて磨砕した後、メスフラスコで50 mlに定容し、遠心（2,000g, 10 min, 室温）した。得られた上清をろ紙によりろ過したものをアスコルビン酸測定用試料として約10  $\mu$ g/mLとなるように希釈し、栓付き小試験管へ1 mL分注した。各小試験管に5%メタリン酸溶液を1 mL加え、インドフェノール溶液の数滴を滴下し、2%チオ尿素-メタリン酸溶液2 mLを加え、よく混合した。小試験管に栓をして50℃の湯浴中で1.5時間加熱した後、水冷して室温に戻した。酢酸エチル2 mLを加えて1時間の振とうを行った後、適量の無水硫酸ナトリウムを加えて脱水した。再度遠心（2,000×g, 10 min, 室温）後、その上清（酢酸エチル層）を試験溶液とした。

試験溶液はHPLC（本体：GULLIVER SRIES、JASCO；カラム：Silica-2150-N、6.0×150 mm、SSC；検出器：model UV-970、JASCO）を用いて測定した。測定条件は、移動相を酢酸-n-ヘキサン-酢酸エチル混液（1:45:5）とし、流速1.5 mL/min、カラム温度40℃、測定波長495nmとした。

#### 5. 血漿成分の測定

測定には、水槽から取り上げ、500 U/mLヘパリンナトリウム処理をした注射器を用いて直ちに尾柄部から採血した血液を用いた。血液は、微量高速冷却遠心機（MX-150、トミー精工）を用いて遠心（500×g, 10 min, 4℃）し、血漿を採取して使用時まで-80℃で保存した。測定には生化学自動分析装置（ドライケム5500、富士フイルム）を使用し、グルコ

ース (GLU)、総コレステロール (TCHO)、Aspartate Aminotransferase (AST) 量、 $\gamma$ -glutamyltransferase (GGT)、尿素窒素量 (BUN) および総カルシウム量 (Ca) の 6 項目を測定した。

## 6. 非特異的免疫機能測定

### 1) 腎臓貪食細胞の NBT 反応

腎臓貪食細胞の貪食活性は、細胞が貪食時に発生する  $O_2^-$  がニトロブルーテトラゾリウム (NBT) と反応することで形成されるブルーホルマザンを測定する NBT 法により実施した。

すなわち、取り上げた魚体から直ちに無菌的に腎臓を切り出し、100  $\mu$ g/mL 硫酸ストレプトマイシンおよび 100 unit/mL ペニシリン G を含む L-15 培地 (Gibco、以後 L-15) を 2 mL 分注した 60 mm Non-Treated Dish (IWAKI) に移し、滅菌したシリンジ棒の裏面で優しく組織を破碎した。培養液ごと 70  $\mu$ m セルストレーナー (BD Falcon™) を用いて組織片等を取り除いたものを細胞液として、事前に分注・冷却しておいた HISTOPAQUE®-1077 (SIGMA-ARDRICH) 2 mL にパスツールピペットを用いて重層した。遠心 (400 $\times$  g, 20 min, 4°C) 後、白血球層を採取して新たなスピッツ管に移し、L-15 で数回遠心洗浄を行った。L-15 に白血球浮遊液を再浮遊させた後、0.1% トリパン・ブルーを用いた色素排除法により血球算定盤上で生細胞数を計数し、生細胞数が  $2 \times 10^6$  cells/mL となるように調整した。得られた細胞浮遊液は 96 well マイクロプレートに 100  $\mu$ L/well となるように分注し、貪食細胞がプラスチック面へ付着する性質を利用して、20°C で 1 時間インキュベートした。非付着細胞を除くため軽くピペッティングして上清を除き、再び L-15 を加えることを数回繰り返した後、L-15 で調整した 0.2% 1.1  $\mu$ m ラテックスビーズ (SIGMA) 液に 1 mg/mL となるように NBT (SIGMA) を混合したものを刺激物として 100  $\mu$ L/well 加え、さらに L-15 を 100  $\mu$ L 分注して 20°C で 20 分間インキュベートした。その後、上清を除き L-15 により数回洗浄した後、70% メタノールで固定した。風乾後、2M 水酸化ナトリウム 120  $\mu$ L、DMSO 140  $\mu$ L の順に加え、軽くピペッティングを行い、マイクロプレートリーダー

(Benchmark、Bio-Rad) を用いて吸光度 630 nm で青色の呈色反応を測定した。なお、ブランクには細胞の代わりに L-15 のみで測定した値を使用した。

## 2) 皮膚粘液細胞数

皮膚粘液細胞数の測定には、パラフィン薄切標本を観察することにより行った。すなわち、ブアン液で固定した魚体から尾柄部を切り出し、常法に従いパラフィン薄切標本を製作した。マイヤーヘマトキシリン溶液 (Wako) を用いたヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、またはコールドシッフ試薬 (Wako) を用いたアルシアンブルー・PAS (AB-PAS) 染色を行った後、表皮層 100  $\mu\text{m}$  当たりの粘液細胞数を 1 個体に着き 10 ヶ所計数し、その平均値を粘液細胞数とした。

## 3) SOD 活性

SOD 活性の測定は、SOD Assay Kit-WST (DOJINDO) を用いた。供試魚から採取した肝臓および腸管は直ちに 9 倍量 (w/v) の 10 mM リン酸塩緩衝液 (PBS、pH7.4) を加え、氷上の 1.5ml マイクロチューブ内でペレットホモジナイザーを用いてホモジナイズした。遠心 (20,000 $\times$ g, 20min, 4 $^{\circ}$ C) 後、得られた上清を測定用試料として使用時まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。試料は測定直前に解凍し、PBS を用いて肝臓試料は 100、200、500 および 1,000 倍、腸管試料は 50、100、200 および 400 倍となるようにそれぞれ希釈し、各希釈溶液を 96 well マイクロプレート (Nunc) に 10  $\mu\text{l}$ /well 分注した。次に WST working solution 100  $\mu\text{l}$ 、Enzyme working solution 10  $\mu\text{l}$  の順に加え、37 $^{\circ}$ Cで 20 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Benchmark、Bio-Rad) を用いて吸光度 450nm で測定した。得られた値は下記の式に当てはめ、SOD 阻害活性を求めた。なお、試料の代わりに UPW としたものをブランク 1、Enzyme working solution の代わりに Dilution buffer としたものをブランク 2、および試料の代わりに UPW かつ Enzyme working solution の代わりに Dilution buffer としたものをブランク 3 とした。

SOD 阻害活性（阻害率 50%） =  $\{(\text{blank1-blank3}) - (\text{sample-blank2})\} / (\text{blank1-blank3}) \times 100$

SOD 阻害活性を標準 SOD の検量線から unit 数に変換した後、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて測定した各試料のタンパク質量を基に、タンパク質濃度 1mg 当たりの SOD 活性値を算出した。

## 7. 高水温ストレス試験

各区から 100 尾を無作為に取上げ、尾鰭に切れ込みを入れ各区毎に標識した。次に、23°C に設定しエアレーションを施した濾過槽付循環式水槽（容量 1000 L）に移し、24 時間後までの死亡状況を観察した。なお、供試魚の死亡は、遊泳運動をせず、鰓蓋の動きが止まったことで判定した。

## 6. 統計解析

測定値は、エクセル統計 2008（株式会社 社会情報サービス）を使用したダネット検定により対照区との有意性を比較した（ $P < 0.05$ ）。高水温ストレス試験についてのみ、フィッシャーの正確確率検定を行った後に、Holm 法による Familywise error rate の調整を行い、対照区との有意性を比較した（ $P < 0.05$ ）。

## 第 3 節 結果

飼育試験における AsA の摂取状況を確認するため、経時的に魚体を取り上げて肝臓組織中の AsA 含量を測定した結果、1,000 および 5,000mg/kg diet となるよう AsA を添加した AsA II および III 区では、実験期間を通して対照区と明瞭な差異が認められた（Table 1）。一方、体重を基に飼育区間で成長を比較したところ、実験期間を通して対照区と各 AsA 試験区の間には有意な差は認められなかった（Fig. 1）。また、血漿成分を測定した結果、全測定項目において試験区間で有意な差は確認されなかった（Table 2）。

非特異的免疫反応を測定した結果、腎臓貪食細胞の NBT 反応は、飼育試験 100 日後の

AsA II および III 区において、対照区との間で有意に高い値が認められた。また、皮膚粘液細胞数も 100 日後の AsA III 区において有意に低く、SOD 活性も 100 日後の AsA III 区の腸管においてのみ対照区と比べ有意に高い値がみられた (Table 3)。

高水温ストレス試験の結果、試験開始 24 時間後の累積死亡率は、対照区 40%、AsA I 区 45%、AsA II 区 30%、および AsA III 区 10% となり、AsA III 区で有意な死亡低減効果が確認された (Fig. 2)

#### 第 4 節 考察

1,000 mg/kg diet を超える高濃度の AsA 投与の有効性については、魚類でもこれまでに複数の報告があるが (Verlhac and Gabaudan, 2005)、100 日間にわたる飼育試験で評価を行ったのは本研究が初めてである。肝臓における AsA 含有量の推移をみると、1,000 または 5,000 mg/kg diet の AsA を投与した区では、実験期間を通して対照区と明瞭な差異がみられ、実験期間を通して AsA を確実に魚体に摂取させることができたものと考えられた。

AsA の高濃度投与に伴う副作用には、ヒトにおいて骨からのカルシウム流失 (Thornton and Omdahl, 1969) が報告されている。しかし、本研究において実験区間で成長 (魚体重) や血漿カルシウム濃度に差異は認められなかった。また、ヒトでは尿酸尿 (Stein *et al.*, 1976) による障害が示されているが、腎機能を示す BUN (血中尿素窒素) を含む本研究で測定したいずれの血漿成分においても異常値は認められず (Table 2)、少なくともニジマスなど淡水養殖されるサケ科魚類においては、高濃度の AsA を長期間与えたとしても、ヒトで認められているような副作用はないものと判断された。

本試験では、長期間の AsA 投与がニジマスの非特異的免疫に及ぼす影響についても検証を行ったが、貪食細胞などの白血球の機能を示す NBT 反応は、飼育試験 100 日後の 1,000 および 5,000 mg/kg diet 区ともに対照区と比べ有意な差で上昇がみられるなど、AsA の短期間投与に関する既知の報告 (Verlhac *et al.*, 1996; Verlhac *et al.*, 1998) と同様の結果が得られた。また、魚類の SOD 活性や粘液細胞数はストレス時にそれぞれ低下 (Eo and Lee, 2008) または増加 (Buchmann *et al.*, 2004; Vatos *et al.*, 2010; Kalogianii *et al.*, 2011) することが知ら

れているが、本研究において 5,000mg/kg diet を投与した魚体では、対照区に比べ有意な SOD 活性の増加、粘液細胞数の減少が認められるなど、1,000mg と 5,000mg/kg diet 区の間でも差異が認められた。更に、高水温耐性試験を行ったところ、5,000mg/kg diet 区においてのみ高い生残効果が確認されたことから、5,000mg/kg diet の AsA 添加は、長期投与を行った場合でも高いストレス耐性効果が維持されているものと考えられた。これらの結果は、費用面がクリアされれば、高濃度の AsA の長期投与を継続して実施することで、有効な魚病の予防手法となることを示している。そこで次章では、最も高いストレス耐性効果が確認された 5,000mg/kg diet を最適濃度（投与量）として、効果をもたらす投与期間や効果が持続する期間について検討を行った。

Table 1 Ascorbic acid (AsA) content in experimental diet and liver tissue of rainbow trout fed experimental diets containing different concentrations of AsA

Diets	Added AsA content (mg/kg diet)	Analyzed AsA content <sup>*1</sup> (mg/kg diet)	Analyzed AsA content <sup>*2</sup> in liver tissue (mg/g tissue weight) during feeding trial				
			0 day	1 day	3 days	10 days	60 days
Cont	0	579		0.101	0.114	0.124	0.189
AsA I	100	772		0.114	0.121	0.137	0.172
AsA II	1000	1846	0.134	0.125	0.210	0.276	0.281
AsA III	5000	5441		0.156	0.247	0.486	0.320

Values are means from duplicate sample.

<sup>\*1</sup> AsA content in each experimental diet were analyzed at one day after diet preparation.

<sup>\*2</sup> Each value is the pool of 5 fishes.



Table 2 Plasma components of rainbow trout fed experimental diets

Analyzed days	Diets	GGT (U/L)	AST (U/L)	BUN (mg/dL)	TCHO (mg/dL)	GLU (mg/dL)	Ca (mg/dL)
50 days	Cont	1.6±0.5	513±80	1.6±0.9	421±18	100±25	9.5±0.4
	AsA I	2.0±1.2	515±10	1.8±0.7	422±34	103±21	9.8±0.3
	AsA II	3.0±1.7	608±58	1.5±0.6	430±22	141±55	9.4±0.6
	AsA III	2.2±0.8	687±13	0.9±0.3	431±42	87±15	9.9±0.8
100 days	Cont	2.0±0.7	399±61	2.7±0.6	303±24	88±19	10.3±0.4
	AsA I	2.0±0.0	395±12	2.1±0.4	302±35	62±50	9.5±0.2
	AsA II	2.0±0.7	407±39	3.6±0.3	285±28	100±25	10.0±0.7
	AsA III	2.2±0.8	471±75	2.9±1.2	279±28	103±59	10.3±0.4

Data were presented as mean±SD (n=5).

Table 3 Non-specific immune responses of rainbow trout fed experimental diets

Analyzed days	Diets	NBT reduction in kidney adherent cells (OD 630nm)	Number of mucus cells	SOD activity (U/mg of protein)	
				Liver	Intestine
50 or 60	Cont	1.28±0.29*	4.3±1.7	1.11±0.60	2.79±0.34
	AsA I	1.44±0.28*	5.4±1.2	1.18±0.20	2.35±0.69
	AsA II	1.51±0.44*	4.5±1.2	0.84±0.30	2.58±0.91
	AsA III	1.33±0.28*	2.6±2.0	1.08±0.27	2.33±0.37
100	Cont	0.55±0.20	6.6±1.2	0.77±0.21	1.81±0.32
	AsA I	0.47±0.25	6.4±1.3	0.95±0.09	2.20±0.82
	AsA II	1.00±0.18 <sup>a</sup>	4.8±1.9	0.88±0.20	2.12±0.48
	AsA III	0.86±0.14 <sup>a</sup>	3.3±1.9 <sup>a</sup>	0.91±0.26	2.67±0.70 <sup>a</sup>

Data were presented as mean±SD (n=5).

<sup>a</sup> Significantly different from AsA0 (P<0.05).

\* This value was measured after 60 days of feeding trial.

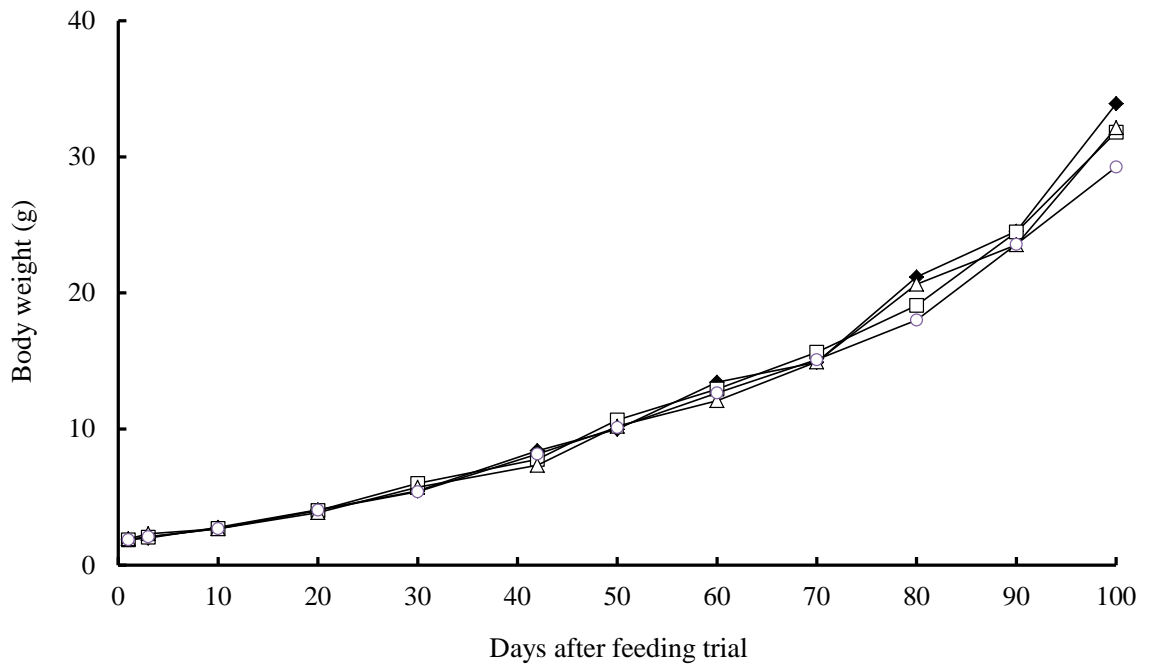


Fig. 1 Growth curve of rainbow trout fed Cont (◆, 0mg/kg diet), AsA I (□, 100 mg/kg), AsA II (△, 1,000 mg/kg), and AsA III (○, 5,000mg/kg) during 100 days

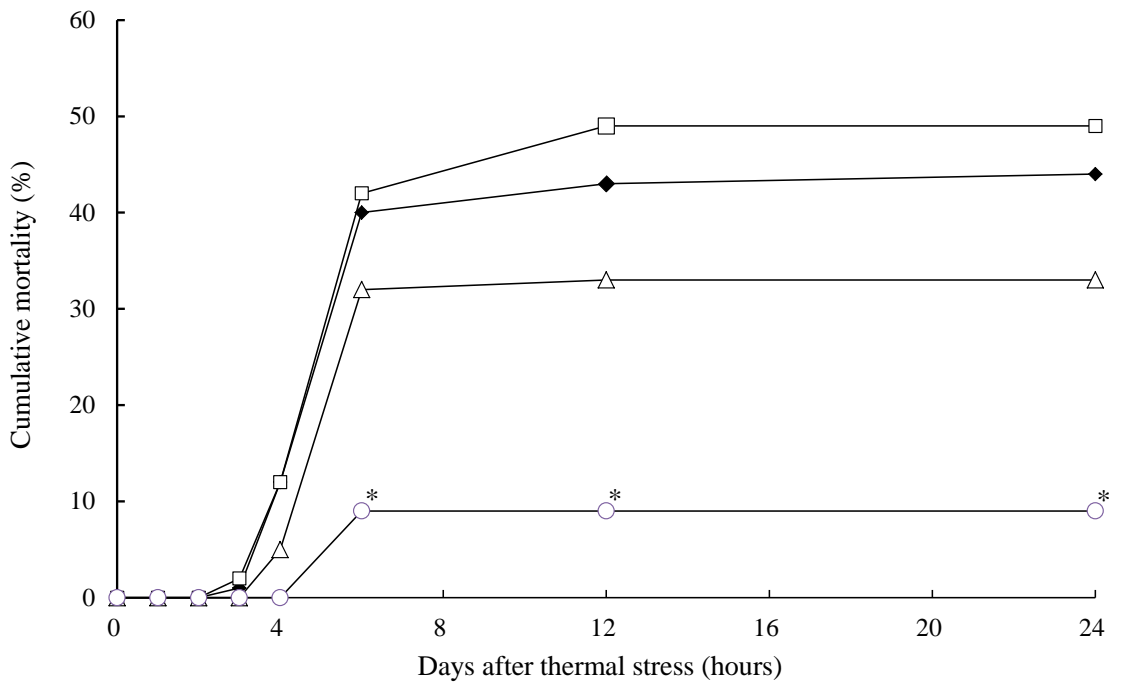


Fig. 2 Changes in cumulative mortality of rainbow trout fed Cont (◆, 0mg/kg diet), AsA I (□, 100 mg/kg), AsA II (△, 1000 mg/kg), and AsA III (○, 5000mg/kg) after 100 days of the feeding period. \*Significantly different from controls ( $P < 0.05$ )

### 第3章 高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類の AsA 組織含有量の変化

#### 第1節 緒言

前章の結果、100 日間にわたる高濃度 AsA の投与において、ニジマスでは副作用的現象は確認されなかった。また、AsA を 5,000 mg/kg diet の濃度で投与した魚体では、対照区と比べ非特異的免疫能やストレス耐性向上効果が認められるなど、疾病予防法としての利用が期待できる結果が得られた。しかし、長期間にわたる高濃度のアスコルビン酸の添加や飼料への展着処理は、生産現場にとって価格的にも作業量的にも大きな負担となる。

そこで本章では、高濃度 AsA 投与法の効率化を目的として、ニッコウイワナ *Salvelinus leucomaenis pluvius*、ヒメマス *O. nerka*、およびニジマスの3魚種を供試魚として、AsA の組織含有量を指標に、投与効果をもたらす最低投与期間および投与中止後の効果持続期間について推定を試みた。またニジマスを供試魚として、AsA に比べ熱安定性などが高い AsA 誘導体についても同様の解析を実施した。なお、AsA 投与は前章において最も高い有効性が確認された 5,000 mg/kg diet の添加濃度のみで実施した。

#### 第2節 材料および方法

##### 1. 供試魚

AsA 組織含有量の経時的変化に関する試験では、鬼怒川水系上流部で採捕された栃木県内在来個体群を栃木県水産試験場（栃木水試）で継代飼育をしていた栗山系のニッコウイワナの稚魚（平均体重 3.8 g）、中禅寺湖漁業協同組合で採卵・受精し発眼卵の状態栃木水試に運搬・育成されたヒメマス（平均体重 2.2 g）、および前章と同一の黒磯系ニジマスの稚魚（平均体重 6.2 g）、の3魚種を供試魚として用いた。なお、AsA 誘導体を対象とした試験は、黒磯系ニジマスを用いた（Table 4）。

##### 1. 試験飼料

###### 1) AsA

前章と同様の手順で、AsA が 5,000mg/kg diet となるように市販飼料に添加したものを試

験飼料、非添加の飼料を対照飼料とした。なお、ニジマスの飼育試験に使用した飼料を対象に前章と同様の手順で試験および対照飼料の AsA 含有量を測定した結果、それぞれ 4,942 および 57 mg/kg diet であった (Table 4)。

## 2) AsA 誘導体

AsA 誘導体には Sodium, calcium ascorbyl-2-phosphate (APSC : STAY-C<sup>®</sup>35, DSM ニュートリションジャパン) を用いた。APSC は、AsA 量換算で 5,000 mg/kg diet となるよう添加したものを試験飼料、サラダオイルのみ加えたものを対照飼料とした。なお前章と同様の手順で試験および対照飼料の AsA 含有量を測定したところ、それぞれ 133 および 57 mg/kg 飼料であった (Table 4)。試験飼料の AsA 濃度が低いのは、本研究手法では APSC 量を求めることができず、APSC から還元された AsA のみを検出したためである。

## 3) 飼育試験

飼育実験毎に、一定期間試験飼料を給餌する AsA 投与区 (AsA group) および試験期間を通して対照飼料のみを与える対照区 (Cont group) の 2 区を設け、実験を行った (Table 4)。詳細な手順は下記に示す。

### 飼育実験 I (ニッコウイワナ)

飼育試験では、13.0 (±1.0) °C に調温したオゾン殺菌河川水を 5.0 L/min の割合で注水した 250 L ヨーロピアンタイプ FRP 水槽 (110×110×65 cm) を使用した。1 水槽当り 178 尾収容したものを 2 槽用意し、1 つの水槽は AsA 投与区として魚体重 3.0% の割合で毎日 30 日間試験飼料の与えた後、対照飼料を 12 日間給餌した (AsA I)。また、もう一水槽は対照区として同一期間、対照飼料のみを与えた (Cont I)。そして両試験区ともに、試験開始直前、試験飼料給餌 3、7、14、30 日後、および対照飼料に切り替えて 3、6、9、12 日後に 5 尾ずつ取り上げ、魚体重、体長、全長、および肝臓重量指数を求めた。次に解剖して肝臓、腎臓、鰓、および腸管を採取し、魚体が小さかったため組織毎にプールしたものを AsA

組織含有量測定試料として、使用時まで-80°Cで保存した。

#### 飼育実験Ⅱ（ヒメマス）

飼育試験には、飼育実験Ⅰと同様に調温・殺菌した河川水を 3.0 L/min の割合で注水した 250L 長方形 FRP 水槽（140×60×50 cm）を用いた。1 水槽当り 300 尾を収容したものを 2 槽用意し、一つの水槽は実験Ⅰと同様の手順で 28 日間試験飼料を与えた後、対照飼料を 21 日間給餌した（AsA Ⅱ）。また、もう一水槽は対照区として同期間対照飼料のみを与えた（Cont Ⅱ）。そして両試験区ともに、試験開始直前、試験飼料給餌 7 および 28 日後、および対照飼料に切り替えて 3、7、14、21 日後に飼育実験Ⅰと同様の手順で魚体を取り上げ、各種測定および組織の採取・保存を行った。なお、本実験では腸管の代わりに筋肉組織を採取した。

#### 飼育実験Ⅲ（ニジマス）

飼育実験Ⅰと同様の手順・期間で 200 尾収容した水槽を 2 槽用意し、それぞれ AsA（AsA Ⅲ）および対照区（ConⅢ）として、飼育実験および魚体の取り上げを行った。なお、AsA 区において市販飼料に切り替えた後は、両区ともに肝臓組織のみ採取した。また、飼育期間を通して採取した組織はプールせず、個体毎に保存・測定に用いた。

#### 飼育実験Ⅳ（ニジマス）

実験Ⅲと同様の手順・期間で APSC 添加飼料を給餌した AsA（AsA Ⅳ）および対照区（Cont Ⅳ）を設け、実験を行った。

#### 4) AsA 含量の測定

組織中の AsA 含量の測定は、前章と同様の手順で実施した。なお、ニッコウイワナおよびヒメマスは等量の各組織を 5 尾ずつプールしたものを 1 ロットとして解析したのに対し、ニジマスは個体毎に測定を行った。

## 5) 統計解析

エクセル統計 2008((株)社会情報サービス)を使用したマンホイットニーU 検定により、測定値について対照区との有意性を比較した ( $P<0.05$ )。

## 第3節 結果

全飼育試験の実験期間を通じて、AsA および対照区の間で魚体重、体長、全長および肝臓重量指数に有意な差は認められなかった。AsA の組織蓄積量に関する各飼育実験結果の詳細は下記に示す。

### 飼育実験 I

結果は Fig. 3 に示した。ニッコウイワナの AsA 含有量は、試験区では投与 3 日後から全ての組織で緩やかに上昇し、飼育試験開始 14 日後には肝臓で対照区の約 3 倍に増加した (Fig. 4)。その後、緩やかに減少するものの 30 日後まで鰓の除く全ての組織で対照区の約 2 倍以上の高い値が認められた。対照飼料に切替え後、AsA 含有量は全ての組織で速やかに減少し、切替え 9 日後には対照区との間に差はみられなくなった。

### 飼育実験 II

結果は Fig. 4 に示した。ヒメマスは肝臓組織においてのみ対照区と比較して明瞭な増加が認められ、飼育実験開始 28 日後には約 2 倍に達した。なお、対照飼料に切替えた 7 日後には対照区との間で差は認められなかった。

### 飼育実験 III

結果は Fig. 5 に示した。ニジマスは、飼育飼料区的全臓器において AsA 含量の有意な増加が確認された。なお AsA は、肝臓では 7 日後、腎臓では 3 日後に最大値に達し、以後緩やかに減少傾向がみられた。また、対照飼料に切り替えた後も、測定した肝臓では切り替



え 6 日後まで有意な差が確認された。

#### 飼育試験Ⅳ

結果は、Fig. 6 に示した。全組織において有意な AsA 含量の増加が確認されたものの、AsA を添加した飼育実験Ⅲと比較して、特に肝臓の AsA 組織含有量が少なく、試験飼料を給餌して 30 日後には対照区との間で差異が認められなかった。なお、対照飼料に切替えた 3 日後には再び増加し、対照区との間で有意な差が確認され、切り替え 6 日後までは有意な差がみられた。

#### 第 4 節 考察

サケ科魚類では、特にニジマスにおいて AsA の要求量に関する研究が古くから行われており、各種条件下における推奨添加量が示されている (Kitamura *et al.*, 1965; Sato *et al.*, 1978)。一方、高濃度の AsA 投与に伴う AsA の組織蓄積に関する知見は乏しい。Wang *et al.* (2003) は、11 週間にわたり高濃度の AsA をイシダイに投与し、その筋肉、肝臓、鰓、および脳における蓄積量を調べたところ、脳、鰓、肝臓、筋肉の順で AsA が蓄積されることを報告しているが、その蓄積量の経時的な推移については解析していない。本研究では脳組織の測定は実施していないが、ニッコウイワナやニジマスで最も高い蓄積性が認められたのは腸管であり、続いて肝臓、腎臓の順であった。腸管は消化吸収中の AsA を検出した可能性があるため、他の臓器をみると、本研究で用いた 3 魚種において肝臓で最も AsA の蓄積が認められた。肝臓では投与開始後 1~2 週間かけて増加した後、維持または減少する傾向が認められ、AsA の蓄積進行と排出に関するものと考えられる変動が認められたことから、AsA の組織蓄積性からみた最適投与期間の判定には肝臓組織が最も適切であると判断した。

そこでニジマスの肝臓における AsA 蓄積量の推移をみると、投与開始 7 日後には最大値に達し、対照飼料に切り替えた 6 日後まで有意に高い蓄積が確認された。この結果は、少なくともニジマスでは、1 週間の高濃度 AsA 投与により十分な効果が期待され、同投与を

停止しても約 1 週間は効果が持続するものと推察された。すなわち、魚種や飼育水温等の条件次第で日数は前後すると予想されるものの、ニジマスでは 7 日間投与した後、7 日間投与休止期間を挟む間欠投与法が、最も効率的な投与方法であるものと判断された。なお、肝臓組織における AsA の動態については、ニッコウイワナやニジマスは一旦増加して減少傾向を示したのに対し、ヒメマスでは、実験期間を通して増加傾向が認められており、魚種によって最適な投与条件は異なる可能性がある。

なお、AsA は通常還元型の L-アスコルビン酸よりも熱に不安定なデヒドロ-L-アスコルビン酸として存在していることが多く、熱やアルカリ等に対して不安定で非常に壊れやすいことで知られている（平野, 1994a）。特に養殖魚の配合飼料用添加物質は製造時の加熱や長期保存の観点から熱安定性が必須であり（佐藤, 2009）、養殖対象種に対する硫酸エステル誘導体であるアスコルビン酸 2-硫酸(AsS)等の研究が古くから進んでいる（辻村ら, 1978; 辻村ら, 1979; Sato, 1991）。現在では、L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルマグネシウムや L-アスコルビン酸-2-リン酸エステルナトリウムカルシウムの開発および安定した生産技術が開発され、飼料添加物としての AsA の保存性は飛躍的に向上している（秋元, 2009）。このように、AsA 誘導体は高濃度 AsA 投与においても高い投与効果が期待できる。一方で、通常の AsA より高価であり、吸収性についての差異に関する知見も乏しい。

そこで AsA と同様の手順で APSC を投与し、組織中の AsA 蓄積量について検討を行ったところ、AsA と APSC はほぼ同様の動態が認められた。肝臓組織だけをみると、AsA に比べ蓄積量が少なく、対照飼料に切り替えた後に再び増加する傾向がみられるなど、AsA とは異なる挙動が観察された。ただ、これらの現象は、肝臓には AsA に変換されていない APSC が蓄積されていたためと考えられ、対照飼料に切り替わると肝臓組織に残存していた APSC を源とする AsA の有意な増加が 1 週間近く確認された。すなわち、APSC は AsA と比べて少なくとも同程度は吸収されており、AsA と同様、週単位の間欠投与が有効であるものと考えられた。また、AsA よりも優れた安定性からみて、APSC は将来的に価格の面がクリアされれば、効果的な高濃度 AsA 投与方法に利用できる薬剤として利用可能であるものと考えられた。

Table 4 Experimental designs of this study

Experiments	Fish species	Groups	Number of fish	Mean weight (g)	Added AsA content (mg/kg diet)	Analyzed AsA content (mg/kg diet)
Expt. 1	Japanese char	Cont I	178	3.8	0	NM
		AsA I			5,000	
Expt. 2	Kokanee	Cont II	300	2.2	0	NM
		AsA II			5,000	
Expt. 3	Rainbow trout	Cont III	200	6.1	0	57
		AsA III			5,000	
Expt. 4	Rainbow trout	Cont IV	200	6.3	0	57
		AsA IV			5,000 [14,286*]	

NM: Not measured.

