

魚病の診断酵素に関する生化学的研究—I^{*1}ハマチとマダイにおけるリンゴ酸脱水素酵素の
組織内分布及び肝臓からの流出早山 萬彦・山脇 啓輔^{*2}Biochemical Studies on Diagnostic Enzymes in Fish Diseases-I
Tissue Distribution of Malic Dehydrogenase and its Release
from the Liver in Yellow Tail and Red Sea Bream

Kazuhiko Hayama and Keisuke Yamawaki

In order to clarify the application of enzymes to the diagnosis of hepatic diseases, the activity of malic dehydrogenase (MDH) was determined in the various homogenized tissues of yellow tail *Seriola quinqueradiata* and red sea bream *Pagrus major*. And the amount of release of the enzyme from the liver after the injection of CCl_4 was measured with the perfusion. MDH activity was detected in all the tissues: liver, kidney, spleen, heart, intestine, pyloric caecum, stomach, and muscle tissues. The highest level of specific activity was found in the heart, and that of tissue activity in the liver. The release of MDH from the liver was induced markedly by the injection of CCl_4 . These facts suggest that MDH in the fish serum may be useful in diagnosing fish liver diseases.

1. 緒 言

各種の魚病,あるいは種々の環境変化などによるストレスに対し,強い抵抗力を有する健康な魚を育成することは,増養殖上,非常に重要である。ヒトの健康については,血液による化学分析の結果が病気の診断には不可欠な分野にまで発展し,診断,治療及び予防の重要な指針となっている。しかし,魚類の健康度を判定する方法については,いくつかの報告^{1, 2)}はみられるが,診断法として体系化さ

れるには,未だ至っていない。

著者らは,血清酵素による魚類の肝臓疾患に対する診断法を確立する目的で,本報では,リンゴ酸脱水素酵素(EC 1. 1. 1. 37,以下,MDHと略す)について,ハマチとマダイの魚体組織内分布を明らかにした。さらに灌流肝を用いて,実験的肝障害時における本酵素の流出量を調べたので,その結果を報告する。

*1 水産大学校研究業績 第1131号, 1987年7月3日受理。

Contribution from Shimonoseki University of Fisheries, No. 1131. Received July 3, 1987.

本報告の概要は昭和59年度日本水産学会中国・四国支部大会(水産大学校)で発表した。

*2 Boehringer Mannheim Japan Co., Ltd..

2. 実験方法

2.1 供試魚

近郊の養殖場より入手した体重70~800 gのブリ *Seriola quinqueradiata* (以下ハマチと呼ぶ)、及び150~1,000 gのマダイ *Pagrus major*の活魚を、それぞれ供試魚とした。

2.2 組織酵素液の調製

魚体から各組織を摘出し、重量を測定後、直ちに約10倍量の0.25Mスクロース溶液とともにテフロン型ホモジナイザーで磨砕した。そのホモジネートを1,800×gで10分間遠心し、その上清を酵素原液とした。原液は精製水で5~10倍に希釈し、測定に供した。なお、筋肉組織としては背鰭先端直下の背肉の一部を用いた。

2.3 測定方法

MDH活性はOrdellらの紫外外部吸収法³⁾、alanine ami-

notransferase (EC 2.6.1.2, 以下、GPTと略す)の活性はReitman-Frankelの変法⁴⁾、たん白質含量はLowryらの方法⁵⁾により、それぞれ測定した。

2.4 肝灌流法

肝臓を摘出し、肝臓内に開口する数本の血管のうち、胃側から肝臓に進入する肝動脈を切開し、カニューレを挿入すると同時に綿糸で結紮固定した。この状態で灌流液を一定の速度(0.40~1.30 ml/min)で流し、先端側の肝静脈からの流出液を一定時間ごとに採取した。なお、灌流液には硬骨魚用生理塩類溶液に少量のグルコースを加え、エアレーションにより空気を十分飽和させたものを用いた。装置の概略はFig. 1に示した。

2.5 四塩化炭素の注入

カニューレ先端付近のチューブにツベルクリン用注射器で四塩化炭素を注入し、灌流液とともに肝臓内に流入させた。

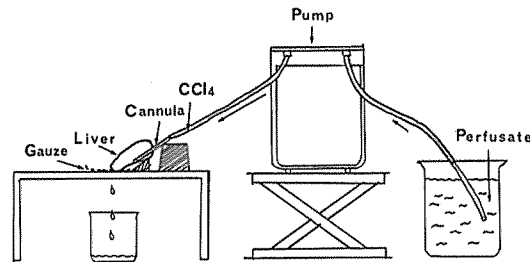


Fig. 1. Experimental apparatus to test the release of enzymes from the liver of fish.

