

## ヒラメの非特異的生体防御能に及ぼす甘草抽出物経口投与の影響

三吉泰之<sup>\*a</sup>, 河原栄二郎<sup>\*b</sup>, 福田 穰<sup>\*a</sup>**Effect of oral administration of licorice-extract on the non-specific immunodefense activity of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus***Yasuyuki MIYOSHI<sup>\*a</sup>, Eijiro KAWAHARA<sup>\*b</sup> AND Yutaka FUKUDA<sup>\*a</sup>

大分県の 2005 年におけるヒラメ養殖生産量は、農林水産統計によると 1,458 トンであり (全国 1 位)、ヒラメは本県の特産養殖種となっている。安定的な養殖生産を妨げる要因の一つとして、細菌感染症の発生が挙げられるが、抗生物質等の薬剤が使用可能な場合は投薬による治療が行われている。

近年、食の安全・安心に対する消費者意識の高まりから、抗生物質等の化学療法剤に依存しない養殖生産技術の開発が求められている。感染症の予防法として、一部の魚種の疾病を対象としたワクチンが市販されているが、ヒラメで使用できるワクチンは  $\beta$  溶血性レンサ球菌症に対するものだけであり、開発は遅れているのが現状である。一方、魚の生体防御能の向上を目的とした飼料添加物の利用も検討されており<sup>1)</sup> 抗病性を高めることで感染症を予防できる可能性がある。

漢方薬として知られる甘草は、マメ科植物の *Glycyrrhiza* sp. の根や茎から得られ、その有効成分は抗炎症作用や強肝作用等があるグリチルリチンである。甘草から工業的にグリチルリチンを製造する際、その残滓から得られる甘草抽出物中には、グリチルリチンの他に、免疫賦活作用が期待されるフラボノイド類を含むことが特徴である。

本報では、甘草抽出物をヒラメに経口投与した際の非特異的生体防御能への影響とエドワジエラ症に対する抗病性の向上効果について検討した。

## 試料および方法

## 1. 非特異的生体防御能への影響

**供試魚、飼料および給餌** 広島県福山市の養殖場で養成された平均体重 56.5g のヒラメ 0 歳魚を用いた。甘草成分を含まないエクストルーダー飼料 (EP) に甘草抽出物

を 0, 5 または 50mg/ kg BW/日となるよう添加した飼料を作成し、日間給餌率 2% で 14 日間給餌した (平均水温 23.4 °C)。給餌開始 1 および 2 週間後に各区 5 尾の供試魚から採材した。

**血清の溶血活性およびリゾチーム活性** 供試魚から採取した血液を室温で 60 分間静置した後に 2,500rpm 15 分間遠心分離し、その上清を血清試料とした。溶血活性の測定は、血清試料を 0.03M EGTA-GVB で 40 倍に希釈し、希釈試料に  $2 \times 10^8$  cells/mL のウサギ赤血球浮遊液 0.2mL を添加後、20 °C 60 分間反応させた。反応終了後、0.01M EDTA-GVB を 2.8mL 添加し、遠心処理した上清の OD<sub>414</sub> を溶血活性とした。リゾチーム活性の測定は、血清試料をリン酸緩衝液 (PB) を用いて 20 倍希釈し、試験管に 0.6mL 入れた。OD<sub>530</sub> が 0.5 の *Micrococcus luteus* 乾燥菌体 PB 懸濁液を 1.8mL 加えて混合し、37 °C で 30 分反応させた。反応前後の OD<sub>530</sub> の値を測定し、溶菌率を算出した。

**白血球の貪食活性および殺菌活性の測定** 供試魚から頭腎を採取し、10unit ヘパリン添加 MEM 2mL 中で頭腎を細切した後に懸濁液をステンレスメッシュ (孔径 45  $\mu$  m) でろ過した。同培地でろ液を遠心洗浄し、得られた沈殿を同培地 2mL で再浮遊させたものを頭腎白血球とした。供試魚から腸管を採取し、PBS 中で腸管表面および内部を洗浄し、腸管を 4mm 四方に切断した。その後、EDTA2Fe 溶液 4mL 中で 20 °C 15 分静置した後に、Collagenase 溶液 4mL 中で攪拌しながら 20 °C 120 分反応させた。得られた懸濁液をステンレスメッシュ (孔径 100  $\mu$  m) でろ過し、MEM でろ液を遠心洗浄し、得られた沈殿を同培地 1mL で再浮遊させたものを腸管白血球とした。頭腎および腸管白血球浮遊液は、血球計算盤で計数し、細胞数を  $1.0 \times 10^7$  cells/mL に調整した。貪食活性の測定は、白血球浮遊液 200  $\mu$  L と 0.2% ギイ