\* Added APSC content (mg/kg diet).

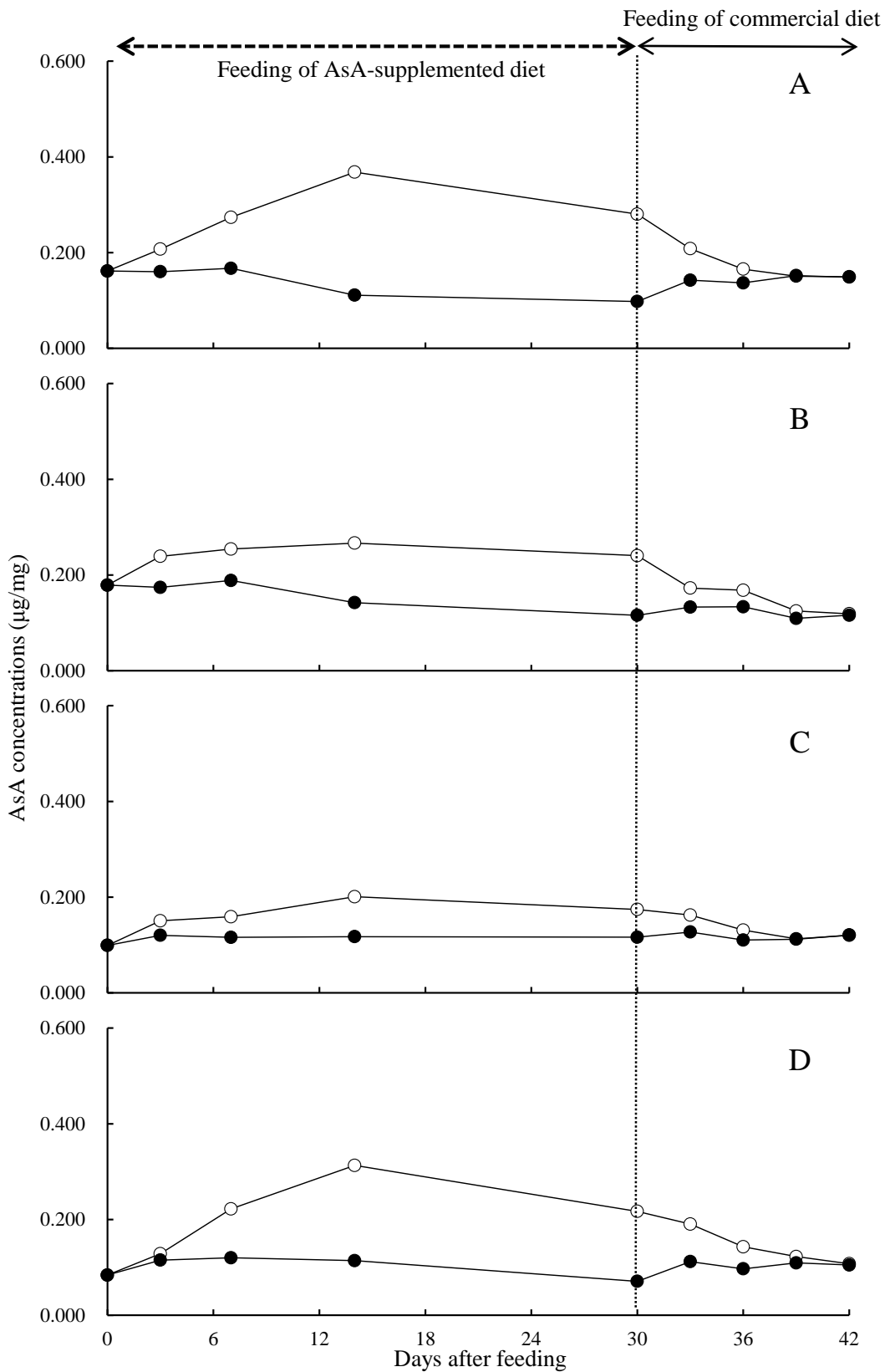


Fig. 3 Changes of ascorbic acid concentrations in liver (A), kidney (B), gill (C), and intestinal tissues (D) of Japanese char fed commercial diets throughout the experimental period (closed circles) and those supplemented with AsA 5,000 mg/kg diet for 30 days (open circles).

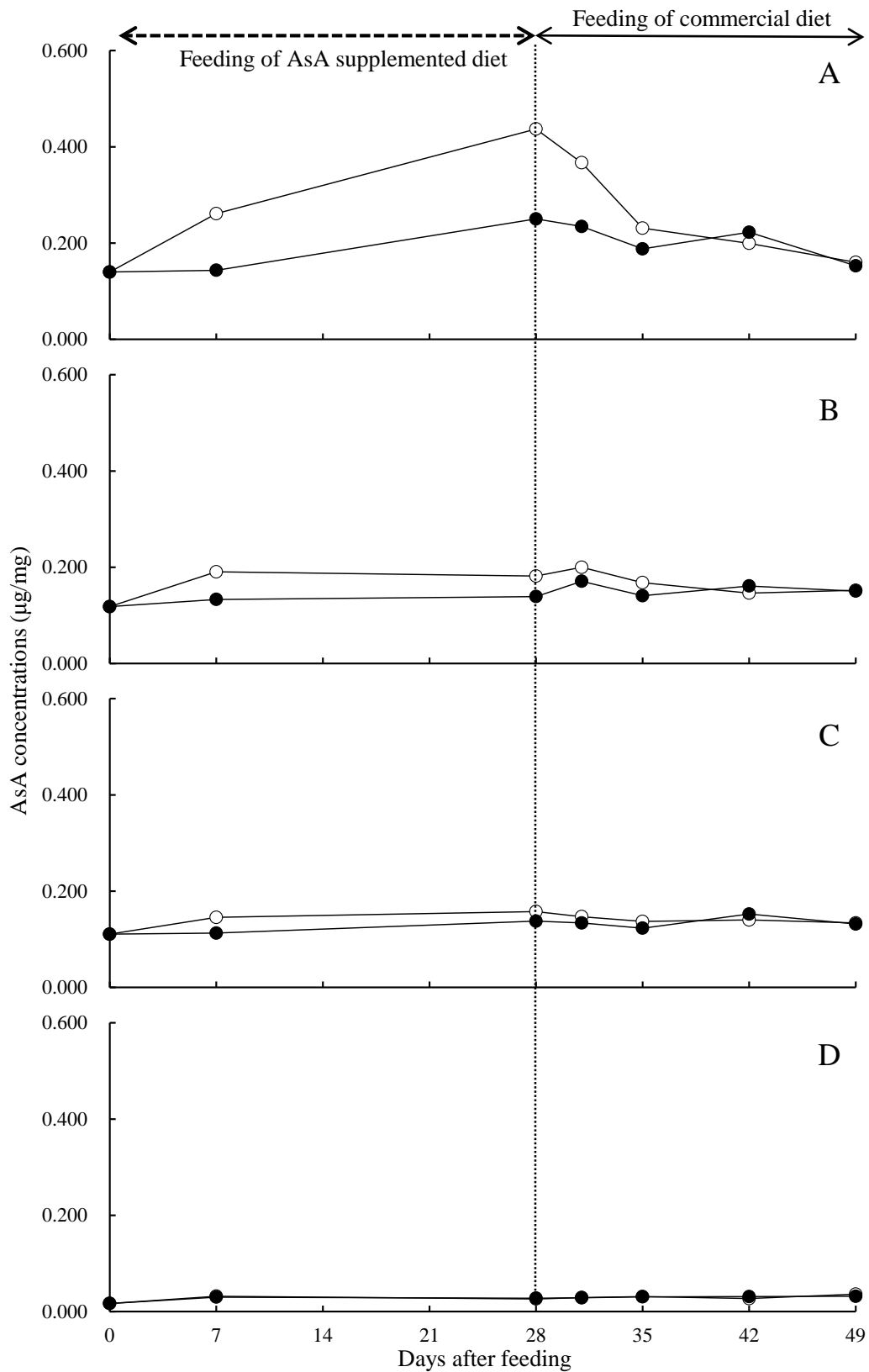


Fig. 4 Changes of ascorbic acid concentrations in liver (A), kidney (B), gill (C), and muscle tissues (D) of kokanee fed commercial diets throughout the experimental period (closed circles) and those supplemented with AsA 5,000 mg/kg diet for 28 days (open circles).

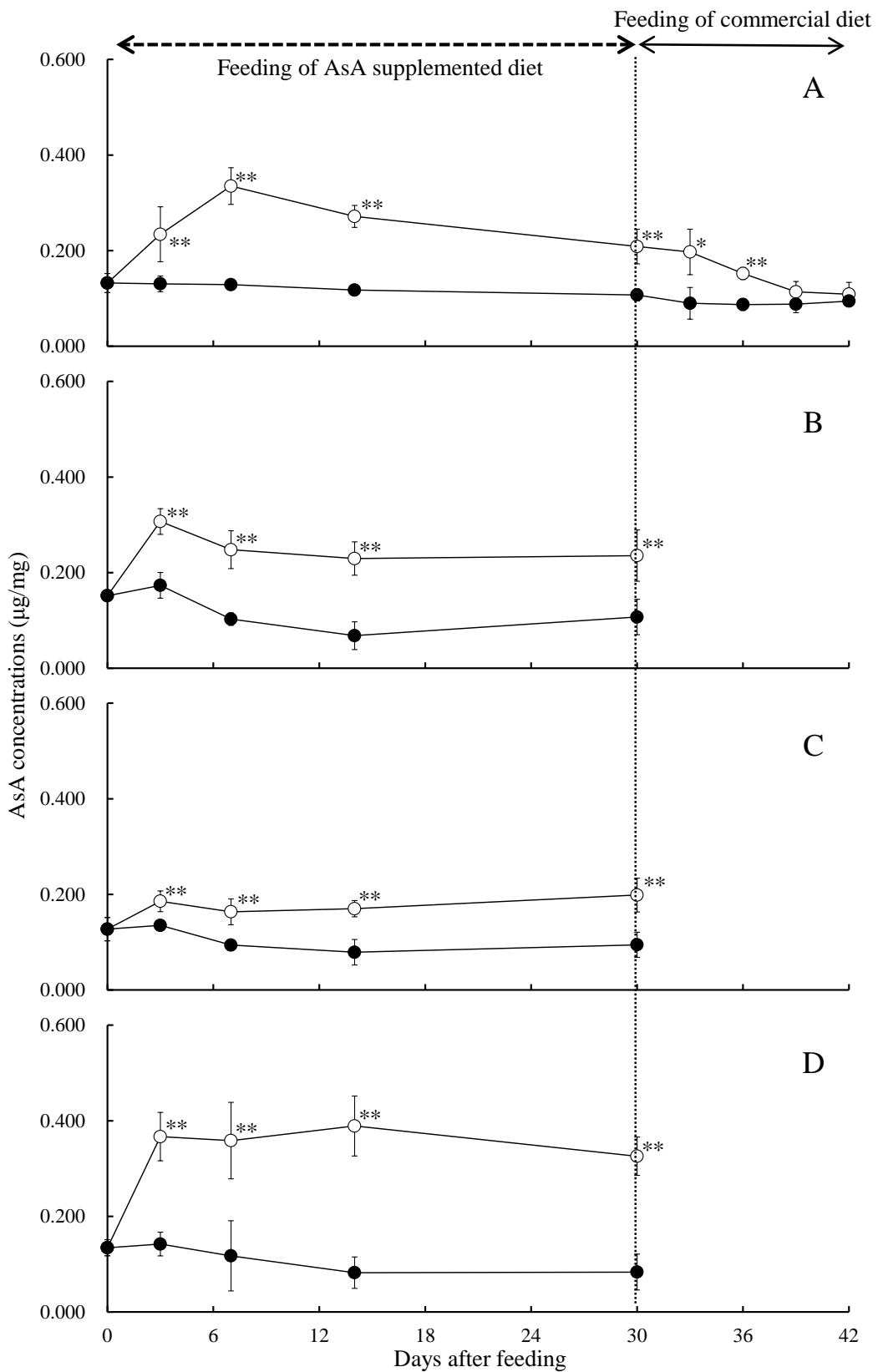


Fig. 5 Changes of ascorbic acid concentrations in liver (A), kidney (B), gill (C), and intestinal tissues (D) of rainbow trout fed commercial diets throughout the experimental period (closed circles) and those supplemented with AsA 5,000 mg/kg diet for 30 days (open circles). Significantly different from controls; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

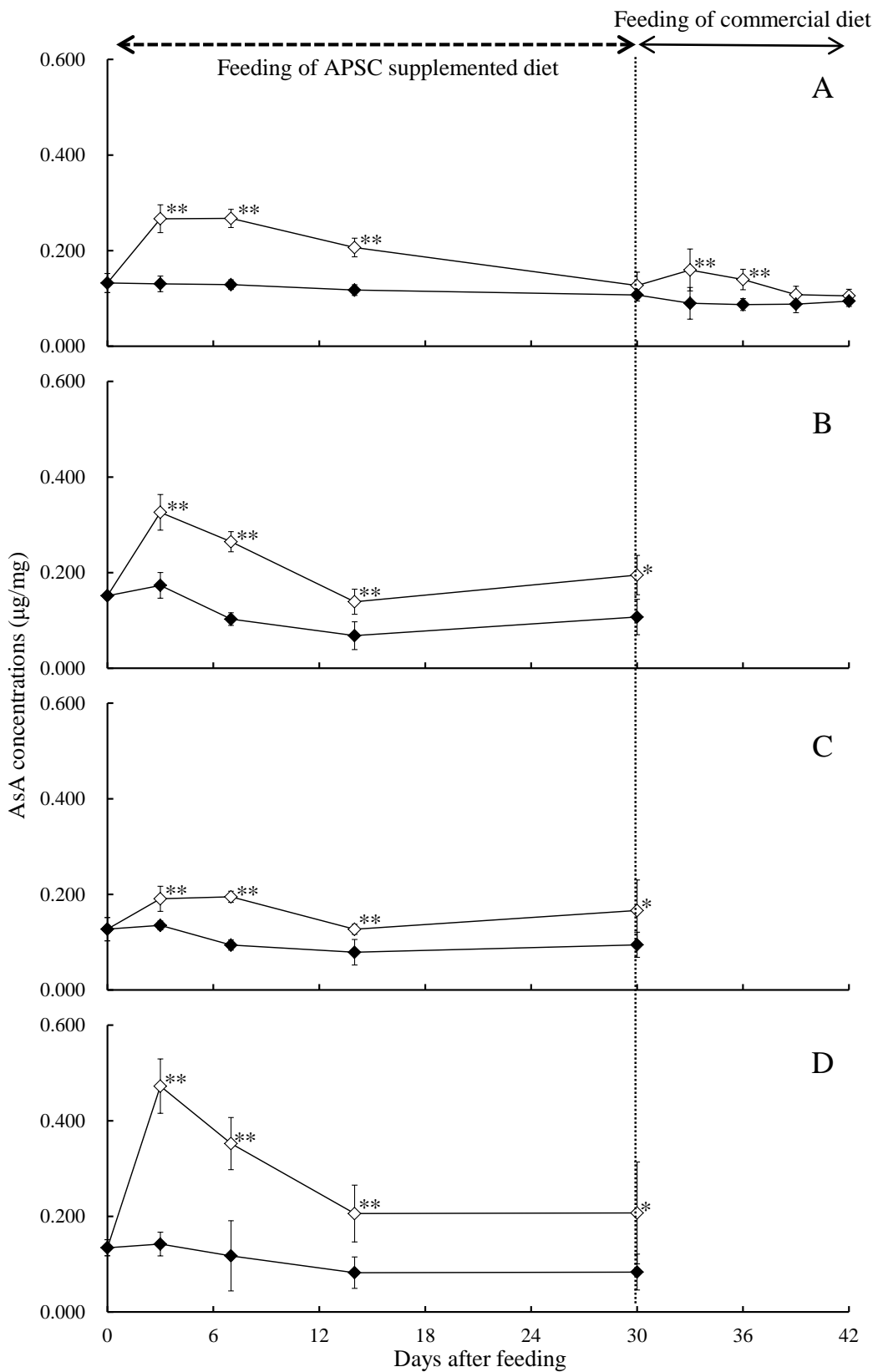


Fig. 6 Changes of ascorbic acid concentrations in liver (A), kidney (B), gill (C), and intestinal tissues (D) of rainbow trout fed commercial diets throughout the experimental period (closed squares) and those supplemented with AsA (APSC) 5,000 (14,286) mg/kg diet for 30 days (open squares). Significantly different from controls; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

## 第4章 高濃度 AsA 投与によるサケ科魚類のストレス耐性向上効果の検討

### 第1節 緒言

養殖生産では、より低コストで多くの魚を生産することが必要となるため、経済性を重視した高密度飼育やそれに伴う低酸素環境等のストレス環境下での育成が強いられることが多い。また、国内の内水面サケ科魚類養殖では、飼育用水として河川水や地下水（湧水）が多用されているが、近年では夏場における猛暑により、飼育用水がサケ科魚類の適正水温を逸脱してしまうケースも散見される。そのため、夏期の高水温時にはストレス環境により飼育魚の健康が損なわれ、感染症を中心とした魚病が多発している（青島, 2007）。一方で、販売魚価の低迷は深刻であり、施設改善によるストレス要因の削減は極めて難しい状況にある。

そこで本章では、高濃度 AsA 投与によるストレス耐性向上について検討を行った。AsA は魚類の必須栄養素である他、高水温や低酸素といったストレス要因に対して高い耐性を誘導することが複数報告されており（Chien *et al.*, 1999; 石橋ら, 1992; Ishibashi *et al.*, 1992; Ortuño *et al.*, 2003; Trenzo *et al.*, 2007）、養殖生産現場ではストレス耐性の向上作用も期待して使われている（越塩, 2008a）。しかし、多くの研究事例は慢性的なストレス負荷に対する情報であり、生産過程で生じることの多い急性ストレスに関する報告は少ない。

本章では、前章までの結果から高濃度 AsA（5,000mg/kg diet）の7日間投与を最適条件とし、生産過程で一般的に想定されるストレス要因として高水温、低酸素、および薬物毒性（ホルマリン毒性）に対する耐性向上効果について検討を行った。

### 第2節 材料および方法

#### 1. 供試魚

中禅寺湖漁協で採卵され、栃木県水産試験場で育成した平均体重 1.6g のヒメマス稚魚を高水温耐性試験に用いた。また、低酸素およびホルマリン毒性耐性試験では、前章で使用した一腹子の黒磯系ニジマス（平均体重 12.6 g）を使用した。



## 2. 試験飼料

前章と同様の手順で AsA を添加・調整した試験飼料および対照飼料を用いた。なお、ヒメマスの飼育試験に使用した飼料を対象に前章と同様の手順で試験および対照飼料の AsA 含有量を測定した結果、それぞれ 4,801 よび 112 mg/kg diet であった (Table 5)。

## 3. ストレス試験

ストレス試験の概要を Table 5 に示した。前章と同様に、試験飼料を魚体重の 3.0% の割合で 7 日間給餌したものを AsA 投与区として、各種ストレス要因に対する耐性試験 (ストレス試験) を実施した。また対照飼料を同様に給餌したものを対照区として、同様にストレス試験を行った。各ストレス試験の詳細は下記に示す。

### 1) 高水温

実験には、13.0 (±1.0) °C に調温したオゾン殺菌河川水を 5.0 L/min の割合で注水した 250 L ヨーロピアンタイプ FRP 水槽 (110×110×65 cm) 2 槽を用いた。それぞれ 300 尾収容して AsA 投与区または対照区として 7 日間飼育した後、飼育水温を 23 または 25°C とした 30 L パンライト円形水槽 (水容量 25 L、エアレーション実施) に 50 尾ずつ移し、30 分もしくは 1 時間毎に、底面に横たわり鰓蓋の動きが観察されなくなった個体を死亡魚として生残率を求めた。

### 2) 低酸素

1) 高水温試験と同一水槽を 2 槽用意し、200 尾/水槽の密度で収容して AsA 投与区および対照区を設定した。低酸素環境は、飼育水を止水状態とすることで作出した。すなわち、30 L パンライト円形水槽 (水容量 25 L) に供試魚を 50 尾移してそのまま止水状態で放置し、15 分毎に蛍光式溶存酸素計 (HQ30d, HACH) を用いて溶存酸素 (DO) を測定することで、低酸素環境に移行するのを確認した。同時に肉眼観察を行い、底面に横たわった尾数から横たわり率を算出した。また、底面に横たわり鰓蓋の動きが観察されなくなった個

体を死亡魚として累積死亡率を求めた。

### 3) ホルマリン

実験には2)と同一のニジマスを使用した。止水状態とした30 Lパンライト円形水槽（水容量25 L）に0.1%ホルマリン溶液となるようホルマリン原液（37%ホルムアルデヒド、8%メタノール）を加えた後、1水槽当たり50尾を移した。15～30分毎に1)と同様の基準で死亡状況を180分間観察した。

## 4. 統計解析

ストレス試験の死亡状況は、フィッシャーの正確確率検定を行い、対照区との有意性を比較した（ $P<0.05$ ）。

## 第3節 結果

### 1. 高水温

結果はFig. 7に示した。23°Cに設定した水槽に移した試験では、対照区の最終生残率が20%であったのに対し、AsA投与区では80%と有意（ $P<0.01$ ）な死亡低減効果が確認された。一方、25°C水槽ではAsA投与区の最終生残率も20%しか認められず、有意な差は認められなかった。

### 2. 低酸素

低酸素環境への移行を確認するため水槽中のDOを経時的に測定した結果をFig. 8に示した。AsA投与区および対照区水槽ともに、測定開始時は9 mg/LであったDOは急激に下がり、実験開始1時間後には2 mg/L程度まで減少したことから、両水槽ともに同一の低酸素環境が作出されたものと判断した。なお、試験中の飼育水温は14.0～17.2°C（平均15.5°C）であった。

低酸素環境における累積死亡率の変化はFig. 9に示した、AsA投与区と対照区の間で最

終累積死亡率に差異は認められなかったが、AsA 投与区は横たわり個体の出現時期が遅延する傾向が認められた。また、実験開始 1~1 時間半後にかけては、横たわりおよび累積死亡率ともに、AsA 投与区が有意に低かった ( $P<0.01$ )。

### 3. ホルマリン

ホルマリンの浸漬処理における生残率の結果を Fig. 10 に示した。対照区と比較して、実験期間を通し有意な差は確認されなかった。

## 第 4 節 考察

養殖魚は、様々なストレス環境下で飼育されており、魚病の主要な発生要因となっているものと考えられている。そこで本章ではヒメマスを供試魚として、高濃度 AsA 投与がサケ科魚類養殖で重要なストレス要因である高水温耐性にもたらす影響について解析を行った結果、水温 13°C から 23°C (水温幅 10°C) への高水温環境下への移動に伴う有意な死亡の低減効果が確認された (Fig. 7)。高水温と AsA 投与の関係については幅広い魚種で報告があり、コトヒキ *Terapon jarbua* に対する慢性的な高水温ストレスに対して、AsA の投与が有効であったことが報告されている (Chien *et al.*, 1999)。また、本研究の第 2 章のニジマスによる実験においても有意な生残向上効果が確認されたことから (Fig. 2)、高濃度 AsA 投与はサケ科魚類を含む多様な魚種において高水温耐性を付与できることが明らかとなった。なお、水温 13°C から 25°C (水温幅 12°C) では、対照区との間で有意な差は認められず、一定の有効範囲があることも確認された。

次に、ニジマスを供試魚として、低酸素ストレスに対する有効性を検討した。慢性および急性的な低 DO に対する AsA の投与効果については、イシダイ *Oplegnathus fasciatus* で報告事例があり (石橋ら, 1992; Ishibashi *et al.*, 1992)、AsA を 300 mg/kg diet の割合で投与すると死亡率が抑制されることが報告されている (石橋ら, 1992)。本試験では、石橋ら (1992) や Ishibashi *et al.* (1992) の報告よりもさらに強いストレス強度で試験を実施したが、最終累積死亡率は対照区と差異は認められなかったものの、高濃度 AsA 投与区では横

たわりや死亡開始時期が対照区と比べ有意に遅くなる傾向が確認された (Fig. 9)。これらの結果は、サケ科魚類においても高濃度 AsA の投与が低酸素環境耐性の向上効果をもたらすことを示している。

なお、最後に実施した 0.1%ホルマリン溶液に対する生残性向上効果については、本研究では確認できなかった (Fig. 10)。毒物に対する AsA の投与効果に関する情報は、細胞レベルではパラコートに対する障害性の軽減が報告されており、細胞の酸化ストレスの軽減が主因であると報告されている (田中, 2011)。魚類では、ニジマスへのカドミウム毒性 (山本・井上, 1982) やスチールヘッドトラウト (ニジマスの降海型) への亜硝酸塩感受性 (Blanco and Meade, 1980) と AsA の関係について報告されており、カドミウム毒性では高濃度 (2,000 mg/kg diet) の AsA とカドミウムを同時に投与し、ヘモグロビン濃度やヘマトクリット値を指標とした評価により僅かに投与効果があることが示唆されている。亜硝酸塩についても同濃度の AsA 投与により、亜硝酸塩への耐性が付与されたことが明らかとなっている。一方、本試験では毒性物質としてホルマリンを選択したが、死亡開始時期からみてストレス強度が強すぎた可能性があり、より薄い濃度での解析が必要である。

本章では、7日間の高濃度 AsA 投与が、サケ科魚類の高水温や低酸素ストレスに対して有効であることを示した。養殖生産過程で生じるストレスは多種多様であるが、それぞれが強弱を繰り返して発生している。本研究結果からみても、AsA は全てのストレス要因に対して有効ではなく、有効範囲もあるため、生産現場では AsA の投与効果が発揮されないケースに遭遇することもあるものと考えられる。一方で、今回効果が認められた高水温や低酸素などは夏季に生じやすいストレス要因であり、7日間 AsA 投与でストレス耐性が付与されたことからみても、従来のように長期間の連続投与では無く、養魚過程でストレスが生じることが予想される夏季や移動・選別時期の前に本法の短期投与を実施することで、経済的であり作業効率の高い成果が得られるものと考えられた。

Table 5 Experimental designs of this study

Experiments	Treatment	Fish species	Groups	Number of fish	Mean weight (g)	Added AsA content (mg/kg diet)	Analyzed AsA content (mg/kg diet)
Thermal tolerance	13 → 23°C	Kokanee	Con I	50	2.5	0	112
			AsA I	50	2.5	5,000	4,801
	Con II		50	2.3	0	NM	
	AsA II		50	2.5	5,000	NM	
Hypoxia tolerance	9.0 → 2.0 dissolved oxygen (mg/l)	Rainbow trout	Con III	50	14.9	0	NM
			AsA III	50	14.6	5,000	NM
Formaline tolerance	0.1% formalin bath treatment		Con IV	50	14.8	0	NM
			AsA IV	50	14.9	5,000	NM

NM: Not measured.