3. 結果

3.1 魚体内組織における活性分布

ハマチ及びマダイの各組織におけるMDH活性を測定し、その結果をTable 1及び2に示した。まず、組織たん白質重量あたりの活性を比較すると、本酵素の活性はハマチでは心臓で最も高く、肝臓がこれにつき、以下、幽門垂、腸、胃、腎臓、筋肉の順に低下し、脾臓で最も低かった。一方、マダイも心臓で最も高く、肝臓、幽門垂がこれにつ

ぎ、以下、胃、腸、腎臓、筋肉、脾臓の順に低下した。また、組織湿重量あたりの活性を比較すると、本酵素はハマチでは肝臓で最も活性が高く、心臓がこれにつき、以下、幽門垂、胃、腎臓、脾臓、腸、筋肉の順に低下したが、脾臓、腸及び筋肉の活性にはほとんど差異はなかった。一方、マダイについても肝臓に最も高い活性がみられ、以下、心臓、胃、腸、腎臓、幽門垂、脾臓の順に低下し、筋肉で最も低かった。さらに、本酵素の活性を全組織(器官)あたりで比較すると、筋肉組織を除いて肝臓に最も高く、ハマチでは幽門垂、マダイでは腸がこれについて高かった。

3・2 ハマチ灌流肝からの MDH の流出

ハマチ灌流肝からの流出液を集め、その MDH 活性を測定し、その結果を Fig. 2 に示した。なお、比較のため同一試料について、GPT 活性及びたん白質含量もあわせ測定した。流出液は灌流開始の60分間は溶血による赤色不

透明であったが、その後は時間の経過と共に透明に近くなり、2時間後には清澄な液となった。MDH 活性は Fig. 2 より明らかなように、灌流開始の15分間は約9,300単位と異常に高かったが、1時間後には1,300単位、2時間後には200単位近くまで減少した。また、4時間30分以降の流出液には MDH 活性は全くみられなかった。なお、同時

Table 1. Malate dehydrogenase activities in various tissues of yellow tail*¹

Tissues	Weight (g)	Activities (Units×10 ⁻³)* ²		
		Specific (per mg protein)	Tissue (per g wt.)	Total (per organ)
Liver	2.25±0.46* ³	14.67±0.66	1525±305	3154±286
Kidney	0.26±0.22	3.30±0.17	252±17	66±4
Spleen	0.13±0.22	1.20±0.15	148±31	21±7
Heart	0.36±0.01	23.20±2.48	1065±81	379±23
Intestine* ⁴	1.11	6.65	147	147
Pyloric caecum	2.60±0.21	6.70±0.85	486±71	1268±287
Stomach	2.21±0.09	5.53±0.74	264±13	583±45
Muscle	—	3.70±0.91	134±31	—

*¹The body weight was in the range of 72.0 to 86.0 g.

*²One unit equals the change in optical density of 0.001 per min at 340 nm and 20 °C.

*³Each value was given as mean ± S. E. for three samples.

*⁴Average of 2 samples.

Table 2. Malate dehydrogenase activities in various tissues of red sea bream*¹

Tissues	Weight (g)	Activities (Units×10 ⁻³)* ²		
		Specific (per mg protein)	Tissue (per g wt.)	Total (per organ)
Liver	2.57±0.76* ³	6.03±1.15	943±191	2142±374
Kidney	0.30±0.10	2.47±0.03	152±11	47±17
Spleen	0.18±0.03	1.00±0.15	104±5	19±5
Heart	0.20±0.01	10.57±0.87	504±60	110±13
Intestine	1.46±0.38	3.97±0.80	197±27	278±67
Pyloric caecum	1.72±0.35	5.73±0.75	123±30	192±10
Stomach	0.28±0.04	4.03±0.76	243±34	65±3
Muscle	—	1.27±0.27	48±11	—

*¹The body weight was in the range of 150 to 262 g.

*²One unit equals the change in optical density of 0.001 per min at 340 nm and 20 °C.

*³Each value was given as mean ± S. E. for three samples.

