

黄疸原因菌接種ブリ組織中の生体内脂質過酸化

—特に黄疸発症と活性酸素との関係—

好気生物は、例えば赤血球のヘモグロビンと結合した酸素はスーパーオキシド様の挙動をするなど、酸素を種々の型の酵素により活性化し、活性酸素の形で利用する。この活性酸素は生体内の脂質過酸化を引き起こし、大量の過酸化脂質とその分解産物を生じ、生体高分子の構造を破壊し、老化や炎症等の疾病および免疫等の生体防御機能の低下等を引き起こすため、¹⁾好気生物は活性酸素を遊離しないようにしながら、酸素を利用している。しかしながら、生体内で活性酸素の生成を完全に抑制することは不可能なため、生体内で生じた活性酸素およびそれにともなう生体内脂質過酸化に対する防御機構を、好気生物は持っている。特に魚類はその体内に酸化されやすい高度不飽和脂肪酸を多量に含有しているため、生体内の脂質過酸化を受けやすいと考えられる。魚類においても、活性酸素機構の発生とその消去機構のバランスがくずれて生体内脂質過酸化が進行したことに起因すると考えられる疾病、たとえばブリの黄疸等が知られている。²⁾ブリ黄疸症の原因に関して、近年、血液中における細菌（黄疸原因菌）感染による赤血球破壊による溶血と生体内脂質過酸化の関与が、それぞれ報告されている。しかし、なぜ高ビリルビン血症になるのか、その経路については、まだよく判っていない。³⁻⁵⁾そこで、黄疸発症と活性酸素の係わりを明らかにするためには、黄疸原因菌を接種したブリ組織中の生体内脂質過酸化とその防御機構の変動について明らかにする必要がある。さらに、比較のために溶血を人為的に起こすことが知られているフェニルヒドラジン投与時におけるそれらの変動も明らかにする必要がある。そこで、本研究を行った。

方法

飼育条件 表1に今回の実験に使用した飼育餌料の組成を示した。また、表2に接種した黄疸原因菌の培養条件を示した。実験魚は市販のEP試料により飼育したブリを対照区15匹、原因菌接種区10匹を用いた。（平均体重は、接種区が1.3kg対照区が1.4kg）ここで接種区の魚に、1992年7月31日延岡市養殖場で発症した黄疸ブリから分離し、10%牛胎児血清を含むL-15培地で25℃、10日間培養した黄

痘原因菌株, 1ml当たり 10^6 cell含む培養液を、1尾当たり5ml接種した。また対照区には培養液のみを1尾当たり5ml接種した。接種後0、3、6、9日後に各区3尾ずつを取り上げ実験に供した。

血液性状の測定 採取した血液性状についてはKawatsuの方法により行った。⁶⁾

2-チオバルビツール酸 (TBARS) 値の測定 血漿中のTBARS値は島崎の比色法で分析し、nmolマロンアルデヒド/mlで示した。⁷⁾

α -トコフェノールの定量法 血漿中の α -トコフェノール含量は、Yamauchi et al.の方法に従って、n-ヘキサン: iso-プロピルアルコール (199:1) を移動層とする高速液体クロマトグラフィーにより定量した。⁸⁾カラムは、Zorbox BP-NH₂、検出器には、蛍光光度計 (励起波長: 295 nm、蛍光波長: 325 nm) を用いて、試料1mlあたりの μ g数で示した。

ビリルビン含量測定法 血漿中のビリルビン含量は、Izumi et al.の抗原抗体反応を利用したELISA法 (酵素抗体法) で測定した。⁹⁾すなわち、ビリルビンにたいして特異的な抗体である24G7を血漿に過剰に加え反応させる。次に、標識抗原であるBilirubin serum albuminにビリルビンと反応していない余りの抗原を付着させる。そこで、標識抗原と反応した余剰の24G7に二次抗体を付着させ、発色基質を加えて発色させたところを、414 nmと492 nmの二波長での吸光度を測定することで、ビリルビン含量を求め、ビリルビン濃度を μ Mで示した。

グルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定 グルタチオンペルオキシダーゼ活性はCarmagnol et al.の方法により測定した。¹⁰⁾

