

平成元年度科学研究費補助金（一般研究C）

研究成果報告書

I 課題番号：63560207

II 研究課題：魚類におけるビリルビン排泄機構に関する研究

III 研究組織

研究代表者：境 正（宮崎大学農学部助教授）

IV 研究経費

昭和63年度	1,500千円
平成元年度	400千円
計	1,900千円

研究発表

(1)学会誌

1. T. Sakai and N. Tabata: Analysis of bile pigments in the bile of yellow-tail and eel by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, 52. 2967-2968 (1988).
2. T. Sakai, H. Murata, M. Endo, K. Yamauchi, T. Tabata, and M. Fukudome: 2-Thiobarbituric acid values and contents of α -tocopherol and bile pigments in the liver and muscle of jaundiced yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Agric. Biol. Chem.*, 52. 2967-2968 (1988)
3. T. Sakai, T. Yamaguchi, H. Nakajima, N. Kono, and C. Shimizu: Occurrence of bilirubin IX β in the gallbladder bile of eel, *Anguilla japonica*. *Biochim. Biophys. Acta*, 993, 128-130 (1989).
4. M. Endo and T. Sakai: Pathology of jaundice in the cultured eel *Anguilla japonica*. *J. Fish Disease* (1990) (投稿中).

(2)口頭発表

1. 境 正, 村田 寿, 山内 清, 田畑伸幸, 福留巳樹夫: 黄疸症ブリ肝臓・筋肉中のTBA 値、 α -トコフェロールおよびbilirubin 含量、平成元年度日本水産学会春季大会、平成元年4月(東京)
2. 境 正, 田畑伸幸, 山口登喜夫, 中島 熙, 河野迪子, 清水千秋: 魚類胆汁中におけるビリルビンIX β の存在、平成元年度日本水産学会春季大会、平成元年4月(東京)
3. 延東 真, 境 正, 山口登喜夫, 中島 熙: 黄疸ウナギの病理組織、平成2年度日本水産学会春季大会、平成2年4月(東京)

まえがき

近年南九州の養殖場でブリの黄疸症が頻発し、多大の漁業被害が出ている。また、ウナギにおいても黄疸症が散発し、その漁業被害も軽視できない。この黄疸症は、ビリルビンの排泄に何らかの障害が起こると発症すると考えられている。しかしながら、魚類のビリルビン排泄機構に関する研究は少ない。そこで、この黄疸症の診断法、治療法および予防法を確立することを主目的として、本研究を行った。そこで先ず最初に、魚類のビリルビン排泄機構についての基礎的データをを得る目的で、まず高性能液体クロマトグラフィーにより魚類胆汁中胆汁色素を分析するシステムを開発し、さらにそのシステムを用いてウナギ胆汁中の未知のビリルビン異性体の同定を試みた。また、血漿中のビリルビン関連物質の分析システムを開発した。ブリにおいては胆汁中に排泄されるビリルビンは主にタウリン抱合ビリルビンであることから、餌料中にタウリンを添加することにより、黄疸症の発症を予防することができるかどうかについて検討を加えた。最後に黄疸発症ブリおよびウナギを入手し、その発症原因について、生化学的手法および組織学・組織化学的手法を用いて検討した。

要約

(1)魚類胆汁中の胆汁色素を分析するHPLCシステムの開発を試みた。その結果、魚類胆汁中胆汁色素をほぼ完全に分離するシステムを作製することができた。このシステムにおいて、その再現性、定量性および感度は良好であり、しかも胆汁中だけでなく、組織中の胆汁色素の分析にも応用可能であった。

(2)ブリにタウリンを添加した精製餌料を与え飼育した後、フェニルヒドラジンを投与し、貧血を起こしたブリ胆汁中のビリベルジンおよびタウリン抱合ビリルビン含量、および肝臓中タウリン含量の変動を調べた。その結果は、タウリンを餌料中に添加することにより、ビリルビンの排泄がスムーズに行くこと、タウリンがビリルビンの排泄時に消費されること、および新たに肝臓中にタウリンが供給されないとビリルビンの排泄がうまく行かないことが明らかになった。このことは、タウリン添加餌料により、黄疸症の予防が可能であることを示唆していると考えられた。

