Spirulina (ラン藻) の主カロテノイド成分 Zeaxanthin と Myxoxanthophyll のニシキゴイ体色鮮明化に対する効果

松野隆男・永田誠一・岩橋正雄

小池利通・岡田 稔

(1978 年 12 月 20 日受理)

Intensification of Color of Fancy Red Carp with Zeaxanthin and Myxoxanthophyll, Major Carotenoid Constituents of *Spirulina*

Takao MATSUNO^{*1}, Seiichi NAGATA^{*1}, Masao IWAHASHI^{*2},
Toshimichi KOIKE^{*2}, and Minoru OKADA^{*2}

It has been shown that the major carotenoids of *Spirulina* are zeaxanthin and myxoxanthophyll. In order to determine which is effective to intensify the reddish color of fancy red carp, test diets containing either zeaxanthin or myxoxanthophyll were fed to solid red yearling fish for 69 days.

Zeaxanthin was quite effective in color development, but no effect was found with myxoxanthophyll. It was concluded that the intensification of the color of fancy red carp with *Spirulina* is due to zeaxanthin, because the amount of astaxanthin in the integument of the test group whose diet contained zeaxanthin increased to eight times that of the control.

In addition to the following five previously identified carotenoids, lutein, zeaxanthin, α -doradexanthin, 4-ketozeaxanthin (β -doradexanthin) and astaxanthin, during the present investigation five other carotenoids, β -carotene, cryptoxanthin, diatoxanthin, β -carotenetriol (4-hydroxy-zeaxanthin), β -carotenetetrol, and idoxanthin were also identified from the integument of fancy red carp.

The occurrence of β -carotenetriol and idoxanthin as dominant gives indirect evidence supporting the hypothesis proposed by HATA *et al.* of a metabolic pathway from zeaxanthin to astaxanthin through 4-ketozeaxanthin as intermediate. The scheme of the metabolic pathway will be as follows: zeaxanthin $\rightarrow$ β -carotenetriol $\rightarrow$ 4-ketozeaxanthin $\rightarrow$ idoxanthin $\rightarrow$ astaxanthin.

ニシキゴイの色素に関する研究はまず平尾ら¹⁾によつて着手され、その皮およびヒレに含まれる色素はカロテノイドであり、lutein と astaxanthin 様カロテノイドがその主成分であるとされた。また平尾ら²⁾はニシキゴイに lutein と astaxanthin の結晶をそれぞれ別々に鯉用配合飼料に添加投与してその色調を比較観察したところ、astaxanthin 投与区が最も赤く着色し、次いで lutein 投与区、対照区の順であることをみとめた。その後、片山ら³⁾はニシキゴイのカロテノイド成分を研究の結果、表皮に lutein, α -doradexanthin (3,3'-dihydroxy-4-keto- α -carotene), β -doradexanthin (adonixanthin = 3,3'-dihydroxy-4-keto- β -carotene) および astaxanthin の存在をみとめ、さらに astaxanthin の生合成^{4,5)}に関して lutein を投与すれば astaxanthin に転換されるが zeaxanthin を投与した場合には astaxanthin に転換さ

れないことをみとめ、astaxanthin の生合成経路として lutein $\rightarrow$ α -doradexanthin $\rightarrow$ astaxanthin 経路を提出した。

一方、秦ら^{6,7)}は片山らとは全く独立にこの問題に関して研究し、ニシキゴイに zeaxanthin, astaxanthin を鯉用配合飼料に添加投与飼育すれば澄んだ赤い色に着色するが、lutein の場合には片山らの結果とは異なり黄みがかった赤橙色にしか着色せず、しかも白地の部分に汚れとして lutein が遊離型で蓄積⁸⁾するが zeaxanthin は白地の部分に蓄積されないことを観察している。このことはすでに著者らのうちの岩橋ら⁹⁾によつてもみとめられていた。またそのカロテノイド組成¹⁰⁾においても zeaxanthin, astaxanthin 投与区は対照区に比べ astaxanthin が最も多く、5~6倍に増加し、lutein 投与区では 4-keto dihydroxycarotene, lutein が最も多く、

^{*1} 京都薬科大学 (Kyoto College of Pharmacy, Misasagi, Yamashina-ku, Kyoto 607 Japan).

