

酸化脂肪によるコイのセコケ病の発生と

ビタミンEの予防効果*

橋本芳郎・岡市友利・渡辺 武

古川 厚・梅津武司

(1965年10月22日受理)

MUSCLE DYSTROPHY OF CARP DUE TO OXIDIZED OIL AND
THE PREVENTIVE EFFECT OF VITAMIN E*Yoshiro HASHIMOTO, Tomotoshi OKAICHI, Takeshi WATANABE**,
Atushi FURUKAWA and Takeshi UMEZU***

The disease of carp, which is characterized by a marked loss of flesh in the back (Fig. 1) and called "Sekoke" disease, has been a serious problem for carp culturists in Japan. Besides muscle dystrophy, loss of appetite, poor growth and high mortality have been observed as symptoms. As the disease was suspected to be a dietary one due to oxidized oil in dried silk-worm pupae used as a main ingredient of feedstuff, the relation between the disease and oxidized oil was examined.

Carp fingerlings were kept for about 120 days on the diet containing 10% of the oxidized saury oil (peroxide value 120~150), with or without DL- α -tocopheryl acetate (Table 1). In 60 days, typical signs of the disease appeared in the group receiving the oxidized oil without DL- α -tocopheryl acetate and the rate of ill fish amounted to 56% at the end of the experiment. The pathological examination revealed that the symptoms are quite identical with those observed on the fish in carp farms. The disease was effectively prevented by the addition of DL- α -tocopheryl acetate (50 mg/100 g diet). Some results of chemical analyses on the test animals are summarized in Tables 2~4.

In connection with the feeding test, the turnover of vitamin E in carp was also examined. As seen in Fig. 2, it is very rapid and marked in hepatopancreas, while far less distinct in the muscle.

コイのセコケ病とは、魚が痩せて背鰭下縁に沿って帯状の凹みが生じ、背が尖つたようになる病気で、食欲不振、成長不良をきたし、死亡率もかなり高くなる。横手¹⁾の調査によればこの病気は全国的に発生し、セボソ、セオチ、セウスまたはカミソリなどと呼ばれている。

従来この病気の原因に、遺伝、ウィルス、細菌、寄生虫、水質、底質、餌料(酸化脂肪やアミノ酸不足)などがあげられたが、最近では栄養性疾患の疑いが濃くなっていた。すなわち発生例すべてにサナギを投与している点は注意を要するところで、富永²⁾は病魚を天然餌料の豊富な場所へ移すと回復する場合があることや、HALVERの組成に準じたビタミン類を与えるとセコケが発現せず、またセコケにかかったコイが治癒する傾向のあることを認めている。その後、村上³⁾はコイにサナギを多量に与えるとセコケ病が発生し、ビタミンEの投与によりその発生率を低下させることができたと報告している。

* 内海水産研究所業績 第112号

Contribution from the Naikai Regional Fisheries Research Laboratory, No. 112.

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

*** 内海区水産研究所 (Naikai Regional Fisheries Research Laboratory)

これらの報告から、筆者らはコイのセコケ病はサナギに含まれる酸化脂肪によつて生じ、ウシやウサギで知られている筋萎縮類似のものではないかと考えた。そこでコイ稚魚に空気吹き込みで酸化したサンマ油を与えて飼育し、セコケ発生の有無と、同時にビタミン E の予防効果を検討した。その結果、酸化脂肪により、コイではセコケが起り、ビタミン E で効果的に予防できることを確かめたが、これに関連してコイのビタミン E 蓄積に関する実験を行なつたので、これらの結果をあわせて報告する。

I. 酸化サンマ油によるセコケ病の発生とビタミン E の予防効果

1. 飼育法と飼料組成

広島県北部淡水指導所より入手した平均体重約 5g のコイ稚魚を内海区水産研究所大野分室の室外に設置した 2×2×0.5m のコンクリート製水槽で 8 月上旬より 12 月上旬まで約 120 日間飼育した。飼育水は井戸水で、1.2l/分の割合で通水し、水温は 25°C(8 月)~15°C(12 月) の範囲にあつた。

各群 330 尾の 5 群を設け、Table 1 に示す飼料で飼育した。なお各群とも飼料 No. 1 により試験前一週間予備飼育を行なつた。投餌量は 10 月初旬までは 1 日当り乾物として体重の 5% とし、それ以後はコイの摂餌状態によつて調節した。試験飼料 100 に対して水 80 を加えよく練つて投与した。

