コイのビタミン B 群要求に関する研究—I.

ビタミン B₆ の欠乏症および要求量

荻 野 珍 吉

(1965 年 4 月 28 日受理)

B VITAMINS REQUIREMENTS OF CARP, *CYPRINUS CARPIO*—I.
DEFICIENCY SYMPTOMS AND REQUIREMENT OF VITAMIN B₆

Chinkichi OGINO*

The feeding trials have been conducted with young carps to study the deficiency symptoms and requirement of vitamin B₆. The basal diet used was that devised by HALVER et al.⁹⁾ except that vitamin B₆ was eliminated. The fishes were fed the diets containing varying levels of vitamin B₆ for 10-week experimental period at 25°C under constant flow of dechlorinated city water. The diet of group 8 was added deoxypyridoxine hydrochloride to facilitate the development of the deficiency symptoms (Table 1). The carps receiving the vitamin below 0.04 mg per kg of body weight per day decreased average weight, showed considerably high mortalities and developed the deficiency symptoms after 4 to 6 weeks feeding (Fig. 1 and Table 2). Nervous disorders were main deficiency symptom developed when no anti-pyridoxine was added to the diet, whereas edema, hemorrhage, exophthalmos and skin disturbance were predominant in the presence of deoxypyridoxine (Table 3). The activities of glutamic-pyruvic and glutamic-oxalacetic transaminases (GPT and GOT) and vitamin B₆ content of hepatopancreas were found to be strongly influenced by the vitamin intake of the fish (Table 4). From the results obtained the vitamin B₆ requirement of young carps was tentatively decided to be about 0.15 mg (as hydrochloride) per kg of body weight per day under the present experimental conditions.

コイは水産養殖業の重要な魚種であるが、栄養要求については不明な点が多く、ビタミンB群の要求についても橋本¹⁾ および ZOBARI²⁾ の研究が見られるに過ぎない。すなわち橋本はビタミン B₁₂ がコイの成長に対して促進効果がないことを、また ZOBARI はピーナツミールと魚粉 (10:1) よりできた飼料でコイを飼育したところビタミンB群の欠乏症と考えられる症状が現われたことを報告している。本報はビタミンB₆ 含量がことなる飼料あるいはデオキシピリドキシンを添加した飼料で仔ゴイを飼育し、B₆ の欠乏症状および要求量について実験した結果について報告する。

実 験

飼料: HALVER ら³⁾ がニジマスのビタミン要求試験に用いた配合飼料よりビタミン B₆ 塩酸塩を除いたものを基本飼料とした。ただしコーンオイルの代わりに大豆油 (局方) を使用した。基本飼料に対するビタミン B₆ 塩酸塩の添加量および各区の魚が摂取した B₆ の量は Table 1 に示されている。なお 8 区の魚には基本飼料 100 g に対して 2 mg のデオキシピリドキシン塩酸塩を添加した飼料を与えた。調餌は HALVER らの方法にしたがい、一度に 1 週間分を作製し冷蔵庫に密栓貯蔵した。

飼育方法: チオ硫酸ソーダの希薄溶液を滴下して残留塩素を除いた水道水をタンクに貯め、これより水

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato-ku, Tokyo, Japan)

Table 1. Vitamin B₆ added to the diet, the vitamin intake of the fish in each group and days required for development of deficiency symptoms.
The diet of group 8 was added deoxypyridoxine hydrochloride.

Experimental group	Vitamin B ₆ added*	Vitamin B ₆ intake	Development of deficiency symptom
	mg/100 g diet	mg/kg body wt./day	
1	4.04	1.17	none
2	1.04	0.30	none
3	0.54	0.15	none
4	0.14	0.040	after 28 days
5	0.090	0.025	25
6	0.065	0.019	21
7	0.040	0.012	20
8	0.040 plus 2 mg of deoxypyridoxine HCl	0.012 plus 0.58 mg of deoxypyridoxine HCl	14

* The vitamin B₆ content of the basal diet was 0.040 mg/100 g.