^{*2} 新潟県内水面水産試験場 (Niigata Pref. Freshwater Fish. Exp. St., Nagaoka, Niigata 940-11 Japan).

対照区に比べそれぞれ 8~10 倍に増加することをみている。さらに秦ら^{6,7)}はこの事実を確認するために、ラベルした ¹⁴C-zeaxanthin をニシキゴイに投与飼育した場合に、腸より吸収された ¹⁴C-zeaxanthin は体表にて adonixanthin (4-keto zeaxanthin) をへて astaxanthin に転換されるが、¹⁴C-lutein を投与した場合に doradexanthin までにしか代謝されないことをみためたのでニシキゴイにおける astaxanthin の生合成経路として zeaxanthin→adonixanthin (4-keto zeaxanthin)→astaxanthin の経路を提出している。

さて、これらの基礎的代謝研究と平行して実用的な立場から体色の鮮明化に有効な物質の検索がなされてきた。本論文でとりあげたラン藻に属する *Spirulina* の利用はその実例である。

著者らのうち岩橋、小池ら¹⁰⁾はすでにニシキゴイの体色鮮明化の実用化に関する研究を種々試みていたが、たまたま山梨県甲府市石和産のニシキゴイが白地を汚すことなく赤味を強めていることを知り養魚池を調査の結果、池中に繁茂する *Oscillatoria* を主とするラン藻類をニシキゴイが捕食していることによると解釈した。また一方では *Spirulina* の利用に関しては旭カーボン(株)¹¹⁾で開発されており、その後著者らのうち、岩橋、小池ら¹²⁾によつて *Spirulina* のニシキゴイ体色鮮明化の応用

研究が行なわれその効果が認められた。そしてその際の鮮明化の条件は total carotenoids (β-carotene に換算) として 10 mg% の添加量で 100 日後投与すれば最も効率がいことがわかつた。

ところで *Spirulina* のカロテノイド組成についてはすでに本間ら¹³⁾の報告があるが、今回著者らはこれについて再検討をこころみるとともにニシキゴイ体色鮮明化にもつとも寄与しているのではないかと考えられる *Spirulina* の主カロテノイド成分である zeaxanthin および myxoxanthophyll の結晶化をはかり、ニシキゴイ(赤無地、0年魚)を用い、対照区、zeaxanthin (Z) 3 mg% 区、Z-6 mg% 区、myxoxanthophyll (M) 6 mg% 区、M-12 mg% 区の5区にわけて 69 日間飼育し、各区の体色鮮明化効果について比較検討を試みた。また zeaxanthin および myxoxanthophyll をそれぞれ 69 日間投与後の赤無地ニシキゴイのカロテノイド組成についても対照区のそれと比較検討した。本論文ではこれらの実験の結果えられた知見について報告する。

実験および結果

Spirulina より zeaxanthin および myxoxanthophyll の結晶の調製 *Spirulina* のカロテノイド含量ならびにその組成についてはすでに本間ら¹³⁾の報告がある

Table 1. Amounts and percentage composition of carotenoids in *Spirulina*

Carotenoid	mg%	%		
β-carotene	8	20.7	28.1	44.63 ^{*1}
β-carotene-5,6-epoxide	—	—	—	1.27
Echinenone	} 1.5	1.4	} 5.1	2.05
Cryptoxanthin		2.3		3.14
Zeaxanthin	10	34.0	30.2	15.99
Diol-ketone	—	—	—	10.63
Myxoxanthophyll	10	29.3	34.1	19.06
Unidentified	—	—	—	0.78
Others	2.3	12.3	2.3	2.45

*1 Data appeared in the paper by N. Honma et al.; Kenritsu Niigata Joshi Tanki Daigaku Kiyo, 10, 135-144 (1973).