\*a 大分県農林水産研究センター 水産試験場 養殖環境担当

\*b 福山大学 生命工学部 海洋生物工学科

結 果

モサン添加 0.05%NBT 溶液 200  $\mu$  L を混合し、20  $^{\circ}$ C 60 分間静置後、スライドグラスに塗末して風乾した。メタノール固定後、Gimza 液で染色し、光学顕微鏡で計数して貪食率を算出した。殺菌活性の測定は、試験管に白血球浮遊液 0.24mL、0.2%ザイモサン添加 0.05%NBT 溶液 1.2mL、MEM 1.2mL を入れ、20  $^{\circ}$ C 60 分間インキュベートした。その後、MEM を用いて遠心洗浄を行い、得られた沈殿にメタノール 200  $\mu$  L を加えて風乾した。その後、2M 水酸化カリウム溶液 1.44mL、ジメチルスルホキシド 1.68 mL を加えて攪拌し、遠心分離後、上清の OD<sub>630</sub> を測定した。

統計処理 測定結果は、一元配置分散分析法および *t* 検定で分析した。

2. エドワジエラ症に対する抗病性向上

供試魚、飼料および給餌 大分県漁業公社で種苗生産されたヒラメ 0 歳魚（平均体重 53.5g）を用いた。甘草成分を含まない EP に甘草抽出物を 0、5 または 10mg/kg BW/日となるよう添加した飼料を作成し、日間給餌率 1.5% で 5 日間投餌、2 日間休餌、5 日間投餌のスケジュールで合計 10 日間給餌した（平均水温 21.0  $^{\circ}$ C）。

攻撃試験 給餌終了 3 日後にヒラメ由来 *Edwardsiella tarda* 052821 株を 8.0  $\times$  10<sup>2</sup> CFU/尾で腹腔内接種して攻撃し、流水水槽に各区 25 尾収容して無給餌で 20 日間観察した（平均水温 19.7  $^{\circ}$ C）。死亡魚および観察終了時の全ての生残魚について、SS 寒天を用いて腎臓からの菌分離を行った。

統計処理 死亡尾数の差は  $\chi^2$  検定で分析した。

1. 非特異的生体防御能への影響

供試魚血清の溶血活性は、図 1 に示したとおりで、甘草抽出物の投与量、期間に関わらず、無投与区と比較して投与区で有意に高く ( $p < 0.05$ )、リゾチーム活性は図 2 に示したとおりで、甘草抽出物の投与量、期間に関わらず、有意差は認められなかった。

供試魚白血球の貪食活性は図 3 に示したとおりである。甘草抽出物 5mg 投与区の貪食活性は、1 週間後の頭腎白血球で有意な変化が認められなかったが、腸管白血球では無投与区と比較して有意に高くなった ( $p < 0.05$ )。2 週間後には頭腎および腸管白血球ともに無投与区と比較して貪食活性が有意に高くなった ( $p < 0.05$ )。50mg 投与区では、1 週間後に頭腎および腸管白血球ともに貪食活性の上昇がみられたが、2 週間後の頭腎白血球の活性は無投与区と有意差がなくなった。殺菌活性は、図 4 に示したとおりである。甘草抽出物 5mg 投与区の殺菌活性は、1 週間後には頭腎および腸管白血球ともに有意な変化が認められなかったが、2 週間後には無投与区と比較して有意に高くなった ( $p < 0.05$ )。50mg 投与区では、1 週間後に腸管白血球の殺菌活性が有意に高くなった ( $p < 0.05$ )。2 週間後には頭腎白血球の殺菌活性も有意に高くなった ( $p < 0.05$ ) が、腸管白血球の活性が 5mg 投与区と比較して低値になった ( $p < 0.05$ )。