フォスファチジルコリンヒドロペルオキシドの測定方法 図1にフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PCOOH) の測定原理を示した。試料中の脂質抽出物をまず順相カラムにより各々の脂質クラスに分離し、波長205nmのUV吸収で脂質を検出する。一方、post column法により溶出液に化学発光試薬を送液、混合し、そこで発生した化学発光により脂質中の過酸化脂質を測定する。過酸化脂質を特異的に検出する原理は、ヒドロペルオキシド体がチトクロムCなどのヘム化合物により分解されると、活性酸素を発生し、これら、活性酸素がアルカリ条件下でルミノールと反応すると、430nmで発光を生じる励起アミノフタル酸となることを利用している。すなわち、430nmでの化学発光量で過酸化脂質が定量される。

結果

図2に血液中の赤血球(RBC)数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン含量の変動を示した。ヘモグロビン含量は3日後から9日後にかけて対照区に比べて明らかな減少を示した。ヘマトクリット値もヘモグロビン値と同様に3日後から9日後にかけて対照区に比べて明らかな減少を示した。この二つの数値の減少から黄疸原因菌が、赤血球を攻撃し溶血を引きを越していることが確認された。

図3に血漿中のビリルビン含量の変動を示した。対照区は $0.04\sim 0.80\mu\text{M}$ で分析法の検出限界濃度にすぎなかったが、原因菌接種区では3日後から9日後にかけて $6.07\sim 753\mu\text{M}$ のビリルビンが認められ、明らかに高ビリルビン血漿を示した。

図4に脂質過酸化の抑制に重要な酵素の一つであるグルタチオンペロオキシダーゼの血漿中の活性の変動を示した。今回の実験においてはグルタチオンペロオキシダーゼ活性については対照区との差異はほとんど見られなかった。

図5に肝臓中のグルタチオンペロオキシダーゼ活性の変動を示した。肝臓においても血漿の場合と同様に、今回の実験と対照区においてはグルタチオンペロオキシダーゼ活性に差はほとんど見られなかった。

図6には肝臓中のフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)含量の変動を示した。PCOOHは脂質の過酸化によって生じる第1次生産物である。このPCOOH含量が3日後から9日後にかけて対照区に比べて明らかに増加していることから、不飽和脂肪酸の過酸化が起こっていることが認められた。

図7には不飽和脂肪酸の最終生産物であるマロンアルデヒドを測定した2-チオバルビツール酸値(TBARS値)の肝臓中の変動を示した。TBARS値は3日後に最も上昇し、6日後9日簿には対照区とほぼ同量にまで回復した。このTBARS値の上昇は生体内脂質過酸化が起こっていることを示している。

図8に天然の脂溶性の抗酸化剤である α -トコフェノールの肝臓中の含量の変動を示した。3日後まで対照区と実験区にはほとんど差は見られなかったが、6日後から9日後にかけて明らかな減少を示した。この減少は生体内脂質過酸化を抑制するために α -トコフェノールが消費された結果だと考えられる。

フェニルヒドラジンを 15mg/Kg 投与した実験結果については、投与後3日目の血液中のヘモグロビンおよびビリルビンの変動のみを図9にまとめて示した。この図から明らかなように、フェニルヒドラジン投与により溶血が起こり、その結果、高ビリルビン血症が発症したと思われる。

考察

図10に今回の試験結果とこれまでの報告とを併せて考えられるブリ黄疽症の発症機構を示している。原因菌接種により著しく増加した肝臓PCOOHは、大量の活性酸素の発生を示している。活性酸素の発生は、これまでも予測されているように、原因菌による赤血球破壊が起きた結果、膜外へ流出したヘモグロビンのヘムと血中酸素との反応により生じたのではないかと考えられる。また、活性酸素の発生は、以前から報告されている、黄疽ブリ組織中のTBARS値の上昇から推測されているように、生体内脂質過酸化の進行に関与していると考えられる。一方、すでに我々は、ラジカル発生剤フェニルヒドラジン投与試験において、活性酸素により肝臓ヘムオキシゲナーゼの誘導化が起こり、高ビリルビン血症になることを確認している。今回の試験により、黄疽原因菌を接種したブリ肝臓中に大量に発生した活性酸素も肝臓ヘムオキシゲナーゼの誘導化を引き起こし、その結果、ビリルビンが高濃度に合成され、黄疽発症に関与したのではないかと考えられる。なお、ブリ黄疽症の発症メカニズムについては、今後、ビリルビン合成など、さらに詳細な検討が必要であると思われる。

