

ブリ黄疸発症と餌料素材の品質との関連

目的

生体内脂質過酸化の進行がブリ黄疸発症の主因であることが、示唆されている。¹⁾この生体内脂質過酸化を抑制する事により黄疸の発症を予防する可能性がある。魚類の生体内脂質には酸化されやすい高度不飽和脂肪酸が多く含まれていることから、その脂質の酸化を抑えるいわゆるフリーラジカルスカベンジャー機能を餌料に加えるなどの手法により、その生体内脂質過酸化を抑制すること黄疸の発症の予防の上から有益と考えられる。その点に関連して、餌料に抗菌性や、生体内の脂質過酸化を抑える機能（すなわちフリーラジカルスカベンジャー機能）を持たせ、養魚の生体防御機能の強化を図ることを目的として、ブラウンフィッシュミールに加熱処理を施した餌料を用いた飼育実験を行い、給餌ブリの生体内脂質過酸化度の変化について調べた結果より、²⁾餌料素材の質を向上させることにより、その生体内過酸化脂質を抑制可能であることが明らかになった。そこで、今回は餌料として用いるブラウンフィッシュミールの質を変化させてブリを飼育し、生体内脂質過酸化の進行とブリ黄疸の発症との関連について検討を加えた。

材料と方法

餌料の調製 餌料は以下のような製造方法の異なるブラウンフィッシュミールを用いシングルモイスト餌料を調製した。1)通常の方法で製造されたブラウンフィッシュミール(ミール1)(1区)。2)酵素処理して製造されたブラウンフィッシュミール(ミール2)(2区)。3)酵素処理および低灰分化処理して製造されたブラウンフィッシュミール(ミール3)(3区)。これら3種類のブラウンフィッシュミールを用いTable 1に示したような配合組成にて餌料を調製した。なお、各ブラウンフィッシュミールの α -tocopherol含量が異なっていたために、各区ともvitamin mixtureによりその含量を乾物飼料当り約12 mgとなるように調節した。

飼育試験 平成2年5月日向灘で採捕された平均体重98 gのブリ稚魚を、あらかじめ青島漁港内に設置した海面小割生簀(2.2 x 2.2 x 2.2 m)において1990年8月6日～9月4日までの30日間飼育試験を行った。水温25.2～29.0℃(平均26.8℃)であった。給餌は1日2回行い、日曜日は無給餌とし、給餌日数は23日であった。また、給餌率は魚の摂餌状態により乾物重量で魚体重の4～7%の範囲で変化させた。

フェニルヒドラジン投与試験法 飼育試験終了後、0(対照区)および20 mg/kg体重(投与区)となるようにフェニルヒドラジン溶液をブリの背肉に投与した。なお、投与後3日間無給餌とした。

血液性状の測定 血液中のヘモグロビン量はシアンメト法により測定した。

¹⁾境 正・村田 寿・延東 真・下村敏之・山内 清・山口登喜夫・中島 熙・福留巳樹夫：平成3年度日本水産学会春期大会講演要旨集pp. 88.

2-チオバルビツール酸(TBA)値の測定法 ブリ組織のTBA値は Yamauchi et al.³⁾の水蒸気蒸留法で測定し、mgマロンアルデヒド/kg試料で示した。血漿TBA値は島崎の比色法で分析し、nmolマロンアルデヒド/mlで示した。⁴⁾

α -tocopherol含量の測定法 α -tocopherolは、Yamauchi et al.⁵⁾の方法にしたがってけん化後、不けん化物をn-ヘキサンで抽出し、n-ヘキサン:イソプロピルアルコール(200:1, v/v)を移動相とする高速液体クロマトグラフィーによって定量した。カラムにはZorbaxBP-NH₂、検出器には蛍光光度計(励起波長:295 nm、蛍光波長:325 nm)をそれぞれ用いた。また、内部標準物質として2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチル-6-ヒドロキシクロマンを用いた。

血漿中のbilirubin含量の測定 血漿および組織中のbilirubin含量はSakai and TabataのHPLC法にて測定した。⁶⁾

結果

供試ブラウンフィッシュミール(BFM)の脂質性状 Table 2に供試ブラウンフィッシュミールの脂肪酸組成、脂肪酸量、脂質含量、 α -tocopherol含量およびTBA値を示した。ミール2と3の脂質過酸化進行の程度を示すTBA値は0.3 μ g MA/g前後(ミール1の約1/6の値)を示し、脂質過酸化の進行が良く抑えられている。特に、ミール3は高度不飽和脂肪酸の割合が多いにもかかわらず、 α -tocopherol含量も高く、脂質の酸化が抑制された質のよいブラウンフィッシュミールであることを示している。品質は、1<2<3の順で良くなっている。

