

## ニジマスのオゾン曝露障害に対する VitaminC および VitaminE の毒性軽減効果

福永健治・鈴木鐵也・高間浩蔵  
(北海道大学水産学部水産食品学科食品化学第二講座)

### Protective effect of dietary Vitamin C and Vitamin E against ozone induced damage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Kenji FUKUNAGA, Tetsuya SUZUKI and Kozo TAKAMA

Department of Food Science and Technology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041 Japan.

During the course of the study on the oxidative damage in fishes, we previously revealed that the primary target organ of ozone toxicity to fish was not gill to cause gill injury but rather red blood cells (RBC). Then decrease of blood antioxidative substances were observed. However, the effect of Vitamin C and Vitamin E against ozone-induced damage has remained unrevealed. In this study, we examined the protective effect of Vitamin C and Vitamin E against ozone induced damage of rainbow trout. The fish, weighing about 65g average, were fed experimental diets containing Vitamin C (V. C ; 100mg / 100g diets), Vitamin E (V. E; 50mg / 100g diets) and V. E-V. C mixture (V. C / E ; V. C 100mg and V. E 50mg / 100g diets) for 10 days. Level of V. C and V. E in plasma and RBC were directly reflected to diets. Fish in ozone exposure group were intermittently exposed to high concentration ozonated water (1.5ppm) for 45min. Control group turned moribund condition by ozone exposure, but V. C, V. E and V. C / E dietary group were little affected by ozone exposure. Then V. C, V. E and V. C / E suppressed RBC hemolysis, membrane lipid peroxidation and decline of  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  ATPase activity by ozone exposure. These results indicate that dietary supplementation of V. C and V. E can be effective protection against oxidative ozone damage.

癌や種々の疾患に見られる病態、あるいは老化をはじめとする生理的機能の変化など非常に広範囲に生体現象に活性酸素が関与していることが明らかになっている。これら活性酸素の生体に対する影響、特に生体成分の過酸化に伴う障害を解析するとき生体膜の酸化的損傷が重要な問題となる。従来から実験動物としてラットやマウスなどが用いられてきたが、元来、高度不飽和脂肪酸を生体膜構成成分とし

\*所在地：北海道函館市港町3-1-1 (〒041)

ている魚類を用いる方が、より明確に活性酸素の生体への影響を検討することが期待できる、また、進化の過程から見れば、魚類は脊椎動物の根幹に位置し、酸素代謝、異化作用などの生理機能についてもヒトをはじめとする高等動物と多くの共通点が見られることも知られている<sup>1,2)</sup>。そこで、我々は、活性酸素による生体障害防御機構を解析するにあたり、養魚、養殖システムへの応用など実用面でも注目されているオゾン酸化ストレス源とし、魚類を実験動物として検討を重ねてきた。そのなかで、オゾン曝露障害の標的器官(細胞)は、鰓ではなく血液、特に赤血球であることを明らかにした<sup>3-6)</sup>。オゾン曝露による障害発現の際に、血漿および赤血球の VitaminC (V. C), VitaminE (V. E) などの抗酸化性成分の顕著な減少と脂質成分の過酸化の進行を観察した。今回は魚類におけるオゾン急性毒性発現に対する V. C, V. E の毒性軽減効果の検討を目的に、ニジマスに予め V. C, V. E 高濃度含有餌料を給餌し、オゾン曝露による酸化障害発現の抑制効果を検討した。

### 実験方法

供試魚は、屋外飼育池で飼育しているニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) 1年魚(平均体重65g, 尾叉長16cm)を用いた。ニジマスは、実験室に搬入後、木村式高密度多目的水槽(20L容)に移し、市販餌料(オリエンタル酵母(株), マス用配合餌料—マス赤8号)を給餌して2週間の予備飼育を行った。飼育水は活性炭カラムを通した水道水を流速3.0L/minで給水した。また、飼育中水温は15℃に保った。

V. C 高濃度含有餌料は、市販餌料に少量の蒸留水に溶解したL-アスコルビン酸を100mg/100g餌料となるように均質に吸収させ、低温減圧下で乾燥し調製した。V. E 高濃度含有餌料は、同様の市販餌料に少量のジエチルエーテルに溶解したdl- $\alpha$ -トコフェロールを50mg/100g餌料となるように均質に吸収させ、低温減圧下で乾燥し調製した。また、V. C/V. E 高濃度含有餌料は、V. C 高濃度含有餌料調製後、V. E を吸収させ調製した。これら餌料の給餌は、一日二回、体重の1%を10日間給餌することにより行った。オゾン曝露は、Fig. 1に示した装置を用いて、水温15℃、オゾン濃度1.5ppmで45分間行った。オゾンは純酸素から無声放電型オゾン発生装置(日本オゾン(株))を用いて発生させ、テフロン製チューブで水槽にオゾン濃度が1.5ppmとなるように吹き込み、ニジマス(5尾一群)を水槽に移し、曝露中も一定濃度(1.5ppm)となるように3分毎に濃度をモニターし、吹き込み量を調節した。オゾン濃度は中性ヨード滴定法<sup>7)</sup>によって測定した。