文献

- 1) E. Candenas: E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.*, **58**, 79-110 (1989).
- 2) T. Sakai, H. Murata, M. Endo, K. Yamauchi, N. 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.*, **53**, 1739-1740 (1989).
- 3) 反町 稔, 前野幸男, 中島員洋, 井上 潔, 乾 靖夫: 養殖ブリ「黄疽症」の原因. *魚病研究*, **28**, 119-124 (1993).
- 4) T. Iida and M. Sorimachi: Cultural characteristics of the

- bacterium causing jaundice of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathology*, **29**, 25-28 (1994).
- 5) Y. Maeno, K. Nakajima, M. Sorimachi, and Y. Inui: Pathophysiological studies of jaundiced yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathology*, **30**, 7-14 (1995).
- 6) H. Kawatsu: Studies on the anemia of fish-III. An example of macrocytic anemia found in brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Bull. Freshwater Res. Lab.*, **19**, 161-167 (1969).
- 7) 島崎弘幸: 生体内過酸化脂質の測定, “過酸化脂質研究法”, 金田尚志編, 1984, 医歯薬出版株式会社: 東京. p.82-83.
- 8) K. Yamauchi, H. Murata, T. Ohashi, H. Katayama, A. M. Pearson, T. Okada, and T. Yamakura: Effect of dietary α -tocopherol supplementation on the molar ratio of polyunsaturated fatty acids/ α -tocopherol in broiler skeletal muscles and subcellular membranes and its relationship to oxidative stability. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **38**, 545-552 (1991).
- 9) Y. Izumi, M. Yamazaki, S. Shimizu, K. Shimizu, T. Yamaguchi, and H. Nakajima: Anti-bilirubin monoclonal antibody II. Enzyme-linked immunosorbent assay for bilirubin fraction by combination of two monoclonal antibodies. *Biochim. Biophys. Acta*, **967**, 261-266 (1988).
- 10) F. Carmagnol, F. M. Sinet, and H. Jerome: Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim. Biophys. Acta*, **759**, 49-57 (1983).

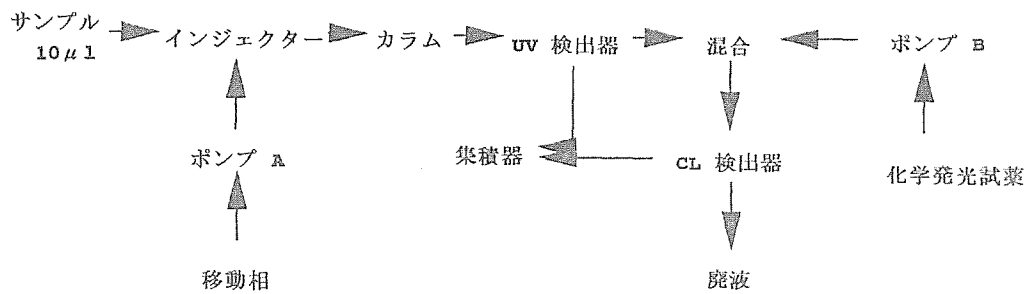
表 1. 実験に用いた餌料の脂肪酸組成、脂質性状、TBARS値、 α -トコフェロールおよびアスコルビン酸リン酸マグネシウム塩 (APM) 含量

Fatty acid	
12 :0	0.04
14 :0	3.90
15 :0	0.26
16 :0	15.63
16 :1 ω 7	6.33
18 :0	3.69
18 :1 ω 9	22.66
18 :2 ω 6	14.61
18 :3 ω 3	8.32
+ 20 :1 ω 9	
18 :4 ω 3	1.64
20 :3 ω 6	0.13
20 :4 ω 6	5.10
20 :5 ω 3	7.06
24 :1 ω 9	0.33
22 :3 ω 6	0.13
22 :4 ω 6	0.13
22 :5 ω 6	0.21
22 :5 ω 3	1.40
22 :6 ω 3	8.45
Sat. FA	23.52
Monoene	29.12
Diene	14.61
Triene	5.23
Tetraene	7.40
Pentaene	10.17
Hexaene	8.45
PUFA \geq 18 :2 ω 6	39.18
Lipid content (%)	25.36
Content of fatty acid(g/100g)	18.90
Peroxidizable index	184.0
Unsaturation index	205.1
Peroxide value	16.27
TBA value (mg MA/kg)	1.62
α -Tocopherol *1	46.8
Ascorbyl-2-phosphate *1	-

