

# 低分子リポポリサッカライドの投与による魚病予防の効果試験

湯浅明彦・谷本 剛

徳島県のアユ養殖は平成13年度で約40経営体、国内アユ養殖生産で約25%のシェアを占め生産量2,014トン是全国第一位の生産量である。しかし、昭和63年から平成5年までは年間約5,000トンの生産量であったが、近年は半分まで低下している。減産の背景には景気の低迷による消費量の低下とともにアユに発生する疾病（魚病）による被害が大きい。近年最も被害の大きな魚病として冷水病とシュードモナス病があり、抗生物質等による化学療法が行われているが耐性菌の出現により十分な効果が挙げられない。抗生物質は定められた用量・用法に基づく適正な使用とともに、使用に伴う環境への影響を考慮する必要がある。アユ養殖の生産性向上と養殖経営の安定を図る上で、食品としての安全性を確保するとともに環境に影響の少ない予防技術の開発が不可欠である。こうした社会的要請に応えるために低分子リポポリサッカライド（以下「低分子LPS」と記す）が強い自然免疫賦活作用を示すことに着目し、アユに投与することで魚病予防効果の有効性に関する試験を実施した。本試験では、低分子LPSの免疫賦活剤としての有効性と、その最適投与量と投与法を明らかにすることを目的とした。

## 材料と方法

### 1) 予備試験

低分子LPS溶液の5倍希釈段階系列を作成し、アユ用配合飼料に容積比で30～40%の溶液を噴霧し50℃で乾燥させることで低分子LPSの含有量の異なる配合飼料を作製した。この方法で低分子LPSを3段階の濃度で含有した飼料（アユ用配合飼料）を作製し、アユの摂餌と経口投与の安全性について予備試験を実施した（図1）。

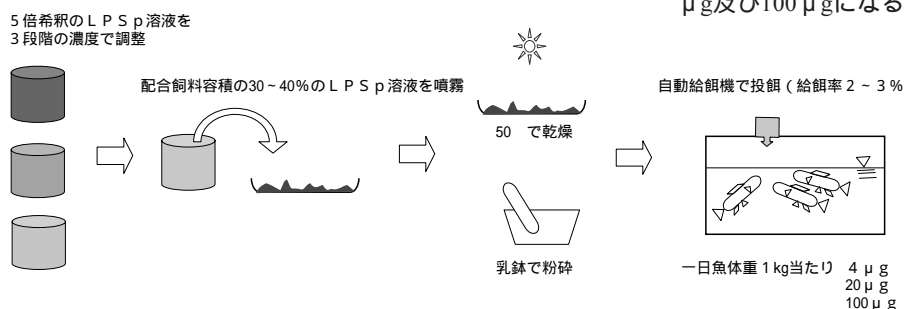


図1 低分子LPS添加配合飼料の作成と経口投与

### 2) 有効性試験

#### 2)-1 低分子LPSの経口投与によるシュードモナス病に対する予防効果について

低分子LPSを一日魚体重当たり4, 20, 100 μg/kgを投与するように調整した3種類の配合飼料を7日間投与したアユ25尾に、 $8.1 \times 10^4$ CFU/mlと $8.1 \times 10^3$ CFU/mlに調整したシュードモナス菌液（滋賀県で分離された標準株FPC941をTSA寒天培地で48時間増殖したものを滅菌PBSに懸濁した）を一尾当たり50 μlづつ腹腔内に注射した。対照として低分子LPSを含有しない配合飼料を与えたアユ25尾の腹腔内に菌液を注射した。また、低分子LPSを継続して投与した場合の有効性を確認する次の試験を実施した。低分子LPSを一日魚体重当たり4, 20, 100 μg/kgを7日間投与し、シュードモナス菌液を $3.7 \times 10^2$ CFU/尾及び $7.5 \times 10^1$ CFU/尾腹腔内に注射した。その後も低分子LPSを添加した配合飼料を継続して投与した。

#### 2)-2 低分子LPSの経口投与による冷水病に対する予防効果について

シュードモナス病の感染試験と同じように、低分子LPSを一日魚体重当たり4, 20, 100 μg/kg体重を7日間投与したアユをそれぞれ25尾ずつ水槽に収容し、アユが冷水病に感染して死亡している水槽の飼育水を添加することで冷水病に感染させた。また、同様に低分子LPSを7日間投与し、病魚排水を注水した後も連続して低分子LPS添加配合飼料を経口投与して効果を比較する試験を行った。

#### 2)-3 低分子LPSの経口投与と浸漬投与を組み合わせることによる冷水病に対する予防効果について

低分子LPSを一日魚体重当たり4, 20, 100 μg/kgを投与するように調整した3種類の配合飼料を10日間給餌した。その後低分子LPS溶液を飼育水1リットル当たり4 μg, 20 μg及び100 μgになるように飼育水中に添加し、注水を止