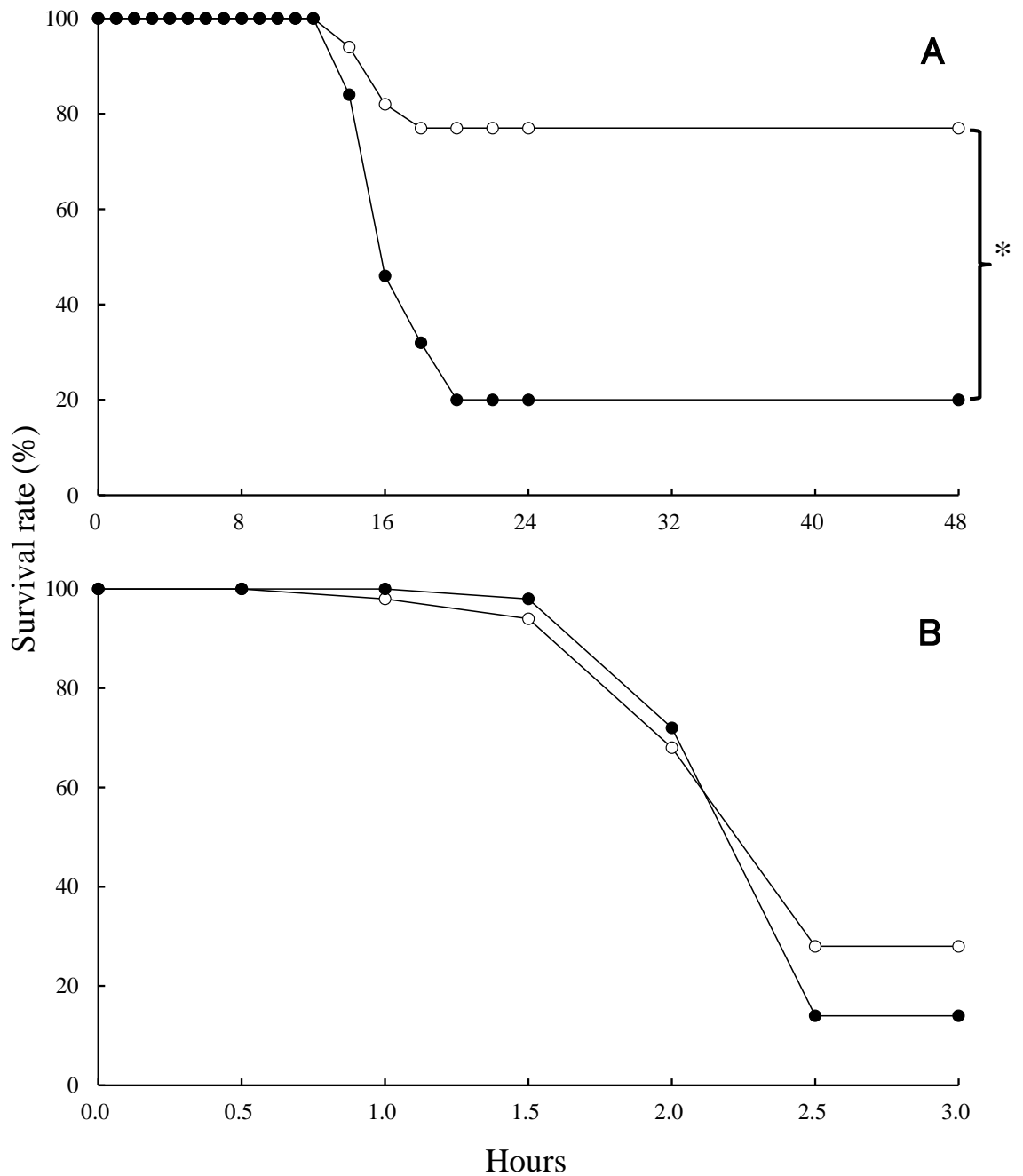


Fig. 7 Survival rates in relation to the thermal tolerance test of kokanee fed commercial diets (closed circles) and those supplemented with AsA 5,000 mg/kg diet (open circles). A: 13 → 23°C, B: 13 → 25°C. \*Significantly different from controls ( $P < 0.01$ ).

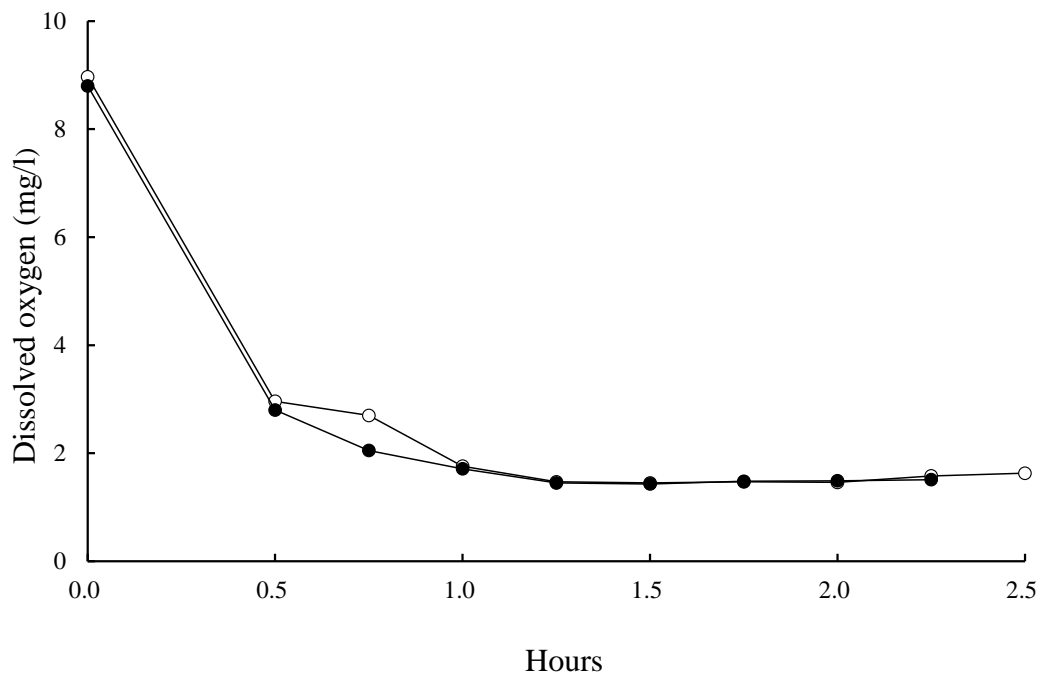


Fig. 8 Changes in dissolved oxygen of AsA (open circles) and Control aquariums (closed circles) throughout the experimental period of hypoxia tolerance test.

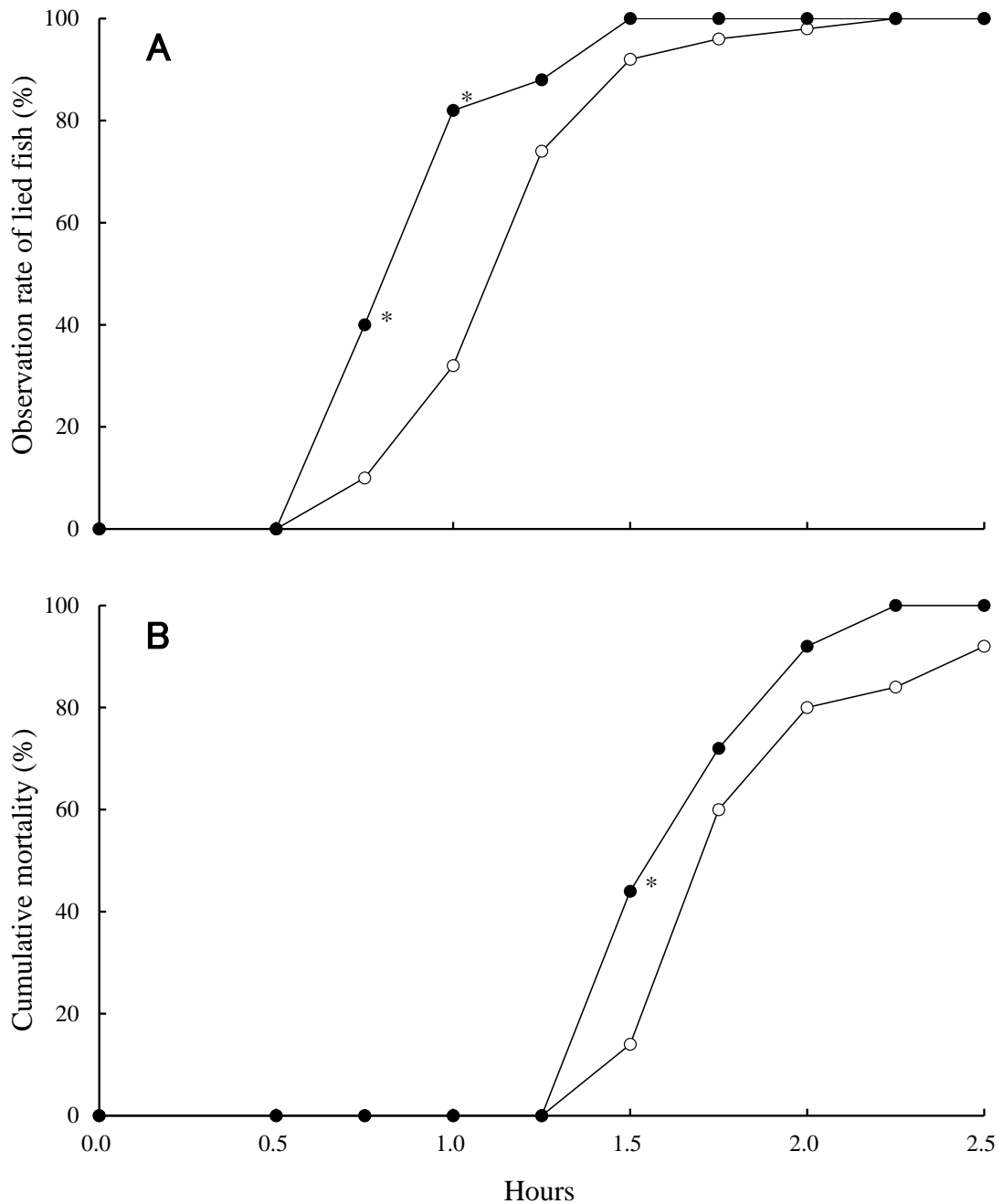


Fig. 9 Observation rate of lied fish (A) and Survival rates (B) in relation to the hypoxia tolerance test of rainbow trout fed commercial diets (closed circles) and those supplemented with AsA 5,000 mg/kg diet (open circles).

\*Significantly different from controls ( $P < 0.01$ ).



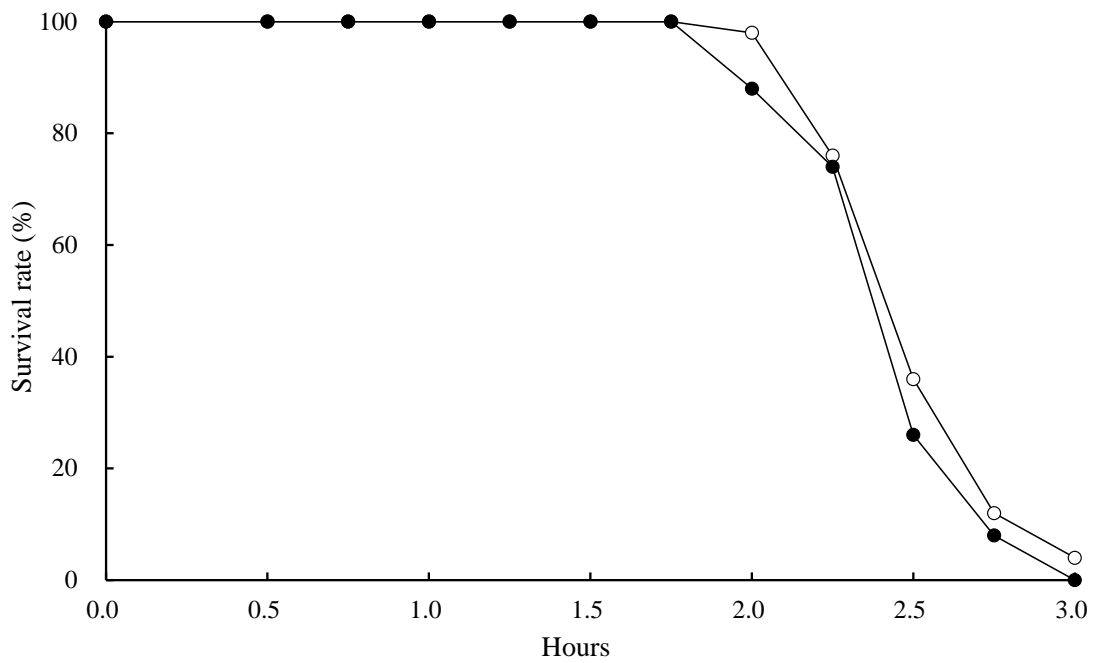


Fig. 10 Survival rates in relation to the formaline tolerance test of rainbow trout fed commercial diets (closed circles) and those supplemented with AsA 5,000 mg/kg diet (open circles).

## 第5章 高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類の抗病性向上効果の検討

### 第1節 緒言

近年の養殖産業におけるコスト要因として、飼料、燃油、電気価格、および魚病被害を挙げることができる。特に魚病による飼育魚の減耗は生産量の低下に直結するため、生産者にとって深刻な問題である。感染症に対する魚病対策としては、抗菌剤やワクチンといった水産用医薬品による対策が一般的であるが、抗菌剤については食の安全・安心の視点から使用削減が消費者から要望されている。また、ワクチンについては、産業規模の小さいわが国のサケ科魚類養殖では開発が進む可能性が極めて低いのが現状である。そこで、免疫力増強による病気に罹りにくい健康魚づくりが注目されている。通常、養殖生産者でもビタミン剤などを免疫賦活剤として市販飼料に添加する形で利用できるため、多くの生産者が創意工夫しながら使用している。しかし、これは科学的知見に基づくものであることは少なく、経験に基づく自己判断による活用であり、効果も安定していないのが現状である（栃木県養殖漁業協同組合、私信）。

そこで本章では、7日間の高濃度 AsA 投与が各種疾病に対する有効性について検討を行った。AsA は、大量投与により生理・免疫賦活作用に関する機能を向上させることが報告されている（村田, 1980）。人為感染試験による投与効果の検証も行われているが（Sakai, 1999; Verlhac and Gabaudan, 2005）、効果がなかった感染症についての知見が乏しいなど、その有効範囲については不明な点が多く残されている（Verlhac and Gabaudan, 2005）。本章では、内水面サケ科魚類養殖で被害が深刻な各種疾病のうち、ウイルス性疾病として IHN（吉水, 2004a）および OMVD（吉水, 2004b）、細菌性疾病として *Streptococcus iniae* を原因細菌とする  $\beta$  溶血性レンサ球菌症（室賀, 2004）、そして環境性の疾病であると考えられているイワナの水腫症（河西, 1991）を選択し、AsA の高濃度投与の有効性について人為感染試験や自然発症症例の死亡状況により評価を行った。さらに、IHN については、魚体サイズや攻撃ウイルス株の遺伝的な違いによる投与効果の差異についても詳細な検証を行った。

## 第2節 材料および方法

### 1. IHN に対する有効性

#### 1) 供試魚

実験にはニジマスおよびヒメマスを用いた。ニジマスは、前述の黒磯系ニジマス稚魚 1g サイズ（平均体重 0.87g）および 6g サイズ（平均体重 5.7 g）の一腹子を用いた。ヒメマスは、前述の中禅寺湖漁協で採卵され栃木県水産試験場で育成したヒメマス 2g サイズ（平均体重 1.6 g）を用いた。

#### 2) 試験飼料

前章で用いた試験および対照飼料を用いた。なお、試験飼料および対照飼料の AsA 量は、それぞれ 4,801 および 112 mg/kg 飼料であった。

#### 3) 供試ウイルス

供試ウイルス株は、2000 年に栃木県内養魚場で発生し当场で分離された IHN ウイルス (IHNV) の TV0026 株および 1989 年に東京都内養魚場で発生し、東京都水産試験場奥多摩分場（現東京都農林水産振興財団奥多摩さかな養殖センター）で分離され、分譲された TK8901 株を攻撃試験に供試した (Table 6)。なお、Mochizuki *et al.*, (2009)に基づき G 遺伝子の塩基配列を決定したところ、TV0026 (Accession No. DDBJ AB856043) および TK8901 (Accession No. DDBJ AB856042) の両株間に 5%(1,442/1,518 nucleotides) の差異が認められた。

#### 4) 感染試験

試験の概要を Table 7 に示した。本試験では、ニジマスで 2 回 (1g および 6g サイズ)、およびヒメマスで 1 回 (2g サイズ) の 3 感染試験を行った (Table 7)。各感染実験の詳細は下記に示す。

#### 感染実験Ⅰ（ニジマス 1g サイズ）

13.0（±1.0）℃に調温されたオゾン殺菌河川水を 0.6 L/min の割合で注水した 25L パンライト円形水槽を 4 槽用意し、供試魚を 55 尾/水槽の密度で収容した。前章と同様の手順で、4 水槽のうち 2 水槽に試験飼料、残りの 2 水槽に対照試料を給餌し、飼育試験終了時に供試魚の AsA 蓄積量を測定するために、各水槽から 5 尾ずつサンプリングして AsA 測定まで -80℃で凍結保存した。AsA の測定は、供試魚の肝臓を 5 尾分プールし、前章の手法と同様に測定した。

感染実験では、15L バケツに供試ウイルス液を攻撃力価がそれぞれ TV0026 で  $10^{5.7}$  および TK8901 で  $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub>/mL となるように 10 L 調整し、各水槽（区）から供試魚を 50 尾ずつ取り上げ、上記ウイルス液中に浸漬した。エアレーションを施しながら 1 時間浸漬させた後、注水量を 0.6 L/min に設定し、補助的にエアレーションを施したパンライト水槽に移して 14 日間死亡状況を肉眼で観察した。

#### 感染実験Ⅱ（ヒメマス 2g サイズ）

感染実験Ⅰと同様の注水設定した 250L の FRP 長方形水槽を 2 槽用意し、供試魚を 300 尾/水槽の密度で収容した。以後、感染実験Ⅰと同一手順で飼育および感染実験を行った。

#### 感染実験Ⅲ（ニジマス 6g サイズ）

注水を 1.0 L/min の割合に設定した 500L の FRP 長方形水槽を 2 槽用意し、供試魚を 600 尾/水槽の密度で収容した。以後、感染実験Ⅰと同一手順で飼育および感染実験を行った。なお、ウイルスの攻撃力価は、TV0026 で  $10^{5.6}$  および TK8901 で  $10^{5.8}$  TCID<sub>50</sub>/mL となるように調整したものをを用いた。感染後は、注水量を 1.0 L/min に設定したパンライト水槽に移し、18 日間死亡状況を観察した。

#### 5) 感染確認

死亡魚は IHNV による感染で死亡したかを確認するため、株化細胞 RTG-2 に死亡魚腎

臓を MEM でホモジナイズし、450nm のメンブレンフィルターで濾過した試料を接種した。20℃で 1 週間の培養後、RTG-2 に IHNV 特有の CPE が確認されたものを IHNV 陽性とし、IHNV による死亡であると判断した。

## 2. OMVD に対する有効性

### 1) 供試魚

本章 1. と同一の黒磯系ニジマス（平均体重 4.7g）の一腹子を用いた。

### 2) 試験飼料

1. と同一の試験飼料および対照飼料を用いた。

### 3) 供試ウイルス株

供試ウイルス株には、2000 年に長野県内養魚場で発生し、長野県水産試験場で分離・分譲された RtNa0010 株を用いた。

### 4) 感染試験

試験の概要を Table 8 に示した。注水を 5.0 L/min (14.0±1.0℃) の割合に設定した 360 L ヨーロピアンタイプ FRP 水槽を 2 槽用意し、供試魚をそれぞれ 250 および 220 尾/水槽の密度で収容した。以後、感染実験 I と同一手順で飼育および感染実験を行った。なお、ウイルスの攻撃力価は、 $10^{4.6}$  TCID<sub>50</sub>/mL となるように調整したものをを用いた。すなわち、ビニール袋に供試ウイルス液を攻撃力価がとなるように 3 L 調整し、供試魚（30 および 40 尾/区）をそのウイルス液に移して酸素を注入しながら密栓状態で 1 時間浸漬した。その後、注水量を 0.6 L/min に設定して補助的にエアレーションを施した 25L パンライト水槽に移し、20 日間の死亡状況を観察した。

### 5) 感染確認

死亡魚は OMV による感染で死亡したかを確認するために、死亡魚腎臓を火炎滅菌したエーゼ穿刺した後に株化細胞 RTG-2 へ接種し、20°C で 1 週間の培養後、RTG-2 に OMV 特有の CPE が確認されたものを OMV 陽性とし、OMV による死亡であると判断した。

### 3. $\beta$ 溶血性レンサ球菌症に対する有効性

#### 1) 供試魚

本章 1. と同一の黒磯系ニジマス（平均体重 8.7g）の一腹子を用いた。

#### 2) 試験飼料

本章 1. と同一の試験飼料および対照飼料を用いた。

#### 3) 供試細菌

栃木県内の養魚場で飼育されていたニジマスから 2006 年に分離された *Streptococcus iniae* TB0613 株を用いた。攻撃菌液は TS 液体培地（BD）に供試菌を接種し、20°C で 48 時間培養し、菌濃度が  $6.0 \times 10^{7.0}$  cfu/mL に調整したものをを用いた。

#### 4) 感染試験

試験の概要を Table 9 に示した。注水を 6.0 L/min ( $14.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ ) の割合に設定した 250 L ヨーロピアンタイプ FRP 水槽を 2 槽用意し、供試魚をそれぞれ 200 尾/水槽の密度で収容した。以後、感染実験 I と同一手順で飼育を行った。

感染試験は、15 L 容量のバケツ内で菌液 1 L と飼育水 9 L を混合した攻撃用菌液（10 倍希釈菌液）を調整し、同調整液にエアレーションを施しながら供試魚（40 尾/区）を 30 分間浸漬させることにより人為感染を行った。その後、注水量を 0.6 L/min ( $17.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ ) に設定し補助的にエアレーションを施した 25L パンライト水槽に移し、14 日間の死亡状況を観察した。また、給餌は 7 日目まで無給餌、8 日目以降は 1 回/日の割合で対照飼料を飽食給餌させた。

#### 5) 感染確認

死亡魚は TS 寒天培地に腎臓を塗抹し、菌分離を行った。分離された菌は、*Streptococcus iniae* 特異的プライマーを用いた PCR 法 (Mata *et al.*, 2004) により種の確認を行った。

### 4. 水腫症

#### 1) 供試魚

栃木県鬼怒川水系産のニッコウイワナを用いた。同魚は栃木県水産試験場で人工採卵・受精させ、継代飼育した 7 代目の種苗 (平均体重約 1.1g) である。

#### 2) 試験飼料

日清丸紅飼料製の海産稚魚用市販飼料 (おとひめ) を基本飼料として、AsA 粉末を超純水で溶解後、5,000 mg/Kg 飼料以上の割合で添加し試験飼料とした。また、超純水のみ添加させたものを対照飼料とした。調整した飼料は、4°C の冷蔵庫で保管し、調整した日のみ使用した。なお、前章と同様の手順で両飼料の AsA 量を測定したところ、それぞれ 18,845 および 8,857 mg/kg 飼料であった。

#### 3) 水腫症自然発症試験

13.0 (±1.0) °C に調温されたオゾン殺菌河川水を 1.0 もしくは 2.0 L/min の割合で注水設定した 25 L パンライト水槽 (容量 30L) に、供試魚を 300 尾/水槽の密度で収容した。水腫症の自然発症の発生の時期まで、前章と同様の手順で対照飼料を給餌し、発症時期に近づいた時期に複数の水槽において試験飼料の給餌を実施した。また、水腫症発症が確認された水槽の一部は塩水浴を実施し、また全ての水槽で給餌を中止した。飼育試験の詳細は、Table 10 に示す。

試験 1 (Expt. 1) : 前述の飼育条件の水槽を 2 区設け、水腫症の自然発症を確認後、直ちに 1% 塩水浴を 3 時間実施した水槽を塩水浴区 (SWB I) 、そのまま通常飼育する

水槽を対照区 (Cont I) とした。なお、塩水浴は 3 日間連続で実施し、自然発症後 13 日目までの死亡状況を観察した。また、対照区から肉眼的に健常および水腫症発症魚をサンプリングし、ブアン液および 1% グルタルアルデヒド液で 5 尾ずつ固定した。固定したそれぞれの標本は、常法によりパラフィン薄切組織標本および走査型電子顕微鏡 (SEM; SEMS-3500N, 日立ハイテク) による観察に行った。なお、薄切組織標本観察はヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色およびギムザ染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

試験 2 (Expt. 2) : 試験 1 と同様の飼育条件の水槽にそれぞれ試験飼料 (AsA I) および対照飼料 (Cont II) を給餌する区を設けた。なお、AsA 投与開始 1 週間後に水腫症が自然発症したため、そのまま給餌を中止して 13 日目までの死亡状況を観察した。

試験 3 (Expt. 3) : 試験 1 および 2 の飼育条件から注水量のみを 2.0 L/min に増やした水槽にそれぞれ試験飼料 (AsA II) および対照飼料 (Cont III) を給餌する区を設けた。なお、試験 2 と同様、投与開始 1 週間後に水腫症が自然発症したため、試験 3 と同様に観察を行った。

## 5. 統計解析

IHN、OMVD、および  $\beta$  溶血性レンサ球菌症における感染試験の結果は、各区の死亡確率が同一であるとみなして、最尤法を用いた対数尤度比検定により、対照区との有意性を比較した ( $P < 0.05$ )。また水腫症における各区の死亡状況の比較検定は、フィッシャーの正確確率検定により、対照区との有意性を比較した ( $P < 0.05$ )。

## 第 3 節 結果

### 1. IHN に対する有効性

試験 1 の供試魚肝臓の AsA 蓄積量は、対照区が 0.172 および 0.136 mg/g であったの対して AsA 区では 0.335 および 0.259 mg/g と約 2 倍量認められた (Table 7)。感染試験を行っ



た結果、TK8901 株で攻撃した Cont I および AsA I の最終累積死亡率はそれぞれ 36 および 38%であった。また、TV0026 株で攻撃した Cont II および AsA II の最終累積死亡率は 84 および 72%であった。両 IHNV 株ともに、AsA 投与による死亡低減効果は認められなかった (Fig. 11)。

試験 2 での感染試験では、TK8901 株で攻撃した Cont III および AsA III の最終累積死亡率はそれぞれ 22 および 20%であった。一方、TV0026 株で感染実験を行った Cont IV および AsA IV の最終累積死亡率は 56 および 26%で、AsA 投与による有意な死亡低減効果が認められた (Fig. 12,  $P<0.01$ )。

試験 3 での感染試験では、TK8901 株で攻撃した Cont V および AsA V では死亡個体は観察されなかった。しかし、TV0026 株で感染実験を行った Cont VI および AsA VI の最終累積死亡率は 87 および 57%で、AsA 投与による有意な死亡低減効果が認められた (Fig. 13,  $P<0.01$ )。

なお、本実験で死亡した全ての魚体からは IHNV が分離された。

## 2. OMVD に対する有効性

感染試験の最終累積死亡率は、それぞれ Cont I および II でそれぞれ 80 および 67%であったのに対し、AsA I および II でそれぞれ 70 および 63%あり、対照区と比べ明瞭な死亡低減効果は認められなかった (Fig. 14)。なお、AsA II の試験開始 2 日後に死亡した 1 個体を除き、全ての死亡魚から OMV が分離された。

## 3. $\beta$ 溶血性レンサ球菌症

感染試験の最終累積死亡率は、Cont I および II ではそれぞれ 85 および 83%であったのに対して、AsA I および II ではそれぞれ 58 および 68%と高濃度 AsA 投与による有意な死亡低減効果が確認された (Fig. 15;  $P<0.05$ )。なお、本実験で死亡した全ての魚体から *S. iniae* が分離された。

#### 4. 水腫症

試験 1 において、体表で水腫を形成する症状の個体が肉眼的に観察され (Fig. 16)、水腫症が自然発症した判断された。死亡状況は、Cont I では水腫症が自然発症すると同時に死亡個体が急増し、最終累積死亡率は 78.6%に達した。一方で、塩水浴を実施した塩水浴区では死亡個体が若干見られる程度で、最終累積死亡率は 5.7%に留まり、対照 1 区に対して有意な死亡低減効果が認められた (Fig. 17,  $P < 0.01$ )。発症魚の鰓および腎臓について薄片組織標本を作製し観察したところ、鰓の二次鰓弁の棍棒化が顕著に生じていた (Fig. 18)。また、腎臓では病魚の尿細管内にギムザ染色で青紫色に染色される微細な蓄積物様ものが観察された (Fig. 19)。SEM により鰓の二次鰓弁表面を詳細に観察したところ、病魚では上皮の増成が顕著にみられたが、微生物の付着・増殖は確認されなかった (Fig. 20)。

試験 2 では、AsA 給餌開始 7 日目に肉眼的に体表で水腫を形成する症状の個体が観察された。そこで、水腫症の発症抑制効果について観察を行ってみたが、最終累積死亡率は AsA I で 80.4%、Cont II で 76.8%と、両区間で有意な死亡低減効果は認められなかった (Fig. 17)。

一方、試験 3 では試験区間で差異が認められた。試験 2 と同様に AsA 給餌開始 7 日目に水腫症が確認され、最終累積死亡率をみると、AsA II で 60.0%であったのに対し、Cont III では 92.2%に達し、両区間で有意 ( $P < 0.01$ ) な死亡低減効果が認められた (Fig. 17)。

#### 第 4 節 考察

IHN はほぼ全世界の内水面サケ科魚類養殖で甚大な被害を発生させているウイルス性疾病である (吉水, 2004a)。1970 年代に国内に侵入して以来、抜本的な対策が開発されないまま、国内サケ科魚類養殖に大きな魚病被害を及ぼしている (青島, 2007)。特に IHNV は世界的に見ても遺伝的多様性が高く、国内侵入株では強毒化していることも明らかになっている (Nishizawa *et al.*, 2006; Mochizuki *et al.*, 2009)。同ウイルスは、国内に侵入した 1970 年代には数 g サイズの稚魚期限定の疾病であった。しかし、近年では 1kg を越える親魚などでも感染が確認されるなど、大きな被害を生じさせている (中居, 2011)。その対策とし

