マダイの補体活性に及ぼす飼料中のコリン, パントテン酸 およびビタミン C の影響^{*1}

矢野 友紀, 中尾 実樹, 古 市政 幸, 米 康 夫

(1987 年 9 月 30 日受理)

Effects of Dietary Choline, Pantothenic Acid and Vitamin C on the Serum Complement Activity of Red Sea Bream

Tomoki Yano,^{*2} Miki Nakao,^{*2} Masayuki Furuichi,^{*3}
and Yasuo Yone^{*3}

Red sea bream *Pagrus major* were fed on the purified diets containing different levels of choline, pantothenic acid or vitamin C for 2-6 weeks, and the effects of these vitamins on serum complement activity and natural hemagglutinin titer were examined.

The dietary requirements of red sea bream for choline chloride and Ca-pantothenate were estimated to be about 50 mg and 1 mg per 100 g diet, respectively, on the basis of growth and feed efficiency. The dose levels of 0-400 mg choline chloride/100 g and 0-15 mg Ca-pantothenate/100 g diet did not affect the complement activity in fish, but higher levels of 800 mg choline chloride/100 g and 28 mg Ca-pantothenate/100 g diet significantly enhanced the complement activity. These results indicate that dietary supplementation of 15 to 30 times the minimum requirement of choline chloride or Ca-pantothenate is necessary for the enhancement of the complement activity. There was no difference in the complement activity between fish fed on the diets with and without 100 mg vitamin C per 100 g diet. However, the group fed on the diet containing 100 mg of vitamin C showed a significantly higher natural hemagglutinin titer.

最近、哺乳類ではビタミン B₂, ビタミン B₆, パントテン酸, コリン, 葉酸, メチルコバラミン, ビタミン C, ビオチン, ビタミン A, ビタミン E, ユビキノン等のビタミン類に強い免疫増強作用のあることが報告され注目されている。^{1,2)}

魚類では、この分野の研究は少ないが、channel catfish を正常な成長に必要な量の 5 倍量のビタミン C を含む飼料で飼育すると、細菌感染に対する抵抗力が強まることが観察されている。³⁾ また、channel catfish をビタミン C 含量の異なる飼料で飼育したところ、1 kg 当り 30~300 mg のビタミン C を含む飼料を与えた区に比べて、ビタミン C 無添加飼料区の抗体産生能、補体活性および貪食細胞活性は有意に低く、ビタミン C 3000 mg 添加飼料区のそれらは有意に高かったと報告されている。^{4,5)}

本実験では、マダイの正常な成長に必要なコリンとパ

ントテン酸の要求量(最小必要量)を求めると共に、コリン、パントテン酸およびビタミン C 投与がマダイの補体活性と自然血球凝集素価に及ぼす影響について調べた。

実 験 方 法

供試魚および飼育試験法 コリンとパントテン酸の試験には、Table 1 に示す Halver 処方のビタミン混合⁶⁾を含む基本飼料で約 1 ヶ月予備飼育した平均体重約 19 g のマダイを使用した。25 尾ずつ 150 l 容水槽に収容し、24~25°C の海水を 1 時間当り 150 l の割合で流した。コリン試験区はコリンを除いた基本飼料 100 g 当り塩化コリンを 0, 50, 100, 200, 400 および 800 mg 添加した 6 飼料区とし、パントテン酸試験区はパントテン酸を除いた基本飼料 100 g 当りパントテン酸カルシウムを 0, 1, 3, 7, 15 および 28 mg 添加した 6 飼料区とした。なお、

^{*1} 九州大学農学部附属水産実験所業績 No. 172. 本研究の要旨は、昭和 61 年度日本水産学会秋季大会(高知)において発表した。

^{*2} 九州大学農学部水産化学教室 (Laboratory of Fisheries Chemistry, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812, Japan).

^{*3} 九州大学農学部附属水産実験所 (Fishery Research Laboratory, Kyushu University, Tsuyazaki, Fukuoka 811-33, Japan).

Table 1. Composition of the basal diet

Ingredients	Percentage
Casein (vitamin free)	47.8
Gelatin	10.6
Amino acids* ¹	2.6
Dextrin	10.0
Pollack liver oil	9.0
Vitamins* ²	3.0
Minerals* ³	4.0
Attractant* ⁴	1.0
α -Cellulose	6.1
Carboxymethylcellulose	6.0

*¹ Amino acids (g/2.6 g): L-Phe 0.5, L-Try 0.2, L-Arg·HCl 1.3, L-Val 0.6.

