養殖ブリにおける細菌性溶血性黄疸の発症機構とその予防に関する研究

伊東良史

2001

①

養殖ブリにおける細菌性溶血性黄疸の発症機構とその予防に関する研究

Studies on the development mechanism of bacterial hemolytic jaundice in cultured yellowtail and its prevention

伊東尚史

2001

Abstract

Sorimachi *et al.* has reported that jaundice found in cultured yellowtail *Seriola quinqueradiata* is bacterial hemolytic jaundice. They observed that jaundice occurred when yellowtail were injected with bacteria obtained from fish suffering from the disease. On the other hand, Sakai *et al.* concluded that jaundice in yellowtail is caused by *in vivo* lipid peroxidation associated with oxidative stress because they observed a decrease of α-tocopherol (α-Toc) and ascorbic acid (AsA) contents and an increase of 2-thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) values in the jaundice fish. However, both these studies did not explain the mechanism of the development of jaundice. Therefore, following experiments were carried out in order to establish the mechanism of the development of jaundice in yellowtail and to elucidate the relationship between bacterial infection and oxidative stress. I also examined whether a supplement of antioxidants such as α-Toc or AsA in the diets may prevent the progress of jaundice in yellowtail.

In order to elucidate the relationship between *in vivo* oxidative stress and jaundice, phenylhydrazine, a radical generator which induces hemolysis and enhances oxidative stress, was injected into the yellowtail. As a result, liver heme oxygenase (HO) m-RNA and plasma bilirubin increased in the treated fish. This proved that the enhancement of *in vivo* oxidative stress has brought about the induction of HO, which generates an excessive amount of bilirubin leading to jaundice. To verify whether oxidative stress increases in fish suffering from the bacterial jaundice, fish were injected with the causative bacteria and the liver triglyceride hydroperoxide (TGOOH) and phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH) contents were measured as indices of oxidative stress. TGOOH and PCOOH contents increased in the diseased fish indicating the enhancement of oxidative stress. These results indicated that jaundice in yellowtail was caused by the hemolytic bacteria through hemolysis. Hemolysis induces the enhancement of *in vivo* oxidative stress and the induction of liver HO, which generates excessive bilirubin.

Based on these results, I examined whether a supplement of α-Toc or AsA in the diet could suppress oxidative stress and prevent jaundice or reduce its severity in yellowtail. First, jaundice-causing bacteria were injected into fish fed on a high α-Toc diet (88mg/100g diet). The group fed with high α-Toc resulted in higher mortality by jaundice and more serious contraction of jaundice than the control group. Next, jaundice-causing bacteria were injected into fish fed on a high AsA diet (2094mg/100g diet). The fish fed on high AsA diet showed a reduction of plasma bilirubin contents indicating that high AsA supplementation had decreased the *in vivo* oxidative stress and lessened the severity of jaundice in yellowtail.

要旨

養殖ブリの黄疸について，反町らは，黄疸発症魚から分離した細菌を健康魚に接種することにより溶血と併せて黄疸が発症することから，ブリの黄疸は細菌性溶血性黄疸であると報告している。しかし，原因菌の感染による溶血がどのようにビリルビン生成に係わっているかについて触れられていない。一方，境らは，高ビリルビン血症を呈したブリにおいて組織中のα-トコフェロール(α-Toc)およびアスコルビン酸(AsA)含量は低く，2-チオバルビツール酸反応物質(TBARS)値が極めて高いことから，黄疸発症には生体内脂質過酸化の進行が関与していると報告している。しかしこの研究においても，黄疸の発症機構の解明までには至っていない。そこで本研究は，ブリの細菌性溶血性黄疸の発症における細菌感染と酸素ストレスとの関連を明らかにし，さらにこの結果に基づき抗酸化剤添加飼料を給与し，魚体内の酸素ストレスを抑える飼育管理方法によって黄疸を予防できるかどうか検討した。

まず，酸素ストレスがブリの黄疸発症にどのように関与しているかを明らかにするため，ラジカル発生剤のフェニルヒドラジンをブリに投与した。その結果，ブリのヘモグロビン含量の著しい減少と著しい溶血が起こり，酸素ストレスが高まった。さらに，肝臓ヘムオキシゲナーゼ(HO)m-RNAが増加し，高ビリルビン血症となった。すなわち，ブリ体内の酸素ストレスの増加はHOを誘導し，ビリルビンを過剰に生成し，黄疸を引き起こした。次ぎに，原因菌感染によるブリ黄疸の発症時の酸素ストレスの増加を明らかにするため，原因菌をブリの腹腔内に接種し，肝臓トリグリセリドヒドロペルオキシド(TGOOH)およびフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)含量を調べた。その結果，黄疸発症魚の肝臓TGOOHおよびPCOOHが顕著に増加し，活性酸素の増加を認めた。これらのことから，ブリの細菌性溶血性黄疸は原因菌による溶血により酸素ストレスが増加し，併せて肝臓HOが誘導された結果，過剰にビリルビンが生成され発症すると考えられた。

これらの結果をふまえ，魚体内の酸素ストレスを抑えるために抗酸化剤添加飼料を給与する飼育管理方法によってブリの黄疸を予防できるかどうか検討した。その結果，高α-Toc飼料（88mg/100ｇ飼料）を46日間給与したブリに，黄疸原因菌を接種すると，対照区（12mg/100ｇ飼料）と比べ死亡数が多く，より重篤な黄疸を発症した。しかしながら，AsAを100ｇ飼料当たり2094mgを添加した飼料で5日間飼育したブリに原因菌を接種した結果，対照区と比べ，黄疸の発症は抑制された。すなわち，酸素ストレスを抑制する飼育管理方法によって，ブリの細菌性溶血性黄疸を軽減できた。

目　次

Abstract …… i
要旨 …… ii
目次 …… iii
緒　言 …… 1

第１章　ブリの細菌性溶血性黄疸の発症機構 …… 8
第１節　フェニルヒドラジン投与による黄疸発症と酸素ストレスとの関係 …… 9
第２節　原因菌接種による黄疸発症と酸素ストレスとの関係 …… 26
第３節　原因菌接種によるブリ肝臓トリグリセリドヒドロペルオキシド量の増加 …… 39

第２章　酸素ストレス抑制飼育管理方法によるブリの細菌性溶血性黄疸の予防 …… 45
第１節　高α-トコフェロール飼料給与による黄疸抑制効果 …… 46
第２節　高アスコルビン酸飼料給与による黄疸の軽減 …… 61
総括 …… 75
謝辞 …… 82
文献 …… 84

緒　言

近年水産業は食料不足に対応する食料産業として世界的脚光を浴びており，また日本人にとっては魚食文化を継承する産業としても重要である。我が国においては，水産天然資源の減少の解決と消費者のニーズに応えるため，捕る漁業からつくり育てる漁業へをキャッチフレーズに増養殖事業の発展に力を注いできた。その結果，養殖業は飛躍的に発展し，平成10年には海面における生産量の約15%を占め，我が国周辺水域の資源水準が低迷する中にあって，特に中高級魚介類の供給面において重要な役割を果たしている。[1]しかし，魚類養殖業は，過密養殖，魚病の発生，養殖場の環境劣化等の課題を抱えており，見通しは必ずしも明るくない。実際，平成10年には14万6千トンを生産し，生産量で海面魚類養殖の55%を占め飛び抜けた存在となっているブリの養殖において，施設面積に対する収穫量が昭和62年は46kg/m²であったのに対し，平成9年には62kg/m²へと上昇し，過密養殖の傾向にある。また魚病に関しても，ブリ養殖については細菌性疾病である連鎖球菌症や類結節症，ウイルス性疾病であるイリドウイルス症など数多くの感染症が発生している。

養殖ブリの黄疸は1980年後半から西日本のブリ養殖場において発症し，体色の黄化を最も特徴的な外観症状とする疾病である。また，この疾病は当初，養殖現場では主に1才魚に多く発症することから，養殖業者に与える経済的ダメージが大きく，原因の解明とその対策が求められてきた。しかしながら，現在のところ，その発症機構は必ずしも十分な解明がなされておらず，したがって有効な予防策は講じられずにいた。

本研究は，養殖ブリの黄疸についてその発症機構を解明し，さらに予防法を確立することを目的としている。

養殖ブリの黄疸の原因に関して，反町らは黄疸症状を呈したブリの血液中に分類学上未同定の細菌を発見し，その原因菌を健全なブリに感染させた。その結果，健全なブリは著しい溶血と黄疸の発症を示した。よって，養殖ブリの黄疸は細菌感染が原因であると報告した。[2,3]前野らは実験的に黄疸原因菌を接種したブリの血液性状および病理組織を調べた結果，非感染魚と比べ，ヘマトクリット値と血液ヘモグロビン含量の低下および血漿ビリルビン量の増加と併せて，脾臓における貧血と血球の溶血像を認めた。[4]さらに，彼らは養殖場にて黄疸を発症したブリの病理組織像についても調べ，肝細胞の壊死，腎臓の尿細管上皮の硝子滴変性と壊死および間質組織の壊死，脾臓髄質部の壊死および貧血を認めた。これらのことより，前野らは養殖ブリの黄疸は原因菌の感染による溶血が最も特徴的な病態変化とし，本症を細菌性溶血性黄疸と呼称することを提案した。[4]

一方Sakai *et al.*は，高ビリルビン血症を呈した養殖ブリは，健常魚と比較し，肝臓および血漿の2-チオバルビツール酸反応物質(TBARS)値が高く，さらに抗酸化剤のα-トコフェロール含量が低いことから，ブリの黄疸発症に生体内脂質過酸化の進行が関与していると報告している。[5]さらに，彼らは発症魚の血漿中に非抱合および抱合ビリルビンの他に，ビリルビンの酸化生成物(Substance X)の存在を明らかにし，病魚が過酷な酸素ストレスを受けていると報告している。[6]しかしいずれにしてもその発症機構は明確になっていない，にもかかわらず二つの説があるた

め，混乱が生じている。そのため養殖現場では有効な予防および対策が講じられずにいる。

ヒトにおける高ビリルビン血症および黄疸の定義は以下の通りである。まず高ビリルビン血症とは，血液中のビリルビン含量が病的に高くなり1mg/dℓを越えた状態を指す。高ビリルビン血症は，正常肝が排出し得るビリルビン量よりも産出量のほうが多いか，あるいは産出量が正常でも障害を受けた肝臓がビリルビンを排出できないために起こる。肝臓の障害がなくても，肝臓の排出管が閉塞してビリルビンの排出が妨げられるときにも高ビリルビン血症が起こる。黄疸とは，このように高ビリルビン血症となり血液中のビリルビン濃度が2mg/dℓ以上になり皮膚，粘膜とくに眼球粘膜の黄染した状態をいう。[7)]

ビリルビンは老化赤血球の破壊により放出されたヘムの代謝産物である。[8)]すなわち，細網内皮系で破壊された赤血球中のヘモグロビンはヘムとグロビンに分解される。そのうちヘムがヘムオキシダーゼにより酸化されビリベルジンとなり，次いでビリベルジンリダクターゼの還元作用によりビリルビンとなる。細網内皮系で作られたビリルビンは非抱合型ビリルビンといわれ，血中ではアルブミンと結合して肝臓に運搬される。非抱合型ビリルビンは肝臓においてグルクロン酸と結合し抱合型ビリルビンとなり胆汁中に分泌され，胆管を通って十二指腸に排出される。[8)]ヒトの黄疸を臨床的に分類すると肝前性黄疸，肝性黄疸および肝後性黄疸の三つに大別される。[7)]すなわち，肝前性黄疸は，溶血などの赤血球破壊の亢進により過剰の非抱合型ビリルビンが生成されるため生じる。肝性黄疸は，肝細胞へのビリルビンの取り込み，グルクロン酸抱合，細

胞内移送および毛細胆管への排出のいずれかの障害により生じる。その例症としてウイルス性肝炎やアルコール性肝炎等の肝細胞性黄疸とGilbert病，Crigler-NajjarおよびDubin-Johnson症候群の体質性黄疸がある。肝細胞性黄疸の場合には抱合型および非抱合型ビリルビンのいずれもが増加する。体質性黄疸の場合には，血液中のビリルビンのタイプが異なり，Gilbert病およびCrigler-Najjar症候群では非抱合型ビリルビンが，Dubin-Johnson症候群では抱合型ビリルビンが増加する。肝後性黄疸は，胆石や胆道ガンによる胆汁うっ滞が原因となり，抱合型ビリルビンが増加する。

魚類の黄疸についてもヒトと同様に，黄疸とは高ビリルビン血症となり皮膚や粘膜が黄染した状態をいう。通常，ほとんどの魚種の血清中ににおいて，ビリルビンは検出されない。したがって，魚類については血清にビリルビンが検出されると病的な状態，すなわち高ビリルビン血症であると考えられる。多くの魚類ではビリベルジンリダクターゼ活性が低いため，[9]肝臓内の胆汁色素は抱合型ビリルビンのみではなくビリベルジン単独でも排出される。また，ビリルビン抱合体については，哺乳類がグルクロン酸抱合体として排泄するのに対し，ブリ等の魚類の多くは主にタウリン抱合体としてビリルビンを排泄する。[10]魚類のこれまでに報告されている黄疸または高ビリルビン血症については，ウナギ，[11]マダイ，[12]ギンザケ[13]，さらに本研究で取り上げるブリがある。ウナギの黄疸については，血漿ビリルビンのほとんどが抱合型ビリルビンであること，健常魚と比較し，血漿アルカリホォスファターゼ活性には差がなかったが，GOTおよびGPT活性が高かったことから，その原因は多機

能肝臓細胞の障害であると考えられている。[11]また，1才および2才魚の養殖マダイの高ビリルビン血症については，非抱合型ビリルビンが多いことが示されている。[12]さらに，赤血球封入体症候群（EIBS）ウイルスの感染により発症するギンザケについては肝機能の低下により胆汁色素の腸肝循環が低下し，胆汁の排出が滞るため高ビリルビン血症になる。[13]

下村は，養殖ブリの黄疸について，血漿中のビリルビンのタイプを調べ，さらに肝臓と脾臓の組織観察を行った。[14]その結果，組織学的には肝臓の血管炎，セルロイドの沈着，脾臓のヘモジデリンを観察し，溶血を確認した。しかし，胆管における塞栓物質は観察しておらず，胆汁うっ滞は認めていない。高ビリルビン血症の症例には抱合型ビリルビンを主とするタイプと非抱合型ビリルビンを主とするタイプの二つを認めたが，抱合型が主である高ビリルビン血症では，肝臓の壊死は少ないが，非抱合型を主とする高ビリルビン血症では肝臓の壊死の進行を観察している。すなわち，養殖ブリの高ビリルビン血症は，ヒトの肝前性黄疸のように溶血などにより過剰のビリルビンが生成されるため生じる場合と，肝性黄疸のように肝臓の障害により細胞内移送および毛細胆管へのビリルビンの排泄障害が生じ，発症する場合の二通りがあると示した。また，胆管には塞栓物質が見られなかったことから，養殖ブリの高ビリルビン血症は肝後性黄疸ではないと示した。下村のこれらの結果を考察すると，養殖ブリの黄疸発症に細菌による溶血以外の因子が係わっていると考えられる。

近年，哺乳類においてビリルビンは強力な抗酸化作用を有することが

認められている。[15-18]Stocker *et al.*は，細胞内酸素濃度に近い2%の酸素濃度であるリノール酸均一溶液において，生理的濃度の10μMのビリルビンはα-トコフェロールを凌ぐ抗酸化作用を示すと報告している。[15]さらに，Yamaguchi *et al.*は，エンドトキシンの接種により酸素ストレスが高まったODS-od/odラットにおいて，ビリルビンがアスコルビン酸と相互的な抗酸化剤として作用し，自らはbilirubin oxidative metabolites に変化すると報告している。[17]これらの報告により，哺乳類においてビリルビンは生体内の重要な抗酸化剤として評価されつつある。前述したように，黄疸を発症した魚類血漿中においてビリルビンの酸化生成物(Substance X)の存在が認められていることから，[6]魚類においてもビリルビンが抗酸化作用を果たしている可能性がある。

