

β -カロテン大量投与がイシダイ種苗の
生体防御機能に及ぼす影響

2001年1月

長崎大学大学院
海洋生産科学研究科

八木基明



目 次

第一章 緒言

1.1	本研究の目的	1
1.2	本研究に関連する従来の研究	8
1.3	本研究の概要	8
	文献	9

第二章 イシダイ脾臓細胞のコンカナバリン A 培養上清による腹腔マクロファージ(mφ)の活性化の検討

2.1	目的	13
2.2	実験方法	
2.2.1	供試魚および飼育	14
2.2.2	イシダイ脾臓細胞の採取と調整	14
2.2.2-1	RPMI 1640 培地の作成	15
2.2.2-2	FRPMI 1640 培地の作成	15
2.2.2-3	CFRPMI 1640 培地の作成	16
2.2.3	イシダイ脾臓細胞の培養	16
2.2.4	イシダイ腹腔マクロファージ(mφ)の調整	17
2.2.4-1	イシダイ腹腔滲出細胞の採取	17
2.2.4-2	イシダイ腹腔滲出細胞浮遊液の調整	18
2.2.4-3	イシダイ腹腔滲出細胞の形態的分類	18
2.2.4-4	イシダイ腹腔滲出細胞中からの mφ の単離	19
2.2.4-5	イシダイ腹腔マクロファージの確認	19

2.2.5	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清のイシダイ腹腔 mφ 活性化の測定	20
2.2.5-1	イシダイ腹腔 mφ の貪食能の測定	21
2.2.5-2	イシダイ腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性の測定	21
2.2.6	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の熱および pH 安定性の測定	22
2.2.6-1	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の熱安定性	22
2.2.6-2	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.添加培養上清の pH 安定性	22
2.2.7	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の腹腔 mφ 活性化に対する種特異性の測定	23
2.2.7-1	供試動物	23
2.2.7-2	マウス脾臓細胞の ConA.S.4B.刺激培養上清の作成	23
2.2.7-3	マウス腹腔マクロファージ(mφ)の調整	23
2.2.7-4	イシダイ脾臓細胞 ConA.S.4B.培養上清のマウス腹腔 mφ 活性化の測定	24
2.2.7-5	マウス腹腔 ConA.S.4B..培養上清のイシダイ腹腔 mφ 活性化の測定	24
2.2.7-6	マウス腹腔腹腔 mφ 機能の測定	24
2.3	結果	
2.3.1	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.添加培養	24
2.3.2	イシダイ腹腔滲出細胞の検討	25
2.3.2-1	イシダイ腹腔 mφ の貪食能	29
2.3.2-2	イシダイ腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性	31
2.3.3	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.添加培養上清の熱(56℃)および酸(pH 2)に対する安定性	33
2.3.3-1	イシダイ腹腔 mφ の貪食能	33
2.3.3-2	イシダイ腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性	35
2.3.4	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の種特異	37

2.3.4-1	マウス腹腔内 mφ への貪食能	37
2.3.4-2	マウス腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性	39
2.4	考察	41
	文献	42
第三章 養殖イシダイにおける β -カロテン大量添加餌料が免疫機能に及ぼす効果		
3.1	目的	45
3.2	方法	
3.2.1	供試魚	46
3.2.2	餌料と飼育条件	47
3.2.3	両群の γ -INF 産生能の検討	47
3.2.3-1	イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の採取と調整	47
3.2.3-2	両群のイシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清中における γ -INF 活性の測定	47
3.2.3-3	両群のイシダイ腹腔 mφ の貪食能の検討	47
3.2.4	両群のヒツジ赤血球(SRBC)に対する抗体産生能の検討	47
3.2.4-1	ヒツジ赤血球(SRBC)の調整	47
3.2.4-2	ヒツジ赤血球(SRBC)によるイシダイの免疫	48
3.2.4-3	SRBC に対するイシダイ血清の抗体価の測定	48
3.3	結果	
3.3.1	対照群、 β -カロテン大量投与群の魚体の体格比較	48
3.3.2	両群の脾臓細胞の ConA.S.4B.刺激による γ -INF 産生	52
3.3.3	対照群 β -カロテン大量投与群のイシダイ腹腔 mφ の貪食能の検討	56

3.3.4	対照群、 β -カロテン大量投与群の SRBC に対する抗体産生の 検討	58
3.4	考察	60
	文献	61

第四章 アラマーブルーを用いた稚仔魚の脾臓細胞幼若化の簡便測定法

4.1	目的	65
4.2	実験方法	
4.2.1	供試魚	66
4.2.2	ヒラメ 1 年魚脾臓細胞のマイトーゲンによる幼若化	66
4.2.3	幼若化応答の測定	67
4.2.4	稚仔魚の脾臓細胞の調整と幼若化	67
4.3	結果	
4.3.1	各マイトーゲンで培養した脾臓細胞数の経時的変化及び細胞 数と吸光度の関係	67
4.3.2	最適マイトーゲン濃度	71
4.3.3	最適培養細胞数	73
4.3.4	稚仔魚の脾臓細胞数	77
4.3.5	各稚仔魚脾臓細胞のマイトーゲンによる幼若化	77
4.4	考察	79
	文献	80

第五章 β -カロテン強化ワムシの投餌がイシダイ・イシガキダイ種苗の生 残率とリンパ球の幼若化反応に及ぼす影響

5.1	目的	82
5.2	材料と方法	
5.2.1	餌料ワムシとその栄養強化	83
5.2.2	ワムシ中のカロテノイドの測定	83
5.2.3	供試魚	83
5.2.4	供試魚の飼育	84
5.2.5	イシダイ・イシガキダイの脾臓細胞幼若化反応の測定	84
5.3	結果	
5.3.1	培養時間に伴うワムシ内カロテノイドの変化	85
5.3.2	イシダイ, イシガキダイの生残率と全長	88
5.3.3	β -カロテン強化ワムシによる仔魚の脾臓細胞幼弱化反応	92
5.4	考察	95
	文献	96
第六章 カロテノイド強化ワムシの投餌がマダイ・トラフグ種苗の生残率とリンパ球の幼若化反応に及ぼす影響		
6.1	目的	99
6.2	実験方法	
6.2.1	供試魚および飼育	99
6.2.2	餌料ワムシとその栄養強化	100
6.2.3	マダイ・トラフグの脾臓リンパ球の幼若化の測定	101
6.3	結果	

6.3.1	飼育結果	101
6.3.2	マダイ・トラフグ脾臓細胞の幼若化反応	107
6.4	考察	110
	文献	111
第七章	総括	114

第一章 緒言

1.1 本研究の目的

海産魚の種苗生産は、1960年代前半に、マダイ (*Pagrus major*), クロダイ (*Acanthopagrus schlegeli*)、ヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)のような沿岸で産卵し飼育しやすい魚種が可能になり、外洋で産卵するブリ (*Seriola quinqueradiata*)、カンパチ (*S. dumerili*)、ヒラマサ (*S. lalandi*)およびシマアジ (*Pscedocaranx dentex*)などはやや遅れてその技術が確立された¹⁾。本研究において対象魚種としたイシダイは、1967年に近畿大学で初めて種苗生産が行われ²⁾、1970年前後には、各地の水産試験場で種苗生産されるようになった。しかし、1975年前後まではその生産に餌料のワムシにナンノクロロプシス（当時の呼び名で海産クロレラ）で栄養強化したものが用いられ³⁾、各施設とも数万尾単位の生産に留まっていた。種苗の大量生産が可能になったのはワムシを油脂酵母で栄養強化する方法が開始されてからであり、⁴⁾ 著者の勤務する長崎市水産センターにおいてもこの方法により、これまでの数万尾単位の生産規模を10万尾単位のまで増産することを可能にした。

種々の魚種の種苗生産に併行して、種苗生産期の海産仔稚魚に病気が発症するようになり、その対策が1970年代からなされてきた。しかし、それが研究として取り組まれたのは1980年代に入ってからであった⁴⁾。そして、1986年10月に、昭和61年度日本魚病学会シンポジウムにおいて「海産魚の仔稚魚期における魚病問題」⁵⁾が取りあげられ、これが我が国における種苗生産過程で発病する病気に関する初めてのシンポジウムであった。その中で松里は、Table 1-1-2に示すような疾病と病状およびそれらの原因を示した。これらはいずれも主にその原因が寄生虫あるいは細菌性によるものであ

Table 1-1-1.

Disease in larval stage of red sea bream

Species .Disease name	Size of onset (mm)	note
Red sea bream		
abnormal egg		Caused by abnormality of oil globule fecundation abnormality and thermal control
Germ body aberratio in egg		Abnormality of oophoron envelope,chromosomal abnormality Mr.Kupper cell bulla abnormality
Abnormal larval fish	2-3	Stomatal opening deficiency,Fin anlage absence,Tarve tunica abnormality
Bladder stone	4-10	High salinity seawater culture
Abdomen distension disease	5-13	Caused by heart,Kidney or liver
Intestinum nebula	6-13	Catarrh,Lipid droplet,Epithelium reforming
Abnormal gill	8-15	No air bladder,Foreign matter in air bladder,Transformation
Epitheliocystis	15-50	
Gliding bacterial disease	9-30	
Vibriosis	15-60	
White spot disease	10-40	
Ichthyobodoosis	10-40	Hypodynamia,Tail fin white turbidness
Trichodinosis	30-60	Onset in high density culture
Thermal shock	2-15	
Pesticide poisoning	4-15	Including pesticide poisoning by artemia
Dietetic disease	10-60	
Nephrocalcinosis	30-50	Unknown

Table 1-1-2.

Disease in larval stage of Japanese flounder

Species .Disease name	Size of onset (mm)	note
Japanese flounder and others		
Bladder stone	5-20	High salinity seawater culture
Abdomen distension disease	7-9	Gastrectasia,Digestive tract distension
Intestinum nebula	8-20	Catarrh,Lipid droplet
Rhabdovirus symptom	all larval fish	Fin redness,Muscle internal bleeding,Air bladder inland
Ascites	5-20	waters stagnation
Vibriosis	15-30	Digestive tract atrophy
Streptococciosis	15-40	Brain,Nerve spine ,Vascular wall bleeding
Gliding bacterial disease	20-60	
Edwardsiellosis	20-30	Scratch,Gill omission,Tail fin bleeding
Bacterial gill disease	30-50	
Trichodinosis	20-50	Unknown difference with gliding bacterial disease
Ichtyobodo disease	50-60	
Oodimiosis	20-50	Mucosa hypersecretion
Scuticociliatidosis	30-50	
White spot disease	40-60	Unknown difference with gliding bacterial disease
Muscle internal bleeding	15-40	Anorexia
Thermal shock	5-30	
Spine aberratio	20-40	Heating culture
Color abnormality	40-60	Chlorosis, Melanism, Moiety chlorosis

った。

一方、1985年頃からイシダイ稚魚に原因不明の大量斃死が各地で頻発した。著者の長崎市水産センターにおいてもその例にもれなかった。その状況は、①急に食欲が無くなり、②活力を失い、表層を遊泳する魚が多く出現し、③これらの症状が発症後数日で大半の仔魚は死亡した。④生き残った魚も数日のうちに死を迎え全滅した。直ちにこの原因の究明を行ったが、外見や顕微鏡による観察では寄生虫による異常を認めず、細菌検査での病原細菌の観察も培養も認めなかった。長崎大学と長崎県水産試験場に依頼した結果では、電子顕微鏡レベルの病変を認め、その病変部は脊髄、脊髄神経節及び脳に限られ、体表や内臓諸器官には目立った変化を認めないという所見であった。また、病変部の神経細胞、神経繊維及び神経膠細胞には多数のウイルス様粒子が認められた。さらに、このウイルス粒子は正二十面体でエンベープを持たず、直径は 34nm と小型であった。以上より、この病気の原因は、ウイルス性の神経壊死 (Viral Nervous Necrosis: VNN) による諸生理機能の失調あるいは喪失に基づくものであると結論された。この知見は、海産魚の種苗生産でウイルス症が発生するとする初めての報告であった⁶⁾。以後イシダイ種苗生産はこのウイルスとの戦いとなった。

このウイルスは、その後、キジハタ (*Epinephelus akaara*)、シマアジ (*Pseudocaranx dentex*)、クエ (*E. moara*)、トラフグ (*Takifugu rudripes*)、マツカワ (*Verasper moseri*)、及びヒラメ (*Paralichthys olivaceus*)、の稚仔魚においても報告された。また、オーストラリア、タヒチおよび東南アジアの *barramundi* (*Lates calcarifer*)、フランスの sea-bass (*Dicentrarchus labrax*) およびノルウェーの turbot (*Scophthalmus maximus*)、の仔稚魚にも VNN によく似

た病状が発生した¹⁾。タイやシンガポールのハタ類(*Epinephelus malabaricus*, *E. tauvina*)の稚魚においても同様に認められ、未報告ではあるがこの病状が確認されている例にはマハタ(*E. septemfasciatus*)、カンバチ (*S. dumerili*)、イシガキダイ (*O. punctatus*)がある¹⁾。これまでに確認されている VNN ウイルス感染魚種は、3目8科15種(Table 1-2)とされ、イシダイのみならず広範囲の魚種におよんでいる¹⁾。したがって、この疾病は、現在あらゆる魚種の種苗生産の段階で最も注意を要するとされている¹⁾。

VNN ウイルス感染の主な経路には、親魚から卵を経由して仔魚に感染する垂直感染があげられている⁷⁾。その予防対策として、シマアジの例では VNN ウイルスに感染していない親魚の選別が行われている⁸⁾。それは、ELISA (Enzyme Linked-immunosorbent assay) による抗 VNN 抗体の検査を用い、非感作親魚を選別するものであったが、十分な発症予防にまでは至らなかった。そこで、産卵期直前の親魚生殖腺に PCR 法(Polymerase Chain Reaction:PCR)で VNN ウイルス遺伝子を検索し、選別する方法が取られ、予防効果をあげている^{9,10)}。しかし、この方法で産卵期直前には VNN ウイルス陰性であったシマアジ親魚の中に、産卵後期に陽性に転じる個体が出現した。この原因について、その後多回産卵、排卵誘発ホルモン注射、過密飼育などのストレスにより VNN ウイルスに対する抵抗力が低下し感染することが考えられた¹¹⁾。

この対策として、親魚へのストレスの軽減や、産卵期に使用する飼育水の紫外線照射やオゾン処理による消毒などがなされている。また、仔魚の飼育には消毒した水を用い、その餌料にはワムシやナンクロロプシスの培養水の消毒を行ったものを与えるなどの対策が有効とされている。しかし、多くの種苗生産施設では、親魚の海

Table 1-2.

Fish species affected by viral nervous necrosis (VNN)

Order Perciformes

Family Centropomatidae

Barramundi (*Lates calcarifer*)*1

Family Percichthidae

Sea bass (*Dicentrarchus labrax*)*1

Family Serranidae

Redspotted grouper (*Epinephelus akaara*)

Kelp grouper (*E. moara*)

Sevenband grouper (*E. septemfasciatus*)*2

Brownspeckled grouper (*E. malabaricus*)*1

Greasy reefcod (*E. tawina*)*1

Family Carangidae

Striped jack (*Pseudocaranx dentex*)

Purplish amberjack (*Seriola dumerili*)*2

Family Oplegnathidae

Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*)

Spotted parrotfish (*O. punctatus*)*2

Order Pleuronectiformes

Family Pleuronectidae

Barfin flounder (*Verasper moseri*)

Family Bothidae

Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)

Turbot (*Scophthalmus maximus*)*1

Order Tetraodontiformes

Family Triodontidae

Tiger puffer (*Takifugu rubripes*)

*1 Reported outside Japan, *2 Observed but not reported yet.

上飼育や種苗の成長に伴う沖出しによる海上生簀での飼育が行われるのが一般的であり、以上に述べた対策を十分に採用することがで

きないのが現状である。

一方、ウイルス感染症は、ウイルスが細菌感染症のように抗生物質に対して感受性を持たないため、薬剤による治療が極めて難しいとされている¹²⁾。従って、ヒトにおいては、そのウイルスを不活化あるいは弱毒化したいわゆるワクチンが用いられており、インフルエンザや天然痘等のウイルス感染症の防疫としてよく知られている¹³⁾。また、ヒトを含む哺乳類では、ウイルスやリケッチア、細菌などの感染症を予防する上で宿主自体が持つ免疫防御能を高めることが極めて重要なことも知られている。このうちウイルス感染症に対する宿主免疫防御能については、ヒトを含む哺乳動物がそのウイルスに感染すると、リンパ球や種々の細胞が抗ウイルス因子としてインターフェロン（：IFN）を産成し、ウイルスの増殖を抑える生体反応が生じるとされている¹⁴⁾。さらに、このIFNの産成はアジュバント活性物質(ビタミンAやペプチドグリカン等)によって上昇することも知られている^{15,16)}。またさらに、アジュバント活性物質のビタミンAは、栄養素の一つであると同時に、その大量投与が宿主の種々の免疫防御能を亢進させるとされている¹⁷⁾。そのプロビタミンAであるβ-カロテンは大量投与による過剰症がなく、免疫賦活効果を有するアジュバント活性物質としてその有効性が報告されている^{18,19)}。これらのことより、魚類においても、β-カロテンの大量投与が、ウイルスをはじめとする種々の感染症に対する免疫防御能を高めるのではないかと考えられる。

そこで本研究では、この点を明らかにし、魚類の、特にイシダイ仔魚におけるウイルス感染症に対するβ-カロテン大量投与による生体防御機構について検討した。

1.2 本研究に関連する従来の研究

魚類に IFN を介した免疫防御機構存在に関する研究は比較的少なく、Graham ら²⁰⁾ がニジマスのリンパ球が IFN を産出するであろうと報告している程度である。水産生物に対する β -カロテン添加餌料による影響では、クロアワビの餌料への β -カロテンの添加で生残率が向上したとの報告がなされている²¹⁾。カロテノイドの一種であるアスタキサンチンの養殖用飼料への添加では、マダイ^{22,23)} やアユ²⁴⁾ の体色改善効果があると報告され、現在マダイ養殖などで体色改善の目的で広く利用されているが、魚類の免疫防御能との関連については全く検討されていない。なお、仔魚期の種苗の免疫防御機能の測定は極めて難しいとされている。

1.3 本研究の概要

本研究は、魚類においても哺乳類と同様な IFN を介した免疫防御機構が存在するか否かについて検討し、その結果をふまえて、INF 産成に対するアジュバンド活性物質である β -カロテンやアスタキサンチンの餌料への添加が免疫防御能を亢進させることが出来るか否かについて検討した。これらの見地によって、現在魚類の疾病として対策が急務となっているウイルス感染症はもとより細菌感染に対して抵抗力の高い健康な魚の育成に役立てようとするものである。

第一章では、本研究の目的と従来の研究、本研究の概要について記述した。

第二章では、VNN 感染症やイリドウイルス症が問題になっている養殖イシダイを用い、魚類における INF を介した免疫機構存在の有無を検討した。

第三章では、 β -カロテン大量添加餌料でイシダイ一年魚を飼育

し、抗体産生、マクロファージの貪食能、IFN を介した免疫防御能等がどのような影響を受けるかについて検討した。

第四章では、これまで極めて難しいとされた仔魚期の種苗(全長 8mm 前後)の免疫防御機能の測定方法を脾臓細胞の幼若化反応を用いて行う簡易測定法の開発を検討した。

第五章では、種苗生産における初期餌料生物であるシオミズツボワムシ(以下「ワムシ」と記す)への β -カロテンの強化がイシダイ、イシガキダイの種苗生産で生残率の向上や第四章で検討した脾臓細胞の幼若化能に及ぼす影響について検討した。

第六章では、ワムシに β -カロテンとアスタキサンチンを強化し、マダイとトラフグの種苗生産を試み、生産した種苗の生残率、脾臓細胞の幼若化能に及ぼす影響について検討した。

文献

- 1) 室賀清邦：海産魚介類の仔稚におけるウイルス性および細菌性疾病．魚病研究, 30, 71-85 (1995).
- 2) 熊井英水，中村元二，原田輝雄：イシダイの親魚養成、人工ふ化および仔魚育成について．昭和 42 年度日本水産学会秋季大会講演要旨集．(1967), pp.20.
- 3) 福所邦彦：イシダイ仔魚におよぼすクロレラによる栄養強化ワムシの餌料効果．長崎水試研報, 3, 152-154 (1977).
- 4) 福所邦彦，岩本 浩，松岡正信，今田 克，藤田矢朗：油脂酵母ワムシによるイシダイの種苗量産．水産増殖, 26, 71-81 (1978).
- 5) シンポジウム講演要旨テーマ「海産魚の仔稚魚期における魚病問題」(昭和 61 年 10 月 2 日於いて高知会館)．魚病研究, 22, 35-61 (1987).

- 6) K. Yoshikoshi, and K. Inoue : Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*(Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13, 69-77 (1990).
- 7) M. Arimoto, K. Mushiake, Y. Mizuta, T. Nakai, K. Muroga, and I. Furusawa: Detection of striped jack nervous necrosis virus(SJNNV) by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). *Fish Pathol.*, 27, 191-195 (1992).
- 8) 虫明敬一, 中井敏博, 室賀清邦, 関谷幸生, 古澤 巖: シマアジのウイルス性神経壊死症: 仔魚の発病に対する親魚の抗体価および産卵飼育方法の影響. *水産増殖*, 41, 327-332 (1993).
- 9) K. Mushiake, T. Nishizawa, T. Nakai, I. Furusawa, and K. Muroga: Control of VNN in striped jack: Selection of spawners based on the detection of SJNNV gene by polymerase chain reaction (PCR). *Fish Pathol.*, 29, 177-182 (1994).
- 10) K. Mori, K. Mushiake, and M. Arimoto: Control measures for viral nervous necrosis in striped jack. *Fish Pathol.*, 33, 443-444 (1998).
- 11) 虫明敬一: シマアジ親魚の産卵に伴って増殖するウイルス性神経壊死症(VNN)原因ウイルス(SJNNV)とその抑制対策. *水産増殖*, 48, 109-115 (2000).
- 12) H. Fraenkel-Conrat and P. C. Kimball : ウイルス学 (三浦謹一郎, 池上正人, 矢崎和盛, 木村 穰 訳), 東京化学同人, 東京, 1985, pp. 385-394.
- 13) 松本修三, 谷内 昭 : 免疫学の予防, 治療への応用「医科免疫学 改訂第2版」(菊池浩吉編), 南江堂, 東京, 1980, pp. 464-485.

- 14) 福見秀雄：ウイルス・細菌とその感染症「岩波講座 現代生物科学 11」(天野恒久, 植竹久雄, 福見秀雄編), 岩波書店, 東京, 1975, pp.7-pp.24.
- 15) G. Dennert and R. Lotan: Effects of retinoic acid on the immune system: Stimulation of T killer cell induction. *J. Immunol.*, 118, 23-29 (1978).
- 16) S. Sone and I.J. Fidler: Synergistic activation by lymphokines and muramyl dipeptide of tumoricidal properties in rat alveolar macrophages. *J. Immunol.*, 125, 2454-2459 (1980).
- 17) K. Tachibana, S. Sone, E. Tsuburu, and Y. Kishino: Stimulatory effect of vitamin A on tumoricidal activity of rat alveolar macrophages, *Br.J.Cancer*, 49, 343-348 (1984).
- 18) J. Rhodes.: Human interferon action: Reciprocal regulation by retinoic acid and β -carotene. *JNCI*, 70, 833-836 (1983).
- 19) A. Bendich: Carotenoids and the immune response. *Am. In. Nutr.*, 199, 112-115 (1989).
- 20) S. Graham and C. J. Secombes : Do fish lymphocytes secrete interferon- γ ? . *J. Fish Biol.*, 36, 563-573(1990).
- 21) M. Tsushima and T. Matsuno : The role of β , β -carotene on growth and survival of Juvenile Japanese abalone *Haliotis discus*. *Fisheries Sci.*, 60, 660-661 (1998).
- 22) Y. Tanaka, T. Katayama, K.L.Simpson, and C. O.Chichester : The biosynthesis of astaxanthin-XX. The carotenoids in marine red fish and the metabolism of the carotenoids in sea bream, *Chrysophrys major Temminck* and *Schlegel*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 42, 1177-1182 (1976).

- 23) T. Fujita, M. Satake, T. Watanabe, C. Kitajima, W. Miki, K. Yamaguchi, and S. Konosu : Pigmentation of cultured red sea bream with astaxanthin diester purified from krill oil. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 49, 1855-1861(1983).
- 24) 松野隆男, 津島乙幸, 秋山敏男, 新井茂 : アスタキサンチンによるアユの体色改善. 水産増殖. 42, 101-106 (1994).