に測定した GPT 活性及びたん白質含量も MDH 活性と同様のパターンで減少した。本実験結果から、肝臓に対する灌流処理の影響は灌流 3 時間以後、ほとんど無視できることがわかった。

3.3 四塩化炭素注入後におけるハマチ肝臓からの MDH の流出

ハマチ肝臓を用いて、3.2と同様の実験条件下で灌流を行い、灌流開始の 3 時間 30 分後に CCl_4 を 0.4 ml 注入、その後における流出液の MDH 及び GPT 活性を測定し、結果を Fig. 3 に示した。流出液の MDH 活性は注入後の 2 時間まではほとんど変化がなかったが、その後は徐々に増加し、5 時間経過後に最大となり、注入前の約 50 倍となった。活性は、それ以後、減少を続け、10 時間 30 分後には注入前のレベルにまで低下した。比較のため同時に測定した GPT 活性も、異常に高い値を示した 2 点を除いて、MDH 活性とほぼ同様のパターンを示した。また、たん白質の流出を Fig. 4 に示したが、これも MDH 活性とほぼ同様の流出パターンであった。

3.4 四塩化炭素注入後におけるマダイ肝臓からの MDH の流出

3.2と同様の実験条件下で、マダイ灌流肝に CCl_4 を注入、

その後における流出液の MDH 活性を測定し、結果を Fig. 5 に示した。肝臓 g あたり、0.021 ml の CCl_4 を注入した Exp. 1 では、注入後、ただちに活性は上昇し、約 1 時間 45 分後には最高となった。その後は徐々に低下し、6 時間後の流出液には活性は全く認められなかった。一方、肝臓 g あたり、0.029 ml の CCl_4 を注入した Exp. 2 では、MDH 活性は徐々に上昇し、2 時間 30 分後に最高となった。その後は徐々に低下し、10 時間以後の流出液には活性はほとんどなかった。なお、Exp. 2 で得られた流出パターンは前実験で求めたハマチの傾向とよく類似した。

3.5 MDH 活性及びたん白質の総流出量

前項の 3.3 及び 3.5 で行った灌流実験から、 CCl_4 注入により流出した MDH 活性及びたん白質の総量を求め、その結果を Table 3 に示した。なお、算出にあたっては、流出液量に MDH 活性及びたん白質含量の各測定値を乗じた。Table 3 より明らかなように、ハマチでは、 CCl_4 の注入量を 0.014 ml から 0.044 ml に増加すると、MDH 活性は約 3.7 倍、たん白質は約 2.4 倍の流出増を示した。一方、マダイでは、 CCl_4 を 0.021 ml から 0.028 ml に注入量を増加すると、MDH 活性は約 2 倍、たん白質は約 1.3 倍の流出増となった。

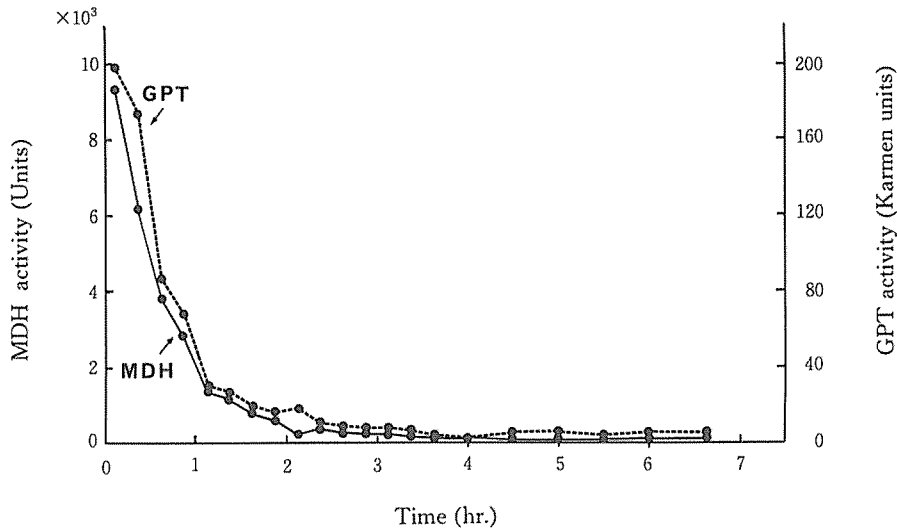


Fig. 2. Release of the enzymes from the hepatic cells of yellow tail during the perfusion with physiological salt solution. Liver weight, 12.0 g; flow rate, 0.70 ml/min