飼育試験結果 ブリの30日間の飼育試験結果をTable 3に示した。成長率、飼料効率、および弊死率に試験区間による差は認められなかった。

筋肉、肝臓および血漿中のTBA値および α -tocopherol含量 Table 4に各試験区の供試魚の筋肉、肝臓および血漿中のTBA値および α -tocopherol含量を示した。各組織ともに、ミール1のTBA値が最も高く、品質の高いものほど低くなっていた。各組織の α -tocopherol含量は逆に、ミール3でもっとも高く、品質の低下とともに、その含量も低下した。

フェニルヒドラジン投与ブリの血液hemoglobin含量および血漿中のtotal bilirubin含量 Figure 1にフェニルヒドラジン攻撃ブリの血液hemoglobin含量を示した。フェニルヒドラジン投与区では2日後にhemoglobin含量は著しく減少し、極度の貧血を起こした。しかしながら、その程度には各試験区に差は認められなかった。フェニルヒドラジン投与後1日目の血漿中のtotal bilirubin含量をTable 5に示した。このTableに示したように、血漿中のtotal bilirubin含量は、各試験区ともに上昇したが、その上昇の程度はブラウンフィッシュミールの品質の最も良くない1区が最も高く、その品質の最も良い3区が最も低かった。

考察

給餌に用いたブラウンフィッシュミールの品質により、供試ブリの成長等に差は認められなかったが、その生体内脂質過酸化の進行に差が認め

られた。すなわち、品質の良いブラウンフィッシュミールを給餌した区で、その生体内脂質過酸化が最も抑制され、最も品質の落ちるブラウンフィッシュミールを給餌した区で、その生体内脂質過酸化が最も進行していた。また、飼育試験終了時に、各区のブリにフェニルヒドラジンを投与すると、ブラウンフィッシュミールの品質の最も悪い区で血漿中の total bilirubin 含量が最も高くなり、最も良い区でその含量は最も低かった。この結果は、生体内脂質過酸化を抑制することにより、フェニルヒドラジン投与のような活性酸素による攻撃に起因する障害を軽減することが可能であることを示している。また、ブリの黄疸の発症の主因が活性酸素であることを考慮すると、¹¹⁾なんらかの手法、例えば今回の試験結果から、用いる餌料の品質を高めるとか、 α -tocopherol等のフリーラジカルスカベンジャーを餌料に添加することにより、その生体内脂質過酸化を抑制し、ブリの黄疸を予防できるかもしれない

文献

- 1) T. Sakai, H. Murata, M. Endo, K. Yamauchi, N. Tabata and M. Fukudome: 2-thiobarbituric acid values and contents of α -tocopherol and bile pigments in the liver and muscle of jaundiced yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 1739-1740 (1989).
- 6) 関屋朝裕, 村田 寿, 境 正, 山内 清, 山下清海, 宇川正治, 金井学, 嶋田元且: 高 α -トコフェロール魚粉餌料給餌による組織の脂質過酸化抑制および生体防御能強化の試み. *日水誌*, **57**, 287-292 (1990).
- 2) K. Yamauchi, H. Murata and T. Ohashi: Quantitative relationship between alpha-tocopherol and polyunsaturated fatty acids and its connection to development of oxidative rancidity in porcine skeletal muscle. *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1061-1067 (1980).
- 3) 島崎弘幸: 生体内過酸化脂質の測定. 過酸化脂質研究法, 金田尚志編, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1984, pp,82-83.
- 4) K. Yamauchi, H. Murata, T. Ohashi, H. Katayama, A. M. Pearson, T. Okada and T. Yamakura: Effect of dietary α -tocopherol supplementation on the molar ratio of polyunsaturated fatty acids/ α -tocopherol in broiler skeletal muscles and subcellular membranes and its relationship to oxidative stability. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **38**, 545-552 (1991).
- 6) T. Sakai and N. Tabata: Analysis of bile pigments in the bile of yellowtail and eel by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2967-2968 (1988).