第二章 イシダイ脾臓細胞のコンカナバリン A 培養上清による腹腔マクロファージ(mφ) の活性化の検討

2.1 目的

魚類の養殖では、近年種々の感染症が多発している。¹⁾特にイシダイは、ウイルス病に弱く、種苗生産ではウイルス性神経壊死症が、養殖ではイリドウイルスが発症し、種苗生産や養殖において苦慮しているのが現状である²⁾。しかし、魚類における疾病に対して、現在のところ、細菌感染症には種々の抗生物質や合成抗菌剤などの研究成果が修められているが³⁾、ウイルス感染症には未だ十分な研究成果が得られていない。従って、病魚の早期発見と取り上げによる防疫対策が行われているのが現状である。ウイルス感染症に対する免疫防御機構となると研究は極めて少ない。

他方、哺乳類におけるウイルス感染症に関する研究は、既に古くから行われ、ワクチン開発や生体の防御機構の一つであるインターフェロン(INF)の生産を亢進させるアジュバンド活性物質などの知見が知られている。この INF は、ウイルス感染に対してウイルスを不活化するとされている⁴⁾。また、INF には数種のサブタイプが存在し、中でも γ -INF は抗ウイルス性を示すのみならず、生体の免疫機能全体をも亢進するとされている^{5,6,7)}。この INF を介した生体防御機能は種々の INF 栄養因子によって増強され、ビタミン A⁸⁾やその前駆物質である β -カロテン^{9,10)}或いはビタミン D、ビタミン E 等の大量投与が効果を示すことが知られており、特に β -カロテンは大量投与による過剰症を起こさないとされ^{11,12)}、現在ヒトをはじめ種々の哺乳動物を対象に検討がなされている。

そこで、本研究では、イシダイ当歳魚を用い、魚類においても INF を介した免疫機構が存在するか否かについて検討した。

2.2 実験方法

2.2.1 供試魚および飼育

供試魚には、著者が勤務する長崎市水産センターでふ化させ約 6～12 ヶ月間通常の餌料(モイストペレット)で飼育したイシダイ (*Oplegnathus fasciatus*)仔魚を用いた。

2.2.2 イシダイ脾臓細胞の採取と調整

イシダイの飼育約 6～12 ヶ月をキュウイエ氏管より血抜きを行い、完全に脱血死させた。これにより、腹腔に血液の混入を防いだ。次に腹部の鱗を剥離後 70%エタノールで消毒を行った。以後の操作は全てクリーンベンチ内で無菌的に行い、使用した器具は消毒したものを用いた。メスと解剖バサミを用いて開腹し、魚体右側面の腹部筋肉を解剖バサミで弧を描くように切除し、脾臓をピンセットで取り出した。これを海産魚の浸透圧になるように調整した FRPMI1640 培地(以降、FRPMI 培地)5ml を分取したシャーレ (FALCON 社、組織培養用)中に入れた。この中でピンセットを 2 本用い脾臓組織をほぐした後、これを氷冷したポリプロピレン製の遠沈管(SUMILON CENTRIFUGETUBE 15ml)中に FRPMI 培地で洗い流して移し、遠心(4℃、1500rpm、15min)して洗浄を行った。遠心上清を捨て、沈殿を後述する 5%FBS を添加した FRPMI 培地(CFRPMI 培地)4ml を加えよく混和して再浮遊させ、27G ツベルクリン針内を通して 5ml 注射筒内に吸引し、これを氷冷した別

のポリプロピレン製の遠沈管に数回に分けて勢い良く吹き出し、Single Cell 浮遊液とした。この液のリンパ球数を血球計算盤を用いて計測し、リンパ球数が 4×10^6 cell/ml となるよう CFRPMI 培地で調整した。

コンカナバリン A セファロース 4B($100 \mu\text{g/ml}$)の準備はコンカナバリン A セファロース 4B(SIGMA 社 懸濁液 1ml 当たり 15mg コンカナバリン A)を 0.33ml 取り、15ml 容のポリプロピレン製の遠沈管に入れ、先述した FRPMI 培地を 2.5ml 添加して遠心(2000rpm 15min)し、沈殿を採取し洗浄を行った。同様の洗浄操作を FRPMI 培地で 3 回繰り返す、防腐剤のメチロサルを取り除いた。これをコンカナバリン A セファロース 4B ビーズ調整液として用いた。

2.2.2-1 RPMI 1640 培地の作成

RPMI 1640 培地(日水製薬社製)	10.4g
炭酸水素ナトリウム	1.0g
超純水	1000 ml
ペニシリン G カリウム(明治製菓社製)	10 万単位
ストレプトマイシン(和光純薬社製)	0.1g

炭酸水素ナトリウムを除いた上記を乾熱滅菌した容器内で混合し、 CO_2 で pH6.0 位までにした後(培地の色が赤色からやや薄い黄橙色になるまで滅菌ピペットを用いて CO_2 を注入した。)、炭酸水素ナトリウムを加え完全に溶解させた。その後 $0.45 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターを通し、ろ過滅菌を行った。なお、使用した超純水は、

後述する LPS の混在を防ぐために用いた。この RPMI 1640 培地は哺乳類の組織培養に用いられるものであり、本実験では後述するマウスの実験の場合に用いた。本実験の海産魚類の場合には、浸透圧を調整した以下に述べる FRPMI 培地を用いた。

2.2.2-2 FRPMI 1640 培地の作成

本実験の海産魚の場合の組織培養には、上記の RPMI 1640 培地が哺乳類の浸透圧(NaCl 0.82%)であるため、魚類の浸透圧に調節するために、塩化ナトリウム(1.35%-0.82%=0.53%)5.3g を添加して用いた。この培地を FRPMI 培地と呼ぶ。

2.2.2-3 CFRPMI 1640 培地の作成

FBS(牛胎児血清、Fetal Bovine Serum GIBCO 社製)を 56 °C の温水中で 40 分間加熱し、血清中に含まれる補体を不活化し、使用するまで-70°Cで凍結保存した。これを先の RPMI 培地および FRPMI 培地に 5%添加し、CFRPMI 培地として用いた。

2.2.3 イシダイ脾臓細胞の培養

先に 4×10^6 cell/ml に調整した脾臓細胞浮遊液をシャーレ(FALCON 社、組織培養用)中に 2.5ml 入れ、先の洗浄を行ったコンカナバリン A セファロース 4B ビーズ(ConA.S.4B.)の終濃度が $100 \mu\text{g/ml}$ となる様に調整したものを 2.5ml 添加した。したがって、脾臓細胞の終濃度は 2×10^6 cell/ml となった。これを CO₂ インキュベータ(25°C 5% CO₂)内で 48 時間培養した。この間数回、培養に用いた組織培養用シャーレを振り、ConA.S.4B.のビーズ上で増殖

した細胞を再浮遊させ、再び細胞の増殖を促した。培養 48 時間後、培養液を 15ml 容のポリプロピレン製の遠沈管に移し、遠心(4℃ 2000rpm 15min)し上清を分取した。この上清を 0.45 μ m のフィルター(ADVANTEC TOYO 社 DISMIC-25)でろ過後、分注して実験に供するまで冷凍保存した。また、対照として、ConA.S.4B. を添加しなかった脾臓細胞培養上清も同様にして作成した。なお、前者を ConA.S.4B. 培養上清後者を培地のみと略して表わした。

2.2.4 イシダイ腹腔マクロファージ(m ϕ)の調整

2.2.4-1 イシダイ腹腔滲出細胞の採取

イシダイの活魚腹部の鱗を少し剥離し、あらかじめ先を丸く処理しておいた注射針を用いチオグリコレート培地(栄研化学社製)約 5ml を内臓を傷つけない様に注意して腹腔内に注射した。活魚を水槽にもどし、注射 5 日後、活魚の状態が無菌的に開腹し、腹腔内を滅菌ピペット(2ml)を用いて約 20℃に保持しておいた生理食塩水と 1~2ml 注入して洗浄し、その洗液を氷冷しておいた 15ml 容のポリプロピレン製遠沈管に回収し、その洗液の総量が 1 尾当たり 15ml 程度となるまで洗浄をくりかえした。遠心(4℃、1500rpm、10min)し、その洗液を上澄を捨て細胞を回収して、これを腹腔滲出細胞とした。なお、チオグリコレート培地の作成は、純水 100ml にチオグリコレート培地(栄研化学社製)3g を溶解し、沸騰浴中で培地中の寒天が完全に溶解したのを確認してから、スクリーバイヤルに分注(5,10ml)し、オートクレイブで 121℃ 2 分間滅菌した。

また、一般に LPS [リポ多糖類(Lipopolysaccharide)] は、グラム陽性菌の内毒素として、種々の m ϕ 機能を活性化することが知

られている。そこで LPS の影響を取り除くために本実験に使用するガラス製のピペット(1,2,5,10ml)、ビーカー、フラスコ、培地、ビン等のガラス器は 180℃、4 時間乾熱処理を行い殺菌すると同時に LPS を加熱不活化した。

2.2.4-2 イシダイ腹腔滲出細胞浮遊液の調整

先に採取した腹腔滲出細胞に CFRPMI 培地を 2ml 添加し、均一なるようによく混和して浮遊させ、その浮遊液 100 μ l を分取して小試験管内に取り 2%酢酸溶液 100 μ l を加えてよく混ぜた。その数分後、一部を血球計算盤にとり混液中の m ϕ 数を概算した。この混液中の m ϕ 数が 1×10^6 cell/ml になるように調整し、これを腹腔滲出細胞浮遊液として実験に用いた。

2.2.4-3 イシダイ腹腔滲出細胞の形態的分類

先で採取した腹腔滲出細胞を形態的に分類し、計測するために細胞遠心法¹⁴⁾を用いて行った。即ち、浮遊細胞回収用遠心バケツト(トミー精工、東京)を用い、まず塩化ビニール板の上に清浄なスライドガラス、ろ紙、ラバーシートの順にのせて、バケツトの所定の位置にセット固定した。その上部に先で調整した腹腔滲出細胞浮遊液を 1~2 滴落とし、それにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)あるいは生理食塩水 200 μ l を加えた後、このバケツトを遠心(800rpm 4min)した。遠心バケツトを取り出し、先とは逆にろ紙をスライドガラス上から剥離させた。なお、この際スライドガラス上に沈殿した細胞がはずれないように十分注意を払った。スライドガラスを風乾後、メイ液(メルク社製)を 200 μ l 落とし、蓋のあるシャーレ内に静置

して 30 秒間固定を行った。これに等量の純水を添加し再び蓋をして 1 分 30 秒ほど染色を行った。その後純水でスライドガラス上を洗浄し、風乾を行い封入後、光学顕微鏡(Nikon OPTIPHOT)を用いて顕鏡観察した。

2.2.4-4 イシダイ腹腔滲出細胞中からの mφ の単離

先の腹腔滲出細胞浮遊液中にマクロファージ以外の細胞の混在があったため、その 200 μ l をシャーレ(FALCON 社、組織培養用)内に敷いたがカバーガラス上に落とし、これを CO₂ インキュペーター(25℃ 5%)で 1 時間培養しプレATINGした。その後、カバーガラス上を生理食塩水で洗浄し、カバーガラス上に付着しなかった細胞を除去し、カバーガラス上に残った細胞を腹腔 mφモノレイヤーとした。

2.2.4-5 イシダイ腹腔マクロファージの確認

一般に人を含む哺乳類の mφ は非特異的エステラーゼ活性が組織科学的に強陽性であるとされている。そこで α -ナフチルブチレートを基質とした非特異的エステラーゼ染色を行い、びまん性赤褐色反応産物がみられた細胞を mφ であるとして確認した。即ち、先のカバーガラス上マクロファージとして単離した細胞を 2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、PBS で洗浄を行った後、 α -ナフチルブチレートを含む基質溶液中に浸し 37℃で 45~180 分間反応させた。その後、洗浄を行い、2%メチルグリーンで核を染色し、再び洗浄して M・X 封入剤で封入し顕鏡観察した。染色に用いた反応液の作成は以下のものであった。

HPR 液 A 液:塩酸パラローズアニリン(SIGMA 社製)1g を 20ml の純水に溶かし、濃塩酸 5ml を加え緩やかに加温後、冷却、ろ過した。

B 液 : 4%亜硝酸ナトリウム水溶液

HPR 調整液 : 前述の A 液、B 液を 0.5ml ずつ混合し振り混ぜ、1N NaOH を用いて pH5.0 に調整した。

新調 HPR 調整液 : HPR 調整液 1 ml に 0.1M 酢酸ナトリウム溶液を 2N 酢酸で pH5.0 に調整した液を 10ml 加えた。

基質: α -ナフチルブチレート(SIGMA 社製)を用いた。

反応液:1/15M リン酸緩衝液 pH6.3、9.5ml に新調 HPR 液 0.05ml を加え、基質 α -ナフチルブチレート 10mg を溶かしたエチレングリコールモノメチルエーテル 0.5ml を加え、ろ過後直ちに使用した。

2.2.5 イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清のイシダイ腹腔 m ϕ 活性化の測定

2.2.5-1 イシダイ腹腔 m ϕ の貪食能の測定

先に述べた 2.2.4-4 で単離した m ϕ モノレイヤーを 2.2.3 で得た ConA.S.4B.培養上清 CFRPMI 培地での種々濃度下で培養した。その培養は、CO₂ インキュベータ(25.0℃ 5%CO₂)内で 4 時間行った。培養後、生理食塩水で洗浄した後、それに不活化酵母(日本製粉社ドライイースト)を 4.6×10^5 cell/ml となるように懸濁させた CFRPMI 培地を 4ml 添加し、30 分及び 60 分培養し、m ϕ に酵母を貪食させた。その後 1/15M リン酸緩衝液(pH7.2)で 2 回洗浄し、

メイギムザ染色を施し、光学顕微鏡(×100)を用いて mφ を 200 個以上観察し、mφ の数と mφ に貪食されている酵母の数を計測した。なお、それぞれの ConA.S.4B.培養上清で培養した mφ の貪食能は一般に用いられている、下記に示す計算式で算出した貪食指数(Phagocyto Index)で表した。

貪食指数 = ① × ②

①: (mφ に貪食された不活化酵母の総数) / (観察した mφ の総数)

②: (不活化酵母を貪食している mφ の総数) / (観察した mφ の総数) × 100

2.2.5-2 イシダイ腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性の測定

先に述べた 2.2.4-2 で調整した腹腔滲出細胞浮遊液を 96 穴(ウエルの)マイクロテストⅢプレート(FALCON 社)の各穴に 200 μl 注入し、CO₂ インキュベータ(25.0℃ 5% CO₂)内で 1 時間培養した。その後、プレートの各ウエルを先のカバーガラスと同様に、生理食塩水で 2 回洗浄した。洗浄後、ウエルの各列に 2.2.3 で得た ConA.S.4B..培養上清の種々の濃度の物を入れ、CO₂ インキュベータ(25.0℃ 5% CO₂)内で 24 時間培養を行った。培養後、各ウエルを生理食塩水で 3 回洗浄し、1/15M 酢酸緩衝液(含 5mM EGTA)100 μl を加え、-40℃ による凍結と室温による凍結融解を 3 回繰り返して、mφ の細胞膜を破壊し、細胞内のペルオキシダーゼを遊離させた。各ウエルに基質の ABTS 溶液を、100 μl 加え、37℃ で約 20 分間反応させ、直ちに各ウエルの 405nm 吸光度をマイクロプレートリーダー(東ソー社製 マイクロプレートリーダー MPR-A4I)で測定した。

基質 ABTS 溶液(200ml)の組成は以下の様であった。

ABTS[2,2'-アジノービス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)

ニアンモニウム塩]0.1096g

クエン酸 4.2g

反応液は上記を混合した溶液 10ml に 30% H_2O_2 溶液 10 μ l を加え攪拌の後直ちに使用した。

2.2.6 イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の熱および

pH 安定性の測定

2.2.6-1 イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の熱安定性

先の 2.2.3 で調整した ConA.S.4B.培養上清の 56 $^{\circ}$ C における熱安定性は以下のように行った。ConA.S.4B.培養上清をプラスチック製チューブ(コーニング社製、2511S)に分注し、ウォーターバス中の 56 $^{\circ}$ C で 30 分間熱処理した。直ちに氷中で急冷却し、これを 2.2.5 の ConA.S.4B.培養上清の代わりに用いて同様の実験を行った。

2.2.6-2 イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.添加培養上清の pH 安定性

先の 2.2.3 で調整した ConA.S.4B.培養上清の pH 2.0 における安定性は以下のように行った。ConA.S.4B.培養上清 10ml を分取し 100 倍量の 0.1M グリシン-塩酸緩衝液 pH2 に対して 4 時間透析を行った。その後 0.1M のリン酸緩衝液 pH 7 で 24 時間透析後、それを CFRPMI 培地で 10ml に定容した。さらに、これを 0.45 μ m のメンブランフィルターでろ過した後これを 2.2.5 の ConA.S.4B.

培養上清の代わりに用いて同様の実験を行った。

2.2.7 イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の腹腔 mφ 活性化に対する種特異性の測定

2.2.7-1 供試動物

日本クレア社の C57/6J 雄マウス 10 週令 体重 24~26g と先に述べた養殖イシダイ（長崎市水産センター）とを用いた。

2.2.7-2 マウス脾臓細胞の ConA.S.4B.刺激培養上清の作成

ネンブタール麻酔液（アボットラボラトリーズ社製 ベントバルピタールナトリウム 50g/ml）麻酔下で、頸動脈を切断し、脱血死させ、腹膜を切開し無菌的に脾臓を摘出し、先のイシダイの場合と同様に操作し ConA.S.4B.培養上清を採取した。なお、海産魚類と哺乳類では浸透圧が異なるため、2.2.2-1 で述べた RPMI 1640 培地を用いた。

2.2.7-3 マウス腹腔マクロファージ(mφ)の調整

マウスに 1ml チオグリコレート培地 1ml を腹腔内注射し、その 5 日後にエーテル麻酔下で頸動脈をハサミで切断し脱血死させた。腹部上皮にハサミを入れて開腹し腹腔内に 37℃ に保持した滅菌生理食塩水（0.82% NaCl 超純水使用）を注射して洗浄し、それを数回くりかえして洗浄液の総数が 1 匹当たり 15ml になるように採取した。その後の浮遊液の調整およびマクロファージの単離と確認はイシダイの場合と同様に行った。

2.2.7-4 イシダイ脾臓細胞 ConA.S.4B.培養上清のマウス腹腔 mφ 活性化の測定

イシダイ脾臓細胞 ConA.S.4B.培養上清を用い、異なる種のマウス腹腔 mφ に対する活性化の測定を、先の 2.2.5 と同様な操作で行った。

なお、貪食能及びペルオキシダーゼの両者とも CO₂ インキュベータ温度は 37℃ と異なった。

2.2.7-5 マウス腹腔 ConA.S.4B..培養上清のイシダイ腹腔 mφ 活性化の測定

先の 2.2.7-4 とは、マウス上清とイシダイ mφ を逆にして、同様に実験を行った。なお、この際の CO₂ インキュベータ温度は 25 °C でおこなった。

2.2.7-6 マウス腹腔 mφ 機能の測定

マウス腹腔より調整した mφ の機能を不活性化酵母に対する貪食能とペルオキシダーゼの活性で測定した。なお測定は先のイシダイと同様の測定法を行い培養温度は 37 °C、培地には NaCl 無添加の CPRPMI 培地を用いた。

2.3 結果

2.3.1 イシダイ脾臓細胞のコンカナバリン A セファロース 4B 添加培養

ふ化後 6~12 ヶ月のイシダイより調整した脾臓細胞をコンカナバリン A の結合したセファロース 4B(ConA.S.4B.)と 48 時間培養

を行った。その一部をとり顕微鏡観察すると、セファロース 4B のビーズの球面部に細胞の増殖増が多数みられた(Fig. 2-1-A)。

一方、対照の ConA.S.4B.無添加の場合では、個々の細胞は多数みられるものの増殖増は観察されず、細胞数も ConA.S.4B.添加の場合よりも非常に少なかった(Fig. 2-1-B)。これらの結果は、イシダイ脾臓細胞は ConA.S.4B.添加によって、その球面部で幼若化が亢進することを示している。

2.3.2 イシダイ腹腔滲出細胞の検討

イシダイ腹腔内にチオグリコレート培地を注入して誘導したイシダイ腹腔滲出細胞のサイトスピン後にメイギムザ染色を行った形態的判定は、その約 60%がマクロファージ(mφ)であろうと推定された (Fig. 2-2)。

そこで、この腹腔滲出細胞をカバーガラス上にプレーティングし、洗浄を行った後、カバーガラス上で α -ナフチルプチレートを経質として、非特異的エステラーゼ染色を行った。その結果は細胞の約 95%がびまん性の赤褐色に染色され腹腔 mφであると推定された (Fig. 2-3)。これらの結果より、イシダイ腹腔 mφは腹腔滲出細胞をカバーガラス上にプレーティングすることによって、モノレイヤーとして得られることが判明した。

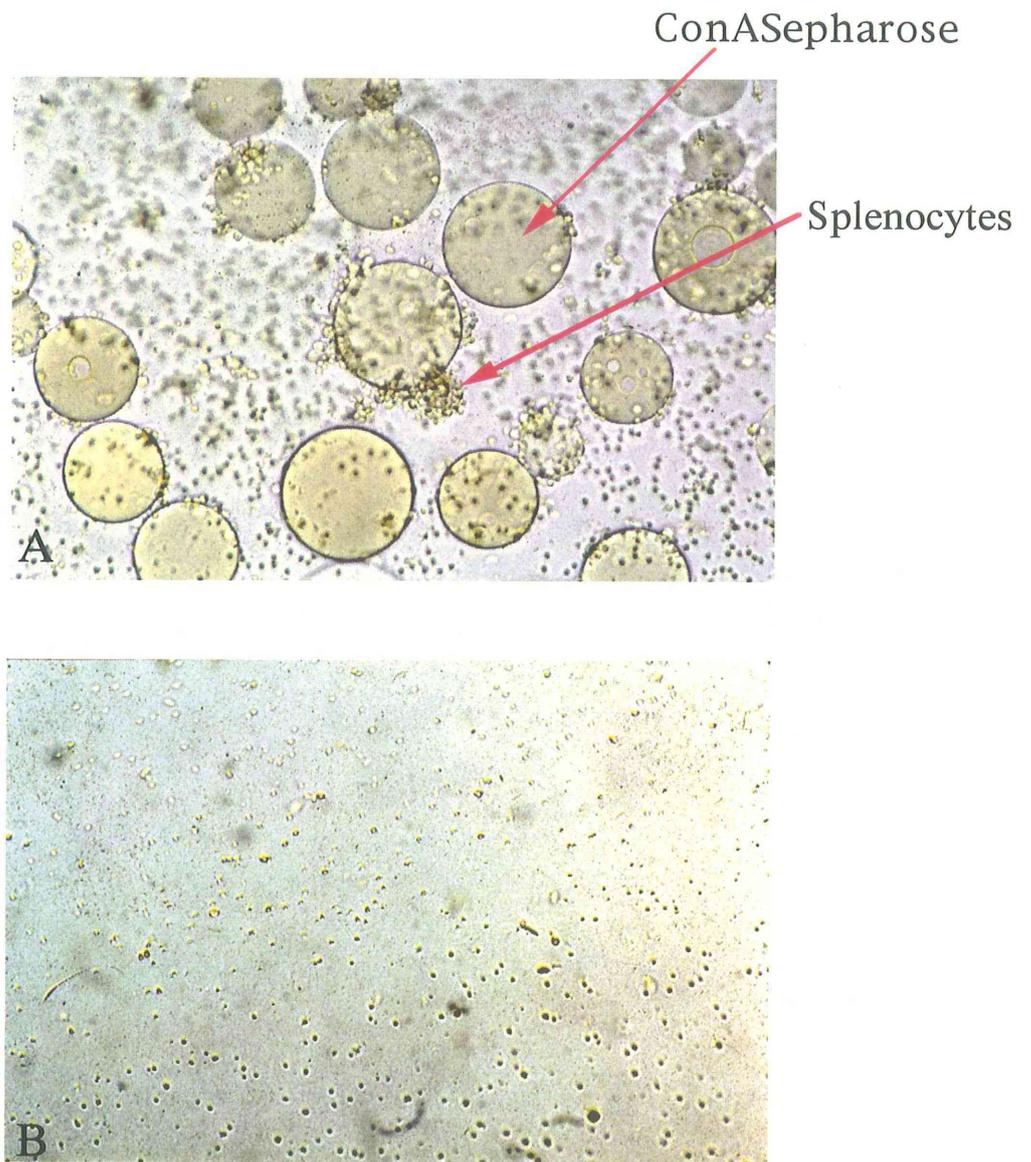


Fig.2-1 Photographs of Japanese parrotfish splenocytes with or without Con A Sepharose 4B

- A: Splenocytes were cultured with Con A Sepharose 4B for 48hr.
Arrow shows blastogenesis of splenocytes on Con A Sepharose 4B.
- B: Splenocytes were cultured without Con A Sepharose 4B for 48hr.

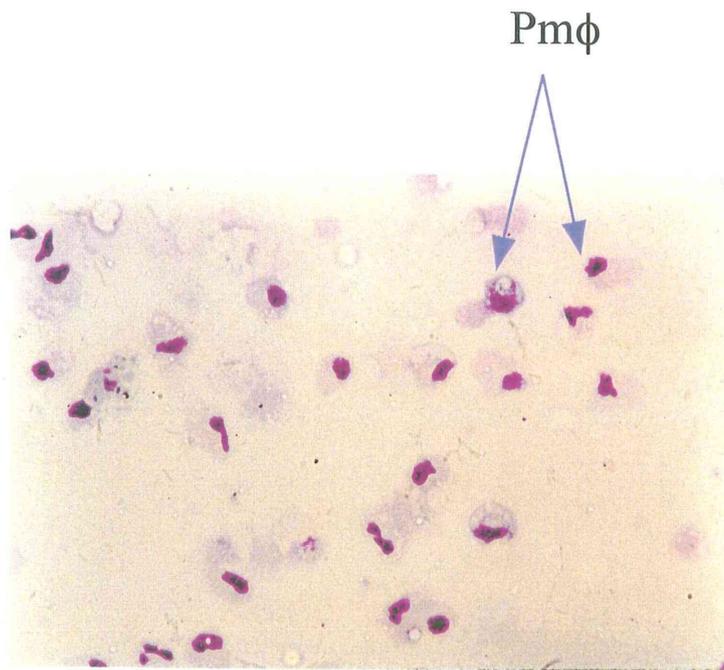


Fig.2-2 Photograph of peritoneal exudate cell

Peritoneal exudate cells were obtained by peritoneal lavage with physiological saline at 5 days after induction by thioglycollate medium. The cells stained by the method of May-Giemsa after cytopspin. Pmφ were >60% in the peritoneal exudate cell.

Pm ϕ

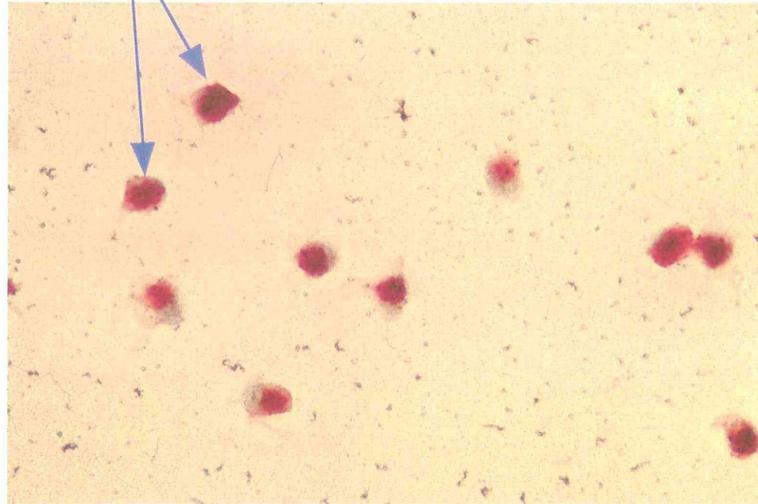
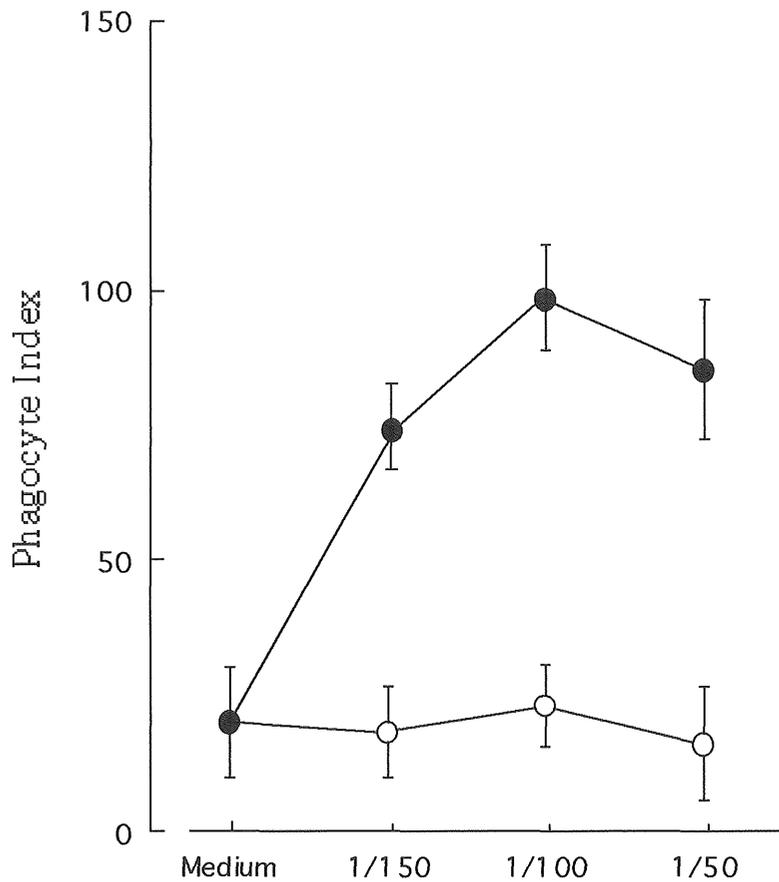


Fig.2-3 Photograph of cytochemical α -Naphthyl butyrate esterase activity of adherent cell.