*1 (mg/100g diet)

表 2 . 黄疸原因菌接種の試験条件

黄疸原因菌株	1992年7月31日延岡市養殖場で発症した黄疸ブリ（体重3.75kg）から分離した株
培養条件	10%牛胎児血清を含むL-15培地（組織培養液）にて25℃、10日間培養
菌数および接種量	対照区；培養液のみを1尾当たり5ml接種 原因菌接種区；原因菌数 2×10^6 cell/mlの培養液を1尾当たり5ml接種
供試魚	市販のEP飼料により飼育されたブリ 対照区15尾（平均体重1.4kg） 原因菌接種区10尾（平均体重1.3kg）
菌攻撃試験飼育	1.5tFRPタンクにおいて9日間飼育



カラム: Shimazu Shim-pack CLC-SIL (M) 250×4.6mm
 ポンプ A: Shimazu LC-10A (UV)
 ポンプ B: Shimazu LC-10A (CL)
 UV 検出器: Shimazu SPD-6A (波長 205nm)
 CL 検出器: Shimazu CLD-10A
 集積器: Shimazu CR-4A
 移動相: アセトニトリル : メタノール : 水 (5.5 : 3 : 1.5 v/v)

流量、1.0 ml/min
 化学発光試薬: 1 μg/ml ミノール, 10 μg/ml チトクローム C,
 1% Me-OH を含む pH10.5 の 20mM ほう酸緩衝液
 流量、1.0 ml/min