て、海外では IHNV の一部遺伝子型に対する IHN ワクチンが開発・販売されているが、日本国内ではその用途はない（中西, 2009）。疾病対策の基本となる防疫は、屋内で隔離飼育の可能な 2g サイズ未満の稚魚期のみであり（原ら, 1993a）、屋外池では病原体を持ち運ぶ鳥類や獣の侵入を完全に防ぐことは難しい（原ら, 1993b）。そのため、IHN に対する有効な対策として、防疫と感染・発症しても死亡しにくい健康魚を作ることを併用することが望ましいと考えられる。そこで本研究では、鈴木・阿井（1989）により報告されている AsA の高濃度投与法に着目した。結果として、感染試験に使用した TK8901 株と TV0026 株でニジマスおよびヒメマスに対する病原性に差異が認められた。また、ニジマス 1g サイズでは AsA 投与による死亡低減効果が認められなかった。一方で、ヒメマス 2g サイズおよびニジマス 6g サイズでは病原性の強い TV0026 株にのみ AsA 投与による死亡低減効果が観察された。これらの結果から、AsA 投与の IHN に対する死亡低減効果が発揮されるには、IHNV 株の病原性や魚体サイズにより異なることが示唆された。IHN に対する抗病性が魚体サイズや家系によって変化するとの報告もあり（河西ら, 1993）、IHNV の病原性にも多様性が認められることから、養殖生産現場では IHN に対する AsA の投与効果が安定的に発揮させるには、IHNV 株の病原性や魚体サイズを考慮した投与が求められる。またウイルスの遺伝型と AsA の有効性の関係について解析を進める必要がある。

なお、生産現場でのより有効な IHN 対策として、2g サイズ未満の稚魚は飼育水の紫外線殺菌や隔離飼育による完全防疫を施し（Yosimuzu, 2009）、外池に出すサイズからは事前の AsA 投与による免疫向上で対応することが望ましいと考えられる。ニジマスの家系間における IHN に対する抵抗性も異なることが明らかになってきており（Purcell *et al.*, 2010）、今後はそれら飼育魚家系の抗病性も加味した IHN 対策も重要となることと考えられる。

OMVD は、IHN と同じウイルス性疾病であるが、AsA の高濃度投与効果が認められなかった（Fig. 14）。OMVD は IHN とは異なり肝臓や体表に病巣を形成することが知られており（吉水守, 2004b）、IHNV と OMV は増殖器官が異なるものと考えられることから、AsA の有効範囲・対象感染症を考える上で、ウイルスの増殖特性との関係も検証する必要がある。

細菌性疾病である $\beta$ 溶血性レンサ球菌症はヒラメを中心とした海産魚で魚病被害が報告されているが、魚体サイズに関わらず感染することから内水面養殖サケ科魚類においても、高価で取引される大型マス類（概ね1kg以上のサイズ）を中心に甚大な被害を及ぼしている。本症は、*S. iniae* と呼ばれるグラム陽性の球菌が原因の細菌性疾病である（室賀, 2004）。本症の対策として、各種合成抗菌剤やヒラメ用の不活化注射ワクチンが開発・販売されている（乙竹, 2009）。一方で、産業規模の小さい内水面養殖魚種については、塩酸オキシテトラサイクリンのみが治療薬として販売されるのみで、ワクチンに至っては開発・販売されていない。そのため、養殖内水面サケ科魚類への本症に対する対策が求められている。本試験結果から、感染試験の最終累積死亡率が対照区で85および83%であったのに対して、AsA区では58および68%と有意な死亡低減効果が確認された。

サケ科魚類へのAsA投与による細菌性疾病に対する死亡低減効果に関する報告は多く、ビブリオ病やレッドマウス病（ビタミンEとの混合投与）で投与による死亡低減効果が明らかとなっている（Navarre and Halver, 1989; Wahli *et al.*, 1998）。一方で、ウイルス性疾病ではあるものの前述したIHNのように魚体サイズや菌株の毒性によっても、投与効果が安定しない可能性も考えられる。そのため、魚体サイズや菌株の毒性の他、飼育水温や飼育密度などの環境要因を含めて具体的な投与条件を精査し、投与効果が十分に発揮される投与手法をより詳細に調べることが望まれる。

イワナの水腫症は、原因不明の疾病として古くからイワナを中心としたサケ科魚類の孵化仔・稚魚期にみられ、イワナの種苗生産に大きなダメージを与えることが知られている（河西ら, 1991）。河西ら(1991)によると、鰓表面に付着した複数種の短桿菌によって水腫症が生じる可能性があることが報告されていた。しかし、本研究で認められた病魚の鰓からは短桿菌のコロニーが優占的に確認されることはなく、一方で、いずれの個体においても鰓上皮組織の増生による二次鰓弁の棍棒化が観察された。また、腎臓の尿細管内に紫色に染色される異物が観察されたことから、腎臓や鰓の代謝に何らかの障害が生じ、浸透圧不全の状態に陥り水腫の症状を呈するようになるのではないかと考えられた。

本症の対策として、河西ら(1991)が塩水浴の効果がある症例とない症例があることを報

告している。本結果から塩水浴による治療効果は明確であったが、治療開始の遅れによる重症化などの要因で死亡状況に影響することも考えられる。一方で AsA 投与効果は、注水量を増やした試験 3 でのみ確認された。飼育環境の悪化に起因する疾病であると仮定すれば、環境の良い条件下での軽症事例では AsA の投与効果が期待できると考えられる。つまり、水腫症の早期発見が可能であれば、発症初期の軽症時に塩水浴による治療を繰り返して実施すれば十分な死亡軽減効果が期待できると思われる。一方、養殖生産現場では常に稚魚池を観察することが難しく、水腫症の発生初期を見逃してしまうことも考えられる。そのような場合には、良好な飼育環境を維持するとともに AsA の高濃度投与による対策も併用すれば、より効果的な水腫症対策になるものと考えられる。

Table 6 IHNV isolates used in this study

Isolate	Source (body weight)	Isolation year	Genogroup	Isolation locality
TK8901	Kidney of rainbow trout (37 g)	1989	U	Fish farm (Tokyo, Japan)
TV0026	Kidney of rainbow trout (33 g)	2000	JRt (Nagano lineage)*	Fish farm (Tochigi, Japan)

\* According to the phenogenetic classification by Mochizuki *et al.* (2009).

Table 7 Experimental designs of challenge tests in this study

Experimental group	Fish species	No. of fish /aquarium	Mean weight (g)	AsA* <sup>1</sup> concentrations in liver (mg/g)* <sup>2</sup>	Aquarium volume (Water supply (L/min))	Water temperature	IHNV isolate	Challenge dose (TCID <sub>50</sub> /ml)
Challenge I	Cont I			0.172				
	AsA I	50	1.23	0.335	25 L (0.6)	13.0±1.0	TK8901	10 <sup>5.8</sup>
	Cont II			0.136			IHNV	
	AsA II			0.259			TV0026	10 <sup>5.7</sup>
Challenge II	Cont III							
	AsA III	50	2.37	NM	25 L (0.6)	13.0±1.0	TK8901	10 <sup>5.8</sup>
	Cont IV						IHNV	
	AsA IV						TV0026	10 <sup>5.7</sup>
Challenge III	Cont V							
	AsA V	150	6.45	NM	100 L (1.0)	13.0±1.0	TK8901	10 <sup>5.8</sup>
	Cont VI						IHNV	
	AsA VI						TV0026	10 <sup>5.6</sup>

NM: Not measured.

\*<sup>1</sup> AsA: fed on a diet supplemented with AsA.

\*<sup>2</sup> AsA concentrations in liver were analyzed after AsA oral administration for 7 days.

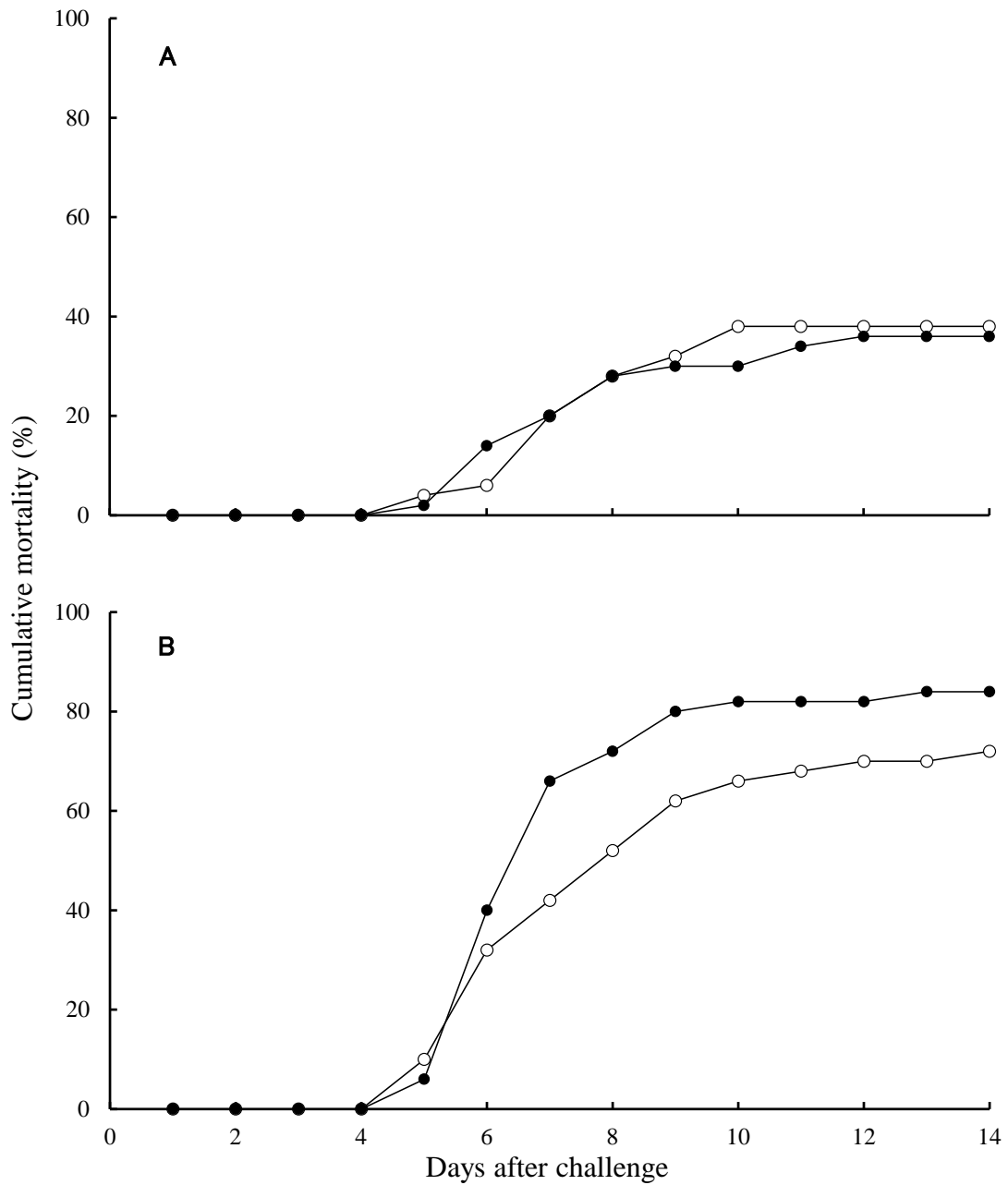


Fig. 11 Changes in cumulative mortalities of 1-g rainbow trout fed control diet (closed circles) and those supplemented with AsA 5000mg/kg diet (open circles) for 7 days followed by bath exposure to IHNV TK8901 (A) or TV0026 (B) isolates (Challenge I).



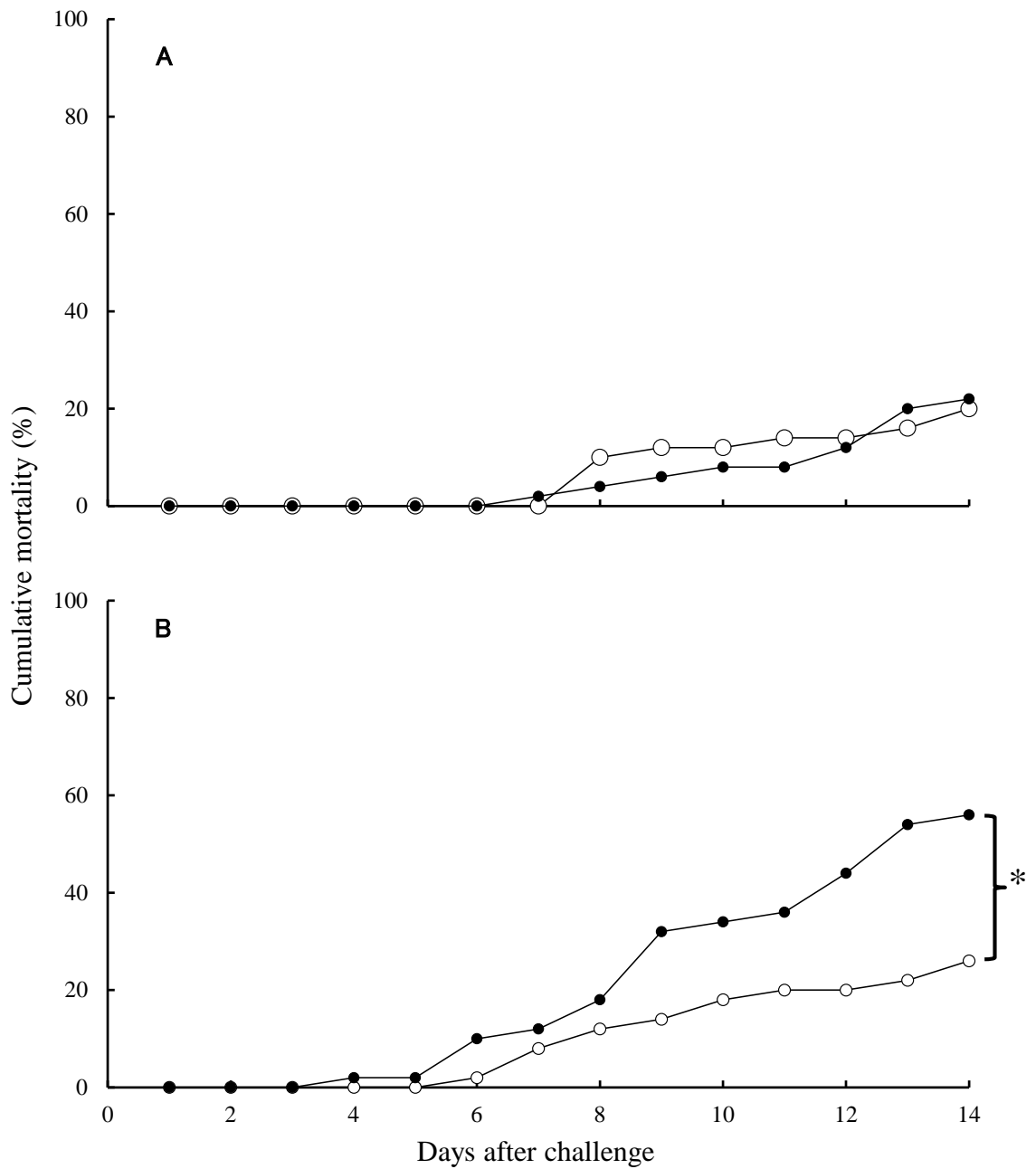


Fig. 12 Changes in cumulative mortalities of 2-g kokanee fed control diet (closed circles) and those supplemented with AsA 5000 mg/kg diet (open circles) for 7 days followed by bath exposure to IHNV TK8901 (A) or TV0026 (B) isolates (Challenge II). \*Significantly different from controls ( $P < 0.01$ ).

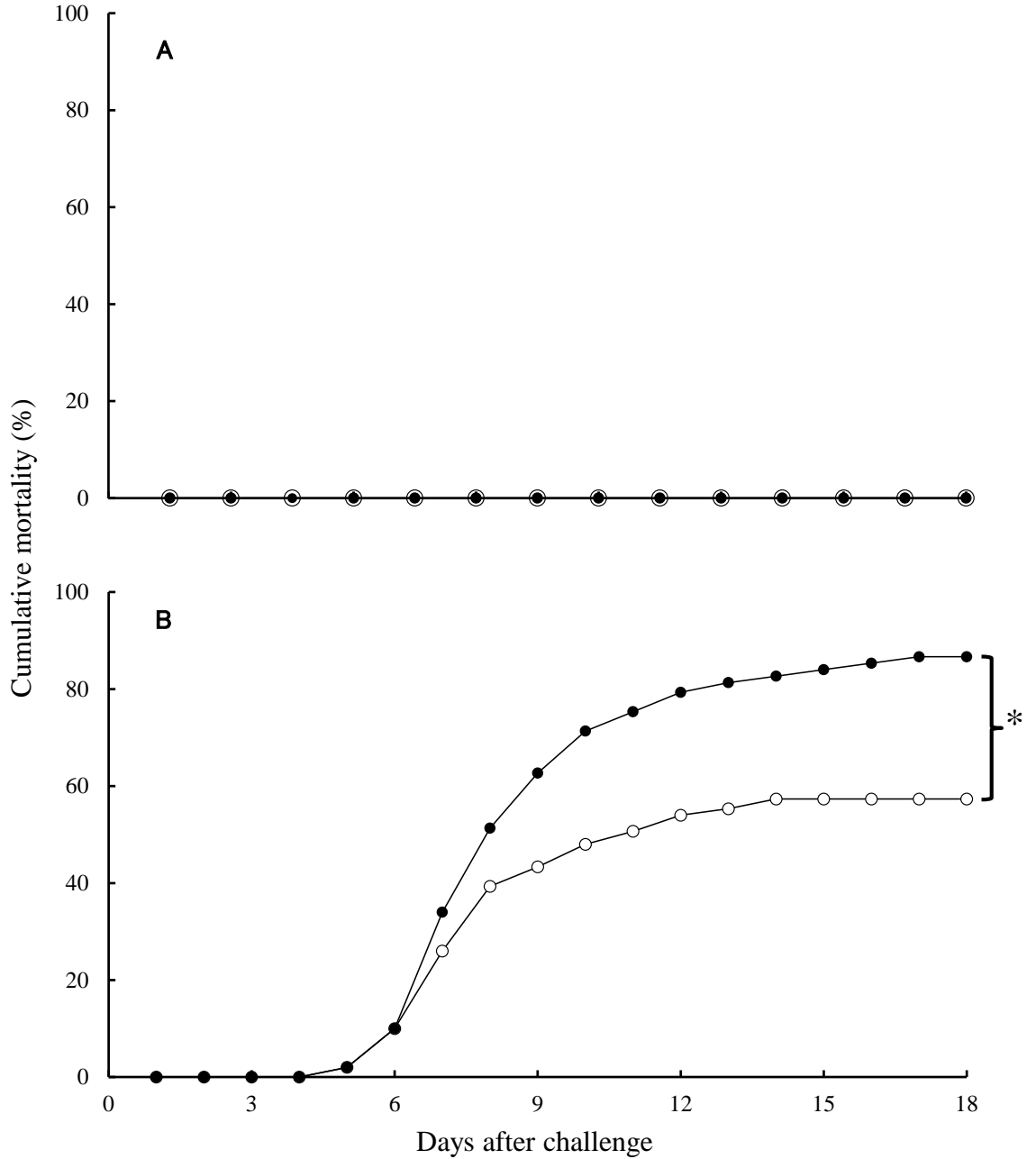


Fig. 13 Changes in cumulative mortalities of 6-g rainbow trout fed control diet (closed circles) and those supplemented with AsA 5000 mg/kg diet (open circles) for 7 days followed by bath exposure to IHNV TK8901 (A) or TV0026 (B) isolates (Challenge III). \*Significantly different from controls ( $P < 0.01$ ).

Table 8 Experimental designs of challenge tests in this study

Experimental group	Fish species	No. of fish /aquarium	Mean weight (g)	Aquarium volume (Water supply (L/min))	Water temperature	OMV isolate	Challenge dose (TCID <sub>50</sub> /ml)
Cont I		40					
Cont II	Rainbow trout	30	5.98	25 L (0.6)	14.0±1.0	RtNa0010	10 <sup>4.6</sup>
AsA I		40					
AsA II		30					

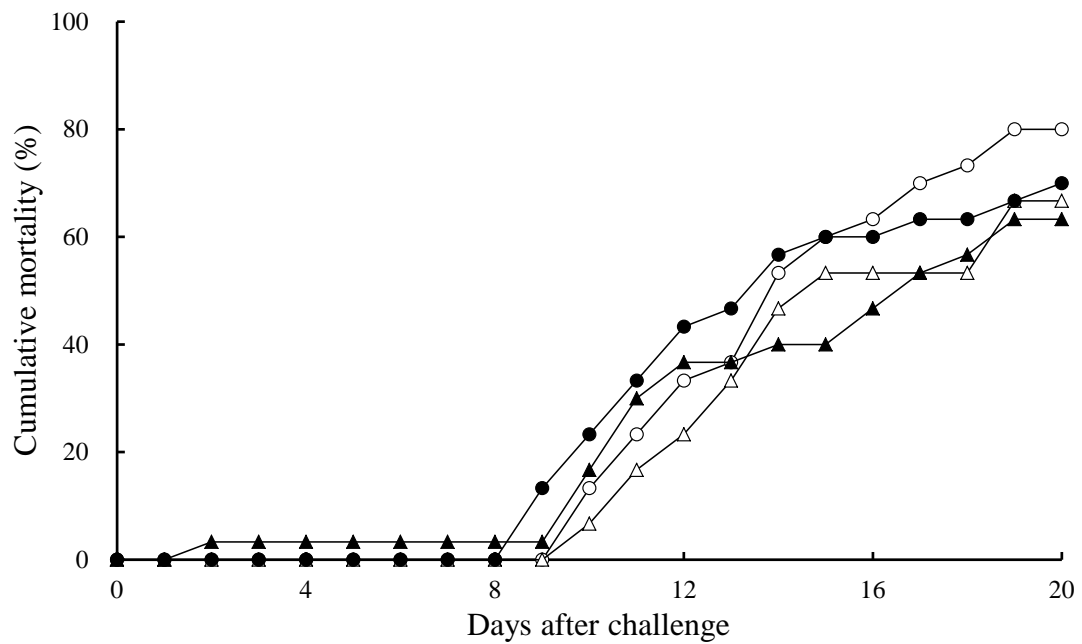


Fig. 14 Changes in cumulative mortalities of rainbow trout fed control diet (Cont I : ●, II : ▲) and those supplemented with AsA 5000 mg/kg diet (AsA I : ○, II : △) for 7 days followed by bath exposure to OMV RtNa0010 isolate.

Table 9 Experimental designs of challenge test in this study

Experiment group	No. of fish/aquarium	Mean weight (g)	Water temperature (°C)		<i>S. iniae</i> isolate	Challenge dose (cfu/ml)
			Feeding trial	Challenge test		
Cont I						
Cont II	40	11.4	13.0±1.0	17.1±0.3	TB0613	6.0×10 <sup>6.0</sup>
AsA I						
AsA II						

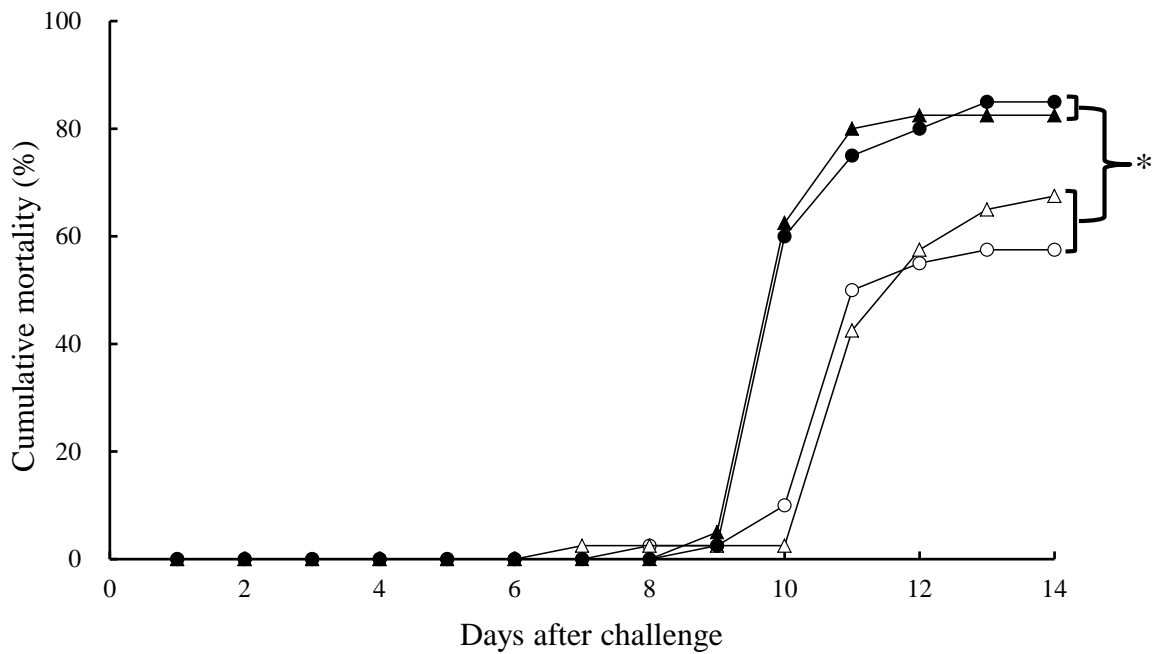


Fig. 15 Changes in cumulative mortalities of 6-g rainbow trout fed control diet (●, ▲) and those supplemented with AsA 5000 mg/kg diet (○, △) for 7 days followed by bath exposure to *Streptococcus iniae* TB0613 isolate.  
 \*Significantly different from the corresponding control groups ( $P < 0.05$ ).

Table 10 Experimental designs

Experiment s	Groups	Numbers of fish	Water supply (L/min)	AsA* <sup>2</sup> concentration in muscle (mg/g)* <sup>3</sup>	Dietary contents of AsA (mg/kg diet)	1.0% (w/v) salt water bath treatment (for 3 hours/day)
Expt. 1	Cont I	300	1.0			
	SWB* <sup>1</sup>	300	1.0	NM* <sup>4</sup>	8,857	Daily for 3 days after DJJC occurrence
Expt. 2	Cont II	300	1.0	0.146	8,857	
	AsA I	300	1.0	0.209	18,845	Not treated
Expt. 3	ContIII	300	2.0	0.133	8,857	
	AsA II	300	2.0	0.192	18,845	Not treated

\*<sup>1</sup>SWB: Treated with salt water bath.

\*<sup>2</sup>AsA: Fed on the diet supplemented with AsA.

\*<sup>3</sup>AsA concentrations in muscle were analyzed after AsA oral administration for 6 days.

\*<sup>4</sup>NM: Not measured.

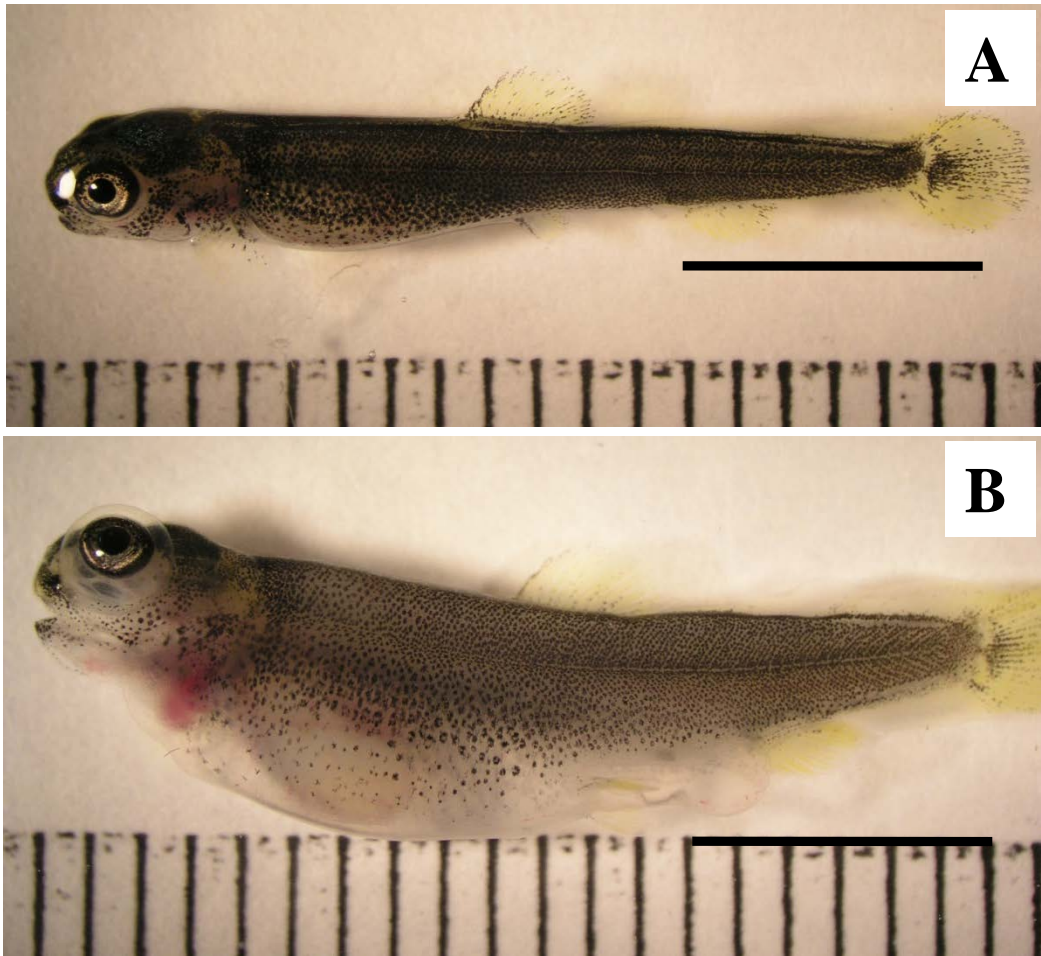


Fig. 16 Photographs of normal (A) and diseased (B) juvenile Japanese char. The affected fish (B) shows typical signs of EJJC such as ascitis, edema in the eye, popeye, and craniofacial abnormalities. Scale bars = 6 mm.