Peritoneal exudate cells were adhered for 1hr in RPMI 1640 medium, then washed 3 times with physiological saline. Adherent cells were analyzed histochemically by the staining of α -Naphthyl butyrate esterase. Pm ϕ were >95% in the adherent cells.

2.3.2-1 イシダイ腹腔 mφ の貪食能

先で得たイシダイ腹腔 mφ にイシダイ脾臓細胞を培養する際の培地を加えて(ConA.S.4B.無添加で以降培地のみと呼ぶ)培養を行った。その mφ に不活性酵母を 1 時間貪食させた貪食指数(Phagocyte Index)は 20.43 で、培地のみ 150 倍希釈、100 倍希釈、50 倍希釈でも、貪食指数はほぼ一定の値であった。しかし、イシダイ脾臓細胞を ConA.S.4B.添加して培養上清を加えて先と同様に培養すると、mφ の貪食指数は、150 倍希釈 76.02、100 倍希釈 96.03、50 倍希釈 80.35 と 100 倍希釈をピークとした一峰性の変化を示した。培地のみと ConA.S.4B.培養上清添加の場合の mφ の貪食指数は 150 倍希釈では培地のみ約 4 倍に、100 倍希釈では約 4.6 倍に、また 50 倍希釈では約 4.4 倍にそれぞれ上昇し、イシダイ脾臓細胞を ConA.S.4B.添加で培養した上清は、イシダイ腹腔内 mφ の貪食能を高めると考えられた(Fig. 2-4)。

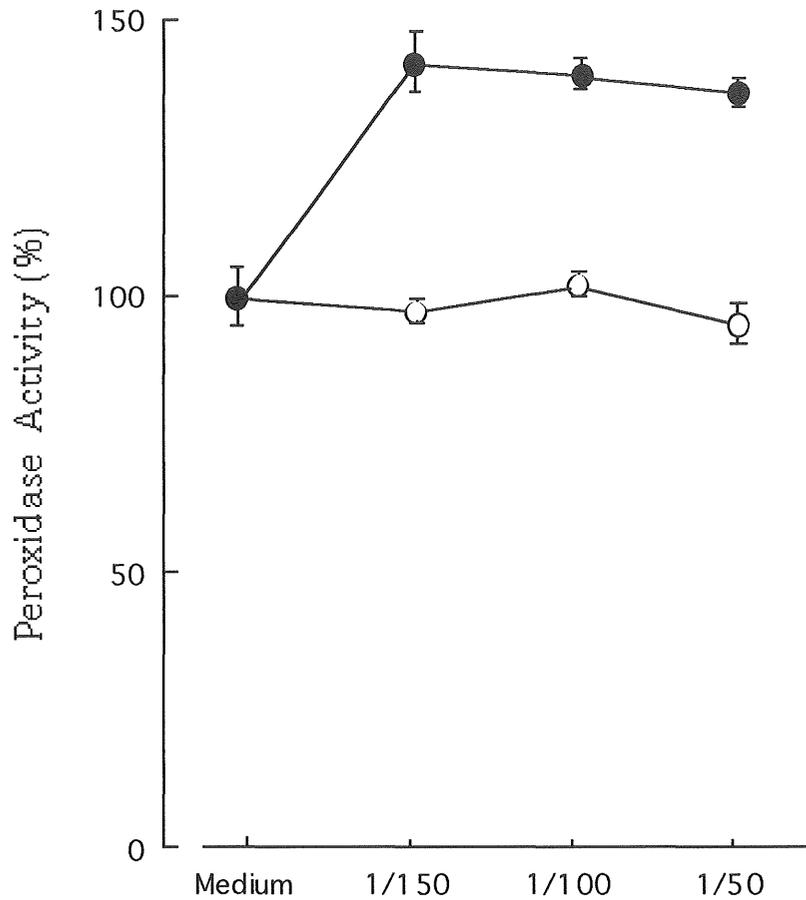


Dilution of NR Sup. or Con A-Stimulated Sup.

Fig.2-4 Augmentation of phagocytic capacity of Pm ϕ by Con A stimulated supernatants
 Pm ϕ monolayers were incubated for 4 h with the indicated dilutions of Con A-stimulated supernatants (●) or normal supernatants (NR sup. : ○). Phagocytosis assay was terminated after 60 min. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 3 independent experiments.

2.3.2-2 イシダイ腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性

イシダイ腹腔 mφ を先の場合と同様にして培養した 1 時間後のペルオキシターゼ活性は、吸光度で培地のみの場合を 100%とすると、ConA.S.4B.培地上清の添加 150 倍希釈 140%、100 倍希釈 134 %、50 倍希釈 130%と ConA.S.4B.培養上清の添加により上昇した。しかし、培地のみの 150 倍希釈、100 倍希釈、50 倍希釈での活性は、ほぼ一定の値であった(Fig. 2-5)。即ち、イシダイ脾臓細胞は、幼若化の亢進によって、イシダイ腹腔内 mφ のペルオキシターゼ活性を高めるような物質の生成が高まると考えられた。



Dilution of NR Sup. or Con A-Stimulated Sup.

Fig.2-5 Augmentation of peroxidase activity of Pm ϕ by Con A stimulated supernatants
Pm ϕ monolayers were incubated for 4 h with the indicated dilutions of Con A-stimulated supernatants (●) or normal supernatants (NR sup. : ○), then peroxidase activity was measured. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 3 independent experiments.

2.3.3 イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.添加培養上清の熱(56 °C)および酸(pH 2)に対する安定性

哺乳動物の脾臓細胞は幼若化が亢進する際に腹腔内 mφ の貪食能やペルオキシターゼ活性を高める γ -インターフェロンが生成されるとされ、また この γ -インターフェロンは熱や酸に対する安定性が低いとされている。そこで、イシダイ脾臓細胞を ConA.S.4B. を添加して培養した上清を 56 °C の熱処理および pH2.0 の酸処理を行って、イシダイ腹腔内 mφ の貪食能やペルオキシターゼ活性に対する活性化作用に対して検討を行った。

2.3.3-1 イシダイ腹腔 mφ の貪食能

イシダイ腹腔内 mφ の貪食能における活性化作用はイシダイ脾臓細胞を ConA.S.4B. を添加して培養した上清の 150 倍希釈 82.31、100 倍希釈 79.57、50 倍希釈 84.01 と培地のみ 42.64 より上昇したのに対して、56 °C 熱処理を行った場合ではそれぞれ 41.32、39.47、29.56 と下降した。また、pH2.0 の酸処理を行った場合では、それぞれ 43.52、38.15、30. と低下を示した(Fig. 2-6)。これらの結果はイシダイ脾臓細胞の幼若化の亢進によって生成されたイシダイ腹腔内 mφ 貪食能を活性化した物質が 56 °C 熱処理や pH2.0 酸処理でその活性化作用が消失したのではないかと考えられた。しかし、その活性化作用が熱や酸処理によって添加濃度の上昇に伴って下降した点については不明であった。

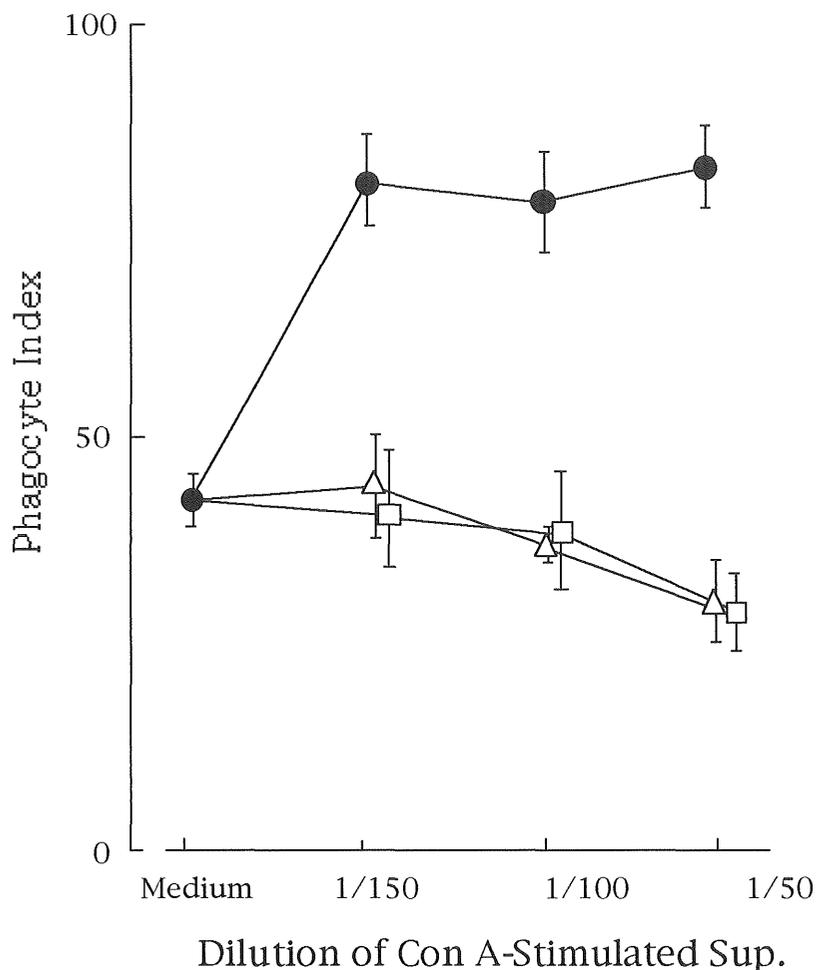


Fig.2-6 Effects of acid (pH 2) or heat (56°C) treatment of Con A stimulated supernatants on phagocytic activity of Pm ϕ . Acid treatment of Con A stimulated supernatants was carried out by dialysis against 0.1 M glycine-hydrochloric acid buffer (pH 2) for 24 h. Heat treatment of Con A stimulated supernatants was carried out by heating at 56 °C for 30 min. Pm ϕ monolayers were incubated for 4 h with the indicated dilutions of non-(●), acid-(△) or heat-(□) treated Con A-stimulated supernatants. The phagocytic activity was assayed in the same way as described in Fig. 2. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 2 independent experiments.

2.3.3-2 イシダイ腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性

イシダイ腹腔内 mφ のペルオキシターゼ活性に対する活性化作用は(Fig. 2-7)、熱や酸非処理の場合が培地のみ O.D.=100%、150倍希釈 137%、100倍希釈 141%と上昇したが、50倍希釈では54%と低くなった。これに対して、56℃熱処理を行った場合では培地のみ100%、150倍希釈68%、100倍希釈で93%、50倍希釈で65%を呈し、先の無処理の場合よりも低値を示した。また、pH2.0処理を行った場合も培地のみ100%、150倍希釈88%、100倍希91%、50倍希釈67%と無処理の場合よりも低値を示した。これらの結果は、イシダイ脾臓細胞の幼若化の亢進によって生成されたイシダイ腹腔内 mφ のペルオキシターゼ活性を活性化した物質が56℃熱処理やpH2.0酸処理でその活性化作用は消失したのではないかと考えられた。しかし、無処理の場合の50倍希釈での活性の下降についての原因は明らかでない。

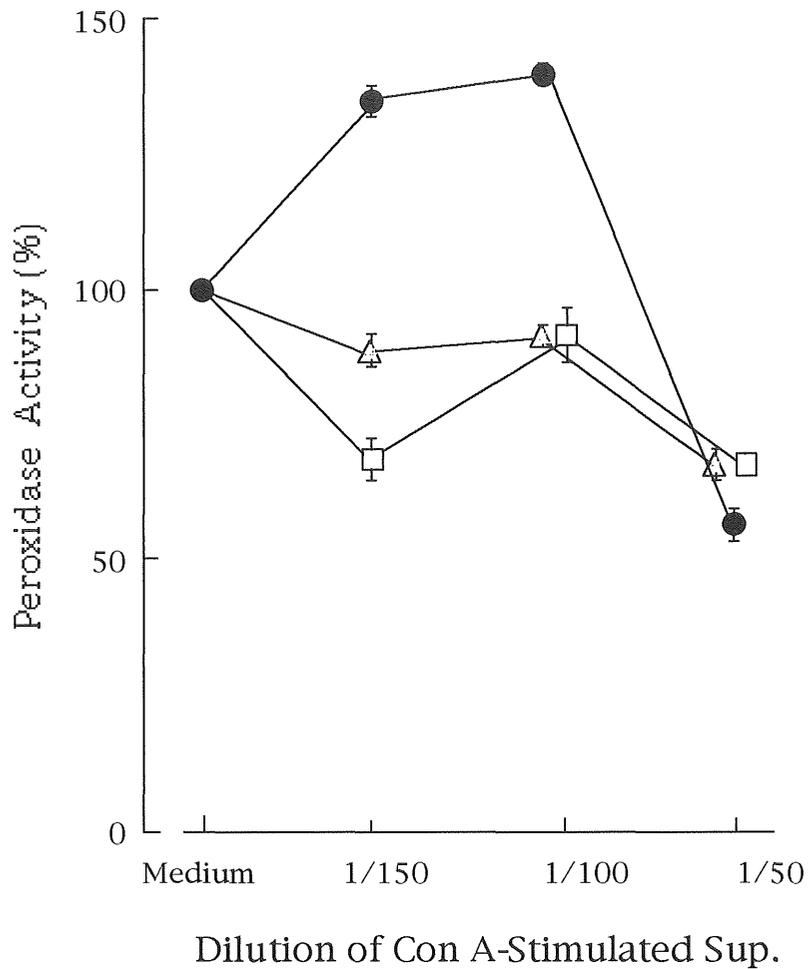


Fig.2-7 Effects of acid (pH 2) or heat (56°C) treatment of Con A stimulated supernatants on peroxidase activity of Pm ϕ Pm ϕ monolayers were incubated for 4 h with the indicated dilutions of non-(●), acid-(△) or heat-(□) treated Con A stimulated supernatants, and then peroxidase activity was measured. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 2 independent experiments.

2.3.4 イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の種特異性

哺乳動物の脾臓細胞は幼若化が亢進される際に腹腔内 mφ の貪食能やペルオキシターゼ活性を高める γ -インターフェロンが生成されるとされているが、この γ -インターフェロンは異なる種間ではその活性化作用がないと言われている。そこで、脾臓細胞を ConA.S.4B.添加して培養した上清の腹腔内 mφ に対する活性化作用をイシダイとマウス間で種特異性を検討した。

2.3.4-1 マウス腹腔内 mφ への貪食機能

マウス腹腔内 mφ の貪食能における活性化作用は(Fig. 2-8)、培地のみ 71.58(Phagocyte Index)、マウス脾臓細胞 ConA.S.4B.培養上清 150 倍希釈 96.79、100 倍希釈 133.20、50 倍希釈 51.82 と 150、100 倍希釈で上昇し 50 倍希釈で低下したのに対して、異種であるイシダイ脾臓細胞 ConA.S.4B.培養上清の場合ではそれぞれ 46.88、11.58、34.69 と全ての希釈培地で培地のみより低値を示した。すなわちマウス腹腔 mφ の貪食能を上昇させるためには、同種であるマウス脾臓細胞 Con A 培養上清が必要であり、イシダイ脾臓細胞 ConA.S.4B.培養上清はマウス mφ の貪食能に対してはむしろ阻害的作用を示した。

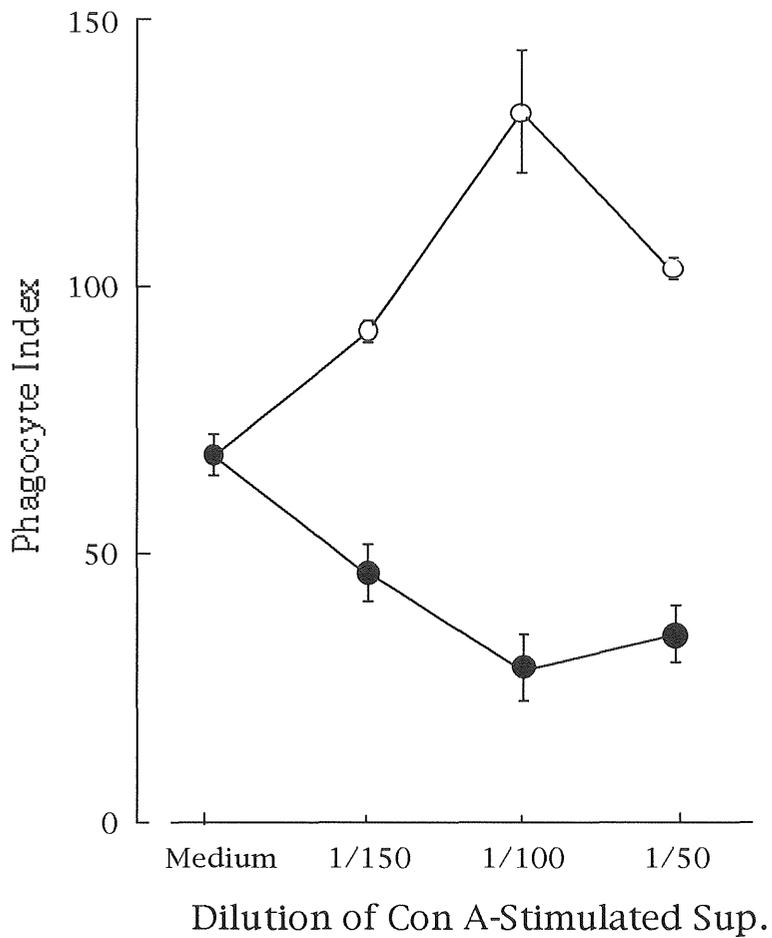


Fig.2-8 Effect of a different splenocyte source of Con A-stimulated supernatants on the phagocytic activity of mouse Pm ϕ . Mouse Pm ϕ were incubated for 4 h with the indicated dilutions of Con A-stimulated syngeneic (mouse:○) or heterogenic (Japanese parrotfish : ●) splenocytes supernatants for 4 h. The phagocytosis assay was terminated after 120 min. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 2 independent experiments.

2.3.4-2 マウス腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性

マウス腹腔内 mφ のペルオキシターゼ活性に対する活性化作用は(Fig. 2-10)、培地のみ 0.100 (100%)、マウス脾臓細胞 ConA.S.4B. 培養上清 150 倍希釈 0.149(149%)、50 倍希釈では 0.163(163%)と上昇した。これに対して、イシダイ脾臓細胞 ConA.S.4B.培養上清 150 倍希釈 0.109(109%)、50 倍希釈で 0.102(102%)培地のみより著明な変化を示さなかった。すなわち先で述べた食食能と同様、マウス腹腔 mφ のペルオキシターゼ活性を上昇させるためには、同種であるマウス脾臓細胞 Con A 培養上清が必要であった。

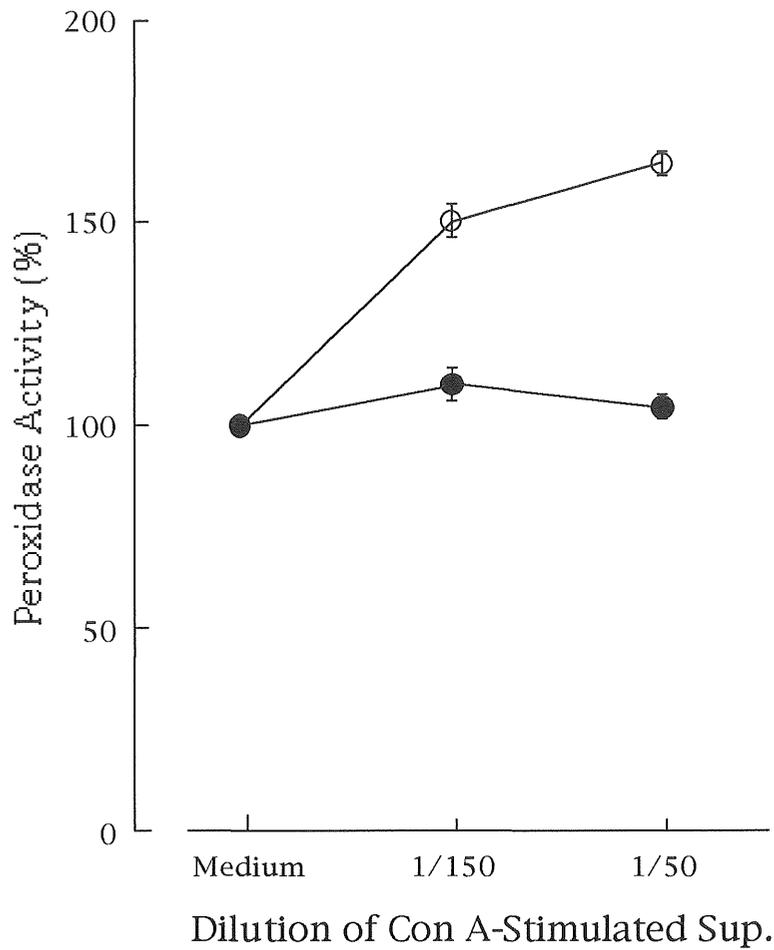


Fig.2-9 Effect of a different splenocyte source of Con A-stimulated supernatants on peroxidase activity of mouse Pm ϕ . Mouse Pm ϕ were incubated for 4 h with the indicated dilutions of Con A-stimulated syngeneic (mouse: ○) or heterogenic (Japanese parrotfish : ●) splenocytes supernatants for 4 h and then peroxidase activity was measured. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 2 independent experiments.

2.4 考察

魚類のイシダイにおいても哺乳類と同様の INF を介した免疫機能の有無を検討するため。イシダイ脾臓細胞を ConA.S.4B.と培養したところ、細胞の増殖像がみられた。この培養上清をイシダイ腹腔 mφ と培養したところ mφ の貪食能は上昇し、ペルオキシターゼ活性においても顕著な活性化がみられた。これらのことより、イシダイ脾臓細胞は幼若化の亢進によってイシダイ mφ の貪食能やペルオキシターゼ活性を高めるような物質の生成が高まると考えられた。

ヒトをはじめとする哺乳動物では、リンパ球をコンカナバリン A やヒトヘムアグルチニンなどの幼若化誘導物質で培養するとリンパ球中の T リンパ球が幼若化といわれる分裂を起こし、その過程で培養上清中に γ -インターフェロン (γ -INF) を含むリンホカインを産生することが知られている。また、幼若化リンパ球より産生された γ -INF は *in vitro* で mφ を活性化し、その伸展性(spreading)の増大、非特異的或いは、オプソニン化した(抗体感作)細菌や赤血球などに対する特異的貪食能の上昇、腫瘍細胞に対する細胞傷害作用の上昇などが報告がされている。これらのことからイシダイ mφ の貪食能やペルオキシターゼ活性を高めるような物質が γ -INF ではないかと推察された。ところで、哺乳動物の γ -INF は熱(56 °C)或いは酸(pH 2)に対して非常に不安定であることが知られ、これらの処理を行うと mφ 活性化能を消失するとされている。また、 γ -INF には種特異性が存在し、ヒト γ -INF はヒトに、マウス γ -INF はマウスにしか作用しないことが知られている。魚類においても、Graham & Secombes はニジマスを用いて mφ 活

活性化因子を 60℃ 或いは pH 2 処理することにより活性能が消失したことから、ニジマス リンパ球上清中の mφ 活性化因子は γ -INF ではないかと推察している。

そこで、本研究で著者の作成した ConA.S.4B.培養上清を熱（56℃）或いは酸（pH 2）で処理しその活性能を測定したところ、活性能は消失した。さらに、イシダイ脾臓細胞 ConA.S.4B.培養上清はマウス mφ を活性化せず、マウス mφ の活性化にはマウス γ -INF が必要であったことより、その作用には種特異性が認められた。以上のことから養殖イシダイのリンパ球は *in vitro* で ConA.S.4B.刺激培養することにより γ -INF を産生すると考えられた。すなわちイシダイの体内で γ -INF、mφ の免疫防御機構の存在が示唆された。

文献

- 1) 室賀清邦:海産魚介類の稚仔におけるウイルス性および細菌性疾病.魚病研究, 30, 71-85 (1995).
- 2) K. Yoshikoshi and K. Inoue : Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish, *Oplegnathus fasciatus*(Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13, 69-77 (1990).
- 3) R.Kusuda, K. Kawai: Bactrial disease of cultured marine fish in Japan.*Fish Pathol.*, 33, 221-227(1998).
- 4)大槻健蔵 : インターフェロン誘起プロテインキナーゼ と抗ウイルス作用, 「インターフェロン研究の進歩別冊,蛋白質 核酸 酵素」,NO.25 ,共立出版,東京,1981, pp.220-226.

- 5) 岡村春樹、川口久美子、庄司宏 : γ -インターフェロンの産生機構、「インターフェロン研究の進歩別冊,蛋白質 核酸 酵素」, NO.25 ,共立出版,東京,1981, pp.69-80.
- 6) G. Sonnenfeld, Mandel, A. D. and Merigan: T. C. Cell, *Immunol.* **34**, 193 (1997).
- 7) K. Huang, R. M. Donahoe, F. B. Gordon and H. R: Dressler *Infect. Immun.* **4**. 581 (1971).
- 8) K. Tachibana, S. Sone, E. Tsuburu & Y.Kishino : Stimulatory effect of vitamin A on tumoricidal activity of rat alveolar macrophages.*Br.J.Cancer.* **49**,343-348(1984).
- 9)J. Rhodes: Human Interferon Action: Reciprocal regulation by Retinoic Acid and β -carotene. *Jnei*, **70**, 833-836 (1983).
- 10) A. Bendich. Am: 'Carotenoids and immune response'. *In. Nutr.* **199**, 112-115 (1989).
- 11)A. Bendich. Am: 'Vitamins and immunity'.*In. Nutr.*601-603(1992).
- 12)V. S. Blazer and R. E. Wolke: The effect of α -tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of Rainbow trout(*Salmo gairdneri* R).*Aquaculture.* **37**,1-9 (1984).
- 13)K. Tachibana, G. Chen, D.S.Hung, P.Suderi, R.R.Watson: Production of Tumor Necrosis Factor by Resistant and Activated Murine Macrophages. *J. Leukocyte Blood.* in press 1992.
- 14)曾根三朗 螺良英郎:ラット肺胞マクロファージの採取法「免疫

- 実験操作法 XI」 (1982).
- 15)金井 泉, 金井正光:May-Giemsa 複染色法,「臨床検査法提要」,
南山堂, 東京, 1941, pp.VI-37-38.
- 16)細胞組織化学 Esterase 144-146 1980 (日本組織細胞化学編).
- 17)Christopher J. Secombes : Enhancement of fish phagocyte
activity.*Fish & Shellfish Immunology*. **4**. 412-436 (1994).
- 18)E. F. Wheelock. *Science*, 149, 310 (1965).
- 19)M. J. Valle, G. W.Jordon, D. A. Stevens and T. C. Merigan:
J. Immunol. **115**, 1191 (1975).
- 20)Fumitaka Ogushi, Saburo Sone, Satoru Moriguti, Katsuyasu
Tachibana, Yasuo Kishino and Eirou Tshubura.:
Enhancement of Human Alveolar Macrophage Fc Receptor-
Mediated Phagocytosis by I.ymphokines from Mitogen
Stimulated Lymphocytes. *The Tokushima J. Experimental
Medicine*, **30**, 3-4, 41-49 (1983).