Table 2. Average body length and weight of yearling of solid red fancy carp after 69 day feeding experiment

Group	Body length (cm)	Body weight (g)
Initial	8.1	9.9
Control	12.6	36.1
Zeaxanthin 3 mg% (final)	12.4	31.7
Zeaxanthin 6 mg% (final)	11.8	25.1
Myxoxanthophyll 6 mg% (final)	12.3	29.1
Myxoxanthophyll 12 mg% (final)	12.4	30.6

Table 3. Amounts of carotenoids in fancy red carp

mg%:					mg/cm ² :
	Skin (upper)	Skin (below)	Fin	Total	Skin (upper)
Control	0.472	0.391	0.808	1.671	0.000309
Zeax. 3 mg%	0.939	0.602	1.208	2.749	0.000769
Zeax. 6 mg%	2.626	1.145	2.538	6.312	0.001778
Myxox. 6 mg%	0.632	0.340	0.835	1.807	0.000533
Myxox. 12 mg%	0.620	0.371	0.947	1.938	0.000576

Fig. 1. Extraction of carotenoids of fancy red carp.

が、われわれはそれとは別個に旭カーボン(株)から供与された *Spirulina* についてそのカロテノイド組成、含量を検討した。その結果 Table 1 に示したごとく *Spirulina* のカロテノイド主成分は zeaxanthin (30~34%, 10 mg%), myxoxanthophyll (30~34%, 10 mg%) でほぼ等量ふくまれていた。そこで *Spirulina* 1 kg からそのカロテノイドを抽出した。えられたカロテノイドは MgO: celite 545 (1:1) を吸着剤とするカラムクロマトグラフィーにより 30% acetone/p.e で zeaxanthin を、MeOH で myxoxanthophyll の画分を溶離、分取し、それぞれ約 100 mg の zeaxanthin および myxoxanthophyll の結晶をえた。

飼育条件 ニシキゴイは赤無地、0 年魚をもちい、120 l の循環濾過水槽で 1 区 50 尾として 69 日間飼育した。ニシキゴイの体色鮮明化に有効なカロテノイドの添加量はすでに岩橋、小池ら¹²⁾が報告済みの結果を適用した。すなわち鯉用配合飼料に zeaxanthin の結晶を 3 mg%, および 6 mg% 添加投与、myxoxanthophyll の結晶を 6 mg%, 12 mg% 添加投与の 4 区と対照区の計 5 区において 1975 年 8 月 21 日~1975 年 10 月 28 日の 69 日間飼育した。飼育開始前、および最終取り上げ時での平均体長、体重は Table 2 にしめしたとおりである。

カロテノイドの抽出、ならびにそれらの含量 各区の

カロテノイド含量 (mg% および mg/cm²) を測定するために、ニシキゴイの側線より上部 (背部) と下部 (腹部) の皮およびヒレの部分にわけ Fig. 1 に示した方法によりカロテノイドを抽出し、その含量を測定した。含量計算は $E_{1cm}^{1\%}$ 2300 とし、 λ_{max} 472 nm (in p.e) での吸光度を測定した。えられた結果を Table 3 に示した。

カロテノイドの分離、精製 対照区、zeaxanthin 投与区 (3 mg% 投与区と 6 mg% 投与区を合併)、myxoxanthophyll 投与区 (6 mg% 投与区と 12 mg% 投与区を合併) との 3 つのグループにわけ、それぞれ常法によりケン化後、えられた不ケン化物を Fig. 2 に示したごとく MgO: celite 545 (1:1) を吸着剤として、展開溶媒を p.e→acetone→MeOH と順次極性を増すことにより xanthophyll 区分の分画をおこなった。MeOH で溶離されないケトカロテノイド区分は酢酸-MeOH (5:95) で溶離させ、さらに silicic acid: celite 545 (3:1) を吸着剤とするカラムクロマトグラフィーにより p.e→ether 溶媒系で分画をおこなった。

カロテノイドの同定 各カロテノイドの同定は各標品カロテノイドとの直接比較 (可視部吸収スペクトル, co-TLC, co-column chromatography), およびアセチル化反応, allylic-OH 活性テスト, エポキシ呈色反応, I₂ による異性化反応などによった。ケトカロテノイドの

Fig. 2. Column chromatography of carotenoids.