(3)ウナギ胆汁中の未知のビリルビン異性体について、そのものおよびジアゾ誘導体をHPLC分析することにより、ビリルビンIX β と同定した。また、このビリルビン異性体はウナギ胆汁中の全ビリルビン抱合体の30~40%を占めていた。

(4)黄疸発症ブリを入手し、筋肉および肝臓中の2-チオバルビツール酸値(TBA値)および胆汁色素および α -トコフェロール含量を調べた。また、上記の組織を病理組織学的に調べた。その結果、黄疸症は生体内で急激な活性酸素が発生したことにより発症することが明らかになった。また、ビリルビンはこの急激な活性酸素を防除するために動員されたと考えられた。

(4)黄疸発症ウナギを入手し、その血漿中のビリルビン組成を、血漿中胆汁色素分析用に開発したHPLCシステムで分析し、さらに肝臓の病理を光顕および電顕により調べるとともに、肝臓および皮膚についてビリルビンに特異的なモノクローナル抗体を用い組織化学的に調べた。その結果、ウナギの黄疸症はホルモンバランスが失われたために発症したと考えられた。

昭和 6 3 年度魚病対策技術研究報告書
(魚類免疫及び生体防御機構)

研究者：宮崎大学農学部 助教授 境 正

緒言

タウリンは蛋白質を構成しないアミノ酸の一種で、多くの動物組織、特に海産生物の組織に多量に含まれている。その生理機能について哺乳類では、①抗酸化作用、②解毒作用、③膜の保護、④神経伝達作用、等の機能があると考えられている。(1)また、海産生物においては、浸透圧の調節の機能を持つとも考えられている。しかしながら、その生理的意義については不明な点が多い。ところで、海産魚類、特にブリ*Seriola quinqueradiata*においてこのタウリンは、bilirubinの排泄に重要な役割を担っている事が最近明らかにされた。(2)bilirubinは組織中に大量に蓄積されると、黄疸症を発症する。この黄疸症は近年養殖ブリで頻発し多大の漁業被害をだしている。したがって、肝臓中のタウリン含量と胆汁中のタウリン抱合bilirubin含量との関係を明らかにすることは、黄疸症の予防・治療の面から重要と考えられる。また、養殖海域の環境汚染物質や、疾病の予防・治療のために投与された薬剤による中毒と考えられる疾病も見られるようになってきた。これらの化学物質の解毒に関しても、タウリンは重要と考えられる。そこで、本実験を行った。

実験方法

1. 飼育試験 70尾の60g前後のブリをタウリン投与区（タウリン区）とタウリン無投与区（コントロール区）の2区（各区35尾）に分け、その組成を表1に示すような餌料を給餌して、2t水槽で4週間飼育した。1週間毎に各区3尾取上げその肝臓中のタウリン含量を測定した。飼育終了後、各区15個体に体重100g当たり10mgのフェニルヒドラジンを筋肉中に投与した。フェニルヒドラジン投与後は無給餌とした。投与後フェニルヒドラジン投与区は毎日、無投与区は1日置きに供試魚を取上げ、その肝臓中のタウリン含量と胆汁中の胆汁色素の組成を測定した。

2. 肝臓中のタウリン含量の測定 肝臓中のタウリン含量は、常法にしたがってトリクロル酢酸エキスを調製し、Sihabi and Whiteの方法(3)を基に、新たに開発した逆相カラムを用いる高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)法にて分析定量した。この方法は短時間（約0分）で分析が終了し、他の夾雑物との分離、検量線の直線性、検出限界、再現性、回収

率等についても満足のいくものであった（境ら未発表）。

3. 胆汁中の胆汁色素含量の測定 胆汁に10-100倍量のmethanolを加え、フィルターにて濾過後、Sakai et al.のHPLC法にて分析定量した。(4)

結果

1. 飼育試験 飼育1週間後に取り上げた魚の肝臓が緑肝症を呈していたので、その後は餌料の組成を表1に示したように変化させた。その後、緑肝症は認められなかった。飼育試験の結果を図1に示した。この図から明らかなように、タウリンの投与、無投与に係わらず成長に、ほとんど差は見られなかった。フェニルヒドラジン投与により、投与後一日目に、コントロール区では3尾の斃死が見られたが、タウリン投与区では斃死が見られなかった。