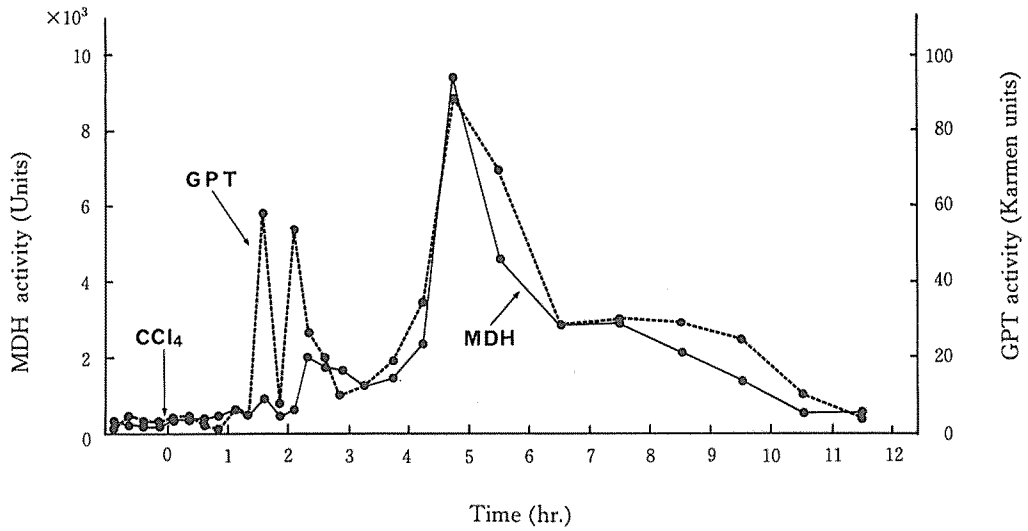


Fig. 3. Release of the enzymes from the hepatic cells of yellow tail after injection of CCl₄ (0.4 ml/liver).
Liver weight, 9.0 g; flow rate, 0.70 ml/min

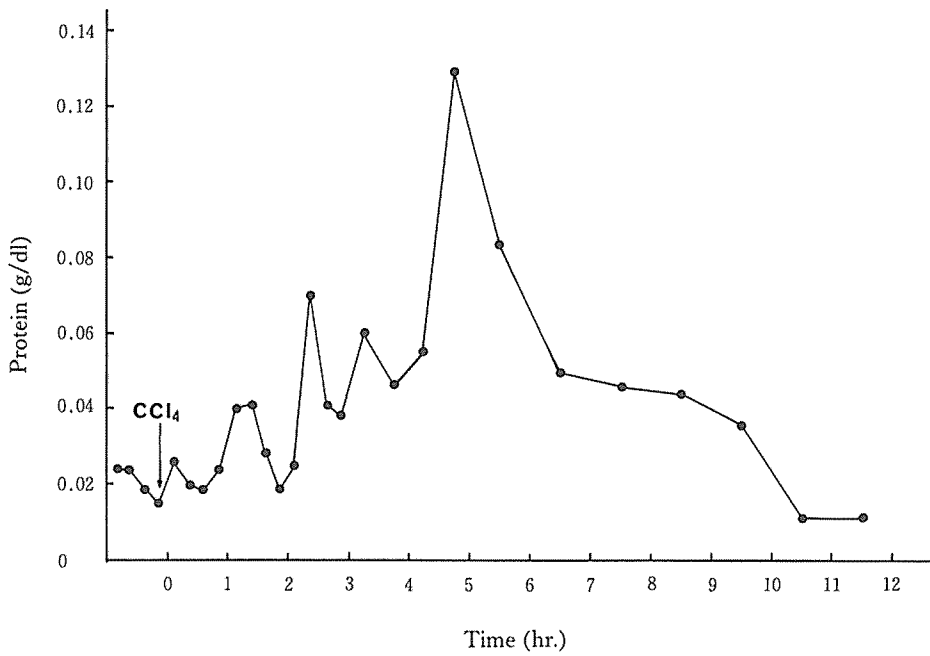


Fig. 4. Release of protein from the hepatic cells of yellow tail after injection of CCl₄ (0.4 ml/liver).
Liver weight, 9.0 g; flow rate, 0.70 ml/min