上記に述べたことを考慮し，ブリの黄疸の発症要因について考えると，以下のことが判明していない事柄である。すなわち，反町ら[2-4]の研究では，原因菌の感染で引き起こされる溶血により発症するブリの黄疸が，どのような代謝によって高ビリルビン血症となるのか不明である。また，一方Sakai *et al.*の研究[5,6]においても，ブリが生体内脂質過酸化の進行および酸素ストレスを受けると，なぜ黄疸の発症となるのか，明らかにされていない。

酸素分子の還元過程で発生するスーパーオキシド，過酸化水素，ヒドロキシラジカルおよび三重項酸素が励起してできる一重項酸素等の不安定な酸素を活性酸素種という。これら活性酸素は，好気生物の体内では常に生じており，生体が極度に活性酸素に曝される状態を酸素ストレスあるいは酸素毒という。活性酸素は脂質の過酸化，蛋白質の変性，酵素

の失活および核酸の分解等に強く関与することから種々の疾病，老化等の原因となる。生体内では脂質は最も活性酸素の作用を受けやすく，酸化されると容易に脂質ラジカルになり，脂質の過酸化が進行する（生体内脂質過酸化）。一方，好気生物は活性酸素を消去するシステムを備えている。この防御機構にはスーパーオキシドジスムターゼ，カタラーゼおよびグルタチオンペルオキシダーゼ等の酵素によるものとα-トコフェロール，アスコルビン酸，カロテノイドおよびグルタチン等の抗酸化物質によるものとの二つに大別される。生体内では通常，活性酸素の生成と消去機能はバランスが保たれている。しかし，そのバランスが崩れると生体内脂質過酸化が進行し，酸素ストレスの高い状態となる。[19-22)]

哺乳類において，酸素ストレスの増加は，ビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ(EC 1.14.99.3)を誘導する。[17, 23-25)]すなわち，酸素ストレスと黄疸発症との間に強い係わりが認められている。

そこで著者は，反町らおよび境らの研究結果をふまえ，魚類においても酸素ストレスの増加が黄疸発症の要因となっているのではないと考え，酸素ストレスと細菌性溶血性黄疸との関係を明らかにすると共に，その結果に基づき，抗酸化剤を添加した飼料を給与し，酸素ストレスを抑制する飼育管理方法によってブリの黄疸を予防できるかどうか検討した。

第１章
ブリの細菌性溶血性黄疸の発症機構

第１節　フェニルヒドラジン投与による黄疸発症と酸素ストレスとの関係

養殖ブリの黄疸は原因菌による感染がその原因とされている。[2]しかしSakai *et al*.は，養殖場で黄疸を発症しているブリの肝臓および筋肉におけるTBARS値の上昇とα-トコフェロール含量の低下を認めた。[5]さらに，その血漿にはビリルビンの酸化生成物であるSubstance Xが存在した。[6]哺乳類において，Substance Xはエンドトキシン投与等により生体に酸素ストレスが生じた際生成されることが認められていることから，[17, 26]黄疸発症ブリにおけるSubstance Xの存在は，ブリ体内に高い酸素ストレスが生じていると考えられる。また著者は，予備実験としてブリに過酸化脂質を給与し，生体内脂質過酸化を進行させたブリに黄疸発症魚の血液を接種したところ，生体内脂質過酸化が進行したブリは，対照魚に比べ，血液中の黄疸原因菌数は少なかったにもかかわらず，黄疸症状はより進行していた。すなわち，養殖ブリの黄疸発症には原因菌の感染だけでなく，魚体内の酸素ストレスの程度が症状を左右すると示唆された。

そこで，ブリの黄疸発症と酸素ストレスとの関係をより明確にするには，原因菌の感染が関与しないで，体内の酸素ストレスの増加のみが黄疸の発症に関与することを明らかにすることが重要と考えた。そこで，ラジカル発生剤であるフェニルヒドラジンをブリに接種し黄疸発症について調べた。さらに，酸素ストレスが増加した哺乳類において，ビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ(EC

1.14.99.3.)が誘導されることから，[17, 23-25]ブリ肝臓ヘムオキシゲナーゼのmRNA量を併せて調べた。

実験方法

供試魚および飼育方法

供試魚には，宮崎県水産試験場の海面小割生け簀（2×2×2m）において，シングルモイスト飼料を給与し，飼育した平均体重1.3kgのブリ*Seriola quinqueradiata*を用いた。この供試魚を宮崎県水産試験場内の1.5トンFRP水槽に収容し，Table 1-1に示すシングルモイスト飼料を1日1回飽食するまで与え，2週間予備飼育した。

フェニルヒドラジン投与試験

予備飼育終了後，フェニルヒドラジン水溶液をブリの背側筋肉部に体重kg当たり17mgを接種した。投与0，5，10，24および48時間後に取り上げ，採血後，肝臓および脾臓を採取した。なお，フェニルヒドラジン投与試験中の水温，溶存酸素量および海水塩分量は，それぞれ22.2-22.4℃，5.44-5.76mℓ/ℓおよび34.7-35.0‰であった。

血液ヘモグロビン測定法

Kawatsuのシアンメトヘモグロビン法により測定し，mg/mℓで示した。[27]

脾臓の病理組織学的検査法

供試魚の脾臓を取り出し，10%緩衝ホルマリンで固定し，常法に従いパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色お

よびBerlin blue(BB)染色を施し，光学顕微鏡下で観察を行った。

Table 1-1. Composition of the experimental diet for yellowtail (%)

Ingredient	
Brown fish meal	65
Active wheat gluten	10
White dextrin	6.5
Vitamin mixture (TH-4 *1)	3
Mineral mixture (T-4 *2)	2
Mineral mixture (O-1 *3)	0.5
CMC	2
Cellulose	2
Sardine oil	9
Water	50

*1; contained 675,000 IU vitamin A, 60,000 IU vitamin D3, 4.0g DL-α-tocopherol acetate, 2.56716g menadione sodium hydrogen sulfite,0.8g thiamine nitrate, 1.467g riboflavin, 0.8g pyridoxine hydrochloride, 2.38g nicotinamide, 2.38051g pantothenic acid, 4.667g calucium salts,194.7g choline chloride, 0.8g folic acid, 0.01067g cyanocobalamine, 0.04667g D-biotin, 56.34g inositol, 31.3g L-ascorbic acid, 476.27g cellulose per kg of vitamin mixture.

*2; contained 206g KH_2PO_4, 141g $Ca(CH_3CHOHCOO)_2 \cdot 5H_2O$, 83g iron proteinate, 309g $Ca_2H_2PO_4$, 261g cellulose per kg of mineral mixture.

*3; contained 12.5g $MgSO_4$, 0.1g $CoCl_2$, 4g $CuSO_4$, 19.97g $ZnSO_4$, 0.3g KIO_3, 900g dextrin, 63.13g cellulose per kg of mineral mixture.

2-チオバルビツール酸反応物質(TBARS)値測定法

血漿中のTBARS値は，血漿0.3mℓに対し1mgのブチルハイドロキシトルエン(BHT)を加えた後，島崎の比色法で測定し，nmolマロンアルデヒド(MA)/mℓで示した。[28)]

α-トコフェロール測定法

血漿α-トコフェロールの定量は，Yamauchi *et al.*のHPLC法によっておこなった。[29)]すなわち，試料をけん化後，不けん化物をn-ヘキサンで抽出し，n-ヘキサン：イソプロピルアルコール(200:1, v / v)を移動相とするHPLC法によって定量し，値はμg/mℓで示した。カラムは，Zorbox BP-NH_2, 検出器には，蛍光光度計(励起波長：295nm,蛍光波長：325nm)をそれぞれ用いた。また，内部標準物質として2,2,5,7,8-ペンタメチル-6-ヒドロキシクロマンを用いた。

アスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸定量法

血漿アスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸の定量は，Ito *et al.*[30)]のHPLC同時定量法を用いた。すなわち，血漿については10%メタリン酸溶液で抽出したアスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸を，シュウ酸を移動相とするHPLC法によって定量した。反応液として50mM $NaBH_4$含有100mM NaOH溶液を用い，カラムにはShim-pack SCR-101H（7.9×300mm，島津製作所（株）製），検出器にはUV検出器(300nm)を，それぞれ用い，値はμg/mℓで示した。

ビリルビン測定法

Izumi *et al.*[31)]の抗原抗体反応を利用したELISA（酵素抗体）法により測定した。すなわち，血漿にビリルビンの単クローン抗体である

24G7を，予想されるビリルビン量よりも過剰に加えた。次いで標識抗原のビリルビン human serum albumin(HSA)を加え，余剰の24G7とビリルビンHSAとの複合体を作った。さらに，その複合体に二次抗体を付着させ，併せて発色基質により発色した度合を425nmの波長で測定した。試料の希釈系よりビリルビン量を算出し，その値はμMで示した。

ヘムオキシゲナーゼmRNA測定法

Thomasの方法に準じて行った。[32]すなわち，肝臓から抽出したRNAよりオリゴ-TTカラムにてmRNAを分離した。分離したmRNAとヘムオキシゲナーゼ cDNAとのドットブロットハイブリダイゼーションを行い，メンブランを洗浄後，オートラジオグラフィーを行った。なお，mRNA量は試験開始時の値を1とした相対値で示した。

統計処理

各区3尾の供試魚を個体別に分析し，分析値は平均値±標準偏差で示し，Duncanのマルチプルレンジテスト（新多重範囲検定法）により統計処理した。[33]なお，ヘムオキシゲナーゼmRNAの測定については，各区3個体分をプールし，分析に供した。

結果

比肝重値，比脾臓重値および血液ヘモグロビン量の変動

比肝重値，比脾臓重値および血液ヘモグロビン量をTable 1-2に示す。

Table 1-2. Hepatosomatic and spleensomatic indices of yellowtail administered phenylhydrazine and their hemoglobin levels

Time	Hepatosomatic index		Spleensomotic index		Hemoglobin(mg/ml)	
(hours)	Control	PH[*1]	Control	PH	Control	PH
0	0.75±0.02[ab*2]	-	0.11±0.01[a]	-	114±10[a]	-
5	0.77±0.06[ab]	0.76±0.11[ab]	0.11±0.02[a]	1.02±0.32[b]	91±5.6[ac]	58±20[bd]
10	0.87±0.10[ac]	0.75±0.04[ab]	0.25±0.11[ac]	1.00±0.07[b]	101±9.8[ae]	41±2.5[b]
24	0.80±0.06[ab]	0.91±0.12[ac]	0.16±0.01[ac]	0.76±0.07[b]	84±14[cde]	68±7.3[cd]
48	0.66±0.05[b]	1.01±0.03[c]	0.25±0.04[ac]	0.44±0.13[c]	93±7.7[ac]	71±31[cd]

[*1] Yellowtail adminestrated phenylhydrazine.

[*2] Values are mean ± standard deviation for 3 fish. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$).

比肝重値は，フェニルヒドラジン投与10時間後までは対照区のそれと比べて差はなかったが，投与24時間後では肝臓が増大し始め，投与48時間後には対照区と比べて有意に高かった。比脾臓重値は，投与5，10，24時間後のいずれも対照区の値より有意に高くなった。血液ヘモグロビン量は，対照区では試験期間を通して84～114mg/mℓの範囲にあり，正常であった。これに対し，投与区の値は，5時間後に58±20mg/mℓ，10時間後に41±2.5mg/mℓと，それぞれ対照区の値と比べて有意に低かった。投与24および48時間後の血液ヘモグロビン量は，それぞれ68±7.3および71±31mg/mℓであり，回復傾向を示した。

脾臓の病理組織像

フェニルヒドラジン投与魚の脾臓の組織像をFig. 1-1に示す。フェニルヒドラジン投与魚の脾臓にはBB染色により青に染まるヘモジデリンの顆粒が観察され，溶血が確認された。

血漿TBARS値の変動

血漿TBARS値をTable 1-3に示す。対照区の血漿TBARS値は，48時間の試験期間を通して3.8～8.7nmolMA/mℓであった。他方，フェニルヒドラジン投与区では，5，10，24および48時間後の値は，それぞれ11±1.8，18±3.0，33±1.9および42±14nmolMA/mℓであり，フェニルヒドラジンによる血漿TBARS値の著しい上昇が認められた。この結果は，フェニルヒドラジン投与によるブリ血漿の脂質過酸化の進行を示唆している。

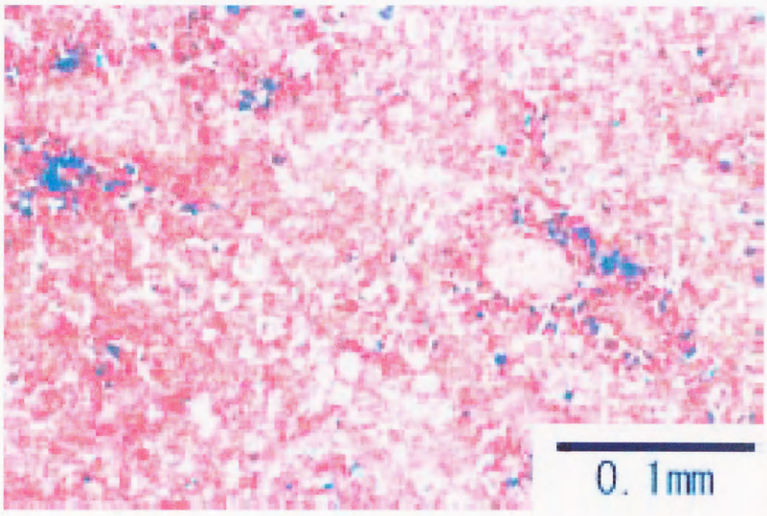


Fig. 1-1. Histopathological appearance of the spleen in yellowtail administrated phenylhydrazine.

Table 1-3. Plasma 2-thiobarubituric acid reactive substance(TBARS) values in yellowtail administrated phenylhydrazine

Time (hours)	TBARS (nmolMA/ml)	
	Control	PH
0	3.8±0.17[a]	-
5	6.0±1.1[a]	11±1.8[ab]
10	4.5±0.32[a]	18±3.0[b]
24	8.7±1.1[a]	33±1.9[c]
48	8.7±1.1[a]	42±14[c]

Values are mean ± standard deviation for 3 fish. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$).

血漿α-トコフェロール，アスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸量の変動

血漿α-トコフェロール，アスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸量をTable 1-4に示す。フェニルヒドラジン投与区の血漿α-トコフェロール量は，対照区と比較し，5，10および48時間後に有意に低かった。血漿アスコルビン酸量も，α-トコフェロールと同様に，フェニルヒドラジンにより有意に減少した。これに対し，血漿デヒドロアスコルビン酸量は投与24および48時間後に，対照区と比べ，逆に有意に増加した。すなわち，フェニルヒドラジンによるアスコルビン酸のデヒドロアスコルビン酸への酸化が示唆された。

血漿ビリルビン量の変動

血漿ビリルビン量をFig. 1-2に示す。血漿ビリルビン量は，対照区では試験期間を通して検出限界（0.05μM）以下であった。これに対し，フェニルヒドラジン投与5，10，24および48時間後のビリルビン量は，それぞれ0.04±0.06，0.22±0.06，0.84±0.05および2.95±2.17μMとなり，ブリの高ビリルビン血症が認められた。

肝臓ヘムオキシゲナーゼmRNA量の変動

肝臓ヘムオキシゲナーゼmRNA量をFig. 1-3に示す。値は，試験開始時の値を1とした相対値で示した。フェニルヒドラジンによる肝臓ヘムオキシゲナーゼmRNAの増加は，投与10時間後で最も顕著となり，対照区の2.3倍であった。すなわち，肝臓におけるフェニルヒドラジン投与によるヘムオキシゲナーゼの誘導が認められた。

Table 1-4. Plasma α-tocopherol, ascorbic acid, and dehydroascorbic acid levels in yellowtail administrated phenylhydrazine

Time	α–Tocopherol(μg/ml)		Ascorbic acid(μg/ml)		Dehydroascorbic acid(μg/ml)	
(hours)	Control	PH	Control	PH	Control	PH
0	42 ± 4.0^{ad}	-	5.2 ± 2.0^{a}	-	1.4 ± 1.1^{a}	-
5	53 ± 7.8^{b}	34 ± 1.6^{ae}	5.3 ± 0.36^{a}	1.7 ± 1.3^{b}	0.81 ± 0.24^{a}	0.84 ± 0.55^{a}
10	49 ± 4.3^{bd}	31 ± 3.5^{cef}	7.7 ± 2.5^{ac}	0.31 ± 0.15^{b}	0.65 ± 0.10^{a}	1.2 ± 0.13^{a}
24	32 ± 1.9^{ac}	23 ± 1.0^{c}	8.4 ± 1.1^{c}	0^{b}	0.74 ± 0.40^{a}	3.8 ± 0.07^{b}
48	38 ± 7.0^{af}	24 ± 2.7^{ce}	7.6 ± 2.4^{ac}	0^{b}	1.4 ± 0.36^{a}	2.2 ± 0.43^{c}

Values are mean ± standard deviation for 3 fish. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$).

