

植物由来サポニン物質の経口投与による 魚類生体防御能促進効果

- Superoxide Dismutase 活性の亢進について -

武田州弘*・芦田貴行・沖増英治・雨村明倫

福山大学内海生物資源研究所

Augmentation of Host Defense of Yellow Tail to *Enterococcus seriolicida* Infection by the Oral Administration of Feed Containing Saponins.

Kunihiro Takeda, Takayuki Ashida, Eiji Okimasu and Akinori Amemura

(Research Institute of Marine Bioresources, Fukuyama University, Ohama-cho, Innoshima, Hiroshima 722-21, Japan)

Report Res. Inst. Marine Bioresources, Fukuyama Univ., No.7,19 -28 (1996).

We have been suggested that superoxide is used for defense from microbial infection, but, in the counter side, it may cause deterioration and pathogenesis of inflammation in various organs. We compared antioxidative enzymes, which comprise of cytosolic copper/zinc superoxide dismutase (Cu/Zn-SOD), mitochondrial manganese SOD (Mn-SOD) in various tissues of quillaja or beet saponin pre-feeding fishes with those in control tissues before and after the challenge of *Enterococcus seriolicida* infection.

Quillaja saponin feeding did not result in any change in the activity of Cu/Zn-SOD. But, we observed a progressive increase in Mn-SOD activity following the challenge. The enhanced antioxidative defense system is likely to play a significant role in the ultimate survival of individual.

* 現住所 : 福山通運 (株) 〒720 福山市東深津町4丁目20-1

近年、水産養殖業におけるマリンバイオテクノロジー技術は向上し、養殖魚の生産性も高まってきているが、それに伴い多様の魚病が発生し、大量弊死といった甚大な被害をもたらしている。本研究で扱う感染症、ブリの連鎖球菌症はブリ養殖において最も甚大な被害をもたらしている細菌感染症である。その発生機構を分析してみると、感染経路は餌料中や環境中に存在する病原菌が口腔を経て消化管内で増殖することによる経口感染が主であると言われている¹⁾。これら魚病細菌感染症においては、その症状が発見された後になって餌料とともに抗生物質、合成抗菌物質が投与されているのが現状である。しかし、これらの薬剤に対する耐性菌の出現が認められ、治療薬のほとんどはマクロライド系抗生物質が使用されているが、その魚体内の残留性が懸念されている。これからは、これら薬剤に代わる抗病機能や免疫賦活機能を備えた安全な物質の開発が望まれている。このような免疫賦活物質は投与した生体の細胞性免疫機構を刺激するものが多く、この機能活性を測定することにより、この物質の免疫賦活効果を評価することができる²⁾。

細菌感染症に伴う細胞性免疫応答機構の極早い段階で、様々な臓器組織内において Superoxide (O_2^-)、Hydrogen peroxide (H_2O_2) や Hydroxy radical ($\cdot OH$) といった活性酸素分子が発生し、異物排除に役だっている³⁾。また、この活性酸素分子は正常組織細胞に過酸化反応などにより、様々な構造・機能障害をもたらし、感染時の炎症や腫大の引き金をする、いわば「両刃の剣」である。そこで、生体にはこの酸化による障害を防ぐために、これら活性酸素分子消去機構や修復機構が誘導される。この活性酸素分子消去機構