*² Halver's vitamin mix. (1957)⁶) + α -cellulose.

*³ Minerals (g/4 g): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.85, Fe-citrate 0.15.

*⁴ L-Asp·Na.

Halver の処方⁶⁾ に基づいて飼料 100 g 当りコリン試験区にはパントテン酸 28 mg を、パントテン酸試験区にはコリン 800 mg を添加したので、実際の飼料区は全部で 11 区となった。これらの試験飼料を 1 日に魚体重の 3% の割合で、朝夕 2 回に分けて与え、6 週間飼育して成長と飼料効率を調べた。

また、ビタミン C の試験には上記基本飼料で約 1 ヶ月予備飼育した平均体重約 190 g のマダイを使用した。38 尾ずつ 2 区に分け、一方に基本飼料からビタミン C を除いた飼料を、他方に飼料 100 g 中 100 mg のビタミン C を含む飼料を与えて、水温 24~25°C で約 2 週間飼育した。

なお、飼料の調製は前報⁷⁾ に準じたが、いずれも 30°C 以下で手早く作り、投餌直前まで -20°C で凍結保存した。

採血および血清の分離 キュヴィエ氏管から採取した血液を室温に約 1 時間放置して凝固させ、さらに氷水中で 1 時間冷却して血餅を収縮させた後、遠心分離し、得られた血清を -80°C に凍結保存した。

抗ヒツジ赤血球マダイ血清の調製 体重約 500 g のマダイにヒツジ赤血球ストローマ⁸⁾ を 1 週間おきに 6 回腹腔内投与し、最終投与後 5 日目に採血した。抗血清の非働化は 45°C で 20 分間加熱して行った。

古典経路補体価 (CH 50) の測定 測定は Mayer 法⁹⁾ に準拠した Matsuyama ら¹⁰⁾ の方法によって行った。すなわち、 Ca^{2+} と Mg^{2+} の存在下で、 5×10^8 個のマダイ抗血清で感作したヒツジ赤血球の 50% を 20°C、120 分間に溶血させる補体量を 1 unit と規定し、血清の古典経路補体価を CH 50 値 (unit/ml) として求めた。

代替経路補体価 (ACH 50) の測定 測定は天野法¹¹⁾に

準拠した矢野ら¹²⁾ の方法によって行った。すなわち、EGTA* と Mg^{2+} の存在下で、 4×10^7 個のウサギ赤血球の 50% を 15°C、120 分間に溶血させる補体量を 1 unit と規定し、血清の代替経路補体価を ACH 50 値 (unit/ml) として求めた。

自然血球凝集素価 (NHA) の測定 10 mM の EDTA* を含むゼラチンペロナル緩衝液 (pH 7.5) に懸濁させたウサギ赤血球 (2×10^8 cells/ml) と、同緩衝液で倍々希釈したタイ血清を 1:1 に混和し、20°C で 120 分間インキュベートした。ついで凝集の有無を実体顕微鏡で観察し、凝集がみられる最小希釈倍数を血清の NHA 値とした。

実験結果

コリン要求量 コリン試験飼料で 6 週間飼育したマダイの成長および飼料効率と、飼料中の塩化コリン含量との関係を Fig. 1 に示す。図から塩化コリン無添加区の成長と飼料効率は 50 mg 以上の添加区より著しく劣るが、50 mg 以上の添加区ではほぼ一定となることが分る。し

Fig. 1. Relationship between dietary choline chloride levels and growth of red sea bream or feed efficiency.

Fig. 2. Relationship between dietary Ca-pantothenate levels and growth of red sea bream or feed efficiency.

* 本文中では次の略語を使用した。EGTA, ethyleneglycol-bis(2-aminoethyl ether) tetraacetic acid; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid.

Table 2. Effects of dietary choline chloride levels on the complement activity and the natural hemagglutinin titer of red sea bream serum^{*1,2}

Choline chloride (mg/100 g diet)	CH50 ^{*3} (unit/ml)	ACH50 ^{*4} (unit/ml)	NHA ^{*5} (log ₂ titer)
0	33.4±12.5 ^a	136.0±74.0 ^a	1.9±1.4 ^a
400	44.2±24.3 ^a	157.4±97.3 ^a	2.9±1.5 ^a
800	170.6±66.1 ^b	373.0±57.6 ^b	3.6±1.5 ^a

*1 Values (means±SD) are obtained from 6-9 fish.

