

論文

魚類をモデルとした高用量アスコルビン酸投与による酸化ストレス軽減評価

難波 亜紀^{※1}・岩崎 大^{※2}・上田龍太郎^{※3}・間野 伸宏^{※4}

Evaluation of high-dose ascorbic acid administration for oxidative stress reduction in fish model

Aki NAMBA^{※1}, Dai IWAZAKI^{※2}, Ryutaro UEDA^{※3} and Nobuhiro MANO^{※4}

ABSTRACT

High-dose administration of ascorbic acid is expected to be beneficial for various diseases, but the mechanism is still unclear. In the present study, we investigated the effects of ascorbic acid administration on oxidative stress in a fish model. As a result, there were no differences between administration and control groups, except for a significant decrease in the CAT activity in hepatopancreas. On the other hand, lipid peroxide levels in all tissues were lower compared with control group, suggesting that this experimental system can be used as a model for high-dose ascorbic acid administration. In the future, it will be necessary to optimize the concentration, frequency, and duration of administration, and analyze the effects of the administration on the antioxidant defense capacity of each tissue throughout experimental period to conclude the usefulness of this administration model.

キーワード : アスコルビン酸 高用量 評価

1. はじめに

高用量でのアスコルビン酸投与は、貪食細胞やTリンパ球の活性を亢進することが報告されており¹⁾、敗血症患者に対する対処法として期待されている。また、アスコルビン酸は補酵素としての機能のほか、抗酸化物質の一つとして知られており、スーパーオキシドラジカル (O_2^-)、ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$)、および過酸化水素 (H_2O_2)

等の活性酸素種 (ROS) を除去し、酸化ストレスを防ぐ性質を有することが明らかとなっている²⁾。一方で、アスコルビン酸濃度を高めると酸化促進作用を示す報告もある³⁾。癌は酸化ストレスと深い関係があることが指摘されており、高用量でのアスコルビン酸投与は癌治療法の一つとして注目されている⁴⁾⁵⁾が、機序については不明な点も多く、処方の実施には賛否両論があるのが現状であ

※1 日本大学短期大学部 (三島校舎) 食物栄養学科 助教 Assistant Professor, Department of Food and Nutrition, Junior College (Mishima Campus), Nihon University

※2 日本大学生物資源科学研究科博士前期課程 学生 Graduate School of Bioresources Sciences, College of Bioresources Sciences, Nihon University

※3 日本大学短期大学部 (三島校舎) 食物栄養学科 教授 Professor, Department of Food and Nutrition, Junior College (Mishima Campus), Nihon University

※4 日本大学生物資源科学部海洋生物学科 准教授 Associate Professor, Department of Marine Science, College of Bioresources Sciences, Nihon University

る。医療等において本投与をより適正利用していくためには、生体レベルでの詳細な実験検証が必要であるが、哺乳動物を用いた実験検証は多くの制約があり、多様な解析手段が求められている。

そこで本研究では、魚類をモデルとした高用量のアスコルビン酸投与の実験系の有用性検証を最終目標として、同投与が魚体に及ぼす影響について解析を行った。実験魚には、飼育が容易で様々な多様なストレス実験ができ⁶⁾、年間を通して人工繁殖が可能なヒラメ *Paralichthys olivaceus* を選択した。そして、同投与が抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD)、カタラーゼ (CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ (GP-x) の活性、および酸化ストレスにより生成される過酸化脂質量 (脂質過酸化度) に及ぼす影響について、腸管、胃、肝臓および腎臓組織を解析した。