第三章 養殖イシダイにおけるβ-カロテン大量添加餌料が免疫機能に及ぼす効果

3.1 目的

近年、養殖漁業では、ウイルス感染症が増加している¹⁾。イシダイにおいても、西日本各地の種苗生産施設でウイルス性の神経壊死症が多発し重大な問題になっている²⁾。しかし、その対策に有効な方法が少ないのが現状である³⁾。ところで、哺乳類ではウイルスに感染すると INF を産生しウイルスを駆逐することが知られ、この INF を介した免疫機構は極めて重要な生体防衛機能であることが知られている。

そこで魚類のイシダイにおいてもこのような免疫防御機構が存在するか否かの検討を試み第二章で検証した。その結果、魚類のイシダイにおいても哺乳類同様にリンパ球とマクロファージの免疫防御機構の存在が確認された。なお、哺乳類では INF を産生するこの免疫防御機構はビタミンや種々の栄養因子で活性化されることが知られ⁵⁾、中でもプロビタミン A として知られているβ-カロテンは、哺乳動物に対して大量投与を行ってもビタミン A のような過剰症を起こさず、ヒトをはじめ種々の哺乳動物を対象に効果があるとされている。そこでこの章では、イシダイの餌料のモイストペレットにβ-カロテンを大量に添加し、それを餌料としてイシダイの飼育を行い、育成したイシダイの免疫機能が亢進するか否かを検証した。

3.2 方法

3.2.1 供試魚

供試魚には，ふ化後約 3 ヶ月のイシダイ (*Oplegnathus fasciatus*) (長崎市水産センター) 稚魚を用いた。

3.2.2 餌料と飼育条件

イシダイ稚魚の飼育は，ふ化約 3 ヶ月の種苗を，海上の生け簀網 (4.5m × 4.5m × 4.0m) に收容し，餌料にモイストペレットを用いて飼育した。試験区の餌料組成は Table 3-1 に示したモイストペレットを用い，対照群はモイストペレットのみとし，β-カロテン大量投与群にはモイストペレットに β-カロテン 25,000 μg/100g を添加したものを投餌した。

なお投餌率は魚体重に対して期間平均約 4 % で季節に合わせて増減し，12 ヶ月間以上飼育して以下の実験に用いた。

Table 3-1 Composition of experimental diets

Ingredients	Normal group	b- C arotene enriched group
Dry mixture	46.50%	←
Sardine	46.50%	←
Feed oil	7.00%	←
Vitamin C	47mg	←
Vitamin E	28mg	←
b- C arotene	0 μg	25,000mg

Normal groups diet contained 3,490IU of vitamin A (retinol potency), did not contained b-carotene

3.2.3 両群の γ -INF 産生能の検討

3.2.3-1 イシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清の採取と調整

イシダイ脾臓細胞は、飼育 12 ヶ月目の対照群と β -カロテン大量投与の両群の魚体から前章 2.2.2 と同様の方法で無菌的に脾臓細胞を採取して、2.2.3 の方法で脾臓細胞を培養し調整した。

3.2.3-2 両群のイシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清中における γ -INF 活性の測定

前章 2.2.4-4 の方法で両群のイシダイ脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清を制作し、2.2.4-4 の方法で、対照群の魚体から腹腔m ϕ モノレイヤーを調整した。これに両群の脾臓細胞の ConA.S.4B.培養上清を添加培養し、対照群の腹腔m ϕ の不活性酵母に対する貪食能とペルオキシターゼ活性を測定した。なお貪食能とペルオキシターゼ活性の測定も前章 2.2.5 に準じて行った。

3.2.3-3 両群のイシダイ腹腔m ϕ の貪食能の検討

対照群、 β -カロテン大量投与群の両群の魚体から前章 2.2.4-4 と同じ方法で、腹腔m ϕ モノレイヤーを調整し、ConA.S.4B.培養上清を添加せずに直ちに、不活化酵母を添加して貪食能を前章 2.2.5-1 と同法で経時的に測定した。

3.2.4 両群のヒツジ赤血球(SRBC)に対する抗体産生能の検討

3.2.4-1 ヒツジ赤血球(SRBC)の調整

抗原としてヒツジ保存血（日本バイオテスト研究所）を用い、保存液であるアルセバー氏液を除くため 8.02%の生理食塩水で 3 回

遠心(1500rpm, 15min)洗浄した。洗浄後, ヒツジ赤血球(SRBC)が, 2×10^9 cell/ml となるように生理食塩水で希釈しヒツジ赤血球の調整液とした。

3.2.4-2 ヒツジ赤血球(SRBC)によるイシダイの免疫

各群のイシダイに対する SRBC による免疫は, 魚体重 50g あたり SRBC を 2×10^9 cell/ml 腹腔内注射し免疫した。イシダイ血清の採取は, 注射後 2 週間飼育したイシダイから尾動脈注射より採血を行い, 凝固後, 遠心分離して採取した。なお血清中の補体成分の不活化は 45°C , 30 分で行った。

3.2.4-3 SRBC に対するイシダイ血清の抗体価の測定

抗体価の測定は不活化した抗 SRBC 上清の赤血球(SRBC)凝集反応で以下の如くおこなった。

すなわち, 96 穴のプレート V ディスポ (三光純薬) を用い各ウエルにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で希釈した各希釈倍数のイシダイ血清を $50 \mu\text{L}$ 加えた。さらに各ウエルに抗原として用いた SRBC 懸濁液 (1×10^9 cell/ml) を $50 \mu\text{L}$ ずつ添加し, これを 25°C , 2 時間反応させ凝集反応陽性の認められる最大希釈倍率を抗体価として表した。なお, 抗血清の希釈はプレート上で $50 \mu\text{L}$ 容ダイリ्यूター (三光純薬) を用いて行った。

3.3 結果

3.3.1 対照群, β -カロテン大量投与群の魚体の体格比較

対照群, β -カロテン大量投与群の γ -INF 産生能の検討に用いた

供試魚の体格と、それとは別に無作為に採取し、測定をおこなった両群の体格を Fig. 3-1 に示した。両群の体長・体重には著差はみられなかった。なお、飼育16ヶ月目における両群の血液諸成分を Table 3-2 に示した。

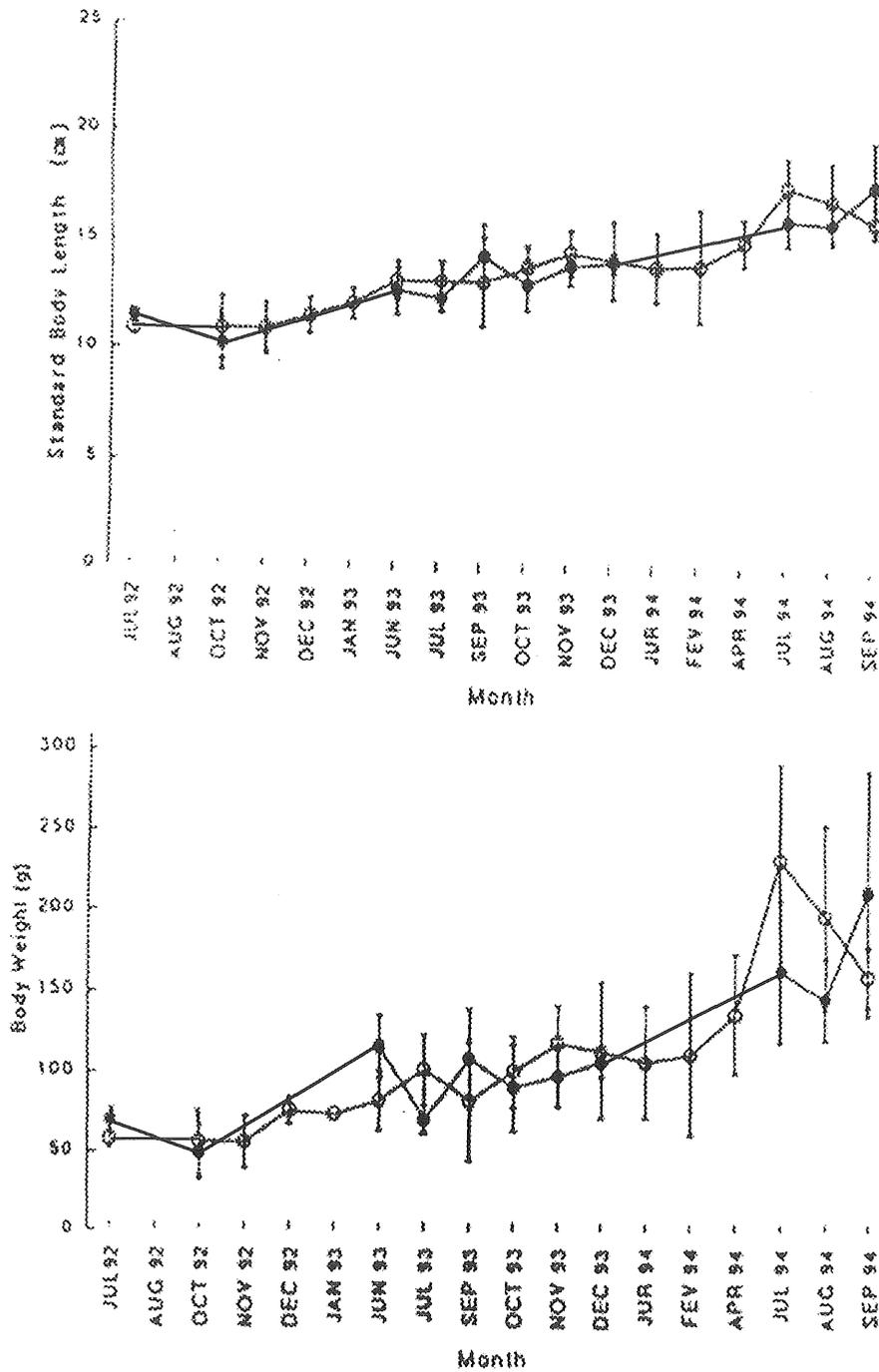


Fig. 3-1 Monthly changes of standard body length and body weight
 ○ : Normal dietary group
 ● : β -Carotene enriched dietary group

Table 3-2 Haematological characteristics and number of splenocyte

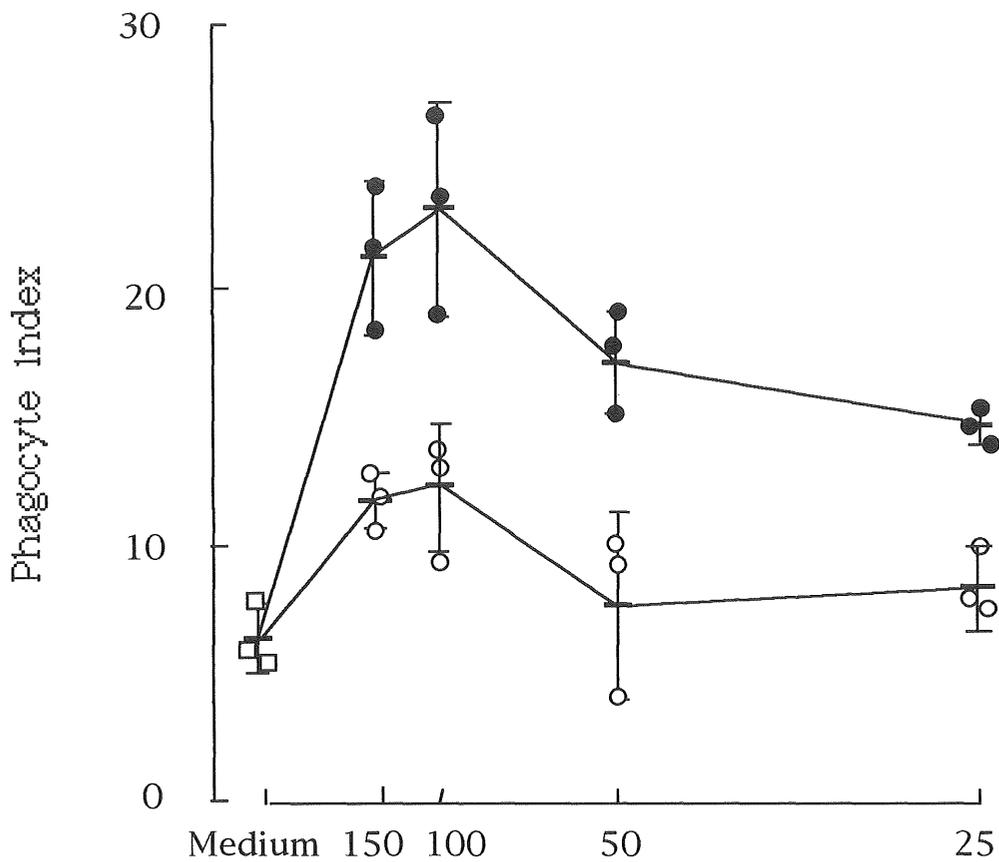
	Normal group		b-C arotene enriched group	
Ht (%)	40.3 ± 6.1 *		37.8 ± 2.2	
Serum protein (g/dl)	7.73 ± 1.15		7.46 ± 0.36	
Hb (g/dl)	6.55 ± 1.45		5.90 ± 0.99	
Number of splenocyte (x10 ⁶ /100g body weight)	2.21 ± 0.90		2.59 ± 0.72	

Sixteen months old fish were used for each assays.

*: Mean ± SD of 5 fish

3.3.2 両群の脾臓細胞の ConA.S.4B.刺激による γ -INF 産生

両群脾臓細胞の ConA.S.4B.刺激による γ -INF 産生を対照区の腹腔m ϕ を 30 分食食能でみた結果を Fig. 3-2 に、60 分のを Fig. 3-3 に示した。培地のみで腹腔m ϕ を培養後、不活化酵母を食食させたところ食食時間 30 分で食食指数は 6.64 であった。対照群の ConA.S.4B.培養上清で培養後の食食指数は 150 倍希釈で 11.89, 100 倍希釈で 12.29, 50 倍希釈で 7.98, 25 倍希釈で 8.61 といずれの希釈倍率においても、培地のみより上昇し、100 倍希釈をピークとした一峰性の変化を示した。一方、 β -カロテン大量投与群の ConA.S.4B.培養上清では希釈倍率の変化に伴って対照群と同様の変化を示した。対照群と β -カロテン大量投与群の比較では食食指数がピークの 100 倍希釈でその活性化は約 2 倍を呈し、全ての希釈倍率で β -カロテン大量投与群が高い食食指数を示し、 γ -INF 産生が多かった。また 60 分では、培地のみで培養では 12.61 であった。対照群の ConA.S.4B.培養上清で培養後の食食指数は 150 倍希釈で 16.36, 100 倍希釈で 20.96, 50 倍希釈で 11.17, 25 倍希釈で 8.22 と 100, 150 倍希釈において、培地のみより上昇し、100 倍希釈をピークとした一峰性の変化を示した。一方、 β -カロテン大量投与群の ConA.S.4B.培養上清ではいずれの希釈倍率においても培地のみより上昇し 100 倍希釈をピークとした一峰性の変化を示した。対照群と β -カロテン大量投与群の比較では食食指数がピークの 100 倍希釈でその活性化は約 1.5 倍を呈し、全ての希釈倍率で β -カロテン大量投与群が高い食食指数を示し、 γ -INF 産生が多かった。



Dilutions of Con A-stimulated splenocyte supernatants.

Fig. 3-2 Augmentation of phagocytic capacity of fish Pm ϕ by Con A stimulated supernatants
Pm ϕ monolayers were incubated for 4 h with the indicated dilutions of Con A-stimulated supernatants (●: β -Carotene enriched dietary group, ○: Normal dietary group) or medium alone (□). Phagocytosis assay was terminated after 30 min. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 3 independent experiments.

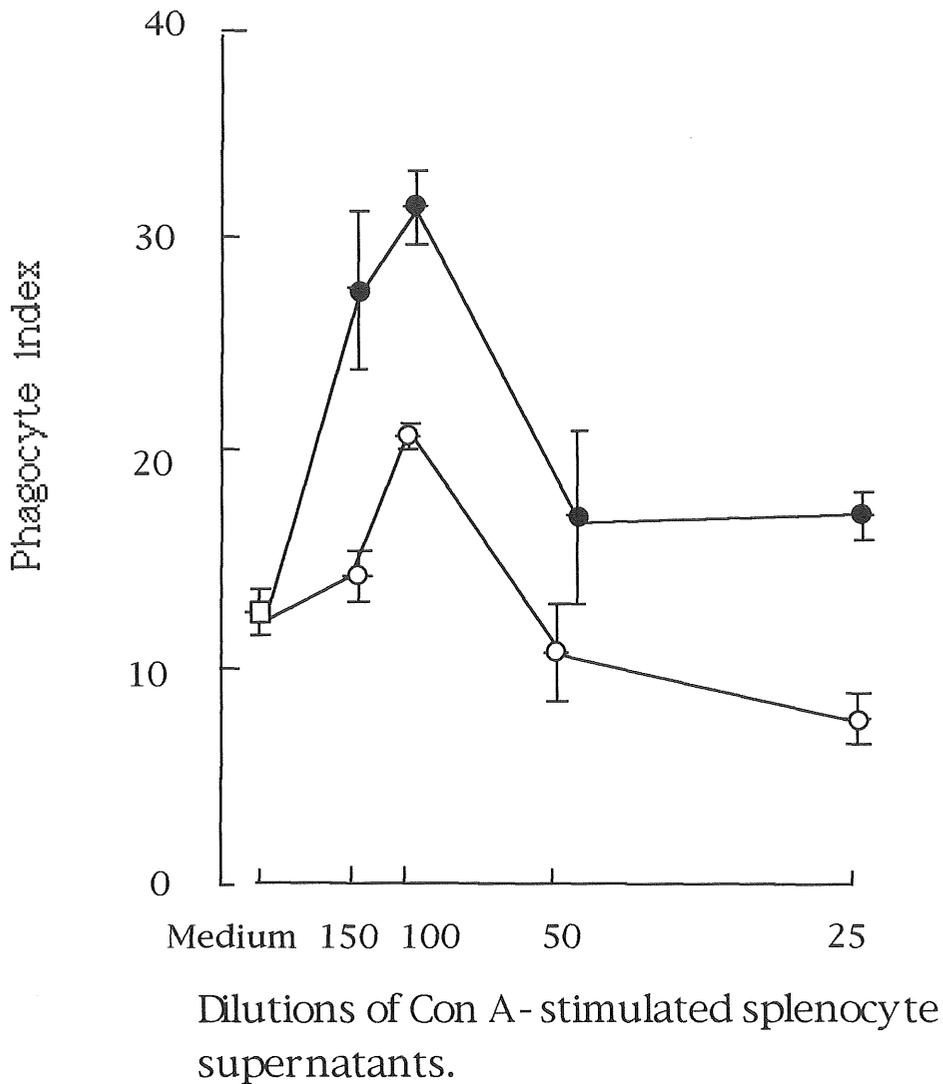


Fig. 3-3 Augmentation of phagocytic capacity of fish Pm ϕ by Con A stimulated supernatants
Pm ϕ monolayers were incubated for 4 h with the indicated dilutions of Con A-stimulated supernatants (●: β -Carotene enriched dietary group, ○: Normal dietary group) or medium alone(□). Phagocytosis assay was terminated after 60 min. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 3 independent experiments.

また、腹腔mφのペルオキシターゼ活性でみた両群脾臓細胞のCon.A刺激による γ -INF産生をFig. 3-4に示した。

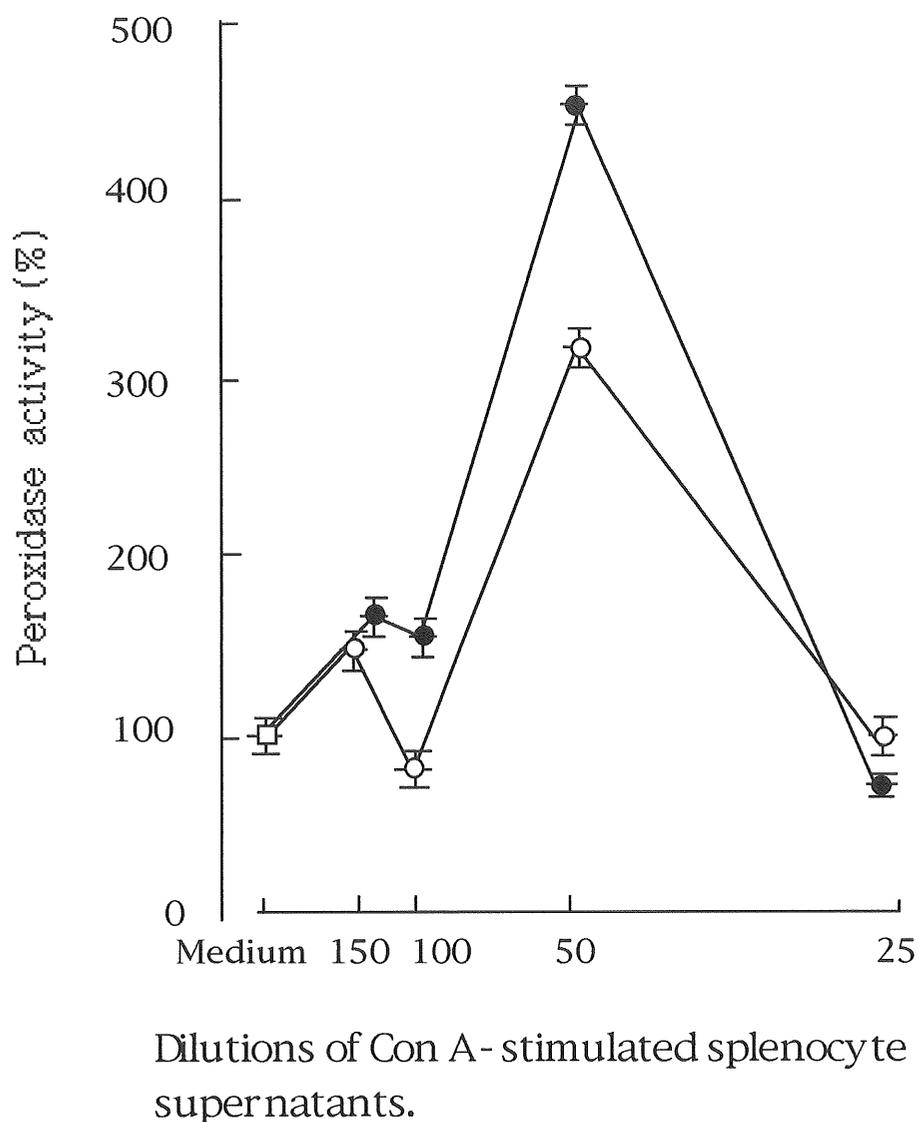


Fig. 3-4 Augmentation of peroxidase activity of fish Pm ϕ by Con A stimulated supernatants
Pm ϕ monolayers were incubated for 4 h with the indicated dilutions of Con A-stimulated(●: β -Carotene enriched dietary group, ○: Normal dietary group) or medium alone(□), then peroxidase activity was measured. Each point indicates the mean \pm SD for triplicate cultures in 3 independent experiments.

培地のみで腹腔mφを培養後のペルオキシターゼ活性が 0.041 であったのに対して、対照群の ConA.S.4B.培養上清の添加による活性は 150 倍希釈では 0.066(161%:培地のみで培養したmφの吸光度を 100%とした相対値), 100 倍希釈では 0.033(81%), 50 倍希釈では 0.135(329%), 25 倍希釈では 0.042(120%), と 100 倍希釈を除いて全ての希釈倍率でmφのペルオキシターゼ活性は上昇した。

一方、β-カロテン大量投与群の ConA.S.4B.培養上清では希釈倍率の変化に伴って対照群と同様の変化を示した。対照群とβ-カロテン大量投与群の比較ではペルオキシターゼ活性がピークの 50 倍希釈でその活性は約 1.4 倍を呈し、高濃度である 25 倍希釈を除いて全ての希釈倍率でβ-カロテン大量投与群が高い貪食指数を示し、γ-INF 産生が多かった。

3.3.3 対照群, β-カロテン大量投与群のイシダイ腹腔mφの貪能の検討

Con.A 培養上清を添加せず、両群から調整したmφモノレイヤーに直接、不活化酵母を貪食させた結果を Fig. 3-5 に示した。対照群のイシダイ腹腔mφの酵母に対する貪食指数(Phagocyte Index)は貪食 30 分で 1.2, 60 分で 5.8, 120 分で 4.5 となり培養時間の経過とともに上昇がみられた。一方、β-カロテン大量投与群の腹腔 mφでは貪食 30 分で急激な貪食指数の上昇がみられ、以後もそのレベルの貪食を維持した。

対照群とβ-カロテン大量投与群の貪食能を比較すると、β-カロテン大量投与群の貪食指数は対照群の貪食指数よりすべての貪食時間で高値を示し、貪食 30 分では約 7 倍, 60 分では 1.3 倍, 120 分

では 1.5 倍となっていた。すなわち β -カロテン大量投与群 Pm ϕ は対照群のそれよりも貪食能が高かった。

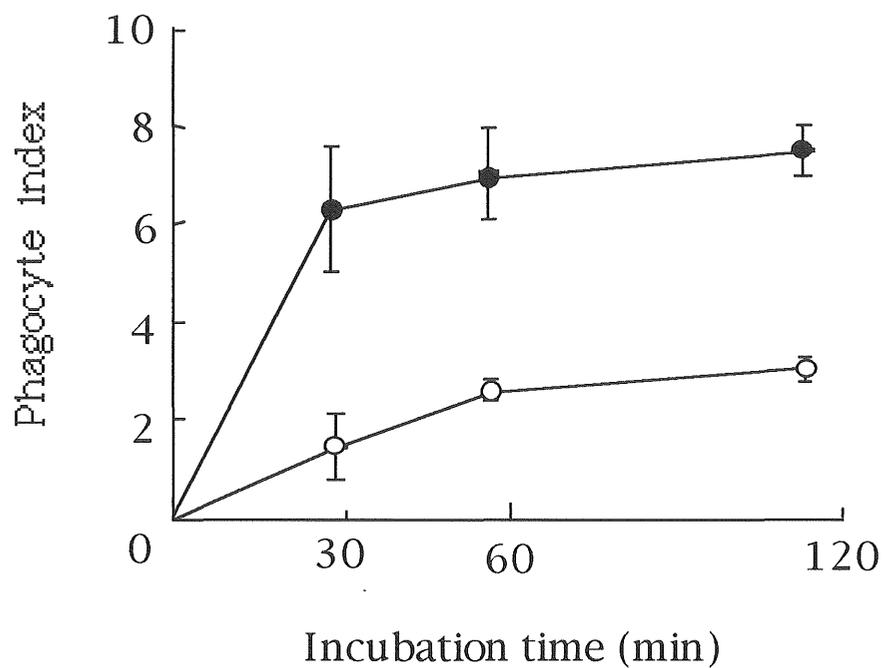


Fig. 3-5 Influence of β -Carotene on phagocytic activity of Pm ϕ against inactivated yeast

Pm ϕ monolayers were incubated with inactivated yeast. Assays were terminated at the indicated times.