Table 1. Composition of test diet for yellowtail (%)

Ingredient	Diet no.		
	1	2	3
Brown fish meal	65 ^{*1}	65 ^{*2}	65 ^{*3}
Active wheat gluten	10	10	10
White dextrin	6.5	6.5	6.5
Vitamin Mixture (TH-4 ^{*4})	3	0	0
Vitamin Mixture (TH-4 ^{*5})	0	3	0
Vitamin Mixture (TH-4 ^{*6})	0	0	3
Mineral Mixture (T-4 ^{*7})	2	2	2
Mineral Mixture (O-1 ^{*8})	0.5	0.5	0.5
CMC	2	2	2
Cellulose	2	2	2
Sardine oil	9	9	9
Water	50	50	50

*1: Brown fish meal 1, see text.

*2: Brown fish meal 2, see text.

*3: Brown fish meal 3, see text.

*4: contained 675,000 IU vitamin A, 60,000 IU vitamin D3, 2.07 g dl α -tocopehrol acetate, 2.56716 g menadione sodium hydrogen sulfite, 0.8 g thiamine nitrate, 1.467 g riboflavin, 0.8 g pyridoxine hydrochloride, 2.38 g nicotineamide, 2.38051 g pantothenic acid, 4.667 g calucium salts, 194.7 g choline chrolide, 0.8 g folic acid, 0.01067 g cyanocobalimine, 0.04667 g d-biotin, 56.34 g inositol, 59.3 g L-ascorbic acid, 446.27 g cellulose per kg of vitamin mixture.

*5: same as shown in TH-4 except that this contained 1.87 g dl α -tocopehrol acetate, and 446.47 g cellulose per kg vitamin mixture.

*6: same as shown in TH-4 except that this contained 1.47 g dl α -tocopehrol acetate, and 446.87 g cellulose per kg of vitamin mixture.

*7: contained 206 g KH_2PO_4 , 141 g $\text{Ca}(\text{CH}_2\text{CHOHCOO})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 83 g iron proteinate, 309 g $\text{Ca}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 261 g KH_2PO_4 , 261 g cellulose per kg of mineral mxiture.

*8: contained 12.5 g MgSO_4 , 0.1 g CoCl_2 , 4 g CuSO_4 , 19.97 g ZnSO_4 , 0.3 g KIO_3 , 900 g dextrom. 63.1 g cellulose per kg of mineral mixture.

Table 2. Properties of brown fish meals

	BFM 1	BFM 2	BFM 3
SFA ^{*1} (%)	33.48	30.62	30.78
UFA ^{*2} (%)	66.52	69.38	69.22
MUFA ^{*3} (%)	19.29	19.23	18.43
PUFA ^{*4} (%)	42.19	45.33	48.43
PUFA>18:2 ^{*5} (%)	41.34	44.38	46.14
Fatty acid (mg/100g)	4519.7	4219.3	3071.0
Fat (%)	11.01	11.96	9.22
α -Tocopherol (μ g/g)	15.1	22.7	40.9
TBA (μ gMDA/g)	1.82	0.29	0.32

*1 Saturated fatty acid.

*2 Unsaturated fatty acid.

*3 Mono unsaturated fatty acid.

*4 Poly unsaturated fatty acid.

*5 Poly unsaturated fatty acid (>2 double bond).

Table 3. Effects of properties of brown fish meals on growth of yellowtail

Groups	Av. Body weight (g)		Growth rate (%)	Feeding efficiency*	Mortality
	Initial	Final			
1	114	286	147	0.87	0.03
2	115	293	154	0.91	0.00
3	118	297	150	0.89	0.01

* g gain/g feed.

Table 4. Effects of dietary brown fish meal properties on TBA values and α -tocopherol contents in some tissues of yellowtail

Group	TBA values			α -tocopherol		
	Plasma (nmol/ml)	Liver (μ g/g)	Muscle (μ g/g)	Plasma (μ g/ml)	Liver (μ g/g)	Muscle (μ g/g)
I	6.60	0.22	8.87	18.2	99.8	2.2
II	5.90	0.19	3.87	21.8	104.4	3.4
III	5.63	0.18	4.29	25.1	121.4	3.7

Table 5. Effects of dietary brown fish meal properties on plasma bilirubin levels of yellowtail injected with phenyl hydrazine

Group	Phenyl hydrazine (mg/kg BW)	Bilirubin (μ g/ml)
	I	0
II	0	nd
III	0	nd
I	10	nd
II	10	nd
III	10	nd
I	20	0.262
II	20	0.138
III	20	0.096

