

ハマチ稚魚に対する酸化油脂の毒性とグルタチオンによる解毒効果

誌名	日本水産学会誌
ISSN	00215392
著者	村井, 武四 秋山, 敏男 尾形, 博
巻/号	54巻1号
掲載ページ	p. 145-149
発行年月	1988年1月

ハマチ稚魚に対する酸化油脂の毒性とグルタチオンによる解毒効果

村井武四, 秋山敏男, 尾形 博, 鈴木 徹

(1987年10月13日受理)

Interaction of Dietary Oxidized Fish Oil and Glutathione
on Fingerling Yellowtail *Seriola quinqueradiata*Takeshi Murai,*² Toshio Akiyama,*² Hiroshi Ogata,*²
and Thoru Suzuki*²

A 4-week feeding study and succeeding hematological analyses were carried out using fingerling yellowtail in order to test the interaction of dietary oxidized oil and glutathione. Major ingredients of the experimental diets were raw sand lance (61%) and raw mysis (40%). Supplemental level of oxidized cod viscera oil (POV, 84 meq/kg) was 5% with or without glutathione supplementation (0.1%, reduced form). Fish fed the diet with the oxidized oil alone showed poor growth rate and high mortality (23% in 4 weeks). Although no sekoke disease like symptom was detected even in this dietary group, the hematological analyses revealed that feeding the oxidized oil lowered hematocrit level and serum neutral fat content, but increased glutamic-oxaloacetic transaminase and glutamic-pyruvic transaminase activities, and immunoglobulin M level in the serum as well as free amino acid levels. Supplementation of glutathione to the diet prevented these symptoms almost completely.

酸化油脂の投与でハマチ稚魚の成長率と生残率が大幅に低下し,¹⁾ また、背こげ病の発生することが報告されている。²⁾ ハマチの主たる餌料原料は、極めて酸化され易い高度不飽和脂肪酸含量の高い海産の冷凍魚であるので、酸化脂質の影響は無視できない問題である。脂質酸化の初期段階における有毒成分の主体はヒドロペルオキシド (HPO) であるといわれている。³⁾ トコフェロール等の抗酸化剤を飼餌料に添加することにより、酸化脂質による障害をハマチでもある程度防止できることが知られている。²⁾ これは抗酸化剤の添加によりラジカルが消去され、HPO 生成の連鎖反応が阻止されるためであると考えられている。しかしながら、抗酸化剤には一度生成された HPO を消去する作用はなく、この作用を有するのはグルタチオンペルオキシダーゼであり、この酵素は還元グルタチオンを消費して、体内に取り込まれた HPO を無毒なヒドロキソ体に変換するとされている。⁴⁾ そこで、HPO の生成速度をモニターしながら酸化させた油脂と還元型グルタチオンを添加した餌料を用いてハマチ稚魚の飼育試験を行い、血液性状、血清成分等の分析を行い、酸化脂質の毒性およびグルタチオンの解毒効

果を生理・生化学的に検討した。

材料および方法

酸化油脂は理研ビタミン株式会社から提供された抗酸化剤無添加の精製タラ肝油を用いて、次のように調製した。供試油脂を冷暗所 (3°C) で空気を吹き込みながら 30 日間、さらに 14 日間同一条件下で蛍光灯の照明も加え酸化させ、過酸化価 (POV) が約 60 meq/kg に達した後、容器一杯に泡立っている状態のまま屋外に出し、直射日光下に 4 時間放置した。この条件下で POV が 84 meq/kg に達したものを酸化油脂として直ちに使用した。POV の変化は常法でモニターした。試験餌料の組成は Table 1 に示した通り、イカナゴ 61% とイサザアミ 30% を主原料とする生餌であった。1 区の対照餌料には、精製タラ肝油を酸化開始前に分取し、エトキシケン を 500 ppm 加えて 5% 添加した。ビタミン混合はリポフラビン含量の比較的低いエーザイ株式会社製の海産魚用混合を用いた。2 区には上記酸化油脂を 5%、3 区には酸化油脂の他に還元型グルタチオン (和光純薬工業株式会社) を 0.1% 添加した。これら原料は完全に解凍す

*1 本報の概要は昭和 62 年度日本水産学会春季大会で発表した (講演要旨 p. 41)。また、本研究の一部は文部省科学研究費補助金 (No. 59360021) によって行われた。

*2 水産庁養殖研究所・栄養代謝部 (Fish Nutrition Division, National Research Institute of Aquaculture, Tamaki, Mie 519-04, Japan)。