Table 4. Percentage composition of individual carotenoid from integument of fancy red carp

Carotenoid	Control	Zeaxanthin group	Myxoxanthophyll group
β-carotene	1.9	t	0.7
Cryptoxanthin	6.1	1.7	0.9
Unidentified I	1.0	0.3	0.2
Lutein	4.8	1.0	3.1
Zeaxanthin	2.7	16.9	4.1
Unidentified II	3.3	t	t
Diatoxanthin	5.4	1.2	2.1
β-carotenetriol	14.5	5.6	21.7
β-carotenetetrol	9.5	5.9	7.1
Doradecin (main, β-)	19.8	20.9	32.2
Idocin	17.6	8.5	13.9
Astacene	13.1	38.6	14.0

場合は NaBH_4 により対応するアルコールに導き、えられた還元成績体について上記定性反応を適用、同定した。

同定された各カロテノイドとそのパーセント組成を Table 4 に示した。

考 察

投与実験の結果 (Table 3) より total carotenoid 量は zeaxanthin 3 mg% 投与区は対照区に比べて約 2 倍、6 mg% 投与区は約 4 倍に増加していることがみとめられた。一方、myxoxanthophyll 投与区では 6 mg% および 12 mg% 投与区はいつもほとんどカロテノイド含量の増加がみとめられなかった。

ニシキゴイの部位別カロテノイド量をみると Table 3 に示したごとく背部の場合、zeaxanthin 3 mg% 投与区は対照区と比較して 2 倍、6 mg% 投与区は約 6 倍とほぼ投与量に比例してカロテノイドの増加がみとめられた。ところが一方、myxoxanthophyll 投与区は 6 mg% および 12 mg% 投与区とも対照区と比較してほとんど変化はなかった。腹部の場合にも背部の場合にみとめられた結果と同じく zeaxanthin 投与区においてのみカロテノイド含量の増加がみとめられた。

カロテノイド含量についてえられた結果はわれわれが肉眼でニシキゴイの色調を観察した結果ともよく一致している。すなわち zeaxanthin 投与区は対照区に比べて投与後、赤みを増すが、myxoxanthophyll 投与区は

Fig. 3. Metabolic pathway from zeaxanthin to astaxanthin in fancy red carp.

とんど色調の変化がなかった。以上の蓄積飼育実験の結果および色調の観察結果とを考えあわせて、体色鮮明化に有効な *Spirulina* の主カロテノイドである zeaxanthin および myxoxanthophyll のうち、zeaxanthin がニシキゴイ体色の鮮明化に大きく寄与していることがわかった。zeaxanthin が鮮明化に有効なカロテノイドであるとの結論はすでに秦ら⁹⁾ がニシキゴイを使つて確かめているが、著者らの今回の実験結果もこのことを支持している。

さて、カロテノイド組成については Table 4 に示した。zeaxanthin 投与区 (zeaxanthin 3 mg%, 6 mg% 投与区各5尾づつを合併したもの) は対照区と比較してその含量 (mg%) がふえているカロテノイドは astaxanthin と zeaxanthin であり、astaxanthin は約8倍に zeaxanthin は約17倍に増加していた。逆に減少しているカロテノイドはその減少の度合が著しいものから順に lutein, diatoxanthin, β -carotenetriol, β -carotenetetrol, idocin であった。

以上の結果から各カロテノイド含量を比較すると、

zeaxanthin を投与すれば zeaxanthin は勿論であるが、体色鮮明化にもつとも寄与する astaxanthin の増加がみとめられたのである。このことはニシキゴイの体内に取り込まれた zeaxanthin が astaxanthin へ転換されたことを物語るものである。この推定の正しいことはすでに秦ら⁷⁾ がラベルしたカロテノイドを使つて証明している。すなわち彼等らは ^{14}C -zeaxanthin を投与すれば astaxanthin に転換されるが、 ^{14}C -lutein を投与しても α -doradexanthin までにしか転換されないことを明らかにしている。そして zeaxanthin から astaxanthin への生体内代謝経路として zeaxanthin $\rightarrow$ adonixanthin (4-ketozeaxanthin) $\rightarrow$ astaxanthin の経路を提出している。著者らが今回えた結果はさらにこの事実を間接的に証明したことになる。

