

アスコルビン酸を補足したエクストルーダ飼料給与 による養殖ブリ黄疽発症の軽減の試み

魚類における黄疽の発症の報告は多い。¹⁻⁵⁾そのなかでも、近年鹿児島県をはじめとする南日本で養殖ブリに黄疽が頻発し、多大の被害が出ている。特に、このブリ黄疽は出荷直前の2~3年魚に多く発症がみられ、ブリ養殖上重大な問題となっている。ビリルビンの抗酸化機能の面から行なった我々の一連の研究結果は、魚類黄疽のなかで特に被害額が多く産業上最も問題となっているブリ黄疽の発症の主因が生体内で生じた多量の活性酸素による生体内脂質過酸化の極度の進行であることを示している。⁶⁾これまでに行われてきた多くの研究結果より、この生体内脂質過酸化の進行は、給餌する餌料の質により大きく左右されることが明らかになってきている。^{7-9)*1, *2}従って、生体内脂質過酸化を進行させる要因となる餌料中の脂質過酸化物含量を極力抑えること、餌料中の生体内脂質過酸化を抑制するために重要なビタミンである α -トコフェロール (α -Toc) やアスコルビン酸 (ASA)、特に、黄疽発症ブリの血漿および肝臓中のASA含量が著しく低下していることから、¹⁰⁾ASAの餌料への添加量を多くすることにより、ブリの黄疽の予防が可能と考えられる。そこで、本研究を行った。

方法

飼育条件 2 試験区を設け、飼育試験を行った。1区：20mg/100g飼料のASAリン酸マグネシウム塩 (APM) を含むEP飼料にASA 0mg添加。2区：20mgASAを添加した。表1に今回の実験に使用したこの飼育餌料の組成を示した。この2餌料で2月間魚を飼育した後、1992年7月31日延岡市養殖場で発症した黄疽ブリから分離し、10%牛胎児血清を含むL-15培地で25°C、10日間培養した黄疽原因菌株, 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5日目に魚を取り上げ、肝臓および

*1関屋朝裕、村田 寿、境 正、山内 清、宇川正治、山田卓郎：ブリの生体内脂質過酸化に及ぼす飼料アスコルビン酸の影響。平成2年度日本水産学会春季大会発表

*2村田 寿、境 正、山内 清、関屋朝裕、延東 真、下村敏之、宇川正治：フェニルヒドラジン攻撃ブリの抗酸化システムに及ぼす飼料アスコルビン酸の影響。平成2年度日本水産学会春季大会発表

血液中の生体内脂質過酸化に関与する成分を測定した

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。¹¹⁾

2-チオバルビツール酸 (TBARS) 値の測定 ブリ組織のTBARS値はYamauchi et al.の水蒸気蒸留法で測定し、mgマロンアルデヒド/kg 試料で示した。¹²⁾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。¹³⁾

アスコルビン酸含量の測定法 アスコルビン酸は、Ito et al.¹⁴⁾の方法に従ってメタリン酸で抽出した試料を、移動相として5mM シュウ酸を、反応液として50mM水素化ホウ素ナトリウム含有100mM水酸化ナトリウムを用いた高速液体クロマトグラフィーによって定量した。カラムには Shim-Pack SCR-101H (7.9 x 300 mm), 検出器には UV 検出器(検出波長:300 nm)をそれぞれ用いた。

α -トコフェノールの定量法 血漿中の α -トコフェノール (α -Toc) 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。¹⁵⁾カラムは、Zorbox BP-NH₂, 検出器には、蛍光光度計 (励起波長: 295nm、蛍光波長:325nm)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。¹⁶⁾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、414nmと492nm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。

脂質過酸化物 (PCOOH) の測定方法 図1に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PCOOHを測定する。PCOOH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PCOOHが定量される。

結果

図2にこれまで数年にわたり養殖現場での調査結果うち、黄疸発症が認められなかった養殖場（養殖場N）と認められた養殖場（養殖場J）のブリ肝臓および血漿中のASA含量について示した。この図から明らかなように、養殖場Jのブリ肝臓中のASA含量は（養殖場N）それよりも低く、養殖場Jのブリ血漿中のASA含量は検出限界以下であった。この結果は、肝臓および血漿中のASA含量が低下すると黄疸が発症する可能性を示している。

次いで、飼育結果について表3に示した。この表から明らかなように、両区間に差は殆ど認められなかった。この結果は、20mg/100 g餌料のアスコルビン酸が添加されれば成長に関しては十分であることを示している。