Table 1. Composition of the experimental diets

	Diet No.		
	1	2	3
Ingredient (g/kg)			
Raw sand lance	610	610	609
Raw mysis	300	300	300
Crude sodium arginate	30	30	30
Feed oil* ¹	50	0	0
Oxidized feed oil* ²	0	50	50
Vitamin mix* ³	10	10	10
Glutathione (reduced form)* ⁴	0	0	1
Proximate composition (%)			
Moisture	75.4	73.8	74.0
Crude protein	10.7	11.3	11.9
Crude fat	8.3	8.3	8.3
Ash	2.2	2.3	2.4

*¹ Product of Riken Vitamin Co. Ltd.*² See the text for detail.*³ Pre-mix for saltwater fishes, product of Eizai Co. Ltd.*⁴ Product of Wako Pure Chemical Industries Ltd.**Table 2.** Fatty acid composition (%), vitamin A and E contents and POV in the experimental diets

	Diet No.		
	1	2	3
Fatty acid			
14:0	4.39	3.54	4.36
14:1	0.19	0.18	0.17
16:0	13.63	12.42	12.92
16:1	7.40	6.74	6.99
17:0	1.38	1.47	1.34
17:1	0.85	1.10	0.77
18:0	2.05	2.58	1.86
18:1	14.62	13.88	12.86
18:2	0.35	3.42	0.76
18:3	0.55	0.79	0.56
18:4	0.19	0.07	0.53
20:1	12.83	9.89	12.55
20:2	2.22	2.02	2.57
20:3	0.04	0.05	0.25
20:4 ω 6	0.21	0.18	0.80
20:4 ω 3	8.33	7.72	9.55
20:5 ω 3 & 22:1	14.41	14.40	14.25
Unknown	2.66	3.05	2.74
22:4 ω 6	0.99	1.01	0.64
22:5 ω 6	1.03	0.99	1.26
22:5 ω 3	1.16	1.07	1.11
22:6 ω 3	10.19	9.91	10.19
Vitamin & POV			
Vitamin A (g/100 g)	370	250	250
Vitamin E (mg/100 g)	4.28	3.67	4.04
POV (meq/kg)	2.5	25.7	14.0

ることなく、手早く秤量、攪拌後モイストベレッターでミンチとした。調製した餌料は密閉容器に収容後、直ちに凍結し、 -20°C の冷凍庫に保存した。

調製後の餌料の一般成分 (Table 1) は常法により、脂肪酸組成はガスクロマトグラフで分析した。ビタミン A と E 含量および POV は日本冷凍食品検査協会に依頼して、ビタミンは高速液体クロマトグラフで、また POV は常法にて分析した。分析値は Table 2 に示した通りであり、脂肪酸組成とビタミン E 含量には余り顕著な区間差はなく、油脂の酸化過程および餌料貯蔵中にこれらの成分はそれほど破壊されなかったと考えられた。一方、ビタミン A 含量は、酸化油脂を添加した 2 区と 3 区が対照区より約 30% 低い値を示した。しかしながら、最も低い区でもビタミン A と E は共に竹田の報告しているハマチの要求量⁸⁾ を十分満たす値であった。POV は、対照区より 2 区がほぼ 10 倍、3 区が約 5 倍近い値であり、これらの値は、餌料調製後分析時 (約 1.5 ヶ月後) までさらに酸化が進行し、調製時の酸化油脂と飼料原料中の POV の合計値より 2 区で約 4 倍に、3 区で約 2 倍に増加していたことを示している。

飼育試験には、アルテミア卵孵化用に作成された 0.5 t パントライト円形水槽を用い、配水管の外側にスタンド・パイプを設置することにより底部から排水できるように改造して使用した。また、水槽の周囲は黒色ビニールでカバーすることにより遮光した。供試魚は屋内で予備飼育した平均体重約 3 g のハマチ稚魚で、各水槽に 50 尾 (一試験区 2 水槽) 収容した。各々の水槽には、水温 $20.0 \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、塩分量 34.1‰ の濾過海水を毎分 7~8 l 供給し、同時にエアレーションも行った。給餌は 1 日 3 回、週 6 日、解凍した餌料を 50 ml の注射筒から押しだし、ヌードル状にして飽食するまで与え、4 週間継続した。