曝露終了後、ヘパリンを抗凝固剤として尾柄部より採血し、直ちにヘマトクリット値(Ht)および溶血率を測定した。得られた血液は常法にしたがって血漿と赤血球に分離し、試料とした。血液中のヘモグロビン量(Hb)およびメトヘモグロビン量(metHb)はシアンメトヘモグロビン法<sup>8)</sup>によって測定した。V. C は、分子サイズ排除紫外部検出 HPLC 法<sup>9)</sup>、V. E は、順相蛍光検出 HPLC 法<sup>10)</sup>、還元型グルタチオン(GSH)は、逆相ポストラベル蛍光検出 HPLC 法<sup>11)</sup>、マロンジアルデヒド(MDA)は、逆相蛍光検出 TBA-HPLC 法<sup>12)</sup>によって定量した。赤血球膜 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase 活性は、Chan ら<sup>13)</sup>の方法を改変して測定した。

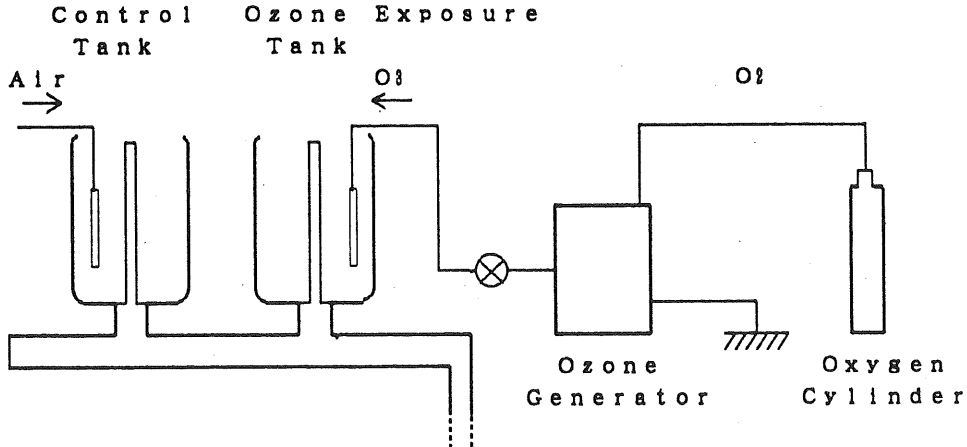


Fig. 1. Apparatus used for the ozone exposure.

The apparatus is composed of specially designed aqua culture tank invented by Mr. Shizuo Kimura which enables high density culture, and ozone generator (Nihon Ozone, Tokyo) with generation capacity of 5g/hr.

### 実験結果および考察

オゾン曝露時の供試魚の挙動を観察したところ、対照群（市販餌料給餌群）ではオゾン曝露後15分を過ぎた頃から鰓の動きが不規則になり突発的な挙動が目立ち、水槽外に飛び出す個体も見られ、45分曝露後には全個体が瀕死の状態に陥った。一方、V. C、V. EおよびV. C/E群では、不規則な鰓の動きが若干見られたものの、45分曝露後でも特筆すべき変化は認められなかった。以上のようにV. C、V. EおよびV. C/E高度含有餌料の給餌は極めて高いオゾンの急性毒性抑制効果を示した。また、この時点（曝露45分後）で飼育用の水槽に戻した場合、V. E、V. C/E群では全個体その後、正常に生存したが、V. C群は5尾中3尾が12時間以内に死亡した。各群の全個体の致死に要した時間は、V. C群が150分、V. E群は230分、V. C/E群では240分であった。

オゾン曝露45分後のHt値、Hb濃度、metHb量および溶血率におよぼすV. C、V. EおよびV. C/E給餌の影響を検討した結果をTable. 1に示した。対照群ではオゾン曝露によってHt値の有意な上昇が見られたがV. C、V. EおよびV. C/Eでは若干上昇する程度で有意な差ではなかった。血液中のHb量は、オゾン曝露の影響を受けず、いずれの群においても全く変化は見られなかった。対照群でHt値が上昇したことからオゾン曝露によって脾臓や腎臓など血液貯留器官からの赤血球の動員が起こっている可能性があるため曝露直後に脾臓および腎臓を摘出し臓器重量を測定し、対照個体と比較したが全く差がなかった。また、オゾン曝露によってHb量に変化が見られないこともこの結果を支持するものである。すなわち、オゾン曝露によるHt値の上昇は、赤血球自身の膨化に起因するものと判断された。溶血率は、対照群では有意に高い値を示したが、V. C、V. E、V. C/E群では、いずれの群においても効果的に溶血が抑制されていることが明らかになった。次にオゾン曝露によるHbの酸化すなわち、metHbの生成を検討したところ対照群では、Hbの約80%がmetHbに酸化されていた。しかし、V. C、V. Eおよ