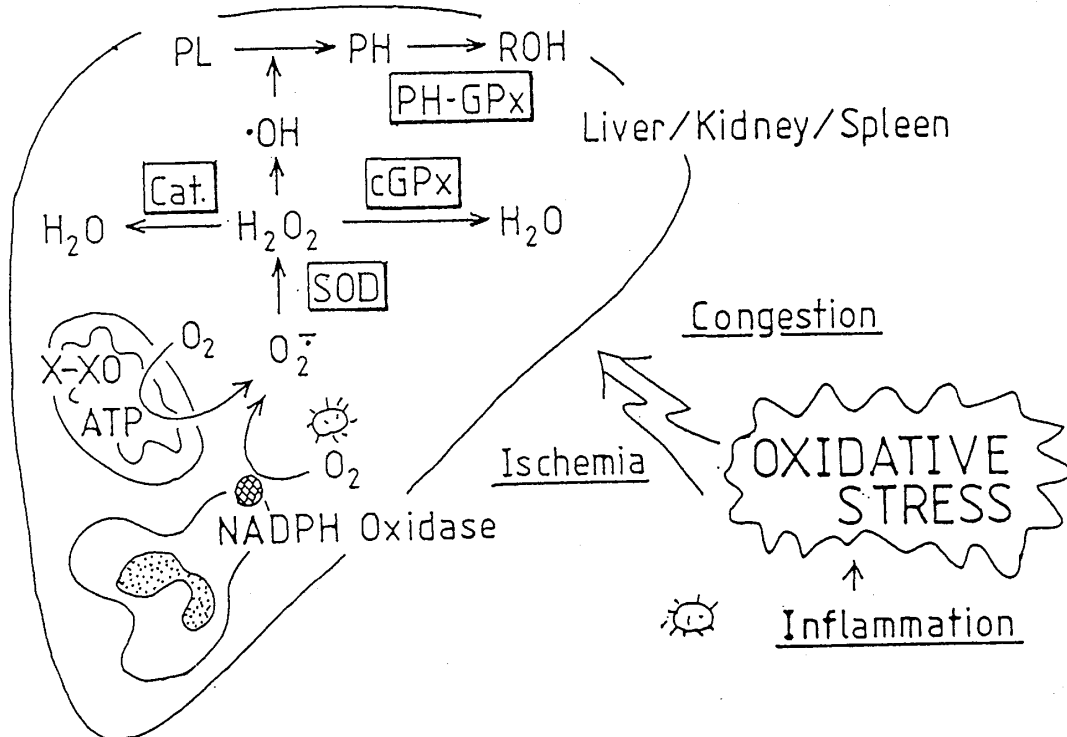


Fig.1 Production of Active Oxygens Induced by Oxidative Stresses.

には、Superoxide dismutase (SOD), Catalase (Cat.) や Glutathione peroxidase (c-GPx, PH-GPx) の各種活性酸素不均化酵素が関係している⁴⁾ (Fig. 1)。

細菌感染により発生した O_2^- をSODが H_2O_2 に変え、この分子をCat. とc-GPx, PH-GPxが不均化する。これらの酵素活性は生成される活性酸素量に応じて誘導されるため、感染症の程度により変化し、活性酸素のバランスを保とうとする⁵⁾。したがって、これらの各種活性酸素不均化酵素活性を測定することにより、生体防御能の程度を推測することが可能となる。

本研究では、植物由来で安全性も高く、生理活性機能を持つ2種のサポニン⁵⁾に着目した。これらの物質をブリに経口投与した後、連鎖球菌症の原因菌*Enterococcus seriolicida*を人為感染させ、延命効果を確かめると同時に、感染魚体臓器組織内のSuperoxide dismutase 酵素活性を測定し、病原菌感染防御効果を検索した。

材料および方法

飼育条件と実験区

実験に供したブリ (*Seriola quinqueradiata*: 平均体重145~230 g) は (財) 日本栽培漁業協会屋島分場より供与され、当研究所にて馴致した魚を使用した。200 l 青色水槽を4個用意し、それぞれ約150 l の海水をはり、3 l /min で注水し、5 l /min の通気を施した。実験中の平均水温は17℃であった。実験区と給餌条件は下記のごとくであった。

- | | |
|--------------------------|--|
| A : Control区 | 混合餌料200g/kg body weight |
| B : 感染Control区 | 混合餌料200g/kg body weight |
| C : Quillaja saponin 投与区 | 混合餌料200g/kg body weight
+ Quillaja saponin 5mg/kg body weight |
| D : Beet saponin 投与区 | 混合餌料200g/kg body weight
+ Beet saponin 5mg/kg body weight |