を1時間に 8 l の流量で各水槽 (40 l 容) に導き、通気しながら流水式で飼育し、水温は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ に調節した。コイは体重 4 g 前後のものを選び、各水槽に 30 尾宛を入れて飼育した。実験に入るに先立ち各水槽の魚はアクリフラビンで消毒し、3日間絶食させたのち Table 1 に示した1区の飼料を与えて2週間予備飼育を行ない、飼料と環境に十分慣らした。実験は 1964 年 10 月 15 日より 10 週間に亘って行なつた。なお7区のみは回復試験に使用する目的で2個の水槽を設けた。飼料は休日を除き、1日に体重の7パーセントの量を3回に分けて与え (飼料の水分 58.3 パーセント)、2週間毎に体重の測定を行なつた。排泄物はスポイトで取り除き、各水槽は4日毎に取り換えた。斃死魚は発見次第取り除き、欠乏症状が現われたら症状を観察し、一部の魚は化学的あるいは組織学的な研究試料に供し、また適当な時期に回復試験を行なつた。

トランスアミナーゼの活性度および B₆ 含量の測定：肝臓臓を分離秤量してのちただちにその重量の 200 倍容の氷冷 0.1 M 磷酸塩緩衝液、pH 7.4 を加え 0°C でホモジナイズし、汨液を酵素液として使用し氷中に貯えた。トランスアミナーゼの活性度は Glutamic-pyruvic transaminase (GPT; Alanine aminotransferase) および Glutamic-oxalacetic transaminase (GOT; Aspartate aminotransferase) について測定した。GPT の活性度は試験管に DL-アラニン (0.1 M, 水溶液) 1 ml, α -ケトグルタル酸 (0.1 M, 水溶液) 0.2 ml, 0.1 M 磷酸塩緩衝液、pH 7.4, 2.8 ml および酵素液 1 ml をとり、 38°C で 30 分反応後三塩素酢酸溶液を加えて除蛋白してのち、生成したビルビン酸を比色法⁴⁾ によつて測定して求めた。GOT の活性度は GPT の場合における DL-アラニンの代わりに L-アスパラギン酸 (0.1 M, 水溶液) 1 ml をとり、他の試薬は GPT の場合と同様にとり、 38°C で 30 分間反応後 280 m μ における吸光度の増加から、生成したオキサロ酢酸の量を求めた⁵⁾。活性度の測定に当つては酵素液と緩衝液および試薬のみの対照を行ない測定値を補正した。ビタミン B₆ は *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 を使用するバイオアッセイによつて定量した。

結 果

平均体重および斃死率：2週間毎に測定した平均体重の変化は Fig. 1 に示されている。B₆ の摂取量が低い4区より7区の魚は実験開始4週間目以後成長がにぶり平均体重が低下したが1区より3区まではよく成長した。実験中に斃死した魚の数は Table 2 に示されている。良好な成育を示した1区および3区 (2区は事故のため10週目に全部斃死した) には全く斃死した魚が見られなかつたのに対して、4区より8区までは6週目までに約半数が死亡した。特にデオキシピリドキシンを加えた8区では実験の初期より斃死する