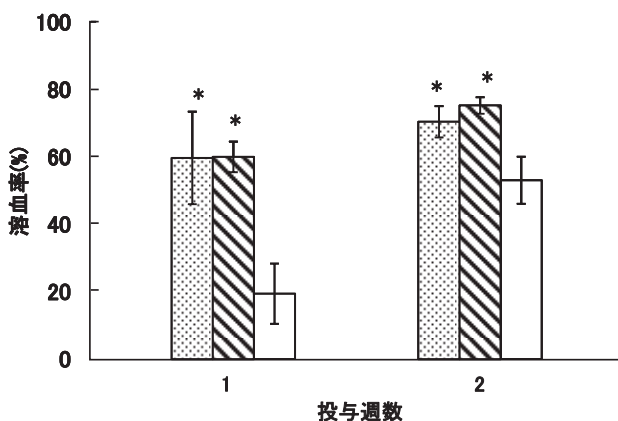


図 1. 甘草抽出物を経口投与したヒラメにおける血清の溶血活性

■ ; 甘草抽出物 5 mg/kgBW/日投与区,  
 ▨ ; 甘草抽出物 50 mg/kgBW/日投与区,  
 □ ; 無投与区, 平均±標準誤差,  
 \* ; 無投与区に対して有意差 ( $p < 0.05$ )あり

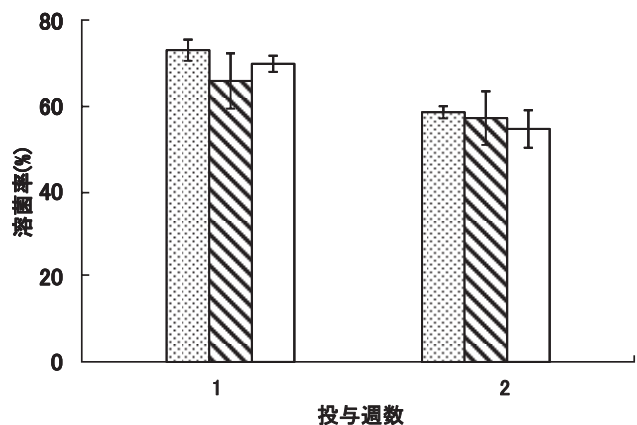


図 2. 甘草抽出物を経口投与したヒラメにおける血清のリゾチーム活性

■ ; 甘草抽出物 5 mg/kgBW/日投与区,  
 ▨ ; 甘草抽出物 50 mg/kgBW/日投与区,  
 □ ; 無投与区, 平均±標準誤差

ヒラメへの甘草抽出物投与の影響

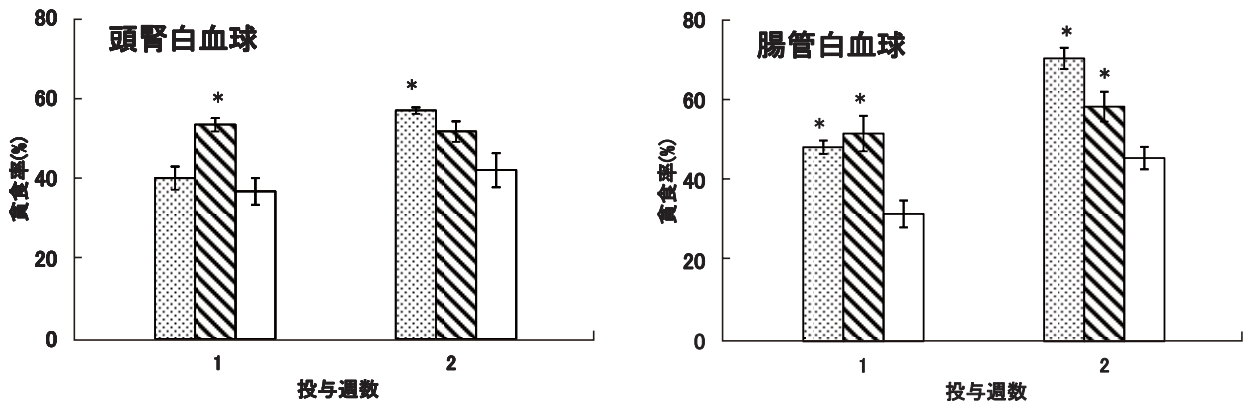


図3. 甘草抽出物を経口投与したヒラメにおける頭腎または腸管白血球の食食活性

■ ; 甘草抽出物 5 mg/kgBW/日投与区,  
 ▨ ; 甘草抽出物 50 mg/kgBW/日投与区,  
 □ ; 無投与区, 平均±標準誤差,  
 \* ; 無投与区に対して有意差 ( $p < 0.05$ ) あり