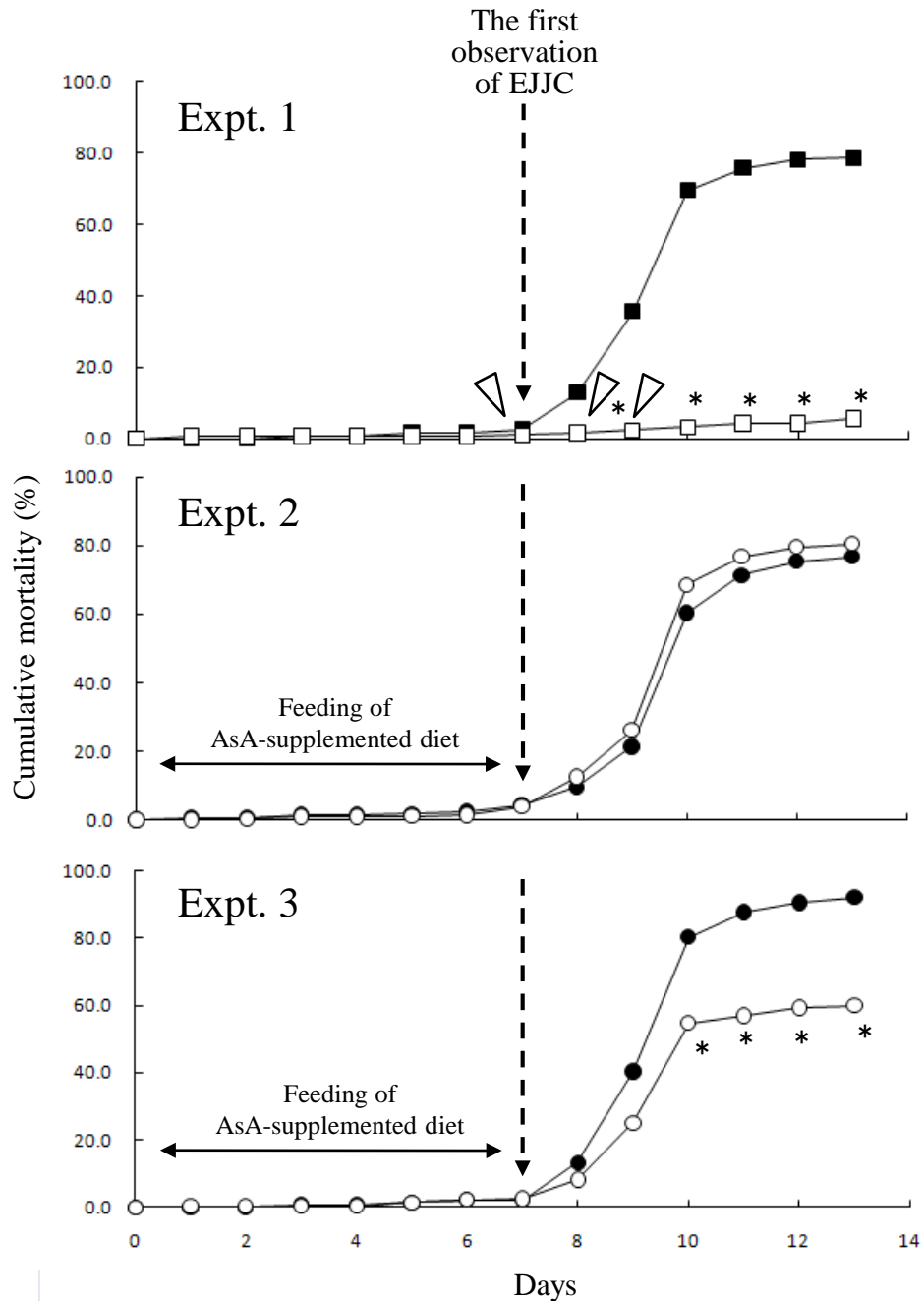


Fig. 17 Changes in cumulative mortalities of the three experiments: the effect of salt water bath treatment in the early stage of EJJC (Expt. 1: SWB □, Cont I ■), the effect of the dietary supplement of a high-concentration (10,000 mg/kg diet) of AsA (Expt. 2: AsA I ○, Cont II ●), and the effect of the AsA supplement under an increased water flow (Expt. 3: AsA II ○, Cont II ●). Arrowheads indicate the time points when the 1.0% salt water bath treatments (3 hours/day) were carried out in Expt. 1. \*Significantly different from the corresponding control groups ( $P < 0.01$ ).

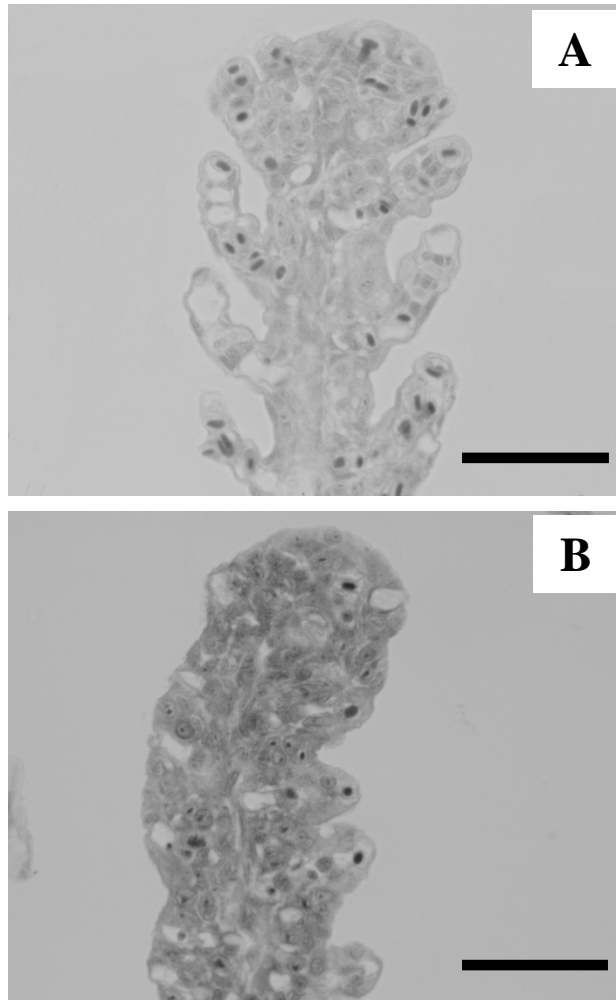


Fig. 18 Histological sections of the gills sampled from normal (A) and diseased (B) fish. The hyperplasia of the epithelium and fusion of lamellae are evident in the gill of diseased fish. Giemsa stain. Scale bars = 100 μm.

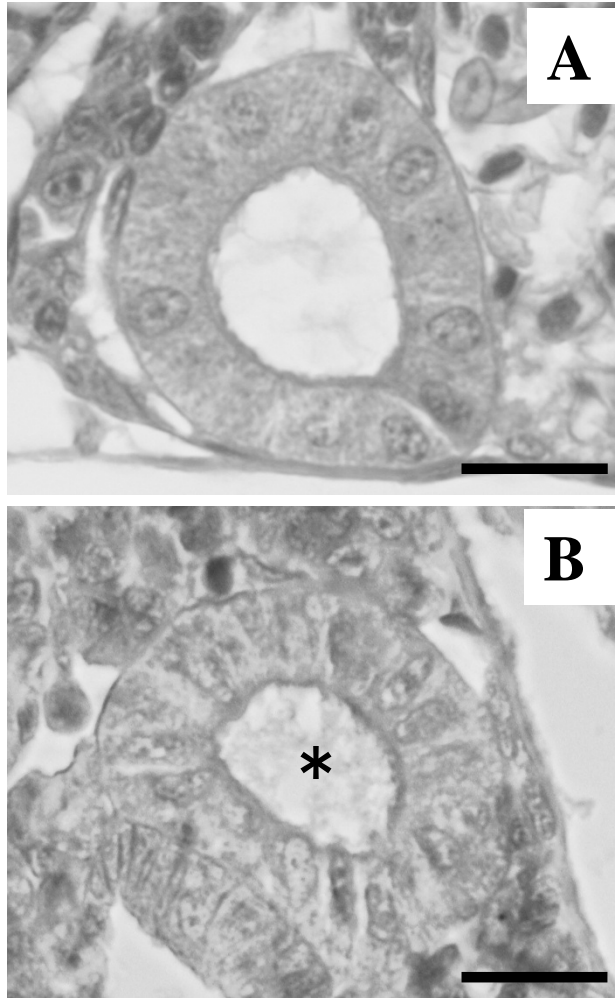


Fig. 19 Renal tubules in the kidney from normal (A) and diseased (B) fish. Violet objects (asterisk) were observed in many renal tubule of the diseased fish. HE stain. Scale bars = 50  $\mu$ m.

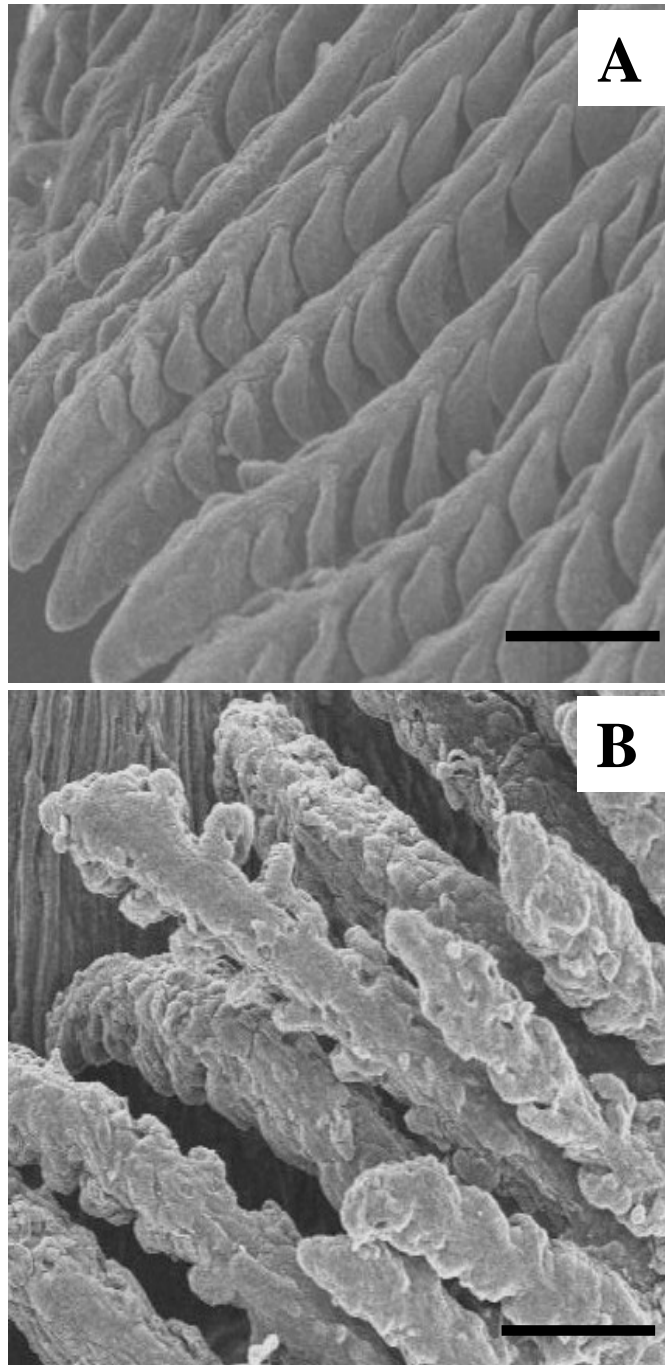


Fig. 20 Scanning electron micrographs of the gill surface of normal (A) and diseased (B) fish. Marked hyperplasia of gill epithelium was observed only in the diseased fish. Bacterial colonization was not detected on the surface of the gills. Scale bars = 200  $\mu\text{m}$ .

## 第6章 高濃度 AsA 投与がニジマスの IFN $\gamma$ 産生に及ぼす影響

### 第1節 緒言

前章では、高濃度 AsA 投与による IHN（高病原性）に対する抗病性の向上効果が確認された。一方で、その作用機序は明らかでない。魚類に限らず AsA 投与に伴う耐病性の向上と体内における免疫機能や生理活性の向上を多くの研究者が報告しているが（村田, 1980）、その機能向上と耐病性との関係が一致しないという報告もある（青島, 2005）。養殖現場においても、免疫賦活剤の投与はワクチンよりも投与効果の安定性に欠けると言われており、作用機序を科学的に明らかにし、その作用メカニズムを十分に理解した上で、有効的に利用することが望ましい。

本研究の結果、高濃度 AsA 投与によりウイルス性疾病の IHN（高病原性）に対する耐病性の向上効果が顕著に認められた。高濃度の AsA 投与は種々の細胞性免疫および液性免疫を活性化させることが知られている（村田, 1980）。その中でもインターフェロン（IFN）の産生を促進することが、マウスおよびヒト細胞を用いた *in vitro* の試験やマウスへの投与実験で確認されている（Siegel, 1974, 1975; Geber *et al.*, 1975; Dahl and Degré, 1976）。IFN は、ウイルス感染に際して動物細胞から産生・分泌されるタンパク質のうちウイルス増殖阻害因子となるもので、白血球が産生する $\alpha$ 型、繊維芽細胞が産生する $\beta$ 型、特異抗原やマイトジェンで活性化されたリンパ球が産生する $\gamma$ 型の3種に大別される（小澤, 1994）。魚類もウイルス感染時にインターフェロンを産生する事が知られており（佐野・長倉, 1982）、それを活用した疾病対策も考えられている（辻村ら, 1994）。

高濃度 AsA 投与ではニジマスのリンパ球が活性化することが報告されていることや（Verlhac and Gabaudan, 1994; Wahli *et al.*, 1998）、IHN に対して抗病性も高いニジマス群について白血球のナチュラルキラー（NK）活性が関与するという報告もあることから（望月ら, 2007）、本章では IFN のうちリンパ球で産生される IFN $\gamma$  に着目した。IFN $\gamma$  はリンパ球のうち、主に T 細胞やナチュラルキラー（NK）細胞から分泌され、抗ウイルス効果のほかにも抗腫瘍効果、マクロファージ・NK 細胞の活性化および免疫応答調節の機能も持つ（辻, 2005）。魚類の IFN $\gamma$  においても、数魚種で遺伝子が単離され、ほ乳類と同じエク

ソン/イントロン構造であることが確認されているが、哺乳類と異なり複数のアイソフォームの存在も明らかとなっている (Robertson, 2006)。

本章では、ニジマス血中の IFN $\gamma$  濃度を測定するためにニジマス IFN $\gamma$  のアイソフォーム 1 の遺伝子組換え体を作成した。そして、同組換え体を抗原とした特異抗体を得て、ELISA 法による測定系を構築し、前章までで多くの有効性が確認された高濃度 AsA (5,000 mg/kg diet) を投与したニジマスの血中における IFN $\gamma$  濃度と体内の AsA 含有量の相関性を検討した。また、同抗体を用いた免疫染色により、脾臓、鰓および腎臓の IFN $\gamma$  産生細胞の局在状況を観察した。これらの結果をまとめ、高濃度 AsA 投与に伴うウイルス性疾病である IHN に対する耐病性向上効果に関する作用機序を推察した。

## 第 2 節 材料および方法

### 1. ニジマス血中 IFN $\gamma$ 量の ELISA 法による測定系の確立

#### 1) ニジマス IFN $\gamma$ の遺伝子組換え体 (rIFN $\gamma$ ) を作出

ニジマス IFN $\gamma$  に対する特異抗体を作製するために IFN $\gamma$  遺伝子組換え体 (rIFN $\gamma$ ) を作出した。すなわち、国立遺伝学研究所 DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) のデータベースに登録された情報に基づきニジマス IFN $\gamma$  アイソフォーム 1 の塩基配列を決定し、発現ベクター (pET-16b) に導入後、大腸菌 *Escherichia coli* (BL21) DEpLysS に形質転換させた。本大腸菌を IFN $\gamma$  遺伝子組換え大腸菌として、使用時まで -80°C で凍結保存した。なお、本菌の培養には LB Broth Lennox (Difco) にアンピシリン (Sigma-Aldrich) を終濃度で 100  $\mu$ g/mL となるように添加した培地 (LB/amp) を使用した。

遺伝子組換え体の発現誘導は、-80°C で凍結保存した遺伝子組換え大腸菌を白金耳で LB/amp 培地 100mL に接種し、37°C で一晩振とう培養した後、1L の LB/amp 培地の入った 2L バッフル付フラスコに全量移した。引き続き 37°C で振とう培養させながら経時的に菌液を採取し、マイクロプレートリーダー (iMark Microplate Reader、Bio-Rad もしくは WPA Biowave、FUNAKOSHI) を用いて波長 595nm の吸光度を測定した。吸光度が 0.5 以上に達したのを確認した後、発現誘導剤として最終濃度が 0.1mM となるよ

うにイソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノシド(Wako)を培地に添加し、37°Cで更に4時間振とう培養を行った。冷却遠心機(himac CR22F、HITACHI)を用いて全菌液を遠心分離(3000×g、4°C、15分)し、上清を除去した後、適量の150mM NaClを含むpH7.4の10mMリン酸緩衝液(PBS)を加えて懸濁させた。小型遠心分離機(5910、KUBOTA)を用いて遠心洗浄(3000×g、4°C、10分)を繰り返して3回行った後、湿菌重量を測定した。湿菌重量に対し10倍量(w/v)のpH7.4に調整したWash buffer(0.5M NaClおよび0.1M イミダゾールを含む20mM PBS)にプロテアーゼインヒビター(Roche)を添加を加えて菌懸濁液とし、-80°Cで凍結、30°Cで融解する操作を3回繰り返した。次に、超音波破碎機(ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201、TOMY)を用いて約1分間の超音波破碎を行い、その後に終濃度0.1%となるようにTrion X-100(Wako)を添加し、氷上で30~60分間静置した。冷却遠心分離機(EX-136、TOMY)を用いて遠心分離(8000×g、4°C、30分)後、得られた上清は0.80および0.45 μm ディスポーザブルシリンジフィルターユニット(ADVANTEC)で順番に濾過したものを可溶性画分として使用した。また沈殿物はボルテックスミキサーで混合した後、マイクロピペットで約50~100 μLを1.5mL マイクロチューブに移し、10倍量のWash bufferで懸濁したものを不溶性画分とした。なお、両画分ともに直ちにSDS-PAGE解析による発現確認に供した。

可溶性および不溶性画分に含まれるタンパク質濃度は、Bradford法を用いて測定した。検量線作成のため、ウシ血清アルブミン(BSA、Wako)を0.50、0.10、0.25および0.50mg/mLの濃度に調製し、フラット型マイクロタイタープレート(Nunc)に10 μL/wellとして分注した。同様にWash bufferで段階希釈した可溶性または不溶性画分を試料として加えた。次に、蒸留水で5倍希釈したProtein assay Dye Reagent(Bio-Rad)を100 μL/well加えて、15~30分室温で反応させた後、マイクロプレートリーダーを用いて波長595nmで吸光度を測定し、BSAより得た検量線に基づきタンパク質濃度(mg/mL)を算出した。なお、検量線および試料は2wellずつ測定を行い、その平均値を使用した。

さらに、得られた可溶性画分、不溶性画分、およびPBSで懸濁した発現誘導剤非添加のニジマスIFN $\gamma$ 遺伝子組換え大腸菌(陰性コントロール)を用いて、Laemmli (1970) の

方法に基づきSDS-PAGE解析を行った。すなわち、タンパク質濃度を調整して統一した上記試料を0.2mLチューブに移し、終濃度で10%となるように 2-メルカプトエタノール(Wako) を添加した2×Sample buffer(0.25M Tris-HCl、4%SDS、10%スクロース、0.1%BTB)を試料と等量加え、3分間煮沸し、泳動用試料とした。事前に作製した15%SDS-PAGEゲルに泳動用試料を10 $\mu$ Lアプライし(1試料につき2レーン以上)、濃縮ゲル20mA、分離ゲル40mAの条件で電気泳動した。の条件で泳動した。なお分子量マーカー(5 $\mu$ Lアプライ)には、Broad Range 7 Protein Molecular Weight Makers (Promega)、Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad)、タンパク質分子量マーカー II (TEFCO)、またはProtein Molecular Weight Maker Broad (TaKaRa)を用いた。常法に従い、Coomassie Brilliant Blue (CBB) 染色を行った後、パソコンのスキヤナーで泳動画像を取り込み、バンド像の比較および移動距離により目的とした発現タンパク質の発現確認および分子量を求めた。

前述の電気泳動において可溶性もしくは不可溶性画分で認められたバンドが目的とした遺伝子組換え体であることを確認するため、ウエスタンブロッティングを行った。一次抗体にはAnti-His antibody (Recenttec)、二次抗体にはPolyclonal Goat Anti-Mouse IgG / HRP (KPL)、転写膜にはPVDF膜(GE Healthcare)を、PVDF膜はゲルのひと回り大きめに切り出し、メタノールに10秒浸漬した後、滅菌蒸留水で3~4回洗浄し、転写バッファー(192mM Glycine、25mM Tris、20%メタノール) に10分以上浸したものをを用いた。また、ろ紙(Bio-Rad) はゲルが収まる程度の大きさに切りだし、転写バッファーに十分浸したものをを使用した。

泳動後のゲルは切り出した後、転写バッファーに10~20分浸し、トランスブロットSDセルセミドライブロッティング装置(Bio-Rad) に、ろ紙、PVDF膜、ゲル、ろ紙の順に気泡が入らないように重ね転写 (15V、2mA/cm<sup>2</sup>、20分) した後、同膜を取り出して終濃度0.1%のTween20を添加したPBS (PBS-T) による洗浄を10分間のうちに3回行った。5%量のスキムミルクを加えたPBS-Tをブロッキング溶液としてPVDF膜に添加し、4 $^{\circ}$ Cで一晩ブロッキングを行った後、PBS-Tで10分間のうちに3回の洗浄を行い、同ブ



ロッキング液で10,000倍に希釈した一次抗体を加え、4°Cで一晩反応させた。再びPBS-Tで10分のうちに3回洗浄した後、同ブロッキング液で2,000倍に希釈した二次抗体を添加し、室温で1時間反応させた。なお、一次抗体および二次抗体の添加量はPVDF膜1枚あたり約10mLとし、タッパー内で反応させた。PBS-Tで10分のうちに3回洗浄後、直前に調製したDAB溶液(0.2% 3-3'ジアミノベンジジン四塩酸塩、50mM Tris-HCl) を3~4滴PVDF膜に滴下し、室温で反応させた。目的としたバンドを視認した後、同膜を蒸留水中に浸し反応を停止させた。風乾後、マーカー部分は切り離し、アミドブラック溶液(40%メタノール、10%酢酸、0.1%アミドブラック)を用いて染色を行った。

SDS-PAGEおよびウエスタンブロットティングによる発現確認の結果、IPTG誘導していないネガティブコントロールとバンドパターンを比較したところ、不溶性画分において20kDa付近に特異的なバンドが認められ(Fig. 21)、His-tag抗体を用いたウエスタンブロットティングでは両画分(可溶性画分で2本および不溶性画分において4本)にバンドが検出された。SDS-PAGEにおける特異的なバンドが検出されたことから(Fig. 22)、同バンドがIFN $\gamma$ であることを確認した。同バンドの推定分子量は、分子量マーカーの移動距離から算出した検量線に当てはめ算出した結果、20kDaであった(Fig. 23)。

SDS-PAGE解析の結果、目的とした誘導組換え体(IFN $\gamma$ )が不溶性画分(封入体)に認められたため、不溶性画分約5gに8M Ureaを含むWash buffer 1Lを加えて懸濁させる事により可溶化し、ローテートミキサー(NISSIN)を用いて4°Cで4時間以上転倒混和を行い、0.80および0.45 $\mu$ mの順でフィルター濾過を行ったものをアフィニティークロマトグラフィーによる精製に用いた。すなわち、可溶化した試料に適量のNi-NTA Agarose (QIAGEN)を加え、4°Cで4時間~一晩転倒混和した。オープンカラム(Poly-Prep Chromatography Columus) に試料をアプライし、8M Urea含有Wash buffer100~150mL洗浄した後、pH7.4の8M Urea含有Elution buffer (0.5M NaClおよびイミダゾールを含む20mM PBS)で溶出し、1.5mLチューブに1mLずつ各フラクションを回収した。回収したフラクションは、前述の手法でタンパク質濃度を測定した。タンパク質の溶出が確認されたフラクションについても前述と同様の手法でSDS-PAGE解析を行った。なお各

サンプルのアプライ量は5 $\mu$ lとし、20mAの定電圧で電気泳動した。得られた泳動バンドが目的とした遺伝子組換え体であることを確認するため、前述と同様の手法でウェスタンブロッティングを行った。タンパクの溶出が確認されたフラクションにおいて、20kDa付近にシングルバンド(最も多いフラクションで0.3~0.4mg/mLのタンパク質量)が検出された。タンパク溶出量が多く認められたフラクションNo.1および2をウェスタンブロッティングした結果では、2~5本のバンドが検出されたが20kDa付近に最も反応性の強いバンドが認められ、今回のアフィニティークロマトグラフィーにより溶出されたタンパク質がIFN $\gamma$ であることを確認した(Fig. 24)。次に、透析によるIFN $\gamma$ 精製のため、目的とした組換え体が含まれていたフラクション3~4mlを透析膜(ダイアライシスマンブレン サイズ20、Wako)に移してクローサーで閉じ、4 $^{\circ}$ Cの6M Urea含有2 $\times$ PBS 1Lの中でゆっくりと震とうさせた。以後、約4時間~一晩おきに0.5Mアルギニンを含む2 $\times$ PBSを用いてUreaの濃度を4.0M、2.0M、1.0M、0.5Mの順に希釈し、最終的に0.5Mアルギニン入り2 $\times$ PBSに置換した。全試料1.5mLチューブに移して遠心分離(10000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、3分)後、上清を孔径0.45 $\mu$ mメンブレンフィルターで濾過した。これをrIFN $\gamma$ 抗原として、タンパク質濃度を測定した後、タンパク質低吸着凍結保存チューブ(N-50086、Hitec)中で抗体作製時まで4 $^{\circ}$ Cで保存した。

## 2) 抗ニジマス IFN $\gamma$ ポリクロナール抗体の作製

1)で作製した rIFN $\gamma$  をウサギに接種し、抗ニジマス IFN $\gamma$  ポリクロナール抗体を作製した。すなわち、抗原動物には生後 8 週目の実験用ウサギ(ニュージーランドホワイト種) 2 羽を用いて、飼育管理は日本大学動物実験運営内規に沿って実施した。初回免疫では rIFN $\gamma$  抗原 150 $\mu$ g および ADJUVANT COMPLETE FREUND (DIFCO) を 1:1.1(v/v) の割合でそれぞれガラスシリンジにとり、三方活栓で連結して 30 分程度混合した後、同混合液をウサギの背中側から 1 羽につき 3~4 回にわけて数カ所に皮下注射をした。2 回目の免疫以降は、抗原 100~150 $\mu$ g を ADJUVANT INCOMPLETE FREUND (DIFCO) と 1.0:1.1 の割合で混合し、初回と同様の手順での追加免疫を計 5 回行い、計 6 回の

免疫を行った。なお初回免疫時および追加免疫前にウサギの耳から 0.5~1.0mL 程度採血をし、抗体価測定に使用した。採取した血液は一晚 4°C で静置した後、遠心分離 (3,000g、4°C、30 分) することで血清を採取し、-80°C で凍結保存した。抗体価の上昇および抗体特異性を確認後、本採血を行った。まずウサギ 2 羽の体重を測定し、体重に対して 25mg/kg となるようにソムノペンチル (共立製薬株式会社) をシリンジにとり、耳から接種することで麻酔を行なった。麻酔の効きは眼瞼反射により確認した。麻酔確認後、心臓から本採血を行った。血液は 50mL 遠沈管複数本に採取し、37°C で約 1 時間静置した後、4°C で一晚静置して遠心分離 (3,000×g、4°C、30 分) し、その上清を回収して抗血清とした。抗血清は非働化(56°C、30 分)を行い、終濃度が 0.02% となるようにアジ化ナトリウムを添加して、タンパク質低吸着チューブに 1mL ずつ分注し、-80°C で凍結保存した。抗体精製時にはこれらを 1 本ずつ 4°C で解凍して用いた。

抗体価の測定は、インダイレクト ELISA 法により実施した。すなわち、1)において精製した rIFN $\gamma$  抗原を pH 9.6 の Coating buffer (炭酸ナトリウム 1.59g、炭酸水素ナトリウム 2.93g、蒸留水 1L) により 1 $\mu$ g/mL の濃度になるように調整し、ELISA 用 96well フラット型マイクロタイタープレート(MaxiSorp、Nunc) に 50 $\mu$ L/well 分注して 4°C で一晚固相化させた。次に、PBS-T で 3~4 回洗浄した後、5%のスキムミルクを加えた PBS-T をブロッキング溶液として 100 $\mu$ L/well 分注し、ブロッキングとして室温で 2 時間インキュベートした。PBS-T で 3~4 回洗浄した後、PBS-T で 10~100,000 倍に段階希釈した前血清または抗血清を 50 $\mu$ L/well 加え、室温で 1 時間反応させた。PBS-T で 3~4 回洗浄後、PBS-T で 2,000 倍に希釈した Anti-rabbit IgG antibody/HRP(P0448、Wako) を 50 $\mu$ L/well 加え、室温で 45~60 分間反応させた。PBS-T で 3~4 回洗浄後、直前に調整した pH 5.0 の発色溶液(0.1M クエン酸、0.2M リン酸二ナトリウム、0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、ABTS) を 50 $\mu$ L/well 加えた。室温で 10 分~20 分反応させ、発色を確認後、マイクロプレートリーダーを用いて測定波長 405nm の吸光度を測定した。

