

養殖ヒラメに及ぼす過酸化脂質の影響

井岡 久, 大島敏明

Influence of Peroxidized Fat on Cultivated Japanese Flounders
Prakichthys olivaceus^{*1}

Hisashi Ioka and Toshiaki Ohshima^{*2}

Contents of peroxidized fats (Phosphatidilcholine-Hydroperoxides: PC-HPO in the total fat of plasma, blood corpuscle, and liver tissue of cultivated flounders bred with live bait, dry pellets, and moist pellets was measured with natural fish as the reference. The PC-HPO level in the plasma of flounders bred with dry pellets is high compared with live-bait fish, moist fish, and natural fish. Concerning the *Edwardsiella* disease in cultivated fish, the PC-HPO contents in flounder liver tissues infected with *E.tarda* are compared with those of uninfected fish. The PC-HPO content in the liver tissue of flounders infected with *E.tarda* was significantly higher than that of noninfected fish ($p < 0.05$). These results provide important suggestions for establishing a scheme to prevent *Edwardsiella* disease.

キーワード：養殖^{ようしよく}, ヒラメ, 過酸化脂質^{かさんかししつ}, 飼餌料^{しじりょう}, エドワジェラ症^{しょう}

浜田市およびその近郊を中心としたヒラメ陸上養殖業者数は、1996年の4経営体をピークに漸減し、2000年1月の時点で個人経営の1業者が残るのみとなっている。

ヒラメの陸上養殖が衰退した要因として、いわゆるバブル期以後の魚価の低迷、イワシ類を主とした餌料の確保が困難となったこと、飼育管理に要する労働力の確保難などが挙げられるが、疾病の恒常的発生による歩留りの低下やそれに伴う管理費用の増大も経営を圧迫する大きな理由として挙げられる。

ヒラメの幼魚期には、スクーチカなどの寄生虫による感染症の他、滑走細菌症、ビブリオ病など各種細菌性疾病、その他ウイルス性疾病などが発生しやすい。これまで、浜田地域周辺の陸上養殖場では8~9月の海水温が25℃以上を超え、30℃近くまで上昇する高水温期に細菌性疾病のエドワジェラ症が恒常的に発生してきた。

この疾病の原因菌 *Edwardsiella tarda* の感染により発症した場合、多くは治癒することなく死に至る。

餌止めや抗生剤の投与、疾病魚の除去など対策が実施されるが特に有効な手法はなく、疾病対策は後追いの感が強い。大量斃死はないが、2,000~3,000尾収容水槽で20~30尾/日、多いときには30~50尾/日が連日のように斃死し、累積斃死数は時に40%以上、場合によってはほぼ全滅する場合もある。

以前より、著者らはヒラメ養殖業者から養殖したヒラメ魚肉は天然魚と比べ異味があるとの指摘を受け、養殖ヒラメの品質評価を行ってきた¹⁾⁻²⁾。ドライペレット飼育魚(ペレット魚)、生餌飼育魚(生餌魚)、モイストペレット飼育魚(モイスト魚)、天然魚の品質の差異について、一般成分特性、脂質の性状、エキス成分特性について検討し、飼餌料が異なるヒラメの体成分組成に差異があることを明らかにした³⁾。

本研究では、ヒラメ魚肉の風味に関与していると考えられたPhosphatidilcholine-Hydroperoxides (PC-HPO)の定量を行い、飼餌料による血液中PC-HPO含量の差異について明らかにした。また、PC-HPOの生体内蓄積が養殖ヒラメにおよぼす影響について検討する中

*1本文の一部は平成10年度日本水産学会春季大会にポスターセッションに口頭発表、平成11年度日本水産学会春季大会に口頭発表した。

*2東京水産大学食品学科 (Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo, 108, Japan).

で、エドワジェラ症とPC-HPOの生体内蓄積との相関性が示唆される二、三の知見が得られたので併せてその概要を報告する。

実験方法

試料魚 天然ヒラメ *Paralichthys olivaceus* は、島根県沿岸海域で釣獲あるいは底びき網で漁獲されたものを活魚で入手した。養殖ヒラメは、浜田市周辺の養殖場で流水式陸上飼育をしたペレット魚、モイスト魚、マアジを主体にした生餌魚をそれぞれ入手した。なお、ペレット魚については、当场および浜田水産高校で蓄養したヒラメも試料魚として用いた。

血液・肝臓組織の採取 活魚で研究室に持ち帰った各試料魚は、24~48時間程度飼育水槽で休息させたのち、オイゲノールのエタノール溶液を海水で5,000倍に希釈し、試料魚を2分間浸漬し麻酔を施した。ヘパリン処理した注射器を用い、尾柄部大動脈より、目的に応じ2~5ml程度採血した。また、トーマの血球計算盤により、採血した血液中の赤血球数を測定した。