●: β -Carotene enriched dietary group

○: Normal dietary group

3.3.4 対照群, β -カロテン大量投与群の SRBC に対する抗体産生の検討

対照群のインダイ血清中のヒツジ赤血球に対する凝集価は平均値で 40 であった。一方, β -カロテン大量投与群では平均値で 80 で約 2 倍高かった。 β -カロテン大量投与群の抗体産生は対照群より高かった。(Fig. 3-6)

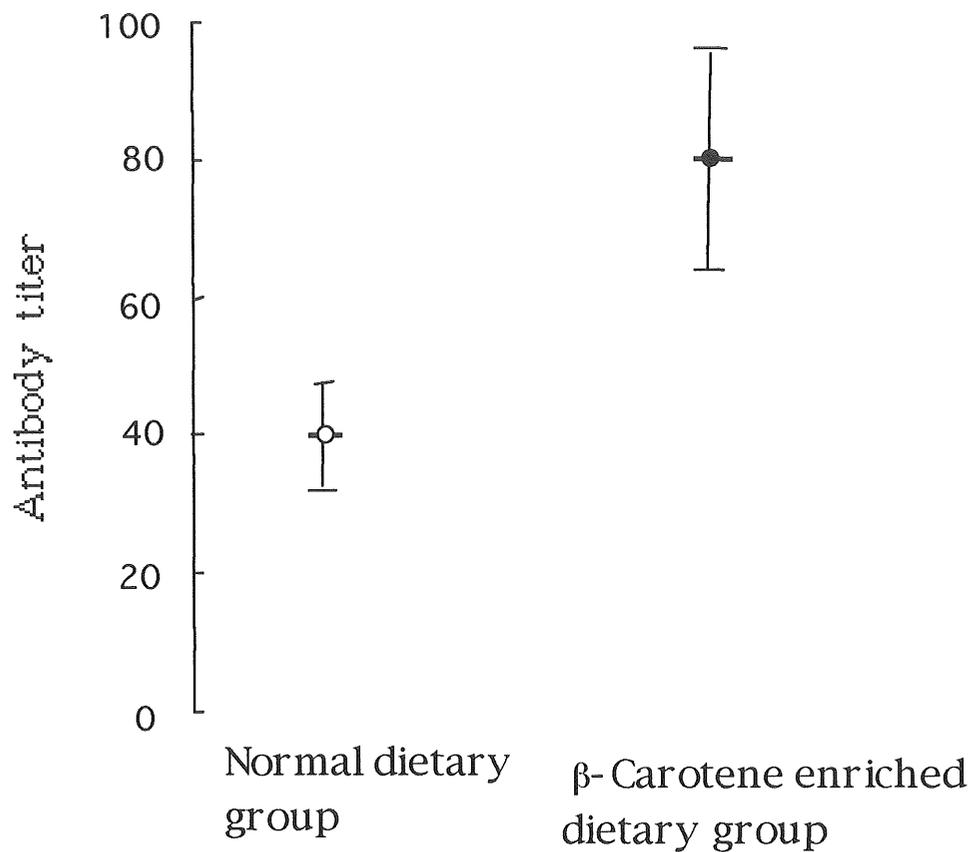


Fig. 3-6 Influence of β -Carotene on antibody production
 Haemagglutination titer were assayed using inactivated serum 4 days after Immunization with SRBC. Antibody titer showed positive reciprocal serum dilution fold.

●: β -Carotene enriched dietary group

○: Normal dietary group

Each point indicates the mean \pm SD

3.4 考察

対照群， β -カロテン大量投与群の脾臓細胞を ConA.S.4B.で刺激し，それぞれの γ -INF 産生を別の通常イシダイ腹腔m ϕ の貪食能とペルオキシターゼ活性で検討したところ， β -カロテンを大量投与群では対照群と比較して通常のイシダイのm ϕ を活性化していた。すなわち β -カロテン大量投与群が多量の γ -INFを産生した。

Tachibanaらはラットで，Rhodesはヒトで，ビタミンAや β -カロテンを大量投与することで直接的にm ϕ が活性化させ，さらに γ -INFの産生を上昇させると報告し，Hofらはマウスに大量投与することによって *in vitro* で Tリンパ球を介してm ϕ を活性化すると述べている。

本研究結果もこれら哺乳動物と同様， β -カロテンが魚体内でT細胞系のリンパ球の機能を亢進していると考察された。また，対照群， β -カロテン大量投与群のそれぞれのPm ϕ の貪食能を比較すると β -カロテン大量投与群の貪食能が対照群のそれよりも高かったことは， β -カロテンの大量投与が，直接m ϕ を活性化し，或いは γ -INF産生が生体内で上昇し，既にPm ϕ の貪食能を活性化していた可能性が示唆された。抗SRBCに対する抗体価では，対照群より β -カロテン大量投与群が高い力価を示した。

ところで活性化m ϕ はIL-1を多量に分泌し，このIL-1は，リンパ球を活性化し， γ -INFや種々のサイトカインを分泌する。さらにこれらのサイトカインはBリンパ球のプラズマ細胞への分化成熟を促し，抗体産生を増加させるとされている。

本研究で認められたSRBCに対する抗体産生が β -カロテン大量投与群で高かったことからこれら生体内の免疫機構，すなわち免疫

ネットワーク全体が活性化されていると考えられた。

しかしながら本実験で投与した β -カロテンが、分解を受けずに直接或いは生体内でビタミン A に変換して免疫防御機構を活性化したかは明確ではない。ともあれ、本研究の β -カロテン大量投与群の魚体の粘液防御機構の亢進が認められた。また、実験に用いた魚体の体格について両群に著差が見られなかったことより、 β -カロテン大量投与による体格への影響は考えられなかったのみならず、なんら過剰症の徴候も認められなかった。

以上のことから β -カロテン大量添加餌料でイシダイを飼育すると、ウイルス感染だけでなく種々の感染症に対して抵抗力のある種苗や養殖魚の産生を可能にすると考えられた。 β -カロテンが栄養素であることから他の抗生物質や抗菌剤のように、筋肉中への薬物残留の問題も考慮する必要がなく、この研究が安全な養殖魚の供給に資する点は大であると考えられた。

文献

- 1) 室賀清邦:海産魚介類の稚仔におけるウイルス性および細菌性疾病.魚病研究, 30, 71-85 (1995).
- 2) K. Yoshikoshi and K. Inoue : Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juveniles of Japanese parrotfish,*Oplegnathus fasciatus*(Temminck & Schlegel). *Journal of Fish Diseases*, 13, 69-77 (1990).
- 3) R.Kusuda, K. Kawai: Bactrial disease of cultured marine fish in Japan.*Fish Pathol.*, 33, 221-227(1998)
- 4) 大槻健蔵 : インターフェロン誘起プロテインキナーゼ と抗ウイ

- ルス作用, 「インターフェロン研究の進歩別冊, 蛋白質 核酸 酵素」, NO.25, 共立出版, 東京, 1981, pp.220-226
- 5) 岡村春樹, 川口久美子, 庄司宏 : γ -インターフェロンの産生 機構, 「インターフェロン研究の進歩別冊, 蛋白質 核酸 酵素」, NO.25, 共立出版, 東京, 1981, pp.69-80.
- 6) G. Sonnenfeld, Mandel, A. D. and Merigan: T. C. Cell, *Immunol.* 34, 193 (1997).
- 7) K. Huang, R. M. Donahoe, F. B. Gordon and H. R. Dressler *Infect. Immun.* 4. 581 (1971).
- 8) K. Tachibana, S. Sone, E. Tsuburu & Y. Kishino : Stimulatory effect of vitamin A on tumoricidal activity of rat alveolar macrophages. *Br. J. Cancer.* 49, 343-348 (1984).
- 9) J. Rhodes: Human Interferon Action: Reciprocal regulation by Retinoic Acid and β -carotene. *J. Nat. Immun.* 70, 833-836 (1983).
- 10) A. Bendich. Am: 'Carotenoids and immune response'. *In. Nutr.* 199, 112-115 (1989).
- 11) A. Bendich. Am: 'Vitamins and immunity'. *In. Nutr.* 601-603 (1992).
- 12) V. S. Blazer and R. E. Wolke: The effect of α -tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of Rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). *Aquaculture.* 37, 1-9 (1984).
- 13) K. Tachibana, G. Chen, D. S. Hung, P. Suderi, R. R. Watson: Production of Tumor Necrosis Factor by Resistant and Activated Murine Macrophages. *J. Leukocyte Biol.* in press

- (1992).
- 14)曾根三朗 螺良英郎:ラット肺胞マクロファージの採取法「免疫実験操作法 XI」 (1982).
 - 15)金井 泉, 金井正光:May-Giemsa 複染色法,「臨床検査法提要」, 南山堂, 東京, 1941, pp.VI-37-38.
 - 16)細胞組織化学 Esterase 144-146 1980 (日本組織細胞化学編).
 - 17)Christopher J. Secombes : Enhancement of fish phagocyte activity.*Fish & Shellfish Immunology*. 4. 412-436 (1994).
 - 18)E. F. Wheelock. *Science*, 149, 310 (1965).
 - 19)M. J. Valle, G. W.Jordon, D. A. Stevens and T. C. Merigan:
J. Immunol. 115, 1191 (1975).
 - 20)Fumitaka Ogushi, Saburo Sone, Satoru Moriguti, Katsuyasu Tachibana, Yasuo Kishino and Eirou Tshubura.: Enhancement of Human Alveolar Macrophage Fc Receptor-Mediated Phagocytosis by Interleukin-1 from Mitogen Stimulated Lymphocytes. *The Tokushima J. Experimental Medicine*, 30, 3-4, 41-49 (1983).
 - 21)宇津木照洋ら: in vitro での $INF\alpha$ および β によるヒト末梢血単球の腫瘍活性誘導に関する検討,「癌と化学療法」, 12, (1985).
 - 22)M. Deley, J. VanDamme, H. Claeys, H. Weening, J. W. Heine, A. Billiau, C. Vermylen, and P. DeSomer, *Eur. J. Immunol.* 10, 877 (1980).
 - 23)I. D. Graham & C. J. Secombes: Do fish lymphocytes secrete interferon- γ ?*J. Fish Biol.* 36, 563-573 (1990).
 - 24)Sakai, D. K: Heat inactive of complements and immune

- hemolysin reactions in reinbow trout, masu trout, coho salmon, goldfish, and tilapia. *bull. Jpn. Soc. Fish.* 46, 565-571 (1989).
- 25) Hof et al.: Stimulation of Cell-mediated resistance in mice to infection with *Listeria Monocytogenes* by V. A. *Anor Immunol (Paris)* ,1300, 587-594(1979).
- 26)A. Ben-Amotz. et al. British: Beta-carotene rich alga *Dunariella bardwil* as a source of retinol in rat diet. *J. Nutri.* 59, 443-449 (1988).

第四章 アラマーブルーを用いた稚仔魚の脾臓細胞幼若化の簡便測定法

近年、養殖漁業では、種々の感染症が多発し、種苗生産や養殖漁業に甚大な被害を与えている。^{1,2)}

その対策として、種々の方策が考えられているが抗生物質や抗菌剤での対処にも限界があり、病気に強い健康な種苗の生産が求められている。そこで種苗の健康度や耐病性の評価が必要であるが、魚類の免疫機能の測定方法で魚体の小さな、特に全長 1cm 以下の稚仔魚期の健康度や耐病性の評価は極めて難しいのが現状である。

ところで魚類の免疫機能を測定する方法は、一般的に哺乳類の免疫機能を測定する方法が用いられている。その中で細胞性免疫機能では貪食細胞である好中球やマクロファージを用いた貪食能、^{3,4)} またリンパ球を分裂促進物質で培養したときの幼若化が指標として用いられている。^{5,6)}

一方、体液性免疫機能では羊の赤血球や細菌などを抗原として魚に接種したときの抗体産生が指標として用いられている。^{7,8)} これらの免疫機能の測定の中で貪食能や抗体産生の測定は一般の研究室で行えるが、リンパ球の幼若化については放射性同位元素である [³H]チミジンの取り込みを用いた手法が一般的である。⁹⁾ しかしながら、この方法では特殊な施設が必要であり、また廃棄物の処理の難点もあり一般の研究室で行うことは非常に困難である。また、一部では、リンパ球の幼若化時に細胞のデヒドロゲナーゼ活性が上昇することを利用した MTT を用いた方法も用いられている。⁶⁾ この方法は、幼若化を吸光度の上昇で測定することができるが、実験操作が極めて煩雑であるという問題がある。

ところが、近年、哺乳動物のリンパ球幼若化の測定のために開発された細胞増殖測定薬であるアラマーブルーはそれ自体を培養液に添加し吸光度を測定するだけという簡単な操作で行え、これまでの測定法に比べ一般の研究室で迅速かつ簡便に行えることから注目され利用されつつある。¹⁰⁾

そこで本研究では、このアラマーブルーを用いて種苗の生体防御能の一つとして脾臓細胞の幼若化能の測定を一般の研究室で行うための簡便な方法について検討した。

4.2 実験方法

4.2.1 供試魚

長崎市水産センターでふ化したヒラメ 1 年魚(魚体重 200～300g)とヒラメ(8 週令)の稚魚およびイシダイ(4 週令)、トラフグ(4 週令)の仔魚を用いた。

4.2.2 ヒラメ 1 年魚脾臓細胞の調整

脾臓細胞の幼若化は Ahmed ら¹⁰⁾の方法に準じて行った。ヒラメ 1 年魚の後脳部を切断後失血死させ、脾臓を無菌的に摘出した。これを海産魚の浸透圧となるよう、0.53% NaCl を添加した RPMI1640 培地 (FRPMI 培地) 中でピンセットを用い組織をほぐし遠心分離 (1,500rpm, 15min) した。遠心後の沈殿を 5% 牛胎児血清、ペニシリン G、ストレプトマイシンを添加した FRPMI 培地 (CFRPMI 培地) で再浮遊させ 27G のツベルクリン針中を勢いよく通過させ、Single Cell 浮遊液とし、Percoll 濃度勾配遠心で赤血球を除去後、再び FRPMI 培地を用い脾臓細胞浮遊液とした。

なお、細胞数の測定は浮遊液のメイ・ギムザ染色とトリパンブルー
否染色細胞の計数で行った。

4.2.3 幼若化応答の測定

96 穴マイクロテストⅢプレート (FALCON, No.3072) に脾臓
細胞浮遊液 100 μ L と各マイトージン溶液 50 μ L (コンカナバリン
A : ConA C-0412, SIGMA 社, ポークウイドーマイトージン :
PWML-9379, SIGMA 社, リポポリサッカライド : LPS , *E. coli*,
SIGMA 社) を加え, 炭酸ガス培養装置 (25 $^{\circ}$ C, 5%CO₂) 内で 48
時間培養した。培養後, アラマーブルー (Alamar Biosciences 社
製) 20 μ L を添加して 24 時間培養した。これをマイクロプレート
リーダー (測定波長 570nm 及び副波長 600nm) で測定した。

4.2.4 稚仔魚の脾臓細胞の調整と幼若化

稚仔魚の脾臓細胞の調整は, まず各稚仔魚より実体顕微鏡下で
無菌の注射針を用いて脾臓を摘出した。これを FRPMI 培地で 4 回
以上洗浄し, ヒラメ 1 年魚と同様にピンセットでほぐし, 27G 注
射針を通過させ, Single Cell 浮遊液を調整し, ヒラメ 1 年魚と同
様に培養した。

なお, 稚仔魚の脾臓細胞については濃度勾配遠心による赤血球
の除去操作を行わなかった。

4.3 結果

4.3.1 各マイトージンで培養した脾臓細胞数の経時的変化 及び細胞数と吸光度の関係

ヒラメ脾臓細胞を各種マイトージェン添加と無添加で培養を行い、経時的に細胞数の変化を測定したところ、マイトージェン無添加では3日間の培養を通して細胞数の顕著な変化は認められなかった。一方、マイトージェン添加では培養時間の経過に呼応して細胞数が増加し、その増加の程度は Con A $100 \mu\text{g}/\text{mL}$, PWM $10 \mu\text{g}/\text{mL}$, LPS $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の順で高かった(Fig.4-1)。

各培養72時間目の細胞数とアラマーブルー添加による吸光度の関係は、細胞数の増加に呼応してその吸光度はほぼ直線的に上昇し、両者の間には有意な正の相関関係 ($r=0.9914$, $n=9$, $p<0.001$) が認められた(Fig.4-2)。

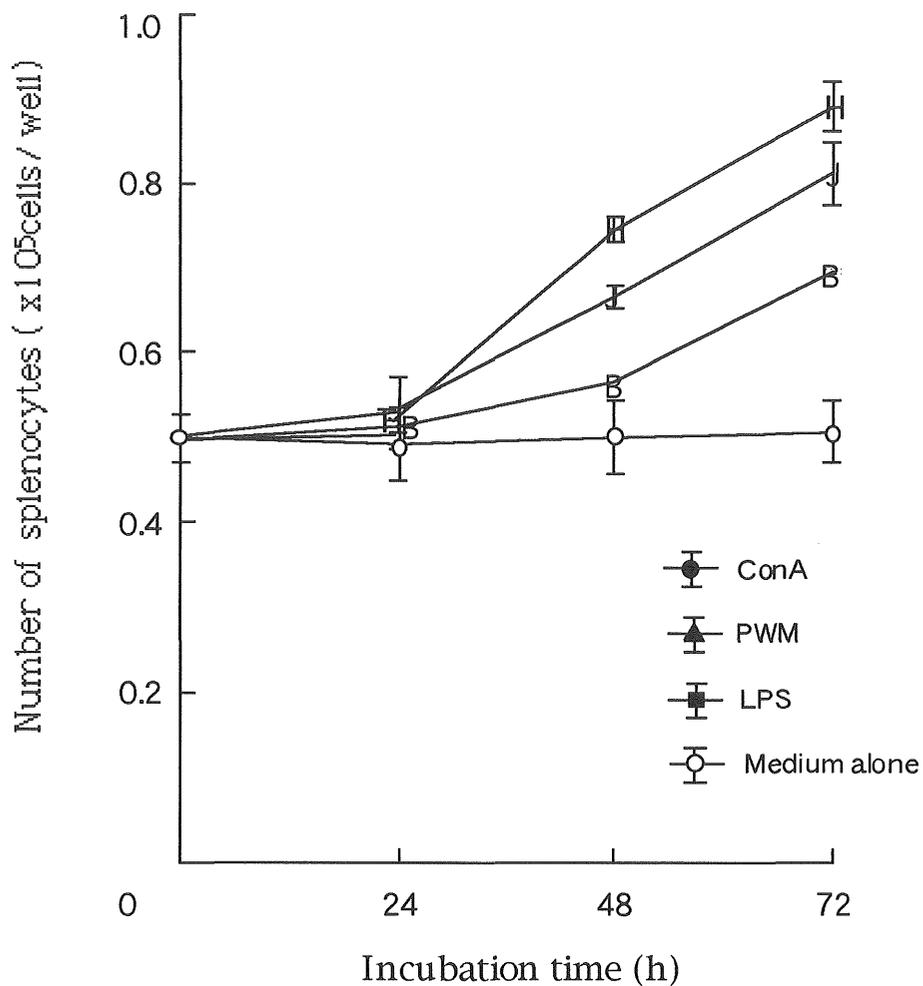


Fig. 4-1 Kinetics of mitogen stimulated splenocyte proliferation of Japanese flounder

Splenocytes (5×10^5 cells/well) were incubated with or without ConA ($100 \mu\text{g/ml}$), PWM ($10 \mu\text{g/ml}$), or LPS ($1 \mu\text{g/ml}$). The cells were then incubated at 25°C for each incubation time in a humidified atmosphere with 5% CO_2 in air. Results are mean \pm SD for triplicate cultures. Representative data obtained in 3 independent experiments.

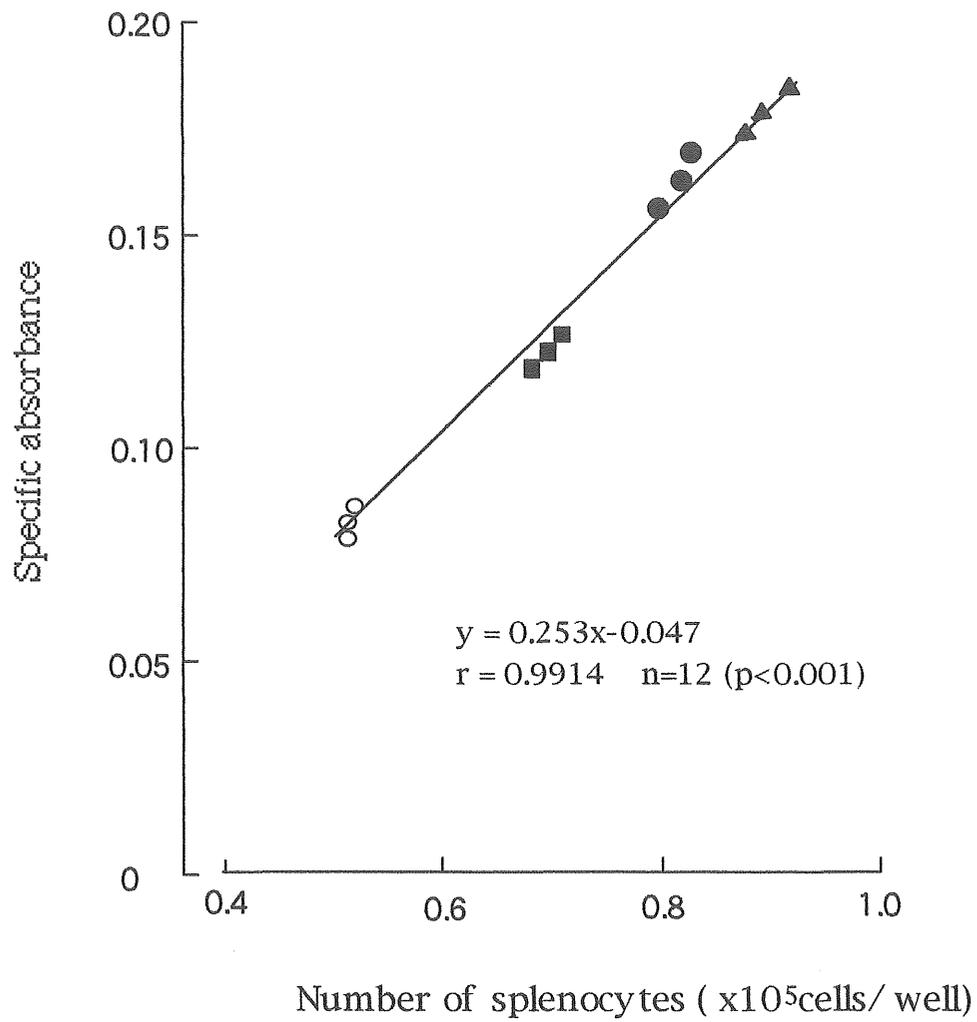


Fig. 4-2 Relationship between cell number and specific absorbance
 Each point shows number of splenocytes and specific absorbance
 after 72 h incubation.

4.3.2 最適マイトージェン濃度

脾臓細胞を種々のマイトージェン濃度で培養した結果を Table4-1 に示した。ConA では、10~250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で培養したところアラマーブルー添加による吸光度は、ConA の濃度の上昇に伴い直線的に上昇し、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で最大の吸光度 0.166 を示し、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では低下した。PWM では、1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で培養したところ、吸光度は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で最大の吸光度 0.178 を呈し、その後濃度の上昇とともに徐々に低下した。また最大の吸光度を呈した 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の値は無添加の場合の約 2.1 倍であった。LPS では、0.01~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で培養したところ、吸光度は LPS の濃度の上昇に伴い緩やかに上昇し、LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で最大の吸光度 0.128 を示した。これはマイトージェン無添加の培地のみ吸光度の 1.5 倍であった。LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では吸光度は低下した。各マイトージェンで培養したヒラメ脾臓細胞のアラマーブルーによる最適の発色を呈したマイトージェン濃度は、ConA 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、PWM 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

Table 4-1. Dose-response effects of ConA, PWM, and LPS on splenocyte proliferation of Japanese flounder

Dose (mg/ml) ^a	Specific absorbance \pm SD		
	ConA	PWM	LPS
Medium alone	0.085 \pm 0.002 ^b		
0.01	ND ^c	ND	0.092 \pm 0.001
0.1	ND	ND	0.101 \pm 0.003
1	ND	0.138 \pm 0.011	0.128 \pm 0.004
10	0.091 \pm 0.007	0.178 \pm 0.007	0.105 \pm 0.010
25	0.108 \pm 0.005	0.156 \pm 0.005	ND
50	0.125 \pm 0.006	0.122 \pm 0.012	ND
100	0.166 \pm 0.016	0.098 \pm 0.001	ND
250	0.122 \pm 0.022	ND	ND

^aSplenocytes cells (5×10^5 cells/well) were incubated with or without different amounts of ConA, PWM, or LPS. The cells were then incubated at 25 °C for 72 h in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. Alamar Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan plate reader at 570 nm and 600 nm.

^b Mean \pm SD of triplicate cultures. Representative data obtained in 3 or more independent experiments.

^cNot done.