図 1. 化学発光高性能液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) 装置

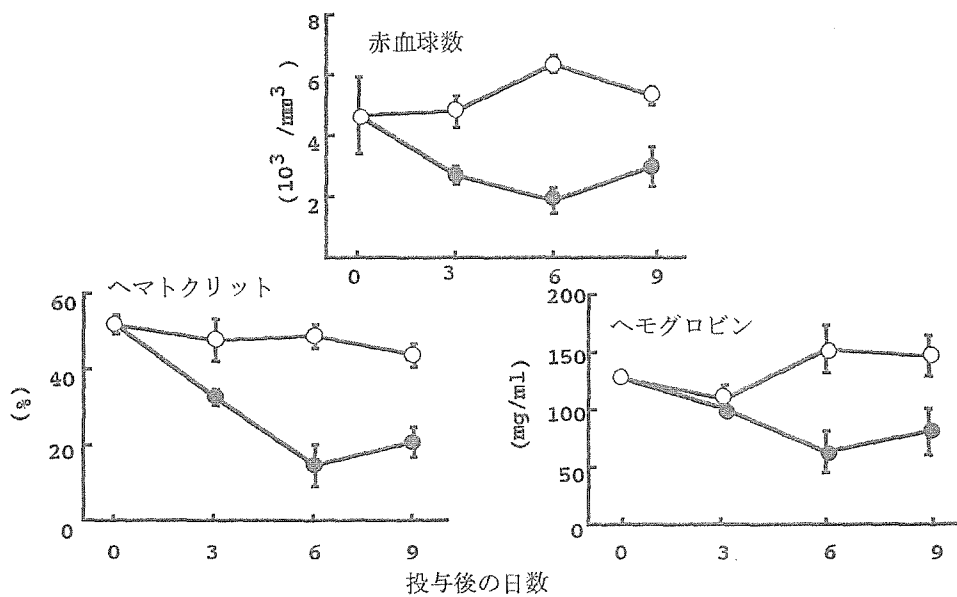


図 2. 黄疽菌接種による血液性状の変動

○: 対照魚 ●: 投与魚

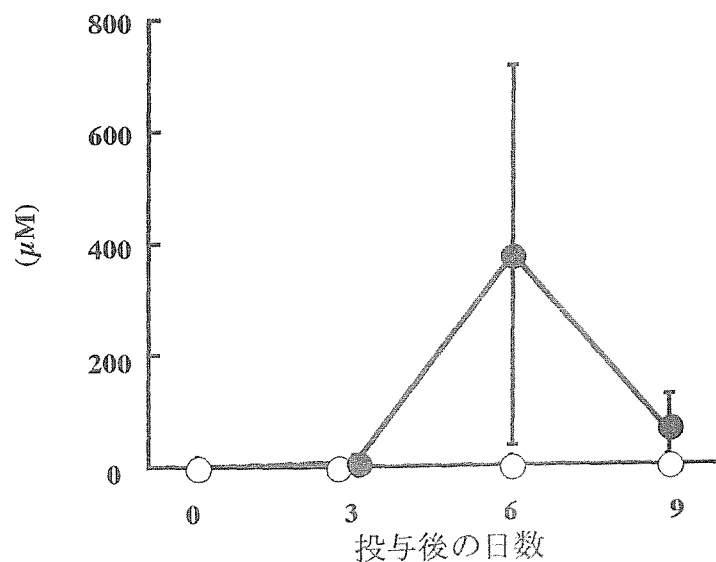


図 3. 黄疽菌投与後の血漿ビリルビン含量の変動.