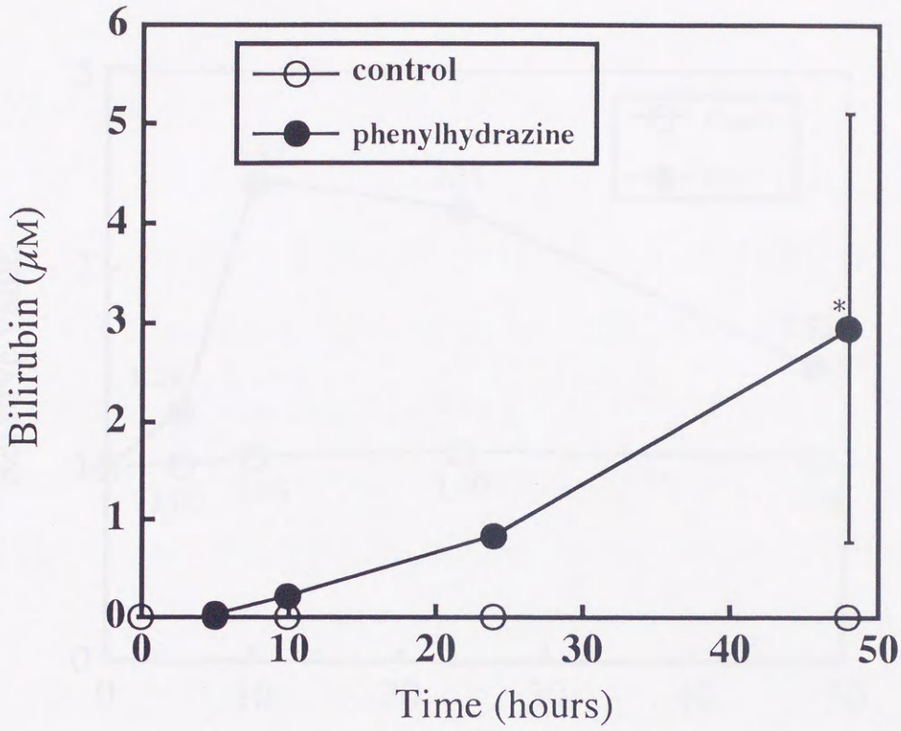


Fig. 1-2. Plasma bilirubin levels in yellowtail administrated phenylhydrazine.
Values are mean±standard deviation for 3 fish.
Superscript indicates significant difference ($P<0.05$) for control value.

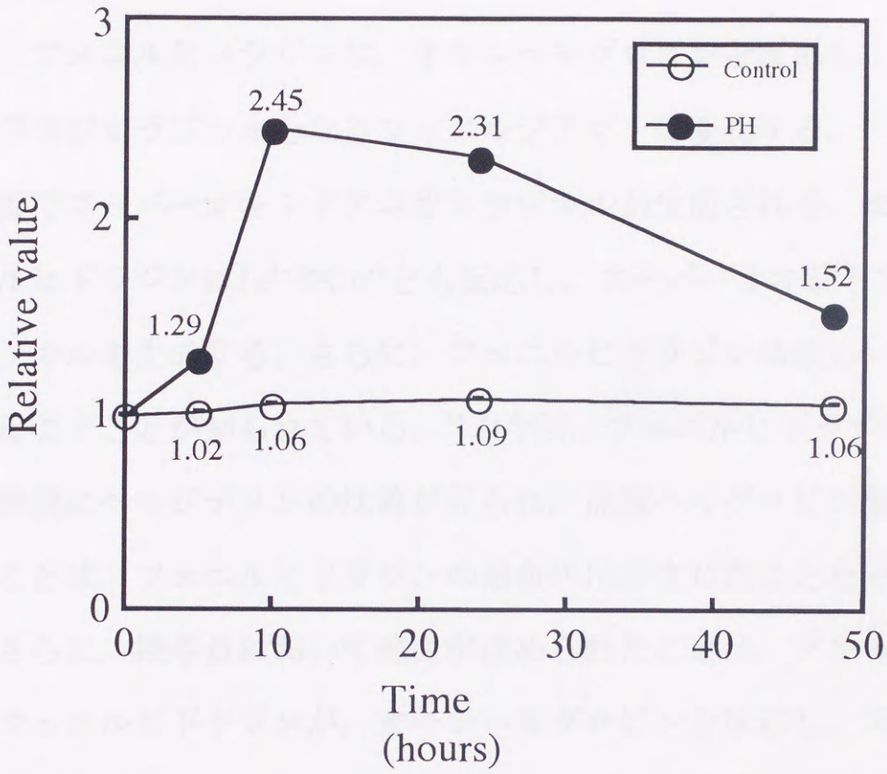


Fig. 1-3. Liver heme oxygenase-mRNA (HO-mRNA) levels in yellowtail administrated phenylhydrazine. Values are shown by relative values.

考察

フェニルヒドラジンは，オキシヘモグロビンと反応し，フェニルヒドラジルラジカルとなりフェニルジアゼンに変化する。[34]その反応過程でスーパーオキシドアニオンラジカルが生成される。また，フェニルヒドラジンはFe^{3+}やCu^{+2}とも反応し，スーパーオキシドアニオンラジカルを生成する。さらに，フェニルヒドラジンは激しい溶血を引き起こすことが知られている。[35, 36]今回，フェニルヒドラジン投与魚の脾臓にヘモジデリンの沈着が見られ，血液ヘモグロビン量が低下したことは，フェニルヒドラジンの溶血作用が生じたことを示している。さらに，投与魚において溶血が認められたことは，ブリ体内においてフェニルヒドラジンが，オキシヘモグロビンと反応し，スーパーオキシドアニオンラジカル，過酸化水素等の活性酸素種を増加させていることも示している。またフェニルヒドラジンによる比脾臓重値の増加は，溶血による赤血球処理の増大を示唆している。

フェニルヒドラジンによる血漿TBARS値の増加は，血漿の脂質過酸化の進行を示している(Table 1-3)。さらに，フェニルヒドラジン投与による血漿α-トコフェロールとアスコルビン酸の減少およびデヒドロアスコルビン酸の増加は，α-トコフェロールとアスコルビン酸が抗酸化作用を果たしていることを示している(Table 1-4)。これらの結果も，ブリ血漿における活性酸素種の増加，つまり，酸素ストレスの高まりを示している。

前述しているように，黄疸とは血漿中のビリルビン含量が病的に高

い状態となり，体表が黄化する疾病である。[2,6]また，健康なブリの血漿にはビリルビンは検出されない。[6,37]したがって，今回フェニルヒドラジンを投与されたブリの血漿中にビリルビンが検出されたことは病的な状態であり，高ビリルビン血症である。加えて，結果には示していないがフェニルヒドラジン投与による体表の黄化も併せて観察された。すなわち，フェニルヒドラジン投与による体内の酸素ストレスの増加が，ブリの黄疸を引き起こしたと考えられる。

通常，赤血球から溶出したヘムは，肝臓や脾臓および他の細網内皮系で，ビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼによりビリベルジンとなり，ビリベルジンはビリベルジンレダクターゼによりビリルビンとなる。対照およびフェニルヒドラジン投与魚の肝臓中のビリベルジンリダクターゼ活性をFang and Bada[9]およびNoguchiらの方法[38]で測定したが，本酵素活性はFang and Badaが述べているように非常に弱いために検出できなかった。この結果からみて，ビリベルジンリダクターゼと黄疸発症との係わり合いはほとんど無いように思われる。ビリルビンはその後，肝臓において哺乳類ではグルクロン酸，魚類では主にタウリンにより抱合され，抱合型ビリルビンとなり胆汁中に分泌される。[8]ヘムオキシゲナーゼは2つのisozyme，すなわちヘムオキシゲナーゼ-1（誘導される）とヘムオキシゲナーゼ-2（誘導されない）からなる。[39-41]ヘムオキシゲナーゼ-1活性はヘム，エンドトキシン，重金属，熱ショック，インターロイキン-1および酸素ストレスにより誘導されることが知られている。[24,25,42,43]ヘムによるヘムオキシゲナーゼ-1の誘導機構は，ヘムオキシゲナーゼ-1遺伝子の5’上流

にヘムに応答するエレメントがないことおよび脳がFe-protoporphyrin IXを通さないにも関わらず，ラットの腹腔内にFe-protoporphyrin IXを投与すると脳のヘムオキシゲナーゼ-1のmRNAが3-4倍になることより，[44]ヘムの間接的な作用によるものと考えられている。Yamaguchiらはビタミン C を合成できないODS-od/odラットにエンドトキシンを投与して酸素ストレスを与えると，肝臓ヘムオキシゲナーゼ-1のmRNA量が増加し，さらに尿中のビリルビン酸化生成物量が増加すると報告している。[18]Stockerはヘムは強力なプロ-オキシダントであることから，その存在そのものが酸素ストレスであり，そのヘムを分解する酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1の誘導は酸素ストレスに対する防御機構であると述べている。[45]また，近年ビリルビンは抗酸化作用を持つことが明らかになり，[15, 16]その活性酸素種のスカベンジャーとしての機能が再評価されてきている。[46, 47]今回の結果は，哺乳類と同様に，魚類においても酸素ストレスの増加が，ヘムオキシゲナーゼを誘導することを示した。また，魚類は胆汁色素をビリルビンだけではなくビリベルジンでも排泄できること，通常はビリベルジンをビリルビンに代謝するビリベルジンレダクターゼ活性が非常に弱いことを考えると，酸素ストレスの増加により消費された体内の抗酸化物質を補うため，ブリが低分子抗酸化物質のビリルビンを能動的に合成している可能性も考えられる。

本節の結果より，ブリにおける酸素ストレスの増加は，肝臓ヘムオキシゲナーゼmRNAを増加させビリルビンの合成を促進し，ブリの黄疸発症における重要な因子になることが示唆された。

第２節　原因菌接種による黄疸発症と酸素ストレスとの関係

本章第１節において，ブリの黄疸発症と酸素ストレスの関係を明らかにするため，ブリに対し活性酸素発生剤フェニルヒドラジンの投与試験を行った。その結果，著しい溶血，血漿TBARS値およびビリルビン量の増加，並びに肝臓ヘムオキシゲナーゼ(EC 1.14.99.3)mRNAの増加を認め，酸素ストレスの増加はビリルビンの合成を促進し，ブリの黄疸発症における重要な因子であることが示唆された。

そこで本節においては，原因菌感染により発症するブリの黄疸と酸素ストレスとの係わりを明らかにするため，ブリに黄疸原因菌を接種し，血中菌数，血中ヘモグロビン，血漿ビリルビン含量並びに肝臓フォスファチジルコリンヒドロペルオキシド，マロンジアルデヒドおよびα-トコフェロール含量，さらに血漿マロンジアルデヒドおよびα-トコフェロール含量を調べた。

実験方法

供試魚

供試魚には，宮崎県水産試験場の海面小割生け簀（2×2×2m）において，市販のエクストルーダー飼料を給与し飼育した平均体重1.4kgのブリを用いた。この供試魚を宮崎県水産試験場内の1.5トンFRP水槽に収容し，黄疸原因菌感染試験をおこなった。

黄疸原因菌培養法

黄疸原因菌株は，1992年7月に延岡市の養殖場で発症した黄疸ブリから分離したものを使用した。菌培養はIida and Sorimachi[48]の方法に準じておこなった。すなわち，培地として10%の牛胎児血清を含むL-15培地を使用し，これに黄疸を発症したブリから採取した黄疸原因菌を含む血液を加え，25℃で振とう培養した。

黄疸原因菌接種試験

対照区および接種区の2試験区を設定した。対照区にはL-15培養液のみを，接種区には$1x10^7$cell/尾となるように調整した培養液を腹腔内に接種した。菌接種後，供試魚を1.5トンFRP水槽に収容し，試験開始時に4尾，3日，6日後に対照区および接種区からそれぞれ3尾，9日後に対照区から5尾および接種区から4尾を取り上げた。なお，接種試験中の水温，溶存酸素量および海水塩分量は，それぞれ22.1-22.8℃，6.85-7.05mg/ℓおよび33.7-34.7‰であった。

血液中黄疸原因菌数測定法

各取り上げ時に，対照区および接種区共に3尾ずつ血液塗末標本を作製し，ギムザ染色をしたのち顕微鏡観察をおこない，黄疸原因菌を測定した。値は，血液1mℓ当たりの菌数で示した。

血液ヘモグロビン測定法

本章第１節と同様に，Kawatsuのシアンメトヘモグロビン法にて測定し，mg/mℓで示した。[27]

脾臓の病理組織学的検査法

本章第１節と同様に，供試魚の脾臓を取り出し，10%緩衝ホルマリ

ンで固定し，常法に従いパラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン・エオシン(HE)染色およびBerlin blue(BB)染色を施し，光学顕微鏡下で観察を行った。

ビリルビン測定法

本章第1節と同様に，Izumi *et al.*[31]の抗原抗体反応を利用したELISA（酵素抗体）法により測定した。値はμMで示した。

フォスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)測定法　処理中の酸化を抑えるために，BHTを0.002%添加した肝臓をテフロンホモジナイザーでホモジネートし，メタノールを加え振とうし，ついで，クロロホルムを加え，激しく振とうして脂質を抽出した。遠心分離後，下層を分取し，窒素気流下で濃縮乾固後，クロロホルム-メタノール（1：1，v/v)に再溶解し，HPLC用試料とした。カラムとして，Shim-pack CLC-SIL (M) 250×4.6 mm（島津製作所（株）製）を用い，移動相としてアセトニトリル：メタノール：水 (5.5: 3.0: 1.5, v/v)，化学発光試薬として1μg/mℓルミノールおよび10 μg/mℓチトクロムCを含む20 mMほう酸緩衝液(1%メタノール含有，pH10.5)をそれぞれ用いた。分析値は，nmol活性酸素(AO)/gとして示した。

マロンジアルデヒド測定法

血漿および肝臓中のマロンジアルデヒド(MDA)は，Suda *et al.*[49]の方法に準じておこなった。まず，試料にリン酸ナトリウム緩衝液を加えホモジネートとし，それに0.25%1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid(DETBA)溶液を加え，マロンジアルデヒドとDETBAとの反応によりMDA蛍光誘導体（DETBA-MDA adduct）を作成した。それを酢酸

エチルにて抽出し，アセトニトリル-0.1M NaCl水溶液（3：1，v/v)を移動相とするHPLC法により定量した。カラムには，Inertsil ODS (250x4.6㎜，GL Sciences Inc.製)を，検出器には蛍光分光光度計（励起波長 515nm，蛍光波長 555nm）をそれぞれ用い，カラム温度は40℃とした。なお，肝臓および血漿中の値は，それぞれμgマロンジアルデヒド(MDA)/gおよびnmolMDA/mℓで示した。

α-トコフェロール測定法

血漿および肝臓中のα-トコフェロールは，本章第1節と同様に，Yamauchi *et al.*[29]のHPLC法によって測定した。肝臓および血漿中の値は，それぞれμg/gおよびμg/mℓで示した。

統計処理

分析値は，各区の供試魚を個体別に分析し，平均値±標準偏差で示し，Duncan[33]のマルチプルレンジテスト（新多重範囲検定法）により統計処理した。

結果

血液中の黄疸原因菌数の変動

ブリ血液中の黄疸原因菌数をTable 1-5に示した。対照区においては，試験期間を通して原因菌は全く認められなかった。しかしながら接種区では3日後と6日後にそれぞれ3尾の供試魚のうち2個体ずつ黄疸原因菌が認められ，原因菌の感染が確認された。

Table 1-5. Number of the bacteria in the blood of yellowtail injected with jaundice-causing bacteria

Days	Group \ Fish no.	Number of jaundice-causing bacteria in the blood(cells/m*l*)			
		1	2	3	AV.±S.D.[*2]
0	Control	0	0	0	0
3	Control	0	0	0	0
	Infected[*1]	0.95	0	18.1	6.35±8.32
6	Control	0	0	0	0
	Infected	154	0	1.78	52.0±72.3
9	Control	0	0	0	0
	Infected	0	0	0	0

[*1] Yellowtail injected with jaundice-causing bacteria.