2. 材料および方法

2.1 供試魚

供試魚には個体差が少なく、本研究の各測定項目の解析が可能な臓器量が得られる約10gのヒラ

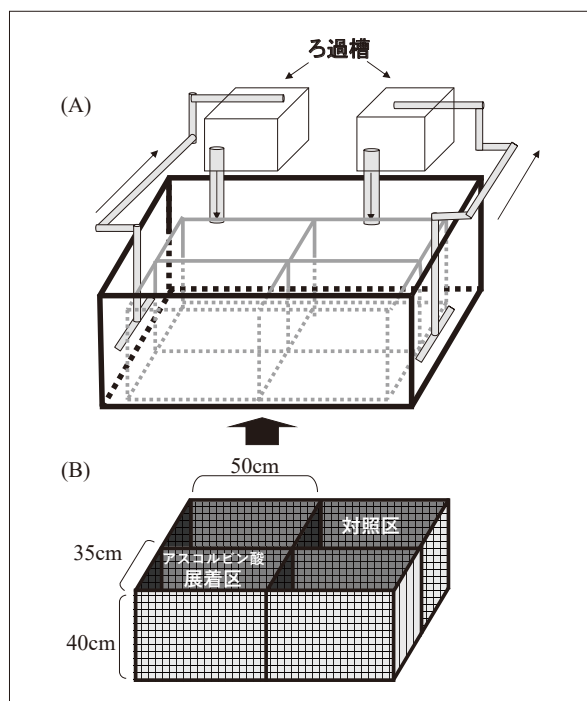


図1 本研究で用いた上面濾過式500L水槽 (A)。同水槽内に4区分した生簀 (B) を設置し、そのうち2区分にヒラメを15尾/区分となるように移してアスコルビン酸展着区または対照区 (15尾/区分) とした。また、給餌した飼料や溶出成分が他の区分に流入しないよう、注水・排水位置を調整した。

メを用いた。民間養殖種苗会社から購入後、水温を $20 \pm 1^\circ\text{C}$ に調整した上面濾過式500L水槽内に設置した生簀内の1区分 (W35×D50×H40cm) 当り15尾移し (図1)、ヒラメEPF-3 (日清丸紅餌料, Table 1) を1日1回、総魚体重当り1-3%給餌することにより10日間馴致飼育を行った。

2.2 アスコルビン酸

アスコルビン酸には、L(+)-アスコルビン酸 (特級, Wako) を使用した。

2.3 高用量アスコルビン酸投与およびサンプル調整

アスコルビン酸投与は、先行研究⁶⁾により経口投与でも肝臓に有意な組織蓄積が生じることが確認されていたことから、経口投与方法により実施した。すなわち、飼料1kg当りL-アスコルビン酸2,000mgを展着させ、毎日魚体重当り3%給餌した (アスコルビン酸展着区)。また同期間、非展着の飼料を与えた魚体を対照とした (対照区)。

10日間給餌後、各区から無作為にヒラメを5尾ずつ取り上げ、0.2g/L 3-aminobenzoic acid ethyl ester (MS-222, Sigma) を用いて麻酔した。次に開腹して腸管、胃、肝臓および腎臓組織を採取し、肝臓の一部は -80°C で保存した。残りの組織は全て4倍量 (w/v) の冷却10mMリン酸塩緩衝液 (PBS, pH 7.2) を加えてホモジナイズして遠心 ($20,000 \times g$, 20分, 4°C) を行い、得られた上清を組織抽出液として使用時まで -80°C で保存した。

2.4 アスコルビン酸組織含有量の測定

経口投与に伴うヒラメ体内におけるアスコルビン酸の蓄積状況を確認するため、ヒドラジン法により肝臓からアスコルビン酸を抽出後、シリカゲルカラム (Silica-215-N, 株式会社センシュウ科学) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法により、組織100g当りのアスコルビン酸含有量を算出した。

2.5 SOD活性の測定

SOD活性の測定は、SOD Assay Kit- WST (Dojin) を用いて実施した。すなわち、事前の予備試験結

果に基づき、PBSを用いて、胃抽出物は500倍 (w/v)、腸管抽出物は100倍、肝臓抽出物は1,000倍、腎臓抽出物は50倍に希釈した。次に、吸光度450 nm で求めたSOD阻害活性をSuperoxide dismutase from bovine erythrocytes (Sigma) を用いて作成した検量線からunit数に変換し、Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad) を用いて測定した各試料のタンパク質濃度 1 mg当りに換算したものをSOD活性とした。