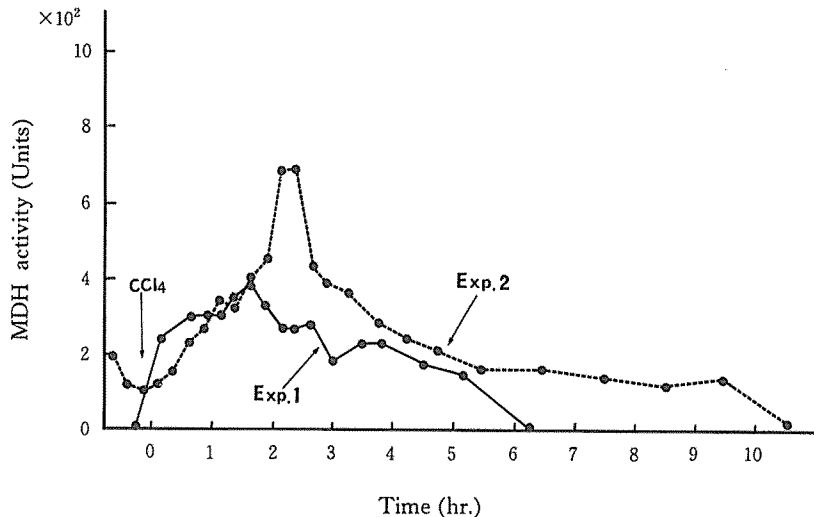


Fig. 5. Release of the enzyme from the hepatic cell of red sea bream after injection of CCl_4 .

Exp. 1: CCl_4 , 0.5 ml/liver; liver weight, 23.8 g; flow rate, 0.96 ml/min

Exp. 2: CCl_4 , 0.3 ml/liver; liver weight, 10.5 g; flow rate, 1.00 ml/min

Table 3. Release of the total activities of MDH and protein, following the injection of CCl_4

Specimens	Body wt. (g)	Liver wt. (g)	CCl_4 (ml/g liver)	Total protein (mg)	Total MDH activities (Units)*
Yellow tail	740	22.0	0.014	50.9	225,000
	800	9.0	0.044	123.9	823,300
Red sea bream	1,000	23.8	0.021	16.1	41,200
	1,000	10.5	0.029	21.5	84,000

*One unit equals the change in optical density of 0.001 per min at 340 nm and 20 °C.

4. 考 察

肝臓障害の診断指標として血清中の MDH 活性を利用するには、その酵素がとくに肝臓に多く分布することが望ましい。そこで、まず、本酵素の組織内分布を調べた結果、ハマチ及びマダイではすべての組織に広く分布しており、

これは他の動物の組織内分布とよく一致する。⁶⁾しかし、組織たん白質量あたりの活性について心臓の活性を100とした肝臓の相対活性を求めると、ハマチ及びマダイではそれぞれ63%及び57%となる。また、他の組織の心臓に対する相対活性は、マダイ幽門垂を除けば、ハマチでは29%、マダイでは38%以下であり、いずれの組織においても活性

が非常に低い。一方、七面鳥についての報告値⁶⁾を参考に、その心臓に対する肝臓の相対活性を求めると、約22%となる。したがって、魚類における本酵素活性は、鳥類と同様に心臓で最も高く、肝臓がこれにつぐが、魚類肝臓における活性の分布割合は鳥類に比べて非常に高いと考えられる。

組織湿重量あたりの活性は、ハマチ、マダイとも肝臓が最も高い。肝臓の活性を100とした心臓の相対活性は、ハマチでは70%、マダイでは57%である。また、他の組織の肝臓に対する相対活性はいずれも非常に低く、ハマチでは32%、マダイでは26%以下である。既報^{7, 8)}の報告を参考にして、組織湿重量あたりの肝臓に対する心臓の相対活性を求めると、ラット約230%、マウス約214%、ラビット344~385%と非常に高い。したがって、これらの哺乳動物に比べて、本酵素の魚類肝臓組織における分布割合は非常に大きい。また、本実験で得られたハマチの肝臓及び筋肉のMDH活性はマダイに比べて、1.6~2.9倍高い。これは、ハマチの生活様式がマダイに比べて、より活動的なことから、高い酸素利用の必然性と関係していると推察される。