抗体特異性は、ウエスタンブロッティングによる吸収試験にて確認を行った。ブロッキング溶液で抗原濃度が 0、0.01、0.1、1、または 10 $\mu$ g/mL となるように希釈した抗

原溶液5mLに、5 $\mu$ Lのウサギ抗血清(1,000倍希釈量)を加えて、1~2時間ローテーターを用いて転倒混和させた。これを一次抗体として反応を行い、目視によりバンドの有無を確認した。Bradford法にてタンパクの溶出が確認されたフラクションにおいて、20kDa付近にシングルバンドが検出された。タンパク溶出量が多く認められたフラクションNo.1および2をウエスタンブロッティングした結果では、2~5本のバンドが検出されたが20kDa付近に最も反応性の強いバンドが認められ、今回のアフィニティークロマトグラフィーにより溶出されたタンパク質がIFN $\gamma$ であることを確認した(Fig.25)。これらの各フラクションをプールし、透析により精製したものをrIFN $\gamma$  (最終タンパク質収量約0.05mg/mL) として免疫抗原に用いた。

### 3) indirect ELISA 法による IFN $\gamma$ 測定系の確立

条件検討のサンプルにはニジマスの血漿サンプルを用いて行った。Coating bufferにて10、20、40、80、160、320、640、および1280倍に希釈した血漿を一晩固相化した。一次抗体として前述行程にて作製した抗IFN $\gamma$  ポリクローナル抗体(抗IFN $\gamma$ 抗体)を、PBS-Tにて100倍、500倍、1,000倍、および5,000倍に希釈して室温で1時間インキュベートした。二次抗体には2,000倍希釈したAnti-rabbit IgG antibody/ HRPを用い測定を行った。得られた吸光度より、一次抗体の最適希釈率を決定した。

検量線の作成のため、抗原としてrIFN $\gamma$ をCoating bufferを用いて50、10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、および0.0001 $\mu$ g/mLとなるように希釈し、一晩固相化した。一次抗体には100倍希釈した抗rIFN $\gamma$ ポリクローナル抗体、二次抗体として2,000倍希釈したAnti-rabbit IgG antibody/ HRPを用いて測定を行い、得られた吸光度より検量線を作成した。一次抗体は希釈率100倍にて濃度依存的にもっとも高い吸光度(OD<sub>405nm</sub>=0.04~0.06)を示し、希釈率500倍以上では血漿サンプルの濃度に関わらずいずれも吸光度は0.02~0.03の範囲で低い数値を示した。よって、一次抗体は100倍希釈、測定試料(血漿)は最も高い吸光度を示した10倍希釈とし、以後の測定を行った。なお、rIFN $\gamma$ 抗原を固相化して検量線を作成したところ、濃度依存的な吸光度の増加が認

められ、ELISA測定値と抗原濃度の相関性が確認された(Fig. 26)。

## 2. AsA 投与ニジマスの血中 IFN $\gamma$ 量の測定と組織局在性の観察

### 1) 供試魚

群馬県水産試験場川場養鱒場で採卵・育成されたニジマス（平均体重 23.2 g）を供試した。

### 2) 飼育試験

前章と同様の手順で AsA 投与区および対照区を設定した。すなわち、3,000L ヨーロピアンタイプの循環式 FRP 水槽（水温 13~14°C）に網生け簀（70×60×50cm）を浮かべ、供試魚を 30 尾/区画の密度で収容し、前章と同様の手順で飼育を行った。なお、給餌量は魚体重の 2.0%の割合で実施した。

サンプリングは、試験開始直前、試験飼料給餌 1、3、5 および 7 日後まで合計 5 回行い、各回ともに供試魚を 5 尾取り上げ、血中 IFN $\gamma$  量測定用の血液を採血し、AsA 含有量の試料および IFN $\gamma$  産生細胞の局在を確認するための試料として、それぞれ肝臓、脾臓、鰓、腎臓を解剖により摘出した。肝臓は直ちに-80°Cで冷凍し、AsA 含有量の測定まで保存した。その他の臓器はブアン液で固定し、固定後は 70%エタノールで保存した。

### 3) 分析手法

肝臓組織の AsA 含有量は、前章と同様の手順で HPLC を用いて測定した。

血中 IFN $\gamma$  量は、1. で構築した indirect ELISA 法により測定した。すなわち、Coating buffer にて 10 倍に希釈した血漿サンプルを ELISA プレートに 1 サンプル当たり 3 well とし、50 $\mu$ L/well 分注し、4°Cで一晩固相化させた。PBS-T 150 $\mu$ L/well で 3 回洗浄後、終濃度 5%のスキムミルクを加えた PBS-T をブロッキング溶液として 100 $\mu$ L/well 分注し、2 時間・室温でインキュベートする事によりブロッキングを行った。PBS-T 150 $\mu$ L/well で 3~4 回洗浄後、PBS-T で 100 倍に希釈した抗 rIFN $\gamma$  ポリ

クローナル抗体を 50 $\mu$ L/well 加え、1 時間・室温で反応させた。PBS-T で 3~4 回洗浄後、PBS-T で 2,000 倍に希釈した Anti-rabbit IgG antibody/HRP を 50 $\mu$ L/well 加え、1 時間・室温で反応させた。PBS-T で 3~4 回洗浄後、直前に調整した発色溶液(pH 5.0; 0.1M クエン酸, 0.2M リン酸二ナトリウム, 0.05% $H_2O_2$ , ABTS, 蒸留水で調整: % は終濃度)を 50 $\mu$ L/well 加えた。室温で 30~60 分反応させ発色を確認後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度(測定波長 405nm)を測定した

臓器の IFN $\gamma$  産生細胞の局在は、パラフィン薄切組織切片の免疫組織化学染色法による顕微鏡観察によりおこなった。すなわち、ブアン液で固定された各組織から常法に従い作製したパラフィン薄切組織(厚さ 4 $\mu$ m)を Poly-L-lysine(Sigma)を塗抹したスライドガラス上に切り出した切片を伸展後、乾燥させて次の免疫組織化学染色に用いた。免疫組織化学染色は、Avidin-Biotin Complex(ABC)法により行った。すなわち、薄切組織を貼付したスライドガラスを脱パラフィン(キシレン 15 分 $\times$ 2 回)および水和(無水、100%、90%、70%エタノール各 5 分)を行い、2 分間の流水洗浄後、ブロッキング溶液(1% BSA 加 PBS)をスライドガラス上に滴下して、室温で 30 分間インキュベートした。その後、PBS で 5 分間のうち 3 回の洗浄し、一次抗体としてブロッキング溶液により 100 倍に希釈した抗 rIFN $\gamma$  ポリクローナル抗体を組織上に滴下し、室温で 1 時間反応させた。さらにその後、PBS で 5 分間のうち 3 回洗浄をし、二次抗体としてブロッキング溶液で 2,000 倍に希釈した Anti-rabbit IgG antibody/Biotin(VECTOR)を組織上に滴下し、室温で 1 時間反応させた。反応後、PBS で 5 分間のうち 3 回洗浄し、VECTASTAIN Elite ABC 試薬(Vector Laboratories)を用いて室温で 30 分間反応させた。さらに反応後、PBS で 5 分間のうち 3 回洗浄し、直前に調製した DAB 溶液(0.2% 3-3'ジアミノベンジジン四塩酸塩含有 50mM Tris-HCl)を滴下し、室温で反応させた。顕微鏡下で発色を確認後(5~15 分)、蒸留水で数秒洗浄することで反応を止め、Mayer のヘマトキシリンを用いて 30 秒間の対比染色を行った。10 分間の流水洗浄後、脱水(70%、90%、100%、無水エタノール各 5 分)および透徹(キシレン 5 分 $\times$ 2 回)処理した。組織はエンテランニュー(MERCK)を用いて封入し、光学顕微鏡で観察した。なお、各抗体反応、ABC 反応お

よび発色反応時の溶液の滴下量は1スライド当たり100 $\mu$ Lとし、滴下後は溶液の乾燥を防ぐため、スライドガラス上にパラフィルムをかぶせて湿潤チャンバー内で反応させた。

#### 4) 統計解析

肝臓のAsA含有量および血中IFN $\gamma$ 量は、Mann-WhitneyU検定により対照区との有意性を比較した ( $P<0.05$ )。

### 第3節 結果

#### 1. ニジマス血中IFN $\gamma$ 量のELISA法による測定系の構築

抗体濃度および吸光度の関係を数式化したところ、 $y=0.0682x+0.2352$   $R^2=0.9977$ となり、IFN $\gamma$ 濃度と吸光度との間に高い相関性が認められた (Fig. 26)。

#### 2. AsA投与ニジマスの血中IFN $\gamma$ 量の測定と組織局在性の観察

AsAを高濃度投与した試験区では、肝臓組織のAsA含有量は速やかに上昇し (Fig. 27)、血中IFN $\gamma$ 量も投与1日後から対照区と比較して有意な増加が確認された (Fig. 28)。

また、抗rIFN $\gamma$ ポリクローナル抗体を用いてIFN $\gamma$ 産生細胞の検出を行なったところ、肝臓および腸管では対照区およびAsA区の両区において陽性細胞が僅かに認められたものの、両区の間には差はみられなかった。一方、脾臓組織では両区ともに陽性細胞がみられ、AsA投与区では投与3および5日後において実質部 (組織中央部) に強い反応性を示す陽性細胞の増加が確認された (Fig. 29)。これらの組織に対してヘマトキシリンによる対比染色を行わない免疫組織化学染色を実施したところ、特にAsA区の組織中央部において強い反応性を示す細胞が検出され (Fig. 30)、AsA投与により脾臓組織中のIFN $\gamma$ 産生細胞が誘導または同細胞の発現が亢進した可能性が強く示唆された。また、鰓組織においても両区ともに陽性細胞が確認され、投与後5日後のAsA区においては特に強い反応性が観察され、脾臓組織と同様の傾向が認められた (Fig. 31, 32)。腎臓組織でもAsA投与1日後よりAsA

区では実験期間を通じて Cont 区よりも尿細管を含む組織全体に強い反応性が観察された (Fig. 33)。

#### 第4節 考察

近年、抗ウイルス因子に着目した魚類の耐病性向上機構の解明は徐々に知見が集積されており、天然生薬や二本鎖 RNA ウイルスあるいは Poly(I:C)により IFN が誘導される抗ウイルス因子である IFN を活用したウイルス性疾病の予防技術に関する研究が進められている (吉水, 2012)。また、高濃度 AsA 投与により、魚類の免疫機能に関連した指標の向上についても多くの報告がある (Verlhac and Gabaudan, 2005)。本研究においても高濃度 AsA の投与により抹消血中の IFN  $\gamma$  量の有意な増加が確認され、前章で認められたウイルス性疾病である IHN に対する抗病性の向上効果を合わせ考えると、AsA を高濃度投与されたサケ科魚類では速やかに抗ウイルス産生細胞の活性化が誘導されているものと推察された。

血中 IFN  $\gamma$  量の動態を詳細にみると、AsA 高濃度投与の1日後から対照区に対して有意な上昇を示し (Fig. 28)、産生細胞も鰓や脾臓で投与3および5日後までに増加する傾向が観察された (Fig. 29-33)。AsA 投与による IFN の誘導はヒトでは古くから知られており (Siegel, 1974, 1975; Geber *et al.*, 1975; Dahl and Degré, 1976)、本結果から魚類のニジマスにおいても同様の作用が存在し、高濃度 AsA 投与による体内 IFN  $\gamma$  量の増加が IHN (高病原性) に対する抗病性向上の一因であると強く示唆された。また、IHN の耐病性向上に関与する要因として白血球の NK 活性向上の関与を推測した報告もあることから (望月ら, 1997)、IFN  $\gamma$  が直接的に抗ウイルス作用を発揮するよりは、間接的に体内に侵入したウイルスを防御している可能性も十分考えられる。

IHN の原因ウイルスである IHNV は1本鎖の RNA ウイルスであり、感染後の体内における IFN の速やかな誘導は期待できないことから、IHN 発症前に高濃度の AsA を投与することにより体内の IFN  $\gamma$  量を増加させ、それに伴う体内免疫機能を向上させることが疾病対策として重要であると考えられる。また、同じウイルス性疾病でも OMVD に対しては投与効果が観察されなかったことは、ウイルスによりターゲット器官が異なることから、



肝臓や体表に障害性のある OMVD に対して、鰓への障害性が強い IHN は、高濃度 AsA 投与により鰓組織で IFN $\gamma$  産生細胞が増加しウイルス抵抗性が強化されたことに強く関連しているものと推測された。

なお、魚類の IFN にはアイソフォームが存在しており、サケ科魚類でも二つのアイソフォームの存在が知られている。その相違性からみて、本研究で作出した特異抗体は、その識別はできないものと考えられ、リアルタイム PCR などによる解析を平行して進めることで、高濃度 AsA により誘導される主要な IFN $\gamma$  を特定することが今後の課題といえよう。

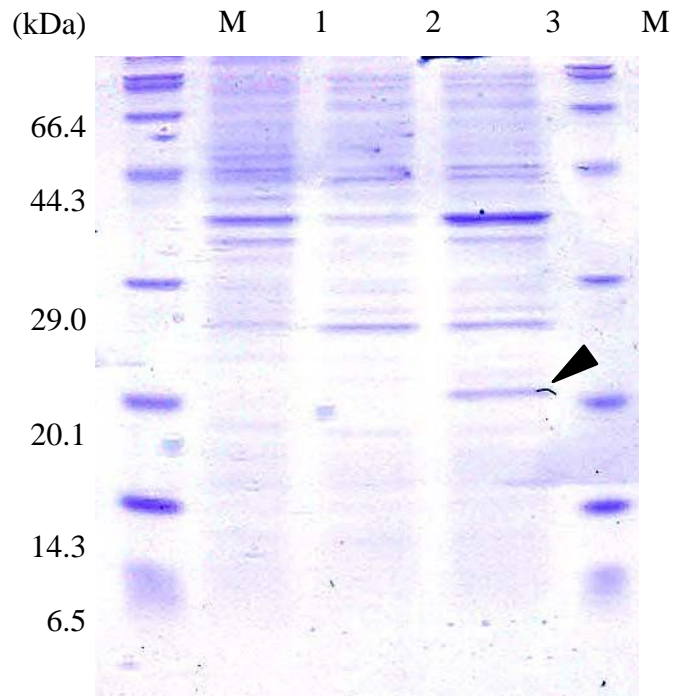


Fig. 21 SDS-PAGE (15%) of whole-cell lysates from *E. coli* BL21 mutants transformed with plasmid pET-16b containing 543bp insert from IFN $\gamma$ 2 in rainbow trout. A unique band was observed in insoluble fraction extracted from *E. coli* BL21 transformed with plasmid pET-16b vector (lane 3) .

M : Marker (Protein Molecular Weight Maker Broad ; TAKARA).

1 : IPTG (-).

2 : Supernatant (Soluble fraction).

3 : Precipitation (Insoluble fraction; Inclusion bodies).

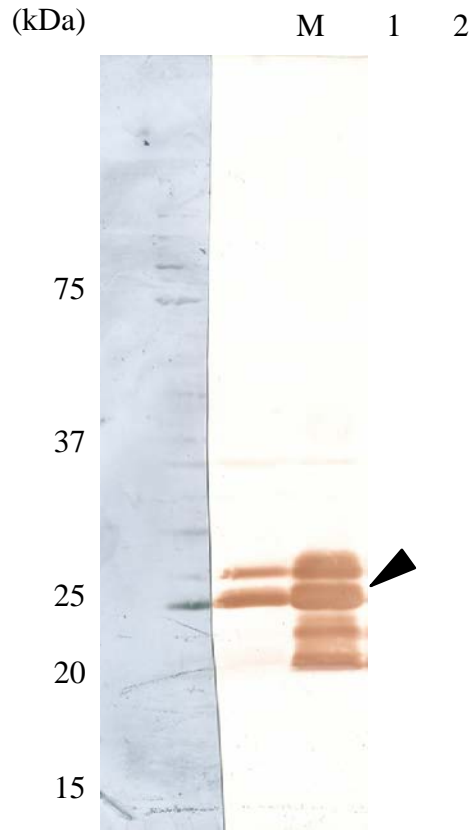


Fig. 22 Western blotting analysis of whole-cell lysates from *E. coli* BL21 mutants transformed with plasmid pET-16b containing 543bp insert from IFN $\gamma$ 2 in rainbow trout. Some bands were observed in soluble fraction and insoluble fraction extracted from *E. coli* BL21 transformed with plasmid pET-16b vector (lane 1 and 2).

M : Marker (Precision Plus Protein Standards ; Bio-Rad).

1 : Supernatant (Soluble fraction).

2 : Precipitation (Insoluble fraction; Inclusion bodies).

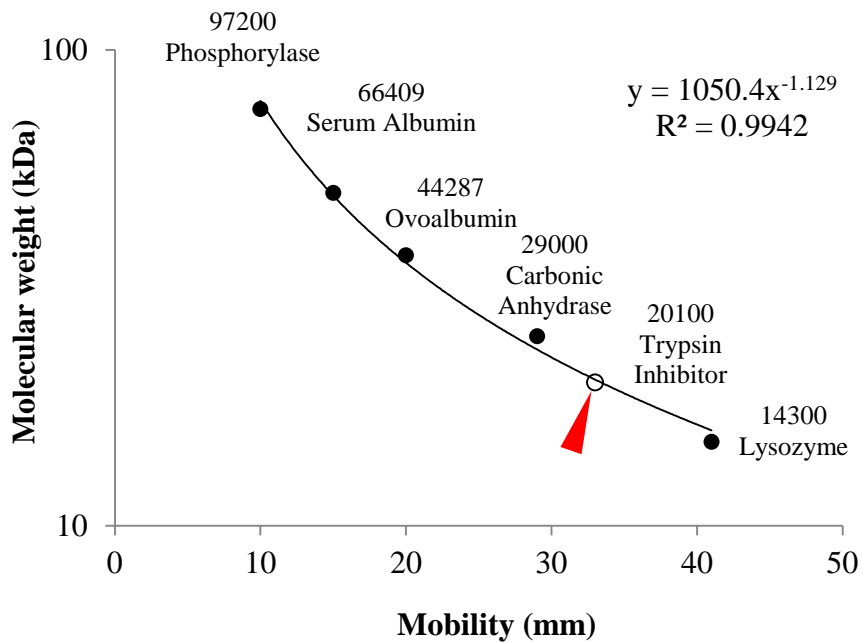


Fig. 23 Determination of molecular weight of rIFN $\gamma$ 2 with SDS-PAGE (20kDa).

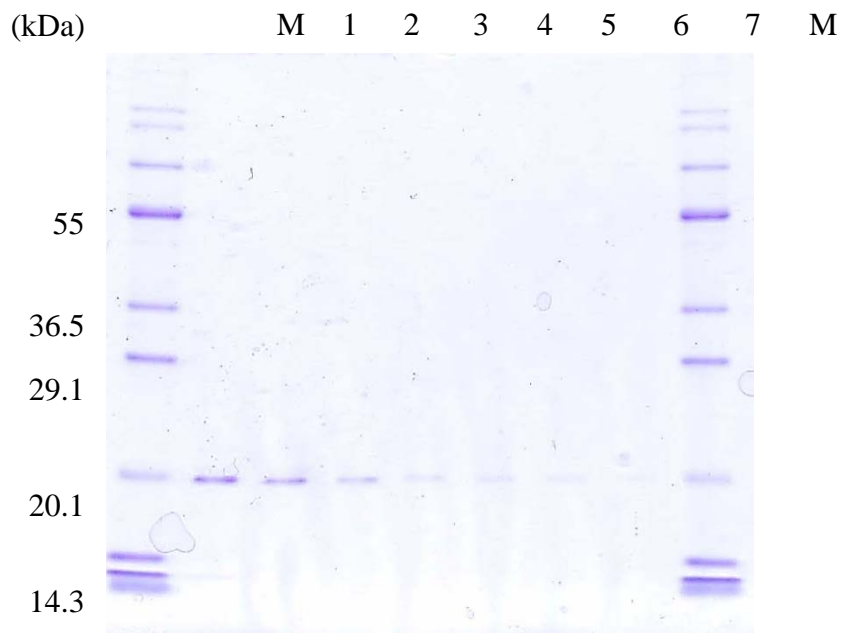


Fig. 24 SDS-PAGE (15%) of rIFN $\gamma$ 2 purified by affinity chromatography.

M : Marker (Protein Molecular Weight Marker, TEFCO).

1 ~7 : Fractions No.

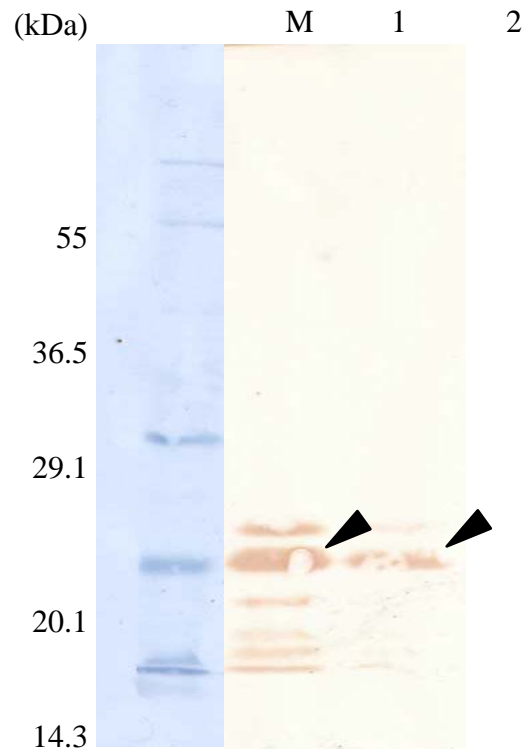


Fig. 25 Western blotting analysis of purified rIFN $\gamma$ 2 by affinity chromatography. Arrow heads indicate rIFN $\gamma$ 2.

M : Marker (Precision Plus Protein Standards ; Bio-Rad).

1~2 : Fraction No.1 and 2 (see Fig. 4) of protein-containing fractions.

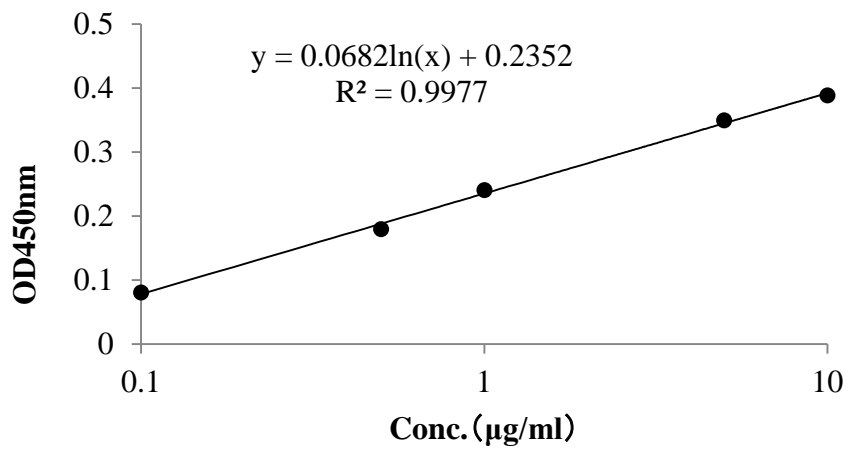


Fig. 26 Standard curve of IFN $\gamma$  concentration using purified rIFN $\gamma$ 2.

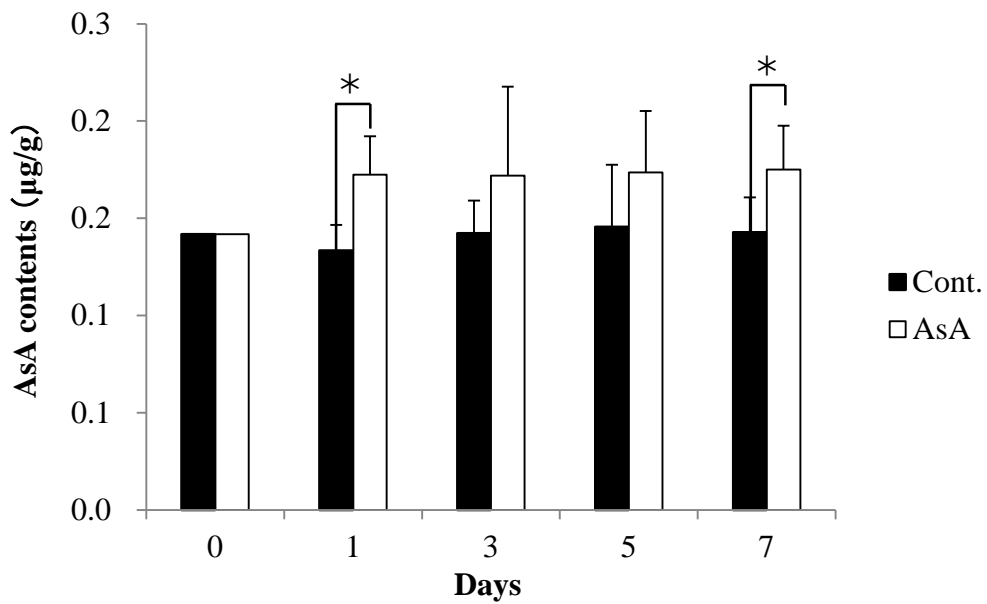


Fig. 27 Changes of AsA contents in liver of rainbow trout treated with AsA supplementation (5000 mg/kg diet).

\*:  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test).



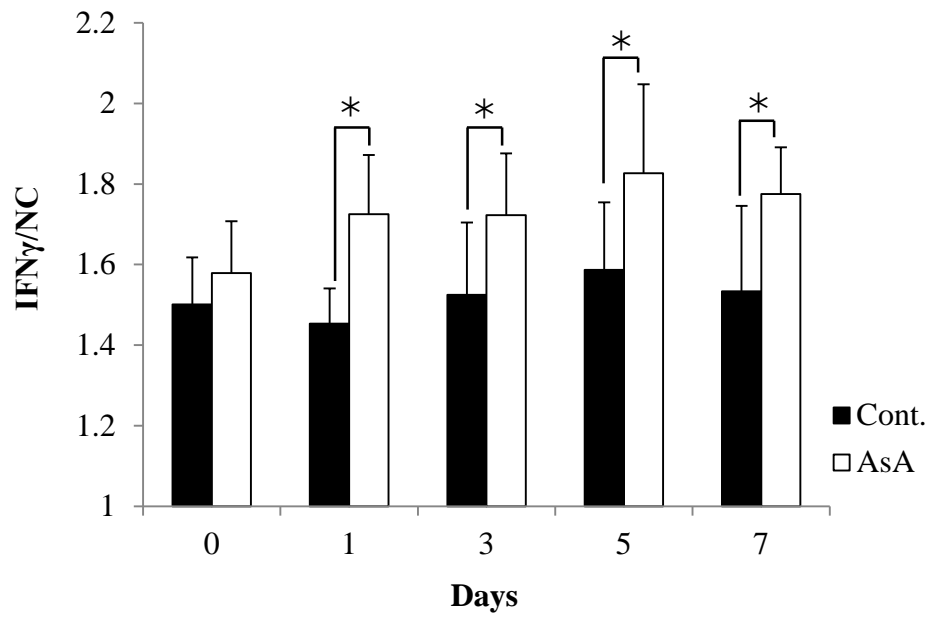


Fig. 28 Changes of plasma IFN $\gamma$  levels in blood of rainbow trout treated with AsA supplementation. \*:  $p < 0.05$  (Mann-Whitney U test).

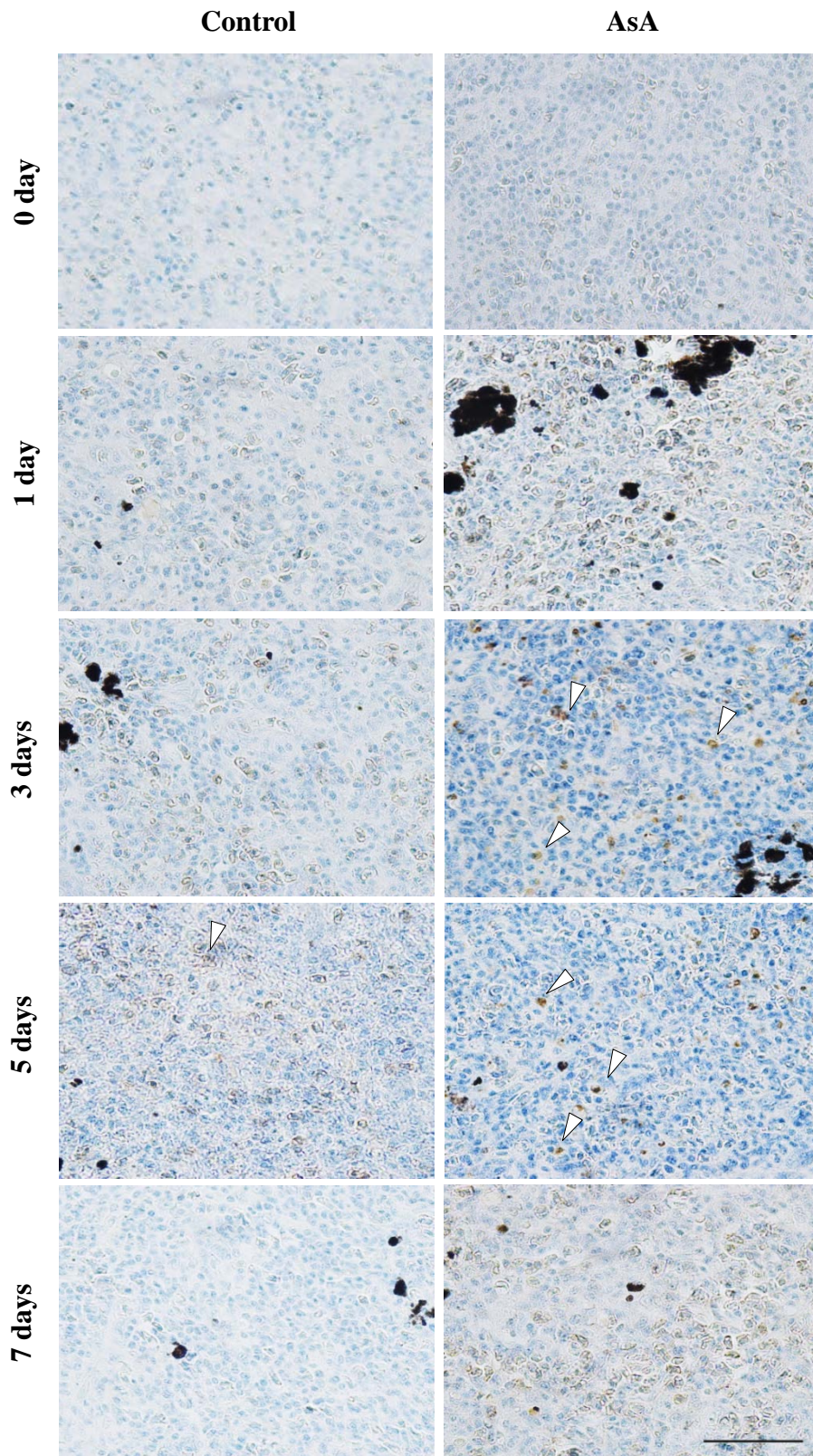


Fig. 29 Immunostainings of IFN $\gamma$  producing-cells (arrow heads) in spleen of rainbow trout collected at 0, 1, 3, 5 and 7 days after feeding trial with AsA in Experiment I .  
Scale bar = 50 $\mu$ m.