2.6 CAT活性の測定

カタラーゼ活性の測定は、Aebi *et al.* (1984)⁷⁾の方法を一部改変して実施した。すなわち、PBSを用いて腸管抽出物は10倍、胃抽出物は50倍、肝臓および腎臓抽出物は100倍に希釈し、基質として10 mM 過酸化水素980 μlと希釈した試料20μlを石英セル中で混合させた。1分間室温で反応させ、その前後に吸光度 (240nm) を測定することで1分当りの減少値 (ΔOD) を求めた。さらにΔODを1分間の吸光度の減少値、Vc/Vxを抽出物の希釈率、Bio-Rad Protein Assayを用いて測定した各試料のタンパク質濃度をproteinとして、下記の式に基づきCAT活性を求めた。

$$\text{Catalase unit} = (\Delta \text{OD}/0.071/2) \times (Vc/Vx) \times (\text{希釈倍率}/\text{protein})$$

2.7 GP-x活性の測定

GP-xの活性はPaglia *et al.* (1967)⁸⁾の方法を一部改変して実施した。すなわち、5 mM EDTAを含む1M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0 : TE) 100 μl、100 mM TEで溶解した100 mM Glutathione Reductase from baker's yeast (Sigma) 10 μl、100 mM TEで溶解した2 mM β-NADPH (Sigma) 10 μl、各組織の抽出液30 μl、超純水660 μlを石英セル中で混合し、37°Cで1分間反応させた。次に、7 mM Tert-Butyl hydroperoxide solution (Sigma) 10 μlを加え、1分間当りの吸光度 (340 nm) の減少値を求めた。なおブランクには、7 mM Tert-Butyl hydroperoxide solutionの代わりに超純水を添加したものを使用し、以下の式によりGP-x活性を求めた。

$$\text{Unit/mg protein} = (A - A_0) \times \frac{1}{0.00622} \times \frac{1000}{10} \times \frac{1}{\text{protein (mg)}}$$

A : 340 nmにおける1分間の吸光度の減少値、
A₀ : ブランクの吸光度

2.8 脂質過酸化度の測定

脂質過酸化度の測定はKosugi *et al.* (1993)⁹⁾を一部改変して実施した。すなわち、組織抽出液50 μlに8.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS, Wako) 溶液100 μl、20% 酢酸緩衝液 (pH 3.5) 750 μl、0.8% Butylhydroxytoluene (BHT; 2,6-ジ-T-ブチル-4-メチルフェノール, Wako) 25 μl、0.8% 2-Thiobarbituric Acid (TBA; 4,6-ジヒドロキシ-2-メルカプトピリミジン, Wako) 750 μl、および超純水350 μlの順に加え、良く混合した。5°Cで60分静置後、沸騰水中に移して60分反応させた。氷上で反応を停止させた後、超純水500 μl、n-ブタノール (Wako) : ピリジン (Wako) = 15 : 5 混液2.5 mlを加えて激しく混合させた。遠心 (1710×g、10分) 後、上清を1 ml採取して吸光度 (532 nm) を測定し (吸光値A)、抽出液の代わりにPBS 50 μlを加えたものをブランク (A₀) として、下記の式に従い生成された赤色色素量を求め、最後に組織重量1 g当りの赤色色素量 (TBARS量, μmol/g of tissue) を脂質過酸化度とした。

$$\begin{aligned} & 1 \text{ mg湿重量の試料が生成したTBARS量}(\mu\text{mol}) \\ & = \frac{(A - A_0)}{1.56 \times 10^5} \times \frac{5.8}{1000} \times \frac{100}{1} \times (1.00 \times 10^6) \end{aligned}$$

