

高アスコルビン酸飼料給与によるブリの細菌性溶血黄疸軽減の試み

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
巻/号	662
掲載ページ	p. 298-299
発行年月	2000年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



短 報

高アスコルビン酸飼料給与によるブリの
細菌性溶血性黄疸軽減の試み

伊東尚史, 村田 寿, 大山 剛, 吉田照豊
境 正, 山内 清, 山口登喜夫, 宇川正治
(1999年3月31日受付)

An Attempt to Depress Jaundice of Yellowtail
Infected with Causative Bacteria by
Feeding High Ascorbic Acid Diet

Takafumi Ito,*¹ Hisashi Murata,*²
Tsuyoshi Oyama,*³ Terutoyo Yoshida,*²
Tadashi Sakai,*² Kiyoshi Yamauchi,*²

Tokio Yamaguchi,*⁴ and Masaharu Ukawa*⁵

キーワード: ブリ, 黄疸, 活性酸素, 酸化ストレス, ビ
リルビン, アスコルビン酸

著者らは、養殖ブリの細菌性溶血性黄疸は細菌が引き起こす溶血により発生した活性酸素がブリ肝臓のヘムオキシゲナーゼを誘導し、ビリルビンを過剰に合成することにより発症すると推測している。^{1),*6} この推測に基づいて、黄疸の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。

生体内のアスコルビン酸 (AsA) は活性酸素種を消去する。^{2,3)} Niki *et al* は、ウサギ赤血球の溶血が、AsAの抗酸化作用により抑制されると報告している。⁴⁾ このことから、ブリの体内においてもAsAは、ラジカル消去剤および抗酸化剤として活性酸素を効果的に消去し、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らは、アスコルビル-2-フォスフェイトマグネシウム塩を20 mg/100 g 配合されたエクストルーダ (EP) 飼料に外割で43 mg/100 gのAsA (C-oil-Riken, 理研ビタミン株式会社製) 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AsA給与量では黄疸の軽減効果を認めることができなかった。⁷⁾ 黄疸ブリの厳しい酸化ストレス⁶⁾を抑えるには、大量のラジカル消去剤を要するのではないかと考

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

Ingredient	Diets	
	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, 4.0 g DL- α -toco-pherol acetate, 2.56716 g menadione sodium hydrogen sulfite, 0.8 g thiamine nitrate, 1.467 g riboflavin, 0.8 g pyridoxine hydrochloride, 2.38 g nicotinamide, 4.667 g pantothenic acid calcium salts, 194.7 g choline chloride, 0.8 g folic acid, 0.01067 g cyanocobalamine, 0.04667 g D-biotin, 56.34 g inositol, 31.3 g L-ascorbic acid calcium salts, 476.27 g cellulose per kg of vitamin mixture.

*², contained 206 g KH₂PO₄, 141 g Ca(CH₃CHOHCOO)₂·5H₂O, 83 g iron proteinate, 309 g Ca₂H₂PO₄, 261 g cellulose per kg of mineral mixture.

*³, contained 12.5 g MgSO₄, 0.1 g CoCl₂, 4 g CuSO₄, 19.97 g ZnSO₄, 0.3 g KIO₃, 900 g dextrin, 63.13 g cellulose per kg of mineral mixture.

え、アスコルビン酸を大量に加えた飼料で飼育したブリを用いて、黄疸症状の軽減効果について検討した。

試験飼料には、魚粉をタンパク質源とし、AsAカルシウム塩を94 mg/100 g 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 (和光純薬工業株式会社製) を2%添加した高AsA飼料 (2区) を用いた (Table 1)。供試魚には、市販のEP飼料で飼育した平均体重460 gのブリ *Seriola quinqueradiata* 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

*¹ 鹿児島大学大学院連合農学研究科 (United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima University, Kagoshima, Kagoshima 890-8580, Japan).

*² 宮崎大学農学部 (Faculty of Agriculture, Miyazaki University, Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan).

*³ 宮崎県水産試験場 (Miyazaki Prefectural Fisheries Experimental Station, Miyazaki, Miyazaki 889-2162, Japan).

*⁴ 東京医科歯科大学難治疾患研究所 (Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Yushima, Bunkyo, Tokyo 113-8510, Japan).

*⁵ 丸紅飼料株式会社小野研究所 (Ono Research & Laboratory, Marubeni Feed Co. Ltd., Ono, Hyogo 675-1355, Japan).

*⁶ 村田 寿, 伊東尚史, 吉田照豊, 境 正, 山内 清, 毛良明夫: 養殖ブリの黄疸の発症と酸化ストレス. 平成8年度日本酸化脂質フリーラジカル学会第20回大会, 1996, p. 100.

*⁷ 毛良明夫, 村田 寿, 境 正, 吉田照豊, 伊東尚史, 山内 清, 宇川正治: アスコルビン酸補足EP飼料給与による養殖ブリ黄疸発症軽減の試み, 平成8年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 1996, p. 59.