飼育試験終了後、一日絶食させて体重測定を行い、各水槽から全魚体の一般分析用に 10 尾、血液性状測定用に 2 尾、血清採取用に約 20 尾サンプリングした。採血は、各水槽から供試魚を順次取り上げ 0.01% MS-222 溶液で麻酔後、尾柄部からヘパリン処理または無処理の注射器で行った。血液性状の測定は常法で行ったが、酸化油脂添加区の溶血が激しいので、血球数算定は行わなかった。血清サンプルは約 10 尾の血液をプールして 3000 rpm で 15 分間遠沈して得た。血清中の総タンパク質、中性脂質とコレステロールおよび glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT) と glutamic-pyruvic transaminase (GPT) 活性の定量は、中外製薬の臨床化学分析装置 (ラーバ・スーパー) で行った。また、血清中の遊離アミノ酸の分析は、血清をスルホサリチル酸溶液で除蛋白後、日立の全自動アミノ酸分析計 835 型で行った。⁹⁾ さらに、血清中の免疫グロブリン (IgM) はアース製薬株式

会社がハマチ用に開発した Enzyme-linked immunosorbent assay 法⁷⁾ で定量して頂いた。これらデータの平均値の差の検定 ($P < 0.05$) にはダニソンの方法⁸⁾ を用いた。

結 果

平均体重約 3 g と比較的小型の魚を用いたため、酸化油脂を添加した 2 区でも 4 週間の飼育で 380% の増重率を示した。しかし、この値は対照の 1 区より約 80% 低く、死亡率も 23% に達した (Table 3)。一方、グルタチオンを添加した 3 区は 2 区と同じ酸化油脂を同率添加したにも拘らず、対照区とほぼ同様の成績を示し、斃死魚も全く認められなかった。このように成長率と生残率に明らかな酸化油脂の影響が認められたが、全魚体の一般成分組成には有意な区間差は全く認められず、いずれの区にも肉眼では背こけ病らしい症状は全く観察できなかった。

血液性状および血清成分分析値は Table 4 に示した通りであり、ヘモグロビン、血清総蛋白質およびコレステロール含量には顕著な区間差は認められなかった。しかし、酸化油脂添加区では対照区よりヘマトクリット値と中性脂質含量は明らかに低く、逆に、GOT と GPT 活性および IgM 含量が高くなる傾向を示した。グルタチオン添加区はいずれの指標も対照区にほぼ近い値であった。

24 時間絶食後の血清遊離アミノ酸のパターンを Table 5 に示した。酸化油脂添加区は対照区より含硫アミノ酸とチロシンおよびフェニルアラニンおよびヒドロキシプロリンが若干低い値を示したが、他のアミノ酸は全て高い値を示し、非必須アミノ酸総量で 23%、必須アミノ酸の総量では 33% 高くなった。一方グルタチオン添加区は他の指標と同様、いずれのアミノ酸も対照区に近い値であったが、酸化油脂添加区が低い値を示したアミノ酸のみは、総て三区の中で最も高い値であった。

Table 3. Performance and whole body composition of fish fed the experimental diets for 4 weeks*

Indices	Diet No.			Pooled SEM
	1	2	3	
Initial No.	50	50	50	
Initial mean wt. (g)	3.2	3.2	3.2	
Final mean wt. (g)	17.8	16.8	18.1	
% wt. gain	461 ^b	383 ^a	473 ^b	14.5
Feed efficiency (%)	18.3 ^a	17.4 ^a	18.8 ^a	0.56
Mortality (%)	0	23.0	0	
Moisture (%)	75.3 ^a	75.7 ^a	76.5 ^a	0.38
Crude protein (%)	16.6 ^a	16.9 ^a	16.5 ^a	0.18
Crude fat (%)	4.1 ^a	3.4 ^a	2.8 ^a	0.49
Ash (%)	3.0 ^a	3.1 ^a	3.1 ^a	0.02

* Data presented are means of duplicate tanks, and values in the same row followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

考 察

青江の研究解説⁹⁾ に詳述されているように、魚類についても過酸化脂質の毒性に関する論文が多数発表されている。ハマチの主要餌料原料である海産魚はエイコサペンタエン酸やドコサヘキサエン酸等、オレイン酸と比較して 40 倍も酸化されやすい高度不飽和脂肪酸¹⁰⁾ を大量に含有しているので、飼餌料の酸化防止に十分留意する必要がある。金田³⁾ は自動酸化油脂の有毒成分は POV がまだ上昇中は HPO であり、さらに酸化が進行し HPO が分解されると、生成した各種分解物も毒性を示し、中でも特にヒドロペルオキシアルケナールの毒性は HPO の 80 倍も高いことを報告している。酸化油脂のみを添加した 2 区の飼料の POV は、冷凍庫に約 1.5 ヶ月間保管中にさらに 4 倍増加したことから判断して、4 週間で 23% の斃死をもたらした直接の因子は HPO の毒性と思われる。一方、グルタチオンを添加した 3 区の餌料の POV は対照区のほぼ 5 倍に達したに