[*2] Mean ±standard deviation for 3fish.

接種区では，3日後と6日後にそれぞれ3尾の供試魚のうち2個体ずつ黄疸原因菌が認められ，原因菌の感染が確認された。

比肝重値，比脾臓重値および血液ヘモグロビン量の変動

比肝重値，比脾臓重値および血液ヘモグロビン量をTable 1-6に示した。黄疸原因菌接種3日，6日および9日後の比肝重値は，いずれも対照区のそれらの値と比較し有意に高かった。比脾臓重値は，比肝重値と同様の傾向を示し，接種6日および9日後に対照区の値より高くなった。対照区の血液ヘモグロビン量は試験期間を通して正常であった。これに対して，菌接種区の血液ヘモグロビン量は6日および9日後において，いずれも対照区の値に対し有意に低くなった。

脾臓の病理組織像

原因菌接種魚の脾臓組織像をFig. 1-4に示す。接種魚の脾臓にはヘモジデリンの沈着が観察され，溶血が確認された。これは，養殖場において黄疸を発症したブリでみられた結果と同様であった。[6)]

血漿マロンジアルデヒド，α-トコフェロールおよびビリルビン含量の変動

血漿マロンジアルデヒド，α-トコフェロールおよびビリルビン含量をTable 1-7に示した。血漿マロンジアルデヒド含量は，菌感染6日後において対照区より有意に高くなった。これに対し，血漿α-トコフェロール含量は，感染3日，6日，9日後において，いずれも対照区より有意に低かった。菌接種区の血漿ビリルビン含量は，いずれの取り上げ時においても対照区の含量より高く，特に6日後の値は有意に高かった。すなわち，黄疸原因菌接種によりブリの黄疸が発症した。

Table 1-6. Hepatosomatic and spleensomatic indices, and blood hemoglobin contents of yellowtail injected with jaundice-causing bacteria

Days	Group	Number of sample	Hepatosomatic index	Spleensomatic index	Hemoglobin (mg/mℓ)
0	Control	4	0.73 ± 0.08^{a}	0.12 ± 0.04^{a}	127
3	Control	3	0.76 ± 0.08^{a}	0.20 ± 0.04^{a}	110 ± 11.7^{a}
	Infected	3	1.33 ± 0.13^{b}	0.21 ± 0.10^{a}	101 ± 3.70^{a}
6	Control	3	0.58 ± 0.03^{a}	0.14 ± 0.08^{a}	153 ± 20.9^{b}
	Infected	3	1.84 ± 0.35^{c}	1.08 ± 0.11^{b}	63.6 ± 17.8^{c}
9	Control	5	0.61 ± 0.04^{a}	0.12 ± 0.06^{a}	147 ± 17.6^{b}
	Infected	4	1.67 ± 0.44^{bc}	0.59 ± 0.06^{c}	81.1 ± 20.2^{ac}

Values are mean ± standard deviation for number of sample. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$).

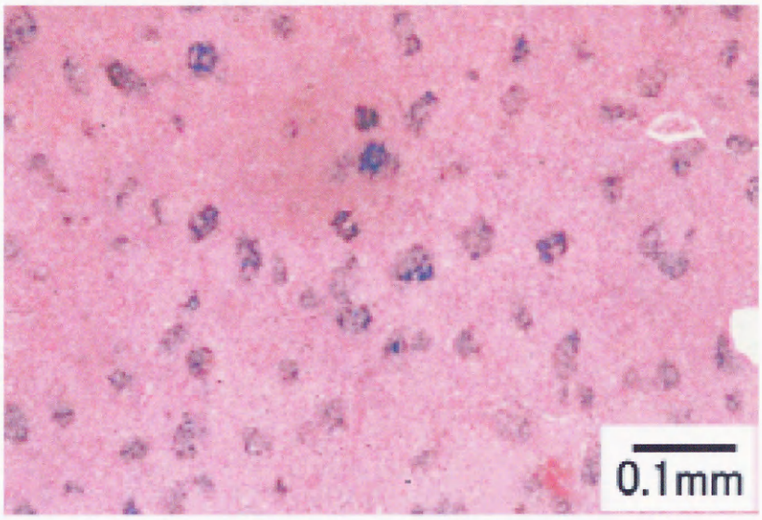


Fig. 1-4. Histopathological appearance of the spleen in yellowtail injected with jaundice-causing bacteria.

Table 1-7. Plasma malondialdehyde, α-tocopherol, and bilirubin levels of yellowtail injected with jaundice-causing bacteria

Days	Group	Number of sample	Malondialdehyde (nmolMDA/ml)	α-Tocopherol (μg/ml)	Bilirubin (μM)
0	Control	4	n.a..[*1]	57.6±5.29[a]	0.27±0.36[a]
3	Control	3	0.14	46.5±2.52[b]	0.31±0.09[a]
	Infected	3	0.16	33.1±7.81[c]	9.35±11.4[a]
6	Control	3	0.18±0.04[a]	44.0±3.02[b]	0.31±0.03[a]
	Infected	3	0.48±0.15[b]	16.5±3.46[d]	379±341[b]
9	Control	3	0.18±0.06[a]	38.3±0.94[bc]	0.42
	Infected	3	0.27±0.10[a]	20.1±2.59[d]	57.9±68.8[a]

[*1] Not analyzed.

Values are mean ± standard deviation for number of sample. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$).

肝臓PCOOH，マロンジアルデヒドおよびα-トコフェロール含量の変動

肝臓PCOOH，マロンジアルデヒドおよびα-トコフェロール含量をTable 1-8に示した。対照区の肝臓PCOOH量は試験期間中0.21～0.43nmolAO/gであった。これに対し，接種区の値は3日，6日および9日後にそれぞれ1.53±0.58, 3.36±0.41, 2.18±0.43μMとなり，いずれも対照区の値より有意に高く，ブリ肝臓における活性酸素量の増加を示唆した。菌接種3日後の肝臓マロンジアルデヒド量は，対照区の値より有意に高く，黄疸発症魚における脂質過酸化の進行を示した。これに対し，接種6日後の肝臓α-トコフェロール含量は，対照区の値と比較し有意に低くなった。

Table 1-8. Liver phosphatidylcholine hydroperoxide (PCOOH), malondialdehyde, and α-tocopherol levels of yellowtail injected with jaundice-causing bacteria

Days	Group	Number of sample	PCOOH (nmolAO/g)	Malondialdehyde (nmolMDA/g)	α-Tocopherol (μg/g)
0	Control	4	0.21 ± 0.06^{a}	0.21 ± 0.08^{a}	834 ± 132^{ab}
3	Control	3	0.43 ± 0.09^{a}	0.23 ± 0.05^{a}	695 ± 258^{ab}
	Infected	3	1.53 ± 0.58^{b}	0.47 ± 0.20^{b}	855 ± 315^{ab}
6	Control	3	0.30 ± 0.16^{a}	0.25 ± 0.07^{a}	1275 ± 751^{a}
	Infected	3	3.36 ± 0.41^{c}	0.31 ± 0.08^{ab}	337 ± 59.4^{b}
9	Control	3	0.23 ± 0.01^{a}	0.35 ± 0.14^{ab}	808 ± 282^{ab}
	Infected	3	2.18 ± 0.43^{b}	0.23 ± 0.04^{a}	564 ± 295^{ab}

Values are mean ± standard deviation for number of sample. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$).

考察

反町らの報告[2)]と同様に，黄疸原因菌をブリに接種することにより黄疸の発症が認められた。今回の試験で認められた血液ヘモグロビン量の低下，比肝重値と比脾臓重値の増加および脾臓ヘモジデリンの観察は(Table 1-6，Fig. 1-4)，反町らおよび前野らが報告している黄疸原因菌感染試験の結果[2, 4)]と同様であると共に，フェニルヒドラジン投与による過酷な酸素ストレスによりブリが高ビリルビン血症を引き起こした本章第１節の結果とも一致する。前野らは黄疸原因菌に感染したブリの血液および血漿ヘモグロビン量を時間経過ともに測定し，血液ヘモグロビン量が減少するのに対し血漿ヘモグロビン量は増加することを認め，さらに，血球の溶血像を観察したことから，黄疸原因菌に感染した際には溶血が生じることを報告している。[4)]本節においても，血液ヘモグロビン量の低下および脾臓におけるヘモジデリンの沈着が観察されたことから，原因菌接種による溶血が確認された。

溶血により生じるオキシヘモグロビンは自動酸化により活性酸素を生成し，[50)]そのヘモグロビンから生じるヘムはラジカル反応を触媒する。[45)]また，溶血によりむき出しとなったヘモグロビンは脂質ヒドロペルオキシドや過酸化水素と接触すると鉄を放出し，[51)]この放出された鉄は脂質過酸化とヒドロキシラジカルの形成を助長する。[52)]これらの報告から，著しい溶血は連鎖的に過酷な酸素ストレスを引き起こすと考えられる。

ブリ肝臓のPCOOH含量は黄疸原因菌接種により明らかに増加した

(Table 1-8)。ラジカル連鎖反応による脂質ヒドロペルオキシドの生成は活性酸素種による脂質からの水素引き抜き反応および二重結合への付加反応により生成されることから，[21]今回の肝臓PCOOH量の増加は，肝臓における酸素ストレスの増加を裏付けている。また，血漿においても肝臓と同様に，マロンジアルデヒド含量の増加とα-トコフェロール含量の減少が認められたことから，肝臓だけでなく，血漿においても酸素ストレスが増加していると考えられる。これらの結果は，原因菌感染により発症するブリの黄疸においても，ブリへのフェニルヒドラジン投与と同様に，酸素ストレスの増加があることを示している。今回の試験において，原因菌接種9日後のブリは，3個体すべてが高ビリルビン血症であったにも関わらず，血液中に原因菌を確認することができなかった。しかし，これらの個体においても著しい血液ヘモグロビン量の低下が認められていることから，いずれも溶血による酸素ストレスの増加があったと考えられる。

本章第1節において，ブリにおける酸素ストレスの増加は，肝臓ヘムオキシゲナーゼを誘導し，ビリルビン合成を促進させ黄疸を発症させると述べた。また本節において，実験的細菌感染により黄疸を発症するブリにおいても酸素ストレスの増加が認められた。これらのことから，ブリの細菌性溶血性黄疸は，原因菌の引き起こした溶血により増加した酸素ストレスがビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼを誘導し，ビリルビンの過剰産成により発症すると考えられる。

第３節　原因菌接種によるブリ肝臓トリグリセリドヒドロペルオキシド量の増加

これまで著者は，ブリ肝臓における酸素ストレスの増加はビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ (EC 1.14.99.3.)を誘導すること（本章第１節）および黄疸原因菌の感染により黄疸を発症するブリでは肝臓フォスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)量が顕著に増加すること（本章第２節）を明らかにした。これらの結果から，ブリの細菌性溶血性黄疸は，原因菌の引き起こした溶血により増加した酸素ストレスがビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼを誘導し，ビリルビンの過剰産成により発症すると考察した。（本章第２節）

そこで本節において，細菌感染によるブリの黄疸発症と酸素ストレスとの係わりをより明らかにするため，厳しい酸素ストレスを受けた肝臓ではフォスファチジルコリンだけでなく，トリグリセリドも酸化を受けると考え，ブリに黄疸原因菌を接種し，肝臓トリグリセリドヒドロペルオキシド(TGOOH)含量を調べた。

実験方法

供試魚

供試魚として，海面小割生簀（2×2×2m）にて市販のエクストルーダー飼料を給与し飼育した平均体重1.4kgのブリを用いた。

黄疸原因菌培養法

原因菌接種試験には，本章第２節で用いたものと同じ菌株を使用した。菌培養はIida and Sorimachi[48]の方法に準じて行った。

黄疸原因菌接種試験

本章第２節と同様に，対照区にはL-15培養液のみを，接種区には$1x10^7$cell/尾となるように調整した培養液をブリ腹腔内に接種した後，供試魚を陸上の1.5トンFRP水槽に収容した。それらのブリを試験開始時に3尾，3日および6日後に対照区および接種区からそれぞれ3尾，9日後に対照区から3尾および接種区から7尾を取り上げた。

血液ヘモグロビン測定法

本章第１節と同様に，Kawatsuのシアンメトヘモグロビン法にて測定し，mg/mℓで示した。[27]

ビリルビン測定法

本章第１節と同様に，Izumi *et al.*[31]の抗原抗体反応を利用したELISA（酵素抗体）法により測定した。値はμMで示した。

肝臓トリグリセリドヒドロペルオキシド(TGOOH)およびフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド(PCOOH)測定法

肝臓中のTGOOHおよびPCOOH含量を本章第２節と同様に，HPLC法を用いて測定した。すなわち，カラムとして，Shim-pack CLC-SIL (M) 250×4.6 mm（島津製作所（株）製）を用い，移動相としてアセトニトリル：メタノール：水 (5.5: 3.0: 1.5, v/v)，化学発光試薬として1μg/mℓルミノールおよび 10 μg/mℓチトクロムCを含む20 mMほう酸緩衝液(1%メタノール含有，pH10.5)をそれぞれ用いた化学発光HPLC

法により測定した。分析値は，nmol活性酸素(AO)/gとして示した。

統計処理

分析は固体別におこない，得られた値を平均値±標準偏差で示し，Duncan[33]のマルチプルレンジテスト（新多重範囲検定法）により統計処理した。

結果

血液ヘモグロビン含量，比肝重値，比脾臓重値および血漿ビリルビン含量の変動

血液ヘモグロビン含量，比肝重値，比脾臓重値および血漿ビリルビン含量をTable 1-9に示した。菌接種区の血液ヘモグロビン含量は6日後において，対照区の値と比べ，有意に低かった。比肝重値は接種3日，6日および9日後に，比脾臓重値は，接種6日および9日後に，それぞれ対照区の値より有意に高かった。対照区の血漿ビリルビン含量は試験期間を通し検出限界(0.05μM)以下であったが，菌接種区ではいずれの取り上げ日においても対照区の含量より高く，特に接種9日後の血漿ビリルビン含量は対照区の値より有意に高かった。

肝臓のTGOOHおよびPCOOH含量の変動

肝臓のTGOOHおよびPCOOH含量をTable 1-10に示した。菌接種区の肝臓TGOOH含量は接種6日をピークに増加し，6日および9日後において，対照区の値と比べ，有意に高かった。

Table 1-9. Hemoglobin contents in the blood, hepatosomatic and spleensomatic indices, and bilirubin contents in the plasma of yellowtail injected with jaundice-causing bacteria

Days	Group	Number of sample	Hemoglobin (mg/mℓ)	Hepatosomatic index	Spleensomatic index	Bilirubin (μM)
0	Control	3	144±24.5[a]	0.97±0.16[ab]	0.15±0.05[a]	n.d.[a*1]
3	Control	3	112[*2]	0.88±0.04[a]	0.18±0.06[a]	n.d.[a]
	Injected	3	111±20.2[ac]	1.19±0.09[bd]	0.27±0.02[a]	0.82±0.12[a]
6	Control	3	117±18.3[ac]	0.79±0.03[a]	0.18±0.07[a]	n.d.[a]
	Injected	3	52.0±19.0[b]	1.70±0.27[c]	1.53±0.41[b]	14.2±13.4[a]
9	Control	3	101±46.3[ab]	0.81±0.06[a]	0.16±0.05[a]	n.d.[a]
	Injected	7	77.3±31.2[bc]	1.35±0.17[b]	0.64±0.23[c]	59.8±42.3[b*3]

[*1] n.d.; not detected (less than 0.05μM).

[*2] Number of sample is one.

[*3] Number of sample is three.

