コイの背こけ病に対する数種抗酸化剤の予防効果

渡辺 武・松浦康修・橋本芳郎

(1966年6月15日受理)

EFFECT OF NATURAL AND SYNTHETIC ANTIOXIDANTS
ON THE INCIDENCE OF MUSCLE DYSTROPHY OF
CARP INDUCED BY OXIDIZED SAURY OILTakeshi WATANABE*, Yasunobu MATSUURA**
and Yoshiro HASHIMOTO*

Succeeding to the previous work, in which the so-called "Sekoke" disease of carp was shown to be a typical muscle dystrophy due to oxidized oil, the preventive effect of antioxidants, methylene blue, BHA and ethyl gallate, was examined and compared with that of DL- α -tocopheryl acetate. In addition, oxidized saury oil of different peroxide values and acetone-soluble lipids from dried silk-worm pupae were tested.

As shown in Tables 1 and 4, these antioxidants except DL- α -tocopheryl acetate are ineffective, although they were reported to alleviate some of disorders induced by oxidized fish oils in terrestrial animals. It is also observed that the muscle dystrophy is induced by the oxidized saury oil of a very low peroxide value and also by acetone-soluble lipids from dried silk-worm pupae. This may suggest that peroxide has little connection with the incidence of muscle dystrophy. Results of chemical analyses on the test diets and animals are summarized in Tables 2, 3 and 5.

コイの背こけ病について、昨年著者ら¹⁾はこの病気が酸化サンマ油の投与により容易に起こり、ビタミンEによつて効果的に防止できることを明らかにした。

したがつて、コイの背こけ病はミンク、ブタ、ニワトリなどで知られている酸化脂肪による病変、たとえば黄色脂肪症、筋萎縮などに類似のものと考えられる。一方、家畜のこのような病気はビタミンE以外の物質によつても防止できることが報告されている。たとえば、タラ肝油の投与でヒヨコに発生する encephalomalacia に対して DAM ら²⁾は methylene blue, ascorbic acid, NDGA***, SINGSEN ら³⁾は DPPD***, BUNNELL ら⁴⁾は BHT***, Santoquin*** などの防止効果を認めている。また SINNHUBER ら⁵⁾は酸化ニン油によるネズミの steatitis, 肝臓肥大などに対して α -tocopherol 以外に ethoxyquin*** の効果を認め、ウシのタラ肝油による筋萎縮に対し、BLAXTER ら⁶⁾は試験した数種抗酸化剤のうち、 α -tocopherol と methylene blue にその防止効果を認めている。

そこで筆者らは昨年の実験の追試を行なうとともに、新たに methylene blue, BHA および ethyl gallate の効果を DL- α -tocopheryl acetate のそれと比較してみた。またコイに対する酸化油の毒性が単にその過酸化物だけによるものかどうかをみるために、空気吹き込みで過酸化物質を 150 前後にしたサンマ油

* 東京大学農学部水産化学研究室 (Laboratory of Marine Biochemistry, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo).

** 群馬県水産試験場 (Gunma Prefectural Fisheries Experimental Station).

*** NDGA (nordihydroguaiaretic acid), DPPD (N,N'-diphenyl-p-phenylenediamine), BHT (butylated hydroxytoluene), Santoquin (ethoxyquin, 1,2-dihydro-6-ethoxy-2,2,4-trimethylquinoline).

(以下、酸化サンマ油Aと呼ぶ)と、これをさらに 160~170°C で約3時間加熱して過酸化価を 3~4 に下げたサンマ油(以下、酸化サンマ油Bと呼ぶ)についても試験した。なお乾燥サナギの多用で背こけが発生するといわれているので、乾燥サナギをアセトンで脱脂したものとアセトン可溶物についてそれぞれ検討した。以下その結果をとりまとめて報告する。

実験方法

飼育法と飼料組成 群馬県水産試験場で育成された平均体重約 2.8 g のコイ稚魚を 60 l のガラス水槽で 7 月上旬より 11 月上旬まで同試験場内で約 120 日間飼育した。用水は試験場内に流入する河川水で、各水槽 2.4 l/分 の割合で通水した。水温は最高 23°C (8 月)、最低 11°C (11 月) の範囲内にあつた。なお飼育水槽は附着する藻類を除くため毎週 1 回掃除した。

試験区は 11 区とし、第 1 試験区と第 11 試験区を除き各区 50 尾の 2 群を設けた。両方の群について 2 週間毎に 10 尾ずつを取り上げ体重測定を行なった。また一方の群からは病理組織学的検索のため定期的に所要尾数を抜き、他の群は試験終了後に化学分析に供した。ただし第 1 および第 11 試験区では試験終了時まで試験魚はそのまま維持した。

Table 1. Experimental groups*.