**Table 1.** Effect of dietary Vitamin C and Vitamin E on hematological indicator of rainbow trout.

|           |           | Control  | Control<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C/E+<br>O <sub>3</sub> exposed |
|-----------|-----------|----------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Ht        | (%)       | 31.5±1.7 | 43.5±2.9*                         | 34.6±0.9                       | 33.4±2.8                       | 34.2±1.6                         |
| Hb        | (g 100ml) | 7.2±0.4  | 7.1±0.4                           | 7.1±0.5                        | 7.2±1.1                        | 7.0±0.4                          |
| Hemolysis | (%)       | 0        | 23.6±4.1*                         | 4.2±1.5                        | 2.3±1.1                        | 2.7±0.8                          |
| metHb     | (%)       | 1.4±0.6  | 82.6±3.5*                         | 5.7±1.4                        | 4.3±0.3                        | 2.7±1.1                          |

Values are mean±S.D. n=5

\*Significantly different from control.  $p < 0.01$

**Table 2.** Effect of dietary Vitamin C and Vitamin E on antioxidative substance contents in rainbow trout RBC and plasma.

## RBC

|           | Control | Control<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C/E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C/E+<br>O <sub>3</sub> exposed |
|-----------|---------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Vitamin C | 100%    | 17.6±0.4*                         | 354±87.9*                      | 178.8±21.2 <sup>a</sup> b      | 96.4±4.9                       | 16.4±1.3 <sup>b</sup>          | 521.8±53.1 <sup>a</sup>          | 102.6±4.4 <sup>a</sup> b         |
| Vitamin E | 100%    | 83.2±6.5 <sup>a</sup>             | 96.2±2.6                       | 93.1±11.3                      | 368.9±43.1 <sup>a</sup>        | 226.4±9.9 <sup>a</sup> b       | 244.2±45.5 <sup>a</sup>          | 152.1±24.9 <sup>a</sup> b        |
| GSH       | 100%    | 90.3±11.4 <sup>a</sup>            | 106.3±7.2                      | 99.2±2.4                       | 96.6±1.5                       | 90.3±2.3 <sup>a</sup>          | 103.2±5.4                        | 97.2±7.7                         |

## Plasma

|           | Control | Control<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C/E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C/E+<br>O <sub>3</sub> exposed |
|-----------|---------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Vitamin C | 100%    | 5.1±0.4 <sup>a</sup>              | 534.1±33.9 <sup>a</sup>        | 78.8±21.2 <sup>a</sup> b       | 96.4±4.9                       | 6.4±1.3 <sup>a</sup> b         | 521.8±53.1 <sup>a</sup>          | 82.6±4.4 <sup>a</sup> b          |
| Vitamin E | 100%    | 84.2±0.5 <sup>a</sup>             | 96.2±3.7                       | 83.1±11.3                      | 468.9±23.1 <sup>a</sup>        | 226.4±9.9 <sup>a</sup> b       | 486.2±23.5 <sup>a</sup>          | 452.1±24.9 <sup>a</sup> b        |

Control values are expressed as 100%

Values are means ±S.D. n=5

a : Significantly different from control.  $p < 0.01$

b : Significantly different from ozone unexposed group.  $p < 0.01$

び V. C/E 群では、いずれの群においても metHb の生成が抑制されていた。

V. C, V. E および V. C/E 高濃度含有餌料給餌後のこれらの血漿、赤血球への反映とオゾン曝露時の V. C, V. E 量、赤血球については GSH 量についても測定した。対照群の値を100%としてその結果を Table. 2 に示した。V. C, V. E および V. C/E 高濃度含有餌料の給餌は血漿、赤血球ともに高度に反映し、それぞれ V. C, V. E 量が増大した。この場合、V. C 高濃度含有餌料給餌による V. E 濃度への影響および、V. E 高濃度含有餌料給餌による V. C 濃度への影響はいずれも認められなかった。オゾン曝露によって、全群で V. C, V. E 量の減少が認められた。血漿、赤血球ともに V. E 高濃度含有餌料の給餌は、オゾン曝露による V. C の減少を抑制することは不可能であった。反対に V. C 高濃度含有餌料の給餌は、オゾン曝露による V. E の減少に影響を与えなかった。V. C/E においては V. C, V. E 量はそれぞれの単独給餌群と同様の減少傾向を示した。また、いずれの高濃度餌料の給餌も赤血球 GSH 量には影響を与えず、オゾン曝露時の GSH 量は V. C, V. E に比較してわずかであった。