酵素活性の測定条件が全く同一とは思われない既報の活性値と、本実験で得られた値を比較することは、多少の誤差があるかも知れないが、McCorkle⁹⁾が報告した冬に取り揚げた channel catfish の肝臓及び筋肉の MDH 活性を、MDH 単位で表示すると、それぞれ約1,953及び約916単位となる。したがって、ハマチ及びマダイの肝臓は channel catfish に比べて著しく高い活性を保持している。しかし、マダイ筋肉の活性は channel catfish の筋肉とほぼ同程度である。さらに、Boström 及び Johansson¹⁰⁾は大西洋産ウナギの白筋の MDH 活性を測定し、1,500 mU/mg protein と報告している。ハマチ筋肉で得られた本実験値を国際単位に換算すると、約1,785mU/mg protein となり、ウナギ白筋の値とほぼ一致する。

陸上哺乳動物をはじめ、魚類においても、四塩化炭素の投与は肝細胞の壊死を発生させ、これによる肝細胞障害は数種の血清酵素に活性上昇を与えると報告されている^{11, 12)}。本実験における四塩化炭素の投与は、5~10時間にわたる MDH の流出となり、さらに投与量の増加に伴って、MDH 活性の流出も増大した。これらのことは、魚類の生体内においても、肝障害時には肝臓からの MDH の流出が起り、その結果、血清中の本酵素活性に異常な変化をもたらすものと考えられる。CCl₄ 0.001 ml の投与により、肝臓 1g あたりの MDH 活性の流出量は、ハマチ16,000~18,700単位、マダイ1,960~2,900単位と計算され、明らかに、ハマチはマダイに比べて5~9倍多い。これは、ハマ

チ肝臓組織中の本酵素活性がマダイに比べて、著しく高いためであろう。

本酵素についての組織内分布、ならびに流出実験の結果から、本酵素は魚類肝障害の診断指標として利用できると思われる。

5. 要 約

ハマチ及びマダイを用いて、リンゴ酸脱水素酵素の組織内分布及び四塩化炭素処理後における灌流肝からの本酵素の流出を調べ、次の結果を得た。

1. 組織たん白質重量あたりで比較した MDH 活性は、両魚種とも心臓で最も高く、肝臓がこれにつき、マダイ幽門垂を除いた他の組織で活性は非常に低かった。

2. 組織湿重量あたりで比較した MDH 活性は、両魚種とも肝臓で最も高く、心臓がこれにつき、他の組織で活性は非常に低かった。また、全組織重量(器官)あたりで比較した活性も筋肉を除いて、肝臓が最も高かった。

3. 四塩化炭素処理後の灌流肝からは、長時間にわたって MDH 活性の著しい流出がみられた。

4. 四塩化炭素処理後におけるハマチ肝臓からの MDH 活性の流出は、マダイに比べて5~9倍高い値を示した。

以上の結果から、本酵素は魚類における肝障害の診断指標になり得ることが示唆される。

文 献

- 1) 木村正雄：宮崎大学農学部研究時報，15，81~175 (1968)。
- 2) 池田弥生：養殖ハマチの血液成分に関する診断学的研究，京都大学農学部学位論文，1976，pp.1~91。
- 3) 坂岸良克：臨床化学検査Ⅱ(石井暢編)，医学書院，東京，1980，p.439。
- 4) 中山年正：臨床化学検査Ⅱ(石井暢編)，医学書院，東京，1980，pp.447~448。
- 5) 佐竹一夫他：実験化学講座，23(日本化学会編)，丸善，東京，1957，pp.37~39。
- 6) E. Bogin, Y. Avidar and B. Israelli: *Zbl. Vet. Med.* A, 23, 858~862 (1976)。
- 7) Gun B. Bengtsson and Börje W. Karlsson: *Comp. Biochem. Physiol.*, 54 B, 501~507 (1976)。

- 8) 高杉年雄：日本内科学会雑誌, 50, 527～550(1961).
- 9) Fred M. McCorkle, Janice E. Chambers and James D. Yarbrough: *Comp. Biochem. Physiol.*, 62 B, 151～153(1979).
- 10) Stig- L. Boström and Rolf G. Johansson: *Comp. Biochem. Physiol.*, 42 B, 533～542(1972).
- 11) Y.Inui: *Bull. Freshwater Fish.Res.Lab.*, 19, 25～30(1969).
- 12) 坂口宏海・浜口章：日水誌, 41, 283～290(1975).