給餌スケジュールは2, 3日おきに1週間の試験給餌のあと、感染前4日間は毎日給餌し、感染後は無給餌とした (Fig. 2)。

細菌人為感染方法

魚体内通過させ、病原性を確認した*Enterococcus seriolicida*菌を、Brain heart infusion (BHI) 液体培地で予備培養の後、100 rpm, 25℃で4時間振とう培養し

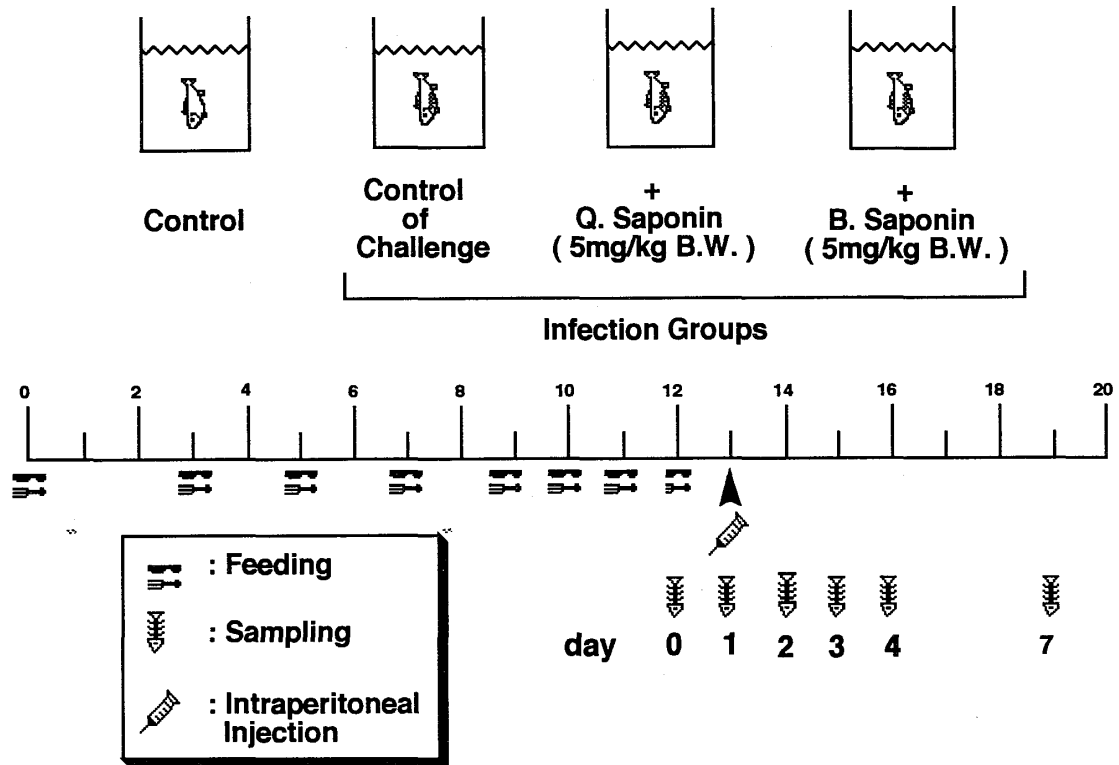


Fig. 2 Experimental Schedule and Conditions.