4.3.3 最適培養細胞数

最適培養細胞数を決定するために、種々の脾臓細胞で各種マイトージェン添加培養した結果を Fig.4-3 に示した。

脾臓細胞数 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ cells/well でマイトージェン無添加培地のみで培養したところアラマーブルー添加

による吸光度は脾臓細胞の上昇に伴い緩やかに上昇し、 1×10^5 cells/well での吸光度は 0.072 を示したのに対し、 10×10^5 cells/well では吸光度は 0.087 であった。ConA $100 \mu\text{g/mL}$ では、細胞数の増加に呼応して吸光度は上昇し、 10×10^5 cells/well では吸光度は若干低下した。本条件で最大の吸光度 (0.157) を示した脾臓細胞数は 5×10^5 cells/well で、同じ脾臓細胞数における培地のみでの培養による吸光度の約 1.8 倍を呈した。PWM $10 \mu\text{g/mL}$ では、細胞数が 5×10^5 cells/well までは細胞数の増加に伴って吸光度は上昇し、 10×10^5 cells/well では吸光度は低下した。このときの最大の吸光度 (0.182) を呈した脾臓細胞は 5×10^5 cells/well で、培地のみでの培養による吸光度の約 2.1 倍であった。LPS $1 \mu\text{g/mL}$ では、細胞数の増加に呼応して吸光度は上昇し、 10×10^5 cells/well では吸光度は低下した。このときの最大の吸光度を示した脾臓細胞数は 5×10^5 cells/well で、培地のみでの培養による吸光度の約 1.4 倍であった。各マイトージェンで培養した種々の脾臓細胞数による吸光度の変化を総じてみると、すべての細胞数でマイトージェン添加によって吸光度は上昇したが、その上昇の程度は 5×10^5 cells/well で最も高く至適であった。

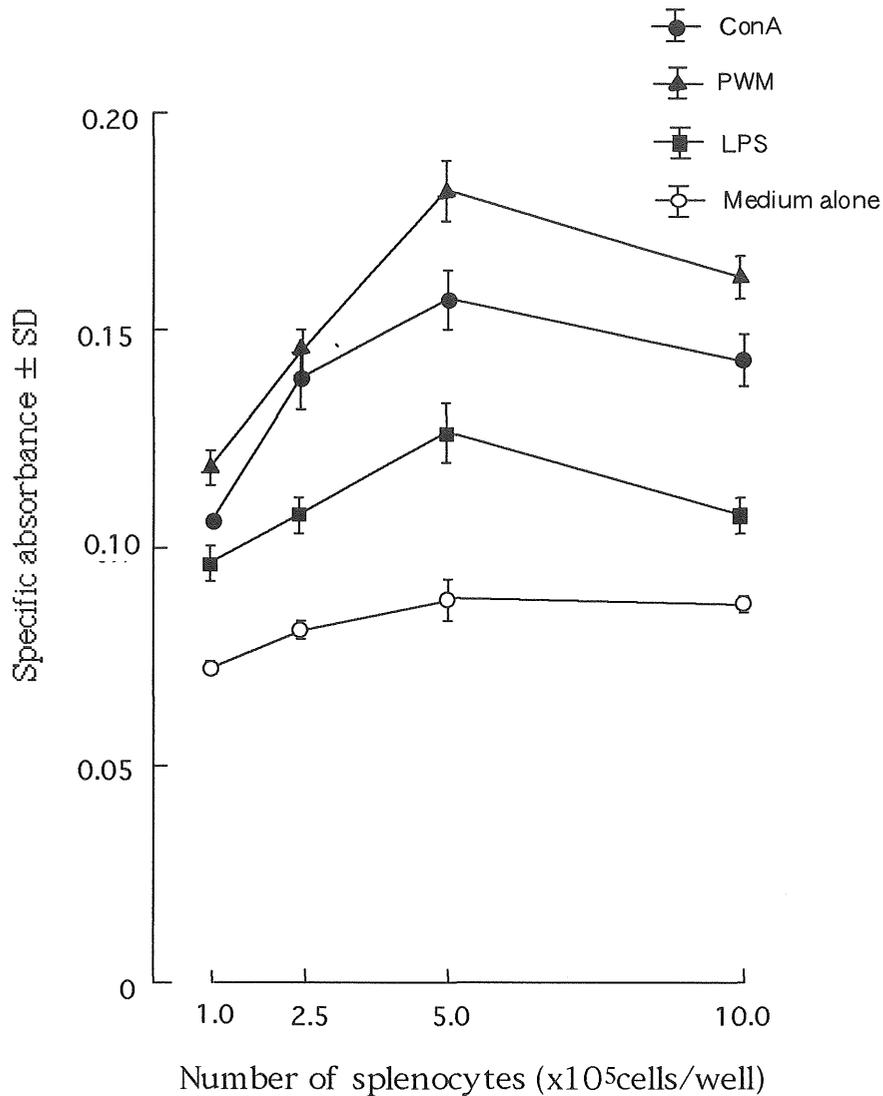


Fig. 4-3 Effect of splenocyte number on mitogen stimulated proliferation of Japanese flounder
 Mononuclear cells (5×10^5 cells /well) were incubated with or without ConA ($100 \mu\text{g/ml}$), PWM ($10 \mu\text{g/ml}$), or LPS ($1 \mu\text{g/ml}$). The cells were then incubated at 25°C for 72 h in a humidified atmosphere with 5% CO_2 in air. Alamar Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan plate reader at 570 nm and 600 nm. Results are means \pm SD for triplicate cultures. Representative data obtained in 3 independent experiments.

仔稚魚から脾臓細胞を調整する場合、採取可能な細胞数が極めて少ないため赤血球の除去作業は極めて困難である。そこで調整脾臓細胞より赤血球を除去しなかった赤血球存在下と、除去した非存在下で幼若化の検討を行った結果を Fig.4-4 に示した。培地のみでの培養、ConA100 μ g/mL 添加培養ともに、赤血球存在下（赤血球割合約 50%）は非存在下（赤血球割合 5%未満）に比較して若干高い吸光度を示したが、脾臓細胞数の増加に伴う吸光度の変化は先に述べた傾向とほぼ同様であった。

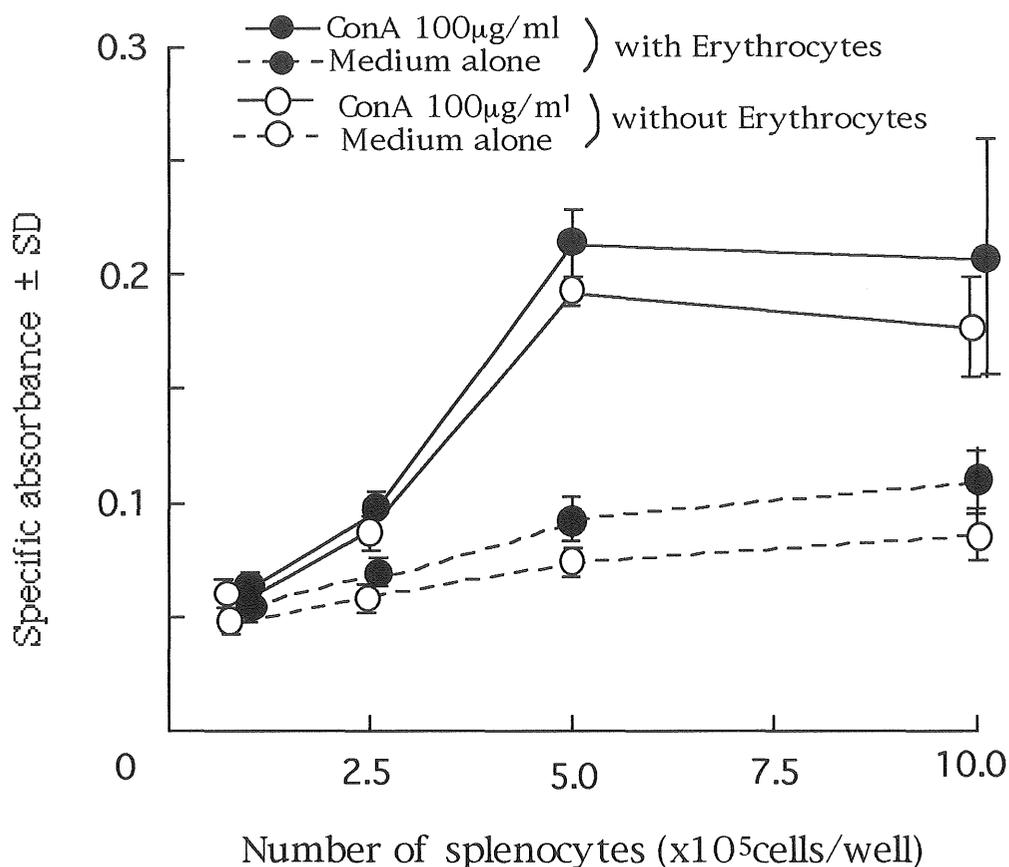


Fig. 4-4 Effect of presence of erythrocytes on mytogen stimulated splenocyte proliferation of Japanese frounder
 Indicated numbers of splenocytes with or without erythrocytes were incubated with or without Con A(100 mg/ml). The cells were then incubated at 25°C for 72 h in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. Alamar Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan plate reader at 570 nm and 600 nm. Results are means ± SD for triplicate cultures in three independent experiments.

4.3.4 稚仔魚の脾臓細胞数

魚体の小さな稚仔魚での測定可否を検討するため、ヒラメ（8週令）、イシダイ（4週令）、トラフグ（4週令）の各稚仔魚から採取した脾臓細胞を Table 4-2 に示した。各魚種より採取された脾臓細胞数は、ヒラメ 11.5×10^5 cells/尾、イシダイ 3.3×10^5 cells/尾、トラフグ 4.6×10^5 cells/尾であった。

4.3.5 各稚仔魚脾臓細胞のマイトーゲンによる幼若化

ヒラメ（8週令）、イシダイ（4週令）、トラフグ（4週令）の各稚仔魚の脾臓細胞を各マイトーゲンで培養した結果を Table 4-3 に示した。ConA ($100 \mu\text{g}/\text{mL}$) で培養したところ、吸光度は無添加の培地に比較してヒラメで約 2.9 倍、イシダイで約 2.7 倍、トラフグで約 2.2 倍の吸光度を呈した。PWM ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) では、ヒラメで約 3.0 倍、イシダイで約 2.7 倍、トラフグで約 2.4 倍の吸光度を呈した。LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) では、ヒラメで約 1.6 倍、イシダイで約 1.4 倍の吸光度であった。

Table 4-2.

Specimen	n	Total body length and number of splenocytes	
		Total body length (cm)	Splenocytes (10^5 cells/larva)
Japanese flounder	9	3.7 ± 0.4 ^a	11.5
Japanese parrotfish	48	0.7 ± 0.1	3.3
Tiger puffer	23	0.8 ± 0.1	4.6

^a Mean \pm SD of total larvae

Table 4-3 Mitogen induced splenocyte proliferation

Mitogen ^a	Japanese flounder	Japanese parrotfish	Tiger puffer
Medium alone	0.097 ± 0.015 ^b	0.099 ± 0.005	0.091 ± 0.032
ConA(100µg/ml)	0.288 ± 0.042	0.267 ± 0.006	0.217 ± 0.062
PWM(10µg/ml)	0.295 ± 0.086	0.273 ± 0.003	0.242 ± 0.028
LPS(1µg/ml)	0.155 ± 0.035	0.142 ± 0.003	ND ^c

^aSplenocytes (5×10^5 cells /well) from each larva were incubated with or without Con A, PWM, or LPS. The cells were then incubated at 25 °C for 72 h in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air. Alamar Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan plate reader at 570 nm and 600 nm.

^b Mean ± SD of triplicate cultures. Representative data obtained in 2 or more independent experiments.

^cNot done.

4.4 考察

稚仔魚の脾臓細胞の幼若化を一般の研究室で簡便に測定する方法を確立するため、細胞増殖測定用色素アラマーブルーを用いた方法での確立を試みた。

ConA, PWM, LPS の各マイトージェンで脾臓細胞を培養したところ、マイトージェンの種類によって異なった幼若化の様相が認められた。ヒトリンパ球を ConA 刺激すると T 細胞が、PWM では T 細胞と B 細胞が幼若化するとされ、LPS ではマウスリンパ球の B 細胞が幼若化するとされている¹¹⁾。本研究で用いたヒラメ脾臓細胞が T 細胞と B 細胞などに分化しているか否かは明確ではない。ともあれ、マイトージェンの種類による幼若化の差が示唆された。また、培養終了時における細胞数と吸光度の間には直線性の高い有意な正の相関関係が認められ、アラマーブルーによる発色でヒラメ脾臓細胞の幼若化反応を測定可能であると考えられた。

そこでアラマーブルーを用いてヒラメ脾臓細胞の幼若化を測定するための至適条件を検討したところ、各マイトージェン濃度は ConA100 μ g/mL, PWM10 μ g/mL, LPS1 μ g/mL, 脾臓細胞数 5×10^5 cells/well の条件が最適と考えられた。この条件で脾臓細胞数 5×10^5 cells/well と 10×10^5 cells/well で培養したところ、吸光度は 10×10^5 cell/mL が低かった。これは細胞数に対して培地中の栄養素の不足等の要因で 72 時間の培養では細胞活性がそれほど上昇しなかったためであろうと考察した。

アラマーブルーを用いた脾臓細胞幼若化の測定は細胞の持つ酵素活性による吸光度で測定するため、培養液中に赤血球が混在すると吸光度測定の妨げになると考えられた。そこでヒラメ 1 年魚の脾

臓細胞を用いて赤血球存在下と非存在下で検討を行ったところ、赤血球の存在下でも非存在下条件とほぼ同様の幼若化現象が認められ、十分測定が可能であると考えられた。

本法を用いて魚類の脾臓細胞が各マイトーゲン刺激によって幼若化することが認められた。これらのことより、本方法を用いることでヒラメ、イシダイやトラフグの稚仔魚でも幼若化の測定が可能であると考えられた。

文献

- 1) 西岡豊弘, 古澤 徹, 水田洋之助: 種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況(1989~1994年). 水産増殖, 45, 285-290 (1997).
- 2) 室賀清邦: 海産魚介類の仔稚魚におけるウイルス性および細菌性疾病. 魚病研究, 30, 71-85 (1995).
- 3) F.Salati, Y.Ikeda, and R.Kusuda: Effect of *Edwardsiella tarda* Lipopolisaccharide Immunization on Phagocytosis in the Eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 53, 201-204 (1987).
- 4) 楠田理一, 田中卓史: *Streptococcus sp.*に対するブリマクロファージの食菌作用に及ぼす抗体および補体のオプリーニン効果. 日水誌, 54, 2065-2069 (1988).
- 5) C. J. LoPresto, L. K. Schwarz, and K. G. Burnett: An *in vitro* culture system for peripheral blood leucocytes of a Sciaenid fish. *Fish & Shellfish, Immunology*, 5, 265-273 (1995).
- 6) J. G. Daly, A. R. Moore, and G. Olivier: A colorimetric

- assay for the quantification of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) lymphocyte mitogenesis. *Fish & Shellfish Immunology*, 5, 265-273 (1995).
- 7) T. Nakanishi : Ontogenetic development of the immune response in the marine teleost *Sebastes marmoratus*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 52, 473-477 (1986).
 - 8) 中西照幸 : カサゴ *Sebastes marmoratus* の免疫応答-I . 養殖研究所研究報告 No. 3, 81-89 (1982).
 - 9) M. J. Marsden, S. H. Hamdani, and C. J. Secombes: Proliferative responses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, T and B cells to antigens of *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology*, 5, 199-210 (1995).
 - 10) S. A. Ahmed, R. M. Gogal Jr., and J. E. Walsh : A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [³H]thymidine incorporation assay. *J. Immunol. Methods*, 170, 211-224 (1994).
 - 11) 豊島 聡, 木元雅夫, 今井康之 : 細胞増殖, 「続生化学実験講座 5 免疫生化学研究法」(日本生化学会編), 東京化学同人, 東京, 1986, pp.193-213.

第五章 β -カロテン強化ワムシの投餌がイシダイ・イシガキダイ 種苗の生残率と脾臓細胞の幼若化反応に及ぼす影響

5.1 目的

先にも述べた如くイシダイの種苗生産ではふ化後海面養殖に移動する沖出し時まで VNN ウイルスによる感染症を発症し大量斃死を起こす。この様な感染症の対策として、卵の消毒や飼育水の消毒等の防疫対策が実施されているが、海面養殖を行うほとんどの魚種ではその防疫に問題があると考えられた。

一方、ヒトをはじめとするほ乳動物では、宿主の免疫防御能の増強が宿主を種々の感染症から発症を防ぐということは周知となっている。この宿主の免疫防御能は ビタミン等の栄養因子や¹⁾色々な免疫賦活剤の投与で亢進すること^{2,3,4}が知られている。中でも栄養素の一つのプロビタミン A として知られる β -カロテンはその大量投与によって感染症の予防効果⁵⁾や白血球の機能亢進^{6,7)}が報告されているのみならず、大量投与による過剰症の発症も無い⁸⁾とされている。これらの点からこの様なウイルス感染症に対して抵抗力のある種苗を生産するために、第2章では魚類にもほ乳動物と同様の免疫防御機構が存在するか否かについて検討するとともに、第3章でイシダイの免疫防御機構に及ぼす β -カロテンの免疫賦活効果について検討し、その効果を確認した。

ところで、VNN ウイルスによる感染症を防御する上でふ化直後の仔魚から β -カロテンを大量投与する必要性が考えられた。そこで本章では、これらの知見を実際の種苗生産技術に応用するため、イシダイやイシガキダイ種苗生産における初期生物餌料であるシ

オミズツボワムシ(*Brachionus plicatilis* O,F,Muller, 以下ワムシ)にカロテノイド特に β -カロテンを取り込ませて強化し, イシダイとイシガキダイの種苗生産を試み, 生産した種苗の生残率, 成長, 免疫防御機能に及ぼす影響について検討した。

12) 材料と方法

5.2.1 餌料ワムシとその栄養強化

餌料には, ワムシの L 型を用いた。ワムシの栄養強化培養は, 30L パンライト水槽に海水 10L に対して魚油ゼラチンカプセル(スーパーカプセル A-1 クロレラ工業社製)浮遊液 1.5mL を添加し, 弱通気で培養した。その際の培養密度は, 1000 個体/mL とした。なお, 対照区には魚油ゼラチンカプセルのみを添加し, β -カロテン区には魚油ゼラチンカプセルに β -カロテン 540 μ g/mL を添加したものをを用いた。

5.2.2 ワムシ中のカロテノイドの測定

β -カロテン強化を行った飼育水 10 中のワムシをプランクトンネットで回収し, 凍結乾燥した。次いで, 共栓試験に乾燥ワムシ 1g をとり, 石油エーテル 5mL を加えて振盪し, 1500rpm, 3min の遠心分離を行い, カロテノイドの抽出を行った。上層の石油エーテルの 450nm における吸光度を測定した。なお, ワムシ内カロテノイドの換算は β -カロテン等量として換算し, 乾燥重量あたりで表した。

5.2.3 供試魚

供試魚には長崎市水産センターで自然採卵後ふ化させたイシダイ

仔魚及び鹿児島県栽培漁業センターで自然産卵後長崎市水産センターまで運搬し，ふ化させたイシガキダイ仔魚を用いた。

5.2.4 供試魚の飼育

供試魚の飼育には黒いビニールで側面を覆った 1,000 容パンライト水槽を用いた。照明には各水槽ごとに昼光色の蛍光灯(40W, 2本)を用い，9:00～17:00 時まで点灯した。イシダイ，イシガキダイの卵をそれぞれ 2 水槽に収容し，ふ化させた。ふ化後，両仔魚を実験区ごとに 20,000 尾ずつに調整した。なお，飼育期間はふ化後 0 日からの 24 日間であった。

飼育水には，紫外線照射ろ過海水を用い，換水量は 0.3 m³/日から仔魚の成長にあわせて 2.5 m³/日まで増加させ，その間の水温は 21～25℃であった。

生残率は，20:00 に無灯火状態で各水槽の異なる 5ヶ所から 10 ずつ採水し，それぞれの採水中における仔魚を計数し，1,000 あたりの生残尾数に換算した。

全長は，生残率の測定時に用いた海水から各区 20 尾ずつを無作為に採取し，拡大投影機を用いて測定した。

5.2.5 イシダイ・イシガキダイの脾臓細胞幼若化反応の測定

脾臓細胞の幼若化は第四章で検討した方法で行った。すなわち，稚魚より脾臓を実体顕微鏡下で摘出した。摘出した脾臓を海産魚の浸透圧となる様，調整した FRPMI1640 培地の中でピンセットを用いてすり潰し，氷蔵したポリ製の小試験管に入れ，遠心(4℃，1500rpm, 15min)し洗浄を行った。遠心後上清液を捨て，5%FBS(牛

胎児血清)を添加した FRPMI1640 培地を加えて Single Cell 浮遊液にし、脾臓細胞数を 1×10^6 cell/mL に調整した。調整した脾臓細胞を 5×10^5 cell/mL となるよう 96 穴マイクロプレート (FALCON, Microtest III plates) に分注し、Poke weed mitogen (PWM L-9379, SIGMA 社) $20 \mu\text{g/mL}$ あるいは、Concanavalin A (Con A C-0412, SIGMA 社) $100 \mu\text{g/mL}$ とともに CO_2 インキュベーター (25°C , 5% CO_2) 内で 72 時間培養した。幼若化の測定は、培養終了 24 時間前にプレートの各ウェルにアラマーブルー (Alamar Biosciences 社製) $20 \mu\text{L}$ を添加し、培養終了後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。なお、測定波長は主波長 570nm 、副波長 600nm であった。

11) 結果

12) 培養時間に伴うワムシ内カロテノイドの変化

ワムシの培養時間の経過に伴う体内カロテノイドの変化を Fig.5-1 に示した。

培養時間に伴うワムシ内カロテノイドの変化は、培養開始時に $120\mu\text{g/g}$ であったが、培養 3 時間目まで上昇し、ワムシ内カロテノイド量は約 $400\mu\text{g/g}$ を示し、以後は一定値を保った。

また、 β -カロテン強化を行ったワムシを UV 励起蛍光顕微鏡 (ニコン 落射蛍光顕微鏡 OPTIPHOT-2) 下で観察すると、油脂酵母のみで培養を行っていた強化前に比較してワムシの消化管内を中心に強い赤色蛍光を認めた (Fig.5-2)。

これらの結果より、飼育に用いた β -カロテン強化ワムシの培養時間は 4 時間とした。

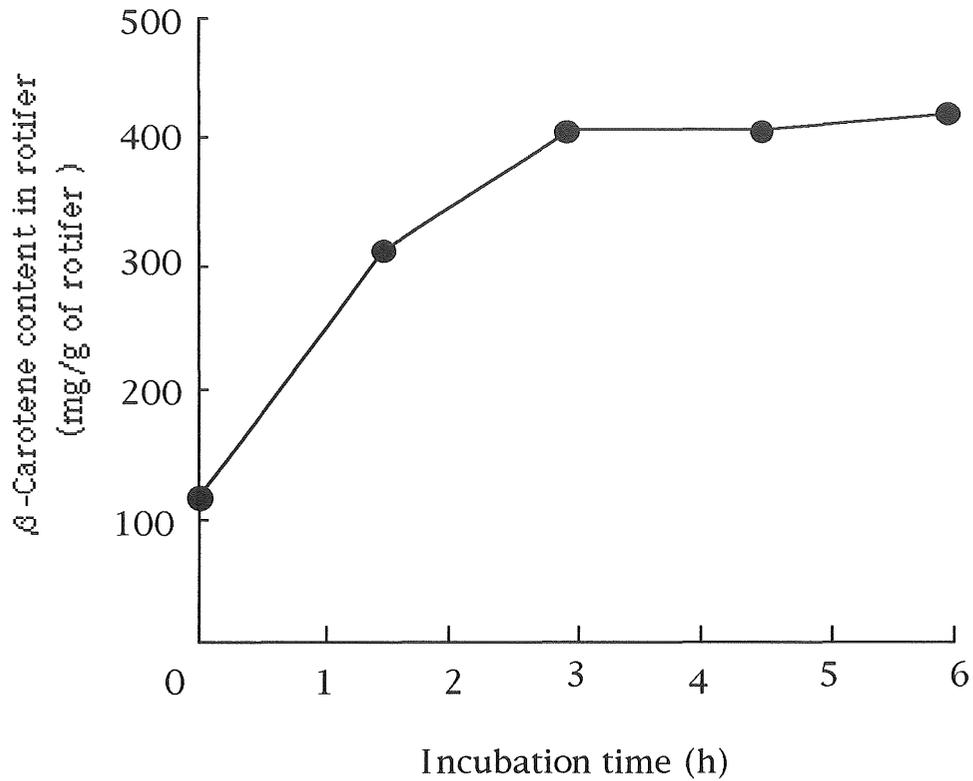


Fig. 5-1 The uptake of β -carotene in rotifer
Rotifers were incubated with β -carotene enclosed gelatin capsule, then, were measured β -carotene concentration in rotifers at indicated time.

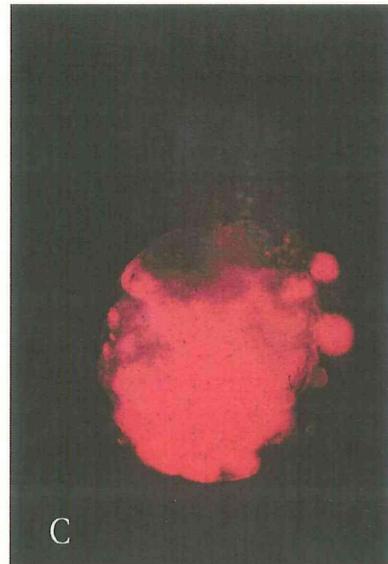
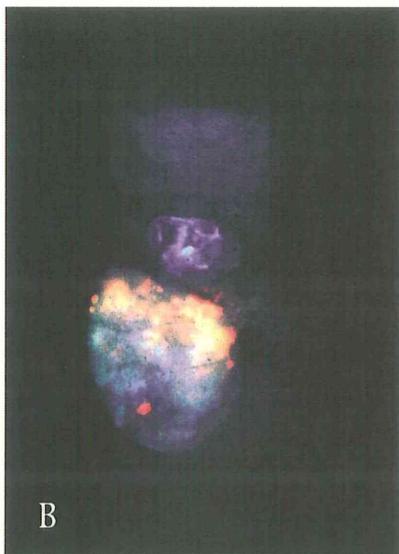


Fig.5-2 Light and fluorescence microscope photographs of β -carotene supplemented and unsupplemented rotifer
A: β -Carotene supplemented rotifer (Light microscope)
B: Unsupplemented rotifer (Fluorescence microscope)
C: β -Carotene supplemented rotifer (Fluorescence microscope)

5-3-2 イシダイ，イシガキダイの生残率と全長

飼育期間中におけるイシダイとイシガキダイの生残率の経日変化を Fig.5-3, 5-4 飼育終了時における生残率と全長を Table5-1 に示した。両魚種ともに生残率は飼育期間延長に呼応して減少し，飼育終了時における生残率は，イシダイでは対照区 39.1%， β -カロテン強化区 53.5%の生残率を示し，イシガキダイでは，対照区 21.1%， β -カロテン強化区 29.9%の生残率を示した。両魚種ともに飼育期間を通じて β -カロテン強化区の生残率が対照区に比較して高かった。飼育終了時における全長は，イシダイでは対照区 8.4 ± 0.3 mm， β -カロテン強化区 8.3 ± 0.2 mm，イシガキダイでは，対照区 9.8 ± 0.6 mm， β -カロテン強化区 9.9 ± 0.7 mm を示し，両魚種とも β -カロテン強化の有無に関わらず全長に有意な差を認めなかった。また，図示しなかったが，飼育期間を通じて両魚種ともに β -カロテン強化の有無に関わらず差を認めず，栄養障害に伴う奇形などの形態異常も認めなかった。

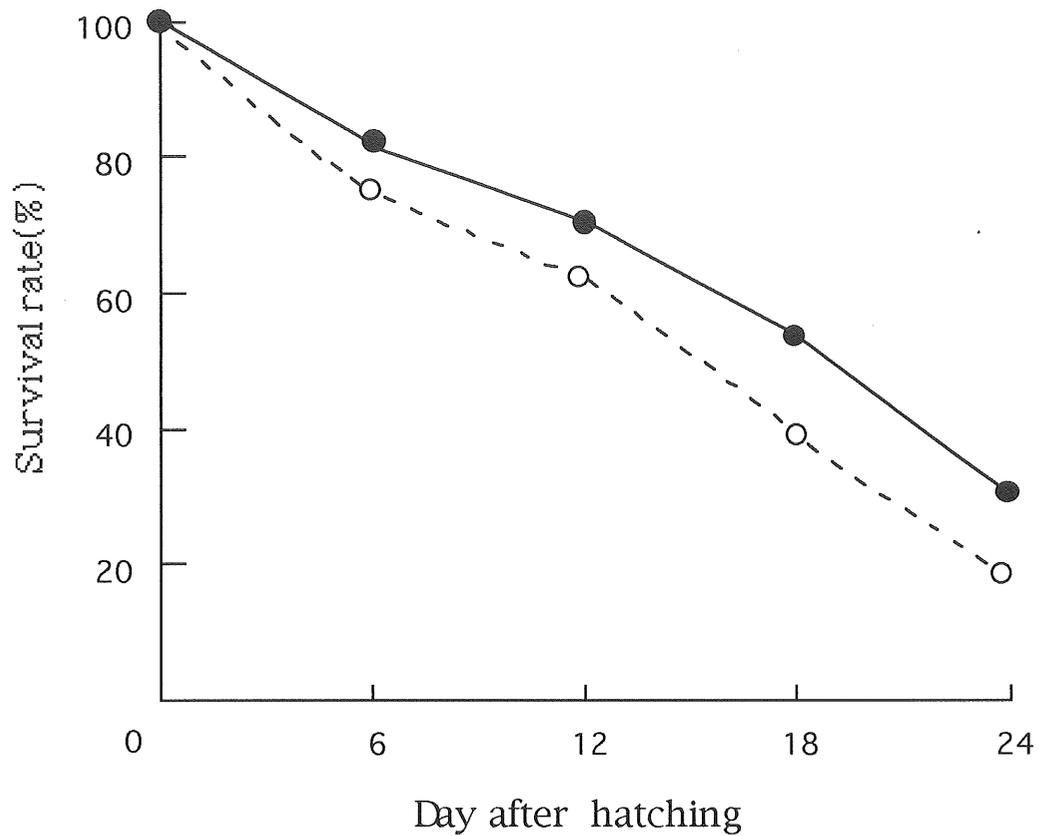


Fig. 5-3 Survival of Japanese parrotfish larvae during the experiment

Larvae were divided into β -carotene supplemented group (●) and un-supplemented group (○).