なお標準過酸化脂質として1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP; malondialdehyde-bis, Sigma) を用いた標準線を作成し、本手法による過酸化脂質の測定の正確性を事前に検証した。

2.9 有意差検定

有意差検定は、アスコルビン酸の定着の確認ではstudentのt検定、酸化ストレスの評価では, Statcel add-in software package (OMS) を用いたTukey-kramer検定により多重比較を行った。

3. 結果

3.1 肝臓中のアスコルビン酸含有量

ヒラメ肝臓中のアスコルビン酸含有量を測定した結果、アスコルビン酸展着区では 201.8 ± 22.7 mg/100g組織重量であったのに対し、対照区では 129.6 ± 33.6 mg/100g組織重量となり、アスコルビン酸展着区において有意 ($p < 0.05$) な増加が認められた (図2)。

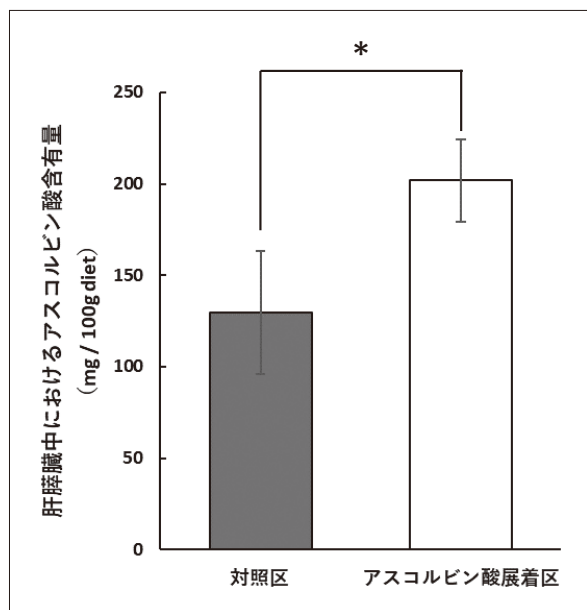


図2 アスコルビン酸展着飼料 (2,000 mg/kg) を10日間与えたヒラメ肝臓中のアスコルビン酸含有量。
* ; $p < 0.05$, studentのt検定.

3.2 SOD活性

SOD活性は肝臓において最も高い活性が認められたが、高用量アスコルビン酸投与による影響は認められなかった (図3)。

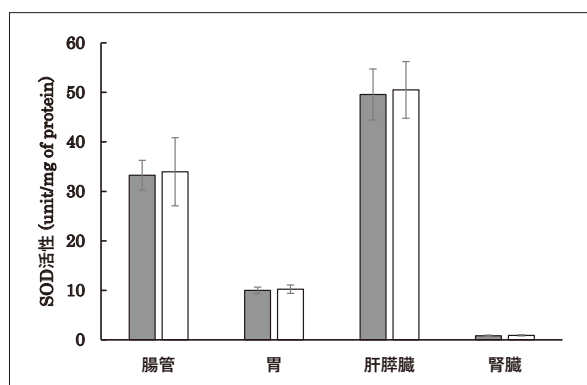


図3 高容量アスコルビン酸投与を行ったヒラメの腸管、胃、肝臓および腎臓組織におけるSOD活性。
■ : 対照区、□ : アスコルビン酸展着区.