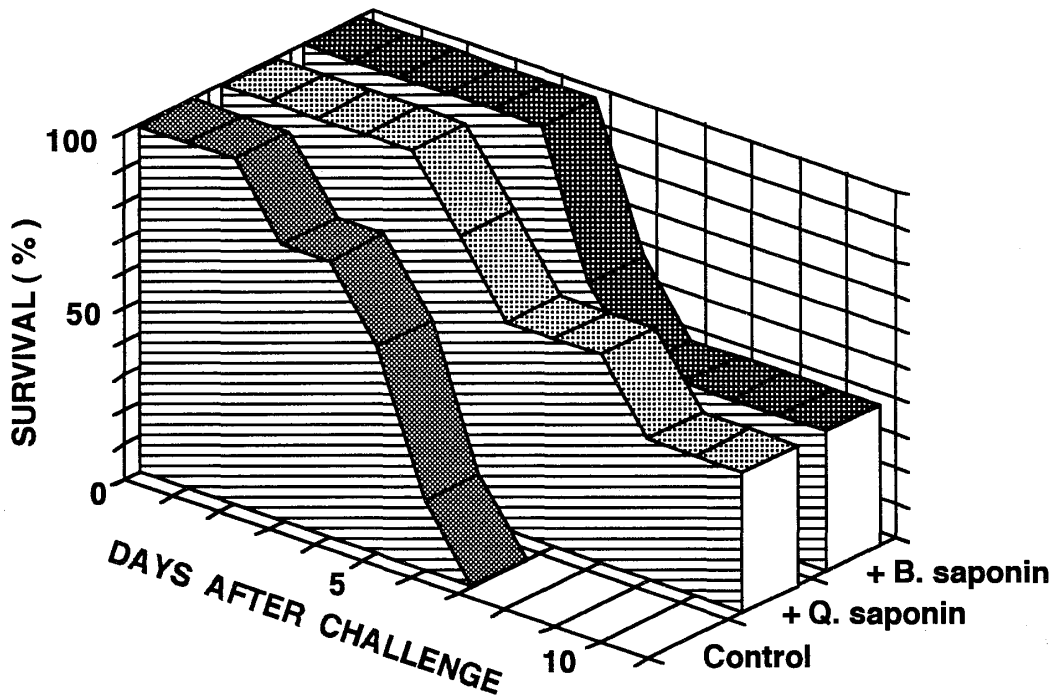


Fig. 3 Survival Rate of Yellow Tail after Bacterial Challenge.

4. 5×10^5 cells/mlに調製した。細菌感染法は, Control区以外のブリに腹腔内注射 (0.1ml/尾)した。

酵素活性測定試料の調製

ブリを取り上げ直後に尾部をメスで切断して放血し, 直ちに肝臓, 腎臓, 脾臓を摘出し重量を測定した。摘出した臓器に, 10% w/vとなるように10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) を加え, 終濃度が1 mMになるようにPhenyl methionyl sulfonyl fluoride (PMSF)を添加した。これを超音波破碎し, 100, 000xg, 30分間遠心した。その上清を回収し, 透析 (<M. W. 8, 000)した。

Superoxide dismutase (SOD) 酵素活性測定

分光的測定法としてNitroblue tetrazolium (NBT)還元法⁶⁾に従った。すなわち, XanthineとXanthine oxidaseにより生成した O_2^- は共存するNBTを還元し, Diformazanを形成する。その時にSODが存在すると O_2^- の一部が不均化され, Diformazanの形成が阻害される。その阻害率と検量線から活性値を求めた。Mn-SOD活性とCu/Zn-SOD活性の区別は, 2mM KCN存在の有無によった。またアクリルアミド・ゲル-NBT法⁶⁾によりSODの同定を試みた。

各臓器内過酸化脂質量測定

Thiobarbituric acid (TBA)法⁷⁾に従った。すなわち, KCl溶液中で得られた各臓器ホモジネートをPerchloric acid (PCA) 添加後の酸性溶液下で TBA と反応させた。その物質 (TBA-RS) をn-Butanol溶液に分配し, 比色定量した。

結 果 お よ び 考 察

サポニン経口給餌による連鎖球菌 (*Enterococcus seriolicida*) 感染魚の延命効果

人為感染後11日間の延命を試験したところ, Fig. 3のごとく, 感染Control区では感染後3日目から弊死が始まり, 7日目に全滅した。しかし, Quillaja, あるいはBeet saponin給餌区ともに, 感染Control区に比べて弊死が始まるのが2, 3日遅れ, 高い生残率を示し, 実験終了の11日目の生残率は共に40%であった。その時の病理解剖所見においては, 感染Control区に比べて肝臓, 腎臓で認められる鬱血も確認されず病状は軽度であった。サポ