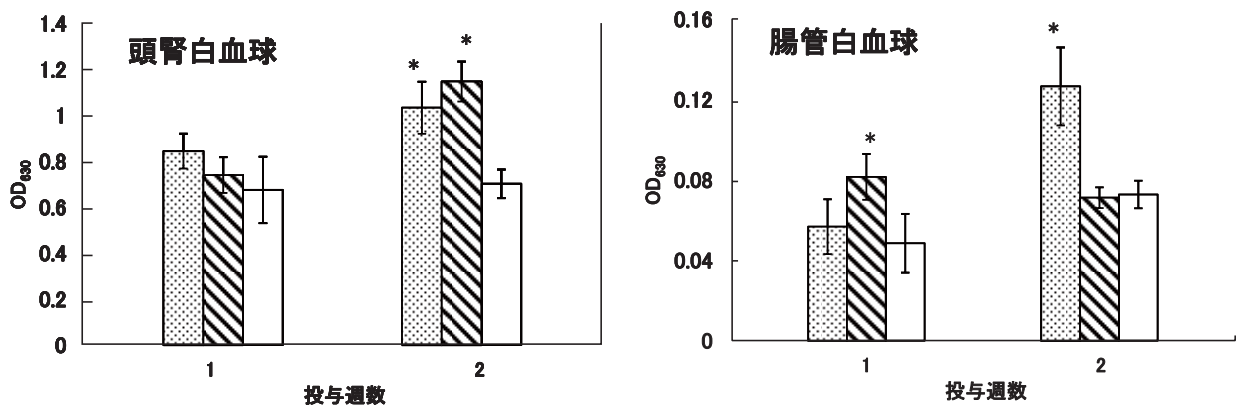


図4. 甘草抽出物を経口投与したヒラメにおける頭腎または腸管白血球の殺菌活性

■ ; 甘草抽出物 5 mg/kgBW/日投与区,  
 ▨ ; 甘草抽出物 50 mg/kgBW/日投与区,  
 □ ; 無投与区, 平均±標準誤差,  
 \* ; 無投与区に対して有意差 ( $p < 0.05$ ) あり

2. エドワジエラ症に対する抗病性向上

攻撃後の各区の生残率は図5に示したとおりである。無投与区では、攻撃3日後から死亡が始まり、攻撃20日後の生残率は20%となった。甘草抽出物を投与した区では、5mg投与で攻撃2日後から、10mg投与で3日後から死亡が始まり、攻撃20日後の生残率はそれぞれ、48および44%となった。無投与区に比べ、甘草抽出物投与区で生残率が高く、5mg投与区では有意差 ( $p < 0.05$ ) がみられた。また、甘草抽出物の投与量の違いによる生残率の差は見られなかった。なお、全ての死亡魚の腎臓から *E.tarda* が分離された。生残魚の保菌率は、無投与

区で100%(5/5)、5mg区で90.9%(10/11)、10mg区で90%(9/10)となった。

考 察

本研究では、グリチルリチンとフラボノイド類を含有する甘草抽出物をヒラメに経口投与して非特異的生体防御能への影響を検討した。また、甘草抽出物を経口投与したヒラメのエドワジエラ症に対する抗病性向上効果について検討した。

非特異的生体防御能への影響の検討では、甘草抽出物

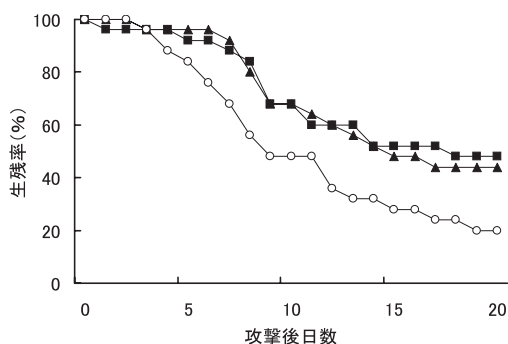


図5. 甘草抽出物経口投与ヒラメの *E. tarda* 接種後の生残率

- ；甘草抽出物 5 mg/kgBW/日投与区,
- ▲；甘草抽出物 10 mg/kgBW/日投与区,
- ；無投与区

の投与量を 5 または 50mg/kgBW/日として 1 または 2 週間与えて、血清の溶血活性とリゾチーム活性を、頭腎または腸管白血球の貪食および殺菌活性を測定した。その結果、甘草抽出物を投与したヒラメでは、血清の溶血活性、白血球の貪食および殺菌活性が無投与区に比べて高くなることが確認された。