魚が多かった。4区より8区までは4週ないし6週以後魚を他の実験に使用したので6週以後の斃死数は表に示されていない。

欠乏症状： 4区より8区の魚には1ヵ月以内に欠乏症状が現われた。症状はデオキシピリドキシンを与えた8区が最も早く現われ、飼料中にデオキシピリドキシンを含まない4区より7区では、飼料中の B_6 含量が低いほど早く現われた (Table 1)。飼育魚に見られた症状は Table 3 に示されている。4区より7区の魚に現われた症状は神経障害と考えられるもので、魚は平衡を失ないてんかん性の発作をおこし、異状な遊泳状態を示した。すなわち横体のままあるいは反転しながら、または水の表面を回転しながら遊泳したり、狂奔したり、また水底に横たわりけいれんをおこしたりした。このような症状が現われると大部分の魚は数日で死亡するが、このような状態のままやや長期間生きる場合もあり、水腫をおこしたり眼球が軽度に出した魚も見られた。デオキシピリドキシンを与えた8区は14日後に約半数の魚に劇しい症状が現われた。すなわち頭部を除き体全体がむくみ、立鱗の状態となり、体の各部の皮下や眼に出血がおこり、眼球がはげしく突出し、皮膚に炎症が認められた。しかしこの場合はてんかん性の発作や狂奔するような症状の魚は見られなかった。

回復試験： 回復試験用水槽の約1/3の魚に欠乏症状が現われたとき、まだ症状が現われない魚を選び4尾宛のサブグループを設け回復試験を行なった。飼料を1区のものに変えた区の魚は数日で食欲が回復し、徐々に体重が増加し、欠乏症状をおこしたり斃死した魚はなかった。7区の飼料を継続して与えた魚は3ないし5日後に全部の魚に欠乏症状が現われ、3尾は数日で死亡し、1尾は症状をおこしたまま20日間生きていた。またデオキシピリドキシンを与えた8区の魚のうち症状が現われた4尾を別の容器に

Fig. 1. Effect of vitamin B_6 levels in the diet on the growth responses of carps.

Numbers in figure indicate the experimental groups shown in Table 1.

Table 2. Number of dead fish in experimental period of 10 weeks.

Experimental group	Number of fish at start	Number of dead fish summarized every 2 weeks				
		0~2	2~4	4~6	6~8	8~10
1	30	0	0	0	0	0
2	30	0	0	0	0	(30)*
3	30	0	0	0	0	0
4	30	0	0	15		
5	30	0	5	11		
6	30	0	2	14		
7	30	0	7	7		
8	30	4	17			

* All fishes of group 2 died due to a trouble of the thermoregulator after 9-week feeding.

Table 3. Vitamin B₆ deficiency symptoms of carps.

Diet	Deficiency symptom
Containing low levels of vitamin B ₆	Nervous disorders, epileptiform fits, hyperirritability, ataxia, loss of appetite, edema of peritoneal cavity, exophthalmos.
Containing deoxypyridoxine	Edema of whole body, exophthalmos, hemorrhage in various parts of body, skin disturbance, sluggishness, loss of appetite.

Table 4. The activity of two transaminases and vitamin B₆ content in hepatopancreas of the fishes.

The fishes in groups 4 to 7 were analyzed for enzymes and for vitamin B₆ at about 10 days after development of deficiency symptoms and those in groups 1 and 3 at the end of the experiment.

Activities of GPT and GOT at start were 329 ± 76.4 and 272 ± 49.4 respectively.

Experimental group	Activity of GPT ¹ μg pyruvic acid formed ³	Activity of GOT ² μg oxalacetic acid formed ³	Vitamin B ₆ content in liver $\mu\text{g/g}$
1	376 ± 61.6 (5) ⁴	295 ± 53.1 (5)	6.3 ± 0.79 (5)
2	—	—	—
3	362 ± 49.0 (5)	260 ± 44.7 (5)	5.2 ± 0.14 (4)
4	267 ± 25.3 (5)	138 ± 33.1 (5)	3.5 ± 0.45 (10)
5	134 ± 45.0 (5)	106 ± 29.5 (5)	
6	196 ± 38.2 (4)	113 ± 49.7 (4)	
7	170 ± 70.8 (5)	115 ± 38.2 (4)	

1. Glutamic-pyruvic transaminase.
2. Glutamic-oxalacetic transaminase.
3. Pyruvic acid or oxalacetic acid formed was estimated after incubation of 1 ml enzyme solution (0.5% hepatopancreas-extract with pH 7.4 phosphate buffer) with respective substrates at 38°C and for 30 minutes. Values indicate mean $\pm$ S. D.
4. Numbers in parentheses indicate the number of carps analyzed.