2. 肝臓中のタウリン含量の変動 結果を図2に示した。フェニルヒドラジン無投与魚は、コントロール区よりもタウリン区のほうが肝臓中のタウリン含量は高く、その後両区ともにタウリン含量はほとんど変動しなかった。フェニルヒドラジン投与後、コントロール区では、投与後一日目にタウリン含量は増加し、二日目から減少し続けた。一方、タウリン区では投与後一日目にタウリン含量は減少し、二日目には増加し、三日目には再度減少し、四日目には再度増加した。

3. 胆汁中の胆汁色素含量の変動 図3に胆汁中biliverdin含量の、図4に胆汁中タウリン抱合bilirubin (ditaurobilirubin)含量の変動結果を示した。コントロール区、タウリン投与区ともにフェニルヒドラジン投与魚において、投与後一日目から胆汁中のbiliverdin含量は急激に上昇した。フェニルヒドラジンを無投与魚では胆汁中のditaurobilirubin含量はほとんど変動しなかった。フェニルヒドラジン投与魚でも、コントロール区で、胆汁中のditaurobilirubin含量はほとんど変動しなかったが、タウリン区で、胆汁中のditaurobilirubin含量は投与後一日目には増加し、二日目に減少し、三日目に急激に増加し、四日目に減少した。

考察

フェニルヒドラジンを投与すると、投与後一日目にコントロール区では3尾の斃死が見

られたが、タウリン投与区では斃死が見られなかった。このことは、タウリンがフェニルヒドラジンとを体外にタウリン抱合体として排泄し、その毒性を低下させたことを示唆している。したがって、魚類においても哺乳類と同様に、タウリンはある種の化学物質をその抱合体として体外に排泄する機能、すなわち解毒機能を持っていると考えられる。

タウリン投与区のフェニルヒドラジン投与魚において、肝臓中のタウリン含量が低い時には、胆汁中のditaurobilirubin含量は高く、逆に、肝臓中のタウリン含量が高い時には、胆汁中のditaurobilirubin含量は低い。また、コントロール区のフェニルヒドラジン投与魚の結果も、同様な傾向を示している。この結果は、ブリにおいて肝臓中のタウリンがbilirubinをditaurobilirubinとして胆汁中に排泄するために消費されることを示している。また、肝臓中のタウリン含量があるレベルに達しないと、bilirubinをditaurobilirubinとして胆汁中へ排泄する機能がうまく働かないことを示しているのかもしれない。したがって、タウリンは肝臓中に蓄積されたbilirubinを、胆汁中に排泄するのに必要な物質と考えられる。このことは近年頻発しているブリの黄疸症の予防に、タウリン投与は有効である可能性を示唆している。

文献

- (1) C. E. Wright, H. H. Takkan, and Y. Y. Lin: *Ann. Rev. Biochem.*, 55, 427 (1986).
- (2) Z. K. Shihabi and J. P. Wite: *Clim. Chem.* 25 1368 (1979).
- (3) T. Sakai, K. Watanabe, and H. Kawatsu: *J. Biochem.*, 104, 793 (1987).
- (4) T. Sakai, N. Tabata, and K. Watanabe: *Agric. Biol. Chem.*, 52, 3051 (1988).

表 1. 飼育餌料組成

I) 基本組成

期間	ミルク カゼイン	タラ 肝油	デキス トリン	ビタミン 混合	ミネラル 混合	CMC
7 / 28						
~ 8 / 5	60	14	10	3	8	5
8 / 6						
~ 8 / 29	60	10	6	3	16	5