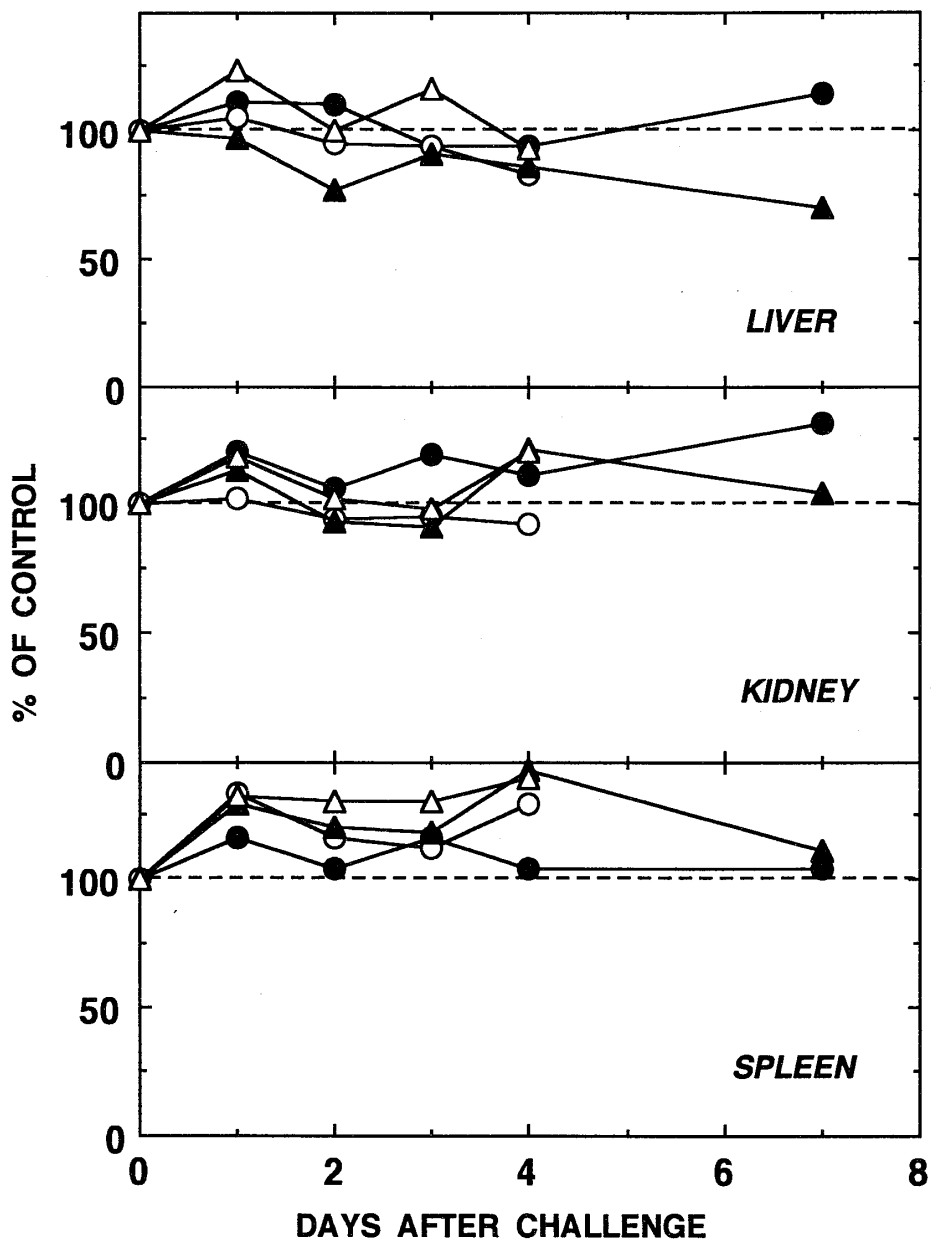


Fig. 4 Cu/Zn-SOD Activity in Various Tissues of Yellow Tail after Bacterial Challenge.