細菌の分離 疾病との関連性について検討するため、採血の終了したヒラメから無菌的に腎臓血をビブリオ用TCBS培地、BHI (Brain Heart Infusion Agar) 培地、*E.tarda* 分離用SS寒天培地の3種類の選択培地に塗抹し、細菌の分離を試みた。併せて、腹腔内臓組織の

観察を行い、肝臓組織を採取し、直ちにHPO分析用試料を調製した。

血液および肝臓組織からの脂質の抽出 採血した血液2mlを試験管に採取し、2,000rpmで20分間遠心分離し、血漿画分と血球画分に分離した。血漿1mlを採取し、Me-OH2ml、200ppmのBHAを含むCH₃CHO1ml、NBD-labeled PC (4-Nirobenz-2-oxa-1,3-diazole-labeled Phosphatidylcholine : AVANTI POLAR LIPIDS, INC製) 930pmol溶液1mlを加え2分間、CH₃CHO1mlを加え30秒、1%KCl溶液1mlを加え30秒ホモジナイズしたのち3,000rpm、10分間遠心分離し下層を採取した。さらに上層にCH₃CHO 1mlを加えホモジナイズし下層を先に採取したCH₃CHO層と合わせN₂ガスで濃縮し、PC-HPO分析に供した。血球画分は2mlのPSB溶液で2回洗浄し、血漿画分と同様に脂質の抽出を行った。肝臓組織からの脂質抽出は、組織0.3~0.5g採取し、血漿1mlから脂質抽出した上記の方法と同様の処理を行った。

PC-HPOの定量 PC-HPOの定量は、順相カラムHPLC蛍光検出法により実施した。本分析システムの概略を図1にDPPP-HPLCシステムとして示した。分析条件は表1のとおりである。なお本法ではHPOに高い反応選択性を有する発蛍光分析試薬として、過酸化脂質測定用蛍光ラベル化剤DPPP (Diphenyl-pyrenylphosphine : DOJIN製) を反応液に使用した。

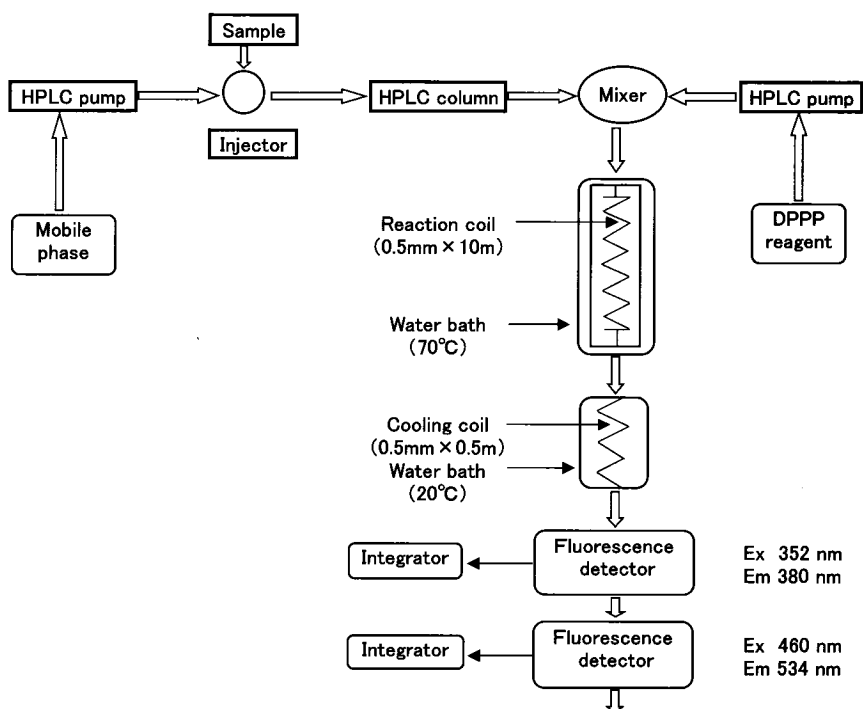


図1 PC-HPO定量HPLシステムの構成

結果および考察

飼餌料によるPC-HPO含量の差異 図2に飼餌料の異なる養殖ヒラメの血漿中のPC-HPO含量を示した。ヒラメにおける過酸化脂質の蓄積は、斃死後の食品としての品質を判断する上で有効な指標となりうるとの観点から、血液中のPC-HPOの含量に及ぼす飼餌料の影響を養殖魚と天然魚で比較したものである。血漿のPC-HPO含量はイカナゴ給餌区の生餌魚が545pmol/ml、モイストペレット給餌区のモイスト魚1,743pmol/ml、ドライペレット給餌区のペレット魚2,672pmol/ml、天然魚545pmol/mlで、ペレット魚において最も高い含量を示し、次いでモイスト魚となり、生餌魚と天然魚はほぼ同等の値を示した。