Values are mean ± standard deviation for number of sample. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$)

Table 1-10. Liver triglyceride and phosphatidylcholine hydroperoxide levels of yellowtail injected with jaundice-causing bacteria

Days	Group	Number of sample	Triglyceride hydroperoxide (nmol AO/g)	Phosphatidylcholine hydroperoxide (nmol AO/g)
0	Control	3	1.26 ± 1.18^{a}	0.28 ± 0.12^{ad}
3	Control	3	2.99 ± 0.23^{a}	1.06 ± 0.28^{be}
	Injected	3	2.78 ± 1.08^{a}	0.70 ± 0.03^{ae}
6	Control	3	2.13 ± 1.25^{a}	0.39 ± 0.12^{ad}
	Injected	3	8.95 ± 2.58^{b}	2.76 ± 0.06^{c}
9	Control	3	2.05 ± 0.32^{a}	0.04 ± 0.02^{d}
	Injected	7	6.35 ± 1.07^{b}	1.50 ± 0.65^{b}

Values are mean ± standard deviation for number of sample. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$)

さらに，肝臓PCOOH含量も本章第２節の結果と同様に，原因菌接種により増加し，その値は接種6日および9日後に対照区の値より有意に高かった。

考察

今回の試験においても本章第２節と同様に，ブリに黄疸原因菌を接種すると黄疸が発症した。すでに，著者は本章第２節において，ブリに原因菌を接種すると，反町らの報告[2)]と同様に黄疸が発症することを認めている。したがって，本節における黄疸の発症も原因細菌の感染によるものと考えられる。本章第２節で述べた通り，脂質ヒドロペルオキシドは，活性酸素種による脂質からの水素引き抜き反応および二重結合の付加反応により生成される[21)]ことから，肝臓脂質ヒドロペルオキシド含量の増加は，肝臓における活性酸素種の増加を直接示している。したがって，今回菌接種により黄疸を発症したブリ肝臓においPCOOH含量だけでなくTGOOH含量も対照区より有意に高かったことから，原因菌の感染により黄疸を発症するブリ体内では酸素ストレスが増加することが再確認された。

第２章
酸素ストレス抑制飼育管理方法による
ブリの細菌性溶血性黄疸の予防

第１節　高α-トコフェロール飼料給与による黄疸抑制効果

これまでの結果から，ブリの黄疸は，原因菌が引き起こす溶血による活性酸素の増加により，ビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼが誘導され，その結果，ビリルビンが多量に産成されるため発症すると考えられた。したがって，ブリの黄疸発症を防ぐには原因菌による溶血を抑えるか，あるいは溶血により発生する活性酸素を消去すれば良いと考えられる。α-トコフェロールは脂溶性の抗酸化剤として極めて有用である。[53]したがってα-トコフェロール含量の高い飼料を与えることは，ブリ体内の酸素ストレスを抑え黄疸を予防する効果的な対策の一つになると考えられる。そこで本節では，α-トコフェロールによるブリの黄疸発症の予防を試みた。すなわち，α-トコフェロールを100ｇあたり12（1区）または88mg（2区）添加したエクストルーダー飼料をブリに給与後，原因菌を接種し黄疸症状の程度を調べた。

実験方法

試験飼料

試験飼料組成をTable2-1に示す。試験飼料としてα-トコフェロールを乾物100ｇ当たり12mgおよび88mg配合したエクストルーダー飼料を用い，試験区をそれぞれ1区および2区とした。

Table 2-1. Composition of the experimental diets for yellowtail

(%)

Ingredient	Diet no.	
	1	2
Brown fish meal	75.5	75.5
Vitamin mix (TH-4[*1])	3	3
Mineral mixture (T-4 [*2])	2	2
Mineral mixture (O-1 [*3])	0.5	0.5
White gluten	10	10
Sardine oil	9	9
α-Tocopherol (mg/100g diet)	12	88
L-ascorbyl-2-phosphate-Mg (mg/100g diet)	30	30

[*1]; contained 675,000 IU vitamin A, 60,000 IU vitamin D3, 4.0g DL-α-tocopherol acetate, 2.56716g menadione sodium hydrogen sulfite,0.8g thiaminenitrate, 1.467g riboflavin, 0.8g pyridoxine hydrochloride, 2.38g nicotinamide, 2.38051g pantothenic acid, 4.667g calucium salts,194.7g choline chloride,0.8g folic acid, 0.01067g cyanocobalamine, 0.04667g D-biotin, 56.34g inositol,31.3g L-ascorbic acid, 476.27g cellulose per kg of vitamin mixture.

[*2];contained 206g KH_2PO_4, 141g $Ca(CH_3CHOHCOO)_2 \cdot 5H_2O$, 83g iron proteinate, 309g $Ca_2H_2PO_4$, 261g cellulose per kg of mineral mixture.

[*3];contained 12.5g $MgSO_4$, 0.1g $CoCl_2$, 4g $CuSO_4$,19.97g $ZnSO_4$,0.3g KIO_3, 900g dextrin, 63.13g cellulose per kg of mineral mixture.

供試魚

供試魚には，予備飼料として丸紅飼料（株）製のエクストルーダー飼料（12mg α-トコフェロール，30mg L-アスコルビル-2-フォスフェイト Mg (APM) /100 g 飼料）を2週間給与した平均体重104 g のブリを用いた。

飼育試験

飼育試験は予備飼育した供試魚を宮崎県水産試験場の海面小割生け簀（2×2×2m）に1区当たり150尾収容し，46日間飼育した。給餌は1日2回おこない，日間給餌率は体重の4～5%の範囲とした。飼育試験期間中の水温は25.2～27.2℃であった。飼育試験終了後，無作為に1区につき20尾を取り上げ，その内10 尾は肝臓および血漿のTBARS値，α-トコフェロール，アスコルビン酸量およびグルタチオンペルオキシターゼ活性の分析に供し，残りの10尾を黄疸原因菌接種試験に用いた。なお，飼育試験終了時のTBARS値，α-トコフェロール，アスコルビン酸量およびグルタチオンペルオキシターゼ活性の分析には供試魚10尾を 1 プールとし，試料とした。

黄疸原因菌培養法

原因菌接種試験に使用した菌は前章第 2 節と同じ菌株を用い，菌培養はIida and Sorimachi[48]の方法に準じておこなった。

黄疸原因菌接種試験

飼育試験終了後，供試魚を1.5トンFRP水槽に収容し，黄疸原因菌感染試験を行った。1区および2区のそれぞれに対照区および接種区を設定し，供試魚を5尾づつ用いた。対照区にはL-15培養液のみを，接

種区には1x10^{7}cell/尾となるように調整した培養液を腹腔内に接種した。接種7日後に生残魚を取り上げ，心臓より採血し，得られた血液および血漿を固体別の分析に供した。なお原因菌接種試験期間中は無給餌であった。

ヘマトクリット値測定法

ヘマトクリット値測定用毛細管に血液を浸透させ片側をパテで閉じた後，11,000回転，5分間遠心分離し，尺度計で%値を読みとった。

血液ヘモグロビン測定法

前章第1節と同様に，Kawatsuのシアンメトヘモグロビン法にて測定し，mg/mℓで示した。[27]

赤血球数測定法

赤血球計算盤を用い，常法にて計測した。

血漿アスパテイトアミノトランスフェラーゼ(GOT)およびアラニンアミノトランスフェラーゼ(GPT)活性測定法

ピルビン酸酸化酵素を用いて生成する過酸化水素を定量する原理を利用し，Iatron Laboratories製のトランスアミナーゼ測定用キットを用いて測定した。値は，それぞれKarmen単位で示した。

2-チオバルビツール酸反応物質(TBARS)値測定法

血漿中のTBARS値は，前章第1節と同様に，島崎の比色法で測定し，nmolマロンアルデヒド(MA)/mℓで示した。[28]肝臓のTBARS値は，Yamauchiらの水蒸気蒸留法で測定し[29]，μgMDA/gで示した。蒸留中における試料の脂質過酸化を防ぐため，組織重量に対し0.3%のBHTを加え，よく混合した後，蒸留処理をした。

α-トコフェロール測定法

血漿および肝臓中のα-トコフェロールは，前章第1節と同様に，Yamauchi *et al.*[29]のHPLC法によって測定した。肝臓および血漿中の値は，それぞれμg/gおよびμg/mℓで示した。

アスコルビン酸定量法

血漿および肝臓中のアスコルビン酸の定量は，前章第1節と同様に，Ito *et al.*のHPLC同時定量法を用いた。[30]肝臓および血漿中の値は，それぞれμg/gおよびμg/mℓで示した。

グルタチオンペルオキシターゼ(GSH-Px)活性測定法

GSH-Px活性の測定は，glutathione reductaseとNADPHを共存させ，そのcummen hydroxideと*t*-butyl hydroperoxideに対する基質としての反応性の差を用いる分別測定法により行った。[54]また，1分間に1nmolの基質を変換させる酵素量を1Uとして，肝臓における活性はU/mg proteinで示した。

ビリルビン測定法

前章第1節と同様に，Izumi *et al.*の抗原抗体反応を利用したELISA（酵素抗体）法により測定し，μMで示した。[31]

統計処理

分析値は，各区の供試魚を個体別に分析し，平均値±標準偏差で示し，Duncan[33]のマルチプルレンジテスト（新多重範囲検定法）により統計処理した。

結果

飼育試験結果

46日間の飼育試験結果をTable 2-2に示す。成長および飼料効率に区間差は無く，飼料α-トコフェロール含量による成長への影響はみられなかった。

飼育試験終了時におけるヘマトクリット値，血漿GOTおよびGPT活性

飼育試験終了時におけるヘマトクリット値，血漿GOTおよびGPT活性をTable 2-3に示す。ヘマトクリット値は，1区が49.5±6.6，2区が50.0±0.8となり，いずれの試験区も正常であった。血漿GOTおよびGPT活性は，いずれも2区の値が1区の値より低く，特にGOT活性は有意に低かった。

飼育試験終了時における血漿および肝臓α-トコフェロール量，TBARS値，GSH-Px活性およびアスコルビン酸量

飼育試験終了時における血漿および肝臓α-トコフェロール量，TBARS値，GSH-Px活性およびアスコルビン酸量をTable 2-4に示す。血漿および肝臓α-トコフェロール量は，飼料α-トコフェロール量を反映しいずれも2区の含量が1区の含量より高かった。血漿および肝臓アスコルビン酸は飼料による差は無かった。血漿および肝臓TBARS値は，いずれも2区の値が1区の値より低く，α-トコフェロールによる脂質過酸化の抑制が示された。2区の肝臓GSH-Px活性は1区より低かった。

Table 2-2. Results of the feeding experiment

Diet no.	Number of sample	Average body weight(g)		Growth rate (%)	Feeding efficency*
		Intial	Final		
1	150	105.3	380.0	260.9	101.3
2	150	103.7	376.1	262.7	96.9

* g gain/ g feed (dry weight basis).

Table 2-3. Effects of dietary α-tocopherol levels on hematocrit values, and asparate aminotransferase (GOT) and alanine aminotransferase (GPT) activities in the plasma of yellowtail

	Diet no.	
	1	2
Hematocrit (%)	49.5±6.6	50.0±0.8
GOT (Karmen unit)	52.3±23.5	13.8±1.9*
GPT (Karmen unit)	25.3±13.3	12.9±1.8

Mean ± standard deviation(n=4) .

* Significantly different from diet 1 at $P<0.05$.

Table 2-4. Effects of dietary α-tocopherol levels on 2-thiobarubituric acid reactive substance(TBARS) values, α-tocopherol and ascorbic acid contents and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities in the liver and plasma of yellowtail

	Diet no.	
	1	2
Plasma		
TBARS value(nmolMA/m*l*)	9.02	6.99
α-Tocopherol(μg/m*l*)	39.4	88.8
Ascorbic acid(μg/m*l*)	0.3	0.2
Liver		
TBARS value(μgMA/g)	0.23	0.14
α-Tocopherol(μg/g)	265	2078
Ascorbic acid(μg/g)	10.1	9.5
GSH-Px(U/mg protein)	71.1	65.4

The plasmas and livers of 4 specimens were pooled and analyzed, respectively.

Sakai *et al.*は，TBARS値が低く，α-トコフェロール含量が高いブリ肝臓において，GSH-Px活性が抑制されることを認めている。[55]したがって，2区の肝臓GSH-Px活性の抑制は，1区と比べ2区の肝臓脂質過酸化レベルが低下したためと考えられる。

黄疸菌感染魚血液中の黄疸原因菌数

黄疸感染試験ブリ血液中の原因菌数をTable 2-5に示した。対照区においては，試験期間を通して原因菌は全く認められなかった。接種区では，すべての供試魚から黄疸原因菌が認められ，原因菌の感染が確認された。

黄疸原因菌感染試験による生残率

黄疸原因菌感染試験による生残率をFig. 2-1に示す。感染試験期間の7日間で1区は全く死亡しなかった。これに対し，2区では菌接種4日後に1尾，5日後にはさらに1尾死亡した。

黄疸菌感染魚の比肝重値，比脾臓重値，ヘマトクリット値，血液ヘモグロビン量，赤血球数，血漿ビリルビン，TBARS値，α-トコフェロールおよびアスコルビン酸量

黄疸菌感染試験魚の比肝重値，比脾臓重値，ヘマトクリット値，血液ヘモグロビン量，赤血球数，血漿ビリルビン，TBARS値，α-トコフェロールおよびアスコルビン酸量をTable 2-6に示す。いずれの区も黄疸原因菌の接種により，比肝重値および比脾臓重値が有意に増加し，ヘマトクリット値，血液ヘモグロビン含量および赤血球数は有意に低下した。また，血漿のTBARS値およびビリルビン含量も増加した。しかも，ブリの黄疸の症状は，1区と比べ2区の方が進行していた。

Table 2-5. Number of the bacteria in the blood of yellowtail injected with jaundice-causing bacteria

Diet no.	Groups \ Fish no.	Number of jaundice-causing bacteria in the blood				
		1	2	3	4	5
1	Control	-[*1]	-	-	-	-
	Infected	+[*2]	++	++	++	+
2	Control	-	-	-	-	-
	Infected	++	++	++		

[*1] -, not detected.

[*2] +, number of bacteria/500 red blood cells<10; ++, 10<number of bacteria/500 red blood cells<100.

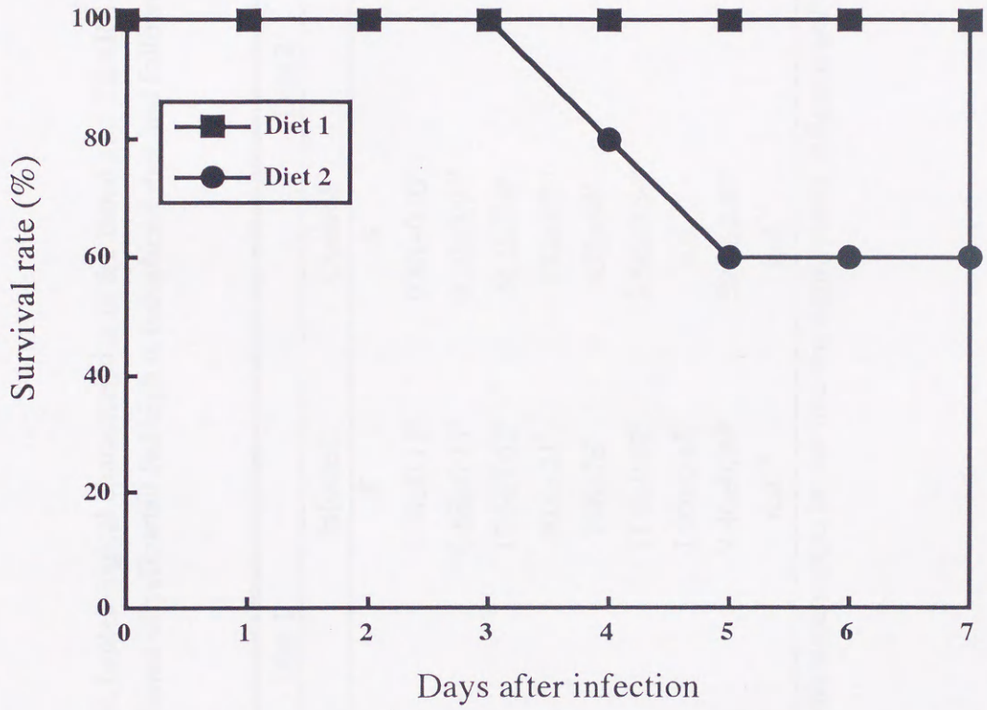


Fig. 2-1. Survival rate of yellowtail fed high α-tocopherol diet and followed by injection of jaundice-causing bacteria

Table 2-6. Hepatosomatic and spleensomatic indeces, hematological characteristics in the blood and TBARS values, bilirubin, α-tocopherol and ascorbic acid contents in the plasma of yellowtail fed high α-tocopherol diet and followed by injection of jaundice-causing bacteria

	Diet 1		Diet 2	
	Control	Infected	Control	Infected
Sample	5	5	5	3
Hepatosomatic index	0.73±0.05[a]	1.64±0.11[b]	0.83±0.03[a]	1.66±0.17[b]
Spleensomatic index	0.08±0.01[a]	0.88±0.13[b]	0.10±0.01[a]	0.71±0.21[b]
Ht (%)	53.5±4.9[a]	17.6±7.62[b]	51.2±7.4[a]	14.3±6.89[b]
Hb (mg/m*l*)	118±10[a]	50.6±21[b]	132±10[a]	36.7±16[b]
Red blood cell (10^4/mm^3)	510±133[a]	168±78[b]	432±64[a]	119±50[b]
TBARS value (nmolMA/m*l*)	3.98±0.68[a]	11.9±0.82[b]	3.60±0.54[a]	12.5±3.84[b]
Bilirubin (μM)	n.d.[*1a]	1.05±0.15[b]	n.d.[*1a]	2.31±1.20[c]
α-Tocopherol (μg/m*l*)	22.9±1.06[a]	9.46±0.99[b]	52.0±2.81[c]	20.0±0.43[a]
Ascorbic acid (μg/m*l*)	n.d.[*2]	n.d.[*2]	n.d.[*2]	n.d.[*2]

Values are means ± standard deviation. Values with superscripts in one line are significantly different at $P<0.05$.