めて2時間アユを浸漬することを2日に一度計8回行った。各試験区に水槽を二つ設けたが、対照区は1水槽とした。

## 結 果

### 1) 予備試験

低分子LPSを一日魚体重1kg当たり4 $\mu$ g、20 $\mu$ g及び100 $\mu$ gを投与するために、給餌率を魚体重あたり2~3%として低分子LPS溶液の濃度を決定した。低分子LPSの含有量が異なる3種類の配合飼料をアユに給餌して成長を比較したが差は認められなかった。また、低分子LPSを含有する配合飼料を与えることによる摂餌率の低下や状態の異常は認められなかった。

### 2) 有効性試験

#### 2)-1 低分子LPSの経口投与によるシュードモナス病に対する予防効果について

シュードモナス病原菌の注射後毎日死亡魚を計数した結果、2週間後の累積死亡率は攻撃菌量が $4.1 \times 10^3$ CFU/尾では92~96%に達した。また、 $4.1 \times 10^2$ CFU/尾では28~60%であった。低分子LPSを一日魚体重当たり20 $\mu$ g/

kgを投与した場合死亡率は28%にとどまった(表1)。注射後も配合飼料を投与した場合は、攻撃菌量が $3.7 \times 10^2$ CFU/尾では2週間後の累積死亡率が47.1~77.3%を示し、20 $\mu$ g投与区が47.1%と最も少なかった。攻撃菌量が $7.5 \times 10^1$ CFU/尾では死亡率が4.0~8.0%にとどまり効果の比較ができなかった。(表2)。

#### 2)-2 低分子LPSの経口投与による冷水病に対する予防効果について

いずれの試験区も2水槽を設けた。対照区よりLPSを投与した試験区の死亡率が大きく2週間後の累積死亡率は72~96%に達した(表3)。また、低分子LPSを26日間連続投与した場合、累積死亡率は75~92%に達した(表4)。

#### 2)-3 低分子LPSの経口投与と浸漬投与を組み合わせたことによる冷水病に対する予防効果について

18日間の累積死亡率は同じ試験区でも二つの水槽で差があり、4 $\mu$ g投与区では54.2%と76.9%、20 $\mu$ g投与区では68.0%と80.0%、100 $\mu$ g投与区では64.0%と78.3%であり、対照区では89.3%であった(表5)。

表1 低分子LPSを7日間経口投与したアユに対するシュードモナス病菌液の腹腔内接種攻撃試験結果

試験区	攻撃菌量 (CFU/尾)	供試 尾数	経 過 日 数														計	死亡率 %	有効率 %	P	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
4 $\mu$ g投与区		25			10	13												23	92.0	4.2	
20 $\mu$ g投与区	$4.1 \times 10^3$	25			3	17			2			1	1					24	96.0	0.0	
100 $\mu$ g投与区		25			12	10	1					1						24	96.0	0.0	
対照区		25			8	16												24	96.0		
4 $\mu$ g投与区		25			3	8												11	44.0	21.4	0.396
20 $\mu$ g投与区	$4.1 \times 10^2$	25			1	5	1											7	28.0	50.0	0.045 *
100 $\mu$ g投与区		25				14	1											15	60.0	-7.1	
対照区		25	1		2	7		1	1			1					1	14	56.0		

カイ二乗検定法 \*P<0.05

表2 シュードモナス病菌液を接種後も低分子LPSを継続して経口投与した場合の試験結果

試験区	攻撃菌量 (CFU/尾)	供試 尾数	経 過 日 数														計	死亡率 %	有効率 %	P	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14					
4 $\mu$ g投与区		24			7	6	1											14	58.3	24.5	0.217
20 $\mu$ g投与区	$3.7 \times 10^2$	17			5	3												8	47.1	39.1	0.091
100 $\mu$ g投与区		24			9	3												12	50.0	35.3	0.072
対照区		22			12	5												17	77.3		
4 $\mu$ g投与区		25			1	1												2	8.0	-100	
20 $\mu$ g投与区		25			1		1											2	8.0	-100	
100 $\mu$ g投与区		25				1	1											2	8.0	-100	
対照区		25			1													1	4.0		

Fisherの正確確率検定

表3 低分子LPSを7日間経口投与したアユに対する冷水病感染試験結果

試験区	供試 尾数	経 過 日 数														計	死亡率 %	有効率 %
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14			
4 $\mu$ g投与区	25					3	2	2	4	1	2	2	2	1	19	76.0	0.0	
20 $\mu$ g投与区	25						2	6	2	2	3	2	2	1	22	88.0	-15.8	
100 $\mu$ g投与区	25				3	6	5	1	3	1	3	1	1	24	96.0	-26.3		
対照区	25				1	1	1	4	3	2	1	4	2	19	76.0			
4 $\mu$ g投与区	25				1	1	5	4	1	3		2	2	2	21	84.0	-16.7	
20 $\mu$ g投与区	25					1	3	3	2	2	1	1	3	3	19	76.0	-5.6	
100 $\mu$ g投与区	25					2	3	2		4	2	3		3	19	76.0	-5.6	
対照区	25					3	1	4	2	3	1	1	2	1	18	72.0		