○: 対照魚 ●: 投与魚

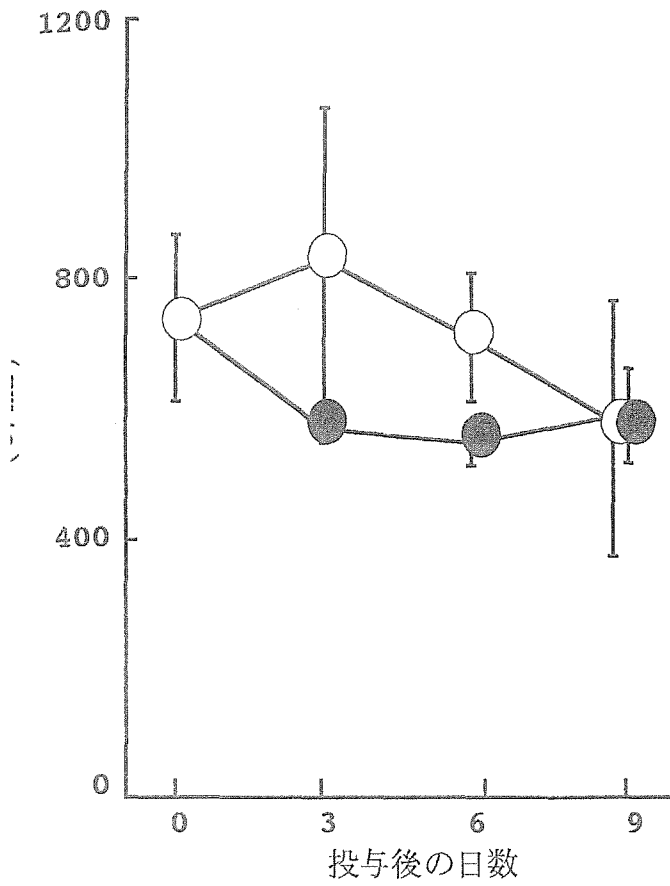


図4. 黄痘菌投与後の血漿中グルタチオンペルオキシダーゼ活性の変動

○: 対照魚 ●: 投与魚

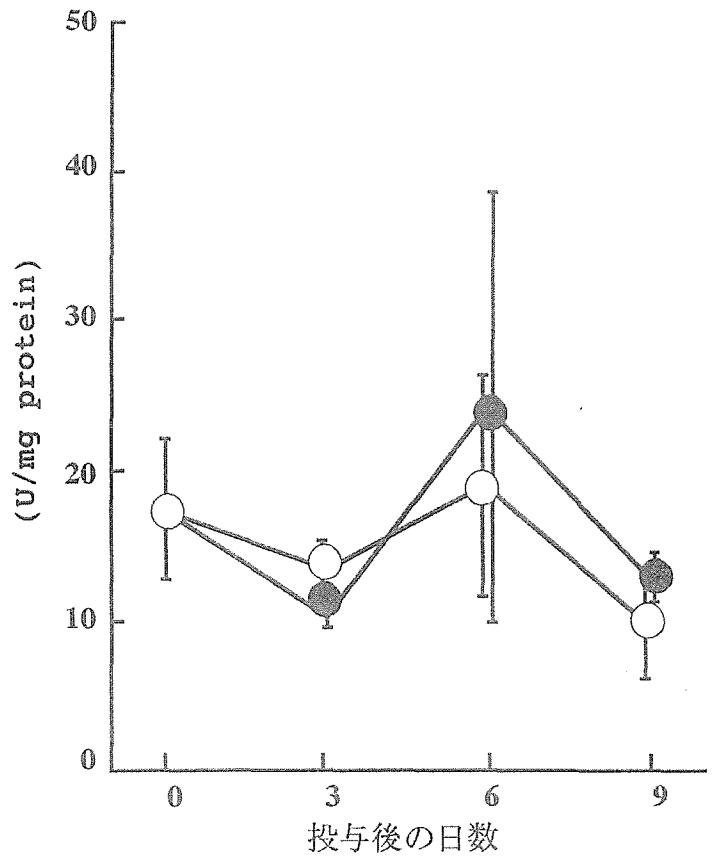


図5. 黄痘菌投与後の肝臓中グルタチオンペルオキシダーゼ活性の変動

○: 対照魚 ●: 投与魚