[*1] n.d.; not detected. (less than 0.05μM)

[*2] n.d.; not detected. (less than 0.02μg/m*l*))

血漿α-トコフェロール含量は菌接種により2試験区のいずれも有意に減少したが，その減少量は1区と比べ2区の方が多かった。血漿アスコルビン酸はすべての区で検出されなかった。

考察

本節においては，魚体内にα-トコフェロールを高濃度に蓄積するためのα-トコフェロール強化飼料給与が，黄疸発症を抑制するか否かを明らかにするため，α-トコフェロール含量の異なる飼料でブリを飼育した後，供試魚に黄疸原因菌を接種した。その結果，飼育成績には飼料α-トコフェロール含量による差異は認められなかった。しかし，高α-トコフェロール飼料を給与されたブリ（2区）は，対照魚と比較し血漿および肝臓の脂質過酸化が抑制され(Table 2-4)，GOTおよびGPT活性は低かった(Table 2-3)。これらの結果から，1区と比べ2区の魚は給与されたα-トコフェロールの抗酸化作用により脂質過酸化が抑制され，肝機能が向上したと考えられる。すなわち，1区と比べ2区の魚は酸素ストレスに対する抵抗性が高いと考えられた。しかし，これら魚に，黄疸原因菌を接種した結果，接種7日後の死亡率は2区の方が1区に比べ高かった。さらに，血漿ビリルビン含量も2区の値が1区より高く，比肝重値および比脾臓重値の増加，ヘマトクリット値，血液ヘモグロビン含量および赤血球数の減少，さらに血漿TBARS値の増加も2区が1区に比べ進行した。すなわち，2区のブリがより重篤な黄疸を発症した。

生体内のα-トコフェロールは抗酸化作用を果たすと自らは酸化されα-トコフェロキシラジカルとなる。その後，α-トコフェロキシラジカルはアスコルビン酸により再還元されα-トコフェロールに戻る。[56]これまで，*in vitro*においてアスコルビン酸やユビキノール-10などのco-antioxidantが存在しない場合，α-トコフェロールが抗酸化作用とは逆に，酸化を進行させることが認められている。[57, 58]Brown *et al.*は，非喫煙者が1日に1,050mgという多量のα-トコフェロールを接種した際，560mg接種した人に比べ血漿アスコルビン酸含量が減少し，さらに赤血球の脂質過酸化が有意に増加すると報告している。[59]本試験において，2区の飼育試験終了時における血漿α-トコフェロール含量は88.8μg/mℓであったのに対し，血漿アスコルビン酸含量は飼育試験終了時で0.2μg/mℓと非常に少なく，菌接種7日後ではさらに減少し検出限界値以下であった。この血漿アスコルビン酸含量とα-トコフェロールの機能と考え併せると，2区のブリの体内ではα-トコフェロールの蓄積量に比べ，アスコルビン酸量が少なかったためアスコルビン酸によるα-トコフェロキシラジカルの再還元ができず，α-トコフェロキシラジカルによる酸素ストレスの増加を引き起こし，重篤な黄疸を引き起こす要因になったと考えられる。

哺乳類において，α-トコフェロールは免疫増強作用を持ち，[60]魚類においても連鎖球菌感染症に対し抵抗性を高めることが報告されている。[61]しかし，本試験のブリの黄疸においてはα-トコフェロールの免疫増強作用は認められなかった。

第２節　高アスコルビン酸飼料給与による黄疸の軽減

著者はこれまで，ブリの細菌性溶血性黄疸の発症要因は，原因菌が引き起こす溶血による酸素ストレスの増加であると示唆した（第１章）。そこで，本章第１節において，高α-トコフェロール飼料の給与によりブリ体内の酸素ストレスを抑える飼育管理による黄疸発症の予防を試みた。その結果，高α-トコフェロール飼料を給与したブリの方が重篤な黄疸を発症し，α-トコフェロールによる黄疸の予防効果を認めることができなかった。この結果を考慮すると，大量の活性酸素発生により発症するブリの黄疸の予防にはα-トコフェロールの給与だけでなく，アスコルビン酸の給与も重要であると思われる。

アスコルビン酸は，酸化したα-トコフェロールを再還元するだけでなく，単独でも水層においてスーパーオキシド，ヒドロキシルラジカルおよび一重項酸素などの生体内の活性酸素種を不活化する作用を持っている。[62, 63]Niki *et al.*は，アスコルビン酸が水溶性のラジカル発生剤2,2'-azobisdihydrochloride (AAPH)の発生するペルオキシラジカルを捕捉し，AAPHが誘起するウサギ赤血球の溶血を抑制すると報告している。[64]これらのことより，ブリ体内においてもアスコルビン酸は，菌感染により発生する活性酸素によって引き起こされる溶血を抑え，黄疸の症状を軽減するのではないかと考えられる。このような観点から，著者は，APMを20mg/100 g 配合されたエクストルーダー（EP）飼料に外割で43mg/100 g のアスコルビン酸を補足した飼

料で２ヶ月間ブリを飼育し，原因菌を接種したが，このアスコルビン酸補足量では黄疸の症状を軽減することができなかった。そこで厳しい酸素ストレスをうけるブリの黄疸を抑えるには，大量のアスコルビン酸を要するのではないかと考え，本節では飼料100ｇ当たり外割で2000mgのアスコルビン酸を補足した飼料で飼育したブリに黄疸原因菌を接種し，黄疸症状の軽減効果について検討した。

実験方法

試験飼料

試験飼料をTable 2-7に示した。試験飼料には，魚粉をタンパク源とし，アスコルビン酸カルシウム塩を94mg/100ｇ配合したシングルモイスト飼料（1区）を対照とし，この飼料に外割でL-アスコルビン酸を100ｇ当たり2000mg添加した高アスコルビン酸飼料（2区）を用いた。

供試魚および飼育方法

供試魚には，海面小割生け簀（2×2×2m）において，市販のエクストルーダー飼料により飼育した平均体重460ｇのブリを用いた。この供試魚を陸上1.5トンFRP水槽に各区13尾ずつ収容し，対照飼料にて7日間予備飼育した後，1日1回それぞれ各飼料を魚体重の3％量給与し，5日間飼育した。試験終了後，供試魚13尾うち1区では4尾，2区では3尾を，それぞれ取り上げ分析用試料とした。なお，飼育試験中の平均水温および平均溶存酸素量は，それぞれ20.1～21.0℃および7.11～7.19mℓ/ℓであった。

Table 2-7. Composition of the experimental diets for yellowtail (%)

Ingredient	Diet No.	
	1	2
Brown fish meal	65	65
Active wheat gluten	10	10
White dextrin	6.5	6.5
Vitamin mixture (TH-4 *1)	3	3
Mineral mixture (T-4 *2)	2	2
Mineral mixture (O-1 *3)	0.5	0.5
CMC	2	2
Cellulose	2	2
Sardine oil	9	9
L-Ascorbic acid	0	2
Water	50	50

*1; contained 675,000 IU vitamin A, 60,000 IU vitamin D3, 4.0g DL-α-tocopherol acetate, 2.56716g menadione sodium hydrogen sulfite,0.8g thiamine nitrate, 1.467g riboflavin, 0.8g pyridoxine hydrochloride, 2.38g nicotinamide, 2.38051g pantothenic acid, 4.667g calucium salts,194.7g choline chloride, 0.8g folic acid, 0.01067g cyanocobalamine, 0.04667g D-biotin, 56.34g inositol, 31.3g L-ascorbic acid, 476.27g cellulose per kg of vitamin mixture.

*2; contained 206g KH_2PO_4, 141g $Ca(CH_3CHOHCOO)_2 \cdot 5H_2O$, 83g iron proteinate, 309g $Ca_2H_2PO_4$, 261g cellulose per kg of mineral mixture.

*3; contained 12.5g $MgSO_4$, 0.1g $CoCl_2$, 4g $CuSO_4$, 19.97g $ZnSO_4$, 0.3g KIO_3, 900g dextrin, 63.13g cellulose per kg of mineral mixture.

黄疸原因菌培養法

原因菌接種試験には，前章第２節と同じ菌株を使用した。菌培養は，前章第２節と同様に，Iida and Sorimachi[48]の方法に準じておこなった。

黄疸原因菌接種試験

アスコルビン酸添加飼料を5日間給与後，1区では9尾および2区では10尾のブリに8.4x10^{7}cell/尾となるように調整した原因菌を含むL-15培養液を腹腔内に接種し，9日後にすべての供試魚を取り上げた。なお，原因菌接種試験期間は無給餌とした。

α-トコフェロール測定法

飼料，肝臓および血漿中のα-トコフェロールは，前章第１節と同様に，Yamauchi *et al.*[29]のHPLC法によって測定した。飼料，肝臓および血漿中の値は，それぞれμg/g dry weight，μg/gおよびμg/mℓで示した。

アスコルビン酸及びデヒドロアスコルビン酸測定法

飼料，肝臓および血漿中のアスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸の定量は，前章第１節と同様に，Ito *et al.*のAsAとDAsAのHPLC同時定量法を用いた。[30]飼料，肝臓および血漿中の値は，それぞれμg/g dry weight，μg/gおよびμg/mℓで示した。

血液中黄疸原因菌の検出

接種9日後に，対照区および接種区共に3尾ずつ血液塗末標本を作製し，ギムザ染色をしたのち顕微鏡観察をおこない，黄疸原因菌を検出した。赤血球500個当たりの原因菌数が0以上で10以下を+，全く

検出されないと-として示した。

血液ヘモグロビン測定法

前章第1節と同様に，Kawatsuのシアンメトヘモグロビン法にて測定し，mg/mℓで示した。[27)]

ビリルビン測定法

前章第1節と同様に，Izumi *et al.*[31)]の抗原抗体反応を利用したELISA（酵素抗体）法により測定し，値をμMで示した。

統計処理

分析値は，各区の供試魚を個体別に分析し，平均値±標準偏差で示し，Duncan[33)]のマルチプルレンジテスト（新多重範囲検定法）により統計処理した。

結果

試験飼料中のアスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸含量

試験飼料中のアスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸含量をTable 2-8に示した。飼料1にはアスコルビン酸カルシウム塩を94mg/100 g 飼料，飼料2には飼料1のアスコルビン酸カルシウム塩に加え2000mg/100 g 飼料の濃度でアスコルビン酸を添加したが，飼料調製後のアスコルビン酸含量は，デヒドロアスコルビン酸[65)]を加えても飼料1では21.8mg/100 g 飼料，飼料2では1018mg/100 g 飼料であった。

血液中の黄疸原因菌数

黄疸原因菌接種ブリ血液中の菌数をTable 2-9に示した。

Table 2-8. Cotents of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in the experimental diets (mg/100 g dry weight diet)

	Diet no.	
	1	2
Ascorbic acid	1.2	776
Dehydroascorbic acid	21	242
Total ascorbic acid	22	1018

Table 2-9. Number of the bacteria in the blood of yellowtail injected with jaundice-causing bacteria

Diet no.	Group	Fish no.	Number of jaundice-causing bacteria in the blood									
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Initial		-[*1]	-	-	-						
	Injected		-	-	-	-	+[*2]	+	-	+	+	
2	Initial		-	-	-							
	Injected		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

[*1] -, not detectd.

[*2] +, number of bacteria/500 red blood cells<10.

1区および2区のいずれも，黄疸原因菌接種前において原因菌は全く認められなかった。菌接種後では，1区で9尾のうち4尾，2区では10尾のうち2尾からそれぞれ原因菌が認められた。

血液ヘモグロビン含量，比肝重値および比脾臓重値

血液ヘモグロビン含量，比肝重値および比脾臓重値をTable 2-10に示した。菌接種後の血液ヘモグロビン含量は，いずれの試験区においても菌接種前の値に比べ有意に低く，黄疸原因菌による溶血が認められた。また，菌接種後の1区と2区との血液ヘモグロビン含量を比較すると，2区の方が有意に高く，アスコルビン酸給与により溶血が抑制された。1区の比肝重値は，前章第２，３節および本章第１節における原因菌接種試験と同様に，接種前と比べ有意に増加した。一方，2区の比肝重値は，菌接種前では1区の値と比べ異常に高かったが，菌接種後では1区の値と比べ有意に低下した。比脾臓重値は1区および2区共に菌接種により有意に増加したが，2区の方がその増加は少なかった。

血漿ビリルビン含量

血漿ビリルビン含量をTable 2-11に示した。試験開始時における血漿ビリルビン含量は，いずれの区も検出限界以下(0.05μM)であった。これに対し，原因菌接種後では1区および2区のいずれも，死亡はみられなかったが，血漿ビリルビン含量は増加し，すべてのブリに黄疸が発症した。しかし，血漿ビリルビン含量に有意な区間差はなかったが，1区の増加は有意であったのに対し，2区の増加は有意ではなかった。

Table 2-10. Hemoglobin contents in the blood, and hepatosomatic and spleensomatic indices of yellowtail fed high ascorbic acid diet and followed by injection of jaundice-causing bacteria

	Diet 1		Diet 2	
Groups	Initial(4)[*1]	Injected(9)[*1]	Initial(9)[*1]	Injected(10)[*1]
Hemoglobin(g /dℓ)	21.1±1.50[a]	6.80±1.52[b]	20.8±0.43[a]	9.21±1.79[c]
Hepatosomatic index	1.18±0.06[ac]	1.43±0.11[b]	1.57±0.08[a]	1.19±0.22[c]
Spleensomatic index	0.11±0.03[a]	0.55±0.20[b]	0.07±0.01[a]	0.40±0.14[c]

[*1] Number in parenthesis are number of samples for analysis.

Values are mean ± standard deviation for number of sample. Values with the same superscripts are not significantly different ($P<0.05$).

Table 2-11. Bilirubin levels in the plasma of yellowtail fed high ascorbic acid diet and followed by injection of jaundice-causing bacteria

	Bilirubin (μM)	
Diet no.	Initial	Injected
1	n.d.[*1] [a](4)[*2]	0.64±0.60 [b](9)[*2]
2	n.d. [a](3)[*2]	0.38±0.29 [ab](10)[*2]

[*1] n.d.; not detected (less than 0.05μM).

[*2] Number in parenthesis are number of samples for analysis.

Values are mean ± standard deviation for number of sample. Values with the same superscripts are not significantly different (P<0.05).