Table 1. Composition of experimental diets. (g)

Diet No.	Defatted fish meal	α -Starch	Corn oil	Saury oil	Vitamin mixture†	Mineral mixture††	DL- α -Tocopheryl acetate (mg)	CMC
1	60	30	10*		0.2	2		1.5
2	60	30		10 (P*)	0.2	2		1.5
3	60	30		10 (O**)	0.2	2		1.5
4	60	30		10 (O**)	0.2	2	25	1.5
5	60	30		10 (O**)	0.2	2	50	1.5

* Purified oil ** Oxidized oil (P. O. V 120~150)

† Thiamine nitrate 10, Riboflavin 80, Pyridoxin hydrochloride 20, Cobalamine 0.02, Ascorbic acid 300, Nicotinamide 150, Ca-pantothenate 100, Biotin 2, Folic acid 6, Choline chloride 1000, Inositol 400, p-Aminobenzoic acid 80, Menadione 8 mg, A₁ 4000 and D₃ 360 IU per kg diet.

†† USPX salt mixture 100 g, AlCl₃ 15, ZnSO₄ 300, CuCl₂ 10, MnSO₄ 80, KI 15 and CoCl₂ 100 mg.

試験飼料のうち魚粉は n-ヘキサンで脱脂したホワイトフィッシュミール (粗蛋白 69.2%, 粗脂肪 2.0%) である。サンマ油は白土精製した過酸化価 3 以下のもので、飼料 No. 2 にはそのまま、飼料 No. 3~5 には 40°C~60°C で 8~24 時間空気吹き込みを行ない、過酸化価が 120~150 になるように酸化させたものを使用した。トーマロコソ油は市販品である。

ビタミン混合物はマスについての HALVER らの処方からビタミン E を除き、二、三の修正を加えたもので、ビタミン E として DL- α -tocopheryl acetate を使用した。飼料原料には多少ビタミン E が含まれており、各々 100 g 中、飼料 No. 1 よりトーマロコソ油を除いたものに 0.86 mg, トーマロコソ油に 22.9 mg, 酸化しないサンマ油には 6.6 mg, 酸化させたサンマ油には 2 mg のビタミン E がそれぞれ測定された。無機塩混合は HALVER の処方通りである。

2. 試験魚の処理および分析法

30 日毎に各試験群から 20~40 尾をとり、体重と体長を測定後ドライアイスで凍結して、東京へ運び、分析に供した。ただ、TBA 値は凍結保存しても増加する傾向があるので、試験池より取り上げた直後に測定した。

TBA 値の測定は、ZALKIN および TAPPEL⁴⁾ の方法を多少修正して行なつた。ドライアイスを加え乳鉢

中でよく磨砕した筋肉 5g に蒸留水 10ml を加え、10 分間攪拌してから 10% 三塩化酢酸 10ml を添加し、遠心分離により沈澱を除去した。ついで上澄液 3ml に 40% エタノール 1ml および 0.75% thio-barbituric acid (TBA) 水溶液 1.25ml を加えて、100°C で 10 分間加熱した後、冷却して 530m μ で比色定量した。TBA 値は SINNHUBER および YU⁵⁾ にしたがって試料 1000g 当りの malonaldehyde の mg 数で表わしてある。

水分は常法により、粗脂肪は A. O. A. C 法により測定し、ビタミン E は BIERI ら⁶⁾ の方法によつた。

この他、全魚体を磨砕してクロロホルム・メタノールで魚体油を抽出し⁷⁾、その特数を常法により測定するとともに、METCALF らの方法⁸⁾ でメチルエステルに導き、脂肪酸組成を diethylene glycol succinate を 20% 含む充填剤 (Wilkens 社製) を使用したガスクロマトグラフィーで分析した。

3. 飼育結果ならびにセコケの発生状況

ビタミン E を添加しないで酸化油を与えた第 3 群の成長、飼料効率はこの群にくらべてかなり悪く、飼育開始後 60 日頃からこの群の魚にセコケが発生しはじめ、約 90 日後にはほとんどすべての魚が外見上セコケ症状を呈した。その後多少減少し実験終了時には外見的にセコケと認められるものは 56% であつた (Fig. 1, Table 2)。このように最後に外観的に病魚と認められるものが減少したのは水温低下に伴う摂餌