図3に、飼育終了時の肝臓中ASA含量を示した。この図から明らかなように、ASAを40 mg/100 g餌料になるように添加した2区のほうが肝臓中のASAおよびデヒドロアスコルビン酸（DASA）ともに多かった。このことは、餌料に添加されたASAが肝臓中に蓄積されたことを示している。表4に血漿中のアスコルビン酸含量の飼育終了時および黄疸菌接種後5日目の結果をまとめて示した。血漿においては肝臓と異なり、ASAの餌料添加にも関わらず、2試験区間ともにASA、DASAおよび全ASA(T-ASA)含量は検出限界以下であった。このことは、餌料にASAを60 mg/100 g餌料になるように添加しても血漿中のアスコルビン酸含量は増加しないことを示している。

飼育終了時の肝臓のPCOOHを図4に血漿のPCOOHを図5に示した。図4から明らかなように、飼育終了時の2区の肝臓のPCOOH量は1区に比べ高く、餌料にASAを添加することにより肝臓中のASA含量が増えその結果、PCOOHの生成が抑えられたこと、すなわち生体内脂質過酸化が抑制されたことを示している。しかしながら、血漿においては1区に比べ2区のPCOOH含量が高く、血漿では餌料にASAを添加しても、PCOOHの生成が抑制されなかったことを示している。

図6に黄疸菌投与後5日目のヘモグロビン量を示した。この図から明らかなように、1および2区ともに黄疸菌接種により引き起こされた溶血によると思われる貧血が起こっている。また、その溶血の程度に両区間の差は認められなかった。

図7に黄疸菌投与後5日目の血漿中のビリルビン含量を示した。1および2区ともに血漿中にビリルビンが認められ、黄疸の症状を示していた。

図8に黄疸菌投与後5日目の肝臓中の、また、図9に血漿中のPCOOH含量を示した。肝臓および血漿中のPCOOH含量は、菌投与により増加した。黄疸菌接種魚における肝臓中のPCOOH含

量はASAを添加した2区の法が1区に比べ低かったが、血漿では逆に1区の方が高かった。この結果は接種前の結果と同じ傾向であった。

図10に黄疽菌投与後5日目の肝臓中の、また、図11に血漿中のTBARS値を示した。TBARS値はPCOOHと同様に脂質過酸化の程度を表す指標となる。この図から明らかなように、黄疽菌投与により、肝臓および血漿中のTBARS値は上昇した。肝臓のTBARS値はそのPCOOHのそれと同じで1区が2区に比べ高かったが、血漿においてはPCOOHとは逆に1区の方が2区に比べ高かった。

図12に黄疽菌投与後5日目の肝臓中の還元型アスコルビン酸（ASA）含量を示した。黄疽菌投与により、1区の肝臓中のASAは減少したが、2区のそれは逆に増加した。また、表4に示したように、血漿中のアスコルビン酸は黄疽菌投与前後ともに、測定限界以下であった。

図13に黄疽菌投与後5日目の肝臓中の、図14に血漿中の α -Toc含量を示した。1、2区ともに黄疽菌接種により肝臓、血漿ともに α -Toc含量は低下した。このことは、黄疽菌接種にともなう溶血により生じた生体内脂質過酸化の進行を抑制するために消費されたためと思われる。

考察

餌料にASAを添加することにより、ブリの黄疽の発症を抑制しようと試みた。肝臓中のPCOOH含量およびTBARS値ともに菌接種により増加していることより、肝臓では生体内脂質過酸化が進行していると思われる。また、その進行を抑えるために α -Tocが消費されていると思われる。しかしながら、ASAに関しては、餌料にASAを添加していない1区では黄疽菌投与によりASA含量は低下しているが、ASAを添加した2区では逆に増加している。1区ではASAは脂質過酸化進行を抑制するために消費されたと考えれるが、2区ではASAはその進行の抑制に関与してないようにも思われる。なぜこのような結果になったのかについては目下不明であるが、EP飼料に用いられているAPMのブリ消化管および肝臓中での分解吸収が、他魚種と異なっている可能性が示唆されているが^{*3}そのことと関係があるのかもしれない。血漿について見ると、TBARS値は黄疽菌の投与により増加し、その割合は1区の方が2区に比べ高かった。しかしながら、PCOOH含量に関しては、1、2区ともに菌投与により増加したが、その割合は

*3境 正、村田 寿、伊東尚史、前津晋也、毛良明夫、宇川正治：魚類組織および魚類飼料中のascorbyl-2-phosphate (APM) 含量の高性能液体クロマトグラフィーによる定量。平成9年度日本水産学会講演発表予定