Table 4. Hematological condition*¹ and serum constituent*² of fish fed the diets for 4 weeks

Indices	Diet No.		
	1	2	3
Hematocrit (%)	50.2 ± 3.16 ^b	41.8 ± 5.31 ^a	47.5 ± 5.02 ^b
Hemoglobin (g/dl)	7.82 ± 0.48 ^a	7.38 ± 1.29 ^a	7.30 ± 0.90 ^a
Total protein (g/dl)	3.13 ± 0.29 ^a	3.28 ± 0.26 ^a	3.21 ± 0.09 ^a
Neutral fat (mg/dl)	526 ± 72.7 ^c	251 ± 18.4 ^a	409 ± 100.1 ^b
Total cholesterol (mg/dl)	302 ± 29.6 ^a	313 ± 3.60 ^a	321 ± 11.0 ^a
GOT (IU/dl at 37°C)	314 ± 62.3 ^a	439 ± 140.7 ^a	297 ± 167.4 ^a
GPT (IU/dl at 37°C)	50.1 ± 6.65 ^a	77.2 ± 13.39 ^b	51.0 ± 9.71 ^a
IgM (g/ml)	170 ± 45.5 ^a	218 ± 23.2 ^a	169 ± 40.0 ^a

*¹ Data are means of 4 samples (2 samples/tank).

*² Data are means of 4 samples (2 pooled samples/tank).

All data are means ± S.D. and values in the same row followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Serum free amino acid composition (μ mol/dl) of fish fed the experimental diets 4 weeks*1

Amino acid	Diet No.		
	1	2	3
Taurine	93.1 \pm 18.3 ^{a,b}	146.4 \pm 31.0 ^b	78.3 \pm 21.1 ^a
Aspartic acid	5.50 \pm 0.36 ^a	6.58 \pm 0.29 ^a	5.25 \pm 0.99 ^a
Threonine	7.93 \pm 1.65 ^a	10.68 \pm 1.42 ^a	7.90 \pm 0.56 ^a
Serine	10.1 \pm 1.25 ^a	14.1 \pm 1.89 ^b	10.1 \pm 0.53 ^a
Glutamic acid	11.3 \pm 2.03 ^a	14.0 \pm 3.08 ^a	11.7 \pm 2.10 ^a
Glutamine	33.8 \pm 8.92 ^a	48.3 \pm 4.52 ^a	37.2 \pm 3.97 ^a
Glycine	91.0 \pm 5.40 ^a	115.7 \pm 4.53 ^b	72.2 \pm 10.09 ^a
Alanine	81.2 \pm 21.4 ^a	90.6 \pm 22.0 ^a	68.4 \pm 5.0 ^a
Valine	22.7 \pm 3.62 ^a	39.3 \pm 18.56 ^a	22.1 \pm 0.93 ^a
Cystine	1.07 \pm 0.35 ^b	0.35 \pm 0.24 ^a	1.33 \pm 0.06 ^b
Methionine	5.60 \pm 0.70 ^a	5.50 \pm 0.98 ^a	5.70 \pm 0.25 ^a
Isoleucine	12.4 \pm 2.32 ^a	16.1 \pm 3.78 ^b	13.1 \pm 0.26 ^a
Leucine	19.7 \pm 3.20 ^a	26.7 \pm 5.93 ^b	20.0 \pm 0.74 ^a
Tyrosine	5.50 \pm 1.25 ^a	5.15 \pm 1.45 ^a	6.73 \pm 0.60 ^b
Phenylalanine	11.7 \pm 1.62 ^a	11.2 \pm 2.43 ^a	13.4 \pm 0.46 ^a
Lysine	49.4 \pm 12.53 ^a	65.7 \pm 8.01 ^b	42.9 \pm 2.74 ^a
Histidine	26.7 \pm 2.77 ^a	39.7 \pm 9.20 ^b	28.5 \pm 1.09 ^a
Arginine	17.3 \pm 4.52 ^a	20.1 \pm 2.15 ^a	17.0 \pm 1.84 ^a
Hydroxyproline	18.2 \pm 0.76 ^a	17.3 \pm 3.75 ^a	19.8 \pm 1.97 ^a
Proline	6.63 \pm 1.68 ^a	8.8 \pm 0.90 ^a	5.65 \pm 0.96 ^a
TNEAA*2	258 \pm 16.7 ^a	318 \pm 34.5 ^b	228 \pm 16.7 ^a
TEAA*3	180 \pm 28.6 ^a	241 \pm 30.0 ^b	178 \pm 5.8 ^a

*1 Data presented are means of 4 samples (2 pooled samples/tank).