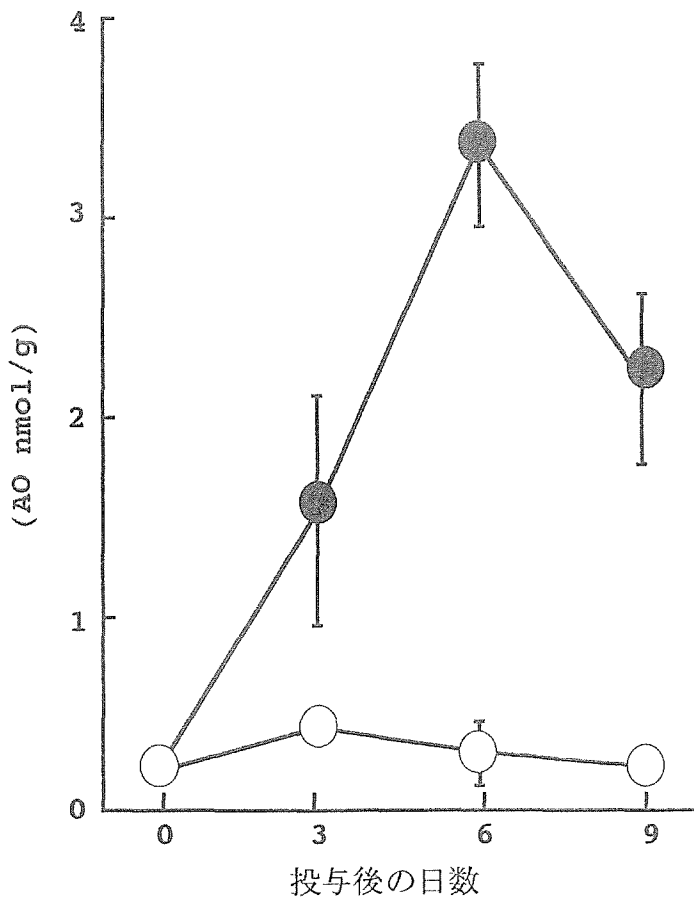


図6. 黄痘菌投与後の肝臓P COOH含量の変動

○: 対照魚 ●: 投与魚

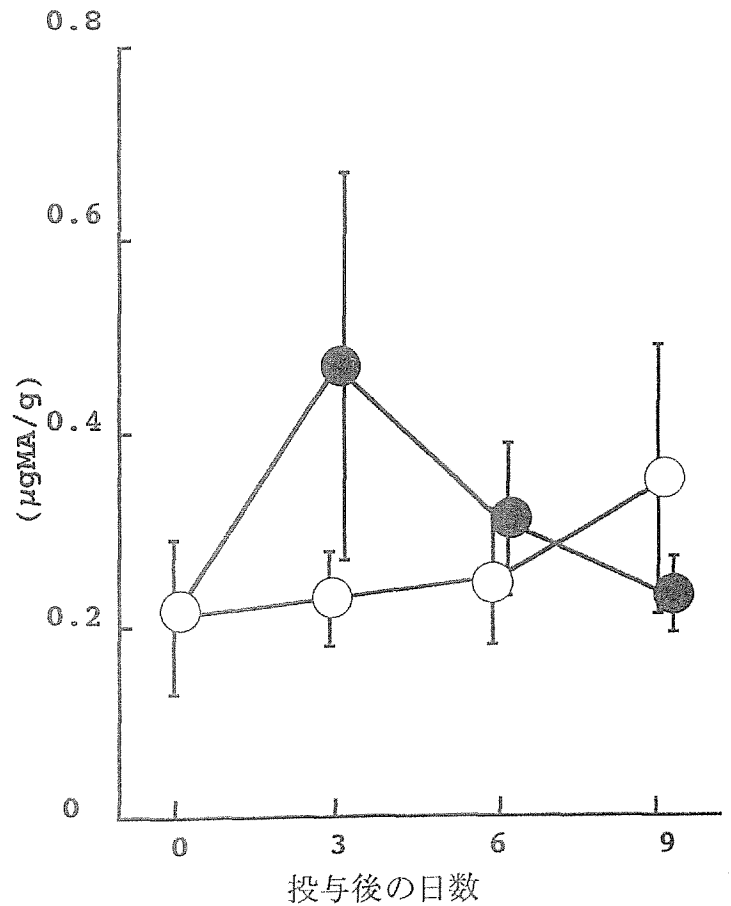


図7. 黄痘菌接種後の肝臓TBARS値の変動

○: 対照魚 ●: 投与魚

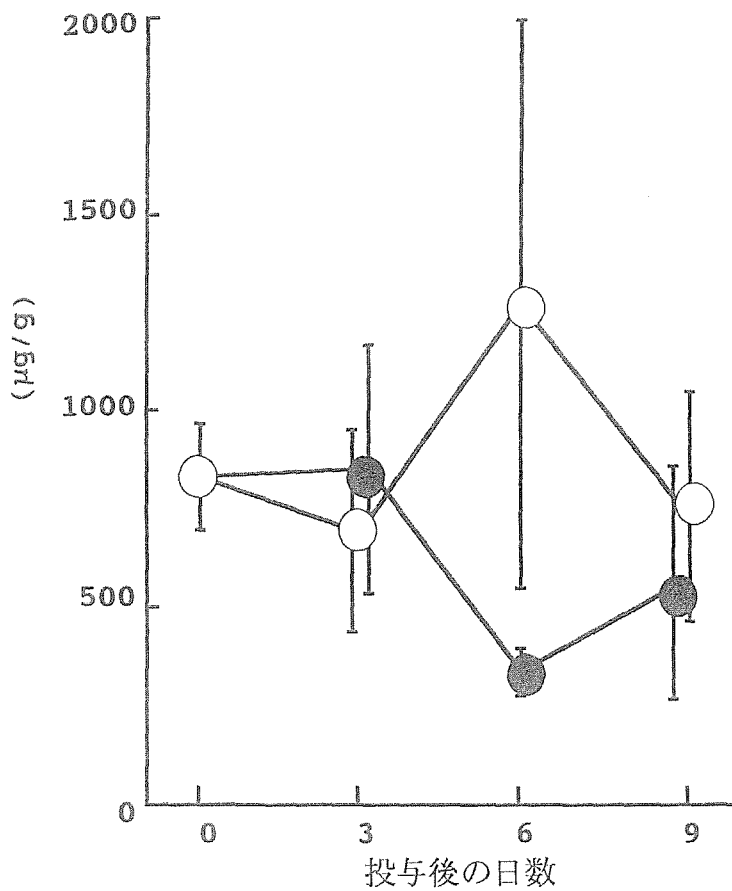