2区の方が1区に比べ高かった。したがって、血漿の生体内脂質過酸化に関しては、その指標となるPCOOH量とTBARS値が逆の関係を示している。しかしながら、PCOOHは脂質過酸化の初期の段階で発生すること、TBARSは脂質過酸化の最終産物であるマロンアルデヒド量をしめしていることを考えると、黄疸菌接種後5日目の時点でも血漿中では初期の段階の生体内脂質過酸化が進行している最中であるのかもしれない。

フィールド実験の結果は、ASA欠乏が黄疸の発症と密接に関わっていることを示していること、血漿中のASAが検出限界以下であったこと等から、今回認められた黄疸の発症は、その発症を抑えるために必要なASAが血液中に供給されなかったことによると考えられる。

文献

- 1) S. Ando and M. Hatano: Bilirubin-binding protein in the serum of spawning-migrating chum salmon *Oncorhynchus keta*: Its identity with carotenoid-carrying lipoprotein. *Fish Physiol. Biochem.*, **5**, 69-78 (1988).
- 2) S. Ando and M. Hatano: Carrier lipoprotein of carotenoids and/or bilirubin in the serum of spawning-migrating mass salmon. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 553 (1990).
- 3) M. Endo, T. Sakai, T. Yamaguchi, and H. Nakajima: Pathology of jaundice in the cultured eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, **103**, 1-7 (1992).
- 4) T. Sakai, T. Shimomura, M. Endo, M. Murata, M. Tashiro, and K. Yamauchi: Occurrence of hyperbilirubinemia in cultured red sea bream. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 328-329 (1993).
- 5) T. Sakai, H. Murata, K. Yamauchi, K. Takahashi, N. Okamoto, K. Kihira, T. Hoshita, and Y. Tanaka: Hyperbilirubinemia of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, Infected with erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS) virus. *Fisheries Science*, **60**, 519-521 (1994).
- 6) 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).

7) T. Watanabe, F. Takashima, C. Ogino, and T. Hibiya: Effect of α -tocopherol on carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **36**, 623-630 (1970).

8) H. Murata and K. Yamauchi: Relationship between the 2-thiobarbituric acid values of some tissues from cultured red sea bream and its dietary α -tocopherol. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**, 1435-1439 (1989).

9) T. Sekiya, H. Murata, T. Sakai, K. Yamauchi, M. Endo, T. Shimomura, and M. Ugawa: Effects of dietary fish meal qualities on 2-thiobarbituric acid values and α -tocopherol contents of yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **60**, 505-508 (1994).

10) H. Murata, T. Sakai, K. Yamauchi, T. Ito, T. Tsuda, T. Yoshida, and M. Fukudome: *In vivo* lipid peroxidation levels and antioxidant activities of cultured and wild yellowtail. *Fisheries Science*, **62**, 64-68 (1996).

11) 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).

12) K. Yamauchi, H. Murata, and T. Ohashi: Quantitative relationship between alpha-tocopherol and polyunsaturated fatty acids and its connection to development of oxidative rancidity in porcine skeletal muscle. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1061-1067 (1980).

13) 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. pp.82-83.

14) T. Ito, H. Murata, Y. Yasui, M. Matsui, T. Sakai, and K. Yamauchi: Simultaneous determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in fish tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **667**, 355-357 (1995).

15) 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).

16) 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).

(%)

Ingredient	Diet no.	
	1	2
Brown fish meal	70.5	70.5
Starch	10.0	10.0
Active gluten	3.0	3.0
Emulsifier	2.0	2.0
Fish oil (sardine oil)	9.0	9.0
Mineral Mixture	2.5	2.5
Vitamin Mixture	3.0	3.0
α-Tocopherol(mg/100g diet)	44	44
{ APM(mg/100g diet) }	20	20
C-oil-Riken (g/100g diet)	0	4
{ (mg AsA/100g diet) }	0	40

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

3. 飼育試験結果

	1	2
験区		
体数	100	51
均体重(g)		
始時	189.5	188.2
了時	526.8	536.7
長率(%)	178.0	185.2
料効率(%)	72.4	75.6
間給餌率(%)	2.09	2.07
死率(%)	0	1.96

黄疽菌接種による血漿中アスコルビン酸の変動

試験区	日数	血漿アスコルビン酸 ($\mu\text{g/ml}$)					
		対照区			黄疽菌接種区		
		AsA	DAsA	TAsA	AsA	DAsA	TAsA
	0	0	0	0	-	-	-
	5	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	0	-	-	-
	5	0	0	0	0	0	0