●: Control, ○: Control of challenge, ▲: Quillaja saponin, △: Beet saponin

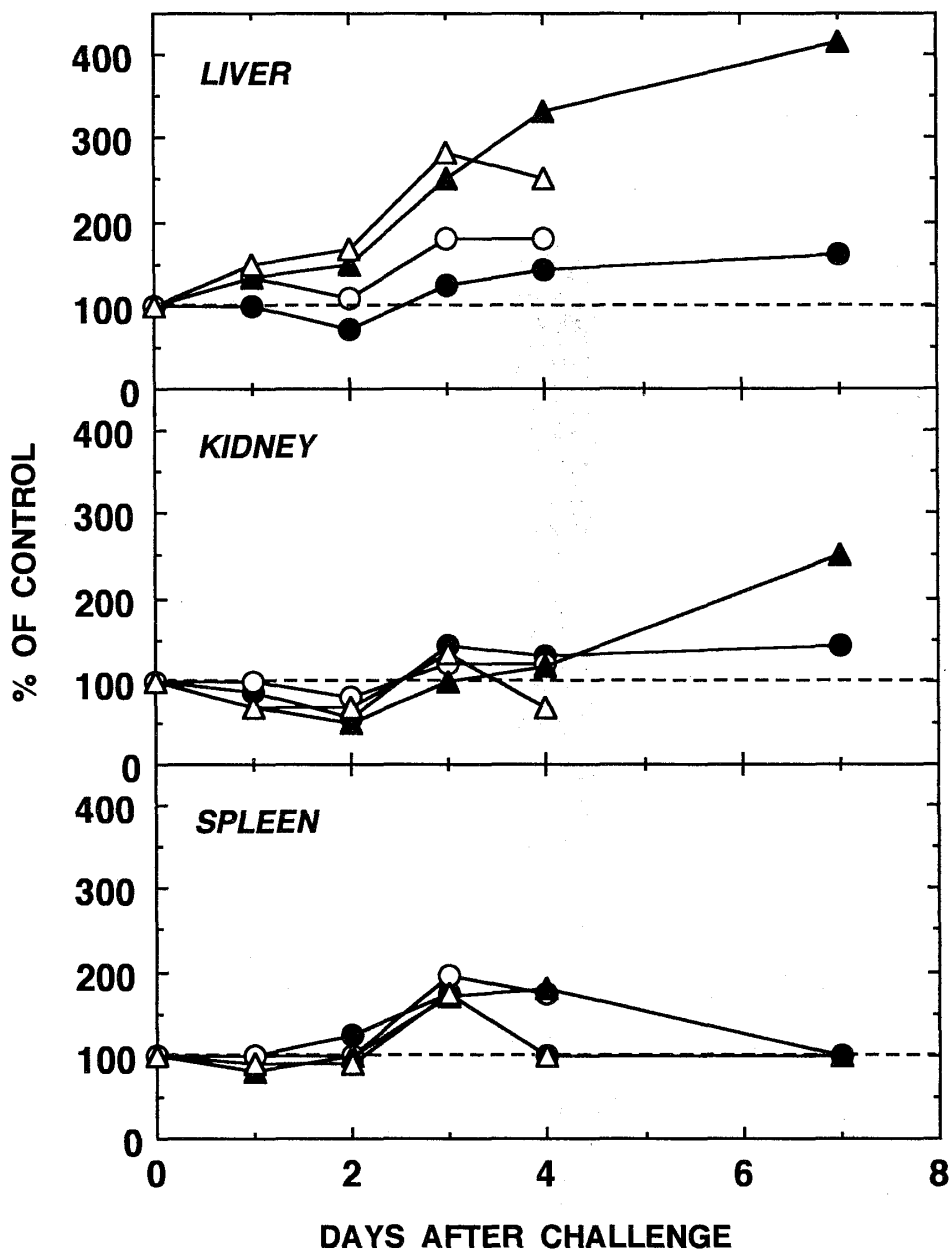


Fig. 5 Mn-SOD Activity in Various Tissues of Yellow Tail after Bacterial Challenge.