オゾン曝露により血漿および赤血球中抗酸化性成分の減少が認められたことから、これらの構成脂質成分の過酸化が予想されたので、脂質過酸化反応の二次分解産物である MDA 量を測定した。対照群の値を100%としてその結果を Table. 3 に示した。オゾン曝露により血漿、赤血球ともに著しく MDA 量

**Table 3.** Effect of dietary Vitamin C and Vitamin E on malondialdehyde formation of rainbow trout RBC and plasma.

|        | Control | Control<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C/E+<br>O <sub>3</sub> exposed |
|--------|---------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| RBC    | 100     | 458±23.7*                         | 99.1±7.2                       | 121.1±11.5                     | 88.7±9.3                         |
| Plasma | 100     | 642±14.3*                         | 113.1±13.1                     | 96.3±9.5                       | 103.1±11.9                       |

Control values are expressed as 100%

Values are means ±S.D. n=5

\*Significantly different from control exposed group.  $p < 0.01$

**Table 4.** Effect of dietary Vitamin C and Vitamin E on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activity of rainbow trout RBC membrane.

| Control | Control<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.E+<br>O <sub>3</sub> exposed | V.C/E<br>O <sub>3</sub> exposed |
|---------|-----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 100%    | 48.6±3.6*                         | 98.2±4.9                       | 102.5±3.2                      | 96.7±5.7                        |

Control values are expressed as 100%

Value means ±S.D. n =5

\*Significantly different from control.  $p < 0.01$

が増大し、構成脂質の過酸化が起こっていることが明らかになった。一方、V. C、V. E および V. C/E いずれの群においても MDA の生成の抑制を確認した。V. C/E 群の結果から血漿では脂質過酸化抑制相乗効果は認められず、赤血球においては若干その傾向が見られるが個体差が大きく有意ではなかった。

次にオゾン曝露が赤血球膜機能へおよぼす影響を赤血球膜 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase に着目し活性の変化を指標に検討した。Table 4 に示したように、オゾン曝露により対照群では活性が半分以下にまで低下したが、V. C、V. E および V. C/E 群のいずれにおいても対照群と活性に差はなく、顕著な活性低下抑制効果が認められた。

溶血、Hb の methHb への酸化は、赤血球の酸素運搬能という欠くべからざる生理機能を失うことを意味すると同時にその酸化損傷過程において活性種の派生をまねき障害発現を助長することが考えられる。すなわち、オゾン曝露障害に対する劇的な V. C、および V. E の毒性軽減効果は、これら赤血球の酸化的損傷を抑制することにより鰓弁内でのガス交換能を維持し、末梢血管内での流動性、変形能といった赤血球膜機能を維持できた結果である。

本研究の目的は、水産増養殖分野でオゾンを利用する際の指針を策定するものではない。しかし、本研究から得られた知見は、飼育水あるいは魚体表面を汚染している微生物、寄生虫などを短時間にかつ極めて効果的に排除するために従来用いられていなかった高濃度オゾンを利用し得る可能性を示すものであり、水産増養殖分野での今後の利用が期待されるものと判断する。

## 文 献

- 1) Powers, D. A. (1989) *Science*, **246** : 352
- 2) 江上伸雄 (1980) 実験動物としての魚類—基礎実験と毒性試験—, ソフトサイエンス社, 東京 : pp2
- 3) Fukunaga, K., Suzuki, T. and Takama, K. (1991) *Comp. Biochem. Physiol.* **100B** : 481

- 4) Fukunaga, K. , Suzuki, T. , Arita, M. , Hara, A. , Yamauchi, K. , Shiriki, N. , Ishizaki, K and Takama, K. (1992) *Comp. Biochem. Physiol.* **101C** : 331
- 5) Fukunaga, K. , Suzuki, T. , Hara, A. and Takama, K. (1992) *Nippon Suisan Gakkaishi* **58** : 171
- 6) Fukunaga, K. , Suzuki, T. , Hara, A. and Takama, K. (1992) *Free Rad. Res. Commun.* **17** : 327
- 7) Saltzman, B. E. and Gilbert, N. (1959) *Anal. Chem.* **31** : 1949
- 8) Horecker, B. L. and Brackett, F. S. (1944) *J. Biol. Chem.* **152** : 669
- 9) Yoshiura, M and Iriyama, K (1986) *J. Liquid Chromatogr.* **9** : 177
- 10) Abe, K. , Ohmae, M and Katsui, G. (1976) *Vitamin* **50** : 453
- 11) 福永健治, 鈴木鐵也, 高間浩蔵 (1993) 微量栄養素研究 **10** : 151
- 12) Fukunaga, K., Suzuki, T and Takama, K. (1993) *J. Chromatogr.* **621** : 77
- 13) Chan, P. C. , Kinday, R. J. and Kesner, L. (1977) *J. Biol. Chem.* **252** : 8537