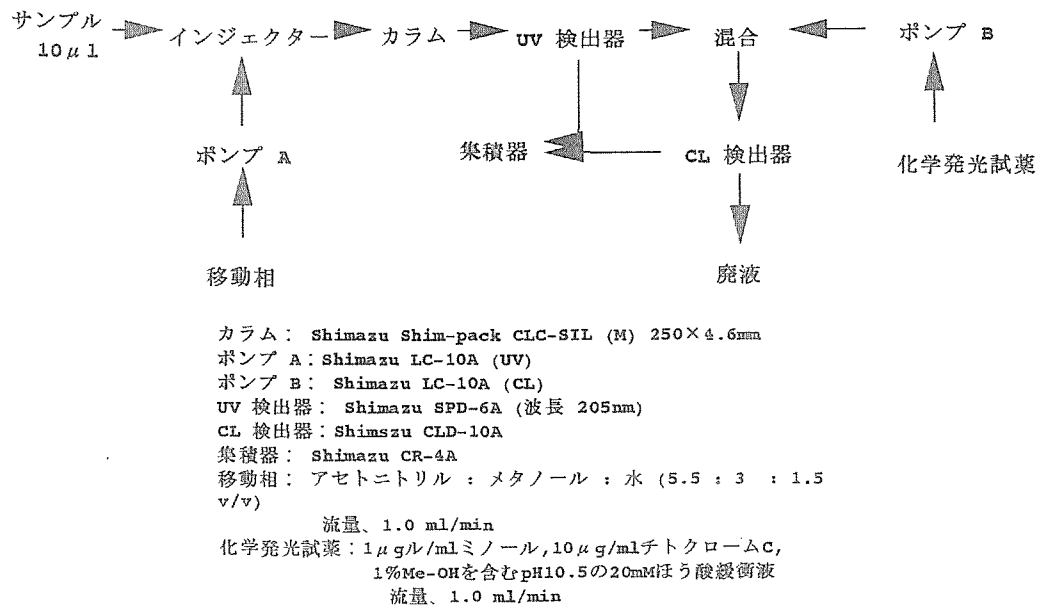


図 1. 化学発光高性能液体クロマトグラフィー (CL-HPLC) 装置

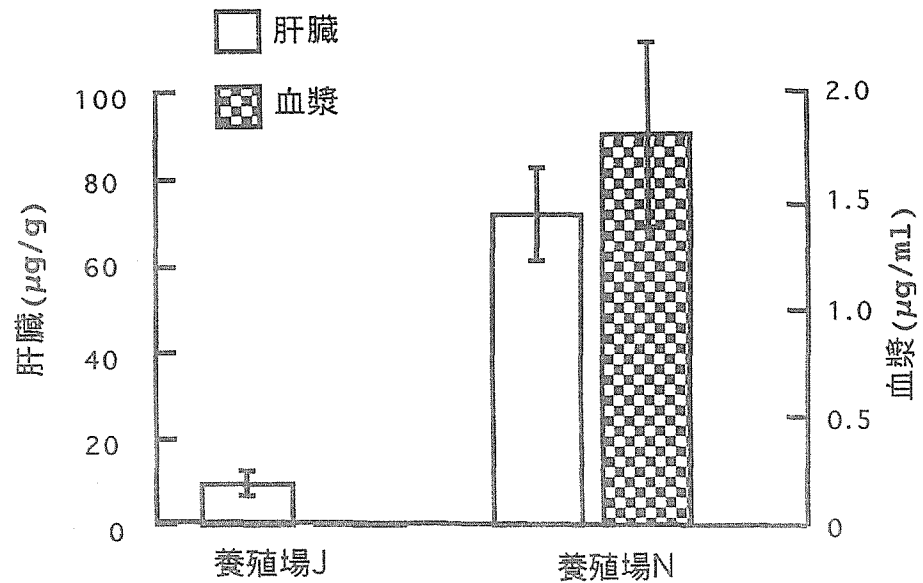


図 2 黄疸発症 (養殖場 J) および未発症 (養殖場 N) プリのアスコルビン酸含量

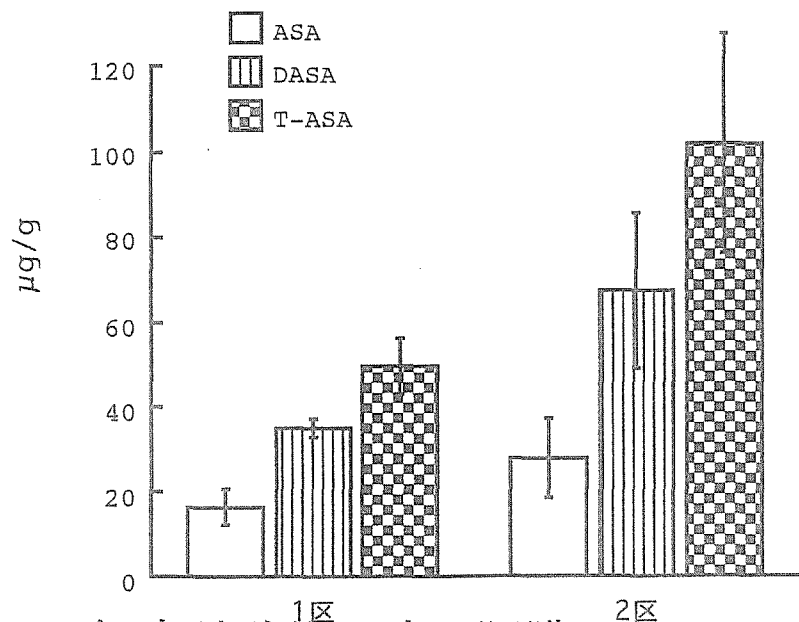