図8. 黄疽菌投与後の肝臓 α -トコフェロール含量の変動
○: 対照魚 ●: 投与魚

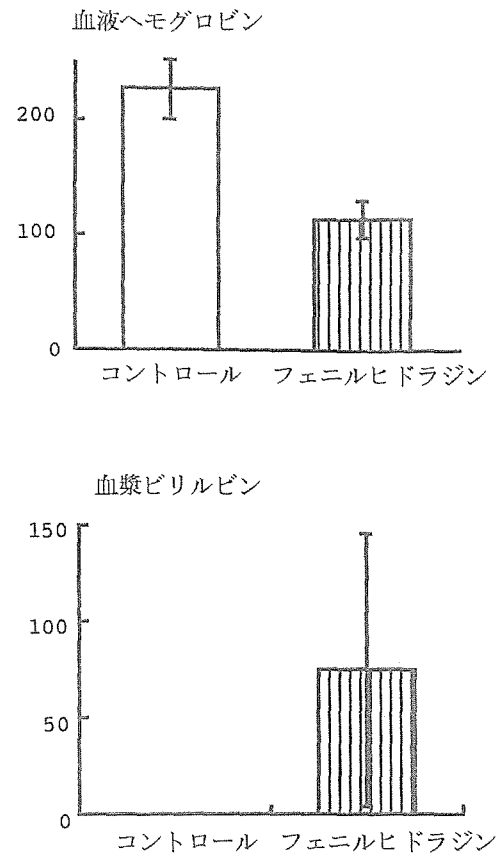


図9. フェニルヒドラジン投与後3日目の血液ヘモグロビン量および血漿ビリルビン含量

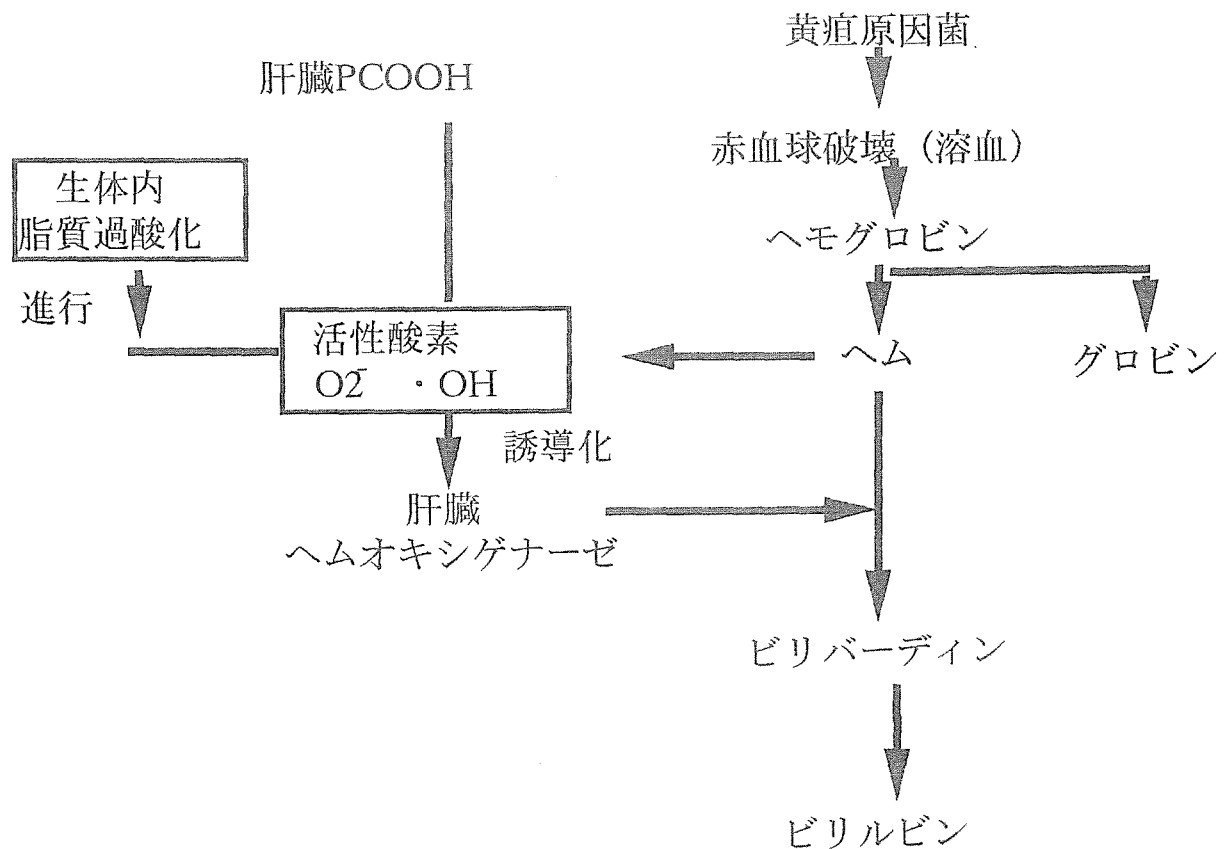


図10. ビリルビン合成と活性酸素との関わり