の B₆ 含量も 1 区および 3 区の魚では高く、4 区より 7 区の魚では低かった。

考 察

仔ゴイをビタミン B₆ 含量がことなつた飼料で飼育した結果は Fig. 1 および Table 1~3 に示されているように、コイの体重 1 kg に対し 1 日 B₆ の摂取量が 0.04 mg 以下では 4 週間経過後体重の増加がにぶり、斃死する魚が多く、また飼育魚に欠乏症状が発生した。これに対し 0.15 mg 以上の B₆ を摂取した区の魚は 10 週間の飼育期間中良好な増重を示し、斃死した魚も欠乏症状の発生も見ることができなかつた。PHILLIPS ら^(6,7) は B₆ を欠いた飼料で飼育したマス類が短期間で全滅することを報告しているが、今回の実験で仔ゴイもマス類と同様にビタミン B₆ の不足に対して非常に敏感であることが明となつた。

B₆ の欠乏症状は Table 3 に示されているように、B₆ 含量が低い飼料で飼育した場合と、飼料中に B₆ の阻害剤が含まれている場合とで現われる症状が多少ことなつていた。この理由は明でないが、使用したデオキシピリドキシンが B₆ の正常な生理作用を阻害したために出現した症状とデオキシピリドキシン自体の他の薬理作用とが同時に現われているのかも知れない。したがつて 4 区より 7 区の魚で見られた症状は明に

移し、1 区の飼料を与えたところ、1 尾は 2 日後に死亡したが、3 尾は約 10 日間で症状が見られなくなり食欲は回復し、体重も増加し初め外観的には全く正常に復した。

肝臓のトランスアミナーゼ活性度および B₆ 含量：各区の魚 4 ないし 5 尾を選び、4 区より 7 区は欠乏症の魚が現われてから約 10 日後に、1 区および 3 区は実験終了時に肝臓の GPT および GOT の活性度を測定した。肝臓の 0.5 パーセント抽出液 1 ml を基質と 38°C で 30 分間反応させたとき生成するビルビン酸あるいはオキサロ酢酸の量より酵素の活性度を比較すると、Table 4 に示されているように、4 区より 7 区の魚では活性が低く、良好な成長をした 1 区および 3 区の魚では活性が高かつた。また肝臓

B₆ の欠乏症状と考えられるが、8 区の魚に見られた症状のすべてがコイの B₆ 欠乏症状であるか否かの決定はなお実験を行なう必要があると思われる。またデオキシピリドンキンを添加した飼料では神経異状の魚が出現しなかつた理由についてはわからない。

コイの肝臓の GPT および GOT の活性度あるいは B₆ 含量は、欠乏症が発生した区と良好な育成をした区の魚の間で明瞭な差異が認められた (Table 4)。このことはピリドキサルリン酸がトランスアミナーゼの補酵素であることから当然の結果であると考えられる。一方酵素の活性度を測定して魚の健康状態を判定できる可能性も示していると考えられる。