図 3. 飼育試験終了時の肝臓アスコルビン酸含量

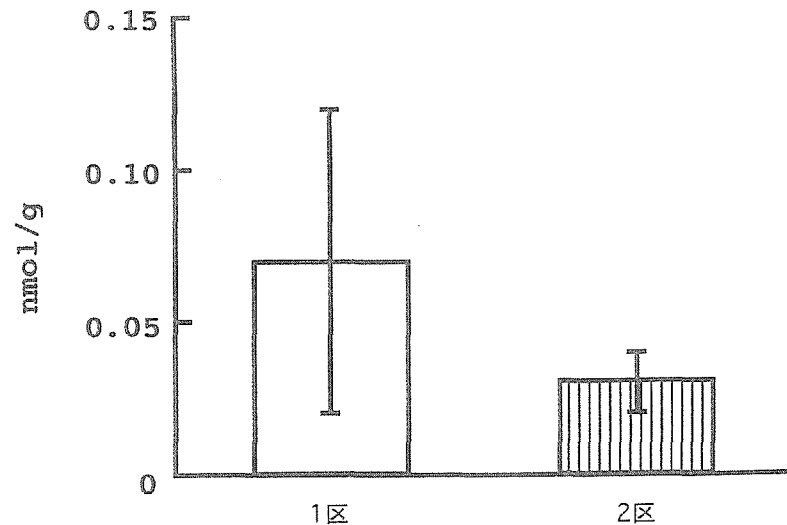


図 4. 飼育終了時の肝臓 PCOOH 含量

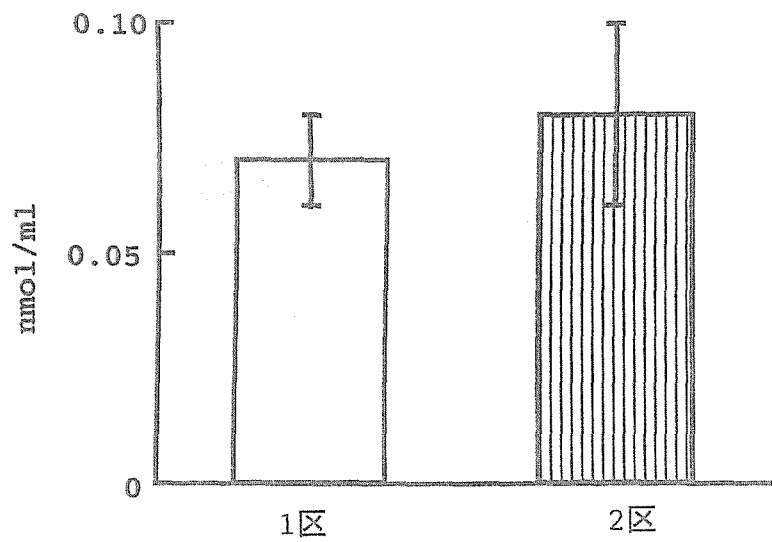


図 5. 飼育終了時の血漿PCOOH含量

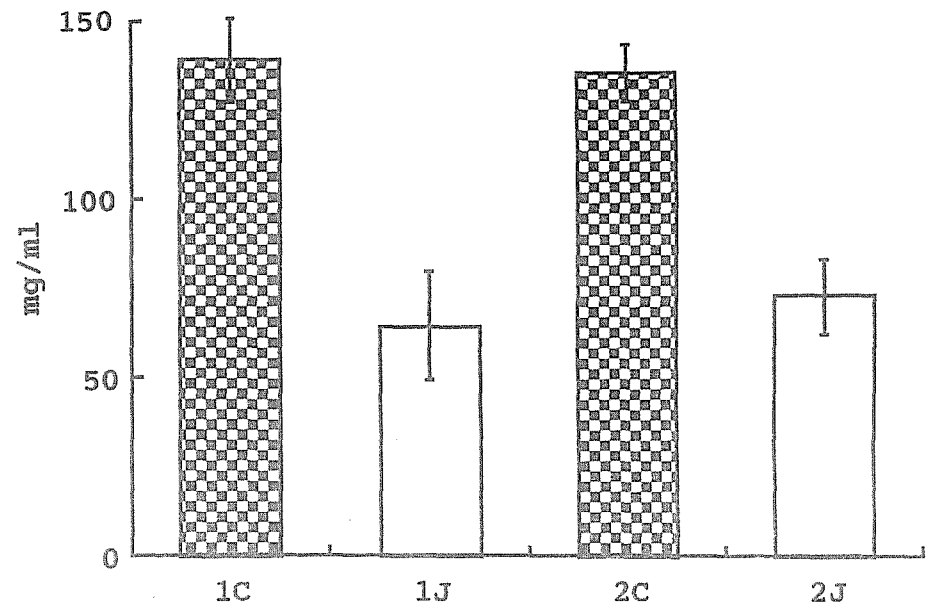