*2 Values in each column not sharing a common superscript letter are statistically different at P<0.01.

*3 Classical pathway complement titer: 1 CH50 unit represents 50% hemolysis of sensitized sheep erythrocytes in the presence of Ca²⁺ and Mg²⁺.*4 Alternative pathway complement titer: 1 ACH50 unit represents 50% hemolysis of rabbit erythrocytes in the presence of EGTA and Mg²⁺.

*5 Natural hemagglutinin titer against rabbit erythrocytes.

Table 3. Effects of dietary Ca-pantothenate levels on the complement activity and the natural hemagglutinin titer of red sea bream serum^{*1,2}

Ca-PaA (mg/100 g diet)	CH50 ^{*3} (unit/ml)	ACH50 ^{*3} (unit/ml)	NHA ^{*3} (log ₂ titer)
0	53.4±19.1 ^a	167.0±83.0 ^a	2.1±1.1 ^a
15	41.9±13.5 ^a	112.6±42.7 ^a	2.1±0.8 ^a
28	170.6±66.1 ^b	373.0±57.6 ^b	3.6±1.5 ^a

*1 Values (means±SD) are obtained from 5-8 fish.

*2 Values in each column not sharing a common superscript letter are statistically different at P<0.01.

*3 See Table 2.

たがって、成長と飼料効率から推定されるマダイのコリン要求量は飼料 100 g 当り 50 mg 前後と考えられる。なお、マスノスケとギンザケ¹³⁾のコリン要求量は飼料 100 g 当り 60~80 mg、コイ¹⁴⁾のそれは 200~400 mg と報告されている。

パントテン酸要求量 パントテン酸試験飼料で 6 週間飼育したマダイの成長および飼料効率と、飼料中のパントテン酸カルシウム含量との関係を Fig. 2 に示す。パントテン酸カルシウム添加区の成長と飼料効率は区によって異なったが、いずれの区も無添加区より高い成長と飼料効率を示した。添加量 1 mg 以下の飼料による測定値がないので問題があるが、図から敢えてパントテン酸要求量を推定すると、飼料 100 g 当り 1 mg 前後と考えられる。なお、サケ、マス類^{18,19)}のパントテン酸要求量は飼料 100 g 当り 1~2 mg、コイ¹⁰⁾のそれは 3~4.5 mg と報告されている。

コリンが補体活性と自然血球凝集素価に及ぼす影響 塩化コリンを飼料 100 g 当り 0, 400, 800 mg 含有する飼料で 6 週間飼育したマダイの CH 50, ACH 50 および NHA 値を Table 2 に示す。400 mg 添加区の CH 50 値

Table 4. Effects of dietary vitamin C levels on the complement activity and the natural hemagglutinin titer of red sea bream serum^{*1,2}

Vitamin C (mg/100 g)	CH50 ^{*3} (unit/ml)	ACH50 ^{*3} (unit/ml)	NHA ^{*3} (log ₂ titer)
0	43.8±22.5 ^a	95.3±53.0 ^a	2.4±1.4 ^a
100	44.8±23.0 ^a	115.4±65.4 ^a	4.0±1.4 ^b

*1 Values (means±SD) are obtained from 18-26 fish.

*2 Values in each column not sharing a common superscript letter are statistically different at P<0.01.

*3 See Table 2.

および ACH 50 値と無添加区のそれらの間には有意差がなかったが、800 mg 添加区のそれらは無添加区および 400 mg 添加区に比して有意に高い値を示した。一方、NHA 値は無添加区、400 mg 添加区および 800 mg 添加区の間には有意差が認められなかった。

パントテン酸が補体活性と自然血球凝集素価に及ぼす影響 パントテン酸カルシウムを飼料 100 g 当り 0, 15, 28 mg 含有する飼料で 6 週間飼育したマダイの CH 50, ACH 50 および NHA 値を Table 3 に示す。15 mg 添加区の CH 50, ACH 50 値と無添加区のそれらとの間に有意差はなかったが、28 mg 添加区のそれらの値は、いずれも無添加区と 15 mg 添加区に比べて有意に高かった。一方、NHA 値は無添加区、15 mg 添加区および 28 mg 添加区の間には有意差は認められなかった。