Lot No.	Protein sources	Test oils	Antioxidants (mg%)
1	Defatted white fish meal	Corn oil	None
2	"	Oxidized saury oil A**	None
3	"	"	DL- α -tocopheryl acetate 50
4	"	"	Methylene blue 120
5	"	"	BHA 20
6	"	"	Ethyl gallate 200
7	"	Oxidized saury oil B***	None
8	"	"	DL- α -tocopheryl acetate 50
9	"	Silk-worm pupae oil	None
10	"	"	DL- α -tocopheryl acetate 50
11	Defatted silk-worm pupae meal	Corn oil	None

* Composition of the basal diet: defatted white fish meal or defatted silk-worm pupae meal 60, test oil 10, α -starch 30, vitamin mixture 0.2, mineral mixture 2, and CMC 2 g.

** Oxidized by air-blowing (P. O. V. 150).

*** Oxidized by air-blowing and subsequent heating at 160~170°C for 3 hours (P. O. V. 3~4).

3 日間絶食させた試験魚に 1 週間飼料 No. 1 (Table 1) を与え予備飼育した後、Table 1 に示した試験飼料を与えた。投餌量は 9 月下旬までは 1 日乾物として体重の 5 % とし、それ以後はコイの摂餌状態によって適宜調節したが、サナギ油添加群は比較的摂餌が良好であつたので、3 % 投与を試験終了時まで続けた。試験飼料 100 に対して水 80 を加え、よく練つて午前と午後の 2 回に分けて投与し、日曜日は餌止めた。

試験飼料のうち魚粉は n-ヘキサンで脱脂した北洋ホワイトフィッシュミール(粗蛋白 70.7%, 粗脂肪 0.38 %, 水分 10.1%) である。サナギミール(粗蛋白 72.8%, 粗脂肪 0.40%, 水分 10.4%) は市販丸干サナギ(粗蛋白 58.9%, 粗脂肪 22.4%, 水分 6.9%) をチョッパーで 3 回粉碎して、25 メッシュ以下の粉末にし、3 倍量のアセトンを加えて 7 時間室温で攪拌抽出し、この操作を 3 回繰返して脱脂したものである。

サンマ油は白土精製を行なった市販品を 40°C で約 28 時間空気吹き込みを行ない、過酸化価が 150 前後になるように酸化させた A と、この酸化油をさらに 160~170°C で約 3 時間加熱し、過酸化価を 3~4 に下げたもの B を調製した。乾燥サナギからアセトン抽出で得たサナギ油の過酸化価は 45 前後であつた。

Table 2. Characteristics of test oils.

	Acid value	Saponification value	Iodine value	Peroxide value
Corn oil	0.07	195.7	121.6	1.2
Silk-worm pupae oil	16.90	197.6	135.7	40.3
Oxidized saury oil A	1.75	190.8	139.8	155.2
Oxidized saury oil B	1.86	191.0	134.9	4.0

Table 3. Vitamin E content of experimental meals and oils ($\mu\text{g/g}$).

Defatted white fish meal	Defatted silk-worm pupae meal	Corn oil	Silk-worm pupae oil	Oxidized saury oil A	Oxidized saury oil B
13	4	260	100	33	38

トモロコシ油は市販のサラダ油である。なお各試料油はすべて 8 ml 宛アンプルに入れ、真空ポンプで脱気し、窒素ガスを注入した後密封、冷蔵庫中に保存し、毎日必要に応じてアンプルを開封するようにした。また約 20 日毎に新たな試料油をアンプルに詰めるようにした。このように保存すれば酸化サマ油で約 50 日過酸化価をほぼ一定に保つことができた。なお各種添加油の諸恒数を Table 2 にあげた。また、これらの試料油およびミールにはそれぞれ Table 3 に示すようにかなりのビタミン E が測定された。

ビタミン混合物と無機塩は前報¹⁾通りである。

各抗酸化剤の添加量は陸上動物の試験で使用された最大量に準じ、各抗酸化剤をエタノールに溶解した後、 α -澱粉に吸着させて飼料に添加した。

試験魚の処理および分析法 飼育試験終了後、試験魚はドライアイスで凍結して東京へ運び分析に供した。ただし TBA 値は取り上げ後ただちに測定した。TBA 値、水分、粗脂肪、ビタミン E の測定法は前報¹⁾通りである。