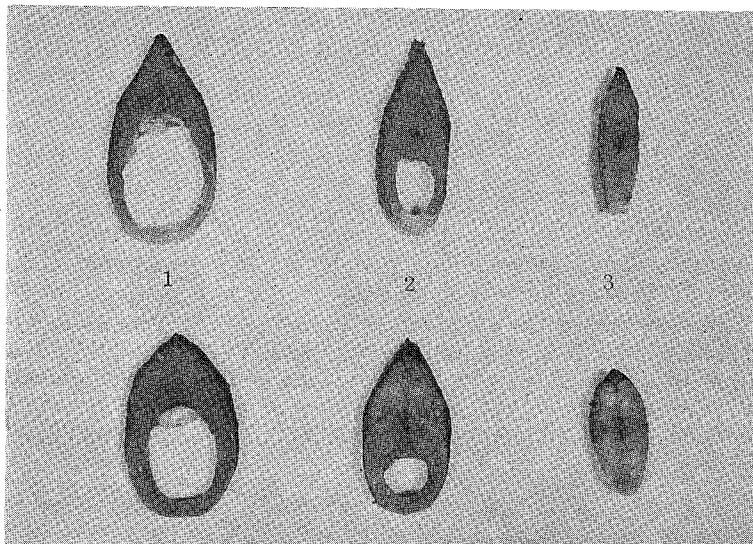


Fig. 1. Transections at the anterior end (1), middle (2), and posterior end (3) of the dorsal fin base. Top row: diseased fish (Lot No. 3). Bottom row: normal fish (Lot No. 5).

Table 2. Results of feeding experiment for 120 days.

Diet No.	Initial weight g	Final weight g	Percent gain	Food efficiency	Mortality %	Apparent muscle dystrophy %
1	5	26.0	420	0.54	2.3	0
2	"	24.7	400	0.49	0.6	0
3	"	18.0	254	0.37	33.8	56
4	"	28.5	464	0.62	0.6	0
5	"	31.7	540	0.69	5.8	0

Table 3. Results of chemical analyses on test animals.

Diet No.	Muscle						Hepato-pancreas		Body oil			
	Moisture %		Crude fat %		TBA		Vitamin E $\mu\text{g/g}$		Iodine value		Peroxide value	
	A*	B*	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	80.3	78.8	1.9	1.7	1.0	0.8	3.5	2.3	86.5	110.1	1.3	5.6
2	80.4	79.5	2.2	1.8	1.8	1.4	11.1	2.5	100.3	122.0	3.3	6.6
3	80.3	80.7	2.0	2.2	3.5	2.0	2.3	1.0	107.4	121.7	6.5	10.1
4	80.0	78.5	2.0	2.0	3.0	1.3	9.4	5.9	103.9	123.6	6.1	5.3
5	80.2	78.4	2.1	1.7	1.1	0.7	24.9	18.5	109.4	121.6	3.6	4.7

* A...30 days, B...120 days.

量の減少によるものと考えられるが、後述するように組織学的な検査では最後取り上げ時すべてが病魚と判断され、決して治癒していたわけではない。病魚は非常にやせており、全体重に対する筋肉部の割合が、健康な他の群では 54~56% であるのに対して 49% にすぎなかつた。

一方、ビタミン E を添加した第 4 群および第 5 群では外見的なセコケは認められず、成長その他も酸化油を投与しない第 1 群、第 2 群とほとんど差がなかつた。第 5 群はかえつて他の群より良い成長を示し、成長率は第 3 群の 2 倍以上に達している。

なお、実験終了時に横手ら⁹⁾に組織学的な調査を依頼したが、第 3 群のすべての魚に筋肉の変性と壊死がみられ、かつこれが川津¹⁰⁾の観察例や、一般養魚場で発生するセコケと全く同様の症状であることが明らかにされている。第 4 群のコイにも一部組織学的な病変が認められ、本実験の条件下では飼料 100 g 当り 25 mg の DL- α -tocopheryl acetate の投与では必ずしも完全な予防ができないことがわかつた。第 5 群は組織学的にも全く異常がなく、DL- α -tocopheryl acetate がセコケ病の予防に有効であることが認められた。

4. 試験魚の分析結果

飼育開始後 30 日および 120 日後のコイについての分析結果を Table 3 に示す。

第 3 群の肝臓のビタミン E 含量は飼育期間中極めて低い値を示し、一方、ビタミン E を飼料中 0.05% 添加した第 5 群では 20 $\mu\text{g/g}$ 程度の値を維持しつづけた。

TBA 値は脂肪の酸化の程度を示すものであるが、第 3 群および第 4 群では比較的高い値を示している。体油の過酸化価についてもほぼ同様の傾向が認められ、ビタミン E の体内における抗酸化作用がうかがわれる。

筋肉の水分含量は第 3 群でやや高いが、粗脂肪量にはほとんど差がない。体油の特数については、各群とも沃素価が次第に添加油の値に近づく傾向を示し、過酸化価が、実験終了時に第 3 群でとくに大

Table 4. Fatty acid composition of body oil of carp reared for 120 days.