図 6. 黄痘菌接種後5日目のヘモグロビン含量の変動

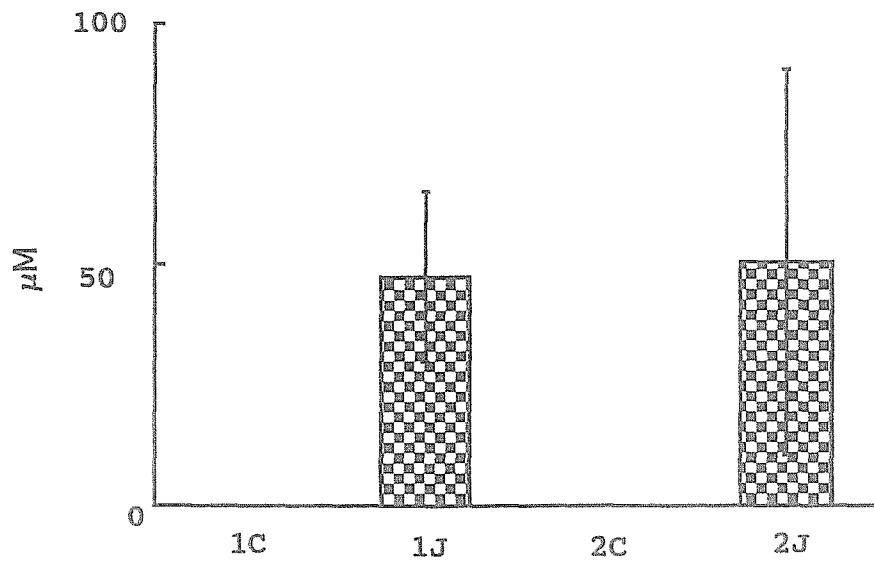


図 7. 黄痘菌接種後5日目の血漿ビリルビン含量

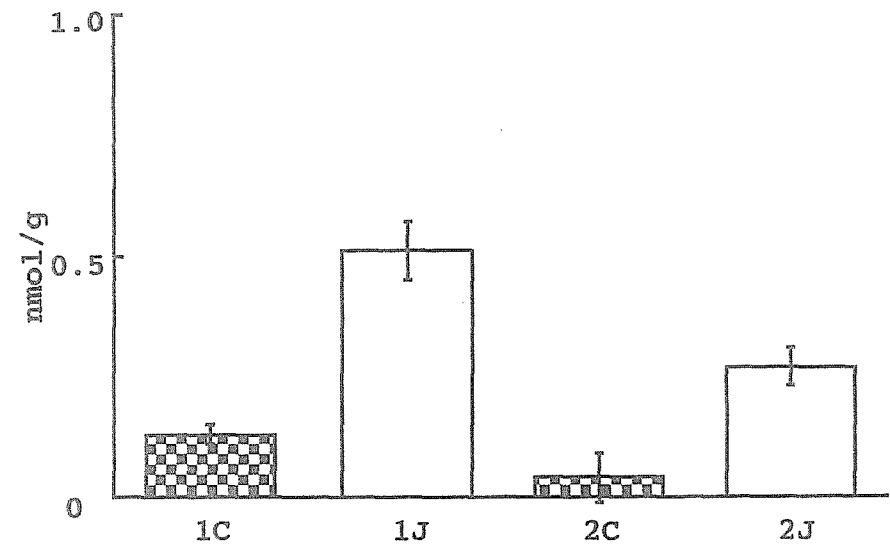


図 8. 黄痘菌接種後5日目の肝臓PCOOH含量

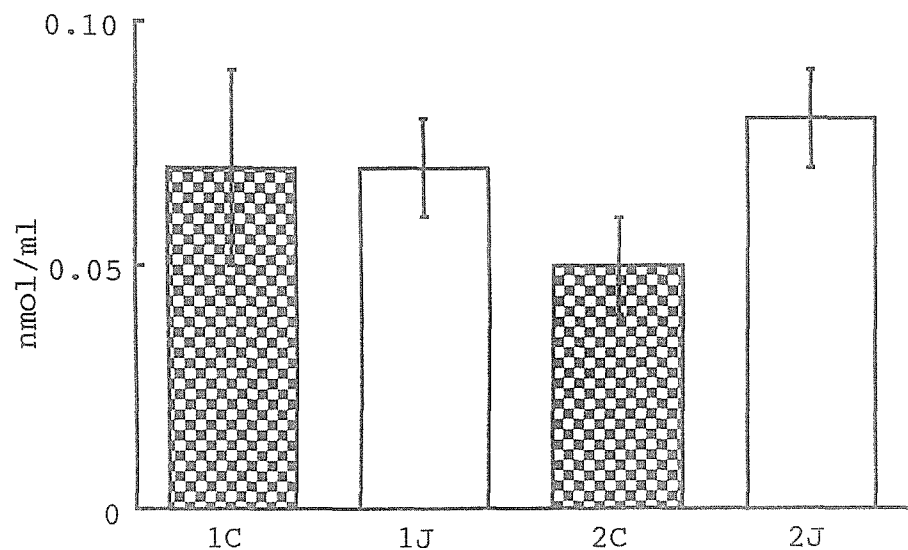