結 果

飼育結果ならびに背こけの発生状況 90 日目と 120 日目に全試験魚を取り上げて外観的に背こけ発生状況を調べた結果は Table 4 の通りで、トモロコシ油を試験油とした試験区 (第 1 および第 11) ならびに供試油の種類にかかわらず DL- α -tocopheryl acetate を添加した試験区 (第 3, 第 8 および第 10) には全く背こけを認めなかった。それ以外の区では多少の遅速はあるが、いずれも背こけが認められた。methylene blue を添加した第 4 区では試験開始 7 日目にはすでに背こけ状態が出現しはじめた。その他の試験区では背こけが発生しはじめたのは試験開始後 60 日頃であつた。120 日目には 90 日目より多少背こけが減少していたが、これは次第に水温が低下し、それに伴う摂餌量が減少したためかも知れない。ビタミン E を添加しないでサナギ油を与えた第 9 区では背こけの発生は他群にくらべてかなり遅く、90 日頃にはじめて認められた。なお正常魚と背こけ魚との体各部の断面部は前報¹⁾に写真で示したものとまったく同じであつた。

かなりの高密度の飼育あるいは低水温のためか、各群とも成長、飼料効率ともに著しく悪かつた。とくにサナギ油を添加した群では飼料効率が悪かつた。各群の成長度、飼料効率その他は Table 4 に示す通りである。この表で特に目立つことは脱脂したサナギミールを与えた第 11 区では成長および飼料効率が他群にくらべてかなり良かつたことで、サナギ蛋白の栄養価が優れていることを示しているようである。なお Table 4 の死亡率は事故死および不明減耗を含んでいる。

試験魚の分析結果 飼育終了後取り上げた各試験区のコイについての分析結果を Table 5 に示す。

肝臓のビタミン E 含量は DL- α -tocopheryl acetate を添加した第 3, 第 8 および第 10 区では高い値を示しており、背こけの発生防止に役立っていることがうかがわれる。その他の群ではかなり値が低かつた。

Table 4. Results of the feeding experiment.

Lot No.	Tank No.	Initial weight (g)	Final weight (g)	Percent gain	Feed efficiency	Mortality (%)	Muscle dystrophy (%)	
							90 days	120 days
1	1	3.3	10.5	218	0.29	2	0	0
2	2	3.5	10.2	191	0.27	16	21	27
	3	3.2	10.6	231	0.30	2	26	32
3	4	3.5	9.9	177	0.24	4	0	0
	5	3.6	11.1	208	0.28	0	0	0
4	6	3.4	8.8	158	0.25	6	55	31
	7	3.8	8.5	123	0.20	4	60	36
5	8	3.7	9.0	143	0.20	8	60	38
	9	3.4	9.8	188	0.26	4	50	40
6	10	3.5	10.8	208	0.26	10	20	24
	11	4.2	10.2	142	0.22	2	22	24
7	12	3.3	8.7	164	0.22	8	43	35
	13	3.6	10.5	191	0.29	0	27	28
8	14	4.0	10.9	172	0.25	0	0	0
	15	3.7	11.0	197	0.27	0	0	0
9	16	3.6	9.2	155	0.19	4	2	10
	17	3.7	8.7	135	0.18	2	0	0
10	18	3.6	9.4	161	0.20	2	0	0
	19	3.4	9.3	173	0.22	2	0	0
11	20	3.8	14.4	279	0.34	2	0	0

Table 5. Results of chemical analyses on test animals.

Lot No.	Muscle			Hepatopancreas
	Moisture (%)	Crude fat (%)	TBA	Vitamin E ($\mu\text{g/g}$)
1	78.4	2.4	0.6	1.5
2	80.3	2.1	1.3	1.5
3	79.1	2.0	0.4	15.0
4	80.1	2.2	1.0	1.2
5	81.7	2.2	1.3	2.0
6	81.1	2.3	0.9	1.1
7	82.0	2.1	1.0	1.2
8	79.4	1.9	0.3	26.5
9	78.9	2.1	0.7	2.0
10	79.5	1.7	0.2	107.0
11	79.4	1.6	0.6	4.7