●: Control, ○: Control of challenge, ▲: Quillaja saponin, △: Beet saponin

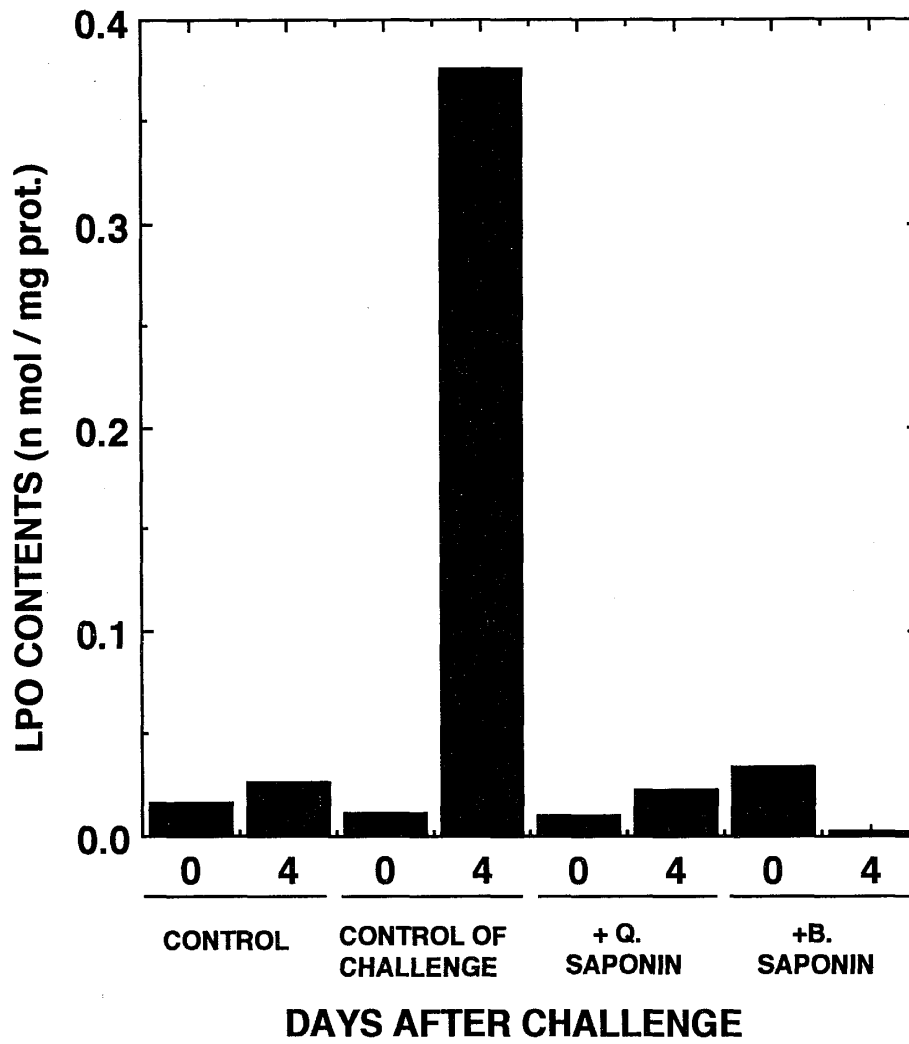


Fig.6 Lipid Hydroperoxide Contents in Liver of Yellow Tail after Challenge.