ケン化後カロテノイド画分中の idocin の存在は魚類でのカロテノイドとして idoxanthin を検出した最初の例であり¹⁴⁾、本研究によりニシキゴイに β -carotenetriol, 4-ketozeaxanthin, β -carotenetetrol, idoxanthin などの存在がみとめられたことから、zeaxanthin より

astaxanthin に至る経路として Fig. 3 の経路を提出したわけである。そして今迄、魚類中に見出されていなかった idoxanthin の存在がたしかめられたことは astaxanthin の前駆体を捕捉したことになる。

要 約

1. ニシキゴイの体色鮮明化に有効な *Spirulina* の主カロテノイドである zeaxanthin, myxoxanthophyll をそれぞれ別々にニシキゴイに投与、飼育した結果, zeaxanthin のみが鮮明化に有効なるカロテノイドであることをみとめた。なお, total carotenoid 量は zeaxanthin 3 mg% 投与区は対照区に比べて 2 倍, 6 mg% 投与区は 4 倍に増加していた。

2. ニシキゴイのカロテノイド成分として、従来報告されていた lutein, zeaxanthin, α -doradexanthin, β -doradexanthin (4-ketozeaxanthin), astaxanthin 以外に今回 β -carotene, cryptoxanthin, diatoxanthin, β -carotenetriol, β -carotenetetrol および idoxanthin の存在を追加確認した。

3. zeaxanthin より astaxanthin への生合成において astaxanthin の前駆体と考えられる idoxanthin の存在を確認し、ニシキゴイにおける zeaxanthin より astaxanthin への生合成経路についての仮説を提出した。

4. zeaxanthin 3 mg%, 6 mg% をニシキゴイ (赤無地, 0 年魚) に 69 日間投与飼育すれば, zeaxanthin および astaxanthin がそれぞれ対照区と比べて zeaxanthin は約 17 倍, astaxanthin は約 8 倍に増加することをみとめた。

文 献

- 1) 平尾秀一・菊地 嶺・田口脩子: 日水誌, 29, 371-381 (1963).
- 2) 山川健重・平尾秀一・菊地 嶺・飯塚三哉: ビタミン, 38, 145 (1968).
- 3) T. KATAYAMA, H. TSUCHIYA, and C.O. CHICHESTER: *Kagoshima Daigaku Suisan Gakubu Kiyo*, 20, 173-184 (1971).
- 4) T. KATAYAMA, T. MIYAHARA, M. SHIMAYA, and C.O. CHICHESTER: *Int. J. Biochem.*, 3, 569-572 (1972).
- 5) T. KATAYAMA, T. MIYAHARA, Y. TANAKA, and M. SAMESHIMA: *Kagoshima Daigaku Suisan Gakubu Kiyo*, 22, 39-45 (1973).
- 6) M. HATA and M. HATA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 41, 653-655 (1975).
- 7) M. HATA and M. HATA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 42, 203-205 (1976).
- 8) M. HATA and M. HATA: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 44, 83-84 (1978).
- 9) 岩橋正雄・細谷久信: 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, 1, 63-72 (1971).
- 10) 岩橋正雄・小池利通: 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, 2, 38-47 (1972).
- 11) 旭カーボン株式会社: 魚の飼育方法, 特開, 昭和 48 年-75389 (1973).
- 12) 岩崎正雄・小池利通: 新潟県内水面水産試験場調査研究報告, 3, 104-108 (1974).
- 13) 本間伸夫・中山豊蔵・佐藤安紀: 県立新潟女子短期大学研究紀要, 10, 135-144 (1973).
- 14) S. NAGATA and T. MATSUNO: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 45, 537 (1979).