図 9. 黄疽菌接種後5日目の血漿PCOOH含量

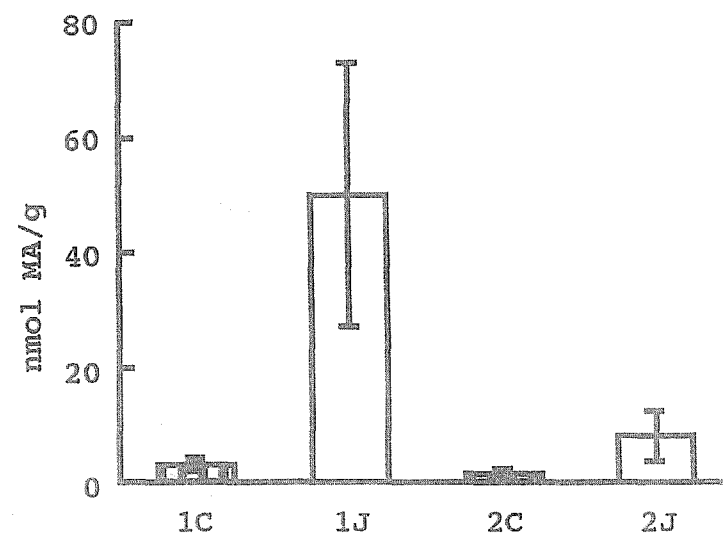


図 10. 黄疽菌接種後5日目の肝臓TBARS値

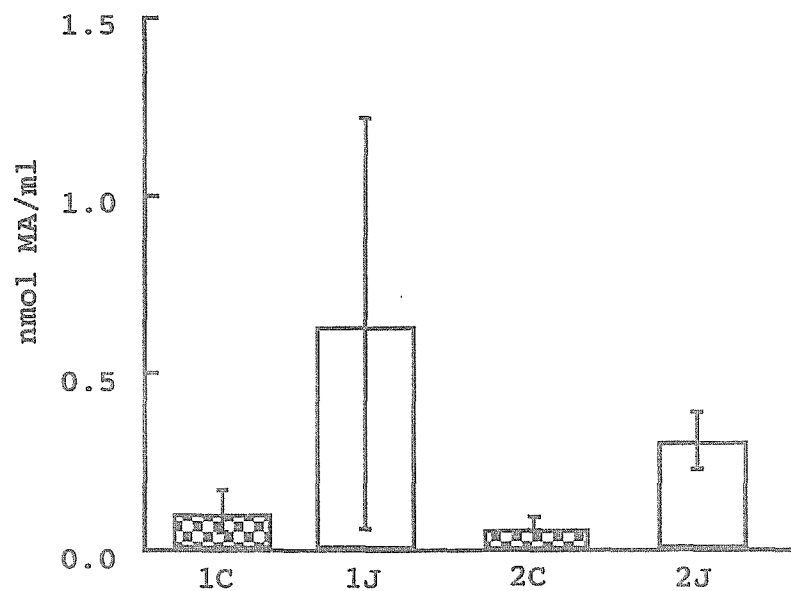


図 11 黄疽菌接種後5日目の血漿TBARS値