ビタミン C が補体活性と自然血球凝集素価に及ぼす影響 ビタミン C を飼料 100 g 当り 100 mg 含む飼料と無添加飼料で約 2 週間飼育したマダイの CH 50, ACH 50 および NHA 値を Table 4 に示す。ビタミン C 添加区と無添加区の補体活性には差が認められなかったが、添加区の NHA 値は無添加区のそれより有意に高かった。

考 察

本実験においてコリン 800 mg/100 g 飼料区とパントテン酸 28 mg/100 g 飼料区の補体活性は無添加区に比して顕著に高かったが、これらの添加量はそれぞれマダイのコリン要求量 (50 mg/100 g 飼料) の 16 倍、パントテン酸要求量 (1 mg/100 g 飼料) の 28 倍に相当する。池田²⁾はビタミンの必要量は動物の各種ストレス、負傷、細菌感染などによって増加すると考えられるので、このような要因に対応するためには最小必要量に幾らかの量をプラスした保健推奨量を決める必要があると述べている。本実験の結果、マダイの補体活性を高く維持するためには、コリンとパントテン酸の場合、最小必要量の投与では不十分で、その 15~30 倍量が必要であることが分った。このことは補体活性がビタミンの保健推奨量を決定する上で 1 つの指標となり得ることを示唆してい

る。しかしながら, これらのビタミンがいかなる機構で補体活性を増強したかについては現時点では不明であり, 今後この方面の基礎的研究を進める必要がある。

つぎに, ビタミン C 100 mg/100 g 飼料と無添加飼料で飼育したマダイにおいては CH 50 値, ACH 50 値共に有意差は認められなかった。Lovell ら^{4,6)}はビタミン C 300 mg/100 g 飼料の投与が channel catfish の CH 50 値を著しく高めたと報告しているので, マダイについてもビタミン C の最小必要量を求めると共に, 100 mg 以上の大量投与の効果を調べてみる必要があると思われる。

本実験ではコリン, パントテン酸, ビタミン C がマダイの補体活性および自然血球凝集素価に及ぼす影響についてのみ調べたが, 今後は他のビタミン類も含めて, 抗体産生能, 貪食細胞活性についても検討する必要があると考える。

文 献

- 1) M. E. Gershwin, R. S. Beach, and L. S. Hurley: *Nutrition and Immunity*, Academic Press, Florida, 1985, pp. 228-258.
- 2) 池田静徳: 養魚飼料-基礎と応用 (米康夫編), 恒星社厚生閣, 東京, 1985, pp. 43-53.
- 3) V. S. Durve and R. T. Lovell: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**, 948-951 (1982).
- 4) R. I. Lovell: in "Ascorbic Acid in Domestic Animals" (ed. by I. Wegger, F. J. Tagwerker, and J. Moustgaard), The Royal Danish Agr. Soc., Copenhagen, 1984, pp. 196-205.
- 5) Y. Li and R. T. Lovell: *J. Nutr.*, **115**, 123-131 (1985).
- 6) J. E. Halver: *J. Nutr.*, **62**, 225-243 (1957).
- 7) Y. Yone, S. Sakamoto, and M. Furuichi: *Rep. Fish. Res. Lab., Kyushu Univ.*, No. 2, 13-24 (1974).
- 8) T. Yano, H. Ando, and M. Nakao: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **29**, 91-101 (1984).
- 9) M. M. Mayer: in "Experimental Immunochimistry" (2nd ed. by E. A. Kabat and M. M. Mayer), C. C. Thomas, Springfield, Ill., 1961, pp. 133-240.
- 10) H. Matsuyama, A. Hirata, M. Nakao, and T. Yano: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **30**, 149-158 (1985).
- 11) 天野哲基: 補体学 (稲井真弥, 井上公蔵, 田村昇編), 医歯薬出版, 東京, 1982, pp. 134-140.
- 12) 矢野友紀, 松山博子, 田中浩二, 中尾実樹: 日水誌, **53**, 1887-1891 (1987).
- 13) J. E. Halver: in "Fish Nutrition" (ed. by J. E. Halver), Academic Press, New York, 1972, pp. 30-103.
- 14) C. Ogino, N. Uki, T. Watanabe, Z. Iida, and K. Ando: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **36**, 1140-1146 (1970).
- 15) B. A. McLaren, E. Keller, D. J. O'Donnel, and C. A. Elvehjem: *Archs Biochem.*, **15**, 169-178 (1974).
- 16) 荻野珍吉: 日水誌, **33**, 351-354 (1967).