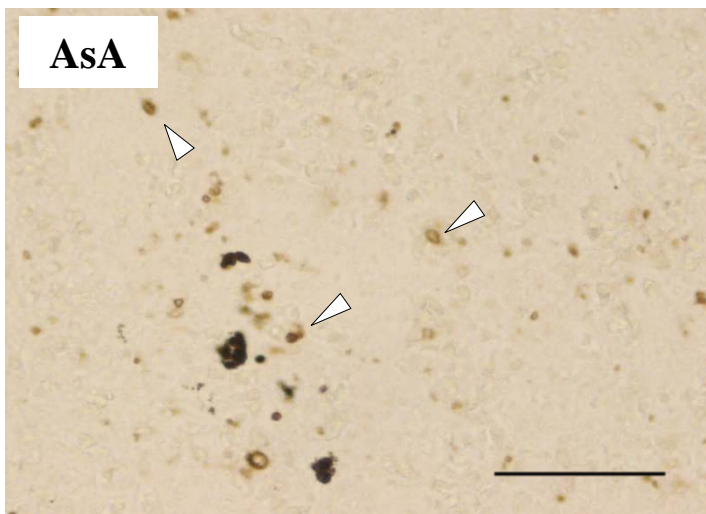
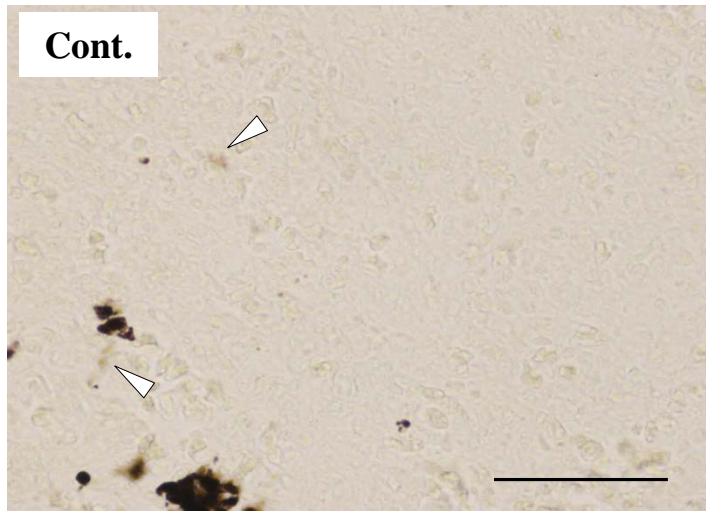


Fig. 30 Immunostainings of IFN $\gamma$  producing-cells (arrow heads) in spleen of rainbow trout collected at 5 days after feeding trial with AsA in Experiment I . Scale bars = 50 $\mu$ m.

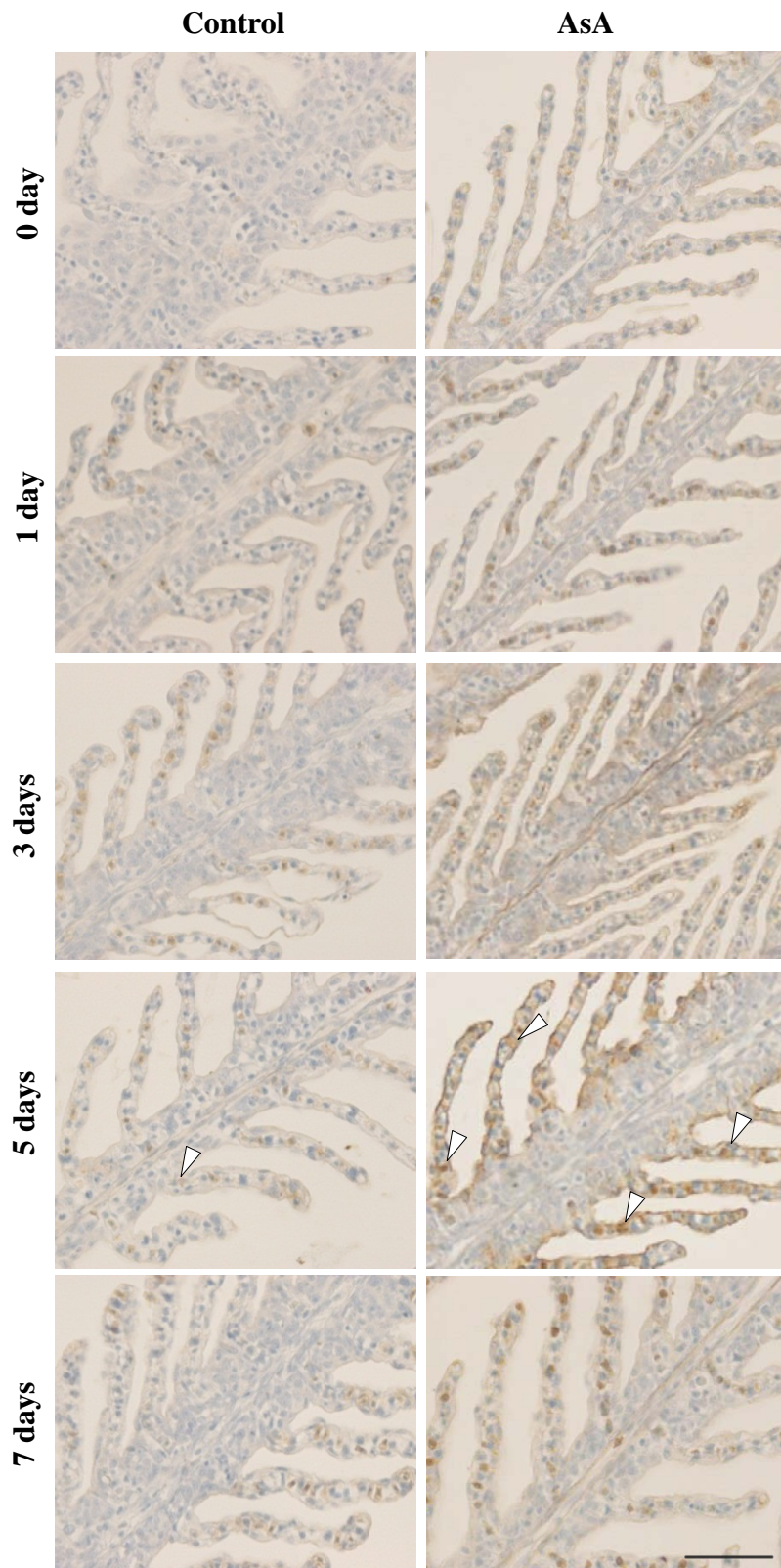


Fig. 31 Immunostainings of IFN $\gamma$  producing-cells (arrow heads) in gills of rainbow trout collected at 0, 1, 3, 5 and 7 days after feeding trial with AsA in Experiment I . Scale bar = 50 $\mu$ m.

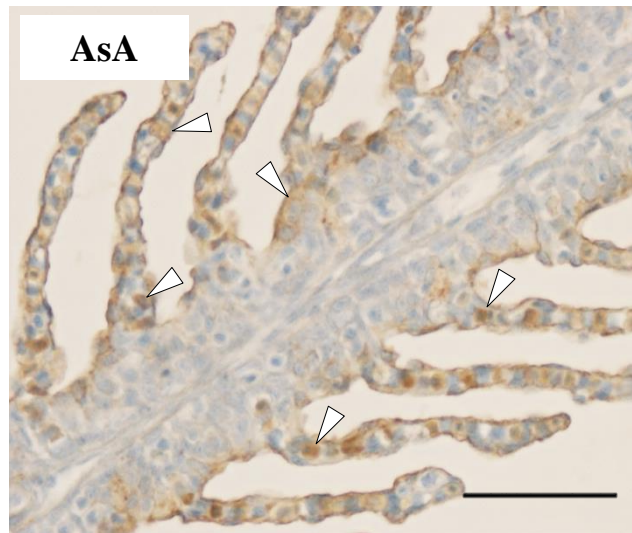
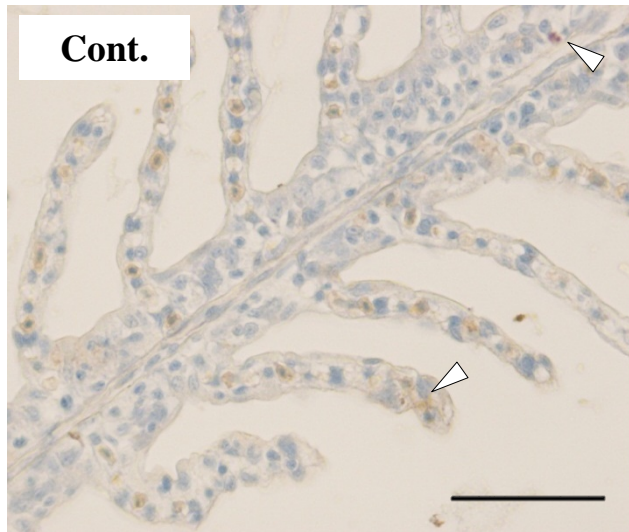


Fig. 32 Immunostainings of IFN $\gamma$  producing-cells (arrow heads) in gills of rainbow trout collected at 5 days after feeding trial with AsA in Experiment I . Scale bars = 50 $\mu$ m

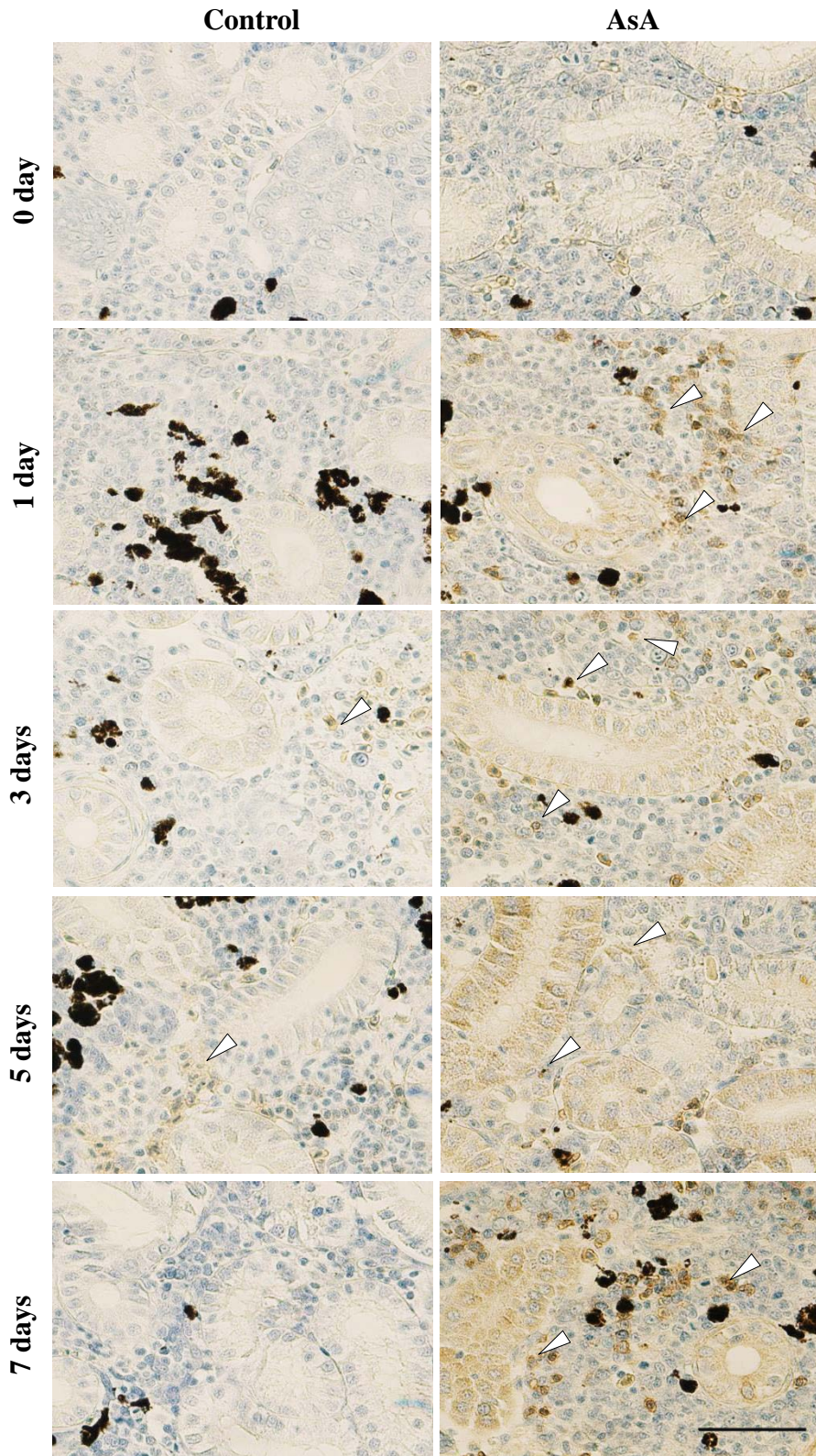


Fig. 33 Immunostainings of IFN $\gamma$  producing-cells (arrow heads) in kidney of rainbow trout collected at 0, 1, 3, 5 and 7 days after feeding trial with AsA in Experiment I . Scale bar = 50 $\mu$ m.

## 第7章 総合考察

国内における食の安全・安心に関する意識は非常に高く、農産物に留まらず養殖魚においてもトレーサビリティシステム、養殖魚 JAS および養殖生産工程管理手法（養殖 GAP）等の品質管理にかかるシステムの導入や制度が次々と設けられている（水谷, 2009; 舞田, 2013）。特に合成抗菌剤や抗生物質等の水産用医薬品の残留に対する基準は、ポジティブリストにより可食部への残留基準が厳格に管理され、食品としての安全が担保されている（舞田, 2013）。一方で、養殖生産の現場では国際的な種卵・種苗の移動が盛んになり、ヒラメの VHS やアユのエドワジェラ・イクタルリ感染症等の外来の新疾病が次々と国内で確認され、魚病対策やその被害による生産コストの上昇により養殖生産者は苦しめられている。

国内の魚病対策では、抗生物質や合成抗菌剤に対する薬剤耐性菌の出現（Zhao *et al.*, 1992）や新たな合成抗菌剤やワクチン製剤等の水産用医薬品の新規開発・販売に慎重な姿勢を示しているなど、国内の魚病対策に関しては閉塞感が強い。そのような困難な状況下、魚体本来の免疫力を高める、もしくは低下させないことにより、疾病に罹患しにくくする、もしくは罹患しても死亡しにくくする技術の開発が有望な対策として考えられている。代表的な技術として、免疫賦活剤の活用術がすでに養殖生産現場で実用されている（中野, 2008; 酒井, 2013）。本研究では免疫賦活物質のうち、人体や魚体への安全性、生産者の入手しやすさ、飼料への添加のしやすさ等が優れた AsA に着目し、淡水で飼育されたサケ科魚類への高濃度投与を行ったところ、種々の有益な試験結果が得られた。本章では内水面サケ科魚類の養殖現場における有効かつ効率的な高濃度 AsA 手法について本研究結果から提言したい。

第2章では、100日という長期間にわたって高濃度 AsA 投与を続けたところ、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とか

ら、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。

第3章では、高濃度の AsA を市販配合飼料に添加して淡水飼育したサケ科魚類へ連続投与し、臓器毎の AsA 含有量の変化を継時的に観察したところ、特に肝臓と腎臓では顕著な蓄積性が認められたことから、今後はこれら臓器に絞って測定および観察することが効率的と考えられる。また、通常の市販 AsA 結晶粉末と AsA 誘導体（ステイ-C）との体内への蓄積性について、魚体組織の AsA 含有量を実際に測定して、比較および検証を行った。AsA とその誘導体ともに投与3日後には有意な蓄積性を示し、両者ともに速やかに魚体内に吸収・蓄積されることが判明した。その後、両者を投与し続けると魚体内の蓄積量が減少傾向に向かうことも明らかとなった。さらに添加飼料の投与を終了しても、対照の未投与群と比較して少なくとも6日間は有意に高い蓄積量を維持し続けることが明らかとなった。これらの結果から高濃度 AsA（誘導体を含む）投与では、7日程度の短期間の高濃度 AsA 投与を実施し、その後7日間の未投与期間を設ける間欠投与を実施することがコスト面や現場の作業量減少に寄与できるものと考えられる。

第4章では、高濃度 AsA 投与によるストレスに対する付与効果について検証した。高水温ストレスについては、水温変化の幅（ストレス強度）によって死亡低減効果が分かれた。低酸素ストレスに対しては、有意な横たわりおよび死亡に達するまでの時間の延長効果が明らかとなった。一方で、ホルマリン毒性に対する死亡低減効果は認められなかった。養殖生産過程では、生産コストの面から様々なストレスを与えながら飼育魚を育成しなければならないが、さらに各種ストレス毎、その強度のレベルによって高濃度 AsA 投与の効果を具体的に明らかにする必要があるものと考えられる。特に、今回の高水温ストレス試験では数℃の温度幅により効果が分かれたことから、養殖現場への普及を考えるのであれば、より詳細な「何℃までなら効果が得られるか」という効果の基準が必要であると考えられる。また、死亡には至らない軽度の種々のストレスを受けた結果、生体防御能の低下が生じ、感染症を罹患しやすくなることから、感染症を未然に防ぐという観点からも高濃度 AsA



投与を活用し、飼育中の各種ストレスを低減することは、養殖生産量の増大に大きく寄与すると考えられる。

第5章では、感染症を中心に魚病に対する高濃度 AsA 投与の死亡低減効果について検証した。ウイルス性疾病である IHN では、IHNV 病原性株のみ高濃度 AsA 投与の死亡低減効果が確認された。また 1g サイズでは十分な効果が確認されなかったが、6g サイズでは確認された。つまり、遺伝的に異なるグループに属する IHNV 株間や魚体サイズの違いから投与効果が異なった。これらの結果から、養殖現場レベルでは AsA の投与効果が判然としない理由が、病原微生物の遺伝的（病原性）や魚体サイズの違いによって変化することが示唆された。細菌性疾病では、 $\beta$  溶血性レンサ球菌症に対して高濃度 AsA 投与による有意な死亡低減効果が認められた。使用できる抗菌剤が少ない細菌性疾病の  $\beta$  溶血性レンサ球菌症には、好発時期であるの夏期の高水温期に AsA の事前投与による対策が有効であると考えられる。不明病であったイワナ水腫症については、飼育環境の悪化に起因した鰓および腎臓の障害による疾病であることが示唆され、その飼育条件により高濃度 AsA の投与効果が異なった。水腫症に対する投与効果では、前章の高水温ストレス試験同様に、ある一定以上のストレス強度下では投与効果が十分に発揮されない可能性が強く示唆された。これらの結果から、高濃度 AsA 投与だけでは総合的な内水面の養殖サケ科魚類の感染症等の疾病対策には至らないが、治療薬やワクチンの開発・販売の可能性が低い国内内水面養殖業にとっては、高濃度 AsA 投与を活用した魚病予防技術は有効かつ現実的な疾病対策の一つであると考えられる。

第6章では、高濃度 AsA 投与について IHN（高病原性）に対する抗病性の付与効果の作用機序を。既知の研究では免疫機能を中心として貪食能などの白血球機能や IgM 量などの液性免疫を中心に調査されてきた。しかし、それらの免疫機能向上と耐病性の関連が一致しないという報告もあることから（青島, 2005）、我々はウイルス性疾病の IHN に顕著な投与効果が認められたことから、抗ウイルス因子の IFN  $\gamma$  に着目した。我々はニジマス血中

の IFN  $\gamma$  量の簡易な迅速測定法として ELISA 法の測定系を確立した。それにより、AsA を投与したニジマスの肝臓中の AsA 蓄積量と血中 IFN  $\gamma$  量は相関を示し、投与 3 日後から有意な上昇が認められた。また、AsA 投与魚の IFN  $\gamma$  賛成細胞の分布を臓器の組織学的観察により検証したところ、腎臓や鰓組織で IFN  $\gamma$  産生細胞の顕著な増加が観察された。これらの結果から、ウイルス性疾病である IHN に対する耐病性が付与された一因として、AsA の投与により抗ウイルス因子の IFN  $\gamma$  量の産生が体内で誘導されたことが強く示唆された。

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5,000 mg/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歩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養殖現場で発生している感染症の種類や病原体の系統などを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や地域や水系毎に予測可能な状態である。また、魚病好発時期やストレスが生じる生産過程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。

## 要旨

### 1. はじめに

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能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、特に餌 1kg 当り 1,000mg 以上の添加（1,000 mg/kg diet）で高い抗病性やストレス耐性が確認されていた。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であり、経済的に使用可能な疾病予防法として提示した。

### 2. 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とから、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。

### 3. 高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類の AsA 組織含有量の変化

免疫賦活剤は科学的な根拠に基づく用法・用量がないことが多く、有効かつ経済的な投与量および期間が明らかにされていない。そのため、前述の検討で最も有効性が高かった AsA 量 (5,000 mg/kg diet) を市販配合飼料に添加し、ニジマス等の淡水飼育サケ科魚類に投与し、AsA の体内蓄積量の推移を臓器毎に観察した。その結果から、最適な投与手法を検討した。また、保存性の高い AsA の誘導体についても同様の手法で検討した。

#### AsA含有量の動態

AsA を高濃度 (5,000 mg/kg diet) 添加した市販配合飼料を 3.8g のニッコウイワナ *Salvelinus leucomaenis pluvius*、2.2 g のヒメマス *O. nerka* および 6.2g のニジマスに給餌し、魚体内の AsA 蓄積量を把握するために筋肉、肝臓、腎臓、鰓および腸管について、継時的に AsA の測定を行った。さらに、ニジマスについては通常飼料切替え後の肝臓における AsA 蓄積量の変化も併せて測定した。その結果、すべての魚種で投与 3 日後から AsA 量が速やかに上昇し、7 日後には最大値を確認し、体内飽和量に達したと考えられた。臓器については、肝臓、腎臓および腸管で高い蓄積性を確認したが、筋肉や鰓での蓄積は少なかった。通常飼料切替え後、ニジマスでは切替え 6 日後までは対照区より有意に高い蓄積性があった。

#### AsA 誘導体の蓄積性

AsA 誘導体 (APSC) を AsA 量に換算して 5,000 mg/kg diet とし添加した市販配合飼料を

6.3g のニジマスに 30 日間給餌し、魚体内の AsA 蓄積量を把握するために肝臓、腎臓、鰓および腸管について、継時的に AsA の測定を行った。さらに、肝臓のみ通常飼料切替え後の蓄積量の変化も併せて測定した。その結果、投与 3 日後から有意な蓄積性が確認され、AsA と同様に肝臓、腸管および腎臓で高い蓄積性が確認された。投与終了後も AsA と同様の動態を示した。

#### 4. 高濃度 AsA 投与に伴うサケ科魚類のストレス耐性向上効果の検討

養殖生産過程では様々なストレスが発生し、飼育魚の直接的な死亡もしくは免疫力の低下に伴う疾病の発生などを引き起こす。AsA 投与によるストレス耐性向上効果を期待して、AsA を短期・高濃度投与（7 日間・5,000 mg/kg diet）し、各種ストレスに曝露した時の生残状況等を観察した。

##### 高水温

前述条件で AsA を添加した市販配合飼料を給餌し、水温 13℃で飼育した 2.5g のヒメマスを対象に、高水温（23 および 25℃）の水槽へ投入した。その結果、23℃区のみで対照区より AsA 投与魚が有意に高い生残性が認められた。ストレス強度によって AsA の投与効果が異なることが強く示唆された。

##### 低酸素

前述条件で AsA を添加した市販配合飼料を給餌した 14.8g のニジマスを対象に、酸素を供給しない止水水槽に収容し、溶存酸素（DO）の減少状況と供試魚の横たわりおよび死亡状況を観察した。その結果、AsA 投与による最終死亡率の有意な差はなかったが、横たわりおよび死亡開始までの時間を有意に延長させる延命効果を確認した。

##### ホルマリン

前述条件で AsA を添加した市販配合飼料を給餌した 14.9g のニジマスを対象に、0.1%ホルマリンの飼育水に投入し、供試魚の死亡状況を観察した。その結果、AsA 投与による有意

な死亡低減効果や延命効果は認められなかった。

## 5. 高濃度AsA投与に伴うサケ科魚類の抗病性向上効果の検討

AsAの投与による疾病に対する死亡低減効果が多くの魚種で報告されている。一方で、その効果がないとの報告もある。そのため、各疾病に対するAsAの短期・高濃度投与（7日間・5,000 mg/kg diet）による各種疾病への投与効果を感染試験により評価した。さらに、ウイルス性疾病のIHNに関しては、供試魚の成長に伴う感受性の変化や原因ウイルスの遺伝的変異の報告があることから、異なるサイズの供試魚について異なる遺伝子型の株による比較・評価も行った。

### 伝染性造血器壊死症（IHN）

AsAを短期・高濃度投与（7日間・5,000 mg/kg diet）した0.9および5.7gのニジマス、さらに1.6gのヒメマスに対して、遺伝的に異なるIHNウイルスのTK8901株とTV0026株の浸漬感染試験を行い、死亡状況を観察した。その結果、0.9gのニジマスでは有意な死亡低減効果は観察されなかったが、5.7gのニジマスおよび1.6gのヒメマスでは、TV0026で攻撃した区のみで有意な死亡低減効果が観察された。つまり、ウイルスの株や供試魚のサイズによりAsAの投与効果が左右されることが強く示唆された。

### サケ科魚類ヘルペスウイルス病（OMVD）

前述試験と同様にAsAを投与した6.0gのニジマスに対して、OMVウイルスのRtNa0010株の浸漬感染試験を行った。その結果、AsA投与による有意な死亡低減効果は認められなかった。

### $\beta$ 溶血性レンサ球菌症（*Streptococcus iniae* 感染症）

前述試験と同様にAsAを給餌した11.4gのニジマスに対して、*Streptococcus iniae* TB0613株の浸漬感染試験を行った。その結果、AsA投与による有意な死亡低減効果が認められた。

## 水腫症

ニッコウイワナの稚魚(1.1g)を注水量の異なる流水式水槽で飼育し、AsAを5,000 mg/kg diet以上の高濃度で投与し続ける区を設け、水腫症の自然発症を待った。また、水腫症発症後に1%塩水浴を3日連続で繰り返し実施し、その治療効果も検証する区も設けた。その結果、水腫症は開始7日後に自然発症した。そこで、死亡状況を観察するとともに、一部発症魚の病理組織学のおよび走査型電子顕微鏡による観察を行い、その原因も併せて検討した。その結果、注水量の多い飼育環境の良い区でのみでAsA投与による有意な死亡低減効果が観察された。また、塩水浴実施より死亡する供試魚はほぼ無く、治療手法として有効であった。さらに、水腫症発症魚の鰓では表皮が増成し二次鰓弁の棍棒化が顕著であった。おそらく、水腫症は飼育環境の悪化等による鰓の棍棒化により、浸透圧調節機能が喪失することにより発症する疾病であると考えられる。

## 6. 高濃度AsA投与がニジマスのIFN $\gamma$ 産生に及ぼす影響

AsAの投与によりウイルス性疾病IHNに対する耐病性が生じることが明らかになったが、そのメカニズムについて検証した。我々は抗ウイルス因子のIFN $\gamma$ に着目し、ニジマス血中のIFN $\gamma$ 量の簡易な迅速測定法としてELISA法の測定系を確立した。それにより、AsAを投与した23.2gのニジマスの肝臓中のAsA蓄積量と血中IFN $\gamma$ 量は相関を示し、投与1日後から有意な上昇が認められた。また、AsA投与魚のIFN $\gamma$ 産生細胞の分布を臓器の免疫組織学的観察により検証したところ、脾臓や鰓組織でそれぞれ投与3および5日後からIFN $\gamma$ 産生細胞の顕著な増加が観察された。これらの結果から、ウイルス性疾病であるIHNに対する耐病性が付与された一因として、AsAの投与により抗ウイルス因子のIFN $\gamma$ 量の産生が体内で誘導されたことが強く示唆された。

## 7. まとめ（養殖生産現場への提言）

AsAは古くから飼料添加物や必須栄養素として要求量等の基礎的な研究が行われている。一方で、医薬品ではないためにその用法・用量や具体的な効能についての情報は乏しかった。今回の試験からAsAおよびその誘導体は投与後に速やかに体内に蓄積されることが分