II) タウリン含量

タウリン含量	
コントロール区	0 g / 100 g food
タウリン投与区	2 g / 100 g food

III) 誘因物質含量

イノシン	135 mg / 100 g food
L-プロリン	86 mg / 100 g food
L-アラニン	131 mg / 100 g food

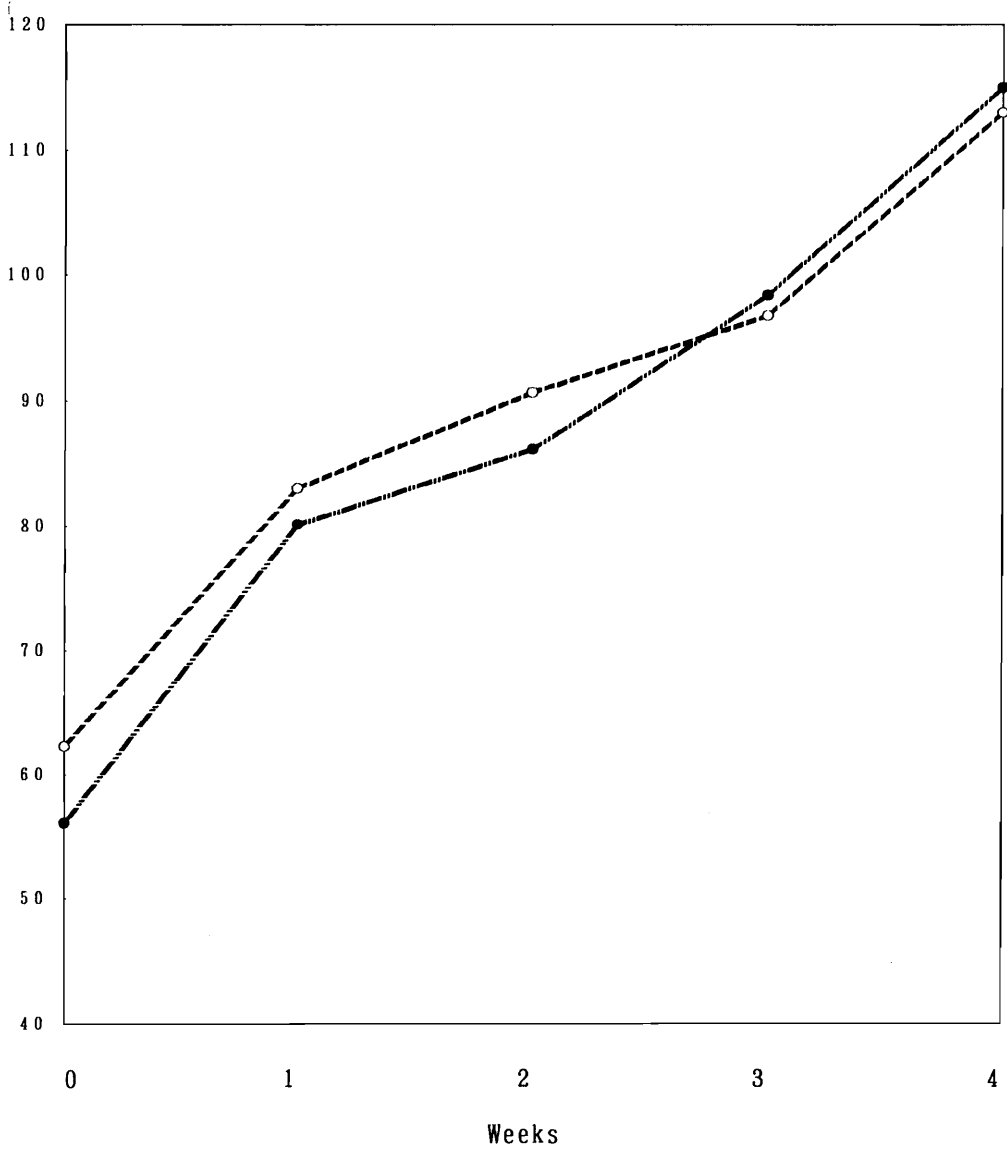


図 1. 飼育試験結果. ---○--- : コントロール区, ---●--- : タウリン区.