すなわち，飼料100ｇ当たり外割で2000mgのアスコルビン酸を添加した飼料を5日間給与することにより，細菌性溶血性黄疸の症状を軽減できた。

肝臓および血漿アスコルビン酸およびα-トコフェロール含量

肝臓と血漿のアスコルビン酸およびα-トコフェロール含量をTable 2-12に示した。原因菌接種前の肝臓アスコルビン酸含量は，飼料のアスコルビン酸含量を反映し，2区の含量が1区の含量に比べ有意に高かった。菌接種後の肝臓アスコルビン酸含量は1区および2区共に減少し，特に2区は有意に減少した。肝臓デヒドロアスコルビン酸含量は1区および2区のいずれも，菌接種により増加する傾向を示した。肝臓α-トコフェロール含量は菌接種によりいずれの試験区も減少したが，特に1区の値は有意に減少した。菌接種前の血漿アスコルビン酸およびデヒドロアスコルビン酸含量は，2区の含量が1区より高く，飼料のアスコルビン酸含量を反映していた。菌接種後の血漿アスコルビン酸，デヒドロアスコルビン酸およびα-トコフェロール含量は1区および2区のいずれも，菌接種前の値に比べ減少し，特に2区のそれらの値は有意に減少した。

Table 2-12. Ascorbic acid, dehydroascorbic acid and α-tocopherol levels in the liver and plasma of yellowtail fed high ascorbic acid diet and followed by injection of jaundice-causing bacteria

	Diet 1		Diet 2	
Groups	Initial(4)[*1]	Injected(3)[*1]	Initial[*2]	Injected[*2]
Liver				
Ascorbic acid(μg/g)	45.8±10.9 [a]	27.8±6.58 [a]	622±63.1 [b]	97.4±10.7 [a]
Dehydroascorbic acid(μg/g)	71.3±37.5 [a]	107±6.30 [ab]	97.8±9.18 [ab]	127±23.5 [b]
α-Tocopherol(μg/g)	572±249 [a]	154±50.6 [b]	487±96.4 [ac]	221±40.1 [bc]
Plasma				
Ascorbic acid(μg/mℓ)	0.28±0.18 [a]	0±0 [a]	407±54.6 [b]	4.42±0.89 [a]
Dehydroascorbic acid(μg/mℓ)	5.98±3.80 [ac]	0±0 [a]	58.9±10.3 [b]	16.8±1.53 [c]
α-Tocopherol(μg/mℓ)	26.0±4.45 [ac]	14.2±3.96 [bc]	33.4±7.69 [a]	12.0±1.99 [b]

[*1] Number in parenthesis are number of samples for analysis.

[*3] Number of samples used for analysis was 3. The liver and plasma were pooled from 3-4fish, respectively, and three samples were analyzed.

Values are mean ± standard deviation for number of sample. Values with the same superscripts are not significantly different ($p<0.05$).

考察

飼料100 g 当たり外割で2000mgのアスコルビン酸を添加した飼料を5日間ブリに与えることにより，典型的な細菌性溶血性黄疸の症状である血液ヘモグロビン含量の減少，比肝重値および比脾臓重値の増加を明らかに抑えることが出来た。加えて，血漿ビリルビン含量の増加も，抑制される傾向を示した。これらの結果は，ブリへのアスコルビン酸の大量給与が，細菌性感染により発症する黄疸の症状を軽減できることを示している。

アスコルビン酸が，水溶液中の活性酸素を迅速に消去することはよく知られている。[63, 66]May *et al.*は，細胞質中のアスコルビン酸は細胞膜に存在するα-トコフェロールを還元し，細胞膜の損傷を効率的に防ぐ作用を持つと報告している。[67]さらにMay *et al.*はアスコルビン酸のα-トコフェロール再生作用が，血球膜のα-トコフェロール減少と脂質過酸化を抑制すると報告している。[68]したがって，今回アスコルビン酸給与によりブリの黄疸症状が軽減されたことは，アスコルビン酸単独の抗酸化作用に加えて，アスコルビン酸のα-トコフェロール再生作用が相乗的に作用し，原因菌が引き起こす溶血による酸素ストレスの増加を強く抑制したためと考えられる。

今回の試験において，養殖業者自らが調整可能なシングルモイスト飼料を用い，5日間の給与により黄疸症状の軽減認められたことから，高アスコルビン酸飼料を短期間給与し，酸素ストレスを抑制する飼育管理方法は，ブリ養殖場において細菌性溶血性黄疸を軽減す

る緊急対策として有効であると考えられる。

総括

体色の黄化と高ビリルビン血症を症状とする養殖ブリの黄疸について，反町らは，黄疸を発症したブリから細菌を分離し，その原因細菌を健康魚に接種すると，黄疸が発症したことから，ブリの黄疸は細菌性溶血性黄疸であると報告した。[2,4]しかし，原因菌の感染による溶血がどのようにビリルビン生成に係わっているかについて触れられていない。一方，Sakai *et al.*は，その発症魚組織中のα-トコフェロールおよびアスコルビン酸含量が低く，2-チオバルビツール酸反応物質(TBARS)が異常に高いことから，黄疸発症は生体内脂質過酸化の進行が関与すると報告した。[5]さらに，Sakai *et al.*は発症魚の血漿中にビリルビンの酸化生成物(Substance X)が存在することを認め，発症魚が過酷な酸素ストレスを受けていると報告した。[6]しかしこの研究においても，[5,6]生体内脂質過酸化の進行および酸素ストレスがどのように黄疸の発症に関与するかを明らかにしておらず，発症機構の解明に至っていない。そこで本研究において，著者は酸素ストレスが黄疸を引き起こす要因となるのか，また原因菌により溶血を引き起こしたブリ体内に酸素ストレスの増加が生じているかについて検討し，ブリの細菌性溶血性黄疸の発症機構を明らかにした。さらに，これら結果に基づき，抗酸化剤添加飼料を給与し，酸素ストレスを抑制する飼育管理方法によりブリの黄疸を予防できることについて検討した。

先ず，ブリの黄疸発症と酸素ストレスとの関係をより明確にする

には，原因菌が感染していない条件下で，体内の酸素ストレスの増加が黄疸の発症を引き起こすことを明らかにすることが重要と考えた。そこで，ブリにラジカル発生剤であるフェニルヒドラジンを投与した結果，ブリ血漿のTBARS値の増加と，α-トコフェロールおよびアスコルビン酸の減少を生じた(Table 1-4)。すなわち，フェニルヒドラジン投与によりブリ体内の酸素ストレスが高まった。さらに，フェニルヒドラジン投与はブリ肝臓のヘムオキシゲナーゼmRNAを増加し，高ビリルビン血症を起こした(Fig. 1-2,3)。

哺乳類において酸素ストレスが増加すると，ビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼ(EC 1.14.99.3.)が誘導される。[17, 23-25] これらの報告と同様に，今回のフェニルヒドラジン投与によるブリ体内の酸素ストレスの増加はヘムオキシゲナーゼの誘導に関与した。すなわち，酸素ストレスの増加はビリルビンの合成を促進し，ブリの黄疸が発症する上で重要な因子であると示唆された。Yamaguchi *et al.*は，エンドトキシンの接種により酸素ストレスが高まったODS-od/odラットにおいて，ビリルビンがアスコルビン酸と相互的な抗酸化剤として作用し，自らはbilirubin oxidative metabolites (BOM)に変化すると報告している。[17]魚類においても，Sakai *et al.* は黄疸を発症したブリ血漿中にビリルビンの酸化生成物(Substance X)が存在することを報告している。[6]これらの報告と今回の結果と考え併せると，魚類においても酸素ストレスの増加がヘムオキシゲナーゼを誘導し，低分子抗酸化物質のビリルビンを能動的に合成していると考えられる。

次いで，細菌感染により発症するブリの黄疸と酸素ストレスとの

関係を明らかにするため，黄疸原因菌をブリに腹腔内接種し，感染魚肝臓のトリグリセリドヒドロペルオキシドとフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド含量を調べた。その結果，反町らの報告[2]と同様に，著しい溶血を伴い黄疸を発症したブリの肝臓トリグリセリドヒドロペルオキシドとフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド含量は有意に増加した。生体内の脂質ヒドロペルオキシドは活性酸素種による脂質からの水素引き抜き反応および二重結合への付加反応により生成される。[21]すなわち，黄疸発症魚の肝臓トリグリセリドヒドロペルオキシドおよびフォスファチジルコリンヒドロペルオキシド量の増加は，肝臓内での活性酸素の増加を示している。その増加の要因としては原因菌による溶血の関与が考えられる。浅田らは，溶血により生じるオキシヘモグロビンは自動酸化により活性酸素を生成すると述べている。[51]また，Stocker *et al.*はヘモグロビンから生じるヘムはラジカル反応の触媒作用をすると報告している。[45]さらに，溶血によりむき出しとなったヘモグロビンは脂質ヒドロペルオキシドや過酸化水素と接触すると鉄を放出し，[52]放出された鉄は脂質過酸化とヒドロキシラジカルの形成を助長する。[53]すなわち，著しい溶血は連鎖的に活性酸素を生成し，過酷な酸素ストレスを引き起こす。

下村は，[14]黄疸を発症した養殖ブリについて，その血漿ビリルビンと肝臓および脾臓の病理組織について調べた。その結果，高ビリルビン血症には抱合型を主とするタイプと非抱合型を主とするタイプの二つのタイプがあること，および前者では肝臓の壊死は少なく，

後者では肝臓の壊死が進行していることを示した。さらに下村は，黄疸ブリ胆管において塞栓物質を認めなかったことから，胆汁のうっ滞により黄疸が発症する可能性を否定している。Sakai *et al.*は黄疸ブリ血漿においてタウリン含量が正常魚より有意に少ないと報告している。[6]この結果は，ブリのビリルビン抱合体の大部分がタウロビリルビンであることを考えると，[10]黄疸発症とタウリンとの間に重要な関係があると推察される。

本試験の結果より，ブリの細菌性溶血性黄疸は，原因菌の引き起こした溶血により増加した酸素ストレスがビリルビン合成の律速酵素であるヘムオキシゲナーゼを誘導し，ビリルビンの過剰産成により発症すると考えられる。その際，増加した酸素ストレスは脂質ヒドロペルオキシドを生成し，連鎖的な脂質過酸化の進行を引き起こし，α-トコフェロールおよびアスコルビン酸等の抗酸化物質含量を低下させ，Sakai *et al.*[5]が報告している養殖ブリの黄疸症状が生じる。さらに，酸素ストレスが発生した際，体内の抗酸化物質含量が多いことなどにより，酸素ストレスに対する抵抗性が高い場合には，活性酸素による肝臓への障害が抑えられるため，生成されたビリルビンは肝臓において抱合され，抱合ビリルビンが多いタイプの黄疸となる。対して，逆に酸素ストレスに対する抵抗性が低い場合には，活性酸素による肝臓への障害が起こり，ビリルビンの抱合が抑制され，非抱合ビリルビンが多いタイプの黄疸が発症すると考えられる。

上記の通り，細菌性溶血性黄疸には酸素ストレスが重要な役割を果たすことから，黄疸を防ぐためには原因菌の感染時に増加する活

性酸素を消去すればよいと考えた。そこで，抗酸化剤を添加した飼料を給与し，酸素ストレスを抑制する飼育管理方法によってブリの黄疸を予防できることについて検討した。先ず，α-トコフェロール補足飼料を給与したブリによる黄疸の発症の予防を試みた。すなわち，α-トコフェロールを100 g あたり12（1区）または88mg（2区）添加したエクストルーダー飼料を46日間ブリに給与後，原因菌を接種し黄疸症状の程度を調べた。その結果，飼育成績には飼料α-トコフェロール含量による差異は認められなかった。しかし，高α-トコフェロール飼料を給与したブリ（2区）は，1区の対照魚と比較し血漿および肝臓の脂質過酸化が抑制され(Table 2-4)，GOTおよびGPT活性は低かった(Table 2-3)。これらの結果，1区と比べ2区の魚はα-トコフェロールの抗酸化作用により脂質過酸化が抑制され，酸素ストレスに対する抵抗性が高いと考えられる。しかし，これら魚に黄疸原因菌を接種した結果，接種7日後の死亡率は，2区の方が1区に比べ高かった。さらに，血漿ビリルビン含量も2区の値が1区より高く，比肝重値および比脾臓重値の増加，ヘマトクリット値，血液ヘモグロビン含量および赤血球数の減少，さらに血漿TBARS値の増加も2区が1区に比べ進行した。すなわち，2区のブリがより重篤な黄疸を発症した。

生体内のα-トコフェロールは抗酸化作用を果たすと自らは酸化されα-トコフェロキシラジカルとなる。その後，α-トコフェロキシラジカルはアスコルビン酸により再還元されα-トコフェロールに戻る。[58]本試験において，2区の飼育試験終了時における血漿α-トコフェロール含量は88.8μ g /mℓであったのに対し，血漿アスコルビン酸含量は飼

育試験終了時で0.2μg/mℓと非常に少なく，菌接種7日後ではさらに減少し検出限界値以下であった。この結果とα-トコフェロールの機能とを考え併せると，α-トコフェロールの蓄積量に比べ，アスコルビン酸量の少なかった2区のブリの体内ではアスコルビン酸によるα-トコフェロキシラジカルの再還元ができず，その結果，蓄積したα-トコフェロキシラジカルが酸素ストレスの増加となり，重篤な黄疸を引き起こす要因になったと考えられる。この結果から，ブリの黄疸の予防にはα-トコフェロール給与だけでなく，アスコルビン酸の給与も重要であると考えられた。

そこで次に，アスコルビン酸の活性酸素消去剤および抗酸化剤としての役割に着目し，100g当たり2000mgのアスコルビン酸を外割で補足した飼料で5日間飼育したブリに黄疸原因菌を接種し，黄疸症状の軽減効果について検討した。原因菌の接種により，対照区および高アスコルビン酸給与区のすべてのブリが黄疸を発症したが，高アスコルビン酸飼料を5日間ブリに給与することにより，典型的な細菌性溶血性黄疸の症状である血液ヘモグロビン含量の減少，比肝重値および比脾臓重値の増加を明らかに抑えた。加えて，血漿ビリルビン含量の増加も，抑制される傾向を示した。すなわち，高アスコルビン酸飼料の短期間給与により，原因菌感染により発症するブリ黄疸の症状を軽減できた。

アスコルビン酸が，水溶液中の活性酸素を迅速に消去することはよく知られている。[63, 66]May *et al.*[67]は，細胞質中のアスコルビン酸は細胞膜に存在するα-トコフェロールを還元し，細胞膜の損傷を効率

的に防ぐ作用を持つと報告している。さらにMay *et al.*[68]はアスコルビン酸のα-トコフェロール再生作用が，血球膜のα-トコフェロール減少と脂質過酸化を抑制すると報告している。したがって，飼料100 g当たり外割で2000mgのアスコルビン酸を補足した高アスコルビン酸飼料給与によりブリの黄疸症状が軽減されたことは，アスコルビン酸の単独の抗酸化作用に加えて，アスコルビン酸のα-トコフェロール再生作用が相乗的に作用し，原因菌が引き起こす溶血による酸素ストレスの増加を強く抑制したためと考えられる。すなわち，高アスコルビン酸飼料を短期間給与し，酸素ストレスを抑制する飼育管理方法は養殖ブリの黄疸の症状を軽減する緊急対策として有効であると考えられる。

謝辞

本論文について，終始多大な御指導，御鞭撻を戴きました宮崎大学農学部　村田　寿教授に衷心より謝意を表します。

本論文をまとめるにあたり御指導並びに御校閲を賜りました宮崎大学農学部　境　正教授，宮崎大学農学部　山内　清教授，鹿児島大学水産学部　手島新一教授，鹿児島大学水産学部　田中淑人教授に厚く御礼申しあげます。

細菌培養および菌数測定について御指導くださいました宮崎大学農学部　吉田照豊助教授に感謝の意を表します。さらに，組織の病理組織学的検査について御指導をいただいた宮崎大学農学部　延東真助教授に深謝致します。

本研究遂行にあたり，多大な御協力を賜りました東京医科歯科大学　山口登喜夫助教授，宮崎県水産試験場　山田卓郎氏，毛良明夫氏および大山　剛氏，宮崎大学大学院生　山崎義弘氏に感謝の意を表します。

本論文の提出にあたり，水産庁養殖研究所病理部長　反町　稔博士（現企画連絡室長）には甚大なる御理解と御配慮を賜りました。また，水産庁養殖研究所病理部長　井上　潔博士には多大なる御理解と種々の御配慮を賜りました。さらに，水産庁養殖研究所病理部ウイルス研究室長　中島員洋博士には格別の御理解，御配慮並びに御助言を賜りました。ここに記して，心から感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり，経済的並びに精神的な支援をしてくれた

両親に深謝します。

文献

1) 図説　漁業白書（平成12年度版），財団法人　農林統計協会編，東京，2000

2) 反町　稔，前野幸男，中島員洋，井上　潔，乾　靖夫: 養殖ブリ“黄疸症”の原因. 魚病研究, **28**, 119-124 (1993).