かった。また、投与休止後も一定期間は体内に残留することも明らかとなった。さらに、ストレス耐性付与効果も高水温や低酸素ストレスで明らかとなったが、そのストレス強度により効果が認められない場合もあった。耐病性向上効果については、IHN や  $\beta$  溶血性レンサ球菌症で認められたものの、OMVD では認められず、IHN では魚体サイズやウイルス株によって効果が分かれた。また、イワナ水腫症についても飼育環境の良い設定区のみで効果が確認された。耐病性についてもストレス耐性と同様に、その疾病種類や負荷状況によってその効果が左右されることが強く示唆された。耐病性が向上するメカニズムについては、AsA 投与によりニジマスの血中の抗ウイルス因子である IFN  $\gamma$  量が増加する結果を得たため、ウイルス性疾病への耐病性向上の一因であると考えられる。

これらの結果から、AsA 投与による淡水養殖サケ科魚類への各種効能はあるものの、その効果を十分に発揮させるにはストレスの種類や強度、疾病の種類や病原微生物の系統などを見極める必要があると考えられる。養殖生産現場においては、ストレスが生じる時期および魚病好発時期を見極め、その直前に短期・高濃度投与（市販配合飼料に AsA を 5,000 mg/kg diet の割合で添加し、7 日間投与する。）を行うことが現時点での最善の投与手法であると考えられる。



## 謝辞

本研究を遂行するに当たり、御指導を賜りました日本大学生物資源科学部漁群行動計測学研究室 小島隆人教授に深甚なる謝意を表します。

また、学部生時代から現在に至るまで、公私ともに御指導を賜りました同学部 廣瀬一美名誉教授に深く感謝の意を表します。

本論文の御校閲を賜りました同学部魚病学研究室 中西照幸教授、ウナギ学研究室 塚本勝巳教授、水族生態学研究室 高井則之准教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の遂行および本論文の取りまとめに関しまして、熱意あるご指導頂きました同学部海洋生物機能化学研究室（魚病学グループ） 間野伸宏専任講師に心よりお礼申し上げます。

東京海洋大学 田中栄次教授には、データ解析手法について、終始丁寧なご指導と多大なご助言を頂きました。東京海洋大学 福田穎穂名誉教授、北海道大学 吉水守教授には、ウイルス実験についてご助言を頂きました。諸先生方に謹んで感謝の意を表します。

試験試料の解析・分析に関しましては、栃木県産業技術センター食品技術部 山崎公位氏、阿久津知美氏、大山高裕氏、栃木県県央家畜保健衛生所 田中実氏、中村真弓氏に機器使用ならびに終始丁寧なご指導と多大なご助言をいただきました。日本大学 難波亜紀博士、金井香澄氏、水上海氏には IHNV の解析並びに IFN $\gamma$  の測定に関する技術指導を賜りました。心よりお礼を申し上げます。

(独) 水産総合研究センター増養殖研究所 矢田崇博士、東京都農林水産総合センター 河西一彦氏、東京都奥多摩さかな養殖センター 中尾忠司氏、城智聡氏、池谷文夫氏、岡部明氏、長野県水産試験場 降幡 充博士、小川滋氏、群馬県水産試験場 新井肇博士、泉 庄太朗博士、石川県水産技術センター 相木寛史博士、DSM ニュートリションジャパン株式会社 斎藤太郎氏には本研究を進める上で供試魚、ウイルス株等の研究材料の提供、文献の収集および養殖現場の情報提供など、多大なご協力とご助言を頂きました。ここに謹んで感謝の意を表します。

サケ科魚類の養殖に関する知識および技術を一から親切に教えていただいた旧東京都水産試験場奥多摩分場の斉藤実氏、下田貞夫氏、有馬多恵子氏をはじめとする当時の職員の皆様には心よりお礼申し上げます。

社会人にして博士論文を作成する機会を与えていただき、多大なるご配慮、ご協力をいただいた栃木県水産試験 元場長 福富則夫氏、前場長 糟谷浩一氏、場長 加賀豊仁氏、生産振興課主幹 澤田守伸氏をはじめとする栃木県職員の皆様には心から感謝いたします。

栃木県養殖漁業協同組合の塩野哲男組合長、大友時夫専務、全国養鱒振興協会の小堀彰会長には養殖生産現場の情報やサンプルを快くご提供いただきました。このご協力に対して深謝いたします

本研究に各方面でご協力いただいた日本大学 藪健史博士、榎本亜矢氏、川越至徳氏、清水直行氏、町田和彦氏、廣瀬公美氏、生方秀典氏、高本直樹氏、岩崎大氏、千葉星斗氏、和田直久氏、竹内久登氏、飯塚泰助氏、水野駿平氏、伊東輔氏ならびに日本大学生物資源科学部魚医学研究室および海洋生物機能化学研究室（魚病学グループ）の卒業生、所属学生諸氏、実験の補助を快く引き受けていただいた臨時職員 綱川佳名子氏には心より感謝いたします。

この全ての皆様のご指導、ご協力、ご助言なくしては、本研究は決して遂行することができませんでした。この場をお借りして、改めて厚く御礼申し上げます。

最後に本研究を進めるにあたり、陰ながら協力をしてくれた家族一同へ感謝します。

本研究は農林水産省農業技術会議「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」の採択課題「生体防御能向上と飼育環境制御による安全・安心なマス類養殖安定生産技術の開発」の一部として実施いたしました。

## 参考文献

- 秋元淳志 (2009) 飼料原料. 改訂 魚の栄養と飼料(渡邊武編). 恒星社厚生閣, 東京, 284-326pp.
- Amer E. C., Kiron V., Satoh S., Watanabe T. (2001) Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defence mechanisms in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 32 (Suppl 1): 162-173.
- Anbarasu K., Chandran M. R. (2001) Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, 11: 347-355.
- Anderson F., Lygren B., Maage A., Waagbø R. (1998) Interactions between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture*, 161: 437-451.
- Aoki T., Egusa S., Arai T. (1974) Detection of R factors in naturally occurring *Vibrio anguillarum* strains. *Antimicrobial Agents Chemother*, 6: 534-538.
- Aoki T. (1975) Effect of chemotherapeutics on bacterial ecology in the water of ponds and the intestinal tracts of cultured fish, ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Japanese Journal of Microbiology*, 19: 7-12.
- 青島秀治・石橋康治・岡本信明 (2005) 温度ストレス下でのニジマス末梢血貪食細胞の生体防御活性とビブリオ病抗病性との不一致について. 魚病研究, 40: 47-51.
- 青島秀治 (2007) 水産試験場等の診断記録からみた我が国における養殖サケ科魚類の疾病問題 (1978-2002年). 魚病研究, 42: 119-122.
- Barnes L. A. (1975) Safety considerations with high ascorbic acid dosage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 258: 523-528.
- Barton B. A. (2002) Stress in fish: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and comparative biology*, 42: 517-

- Bendich A., Machlin L. J., Scandurra O. (1986) The antioxidant role of vitamin C. *Advance Free Radical Biology and Medicine*, 2: 419-444.
- Blanco O., Meada T. (1980) Effect of dietary ascorbic acid on the susceptibility of steelhead trout (*Salmo gairdneri*) to nitrite toxicity. *Revista de Biología Tropical*, 28: 91-107.
- Buchmann K., Bresciani J., Jappe C. (2004) Effects of formalin treatment on epithelial structure and mucous cell densities in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) skin. *Journal of Fish Diseases*, 27: 99-104.
- Cabelli D., Bielski B. H. J. (1983) Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by  $\text{HO}_2/\text{O}_2^-$  radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study. *The journal of chemical physics*, 87: 1809-1812.
- Chien L. T., Hwang D. F., Jeng S-S. (1999) Effect of thermal stress on dietary requirement of vitamin C in Thornfish *Terapon jarbua*. *Fisheries Science*, 65: 731-735.
- Chien L. T., Hwang D. F. (2001) Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 128: 91-97.
- Dabrowski K., Lee K. J., Guz L., Verlhac V., Gabaudan J. (2004) Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 233: 383-392.
- Dahl H., Degré M. (1976) The effect of ascorbic acid on production of human interferon on the antiviral activity in vitro. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica-Section B*, 84: 280-284.
- Dror M., Sinyakov M. S., Okun E., Dym M., Sredni B., Avtalion R. R. (2005) Experimental handling stress as infection-facilitating factor for the goldfish ulcerative disease. *Veterinary immunology and immunopathology*, 109: 279-287.

- Dunier M., Vergnet C., Siwicki A. K., Verlhac V. (1995) Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. IV. Prevention of nonspecific and specific immunosuppression by dietary vitamin C (ascorbate-2-polyphosphate). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30: 259-268.
- Durve V. S., Lovell R. T. (1982) Vitamin C and disease resistance in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 39: 948-951.
- Eo J., Lee K. J. (2008) Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 611-616.
- Erdal J. I., Evensen Ø., Kaurstad O. K., Lillehaug A., Solbakken R., Thorud K. (1991) Relationship between diet and immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) after feeding various levels of ascorbic acid and omega-3 fatty acids. *Aquaculture*, 98: 363-379.
- Foss A., Vollen T., Oiestad V. (2003) Growth and oxygen consumption in normal and O<sub>2</sub> supersaturated water, and interactive effects of O<sub>2</sub> saturation and ammonia on growth in spotted wolfish (*Anarhichas minor* Olafsen). *Aquaculture*, 224: 105-116.
- Frei B., England L., Ames B. N. (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85: 235-241.
- Gannam A. L., Schlock R. M. (2001) Immunostimulants in Fish Diets. Nutrition and Fish Health (Lim C. and Webster C. D. ed.). Food products press, USA, 235-266pp.
- Geber W. F., Lefkowitz S. S., Hung C. Y. (1975) Effect of ascorbic acid, sodium salicylate, and caffeine on the serum interferon level in response to viral infection. *Pharmacology*, 13: 228-233.
- Gouillou-Coustans M. F., Kaushik S. J. (2000) Ascorbic acid requirement in freshwater and marine fish. Is there a difference?. *Ascorbic Acid in Aquatic Organisms* (Dabrowski

K. ed.). CRC press, USA, 49-68pp.

原武史・山崎隆義・田代文男・野本具視・小坂光昭・木村喬久 (1993a) 1・1・2 孵化・飼育施設等を完全に隔離した試験研究期間の事例.魚類防疫への挑戦 サケ・マス編 (「魚類防疫への挑戦」編集委員会編). 緑書房, 東京, 4-7pp.

原武史・山崎隆義・田代文男・野本具視・小坂光昭・木村喬久 (1993b) 1・4 他の動物の侵入を防止した事例. 魚類防疫への挑戦 サケ・マス編 (「魚類防疫への挑戦」編集委員会編). 緑書房, 東京, 16-19pp.

Hardie L. J., Fletcher T. C., Secombes C. J. (1991) The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 95: 201-214.

Hardie L. J., Mardsen M. J., Fletcher T. C., Secombes C. J. (1993) *In vitro* addition of vitamin C affects rainbow trout lymphocyte responses. *Fish and shellfish Immunology*, 3: 207-219.

Halver J. E., Laurence M. A., Smith R. R. (1969) Ascorbic Acid Requirements of Coho Salmon and Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 98: 762-771.

Halver J. E. (1972) The role of ascorbic acid in fish disease and tissue repair. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 38: 79-92.

平野陽三 (1994a) 1 食品の成分変化, 5.ビタミン類の変化, 7)ビタミン C. 総合食品安全事典 (総合食品安全事典編集委員会編). 産業調査会事典出版センター, 東京, 423pp.

平野陽三 (1994b) 5 食品添加物, 栄養強化剤, 2.ビタミン, (5) ビタミン C. 総合食品安全事典 (総合食品安全事典編集委員会編). 産業調査会事典出版センター, 東京, 683pp.

Iguchi K., Ogawa K., Nagae M., Ito F. (2003) The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture*, 220: 515-523.

飯田貴次 (2001) 魚のストレスと生体防御活性. 養殖, 480: 57-59.

石橋泰典・家戸敬太郎・池田静徳・村田修・那須敏朗・熊井英水 (1992) 魚類の低酸素ストレス耐性に及ぼす飼料アスコルビン酸投与の効果. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58:1555.

Ishibashi Y., Kato K., Ikeda S., Murata O., Nasu T., Kumai H. (1992) Effect of dietary ascorbic acid on the tolerance to intermittent hypoxic stress in Japanese parrot fish. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 2147-2152.

石橋泰典 (1994) 海水養殖魚のアスコルビン酸要求に関する研究. 近畿大学水産研究所報告, 4: 1-100.

石黒直哉・西田睦 (2004) 第1章サケ・マス類の系統と進化. サケ・マスの生態と進化 (前川光司編). 文一総合出版, 東京, 15-42pp.

伊藤尚史・村田寿・大山剛・吉田照豊・境正・山内清・山口登喜夫・宇川正治 (2000) 高アスコルビン酸飼料給与によるブリの細菌性溶血性黄疸軽減の試み. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 66: 298-299.

James W. A., Murai T. (1975) Studies on the vitamin C requirements of channel catfish. *Journal of Nutrition*, 105: 557-561.

香川靖雄 (2008) ビタミン研究における個体差の問題. ゲノムビタミン学 (香川靖雄・四童子好廣編). 建帛社, 東京, 39-78pp.

Kalogianni E., Alexis M., Tsangaris C., Abraham M., Wendelaar Bonga S.E., Iger Y., Van Ham E. H., Stoumboudi M. T. h. (2011) Cellular responses in the skin of the gilthead sea bream *Sparus aurata* L. and the sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to high ammonia. *Journal of Fish Biology*, 78: 1152-1169.

河西一彦・長谷川敦子・福田穎穂 (1991) イワナ稚魚のいわゆる水腫症の原因に関する予報. 魚病研究, 26: 21-28.

河西一彦・米沢純爾・小野淳・長谷川敦子・本間智晴・福田穎穂 (1993) ニジマスの成長に伴う伝染性造血器壊死症(IHN)に対する感受性の変化. 魚病研究, 28: 35-40.

- 桐生透 (2005) 5.ニジマス. 水産増養殖システム 2 淡水魚 (高島史夫・村井衛編). 恒星社厚生閣, 東京, 29-55pp.
- Kitamura S., Ohara S., Suwa T., Nakagawa K. (1965) Studies on vitamin requirements of rainbow trout, *Salmo gairdneri*- I . On the ascorbic acid. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 31: 818-826.
- 越塩俊介 (2003) 水溶性ビタミン類. 養殖魚の健全性に及ぼす微量栄養素 (中川平介・佐藤実編). 恒星社厚生閣, 東京, 10-21pp.
- 越塩俊介 (2005) ビタミン C (アスコルビン酸) 要求量と役割. 養殖, 533: 28-31.
- 越塩俊介 (2008a) ビタミン. 養殖, 563: 21-23.
- 越塩俊介 (2008b) ラクトフェリン. 養殖, 563: 48-50.
- 倉田忠男 (1994) ビタミン C の抗酸化性. 抗酸化物質-フリーラジカルと生体防御 (二木鋭雄・島田弘幸・美濃真編). 学会出版センター, 東京, 79-86pp.
- Letherland J. F. (2010) Introduction: Diagnostic assessment of non-infectious disorders. Fish disease and disorders Volume 2 Non-infectious disorders (Leatherlands J .F. and Woo P. T. K. ed.). CABI Press, USA, 1-18pp.
- Li Y. H., Lovell R. T. (1985) Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. *Journal of Nutrition*, 115: 123-131.
- Lim C., Lovell R. T. (1978) Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of Nutrition*, 108: 1137-1146.
- Lim C., Shoemaker C. A., Klesius P. H. (2000a) The effect of ascorbic acid on immune response in fish. Ascorbic Acid in Aquatic Organisms (Dabrowski K. ed.). CRC press, USA, 149-166pp.
- Lim C., Klesius P. H., Li M. H., Robinson E. H. (2000b) Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*, 185: 313-327.



- Lin M. F., Shiau S. Y. (2005) Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, 244: 215-221.
- Liu P. R., Plumb J. A., Guérin M., Lovell R. T. (1989) Effect of megalevels of dietary vitamin C on the immune response of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, in ponds. *Diseases of Aquatic Organisms*, 7: 191-194.
- 舞田正志 (2013) 第 3 章 §5. 水産用医薬品と養殖魚の安全性. 魚介類の微生物感染症の治療と予防 (青木宙編). 恒星社厚生閣, 東京, 268-276pp.
- Martin I., Bengt F., Kjell J. N. (1998) Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon amolts. *Aquaculture*, 168: 387-394.
- Mata A. I., Blanco M. M., Domínguez M., Fernández-Garayzábal J. F., Gibello A. (2004) Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (lctO) gene with potential diagnostic value. *Veterinary Microbiology*, 101: 109-116.
- 緑書房編集部 (2007) 勢いに乗り増産が続くチリの鮭鱒類養殖事業. *養殖*, 557: 27-30.
- 水谷公一 (2009) 養殖生産工程管理手法「養殖 GAP」の実践の手順. *養殖*, 580: 16-19.
- 森井秀昭・吉井一馬 (2001) 魚病原細菌の薬剤耐性性化に関する分子生物学的研究. 長崎県技術開発研究委託事業 地域研究開発促進拠点 支援事業可能性試験. 297-322.
- 望月万美子・阿久津哲也・鴻上繁・岡本信明・吉水守 (2007) 染色体操作により得られたニジマス 2 系統の耐病性ならびに再生産形質に見られた差異. *日本水産学会誌*, 73: 844-850.
- Mochizuki M., Kim H. J., Kasai H., Nishizawa T., Yoshimizu M. (2009) Virulence change of infectious hematopoietic necrosis virus against rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* with viral molecular evolution. *Fish Pathology*, 44: 159-165.

- 文部科学省 (2005) ビタミン C. 五訂増補 日本食品標準成分表分析マニュアル. 国立印刷局, 東京, 97-99pp.
- Mulder I. E., Wadsworth S., Secombes C. J. (2007) Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish and shellfish Immunology*, 23: 747-759.
- 村田晃 (1980) アスコルビン酸大量投与の薬理作用. ビタミン学 [II] (日本ビタミン学会編). 東京化学同人, 東京, 591-595pp.
- 室賀清邦 (2004) アユ等淡水魚の連鎖球菌症 (*Streptococcus iniae* infection). 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編). 恒星社厚生閣, 東京, 203-206pp.
- 中居裕 (2011) 伝染性造血器壊死症 (IHN) (大型魚). 新魚病図鑑 第2版 (畑井喜司雄・小川和夫編). 緑書房, 東京, 15pp.
- 中西照幸 (2009) 第6章 海外におけるワクチンの使用および開発. 水産用ワクチンハンドブック (中西照幸・乙竹充編). 恒星社厚生閣, 東京, 52-56pp.
- 中野俊樹 (2008) プロバイオティクス. 養殖, 563: 69-74.
- Navarre O., Halver J. E. (1989) Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. *Aquaculture*, 79: 207-221.
- Nikoskelainen S., Bylund G., Lilius E. M. (2004) Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 28: 581-592.
- Nishikimi M. (1975) Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 63: 463-468.
- Nishizawa T., Kinoshita S., Kim W. S., Higashi S., Yoshimazu M. (2006) Nucleotide diversity of Japanese isolate of infection hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene. *Diseases of Aquatic Organisms*, 71: 267-272.
- 岡村由紀子 (2008) 抗酸化剤. 養殖, 563: 8-11.

- Ooi E. L., Verjan N., Haraguchi I., Oshima T., Kondo H., Hirono I., Aoki T., Kiyono H., Yuki Y. (2008) Innate immunodulation with recombinant interferon- $\alpha$  enhances resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to infectious hematopoietic necrosis virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 32: 2111-1220.
- 大塚信一 (1996) アスコルビン酸. 岩波生物学事典第4版 (八杉龍一・小関治男・古谷雅樹・日高敏隆編). 岩波書店, 東京, 11pp.
- Ortuño J., Esteban M. A., Meseguer J. (2001) Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and shellfish Immunology*, 11: 187-197.
- Ortuño J., Esteban M. A., Meseguer J. (2003) The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and shellfish Immunology*, 14: 145-156.
- 乙竹充 (2009) 第4章 市販ワクチン. 水産用ワクチンハンドブック (中西照幸・乙竹充編). 恒星社厚生閣, 東京, 33-43pp.
- 小澤美奈子(1994) インターフェロン. 化学事典 (大木道則・大沢利昭・田中元治・千原秀昭編). 東京化学同人, 東京, 135pp.
- Purcell M. K., Laing K. J., Woodson J. C., Thorgaard G. H., Hansen J. D. (2009) Characterization of the interferon genes in homozygous rainbow trout reveals two novel genes, alternate splicing and differential regulation of duplicated genes. *Fish and shellfish Immunology*, 26: 293-304.
- Purcell M. K., LaPatra S. E., Woodson J. C., Kurath G., Winton J. R. (2010) Early viral replication and induced or constitutive immunity in rainbow trout families with differential resistance to Infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV). *Fish and Shellfish Immunology*, 28: 98-105.
- Ren T., Koshio S., Ishikawa M., Yokoyama S., Micheal F. R., Uyan O., Tung H. T. (2007) Influence of dietary vitamin C and bovine lactoferrin on blood chemistry and non-specific immune responses of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, 267: 31-

37.

Roberts M. L., Davies S. J., Pulsford A. L. (1995) The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 5: 27-38.

Robertsen B. (2006) The interferon system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 20: 172-191.

Robertsen B. (2008) Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish and Shellfish Immunology*, 25: 351-357.

Sakai M., Kobayashi K., Yoshida T. (1995) Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 110B: 755-759.

Sakai M. (1999) Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172: 63-92.

酒井正博 (2001) 実用化に向けた新しい免疫賦活物質の研究. 養殖, 480: 70-73.

酒井正博 (2013) 第 5 章 § 8. 免疫賦活剤. 魚介類の微生物感染症の治療と予防 (青木宙編). 恒星社厚生閣, 東京, 445-452pp.

佐野徳夫・長倉義智 (1982) 日本産魚類のウイルス病に関する研究 VIII IHNV 感染により RTG - 2 細胞が産生するインターフェロン. 魚病研究, 17: 179-185.

Sato M., Yoshinaka R., Ikeda S. (1978) Dietary ascorbic acid requirements of rainbow trout for growth and collagen formation. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 44: 1029-1035.

佐藤守・近藤隆雄・吉中禮二・池田静徳 (1982) ニジマスにおけるコラーゲン生合成に及ぼす飼料アスコルビン酸レベルの影響. 日本水産学会誌, 48: 553-556.

Sato M., Hatano Y., Yoshinaka R. (1991) L-Ascorbyl 2-sulfate as a dietary vitamin C source for rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57: 717-721.

佐藤秀一 (2009) 各種ビタミンの安定性. 改訂魚の栄養と試料 (渡邊武編). 恒星社厚

- 生閣, 東京, 143-145pp.
- 崎浦利之 (2008) ポリフェノール. 養殖, 563: 57-59.
- Sauberlich H. E. (1994) Pharmacology of vitamin C. *Annual review of nutrition*, 14: 371-391.
- 澤田守伸・松岡栄一・田原偉成・米花晃雄 (2007) 内水面養殖業の大型鮭鱒類の動向. 養殖, 557: 18-22.
- Shiau S. Y., Jan F. L. (1992) Dietary ascorbic acid requirement of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Nippon Suisan Gakkaisshi*, 58: 671-675.
- Siegel B. V. (1974) Enhanced interferon response to murine leukemia virus by ascorbic acid. *Infection and Immunology*, 10: 409-410.
- Siegel B. V. (1975) Enhancement of interferon production by poly(rI)·poly(rC) in mouse cell cultures by ascorbic acid. *Nature*, 254: 531-532.
- Sieger D., Stein C., Neifer D., Sar A. M., Leptin M. (2009) The role of gamma interferon in innate immunity in the zebrafish embryo. *Disease Models and Mechanisms*, 11-12: 571-581.
- Siraj P., Usha R. (2003) Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambics* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 218-221.
- Stein H. B., Hasan A., Fox I. H. (1976) Ascorbic acid-induced uricosuria. A consequence of megavitamin therapy. *Annals of Internal Medicine*, 84: 385-388.
- Stocker R., Frei B. (1996) ヒト血漿の抗酸化作用. 酸化ストレス-活性酸素障害と疾病- (Sies H. 編). 真興交易医書出版部, 東京, 173-198pp.
- 水産庁 (2012a) 第 3 章第 1 節 水産物の需給をめぐる動き. 平成 24 年度水産白書, 101-107pp.
- 水産庁 (2012b) 第 3 章第 2 節 我が国水産業をめぐる動き. 平成 24 年度水産白書, 108-135pp.

- 鈴木雄策・阿井敏雄 (1989) アスコルビン酸大量投与によるニジマス稚魚の IHN 抗病性. 静岡県水産試験場研究報告, 24: 25-29.
- 高橋幸則・伊丹利明・近藤昌和(2001) 免疫活性物質の基礎知識. 養殖, 480: 60-63.
- 田中英彦(2011) パラコート毒性の機構とアスコルビン酸誘導体による抑制. 福岡大学理学集報, 41: 103-114.
- 丹波弘吉 (2007) ノルウェーにおける鮭鱒類の輸出国家戦略. 養殖, 557: 23-26.
- Thornton P. A., Omdahl J. L. (1969) Further evidence of skeletal response to exogenous ascorbic acid. *Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine*, 132: 618-621.
- Tompson I., White A., Fletcher T. C., Houlihan D. F., Secombes C. J. (1993) The effect of stress on the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diet containing different amounts of vitamin C. *Aquaculture*, 114: 1-18.
- Trenzo C. E., Higuera M., Morales A. E. (2007) Influence of dietary vitamins E and C and HUFA on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) performance under crowding conditions. *Aquaculture*, 263: 249-258.
- 辻典子(2005) IFN- $\gamma$  (菅村和夫・宮園浩平・宮澤恵二・田中伸幸編). 羊土社, 東京, 59-61pp.
- 辻村和也・野口徹・玉井忠和・村上浩紀 (2004) 21 世紀の養殖を科学する 解説編 魚インターフェロンによる魚類ウイルス病の予防及び治療. 養殖, 377: 32-33, 76-79.
- 辻村卓・吉川春寿・長谷川忠男・鈴木隆雄・笠井孝正・諏訪富雄・北村佐三郎 (1978) アスコルビン酸 2-硫酸を経口投与したニジマスの臓器中ビタミン C 含有量. ビタミン, 52: 69-76.
- 辻村卓・北村佐三郎 (1979) ニジマス及びモルモットに経口投与したアスコルビン酸 2-硫酸の血液, 肝臓における取り込み. ビタミン, 53: 247-252.
- Vatsos I. N., Kotzamanis Y., Henry M., Angelidis P., Alexis M. (2010) Monitoring stress in fish by applying image analysis to their skin mucous cells. *European Journal of*

*Histochemistry*, 54: 107-111.

Verlhac V., Gabaudan J. (1994) Influence of vitamin C on the immune system of salmonids.

*Aquaculture and Fisheries Management*, 25: 21-36.

Verlhac V., Gabaudan J., Obach A., Schüep W., Hole R. (1996) Influence of dietary glucan and vitamin C on non-specific and specific immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 143: 123-133.

Verlhac V., Obach A., Gabaudan J., Schüep W., Hole R. (1998) Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish and Shellfish Immunology*, 8: 409-424.

Verlhac V., Gabaudan J. (2005) Vitamin C and health status. In: The effect of vitamin C on fish health. DSM Nutritional Products, Switzerland, 17-28pp.

Vijayan M. M., Aluru N., Leatherland J. F. (2010) Stress response and the role of cortisol. Fish disease and disorders Volume 2 Non-infectious disorders (Leatherlands J. F. and Woo P. T. K. ed.). CABI, USA, 182-201pp.

Waagbø R., Glette J., Raa-Nilsen E., Sandnes K. (1993) Dietary vitamin C, immunity and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 12: 61-73.

Wahli T., Frischknecht R., Schmitt M., Gabaudan J., Verlhac V., Meier W. (1995) A comparison of the effect of silicone coated ascorbic acid and ascorbyl phosphate on the course of ichthyophthiriosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease*, 18: 347-355.

Wahli T., Verlhac V., Gabaudan J., Schüep W., Meier W. (1998) Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Disease*, 21: 127-137.

Wahli T., Verlhac V., Girling P., Gabaudan J., Aebischer C. (2003) Influence of dietary vitamin C on the wound healing process in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

*Aquaculture*, 225: 371-386.

Wang X., Kim K. W., Bai S. C., Huh M. D., Cho B. Y. (2003) Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture*, 215: 203-211.

山本義和・井上雅代 (1982) ニジマスに経口投与したカドミウムの毒性に及ぼすアスコルビン酸投与の効果. 神戸女学院大学論集, 29: 99-106.

Yin Z., Lam T. J., Sin Y. M. (1995) The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and shellfish immunology*, 5: 519-529.

吉水守 (2004a) 2. 伝染性造血器壊死症 (Infectious hematopoietic necrosis: IHN). 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編). 恒星社厚生閣, 東京, 38-44pp.

吉水守 (2004b) 4. サケ科魚類のヘルペスウイルス病 (Herpesviral disease of salmonids). 魚介類の感染症・寄生虫病 (若林久嗣・室賀清邦編). 恒星社厚生閣, 東京, 48-53pp.

Yoshimizu M. (2009) Control strategy for viral diseases of salmonid fish, flounders and shrimp at hatchery and seed production facility in Japan. *Fish Pathology*, 44: 9-13.

吉水守 (2012) 魚類ウイルス病とその防疫・防除に関する研究. 日本水産学会誌, 78:358-367.

Zhang J., Shen H., Wang X., Wu J., Xue Y. (2004) Effect of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere*, 55: 167-174.

Zhao J., Kim E-H., Kobayashi T., Aoki T. (1992) Drug resistance of *Vibrio anguillarum* isolated in ayu from 1989 to 1991. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 1523-1527.

Zou J., Carrington A., Collet B., Dijkstra J. M., Yoshiura M., Bols N., Secombes C. (2005) Identification and bioactivities of IFN- $\gamma$  in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: The first Th1-type cytokine characterized functionally in fish. *The Journal of Immunology*,



175: 2484-2494.