マダイの高ビリルビン血症

マダイの産卵期における血漿中の胆汁色素を調べていたところ、高ビリルビン血症の個体を発見したのでここに報告する。

材料および方法

供試魚には、宮崎県門川町で養殖された、マダイ *Pagrus major* 2年魚(体重426-687 g)と3年魚(体重786-1470 g)を用いた。1990年3月から1990年6年まで数尾ずつ計25尾採取し血漿中のbilirubin含量をSakai and TabataによるHPLC法により測定した。さらに肝臓は4月から6月、脾臓については5および6月に供試魚から採取し、緩衝ホルマリンで固定し、常法にしたがってパラフィン切片を作成し、光学顕微鏡下で観察した。

結果

外見所見 病魚の外見は養殖マダイの健康魚のものとなんら異ならず、黒ずんだ色であった。

部検所見 病魚の部検所見は健康魚のものと変りがなかった。病魚以外の個体において、緑肝症状を呈するものがあった。

HPLCによる血漿中胆汁色素分析 1990年にサンプリングした全個体の性別、体重およびそれらの血漿中胆汁色素組成をTable 1(2年魚)およびTable 2(3年魚)に示した。マダイ血漿中のbilirubin量は多くの個体で検出限界以下であったが、2年魚の12個体中No2-4-1, No 2-4-2およびNo2-6-6の3個体、3年魚の13個体中No 3-6-2の1個体、計4個体において血漿中に非抱合型のbilirubinが検出された。なお、抱合型bilirubinは検出されなかった。この結果から、血漿中のbilirubinが非抱合型主体の高bilirubin血症であると判断された。なお、雌雄による差は認められなかった。

病理組織学的所見 病魚の組織像は養殖条件下での健康魚と同様で、病変は認められなかった。脾臓についても、顕著な病変は認められなかった。

考察

本研究において産卵期のマダイの血漿中の胆汁色素を調べていたところ、高bilirubin血症の個体を発見した。従来マダイの高bilirubin血症および黄疸の報告はない。その理由としては、第1に大きな被害がないこと、第2に養殖条件下におけるマダイの体色は黄化しても解りにくい、という2点があげられる。

これら病魚を分析したところ、血漿中から検出されたbilirubinは非抱合型のみであった。組織的には肝臓および脾臓に病変は認められなかった。したがって、この黄疸の発症の原因については、いままでにその発症の報告例が全く無いことや今回得られた病魚の数が少ない事等から、現在までのところ不明である。

文献

- 1) T. Sakai and N. Tabata: Analysis of bile pigments in the bile of yellowtail and eel by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2967-2968 (1988).

Table 1. Plasma bilirubin contents of cultured red seabream (2 years old)

Sampling date	No	Sex	Body weight (g)	U. Bilirubin ($\mu\text{g/ml}$)	C. bilirubin ($\mu\text{g/ml}$)
3/9	2-3-1	♀	426	nd	nd
4/11	2-4-1	♀	685	nd	0.13
	2-4-2	♂	592	nd	0.02
	2-4-3	♀	687	nd	nd
5/11	2-5-1	♀	669	nd	nd
	2-5-2	♂	521	nd	nd
	2-5-3	♀	584	nd	nd
	2-5-4	♂	555	nd	nd
	2-5-5	♂	594	nd	nd
6/6	2-6-1	♂	591	nd	nd
	2-6-2	♀	636	nd	0.02
	2-6-3	♂	601	nd	nd

U bilirubin: unconjugated bilirubin.
 C bilirubin: conjugated bilirubin
 nd : not detected.

Table 2. Plasma bilirubin contents of cultured red seabream (3 years old)

Sampling date	No	Sex	Body weight (g)	U. Bilirubin ($\mu\text{g/ml}$)	C. bilirubin ($\mu\text{g/ml}$)
3/9	3-3-1	♀	1133	nd	nd
	3-3-2	♀	1470	nd	nd
4/11	3-4-1	♀	1088	nd	0.03
	3-4-2	♂	1230	nd	nd
	3-4-3	♂	894	nd	nd
5/11	3-5-1	♂	794	nd	nd
	3-5-2	♀	842	nd	nd
	3-5-3	♀	1058	nd	nd
	3-5-4	♂	828	nd	nd
	3-5-5	♀	786	nd	nd
6/6	2-6-1	♂	1032	nd	nd
	2-6-2	♂	888	nd	nd
	2-6-3	♂	878	nd	nd

U bilirubin: unconjugated bilirubin.
 C bilirubin: conjugated bilirubin
 nd : not detected.