動物のビタミン要求量を決定することは非常に困難であると考えられるが、今回の実験において B₆ の摂取量がコイの体重 1 kg に対して 1 日 0.04 mg 以下では明に不足であることを示している。良好な育成を示し、欠乏症も発生しなかつた 1 区と 3 区とを比較すると、肝臓の B₆ 蓄積量については 1 区が 3 区よりやや高いが 2 種のトランスアミナーゼについては両区の間で活性度に有意の差を認めることはできない ($P < 0.01$)。したがって飼育魚の成長、斃死、欠乏症発生の有無および肝臓のトランスアミナーゼの活性度を基準として考えると、本実験条件の下では仔ゴイが必要とする B₆ の最低要求量は体重 1 kg に対して 1 日 0.15 mg 付近 (塩酸塩として) と考えることができる。この値は PHILLIPS ら⁸⁾ や HALVER ら⁹⁾ によるニジマスの B₆ 要求量 (0.225~0.25 mg; 0.38~0.43 mg/kg 体重/日) より低い値である。しかしこれらの値は肝臓中の B₆ 蓄積量より求められた値であり、今回の実験においても肝臓の B₆ 蓄積量を考慮に入れると 0.15 mg より高くなると考えられるからコイがニジマスよりも B₆ の要求量が低いということではできないであろう。ニジマスについても成長度から要求量を求めた McLAREN⁹⁾ の結果 (0.02~0.2 mg/kg 体重/日) は PHILLIPS や HALVER の結果より低い値である。また B₆ の要求量は飼料の蛋白質含量によつて影響を受けることが認められており⁷⁾、今回の実験は比較的高蛋白の飼料を使用したことも考慮すべき点であろう。

要 約

HALVER らの配合飼料よりビタミン B₆ を除いた基本飼料に B₆ あるいはデオキシピリドンキンを添加した飼料で仔ゴイを飼育し次の結果を得た。

- 1) 魚の体重 1 kg に対して B₆ の摂取量が 1 日 0.04 mg 以下では 4 週間後成長がにぶり、斃死魚が多く、魚に欠乏症状が現われたが 0.15 mg 以上の摂取量ではよく成長し、魚に異状は見られなかつた。
- 2) B₆ 含量が低い飼料で飼育した魚に発生した症状は平衡喪失、てんかん性発作、けいれん、遊泳状態の異状、水腫、軽度の眼球突出などであつた。デオキシピリドンキンを添加した飼料では水腫、皮下出血、眼球突出、立鱗、皮膚炎の症状が現われたが神経障害はおこらなかつた。
- 3) 肝臓のトランスアミナーゼの活性は良好な育成をした区の魚では高く、欠乏症が発生した区の魚は低くかつた。肝臓の B₆ 含量もトランスアミナーゼの活性と同じ傾向であつた。
- 4) 成長、斃死率、欠乏症発生の有無および肝臓のトランスアミナーゼ活性度を基準とすると、本実験条件の下では仔ゴイの B₆ 要求量は体重 1 kg に対し 1 日 0.15 mg 付近と考えられるが、肝臓の B₆ 蓄積量を基準とするとこの値より高くなると考えた。

本研究は文部省科学研究費および農林水産業特別試験研究費 (主任橋本芳郎教授) の援助によつて行なつた。記して感謝の意を表明する。飼料の作製について便宜を与えられた日清製粉 K.K. 中央研究所青江優夫、増田績の両氏に対し、また終始実験に協力された杉沢雄二、上野国衛、我妻隆介、飯倉敏弘、金谷光彦、桑守彦、山岡正明の諸氏に深謝の意を表明する。

文 献

- 1) 橋本芳郎: 本誌, **19**, 899 (1953).
- 2) ZOBARI, A. R. K.: *Prog. Fish-Cult.*, **18**, 88 (1956).
- 3) HALVER, J. E., and J. A. COATES: *Prog. Fish-Cult.*, **19**, 112 (1957).
- 4) 江上不二夫他: 標準生化学実験, pp. 36~38, 1953, 文光堂, 東京.
- 5) 満田久輝: 実験栄養化学, pp. 423~424, 1961, いずみ書房, 京都.
- 6) PHILLIPS, A. M. JR., H. A. PODORIAK, D. R. BROCKWAY and R. R. VAUGHN: *Cortland Hatchery Report* No. 26, 86 (1957).
- 7) PHILLIPS, A. M. JR., H. A. PODOLIAK, D. D. LIVINGSTON, R. F. DUMAS and R. W. THOESSEN: *Cortland Hatchery Report* No. 28, 67 (1959).
- 8) 青江優夫: 水産増殖, 臨時号, No. 2, 67 (1963).