また、頭腎または腸管白血球の貪食活性および腸管白血球の殺菌活性は、甘草抽出物を 50mg 投与した場合、1 週間で高まるものの、2 週間連続投与した後に、頭腎白血球の貪食活性および腸管白血球の殺菌活性は、対照区との有意差がみられなくなった。甘草抽出物を高濃度に連続投与した場合には、免疫賦活効果が失われる可能性があるため、養殖現場での応用には、高濃度の使用を避ける方が無難であると思われる。本研究では、2 週間で越える連続投与を行っていないことから、今後は本抽出物を低濃度長期間投与した場合の効果や投与中止後の持続期間等について検討する必要がある。

甘草抽出物の経口投与でヒラメの非特異的生体防御能が高まることが分かったため、5 または 10mg/kgBW/日の本抽出物を累計 10 日間与えた魚に、*E.tarda* による攻撃試験を実施した。その結果、実験終了時の生残率は、投与量にかかわらず甘草抽出物投与区で高くなる傾向がみられ、本抽出物を経口投与したヒラメは、エドワジエラ症に対して抵抗性を示すと考えられる。枝広ら<sup>23)</sup>は、甘草の主成分であるグリチルリチンをブリに経口投与することでレンサ球菌症に対する抗病性の向上効果があることを報告している。ブリでは、グリチルリチンの投与による血清中の補体価、リゾチーム活性、マクロファージの貪食活性等で統計学的に有意な変化は認めないが、血清の GOT, GPT 値の改善が見られたことか

ら、肝機能の向上によってブリの健康状態が改善され、抗病性が高まったものと考察している。本研究では、肝機能に関する検討は行っていないが、甘草抽出物投与によるヒラメの非特異的生体防御能の上昇は、エドワジエラ症に対する抗病性の向上に役立ったものと思われる。しかし、試験終了時の生残魚の保菌率は、甘草抽出物投与区においても 90%以上であった。ウナギのエドワジエラ症では、自然感染時において消化管が感染門戸となると考えられている。<sup>4,5)</sup> 本研究でみられた腸管白血球の活性上昇も、ヒラメのエドワジエラ症に対する抗病力に關与する可能性があるが、実験感染に腹腔内接種を用いたことから、消化管における生体防御を評価することはできない。感染方法として経口や浸漬感染などの自然感染に近いと考えられる攻撃法を用いれば、生残率や保菌率の差がより明確にみられたかもしれない。

今後は、エドワジエラ症以外の感染症についても甘草抽出物を経口投与したヒラメの抗病性を検討する必要がある。また、甘草抽出物には、グリチルリチンの他にリクイチン、イソクイチン、リクイチゲニンなどのフラボノイド類が含まれていることから、<sup>6)</sup> ヒラメの抗病性向上に關与する成分を明らかにする必要がある。

## 文 献

- 1) 高橋幸則. 免疫賦活物質. 養殖 2000 ; 37(4) : 149-154.
- 2) 枝広知新, 浜口昌巳, 楠田理一. ブリの連鎖球菌症に対するグリチルリチン投与の影響. 水産増殖 1990 ; 38 : 239-243.
- 3) 枝広知新, 浜口昌巳, 楠田理一. 過酸化脂質を投与したブリ幼魚の実験的連鎖球菌症に対するグリチルリチン投与効果. 水産増殖 1991 ; 39 : 21-27.
- 4) 石原秀平, 楠田理一. シラスウナギおよびクロコに対する *Edwardsiella tarda* の実験的感染について. 日水誌 1981 ; 47 : 999-1002.
- 5) 宮崎照雄, M. A. Gutierrez, 田中真二. ニホンウナギのパラコロ病の実験感染に関する研究. 魚病研究 1992 ; 27 : 39-47.
- 6) 古下 学, 前田俊道, 芝 恒男, 大野裕和, 山本正次, 田村幸吉. 抗菌効果を付加した新しい甘草抽出物フラボリコリス. 養殖 2005 ; 42(1) : 76-77.