ニンの種類の違いはあるが、サポニンには抗炎症作用を有することが古くから認められており⁸⁾、今回の延命効果より、感染に伴い各臓器組織内で次々に発生する活性酸素による生体障害が、給餌されたサポニンによって軽減されているものと推察された。

病魚体の各臓器組織内における各種Superoxide dismutase酵素活性動態

各種臓器組織内のSOD活性の動態を Fig.4,5 に示した。感染と共にCu/Zn-SOD活性は、脾臓で若干、上昇する傾向が認められたが、各臓器ともほとんど変化は認められなかった。ところが、Mn-SOD活性は、各臓器ともに感染後、徐々に増加傾向が認められ、Quillaja saponin投与区の肝臓においては感染後4日目で3倍以上の活性上昇が認められた。

SODには互いにその蛋白の一次構造の異なるCu/Zn-SOD, Mn-SOD, そしてExtracellular SOD (EC-SOD)の3種類が存在している⁹⁾。Cu/Zn-SODは細胞質に、Mn-SODはミトコンドリアに、EC-SODは細胞外である血漿やリンパ液中に認められる。Cu/Zn-SODはほとんどの細胞の細胞質に広く分布しており、Mn-SODと比べると、その発現量の変動が少ないとされている。したがって、今回、脾臓に認められた若干の活性上昇は血液と関わりの高い臓器由来のEC-SODの可能性が示唆された。また細菌感染に伴い、炎症の局所で産生される様々なサイトカインによりMn-SODを発現させることが知られている¹⁰⁾。Quillaja saponin 投与区の肝臓に認められたMn-SODの活性上昇は、感染に伴う炎症による肝臓細胞のミトコンドリア機能の保護作用として発現したものと推察された。

連鎖球菌感染魚の臓器内過酸化脂質量

肝臓組織内の過酸化脂質量は感染Control区において、顕著な増加が認められたが、いずれのサポニン給餌区においてその量変化は認められなかった(Fig.6)。このことは、サポニン経口給餌によりSOD酵素を含めた様々な活性酸素不均化酵素の誘導が促進され、その結果、生体過酸化反応が抑制され過酸化脂質量の減少につながったものと推察された。さらに、この過酸化脂質量の減少が延命試験の生残率と関係している可能性が示唆された。

要 約

1. サポニン経口給餌による連鎖球菌 (*Enterococcus seriolicida*) 人為感染ブリ魚の延命効果を確認した結果、QuillajaあるいはBeet saponin給餌区ともに、感染Control区に比べて高い生残率を示した。

2. 各種臓器組織内SOD酵素活性のうち, Mn-SODの顕著な活性上昇がQuillaja saponin投与区の肝臓に認められた。
3. 肝臓組織内の過酸化脂質量の減少が, 延命試験の生残率と関係している可能性がある。
以上の結果より, 植物由来の生理活性物質のSaponinを給餌により経口投与することにより, 魚病を未然に防ぐことが可能となることが明らかになった。

謝 辞

本研究で用いた2種類のサポニンを御供与いただきました(株)太陽化学総合研究所の松本正樹氏に深謝いたします。

文 献

- 1) 谷口直子 : 魚病研究 17:55-59 (1982).
- 2) M. Sugano, S. Goto, Y. Yamada, K. Yoshida, T. Hashimoto, M. Matsuo and M. Kimoto : *J. Nutr.*, 120, 977-985 (1990).
- 3) M. Boggiolini and M. Thelen : "Oxidative Stress" ed. by H. Sies pp 399-420, Academic Press, San Diego CA (1991).
- 4) 高橋和彦 : 「活性酸素とシグナル伝達」 井上正康 編 pp 68-78, 講談社サイエンスエッセイ (1996).
- 5) K. Takeda, T. Ashida, Y. Nagara, E. Okimasu, A. Amemura and M. Matsumoto : *Report Res. Inst. Marine Biores. Fukuyama Univ.*, 5: 17-26 (1994).
- 6) C. Beauchamps and I. Fridovich : *Anal. Biochem.*, 44: 276-287 (1971).
- 7) H. Ohkawa, N. Ohishi and K. Yagi. : *Anal. Biochem.*, 95, 415-423 (1979).
- 8) 山崎正利 : 癌と化学療法 13, 684-688 (1986).
- 9) B. Housset and A. F. Junod : *Biochem. Biophys. Acta*, 716: 183-189 (1982).
- 10) G. H. W. Wong and D. V. Goeddel : *Science*, 242: 941-944 (1988).