一方、図3に示した血球のPC-HPO含量は生餌魚、モイスト魚、天然魚の3試験区間で2.1~3.0pmol/10万細胞を示し差異はなかったが、ペレット魚では5.3pmol/10万細胞で、他の3試験区よりも有意に高かった (p>0.05)。このように、ドライペレットで飼育

したヒラメには過酸化脂質が蓄積しやすい傾向が明らかとなった。

細菌感染症とHPO蓄積との関連性 異なる飼餌料の飼育により、血漿、血球中のPC-HPO含量に差異が認められたが、PC-HPOのような過酸化脂質が体内に蓄積することで細胞膜などの損傷や正常な細胞機能に障害を引き起こすことが示唆される。したがって、長期にわたる体内蓄積は細胞レベルにとどまらず、内臓機能の低下やそれに伴う免疫力の低下を引き起こす結果、各種の疾病あるいは感染症の発症に至るものと推察される。

PC-HPOの体内蓄積により、免疫系の発達が十分でない幼魚では大型魚に比べ、外部からの刺激や細菌、ウイルスなどのストレスや病原体に対してさらに抵抗力が低下すると思われ、飼育管理技術の確立は最も重要な課題であると考えられる。

今回採用したPC-HPO定量法は微量定量法であるが最少血液採取量は2ml程度が望ましい。経験的に体重の2%の採血が可能であり、魚体重が200g程度あれば

表1 PC-HPC定量HPLCの分離条件

システム操作項目	分析条件
Column	LiChrosorb Si 60 (5 μm) 4 mm I.d. × 250mm
Mobile phase	Chloroform/Methanol/Water=9/50/1.V/V/V 0.6ml/min
DPPP soln	DPPP (Diphenyl-1-pyrenylphosphine) 3 mg +400ml Aceton/Methanol (1:3,V/V) 0.3ml/min
Reaction coil	0.5mm I.d. × 10m, 70°C
Fluorescence monitor	(I) Sample : Ex352nm ; Em380nm (II) I.S : Ex460nm ; Em534nm