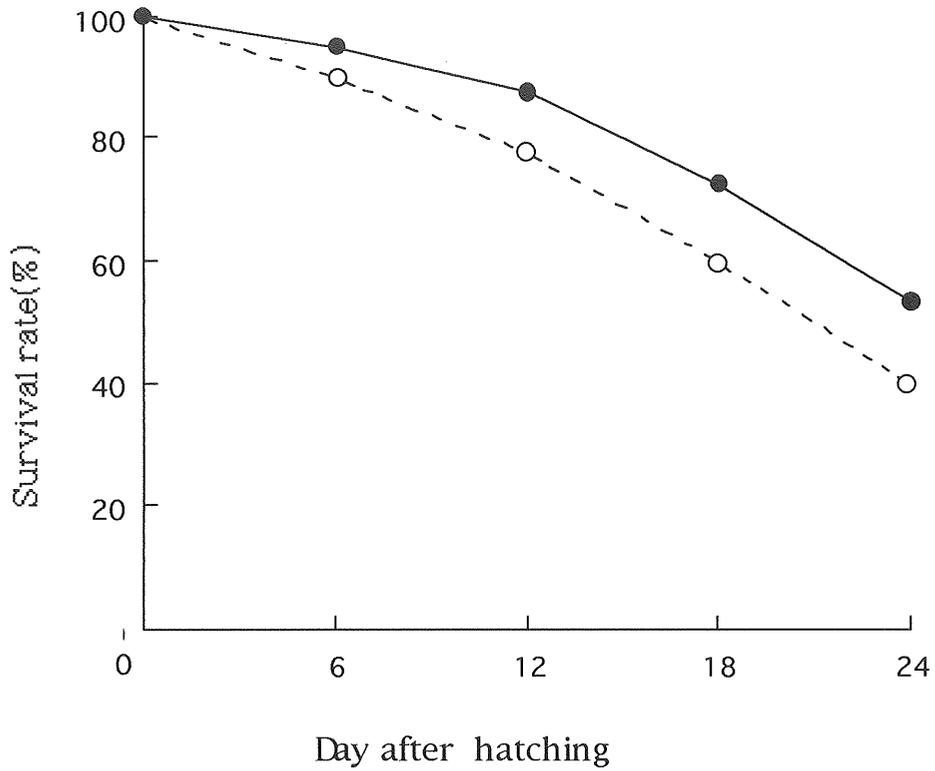


Fig. 5-4 Survival of Spotted parrotfish larvae (B) during the experiment

Larvae were divided into β -carotene supplemented group (●) and un-supplemented group (○).

Table 5-1

Final percent survival and body length

Experimental group	Survival ^a (%)	Body length (mm)
Japanese parrotfish		
Control	39.5	8.4±0.3 ^b
β -carotene supplemented	53.3	8.3±0.2
Spotted parrotfish		
Control	21.1	9.8±0.6
β -carotene supplemented	29.9	9.9±0.7

a: Final percent survival calculated from initial and final number of lava.

b: Mean ± SD for 10 specimens.

5.3.3 β -カロテン強化ワムシによる仔魚の脾臓細胞幼若化反応

イシダイの結果を Fig.5-5 イシガキダイの結果を Fig.5-6 に示した。

β -カロテン強化区と対照区のイシダイ脾臓細胞を培地のみで培養したところ、両区の脾臓細胞はほとんど幼若化せず、吸光度に差を認めなかった。一方、マイトージェンの ConA (10 μ g/mL 及び 100 μ g/mL), PWM (10 μ g/mL 及び 50 μ g/mL) とともに培養したところ、ConA 10 μ g/mL 及び PWM 10 μ g/mL, 50 μ g/mL で対照区に比較して β -カロテン強化区が高を示す傾向であった。また、ConA 100 μ g/mL では対照区 0.195 ± 0.017 , β -カロテン強化区 0.224 ± 0.018 と β -カロテン強化区が対照区に比較して優位に高い($p < 0.05$)幼若化反応を示した。

イシガキダイの幼若化反応の結果では、脾臓細胞を培地のみで培養したところ、先のイシダイと同様両区の脾臓細胞はほとんど幼若化せず、吸光度に差を認めなかった。一方、マイトージェンの ConA (10 μ g/mL 及び 100 μ g/mL), PWM (10 μ g/mL 及び 50 μ g/mL) とともに培養したところ、すべてで幼若化反応による吸光度の上昇が認められたが ConA 10 μ g/mL では両区に有意な差を認めなかった。一方、ConA 100 μ g/mL では対照区 0.151 ± 0.012 β -カロテン強化区 0.205 ± 0.012 , PWM 10 μ g/mL では対照区 0.141 ± 0.007 β -カロテン強化区 0.220 ± 0.011 , PWM 50 μ g/mL では対照区 0.154 ± 0.011 , β -カロテン強化区 0.192 ± 0.017 と β -カロテン強化区が対照区に比較して優位に高い($p < 0.05$ 及び $p < 0.05$)幼若化反応を示した。

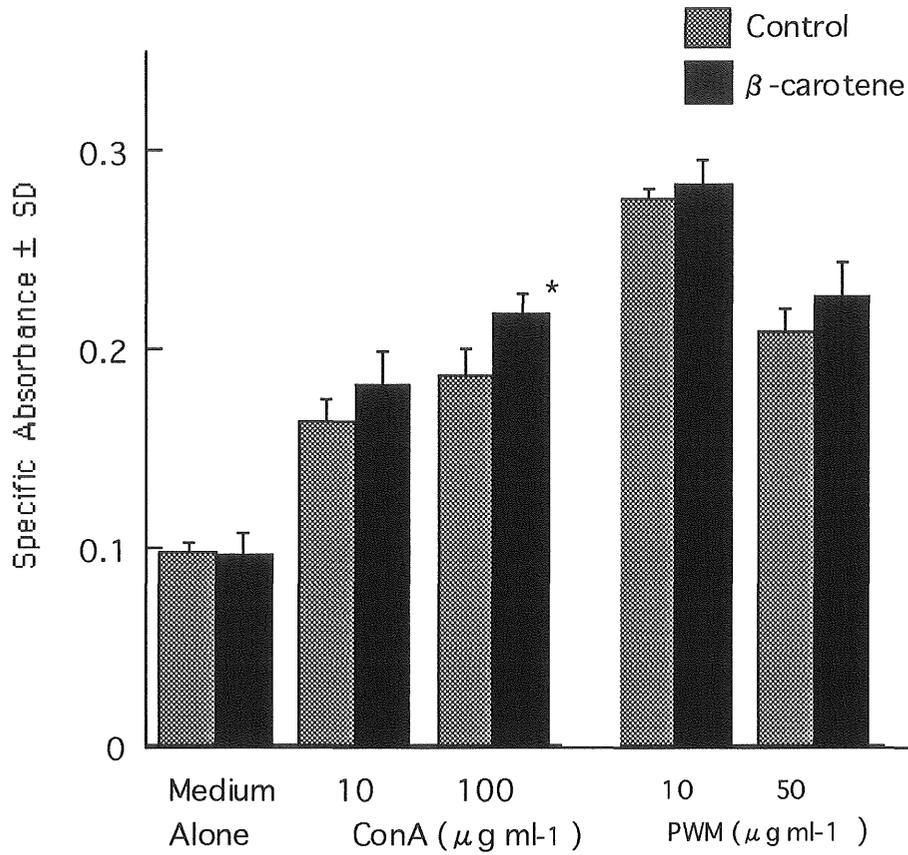


Fig. 5-5 Effect of β -carotene on *in vitro* splenocyte proliferation of Japanese parrotfish. Bars indicate the mean \pm SD for triplicate cultures in 2 independent experiments. (* $P < 0.05$)

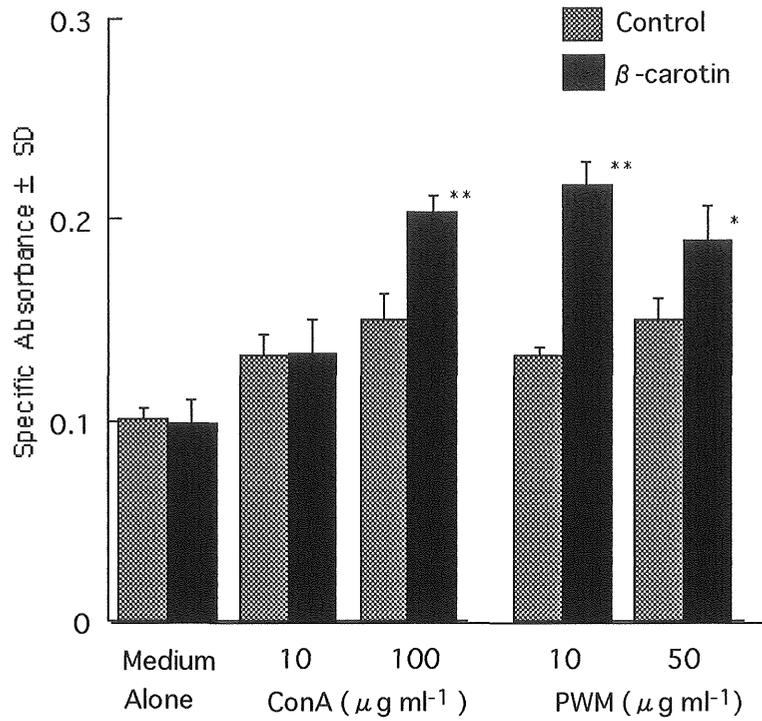


Fig. 5-6 Effect of β -carotene on *in vitro* lymphocyte proliferation of Spotted parrotfish larvae
 Bars indicate the mean \pm SD for triplicate cultures in 2 independent experiments. (* $P < 0.05$, ** $p < 0.01$)

5.4 考察

本章の研究で、 β -カロテン強化ワムシを使用してイシダイイシガキダイの種苗生産を行ったところ、両魚種の生残率の改善が認められ、大量投与に伴う奇形などの発生も認められなかった。この点について、哺乳動物では、 β -カロテンの大量投与がハムスターにおける気管支上皮腫⁹⁾やマウスの繊維肉腫¹⁰⁾の生残率の改善や、ラットに対する抗変異原活性を有するとされ¹¹⁾ている。これら効果は β -カロテンのプロビタミン A の作用¹²⁾に起因するとされている。また、 β -カロテンの大量投与は脂溶性ビタミンにもかかわらずヒトや哺乳類に過剰症を起こさないとされ⁸⁾、これらの魚種に対する大量投与はビタミン A の大量投与より安全であろうと考えられた。

また、 β -カロテン強化ワムシで飼育したイシダイやイシガキダイ種苗の脾臓細胞はマイトーゲン刺激に対する幼若化の反応性を高めていた。同様の知見を、Daniel⁶⁾や森口⁷⁾もヒトリンパ球を用いた *in vitro* の β -カロテンやビタミン A 添加実験で報告している。また、Tachibana ら⁵⁾は、ビタミン A の大量投与がラット肺胞マクロファージの殺腫瘍機能を高めると報告し、Alexander ら¹³⁾は、 β -カロテンの大量投与(180 μ g/日、2週間)投与がヒトリンパ球中のヘルパー T 細胞が増加させると報告している。さらに、Coodley ら¹⁴⁾は、ヒトエイズウイルス感染の患者に β -カロテンを投与したところリンパ球中 CD4 の増加が認められたと報告している。本章で検討を行ったイシダイやイシガキダイの種苗が T リンパ球を介した免疫防御機構を持っているか否かは明確ではない。本章で認められたこのような効果が、 β -カロテンのプロビタミン A

としての働きに起因するか、あるいはそれ自身が持つ抗酸化活性に起因するかは明らかではない。ともあれ、 β -カロテン強化ワムシを用いてイシダイやイシガキダイの種苗生産を行うことで、宿主の脾臓細胞を介した免疫防御機構を亢進させると考えられた。

以上の知見をもとに、現在著者が勤務している長崎市水産センターでは VNN ウイルス感染に伴う大量斃死の発生し極めて種苗生産の難しいとされるイシダイとイシガキダイの種苗を β -カロテン強化ワムシを用いて安定生産しており、これらの種苗の安定供給が可能な我が国唯一の種苗生産施設となっている。

これらのことより、 β -カロテン強化ワムシを用いてイシダイやイシガキダイの種苗生産を行うことで、ウイルス感染症をはじめ種々の感染症に対して抵抗力のある健康な種苗の安定した供給が可能になると考えられた。

文献

- 1) 五十嵐 修：ビタミンの生物学「生命科学シリーズ」，裳華房，東京，105-111(1988).
- 2) 岡村春樹、川口久美子、庄司宏： γ -INF の産生 機構、蛋白質 核酸 酵素「INF 研究の進歩別冊 NO.25」，12 ，69-80(1981).
- 3) G.Sonnenfeld, Mandel, A. D. and Merigan : T. C.Cell, Immunol. **34**, 193 (1997).
- 4) K. Huang, R. M. Donahoe, F. B. Gordon and H. R : Dressler Infect. Immun. **4**, 581 (1971).
- 5) K. Tachibana, S. Sone, E. Tsuburu & Y.Kishino :

- Stimulatory effect of vitamin A on tumoricidal activity of rat alveolar macrophages, *Br.J.Cancer.* **49**, 343-348 (1984).
- 6) Daniel, L.R., B. P. Chew, T. S. Tanaka & L. W. Tjoelker : In vitro effects of β -carotene and vitamin A on peripartum bovine peripheral blood mononuclear cell proliferation, *J. Dairy Sci.* , **74**, 911-915(1991).
 - 7) Moriguchi, S., N. Okishima, S. Sumida, K. Okamura & Y. Kishino : β -carotene supplementation enhances lymphocyte proliferation with mitogens in human peripheral blood lymphocytes. *Nutr. Res.* **16**. 211-218 (1996).
 - 8) Garewal, H. S., N. M. Ampel, R. R. Watson, R. H. Prabhala & C. L. Dols : A preliminary trial of β -carotene in subjects infected with the human immunodeficiency virus. *J.Nutr.* **122**, 728-732 (1992).
 - 9) Woltrbeek, A. P., A. A. Rutten & V. J. Feron,: High survival rate of hamsters given intratracheal instillations of benzo[a]pyrene and ferric oxide and keot on a high β -carotene diet. *Carcinogenesis* , **15**, 133-136(1994).
 - 10) Combs,W.,S. T. Sonis, J. Fitzgerald, C. Tracy & R. Wilson: In vivo and in vitro effects of β -carotene and algae extracts in murine tumor models. , *Nutr. & Cancer* . **12**, 371-380(1989).

- 11) Aidoo, A., L. E. Lyn-Cook, S. Lensing, M. E. Bishop & W. Wamer :. In vivo antimutagenic activity of β - carotene in rat spleen , lymphocytes. *Arcinogenesis*, 16, 2237-2241(1995).
- 12) A. Bendich: β -carotene and the immune response. *Proc. Nutr. Soc.* 12, 400-411(1991).
- 13) L. Daniel, B. P. Chew, T. S. Tanaka and L. W. Tjoelker: In vitro effects of β -carotene and vitamin A on peripartum bovine peripheral blood mononuclear cell proliferation. *J. Dairy Sci.*, 74, 911-915(1991).
- 13) M. Alexander, H. Newmark and R. G. Miller: Oral β - carotene can increase the number of OKT4+ cells in blood. *Immunol. Lett.* 9, 221-224(1985).
- 14) G. O. Coodley, H. D. Nelson, M. O. Loveless and C. Folk: β - carotene in HIV infection. *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes* .6 .272-276(1993).

第六章 カロテノイド強化ワムシの投餌がマダイ・トラフグ種苗の生残率とリンパ球の幼若化反応に及ぼす影響

6.1 目的

先の 4 章までで、魚類にもほ乳動物と同様の免疫防御機構が存在し、その免疫防御機構が β -カロテンの添加で亢進することが判明した。第 5 章では、これらの知見を実際の種苗生産技術に応用するため、イシダイとイシガキダイの種苗生産において初期生物餌料であるシオミズツボワムシ(*Brachionus plicatilis* O,F,Muller, 以下ワムシ)にカロテノイド特に β -カロテンを取り込ませて強化し、イシダイとイシガキダイの種苗生産を試みた。その結果、生産した種苗の生残率と免疫防御機能の亢進に効果を確認した。ところでカロテノイドの一種であるアスタキサンチンの養殖用飼料への添加はマダイ^{10,11)}やアユ¹²⁾の体色改善効果があると報告され、現在、マダイ養殖などで体色改善の目的で広く利用されている。

そこで、本章では、初期餌料であるワムシにカロテノイド特にアスタキサンチン、 β -カロテンを添加し、マダイとトラフグの種苗生産を試み、生産した種苗の生残率、免疫防御機能に及ぼす影響について検討した。

6.2 実験方法

6.2.1 供試魚および飼育

供試魚には長崎市水産センターでふ化させたマダイ(*Pagrus major*)とトラフグ(*Takifugu rubripes*)の仔魚を用いた。

マダイの飼育は、供試魚を黒いビニールで側面を覆った 1000l 容パ

ンライト水槽 3 面に収容し，各 20000 尾ずつを対照区， β -カロテン区，アスタキサンチン区の 3 区に分けて，屋内で飼育した。飼育期間は，ふ化後 0 日（平成 11 年 4 月 15 日）からの 20 日間であった。飼育水には，UV 照射ろ過海水を用い，換水量は $0.3 \text{ m}^3/\text{日}$ から仔魚の成長にあわせて $2.5 \text{ m}^3/\text{日}$ まで増加させた。なお，飼育環境の検査として，毎日の海水 pH，水温，溶存酸素量の測定を行った。生残率は，毎夜 10 時に無灯火状態で各水槽の異なる 5 箇所から 10l ずつ採水し，それぞれの採水中における仔魚を照明下で計数し，1000l あたりの生残尾数に換算し測定した。全長は，生残率の測定時に用いた海水から各区 20 尾ずつを無作為に採取し，拡大投影機を用いて測定した。

トラフグの飼育も，マダイ同様とし，対照区， β -カロテン区，の 2 区に分けて飼育した。飼育期間は，ふ化後 0 日（平成 11 年 3 月 24 日）からの 28 日間であった。

6.2.2 餌料ワムシとその栄養強化

餌料には，ワムシ(*Brachionus plicatilis* O,F,Muller)の L 型を用い，毎日 2 回投餌を行った。ワムシの栄養強化は，海水 10l に対して魚油ゼラチンカプセル(スーパーカプセル A-1 クロレラ工業社製)浮遊液 1.5ml を添加し，ワムシを室温で約 4 時間培養した。その際の培養密度は，1000 個体/ml であった。なお，対照区には魚油ゼラチンカプセルのみを添加し， β -カロテン区には魚油ゼラチンカプセルに β -カロテン $540 \mu\text{g/ml}$ を添加，アスタキサンチン区には，魚油ゼラチンカプセルにアスタキサンチン $540 \mu\text{g/ml}$ を添加，したものを用いた。

6.2.3 マダイ・トラフグの脾臓リンパ球の幼若化の測定

脾臓リンパ球の幼若化は既報に従って行った。⁹⁾ すなわち、マダイはふ化後 20 日目の仔魚より、トラフグはふ化後 28 日目の稚魚より脾臓を実体顕微鏡下で摘出した。摘出した脾臓を海産魚の浸透圧となる様、調整した FRPMI1640 培地の中でピンセットを用いてすり潰し、氷蔵したポリ製の小試験管に入れ、遠心(4℃, 1500rpm, 15min)し洗浄を行った。遠心後上清液を捨て、5%FBS(牛胎児血清)を添加した FRPMI1640 培地を加えて Single Cell 浮遊液にし、脾臓リンパ球数を 1×10^6 cell/ml に調整した。調整リンパ球を 5×10^5 cell/ml となるよう 96 穴マイクロプレート(FALCON, Microtest III plates)に分注し、Poke weed mitogen (PWM L-9379, SIGMA 社) $20 \mu\text{g/ml}$ あるいは、Concanavalin A (Con A C-0412, SIGMA 社) $100 \mu\text{g/ml}$ とともに CO₂ インキュベーター(25℃, 5% CO₂)内で 72 時間培養した。幼若化の測定は、培養終了 24 時間前にプレートの各ウェルにアラマーブル(Alamar Biosciences 社製) $20 \mu\text{l}$ を添加し、培養終了後、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。なお、測定波長は主波長 570nm, 副波長 600nm であった。

6.3 結果

6.3.1 飼育結果

マダイの飼育環境は、飼育水の水温, pH, 溶存酸素量の平均値及び範囲はそれぞれ 23.0℃ (21.6~24.4℃), 8.05(7.72~8.55), 7.19ppm(6.22~8.08ppm)で、トラフグの飼育環境は、飼育水の水温, pH, 溶存酸素量の平均値及び範囲はそれぞれ 17.9℃ (15.4~20.1℃), 8.07(7.96~8.18), 6.91ppm(6.12~7.83ppm)であった。

生残率は、マダイでは、各区ともふ化後 5 日目までに初期減耗が認められ、対照区では 5 日目以降も飼育期間の延長に呼応して生残率が低下し、実験終了の 20 日目では 54.5 %となった。β-カロテン強化区，アスタキサンチン強化区ではふ化後 5 日目以降は高い歩留まりを示し、大きな減少を認めず、実験終了の 20 日目の生残率はβ-カロテン強化区 80.3%，アスタキサンチン強化区 78.7%と対照区より高値を示した (Fig.6-1)。トラフグではβ-カロテン強化区，対照区とも、ふ化後 14 日目までに初期減耗が認められ、対照区では 14 日目以降も飼育期間の延長に呼応して生残率が低下し、実験終了の 28 日目では 32.3 %となった。一方、β-カロテン強化区ではふ化後 14 日目以降は高い歩留まりを示し、実験終了の 28 日目の生残率は 59.8%と対照区より高値を示した (Fig.6-2)。

マダイ仔魚の全長は、飼育期間の延長に呼応して大きくなり、試験開始時に全長 2.8 ± 0.1 mm の仔魚が、終了時に対照区 10.9 ± 1.2 mm，β-カロテン強化区 10.3 ± 1.0 mm，アスタキサンチン強化区 10.8 ± 1.0 mm となり各区の成長に有意な差は認められなかった (Fig.6-3)。また、トラフグ仔魚の全長は、試験開始時に全長 3.23 ± 0.07 mm の仔魚が、終了時に対照区 10.8 ± 0.8 mm，β-カロテン強化区 11.4 ± 0.7 mm となり両区の成長に有意な差は認められなかった (Fig.6-4)。また、カロテノイド強化の各区の供試魚に栄養障害に伴う奇形などの形態異常は認められなかった。

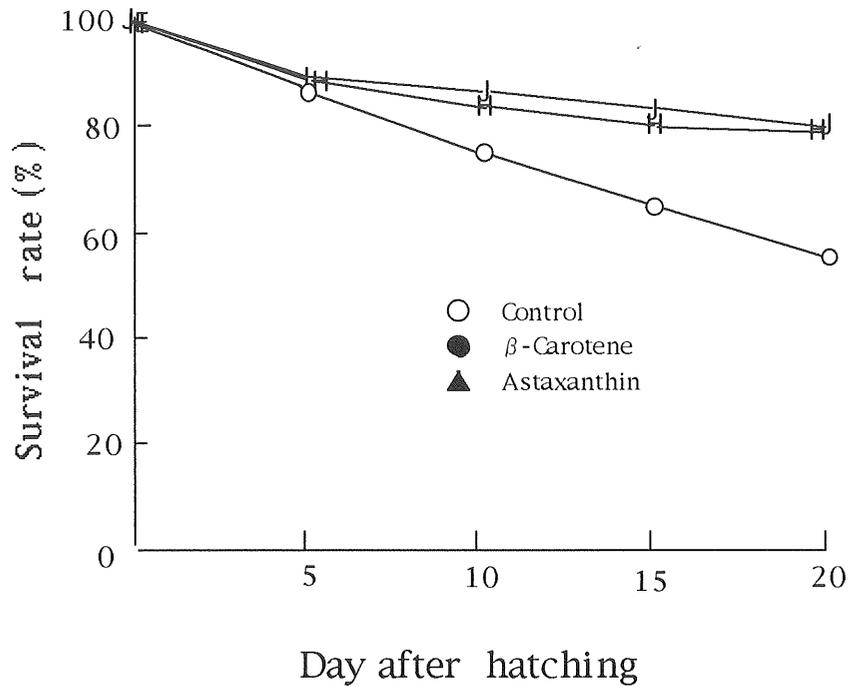


Fig.6- 1. Survival of red sea bream larvae during the experiment.

Larvae were divided into 3 groups. Then, they were fed β -carotene supplemented, astaxanthin supplemented or unsupplemented (control) rotifers twice a day for 20 days.