Table 2. Liver and plasma ascorbic acid and α -tocopherol contents, plasma bilirubin contents, hemoglobin contents in the blood, and hepatosomatic and spleensomatic indices in yellowtail fed high ascorbic acid diet and followed by injection of jaundice-causing bacteria

Groups	Feeding test*1		9 Days post-injection*2	
	Diet 1 (4*3)	Diet 2 (3*4)	Diet 1	Diet 2
Liver				
Ascorbic acid ($\mu\text{g/g}$)	45.8 \pm 10.9 ^a	622 \pm 63.1 ^b	27.8 \pm 6.58* ^{5 a}	97.4 \pm 10.7* ^{5 a}
α -Tocopherol ($\mu\text{g/g}$)	572 \pm 249 ^a	487 \pm 96.4 ^{ac}	154 \pm 50.6* ^{5 b}	221 \pm 40.1* ^{5 bc}
Plasma				
Ascorbic acid ($\mu\text{g/ml}$)	0.28 \pm 0.18 ^a	407 \pm 54.6 ^b	0 \pm 0* ^{5 a}	4.42 \pm 0.89* ^{5 a}
α -Tocopherol ($\mu\text{g/ml}$)	26.0 \pm 4.45 ^{ac}	33.4 \pm 7.69 ^a	14.2 \pm 3.96* ^{5 bc}	12.0 \pm 1.99* ^{5 b}
Bilirubin (μM)	n.d. ^a	n.d. ^a	0.64 \pm 0.60* ^{6 b}	0.38 \pm 0.29* ^{7 ab}
Hemoglobin (mg/ml)	211 \pm 15.0 ^a	208 \pm 4.3 ^a	68.0 \pm 15.2* ^{6 b}	92.1 \pm 17.9* ^{7 c}
Hepatosomatic index	1.18 \pm 0.06 ^{ac}	1.57 \pm 0.08 ^a	1.43 \pm 0.11* ^{6 b}	1.19 \pm 0.22* ^{7 c}
Spleensomatic index	0.11 \pm 0.03 ^a	0.07 \pm 0.01 ^a	0.55 \pm 0.20* ^{6 b}	0.40 \pm 0.14* ^{7 c}

*1 Yellowtail were fed experimental diets for 5 days.

*2 Yellowtail were starved for 9 days after injection of causative bacteria.

*3 Number of samples used for analysis was 4. The liver, spleen, blood and plasma were not pooled, respectively.

*4 Number of samples used for analysis was 3. The liver, spleen, blood and plasma were not pooled, respectively.

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

*6 Number of samples used for analysis was 9. The liver, spleen, blood and plasma were not pooled, respectively.

*7 Number of samples used for analysis was 10. The liver, spleen, blood and plasma were not pooled, respectively.

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

7日間馴致した後、それぞれ各飼料を1日に1回魚体重の3%量を給与し、5日間飼育した。飼育試験終了後供試魚13尾のうち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。感染試験には、養殖場で発症した黄疸プリから分離した前報*6と同一の菌を用いた。1区では9尾、2区では10尾のプリに 1.2×10^7 cell/mlの原因菌を含むL-15培地の培養液を、それぞれ7ml腹腔内に接種し、9日後に全ての供試魚を取り上げた。攻撃後の飼育期間は無給餌とした。血液ヘモグロビン含量はシアンメトヘモグロビン法⁵⁾により、血漿ビリルビン含量はELISA法⁶⁾により測定した。AsAと α -トコフェロール(α -Toc)含量は、それぞれIto *et al.*⁷⁾およびYamauchi *et al.*⁸⁾のHPLC法により測定した。得られた値は、Duncan⁹⁾の新多重範囲検定法により統計処理した。

9日間の原因菌感染試験の結果、すべてのプリで黄疸が発症した。肝臓および血漿のAsAおよび α -Toc含量ならびに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 2に示した。2区の肝臓および血漿のAsA含量は、1区の値と比べ大量のAsAが蓄積していたが、菌接種により著しく減少した。肝臓および血漿の α -Toc含量も、AsAと同様に減少した。菌接種による血液ヘモグロビン含量の減少、比肝重値、比脾臓重値および血漿ビリルビン含量の増加は、いずれも1区と比べ2区の方が抑制され、黄疸症状は軽

度であった。前述したように、AsAの大量給与により高濃度に蓄積された肝臓AsAは、菌接種により著しく減少した(Table 2)。これは、細菌感染による溶血により生じた活性酸素を、AsAのラジカル消去作用により消去していることを示唆しており、その結果、黄疸症状が軽減されたと考えられる。

今回の試験では、外割で2%AsAを添加した飼料で、5日間の給与により黄疸症状の軽減効果が認められたことから、高AsA飼料の短期間給与は養殖場におけるプリ黄疸の軽減対策として十分活用できると考えられる。

文 献

- 1) 伊東尚史, 村田 寿, 境 正, 山内 清, 津田友秀, 山口登喜夫, 毛良明夫, 山田卓郎, 宇川正治: 日本水産, 65, 86-91 (1999).
- 2) 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, 1989, 京都. pp. 171-181.
- 3) 二本鋭雄: 「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. 177-190.
- 4) E. Niki: *Chem. Phys. Lipids.*, 44, 227-253 (1987).
- 5) H. Kawatsu: *Bull. Freshwater Res. Lab.*, 19, 161-167 (1969).
- 6) Y. Izumi, M. Yamazaki, S. Shimizu, K. Shimizu, T. Yamaguchi, and H. Nakajima: *Biochim. Biophys. Acta*, 967, 261-266 (1988).
- 7) T. Ito, H. Murata, Y. Yasui, M. Matsui, T. Sakai, and K. Yamauchi: *J. Chromatogr.*, 667, 355-357 (1995).
- 8) K. Yamauchi, H. Murata and T. Ohashi: *Agric. Biol. Chem.*, 44, 1061-1067 (1980).
- 9) D. B. Duncan: *Biometrics*, 11, 1-42 (1955).