表4 感染攻撃中も低分子LPSを継続して経口投与した場合の試験結果

試験区	供試尾数	経過日数																	計	死亡率 %	有効率 %	P	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17					18
4 μg 投与区	25						1	2	2	5	1	3		5	2		1	1	23	92.0	-6.7	0.6750	
20 μg 投与区	24							1	1	2	5	1	1		4	3			19	79.2	8.2	0.7150	
100 μg 投与区	24								4	2	2	5	2					1	18	75.0	13.0	0.4820	
対照区	29						1			4	5	3	1		3	5		2	1	25			86.2

Fisherの直接確率計算法

表5 経口法と浸漬法を組み合わせる投与した場合の冷水病感染試験結果

試験区	供試尾数	経過日数																	計	死亡率 %	有効率 %	P	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17					18
4 μg	24							3		1	1	1	1		5		1		13	54.2	39.3	0.0058 **	
20 μg	25							1	3	7		3			2	1			17	68.0	23.8	0.0896	
100 μg	25							3	1	3		5			1		1		2	16	64.0	28.3	0.0471 *
4 μg	26							4		1	4	4	2		4			1	20	76.9	13.8	0.2863	
20 μg	25							2		7	2	3			2		3	1	20	80.0	10.4		
100 μg	23								1	5		4			4	2	1	1	18	78.3	12.3		
対照区	28							3		7	1	5	3			3	1	1	1	25			89.3

浸漬液の低分子LPS濃度 (μg/Litter) で試験区を設定

Fisherの直接確率計算法

\* : P<0.05, \*\* : P<0.01

\*\*\* : P<0.001

### 考 察

低分子LPSを投与することによる魚病の予防効果を累積死亡率から評価するために、ワクチンの評価で用いられる有効率を次式により算出した。

有効率(%) = { 1 - (LPS投与区の累積死亡率 / 対照区の累積死亡率) } × 100

また、対照区との統計的な有意差を二乗法とFisherの正確確率計算法により検定した。低分子LPSを投与することによるシュドモナス病に対する予防効果は、一日魚体重当たり20 μg/kgを経口で投与することで最も良い効果が認められた。7日間投与した場合には有効率は50%を示し5%の危険率で有意差が認められた(表1)。21日間連続して経口投与した場合でも20 μg投与区が有効率39.1%を示したが有意差は認められなかった(表2)。

冷水病に対しては低分子LPSを経口で投与することによる予防効果はほとんど認められず、有効率が最も良かったのは100 μg/kgを26日間連続投与した場合の13%であり、7日間の投与ではほとんどの場合マイナスになった(表3, 4)。一方、経口投与と浸漬投与を組み合わせた場合は効果が認められた。一日魚体重当たり4 μg/kgを経口で投与し1リットル当たり4 μgの低分子LPS溶液に浸漬した場合には、39.3%の有効率を示し1%の危険率で有意差が認められた。しかし、同じ条件のもう一つの水槽では有効率が13.8%でしかなく、再現性が疑われることから再試験が必要である(表5)。

シュドモナス病に対する予防効果が一日魚体重当たり20 μg/kgを経口で7日間投与することで有意な差が認められ、4 μg/kg及び100 μg/kgでは効果が劣っていた。Takahashi et al はクルマエビにLPSを一日体重当たり20, 40, 100 μg/kgを7日間経口投与した場合、20 μgで血リン

パ球の貪食活性とPO活性が最も高くなりPRDV(クルマエビ急性血症ウイルス)で攻撃した場合の生残率が最も優れていることを報告しているが、アユの自然免疫賦活のための最適経口投与量も20 μg/kgであることが考えられる。LPSの経口投与が冷水病の予防に効果がなかった理由として、シュドモナス病と冷水病の感染方法の相違が考えられる。シュドモナス病の感染法である腹腔内注射法は侵襲が急性であるが、冷水病の感染法である病魚排水添加法は発病と死亡が緩慢である。LPSによる免疫刺激は急性なものに有効に対応するが、冷水病のように緩慢なものには十分な効果が発揮できない可能性がある。そこで、経口法と浸漬法を組み合わせ、対象疾病に応じた適切な器官の免疫賦活が有効なことが考えられた。

脚注 Fish & Shellfish immunology(2000)10,555-558