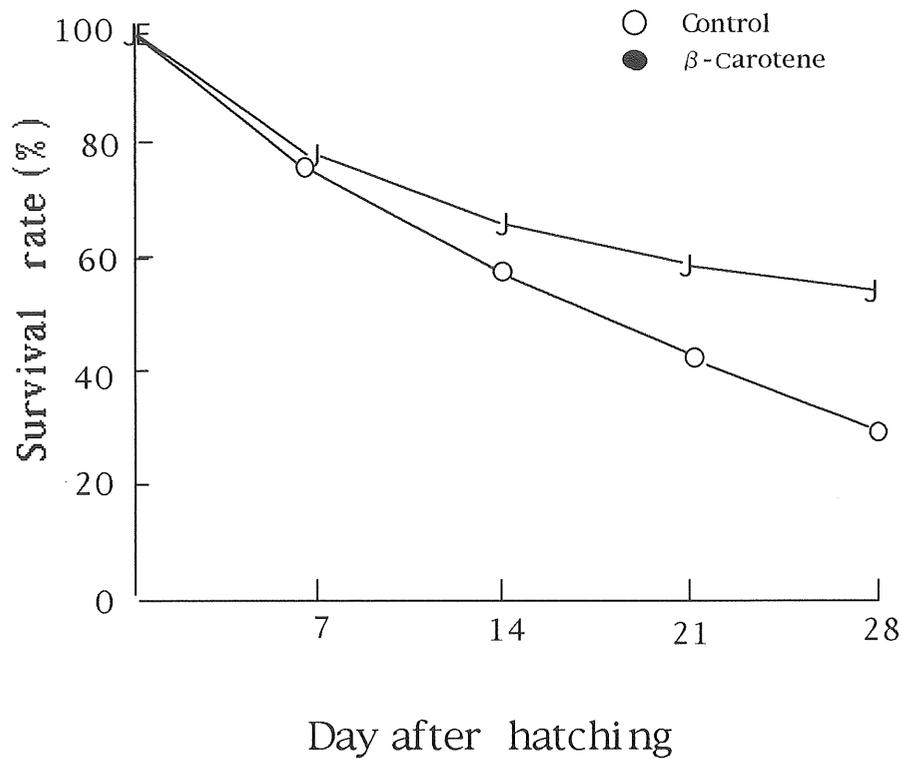


Fig.6-2. Survival of Tiger puffer larvae during the experiment.

Larvae were divided into 2 groups. Then, they were fed β -carotene supplemented or unsupplemented (control) rotifers twice a day for 28 days.

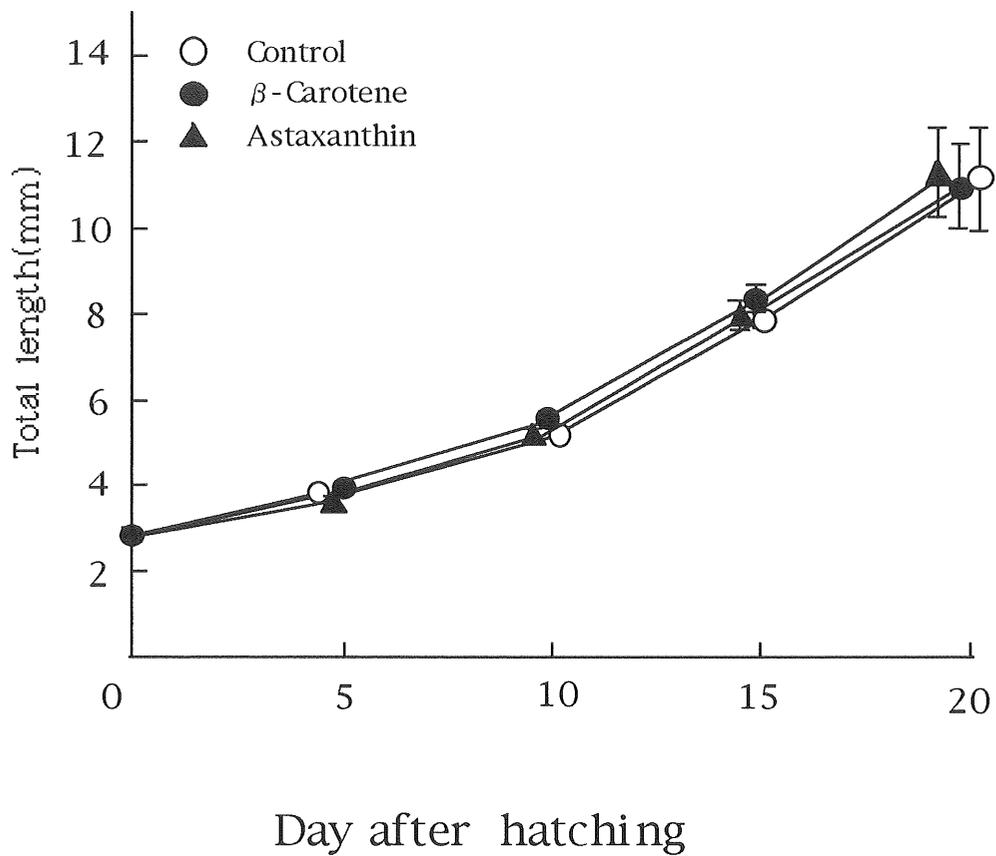


Fig.6- 3. Growth of red sea bream larvae during the experiment .

Bars indicate the mean \pm SD of 10 fish.

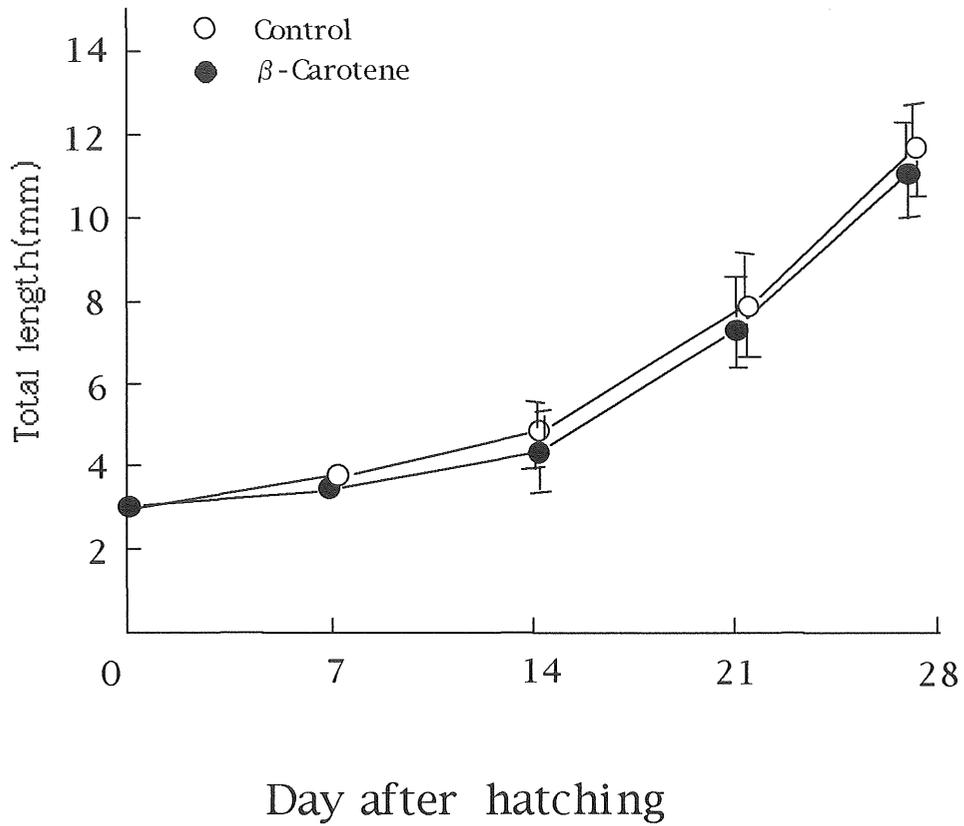


Fig.6-4. Growth of Tiger puffer larvae during the experiment .
Bars indicate the mean \pm SD of 10 fish.

6.3.2 マダイ・トラフグ脾臓細胞の幼若化反応

マダイでは、飼育終了時の供試魚より脾臓を採取し培地のみで培養したところ、対照区の吸光度と比較して β -カロテン強化区、アスタキサンチン強化区ともに有意な差は認められなかった。PWM 20 μ g/ml 刺激では、対照区は培地のみと比較して 1.30 倍の吸光度を示したが、 β -カロテン強化区は 1.62 倍、アスタキサンチン強化区は 1.56 倍と有意に高い吸光度を呈し、カロテノイド強化の両区が対照に比較して有意に高いリンパ球の幼若化反応を示した。Con A100 μ g/ml 刺激では、対照区は培地のみと比較して 1.35 倍の吸光度を示したが、 β -カロテン強化区では 2.11 倍、アスタキサンチン区は 1.88 倍の結果となり、カロテノイド強化の両区が対照に比較して有意に高い幼若化を示した (Fig.6-5)。

トラフグでは、飼育終了時の供試魚より脾臓を採取し培地のみで培養したところ、対照区の吸光度と比較して β -カロテン強化区に有意な差を認めなかった。PWM 20 μ g/ml 刺激では、対照区は培地のみと比較して 1.30 倍の吸光度を示したが、 β -カロテン強化区は 1.83 倍と有意に高い吸光度を呈した。Con A100 μ g/ml 刺激では、対照区は培地のみと比較して 1.35 倍の吸光度を示したが、 β -カロテン強化区では 2.21 倍となり、対照区に比較して有意に高いリンパ球の幼若化を示した (Fig.6-6)。

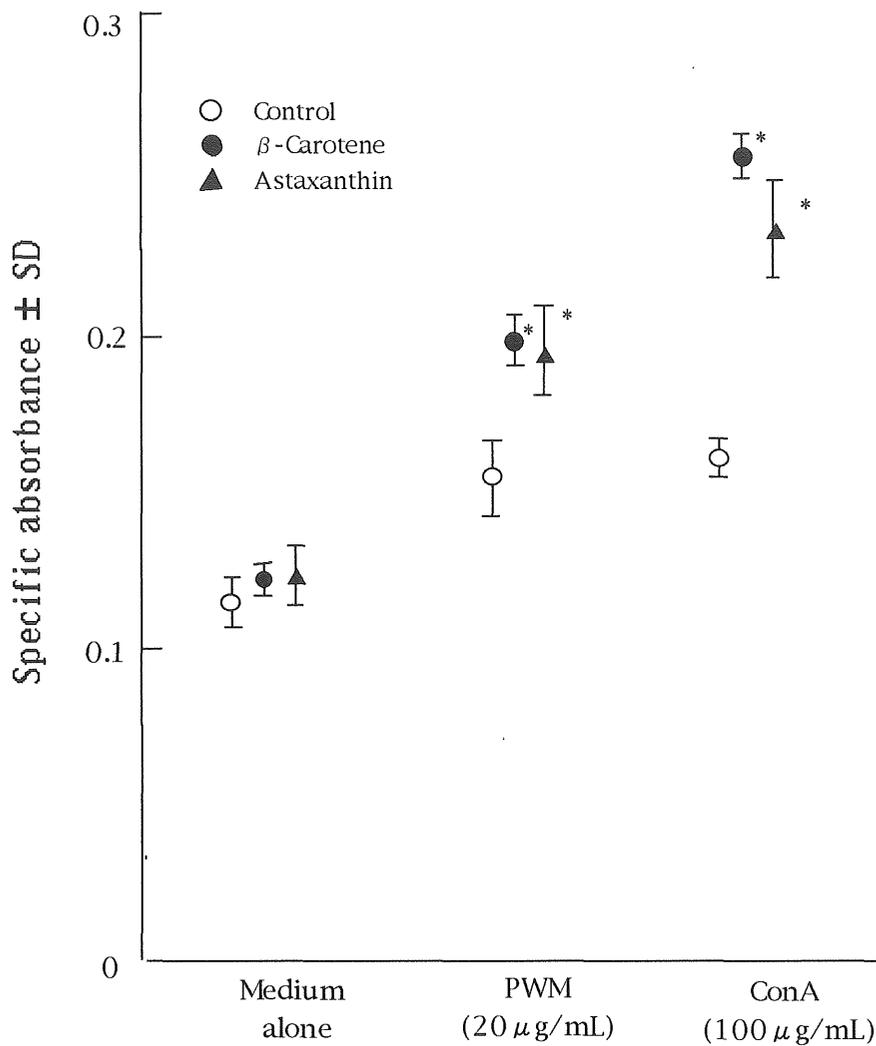


Fig.6- 5. Effect of β -carotene and astaxanthin on *in vitro* splenocyte proliferation of red sea bream. 5×10^5 cells/well of splenocytes from each group were incubated with or without Con A ($100 \mu\text{g/mL}$) or PWM ($20 \mu\text{g/mL}$) for 72 h. Alamer Blue was added to 24 h post culture set up. The optical density was measured with a Titertec Multiskan plate reader at 570 nm and 600 nm. Bars indicate the mean \pm SD of triplicate cultures in 3 independent experiments. (* $p < 0.01$)

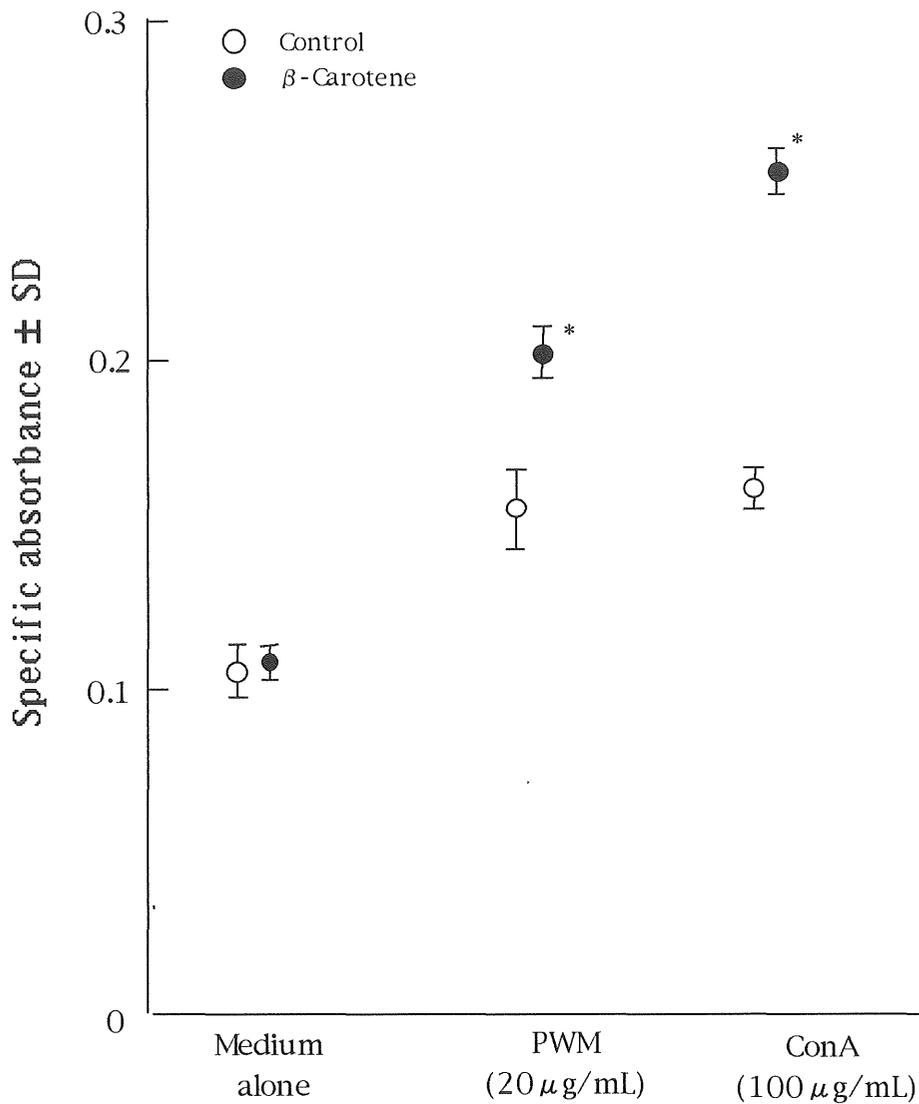


Fig.6-6. Effect of β -carotene *in vitro* splenocyte proliferation of Tiger puffer. Experimental conditions were same as shown in Fig.6-5. Bars indicate the mean \pm SD of triplicate cultures in 3 independent experiments. (* $p < 0.01$)

6.4 考察

カロテノイド強化ワムシを用いてマダイ（ β -カロテンおよびアスタキサンチン）、トラフグ（ β -カロテン）の種苗生産を行い、カロテノイド強化の有効性の有無を検討した。ふ化後 20 日目のマダイの結果では、生残率ではカロテノイド強化の両区の生残率が対照区より高かったが、供試魚の全長からみた成長には有意な差は認められなかった。ふ化後 28 日のトラフグでも、生残率ではカロテノイド強化が対照区より高かったが、供試魚の全長からみた成長にはカロテノイド強化の影響は両魚種ともに認められなかった。また、飼育期間を通じて供試魚に栄養障害に伴う奇形などの形態変化は認められなかった。この点について、竹内ら¹³⁾はヒラメ種苗を用いた実験においてビタミン A の大量投与が魚体の奇形を誘発するものの、 β -カロテンの大量添加は奇形を誘発しない結果を報告しており、著者らの β -カロテン、アスタキサンチンの添加も種苗の成長等に障害を与えるものではないと考えられた。

脾臓リンパ球の幼若化を検討したところ、哺乳動物では T,B 細胞を刺激するとされる PWM $20 \mu\text{g/ml}$ 刺激による幼若化は、対照区では培地のみに対して若干の幼若化反応が認められたものの、カロテノイド強化の両区では高い幼若化反応を呈した。同様に、ヒトやラットの哺乳動物で T 細胞を刺激するとされる Con A $100 \mu\text{g/ml}$ による幼若化でも β -カロテン強化区、アスタキサンチン強化区で対照区に比較して高い幼若反応を示した。Graham らは魚類リンパ球がインターフェロンを産出するであろうと報告している。¹⁴⁾われわれが供試魚としたマダイやトラフグのリンパ球が T 細胞や B 細胞などに分化しているか否かは明確ではない。ともあれ、本実

験で脾臓細胞の幼若化能が亢進していたことより、マダイやトラフグでも同様の免疫防御機構があり、それぞれの機能亢進の可能性が示唆された。哺乳動物ではビタミン A や β -カロテンの大量投与が宿主のマクロファージを介した免疫防御能や T リンパ球由来の γ -IFN 産生を亢進させることは周知となっている。^{6,7)} また、 β -カロテンの免疫賦活作用は β -カロテンが体内でビタミン A に変換された際のビタミン A の持つアジュバント活性や β -カロテン自体の抗酸化作用に起因するとされている。^{6,7)} 本研究において哺乳動物ではプロビタミン A としての働きを持たないアスタキサンチンも β -カロテンと同様の免疫賦活作用を認めた。このことより本研究で認められた免疫賦活作用はプロビタミン A としての作用よりもむしろカロテノイドそのものの抗酸化作用に起因する可能性が示唆された。しかしながら β -カロテンより抗酸化力の強いとされるアスタキサンチンでも β -カロテンと同程度の効果しか認められなかった点は各カロテノイドの強化量の点からさらに検討の必要があると考えられた。

これらのことより、 β -カロテンやアスタキサンチンなどのカロテノイドで強化した餌料ワムシを用いてマダイやトラフグの種苗生産を行うことで免疫防御能の高い健康な種苗生産の可能性が考えられた。

文献

- 1) 西岡豊弘,古澤 徹,水田洋之助:種苗生産過程の海産魚介類における疾病発生状況(1989~1994年).水産増殖, 45, 285-290(1997).
- 2) 室賀清邦:海産魚介類の仔稚におけるウイルス性および細

- 菌性疾病. 魚病研究, 30, 71-85 (1995).
- 3) 大槻健蔵 : インターフェロン誘起プロテインキナーゼと抗ウイルス作用. 「インターフェロン研究の進歩, 蛋白質核酸酵素別冊 No.25」, 共立出版, 東京, 1981, pp.220-226.
 - 4) A. Bendich : Vitamin and immunity . *J.Nutr.*, 122, 601-603(1992).
 - 5) V.S. Blazer and R.E. Wolke. The effect of α -tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of Rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Aquaculture*. 37, 1-9(1984).
 - 6) J. Rhodes : Human Interferon Action Reciprocal regulation by Retinoic Acid and β -carotene. *JNCI*, 70, 833-836(1983)
 - 7) A. Bendich : Carotenoids and the immune response . *J.Nutr.*, 119, 112-115(1989).
 - 8) M. Tsushima and T. Matsuno : The role of β , β -carotene on growth and survival of Juvenile Japanese abalone *Haliotis discus*. *Fisheries Sci.*, 60, 660-661 (1998).
 - 9) K. Tachibana, M. Yagi, K. Hara, T. Mishima, and M. Tsuchimoto : Effects of feeding of β -carotene-supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae (Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*) and Spotted parrotfish (*Oplegnathus punctatus*)): preliminary trials. *Hydrobiologia*, 358, 313-316 (1997).
 - 10) Y. Tanaka, T. Katayama, K.L. Simpson, and C.

- O.Chichester : The biosynthesis of astaxanthin-XX. The carotenoids in marine red fish and the metabolism of the carotenoids in sea bream,*Chrysophrys major Temminck and Schlegel*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 42, 1177-1182(1976).
- 11) T. Fujita, M. Satake, T. Watanabe, C. Kitajima, W. Miki, K. Yamaguchi, and S. Konosu : Pigmentation of cultured red sea bream with astaxanthin diester purified from krill oil.*Nippon Suisan Gakkaishi*. 49, 1855-1861(1983).
- 12) 松野隆男,津島乙幸,秋山敏男,新井茂 : アスタキサンチンによるアユの体色改善.水産増殖. 42,101-106 (1994).
- 13) T.Takeuchi, J. Dedi, C. Ebisawa, T. Watanabe, T. Seikai, K. Hosaya, and J. Nakazoe : The effect of β -carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fisheries Sci.*, 61, 141-148(1995)
- 14) S. Graham and C. J. Secombes : Do fish lymphocytes secrete interferon- γ ? . *J. Fish Biol.*, 36, 563-573(1990).

第七章 総括

本論文は、ウイルスや細菌性の疾病に強い、免疫防御能の高い健康な種苗生産を可能とすることを目的として、魚の餌料に β -カロテンを大量に添加して、それが魚、主にイシダイの生体防御機能に及ぼす影響について明らかにした。その結果を以下に要約する。

第一章では、本研究の目的と意義および概要について述べた。

第二章では、魚類にもホ乳類と同様の生体防御機構が存在することを検討するため、養殖イシダイの脾臓細胞をコンカナバリン A セファロース 4B ビーズ(ConA.S.4B.)と共に48時間培養しその上清によるm ϕ 活性化を検討した。その結果、イシダイ脾臓細胞の増殖像がConA.S.4B.のビーズ上で認められた。そして、ConA.S.4B.培養上清で培養したイシダイ腹腔 m ϕ の貪食能と細胞内のペルオキシターゼ活性の両機能は共に亢進していた。

その上清を、ホ乳類で γ -INF失活処理とされている熱(56℃)或いは、酸(pH 2)処理をおこなったところ、上清は、イシダイの m ϕ を活性化する能力を消失した。また、イシダイ ConA.S.4B.培養上清の m ϕ 活性化の種特異性をマウス腹腔 m ϕ を用いて、検討したところ、マウス m ϕ を活性化する能力を持たず、イシダイ ConA.S.4B.培養上清の種特異性が存在した。

以上のことより、養殖イシダイの脾臓細胞は、ConA.S.4B.で培養すると γ -INFを産生すると示唆され、魚類のイシダイも哺乳類と同様の生体防御機構を有すると推察した。

第三章では、イシダイを二つの餌料群(対照群、 β -カロテン大量投与群)に分け飼育した。約12ヶ月後両群のイシダイの脾臓細胞から ConA.S.4B.培養上清を作成し、この γ -インターフェロン

の力価をmφ機能である貧食能とペルオキシターゼ活性から比較検討した。その結果、β-カロテン大量投与群の ConA.S.4B.培養上清はmφの貧食能、ペルオキシターゼ活性、共に対照群と比較して高かった。

以上より、イシダイに対するβ-カロテンの大量投与が脾臓細胞の高いγ-インターフェロン産生能を誘導したと考えられた。これらのことしより、餌料にβ-カロテンを大量に添加することでウイルス感染症に対して抵抗力のある種苗や養殖魚の産生を可能にする と推察した。

第四章では、これまで不可能であった仔魚期の種苗(全長 8mm 前後)の免疫防御機能の測定方法を脾臓細胞の幼弱化反応を用いて行えるか否かを、哺乳動物のリンパ球幼若化の測定のために開発された細胞増殖測定薬であるアラマーブルーを培養液に添加し吸光度を測定するだけという簡便な方法について検討し、幼弱化反応による細胞数の増加と、アラマーブルー添加による吸光度の関係は有意な正の相関を示した。また、反応のための各マイトゲンに至適濃度と細胞数も求めた。

第五章では、魚類の仔魚にβ-カロテンを摂取させるため、まず、仔魚の餌料である、シオミズツボウムシ(以下「ウムシ」と記す)へβ-カロテンを強化しイシダイ、イシガキダイの種苗生産で生残率の向上や免疫機能亢進に及ぼす影響について検討した。その結果、成長においては、イシダイ、イシガキダイともに差は無かったが、仔魚の生残においてはβ-カロテン添加区が対照区と比して高い値を示した。脾臓細胞の幼弱化反応でも、β-カロテン添加区が対照区と比して高い値を示した。これらのことより、種苗生産でも、生

物餌料を栄養強化することにより免疫力の強い種苗生産の可能性が示唆できた。

第六章では、 β -カロテンの投与が、イシダイ、イシガキダイのみならず種々の魚種でも生残率の向上や免疫機能亢進を認められるかマダイ、トラフグの種苗生産で検討すると共に、カロテノイドのアスタキサンチンをワムシに添加し、マダイの種苗生産を試み、生産した種苗の生残率、免疫防御機能に及ぼす影響について検討し、その機序について論議した。その結果、マダイやトラフグでもイシダイやイシガキダイ同様生残率の向上と免疫機能亢進が認められた。

これらのことより、魚類においても、ほ乳類同様のインターフェロンを介した免疫機構が存在し、 β -カロテンやアスタキサンチンで栄養強化した餌料ワムシを用いて種苗生産を行うことにより免疫防御能の高い健康な種苗を生産できる可能性が示唆された。

謝辞

論文の作成に当たり終始ご親切なご指導ならびにご鞭撻を頂きました樋本六良教授に厚く感謝申し上げます。

また、本論文のご高閲とご助言を賜りました石原 忠教授，吉越一馬教授，青柳東彦教授，橘 勝康助教授に心から感謝申し上げます。また，実験や研究活動について多大なご協力とご支援を頂いた長崎市水産センター所長浜口 孝様他市職員の方々に深く感謝いたします。そして，実験に際してご助力頂きました栄養学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。