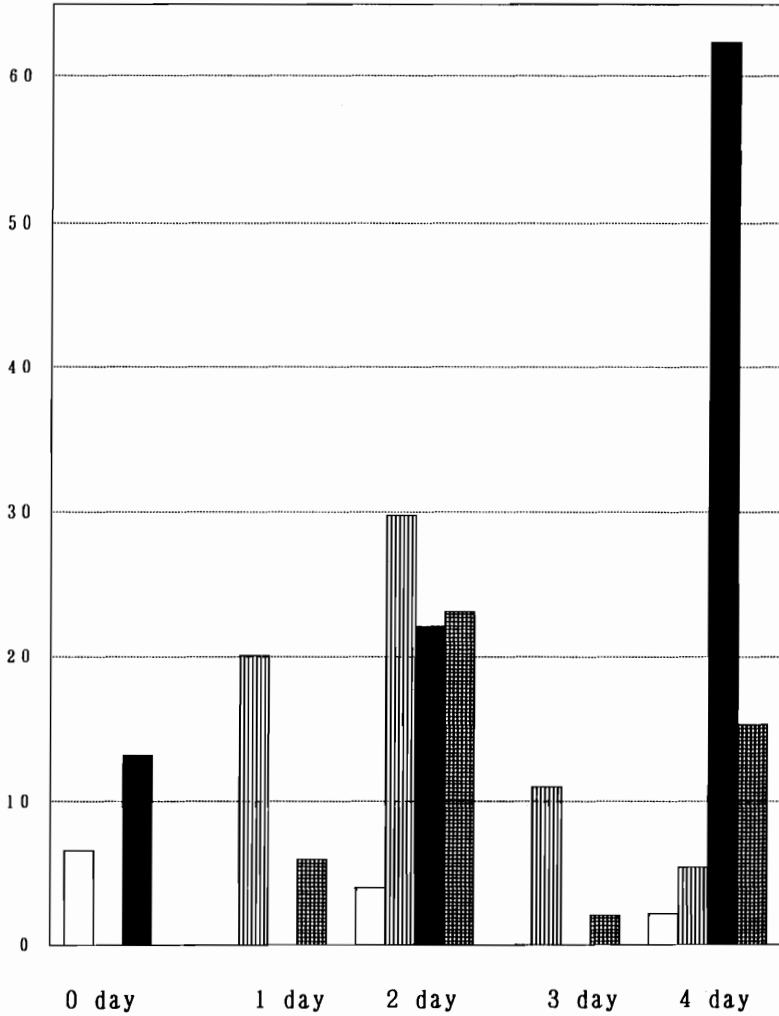


図 2. フェニルヒドラジン投与後の肝臓中タウリン含量の変動：□：コントロール区フェニルヒドラジン未投与魚，▨：コントロール区フェニルヒドラジン投与魚，■：タウリン投与区フェニルヒドラジン未投与魚，▩：タウリン投与区フェニルヒドラジン投与魚。

