

ギンザケの生体内脂質過酸化とEIBS感染の関係

Erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS)はサケ科魚類にとって深刻なウイルス感染症として知られている。¹⁻⁴⁾この疾病は日本のギンザケ養殖業に多大な経済的損害を与えている。⁵⁾ウイルス感染に起因する溶血が重篤な貧血を引き起こす。^{2, 5)}筆者らはEIBSは高ビリルビン血症を引き起こすこと、赤血球中の抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)活性が高くなることから生体内脂質過酸化の進行と発症との関係があること、血漿中の胆汁酸やカロチノイド色素量から胆汁色素排泄障害が発症原因である等を報告した。⁶⁾今回その発症を予防するための基礎研究として、EIBSウイルスによる人為的感染実験を行った。

方法

感染実験 平均体重20 g前後のギンザケを実験に用いた。EIBSウイルスを感染させた後、1週間間隔で5尾を取り上げ、採血を行った。試験は5週間行った。

血液性状の測定 ヘマトクリット値はIkeda et al.の方法で分析した⁷⁾。血液塗沫標本は乾燥させた後、メタノールで5分間固定後、ギムザ、塩化ピナシアノールまたはアクライドオレンジで染色した。⁸⁾各血液塗沫標本30の顕微鏡視野を観察し、サブステージを含む5ステージに分類した。⁴⁾

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ELAISA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、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 μM で示した。

2-チオバルビツール酸 (TBARS) 値の測定 ギンザケ肝臓中のTBARS値はSuda et al.のHPLC法で測定し、pico molマロンアルデヒド/g 試料で示した。¹⁰⁾

脂肪酸の測定 肝臓中の脂肪酸はFolch *et al.*の方法で抽出した。¹¹⁾脂肪酸組成についてはYamauchi *et al.*¹²⁾のガスクロマトグラフィーにより分析した。

結果と考察

表1に感染試験結果を示した。試験期間中における試験区および攻撃区間に体重の差は認められなかった。感染の様子を見ると、感染後2週目から感染赤血球が出現し、5週目には感染赤血球は出現しなかった。ヘマトクリット値に関しては、感染試験開始後4週目が最も低く、5週目には回復に向かっていった。

表1. EIBS感染実験結果

	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目
体重(g)					
対照区	19.4±3.1 ^{*1}	20.0±2.9	19.1±3.9	17.8±3.7	21.0±4.1
攻撃区	20.7±2.8	19.2±3.8	18.9±3.3	18.2±3.2	21.1±3.4
感染率 ^{*2}					
対照区	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
攻撃区	0/10	8/10	6/10	0/10	0/10
ヘマトクリット(%)					
対照区	32.9±2.9	29.5±2.4	28.9±1.6	32.0±2.0	30.1±2.9
攻撃区	30.7±3.1	27.2±3.6	24.8±1.0	20.6±1.7	23.9±2.3

^{*1}平均値±標準偏差

^{*2}ウイルスの感染した赤血球の出現率

表2に血漿中のビリルビン含量の変動を示した。この表から明らかなようにウイルス感染後1週目から血漿中にビリルビンが現れ、高ビリルビン血症の症状を示した。しかしながら、感染後4週目には検出限界以下になった。

表2. 血漿ビリルビン含量の変動

	1週目	2週目	3週目	4週目	5週目
ビリルビン(μM)					
対照区	nd	0.18±0.10 ^{*1}	nd	nd	nd
攻撃区	0.19±0.11	1.41±0.72	0.40±0.56	nd	nd

nd<0.1μM

^{*1}平均値±標準偏差

表3にEIBS感染後の肝臓中のTBARS値を示した。この表から明らかなように、感染試験3週目に肝臓中のTBARS値は低下していた。このことは、おそらく、溶血により生じたヘムが

ビリルビンになりそのビリルビンの抗酸化作用によるものではないかと思われる。

表 3. 肝臓TBARS値の変動

週	0	1	2	3	4	5
対照区	310.5±27.2* ¹	224.1±34.0	351.6±47.9	274.5±59.5	356.9±48.2	301.8±23.1
攻撃区		217.7±5.2	353.9±26.8	210.8±21.1	306.4±40.1	241.2±31.3

*¹平均値±標準誤差

表 4 に肝臓中の脂肪酸組成の変動を示した。感染 3 および 4 週目に 22:6n-3 (ドコサヘキサエン酸) が減少している。このことは、ウイルス感染により生体内脂質過酸化が進行し、その結果最も不飽和度の高い 22:6n-3 が減少したものと考えられる。

以上の結果をまとめると、EIBS の感染症は 4 週目から幼弱赤血球が出現し始めたことより、5 週目からは回復期に入ったことになる。Takahashi et al.^{4, 5} の実験結果と比較すると、回復期にはいるのがやや早く、Ht 値も極端に (10% 以下) に低下することなく、病状は比較的軽度に行進したものである。この結果は、魚の成長速度が遅かった (摂餌が充分でなかった) ことが原因と思われる。本実験結果は本症の病状の悪化に脂質過酸化が関係している事を強く示唆している。さらに、脂質過酸化を起こしやすい条件下 (例えば低分子の抗酸化物質である α -トコフェロールやアスコルビン酸欠乏餌料で飼育するなど) で感染させる等の実験を行う必要がある。

文献

- 1) S. L. Leek: Viral erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS) occurring the juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytsca*) reared in freshwater. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **44**, 685-688 (1987).
- 2) S. C. Piacentini and J. S. Rohovec: Acridine orange as a differential stain for blood cell viruses. *AFS Fish Health Sec. Newsl*, **17(1)**, 6 (1989).
- 3) T. Lunder, K. Thoruod, T. T. Poppe, R. A. Holt, and J. S. Rohovec: Particles similar to the virus of erythrocytic inclusion body syndrome, EIBS, detected in Atlantic salmon (*Salmo salar*)

- in Norway. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.*, **10**, 21-23 (1990).
- 4) K. Takahashi, N. Okamoto, M. Maita, J. S. Rohovec, and Y. Ikeda: Progression of erythrocytic inclusion body syndrome in artificially infected coho salmon. *Gyobyou Kenkyu*, **27**, 89-95 (1992).
- 5) K. Takahashi, N. Okamoto, A. Kumagai., M. Maita, Y. Ikeda, and J. S. Rohovec: Epizootics of erythrocytic inclusion body syndrome in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, cultured in sea water in Japan. *J. Aquat. Anim. Health*, **4**, 174-181 (1992).
- 6) 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).
- 7) Y. Ikeda, N. Okamoto, and M. Machida: A field method for determining hematocrits with a microcentrifuge. *Prog. Fish-Cult.*, **54**, 111-114 (1992).
- 8) W. T. Yasutake: Standardization of stain used for diagnosing erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS). *AFS Fish Health Sec. Newsl*, **15**(2), 7 (1989).
- 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) I. Suda, S. Furuta, and Y. Nishiba: Fluorometric determination of a 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid-malonaldialdehyde adduct as an index of lipid peroxidation in plant materials. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 14-17 (1994).
- 11) J. Folch, M. Lefes, and G. H. Sloane Stanley: A simple

method for the isolations and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509 (1957).

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).