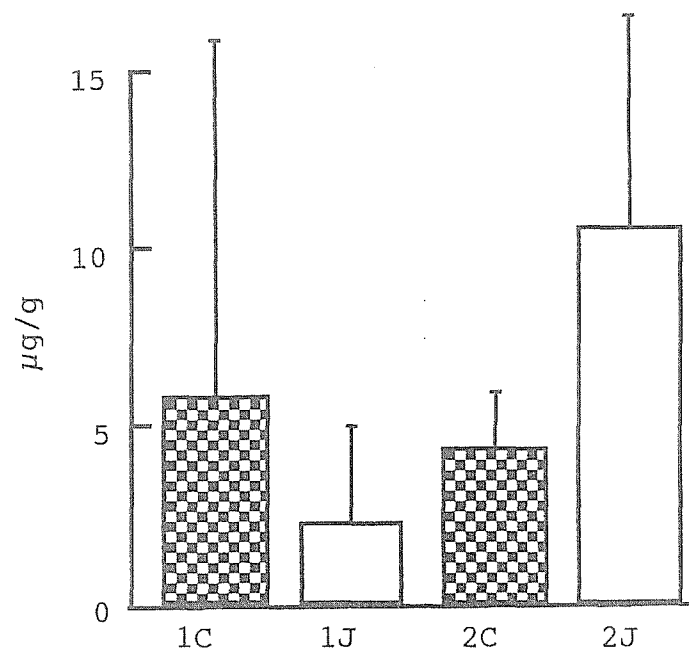


図 12. 黄疽菌接種後5日目の肝臓還元型アスコルビ

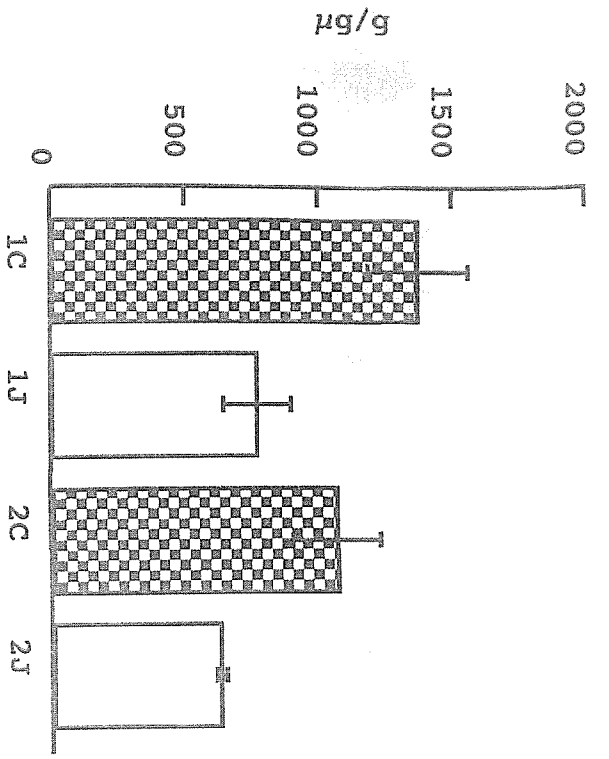


図 1.3. 黄疽菌接種後5日目の肝臓α-トコフェロール含量

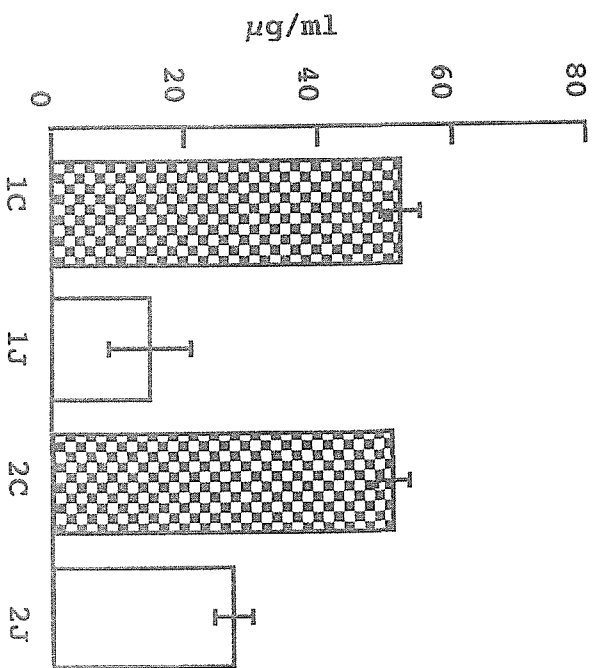


図 1.4. 黄疽菌接種後5日目の血漿のα-トコフェロール含量