Fatty acid	Diet No. 1	Diet No. 3	Diet No. 5
14:0	1.1	3.9	4.1
15:0	trace	0.7	0.7
16:0	16.7	20.5	19.0
16:1	6.2	10.6	11.6
17:0	trace	0.9	1.0
17:1	"	1.0	1.0
18:0	3.8	3.9	3.8
18:1	40.6	34.0	35.7
18:2	21.3	4.7	3.6
18:3	trace	1.4	—
20:0			
18:4	1.2	7.8	8.7
20:1			
20:2	3.3	1.5	1.3
20:3	1.0	—	—
22:0	0.9	—	—
22:1	1.6	3.1	2.7
22:2	—	trace	0.8
22:3	0.8	2.7	3.0
Others	1.5	3.3	3.0

きかつた。脂肪酸組成にも沃素価と同様添加油の組成に近づく傾向があるが、とくにビタミン E 添加の影響はないようである。Table 4 は、第 1 群、第 3 群および第 5 群の主な脂肪酸の組成を示したものである。

II. コイ体内におけるビタミン E の蓄積

平均体重 29 g のコイを 1 群 22 尾とし、60 l の循環水槽 (水温 24°C) で飼育し、これにさきの実験で使用した飼料 No. 1 とほぼ同じ組成の基本飼料に DL- α -tocopheryl acetate を 0.1% 添加して投与し、肝臓および筋肉におけるビタミン E の蓄積と減少の状態を調べた。ただし、基本飼料の油は大豆油とした。

Fig. 2 に示すように、試験群には 7 日間、基本飼料とビタミン E を与えた後、2 群に分け、一方には基本飼料を、他方には基本飼料の大豆油を酸化サンマ油 (過酸化価 120) にかえた飼料を与えてビタミン E の減少を比較した。対照群にはビタミン E を添加しない基本飼料を 20 日間継続して与えた。

肝臓ではビタミン E がかなり速やかに蓄積し、100 $\mu\text{g/g}$ 程度に達するが、それ以後とくに増加することはないようである。次いでビタミン E の投与を止めた場合の肝臓からの消失速度もかなり大きく、減少率は肝臓 1 g 当り 4.6 $\mu\text{g/日}$ である。この減少の割合は本実験の限りでは飼料中の油の酸化の程度とは関係がないようであつた。これに対して筋肉のビタミン E 濃度はビタミン E の投与に影響されず、ビタミン E 投与群においても対照群とほぼ同じように低い値を保ち続けた。

この結果は、コイではビタミン E の筋肉における蓄積が円滑に行なわれず、そのために、酸化脂肪の毒性が筋肉の変性として現われやすいことを裏付けるもののように、興味深い。

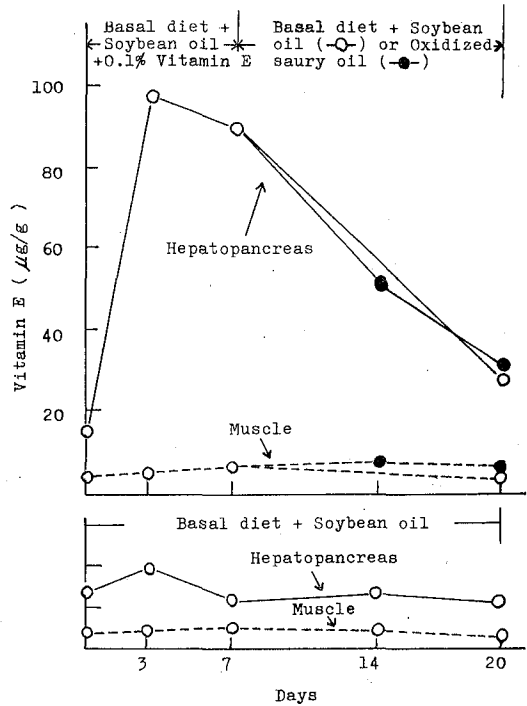


Fig. 2. Vitamin E in the hepatopancreas and muscle of carp.