*2 Total non-essential amino acids.

*3 Total essential amino acids.

*4 All data are means \pm S.D. and values in the same row followed by a different letter are significantly different ($P < 0.05$).

も拘らず、酸化脂質の影響がほとんど認められなかった。この原因として、哺乳動物で遊離のアミノ酸吸収機構と全く別に、オリゴペプチドもインタクトに吸収する機構の存在が、最近証明されているように、¹¹⁾ トリペプチドであるグルタチオンも分解されることなく体内に吸収され、グルタチオンペルオキシダーゼによる HPO の消去を助長した¹²⁾可能性も考えられる。

高等動物では、HPO は肝硬変や妊娠中毒症の原因物質であり起炎物質であることが知られている。¹⁰⁾ 血清中の GOT と GPT 活性の測定は肝臓の病態判定に利用されており、魚類においても肝機能障害により、これら酵素の活性が上昇することが知られている。^{*3} Imada & Suga¹²⁾ も著者らの結果と同様に、ハマチにグルタチオンを投与して GOT と GPT の上昇が防止できたと報告している。グルタチオンは体内で HPO 消去を助け酸化物質の毒性を軽減するのみでなく、肝臓の酵素の活性化、解毒および細胞の呼吸にも関与しているといわれており、¹²⁾ 魚類でも今後グルタチオンの作用を詳細に検討する必要がある。

魚類でも酸化脂質の投与で膵臓の β 細胞が破壊され、その症状は自然発症糖尿病動物における膵臓の変化とほぼ

一致するといわれている。^{13,14)} アロキサン投与で β 細胞を破壊したウナギ¹⁵⁾と同様に、著者らの実験でも、絶食時の血清中の遊離アミノ酸が酸化油脂添加区で顕著に高い値を示し、グルタチオンの添加で対照区のレベルまで低下したことは、HPO により β 細胞が破壊され、インスリンが不足していた可能性を示唆している。一方、アロキサン投与したウナギでも、肝臓を摘出しない場合、非必須のアミノ酸は肝臓で急速に脱アミノ化され、血中濃度は余り上昇しないと報告されている。¹⁵⁾ 酸化油脂添加区で非必須のアミノ酸も顕著に増加したことは、肝機能に異常が生じたことを裏付けていたと思われる。しかしながら、個々のアミノ酸の動態は前記の報告¹⁵⁾とは異なるところがあり、さらに検討する必要がある。また、高度不飽和脂肪酸含量の高い魚油の過剰摂取は免疫応答の低下を招く可能性も示唆されているが、¹⁰⁾ 本実験で得られた IgM の変化と酸化油脂投与との関連はまだ全く不明であり、今後の検討課題である。これまでに POV が 50 以下ではハマチの成長に悪影響を与えない²⁾といわれていたが、今回 POV がその半分程度の値でも顕著な影響が認められたことは、従来からいわれているようにただ単に POV だけでなく、脂質の酸化状態も含めて

*3 農林水産技術会議事務局：研究成果，128，8-61（1980）。

酸化脂質の影響およびその防止に一層注意を払う必要性を示していると思われる。

文 献

- 1) M. Kimura: *Bull. Miyazaki Univ.*, **15**, 81-175 (1968).
- 2) 坂口宏海, 浜口 章: 日水誌, **35**, 1207-1214 (1969).
- 3) 金田尚志: 化学と生物, **21**, 174-180 (1983).
- 4) 八木國夫: 食料・栄養・健康, **4**, 125-133 (1984).
- 5) 竹田正彦: 養殖, **22(7)**, 101-105 (1985).
- 6) 尾形 博: 養殖研報, **10**, 21-32 (1986).
- 7) A. Matsubara, S. Mihara, and R. Kusuda: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **51**, 921-925 (1985).
- 8) D. Duncan: *Biometrics*, **11**, 1-42 (1955).
- 9) 青江 弘: *Feed oil abstracts.*, **1031B14**, 7-12 (1981).
- 10) 森田育男, 室田誠逸: 化学と生物, **21**, 1688-1730 (1983).
- 11) D. B. A. Silk, J. E. Hegarty, P. O. Fairclough, and M. L. Clark: *Ann. Nutr. Metab.*, **26**, 337-352 (1982).
- 12) O. Imada and Y. Suga: *Feedstuffs*, **68(13)**, 17 (1986).
- 13) M. Yokote: *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, **20**, 39-72 (1970).
- 14) T. Murai and J. W. Andrews: *J. Nutr.*, **104**, 1416-1431 (1974).
- 15) Y. Inui and M. Yokote: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **41**, 1105-1111 (1975).