3) 反町　稔，前野幸男: ブリ“黄疸症”原因菌の各種薬剤に対する感受性. 魚病研究, **28**, 141-142 (1993).

4) 前野幸男，中島員洋，反町　稔，乾　靖夫: 養殖ブリ黄疸の病態生理. 魚病研究, **30**, 7-14 (1995).

5) 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).

6) T. Sakai, H. Murata, M. Endo, T. Shimomura, K. Yamauchi, T. Ito, T. Yamaguchi, H. Nakajima, and M. Fukudome: Severe oxidative stress is thought to be a principal cause of jaundice of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, **160**, 205-214 (1998).

7) 橋本信也：症状の起こるメカニズム，医学書院，東京，1995, pp. 102-105.

8) D. J. Ostrow, *Overview of bile pigment metabolism,* in *Bile pigment and jaundice,* D. J. Ostrow, Editor 1986, Marcel Dekker Inc.: New York. p. 1-6.

9) L. Fang, and L. J. Bada: Biliverdin reductase activity in marine fishes. *Marine Biol. Lett.*, **3**, 121-130 (1982).

10) T. Sakai, K. Watanabe, and H. Kawatsu: Occurrence ditaurobilirubin, bilirubin conjugated with two moles of taurine, in the gallbladder bile of yellowtail Seriola quinqueradiata. *J. Biochem.*, **102**, 793-796 (1987).

11) H. Kawatsu, and T. Sakai: Hyperbilirubinemia in cultured eel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish*, **46**, 809-812 (1980).

12) T. Sakai, T. Shimomura, M. Endo, H. Murata, M. Tashiro, and K. Yamauchi: Occurrence of hyperbilirubinemia in cultured red sea bream. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 328-329 (1993).

13) 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 Sci.*, **60**, 519-521 (1994).

14) 下村敏之：養殖魚の黄疸について. 宮崎大学大学院農学研究科, 修士論文, 宮崎大学, 宮崎, 1991.

15) R. Stocker, Y. Yamamoto, A. F. McDonagh, A. N. Glazer, and B. N. Ames: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, **235**, 1043-1046 (1987).

16) R. Stocker, A. N. Glazer, and B. N. Ames: Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5918-5922 (1987).

17) T. Yamaguchi, F. Horio, T. Hashizume, M. Tanaka, S. Ikeda, A.

Kakinuma, and H. Nakajima: Bilirubin is oxidized in rats treated with endotoxin and acts as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 11-19 (1995).

18) T. Yamaguchi, T. Hashizume, M. Tanaka, M. Nakayama, A. Sugimoto, S. Ikeda, H. Nakajima, and F. Horio: Bilirubin oxidation provoked by endotoxin treatment is suppressed by feeding ascorbic acid in a rat mutant unable to synthesize ascorbic acid. *Eur. J. Biochem*, **245**, 233-240 (1997).

19) 米井脩治，泉　忠秀：酸素ストレスによる適応応答の誘導とその機構,「活性酸素」（中野　稔，浅田浩二，大柳善彦編），共立出版，東京，1988，pp. 517-525.

20) 浅田浩二：活性酸素の生成・消去・作用，「活性酸素」（中野稔，浅田浩二，大柳善彦編），共立出版，東京，1988，pp. 7-12.

21) 吉川敏一,内藤裕二,近藤元治：活性酸素による生体の障害，「活性酸素種の化学」（日本化学会編）,学会出版センター, 東京, 1990, pp. 163-175.

22) 近藤元治：フリーラジカルって何だ？，株式会社　日本医学館，東京，1991，p. 35-70.

23) A. L. Applegate, P. Luscher, and M. R. Tyrrell: Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.*, **51**, 974-978 (1991).

24) F. G. Vile, and M. R. Tyrrell: Oxidative stress resulting from

ultraviolet a irradiation of human skin fibroblasta leads to a heme oxygenase-dependent increase in ferritin. *J. Biol. Chem.*, **268**, 14678-14681 (1993).

25) M. L. Tomaro, J. Frydman, and B. R. Frydman: Heme oxygenase induction by $CoCl_2$,Co-protophyrin IX, phenlyhydrazine, and diamide: evidence for oxidative involvement. *Arch. Biochem. Biophys.*, **286**, 610-617 (1991).

26) T. Yamaguchi, I. Shioji, A. Sugimoto, Y. Komoda, and H. Nakajima: Chemical structure of a new family of bile pigments from human urine. *J. Biochem.*, **116**, 298-303 (1994).

27) 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).

28) 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) 医歯薬出版株式会社, 東京, 1984, pp. 82-83.

29) 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. *Hippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **38**, 545-552 (1991).

30) 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. Chomatogr.*, **667**, 355-357 (1995).

31) Y. Izumi, M. Yamazaki, S. Shimizu, K. Shimizu, T. Yamaguchi, and H. Nakajima: Anti-bilirubin monoclonal antibody II. Enzyme-linked immunosorbent assay for bilirubin fractions by combination of two monoclonal antibodies. *Biochimca et Biophysica Acta*, **967**, 261-266 (1988).

32) S. P. Thomas: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, **77**, 5201-5205 (1980).

33) D. B. Duncan: Multiple range and multiple *F* tests. *Biometrics*, **11**, 1-42 (1955).

34) M. P. Hara, and F. Irwin: The oxidation of phenylhydrazine: Superoxide and Mechanism. *Biochemistry*, **15**, 681-687 (1976).

35) T. Sakai, N. Tabata, and K. Watanabe: Bile pigments in the bile of marine fish: yellowtail, red sea bream, and flounder. *Agric Biol. Chem*, **54**, 2047-2053 (1990).

36) T. D. Bates, and C. C. Winterbourn: Haemoglobin denaturation, lipid peroxidation and haemolysis in phenylhydrazine-induced anaemia. *Biochimca et Biophysica Acta*, **798**, 84-87 (1984).

37) 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 fish. *Fisheries Sci.*, **62**, 64-68 (1996).

38) M. Noguchi, T. Yoshida, and G. Kikuchi: Purification and properties of biliverdin reductases from pig spleen and rat liver. *J. Biochem.*, **86**, 833-848 (1979).

39) P. E. Braggins, G. M. Trakshel, and R. K. Kutty: Characterization of two heme oxygenase isoforms in rat spleen: comparison with the hematin-induced and constitutive isoforms of the liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **141**, 528-533 (1986).

40) G. M. Trakshel, and M. D. Maines: Multiplicity of heme oxygenase isozymes. *J. Biol. Chem.*, **264**, 1323-1328 (1989).

41) G. M. Trakshel, J. F. Ewing, and M. D. Maines: Hetrogeneity of haem oxygenase 1 and 2 isoenzymes: Rat and primate transcripts for isoenzyme 2 differ in number and size. *Biochem. J.*, **275**, 159-164 (1991).

42) S. Taketani, H. Kohno, T. Yoshinaga, and R. Tokunaga: The human 32-kDa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS LETTERS*, **245**, 173-176 (1989).

43) S. M. Keyse, and R. M. Tyrrell: Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 99-103 (1989).

44) D. M. Maines: Regulation of heme oxygenase, in "Heme oxygenase-clinical appliation and function" (ed. by D. M. Maines) CRC Press Inc., New York, 1992, pp. 155-201.

45) R. Stocker: Induction of haem oxygenase as a defence against oxidative stress. *Free Radical Res. Commun.*, **9**, 101-112 (1990).

46) A. P. Denny, F. A. Mcdonagh, R. D. Spritz, A. P. Rogers, and K. D. Stevenson: Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia. *Free Radical Biol. Med.*, **19**, 295-404 (1995).

47) N. P. Hopkins, L. L. Wu, C. S. Hunt, C. B. James, M. G. Vincent, and R. R. Williams: Higher serum bilirubin is associated with decreased risk for early familial coronary artery disease. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.*, **16**, 250-255 (1996).

48) T. Iida, and M. Sorimachi: Cultural characteristics of the bacterium causing jaundice of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Fish Pathology*, **29**, 25-28 (1994).

49) I. Suda, S. Furuta, and Y. Nishiba: Fluorometric determination of a 1,3-dietyl-2-thiobarbituric acid-malondialdehyde adduct as an index of lipid peroxidation in plant materials. *Biosci. Biotecnol. Biochem.*, **58**, 14-17 (1994).

50) 浅田浩二，中野　稔: 自動酸化による活性酸素発生，「活性酸素」（中野　稔，浅田浩二，大柳善彦編），共立出版，東京，1988, pp. 124-128.

51) J. Gutterrige: Iron promoters of the fenton reaction can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett*, **201**, 291-295 (1986).

52) D. K. Dipak, E. B. Walter: 酸素ラジカルと疾病（高宮和彦，加藤

博通，早瀬文孝，吉川敏一）建帛社，東京，1992，pp. 1-32.

53) 中村哲也: トコフェロール，「活性酸素」（中野　稔，浅田浩二，大柳善彦編），共立出版，東京，1988，pp. 327-334.

54) F. Carmagnol, M. Sinet F., and H. Jerome: Selenium-dependent and non-selenium-dependent glutathione peroxidases in human tissue extracts. *Biochim. Biophys. Acta*, **759**, 49-57 (1983).

55) T. Sakai, H. Murata, K. Yamauchi, T. Sekiya, and M. Ukawa: Effects of dietary lipid peroxides contents on *in vivo* lipid peroxidation, α-tocopherol contents, and superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in the liver of yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1481-1486 (1992).

56) H. R. Bisby, and W. A. Parker: Reaction of ascorbate with the α-tocopheroxyl radical in micellar and bilayer membrane systems. *Arch. Biochem. Biophys*, **317**, 170-178 (1995).

57) K. Mukai, K. Sawada, Y. Kohno, and J. Terao: Kinetic study of the prooxidant effect of tocopherol. Hydrogen abstraction from lipid hydroperoxides by tocopheroxyls in solution. *Lipids*, **28**, 747-752 (1993).

58) A. Kontush, B. Finckh, B. Karten, A. Kohlschutter, and U. Beisiegel: Antioxidant and prooxidant activity of α-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J. Lipid Res.*, **37**, 1436-1448 (1996).

59) M. K. Brown, C. P. Morrice, and G. G. Duthie: Erythrocyte vitamin E and plasma ascorbate concentrations in relation to erythrocyte

peroxidation in smokers and nonsmokers: dose responce to vitamin E supplementation. *Am. J. Clin. Nutr.*, **65**, 496-502 (1997).

60) N. S. Meydani, and A. A. Beharka: Recent developments in vitamin E and immune response. *Nutrition Reviews*, **56**, S49-S58 (1996).

61) 関屋朝裕，村田　寿，境　正，山内　清，山下晴海，宇川正治，金井　学，嶋田元且: 高αートコフェロール魚粉飼料給餌によるブリ組織の脂質過酸化抑制および生体防御能強化の試み. 日水誌, **57**, 287-292 (1991).

62) 荒川信彦:「ビタミンハンドブック②水溶性ビタミン」(日本ビタミン学会編），化学同人，京都，1989，pp. 171-181.

63) 二木鋭雄: アスコルビン酸・グルタチオン，「活性酸素」（中野稔，浅田浩二，大柳善彦編），共立出版，東京，1988，pp. 321-326.

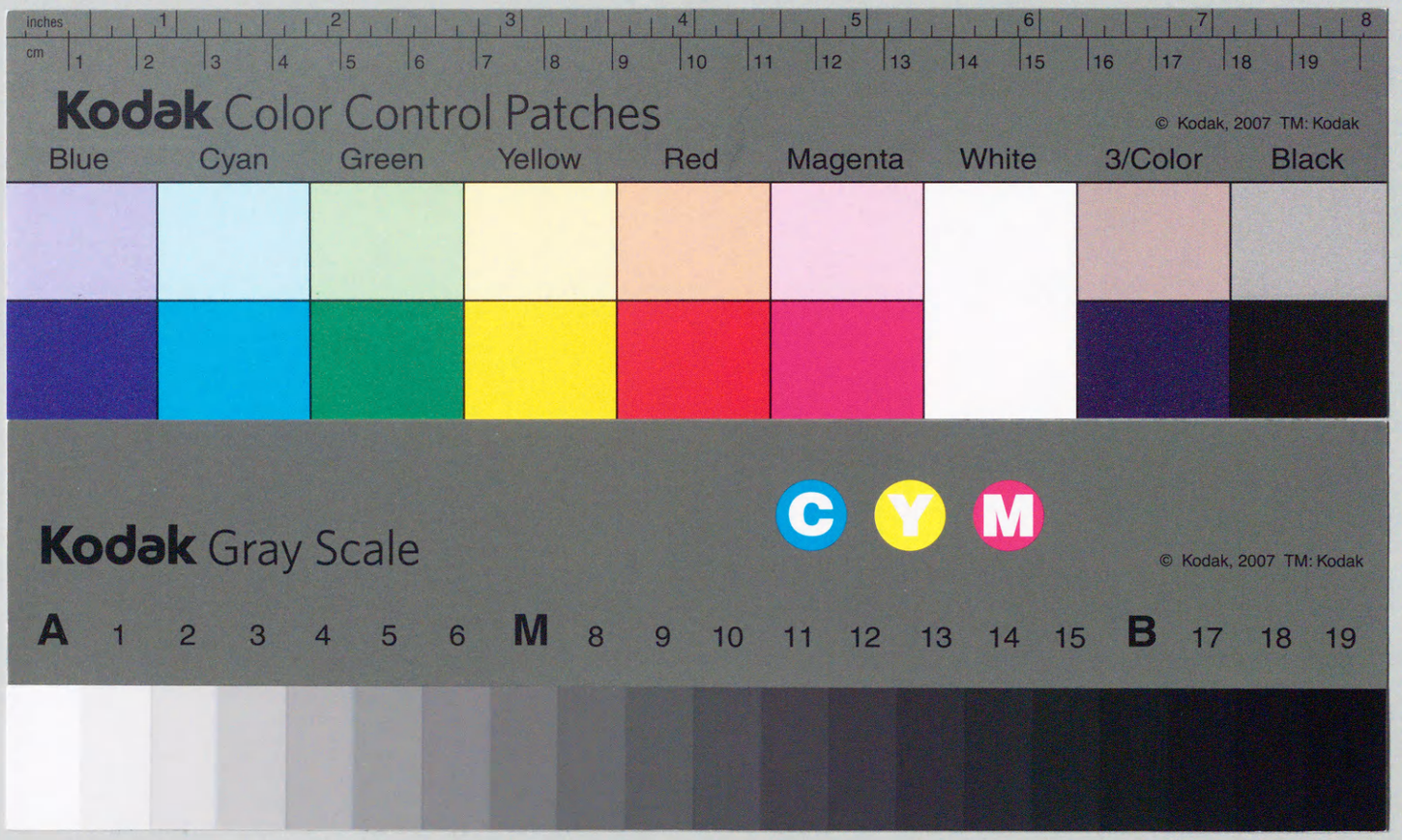
64) E. Niki, A. Kawakami, Y. Yamamoto, and Y. Kamiya: Oxidation of Lipids. VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposome in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull. Chem. Soc. Jpn*, **58**, 1971-1975 (1985).

65) M. Sato, T. Mitani, T. Miyazaki, R. Yoshinaka, and M. Sakaguchi: Efficacy of dehydro-L-ascorbic acid as a dietary vitamin C source in rainbow trout. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 171-176 (1993).

66) 二木鋭雄:　生体における酸素毒性に対する防御システム，「活性酸素種の化学」，（日本化学学会編）学会出版センター，東京，1990，pp. 177-190.

67) J. M. May, Z. C. Qu, and S. Mendiratta: Protection and recycling of alpha-tocopherol in human erythrocytes by intracellular ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophys.*, **349**, 281-289 (1998).

68) J. M. May, Z. Qu, J. D. Morrow, and C. E. Cobb: Ascorbate-dependent protection of human erthrocytes against oxidant generated by extracellular diazobenzene sulfonate. *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 47-53 (2000).


inches
1 2 3 4 5 6 7 8
cm
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
Kodak Color Control Patches
© Kodak, 2007 TM: Kodak
Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black
Kodak Gray Scale
C Y M
© Kodak, 2007 TM: Kodak
A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19