3.3 CAT活性

CAT活性は、肝臓において最も高い活性が認められた。高用量アスコルビン酸投与に伴う影響は組織間で異なり、肝臓ではアスコルビン酸展着区において有意な減少が認められた (図4)。

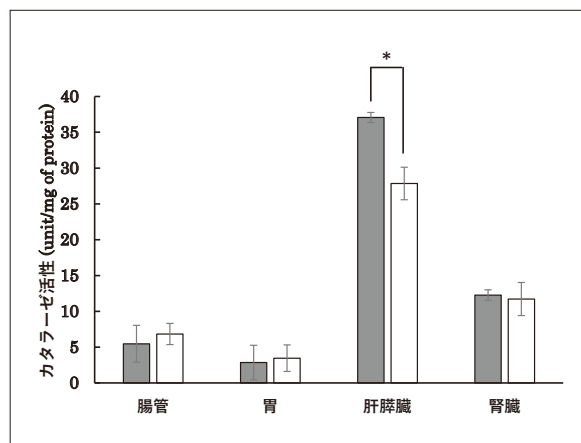


図4 高容量アスコルビン酸投与を行ったヒラメの腸管、胃、肝臓、腎臓組織におけるCAT活性。
■ : 対照区、□ : アスコルビン酸展着区。
* ; $p < 0.05$, studentのt検定.

3.4 GP-x活性

GP-x活性は、腎臓において最も高い活性が認められ、高用量アスコルビン酸投与による影響は認められなかった (図5)。

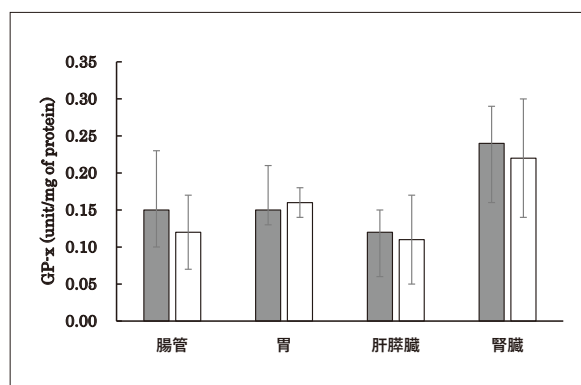


図5 高容量アスコルビン酸投与を行ったヒラメの腸管、胃、肝臓および腎臓組織におけるGP-x活性。
■ : 対照区、□ : アスコルビン酸展着区.

3.5 過酸化脂質度

過酸化脂質度は腎臓において最も高い値が認められ、いずれの組織でも対照区と比較してアスコルビン酸展着区の方が低い値を示したが、有意な差は認められなかった (図6)。

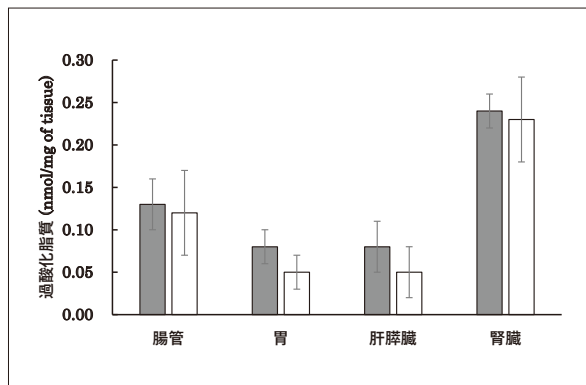


図6 高容量アスコルビン酸投与を行ったヒラメの腸管、胃、肝臓および腎臓組織における過酸化脂質。
■：対照区、□：アスコルビン酸展着区。

4. 考察

本研究では、高容量アスコルビン酸投与の有用性を検証するため、魚類をモデルとした実験を行った。本試験に使用したヒラメは、人為的に飼育管理された種苗がどの地域・季節でも入手でき、体側面も大きいことから、特に粘膜組織のモデル研究に適した魚種である。著者らも、高容量アスコルビン酸投与が粘膜組織に及ぼす影響についてヒラメをモデルに解析を行っており、抗菌ペプチドの発現が誘導されることを確認している⁶⁾¹⁰⁾。ヒラメは典型的な魚食魚であるが、数g以上の魚体サイズになれば配合飼料のみで飼育可能であり、動きも少なく、海水魚の中では最も飼育が容易な魚種の一つである。また成長も早く、特別な飼育施設や飼育技術がなくても5~100gサイズまで用意することができ、多様な生体実験が可能であるという点も魅力的な魚種である。