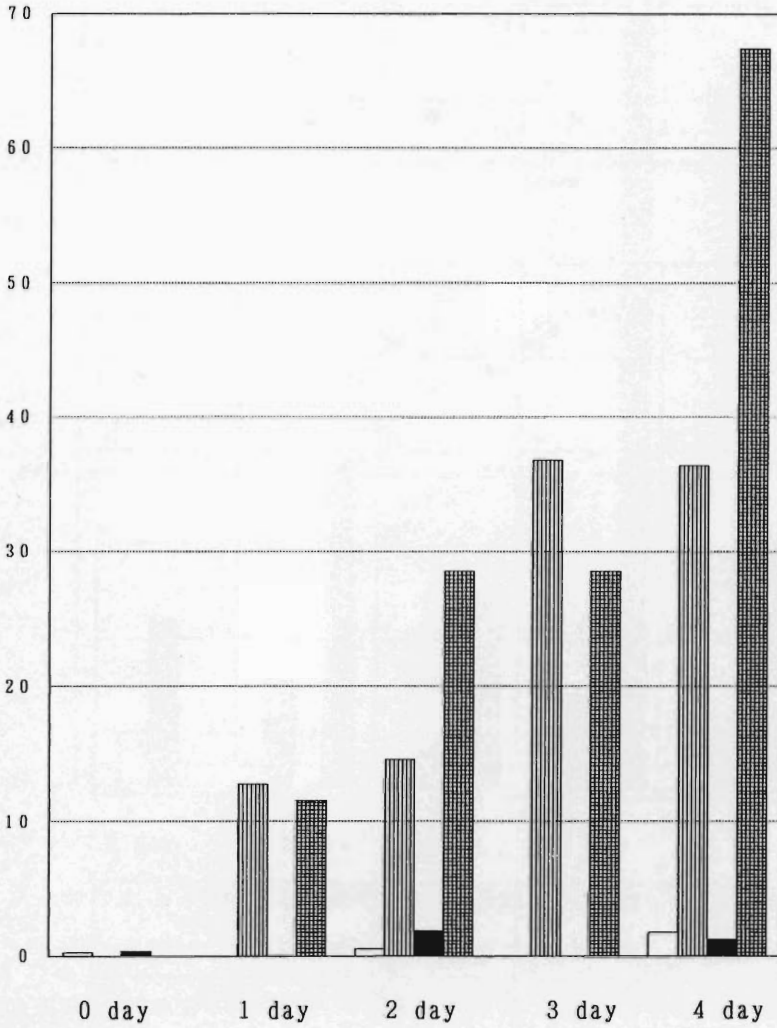


図 3. フェニルヒドラジン投与後の肝臓中biliverdin含量の変動, □ :
 コントロール区フェニルヒドラジン未投与魚, ▨ : コントロール区
 フェニルヒドラジン投与魚, ■, タウリン投与区フェニルヒドラジン未
 投与魚, ▩ : タウリン投与区フェニルヒドラジン投与魚.

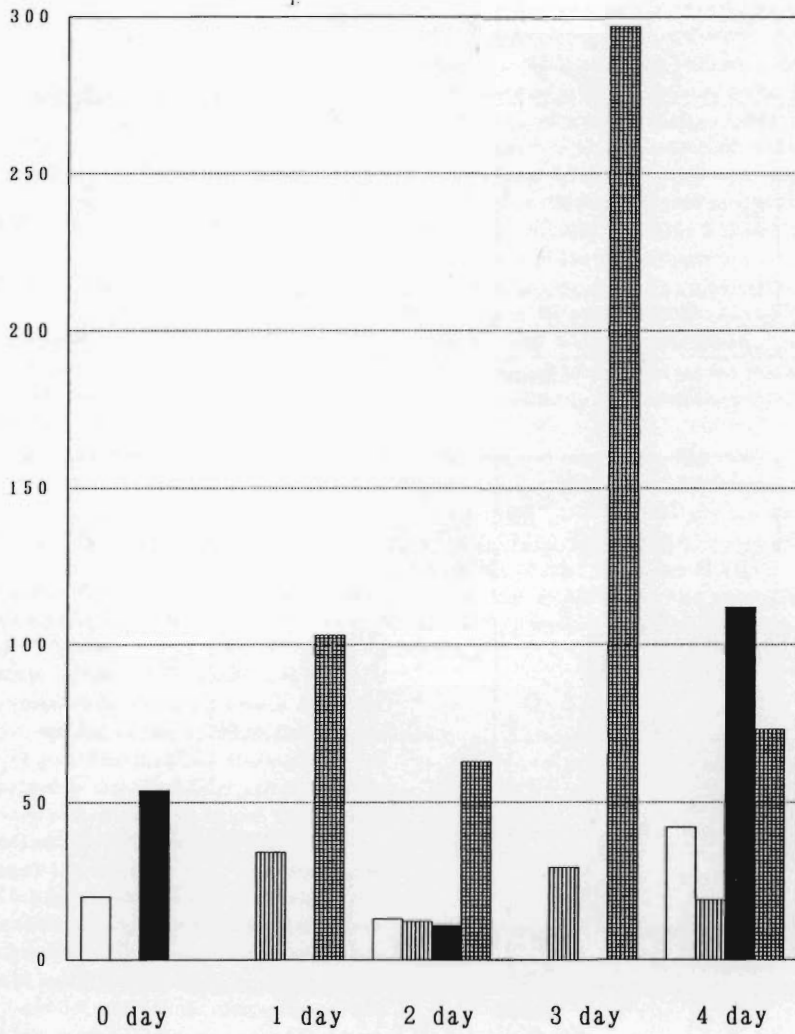


図 5. フェニルヒドラジン投与後の胆汁中ditaurobilirubin含量の変動： □ .
 コントロール区フェニルヒドラジン未投与魚. ▨ : コントロール区
 フェニルヒドラジン投与魚, ■ : タウリン投与区フェニルヒドラジン
 未投与魚, ▩ : タウリン投与区フェニルヒドラジン投与魚.