The basal diet was composed of defatted white fish meal 60, α -starch 30, vitamin mixture 0.2, minerals 2 and CMC 1.5.

III. 考 察

以上のように、コイのセコケ病が明らかに酸化脂肪の投与により生じ、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確認された。

これまでニジマスにおける酸化油の害はかなり詳しく研究され、成長障害、脾臓組織の変性、貧血、肝臓障害などが認められ^{10)~13)}ている。しかし、コイのセコケに特徴的な筋肉の変性はニジマスでは観察されていない。この点、コイはニジマスとは明らかに異なり、ビタミン E 欠乏により筋萎縮を起こすマウスやモルモットにむしろ似ているようである。魚でもこのような種特異性がうかがわれるのは興味深い。また、コイでは摂取したビタミン E が筋肉に比較的移行しにくいことが観察されたが、これが筋萎縮を起こしやすい原因とも思われる。

WOODALL 氏¹³⁾はニシン油を飼料に 5% 加えてニジマスに与えた場合のビタミン E 要求量は、飼料 100 g 当り 3 mg 以下としているが、本実験では餌料 100 g 当り 25 mg の添加でも完全に正常な状態を維持することができなかつた。比較的酸化のすすんだ油をかなり多量に与えたためと思われるが、この場合にもビタミン E は明らかに体内で抗酸化的に働き、Table 2 に示したように第 4 群の体油の過酸化価を対照群と同じ程度までに下げるのに役立つている。

今後、コイのビタミン E 要求量を脂肪の性質と関連してさらに詳しく検討する必要があるが、ビタミン E 欠乏による筋萎縮その他の障害に methylene blue が有効であることも報告¹⁴⁾されているので、コイのセコケ病を還元性物質や他の抗酸化剤によつて防ぐことができるかどうか、さらに実験を進める予定である。

IV. 要 約

コイのセコケ病の病因を明らかにし、またビタミン E の効果を検討するために、コイ稚魚に、過酸化価 120~150 の酸化サンマ油を魚粉を主とする配合飼料に混合して与えたところ、約 2 カ月でセコケが発生し、4 カ月後には罹病率 56% に達した。一方、同じ飼料にビタミン E を 100 g 当り 25 mg 添加した場合には組織学的には多少セコケ病の症状を呈したが、成長その他外見的には対照群と差がなく、50 mg 添加では全く異常を認めなかつた。

なお投与したビタミン E は肝臓には蓄積されるが、筋肉ではほとんど蓄積されることが判明した。

終わりに、本実験を行なうにあたり、飼料原料およびビタミン E を提供して頂いた、日本農産工業株式会社、日本水産株式会社中央研究所およびエーザイ株式会社に厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 横手：淡水区水産研究所 パンフレット, (1961).
- 2) 富永：長野県水産指導所佐久支所 パンフレット, (1958).
- 3) 村上・古川・川上：広島県北部淡水指導所、内海区水産研究所共同報告 パンフレット, (1962).
- 4) ZALKIN, H. and A. L. TAPPEL: *Arch. Biochem. Biophys.* 88, 113 (1960).
- 5) SINNHUBER, R. O. and T. C. YU: *Food Tech.*, 12, 9 (1958).
- 6) BIERI J. G., C. J. POLLAND, I. PRANGE and H. DAM: *Acta Chem. Scand.*, 15, 783 (1961).
- 7) BLIGH, E. G. and W. J. DYER: *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37, 911 (1959).
- 8) METCALF, L. P. and A. A. SCHMITZ: *Anal. Chem.*, 32, 363 (1961).
- 9) 横手・日比谷・橋本：日本水産学会年会講演, (1965).
- 10) 川津：淡水研報 10(2), 41 (1960).
川津：同上 11(2), 29 (1961).
- 11) ONO, T., F. NAGAYAMA and T. MASUDA: *J. Tokyo Univ. Fish.*, 46, 97 (1960).
- 12) NORRIS, E. R. and L. R. DONALDSON: *Am. J. Physiol.*, 129, 214 (1940).
- 13) WOODAL, A. N., L. M. ASHLEY, J. E. HALVER, H. S. OLCOTT and J. VAN DER VEEN: *J. Nutrition*, 84, 125 (1964).
- 14) BLAXTER, K. L., F. BROWN and A. M. MACKDONALD: *Brit. J. Nutr.*, 7, 287 (1953).