なお、高容量のアスコルビン酸投与研究において魚類を利用する場合、投与方法の選択が課題であった。魚類でも注射器を用いた接種投与も可能であるが、強いストレス反応を引き起こすリスクが考えられたことから、経口投与方法を選択した。投与濃度については、1,000~5,000 mg/kg飼料の割合で1週間以上アスコルビン酸を展着した飼料を与えると抗病性が向上することを確認していたことから⁶⁾¹⁰⁾、本研究では2,000 mg/kg飼料に濃度を固定して10日間投与する実験系として設定した。結果として、実験に供したヒラメの肝臓中のアスコルビン酸含量をみると、予備試験を含め、全ての試験系でアスコルビン酸展着区は対照区と比較

して1.7~2倍近い有意な増加が認められたことから、適切に高容量アスコルビン酸を投与できたものと判断した。

しかし、本試験では肝臓におけるCATの活性において有意な減少が認められたのを除き、アスコルビン酸投与に伴う明瞭な変化は確認できなかった。一方で、有意差は認められなかったものの、過酸化脂質の値は調べたいずれの組織においても低い値を示したことから、高容量アスコルビン酸投与のモデルとして、本試験系は利用可能であると推察された。今後、投与濃度や投与回数・期間について最適化した上で、同投与が各組織の酸化防御能に及ぼす影響について経時的に解析を行うことで、本投与モデルの有用性について結論を下す必要がある。

文献

- 1) Maggini S., Beveridge S., Sorbata P. J. P. and Senatore G. (2008): Feeding the immune system: the role of micronutrients in restoring resistance to infections. *CAB Rev.*, 3, 1-21.
- 2) Ahmad I.M., Aykin-Bums N., Sim J.E., Walsh S.A., Higashikubo R., Buettner G.R., Venkataraman S., Mackey M.A., Flanagan S.W., Oberley L.W. and Spitz D/R. (2005): Mitochondrial O₂⁻ and H₂O₂ mediate glucose deprivation-induced stress in human cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 280, 4254-4263.
- 3) Chen Q., Espey M.G., Sun A.Y., Lee J.H., Krishna M.C., Shacter E., Choyke P.L., Pooput C., Kirk K.L., Buettner G.R. and Levine M. (2007): Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104, 8749-8754.
- 4) Takemura Y., Satoh M., Satoh K., Hamada H., Sekido Y. and Kubota S. (2010): High dose of ascorbic acid induces cell death in mesothelioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 394(2), 249-253.
- 5) Ohno S., Ohno Y., Suzuki N., Soma G. and Inoue M. (2009): High-dose vitamin c (ascorbic acid) therapy in the treatment of patients with advanced

- cancer. *Anticancer Res.*, 29, 809–915.
- 6) Mori M., Shibasaki Y., Namba A., Yabu T., Wada N., Shiba H., Anzai H. and Mano N. (2022): Alteration of hemoglobin β gene expression in mucosal tissues of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, in response to heat stress, *Edwardsiella piscicida* infection, and immunostimulants administration. *Fish Shell. Immunol. Report*, 100049.
- 7) Aebi H. (1984) : Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, 105, 21~126.
- 8) Paglia D.E. and Valentine W.N. (1967): Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70, 158-169.
- 9) Kosugi H., Kojima T. and Kikugawa K. (1993): Characteristics of the thiobarbituric acid reactivity of human urine as a possible consequence of lipid peroxidation. *Lipids*, 28, 337-343.
- 10) Mori M., Ito T., Washio R., Shibasaki Y., Namba A., Yabu T., Iwazaki D., Wada N., Anzai H., Shiba H., Nakanishi T. and Mano N. (2021): Enhancement of immune proteins expression in skin mucus of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* upon feeding a diet supplemented with high concentration of ascorbic acid. *Fish Shell. Immunol.*, 114, 20-27.