サナギ油にビタミンEを添加した第10区では他群にくらべて高い値が認められたが、恐らく3%投餌を続けた結果と考えられる。

TBA 値は各区とも比較的低い値を示し、大きな差は認められなかった。しかし、酸化油添加群およびビタミンE以外の抗酸化剤を添加した群では高く、ビタミンEを与えた群では低く、ビタミンEの体内における抗酸化作用がうかがわれる。

筋肉の水分含量についても同じような傾向がみられ、ビタミンEを添加しない酸化油添加群では高い値を示している。粗脂肪含量は水分ほど著しくないが、やはり同じような傾向を示した。

なお、methylene blue を添加した第4区では試験魚の筋肉を摘出した際、空気にふれると青色に着色す

るのが認められた。methylene blue が多少筋肉内に蓄積されるものと思われる。

考 察

コイの背こけ病は酸化脂肪の投与により容易に発現し、ビタミンEを同時に添加すれば効果的に予防できることが再確認された。また乾燥サナギの毒性がアセトン可溶脂質部分にあることを確めた。前回の試験¹⁾と比較すると背こけの発生率がかなり低くかつたが、多分試験期間を通じて水温が低くかつたためとも考えられる。

陸上動物において酸化脂肪の毒性を軽減する効果の認められている methylene blue, BHA, ethyl gallate は全くコイでは効果がなく、methylene blue 添加群では投餌開始後7日目にはすでに背こけが出現しはじめ、methylene blue はむしろ背こけの発生を促進するよう思われた。これら3種の抗酸化剤のうち methylene blue と BHA 添加群に背こけ発生率が高く、ethyl gallate 投与群は比較的低くかつた。コイと家畜のこのような違いは抗酸化剤の吸収の相違あるいは生体内における抗酸化剤の働きの著しい相違を示唆するものであろう。その理由づけは難かしいとしても興味ある現象と思われる。

次に一度過酸化物質が150附近になるように空気吹き込みで酸化させたサンマ油を、さらに160~170°Cで加熱して過酸化物質を3~4まで下げたものを投与した群にも高い背こけ発生率がみられ、ビタミンEにより予防できた。このことからコイの背こけ病は過酸化物質によるものではなく、その他の酸化生成物の毒性によるものと思われる。組織学的な検索の結果をまつてさらに検討したいが、もし両種の酸化油による症状が全く一致するなら、低温で空気を吹込むだけで簡単に毒性物質が生成する可能性が強い。

試験魚の生物学的測定結果および化学分析の結果は前回の試験とほぼ同様であるが、背こけの発生した試験区ではTBA値および水分含量が高く、ビタミンE添加群では低い傾向がはつきり認められた。

背こけ病についてはまだいくつかの問題が残されているが、さしあたってコイに対する methylene blue の作用、未検討の ethoxyquin などの抗酸化剤の防止効果、酸化生成物の分離などについて検討を加える予定である。

要 約

コイの背こけ病は酸化油の投与により容易に発現し、ビタミンEによつて効果的に防止できることを再確認するとともに、乾燥サナギの毒性がそのアセトン可溶脂質部にあることを確めた。

陸上動物において酸化脂肪の毒性を軽減する効果の認められた methylene blue, BHA, ethyl gallate はコイでは全く効果のないことがわかつた。

また、一度過酸化物質を150附近まで酸化させたサンマ油を160~170°Cで加熱して過酸化物質を下げた酸化サンマ油投与群にも高い背こけ発生率がみられ、ビタミンEにより予防できた。このことからコイの背こけ病は酸化脂肪の過酸化物質によるものではなく、その他の酸化生成物によるものと思われた。

終わりに、本実験を行なうにあたり、ビタミンその他の提供を頂いた、日本農産工業株式会社中央研究所に厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 橋本芳郎・岡市友利・渡辺 武・古川 厚: 本誌 **32**, 64~69 (1966).
- 2) H. DAM, I. PRANGE, I. KRUSE and E. SONDERGAARD: *Biochem. Biophys. Acta.*, **2**, 501~513 (1948).
- 3) E. P. SINNGSEN, R. H. BUNNELL, L. D. MATTERSON and E. L. JUNGHER: *Poultry Sci.*, **34**, 262~271 (1955).
- 4) R. H. BUNNELL, L. D. MATTERSON and E. P. SINGSEN: *ibid.* **34**, 1068~1079 (1955).
- 5) R. O. SINNHUBER, A. A. RASHEED and J. E. OLDFIELD: *J. Nutrition.*, **79**, 323~332 (1963).
- 6) K. L. BLAXTER, F. BROWN and W. A. WOOD: *ibid.* **7**, 337~349 (1953).