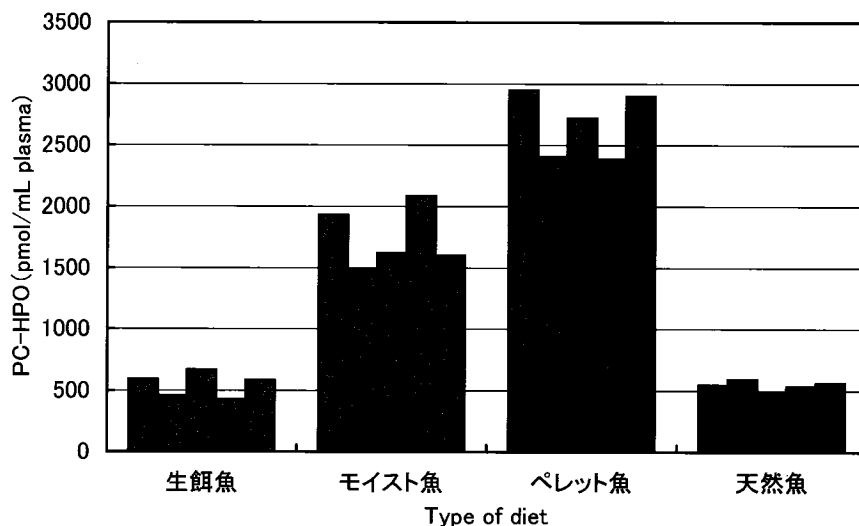


図2 血漿中のPC-HPO含量の差異

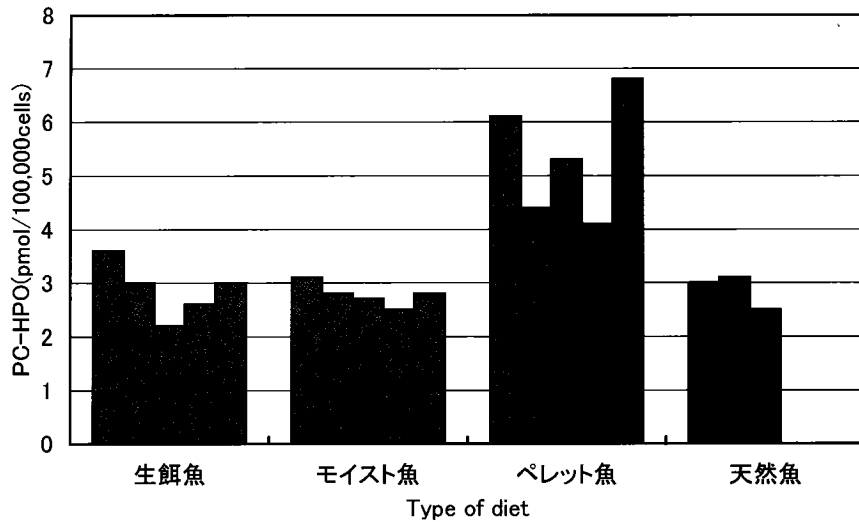


図3 血球中のPC-HPO含量の差異

比較的速やかな採血が実施できるが、数10gの小型魚からの採血は困難である。そこで、著者らは幼魚期におけるPC-HPOの蓄積を把握する必要があるとの見知から、肝臓中のPC-HPO含量の定量を試みた。予備試験の結果、0.3g程度の組織で分析可能であることが明らかとなったため、小型魚におけるC-HPOの蓄積量は肝臓組織に含有されるPC-HPO含量により評価した。

表2に内臓所見も併せ、試料魚の概要を示した。また、図4に肝臓組織中のPC-HPO含量および細菌分離結果として*E.tarda*感染魚および非感染魚に区分し図示した。細菌分離は分析試料調製時に選択培地で腎臓組織から細菌分離を実施した結果である。SS寒天培地に*E.tarda*特有のコロニーを形成したものを*E.tarda*感染魚、コロニーが観察されなかったものを非感染魚

とした。

ペレット魚における感染魚のPC-HPO含量は非感染魚と比べた場合、有意 ($p>0.05$) に感染魚が高かった。モイスト魚では感染魚と非感染魚間のPC-HPO含量に有意差が認められなかった。測定した養殖魚全体で見ると*E.tarda*感染魚と非感染魚の間に有意差 ($p>0.05$) が認められ、感染魚肝臓中のPC-HPO含量が高いことが明らかとなった。

また、*E.tarda*感染魚の多くは、腹水、肝臓、脾臓、腎臓の肥大など、内臓諸器官に異常が認められた。

以上のことから、PC-HPO蓄積量と*E.tarda*による感染との関連性が強く示唆されるが、餌を多く摂取する魚ほどエドワジェラ症を発症する頻度が多いという現場の話もあり、非感染魚でも飼餌料の多量摂取によ

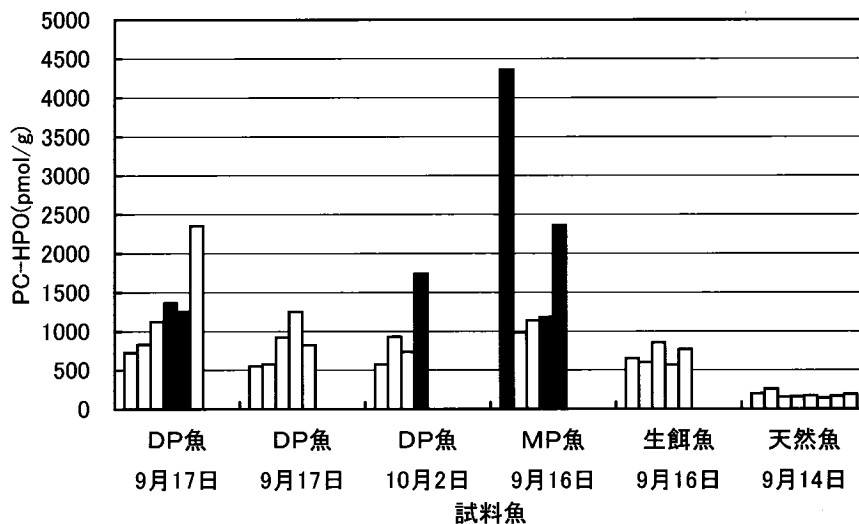


図4 餌飼料の異なるヒラメ肝臓中のPC-HPO含量
黒抜き：感染魚、白抜き：非感染魚

りPC-HPOの含量水準が上昇するものと考えられた。

養殖現場では疾病発生防止を図るため、高水温期は給餌制限などを実施する。この影響により血液中の各種栄養成分濃度は大きく変動することが考えられる。また、幼魚期の魚から一定量の血液を採取することは困難であることから、幼魚については肝臓組織中のPC-HPOの蓄積の多少が疾病発症を予察するための指標となりうると期待された。

一般に水温、水質などの環境条件、健苗性、飼餌料の品質などの諸条件によって疾病発生の有無は大きく異なると言われており、直ちにPC-HPOの蓄積が細菌疾病発症の原因と断定はできない。しかしながら、過

酸化脂質の体内での挙動が健康性を損なう原因となることも報告されており⁴⁾、飼餌料の組成、品質によっては魚類の健康性に大きな影響を与えていると考えざるを得ない。

現在、消費者に提供される全ての食品は安全性を保証したものでなければ、商品としての価値を失わないかねない情勢となっていることは周知の通りである。養殖生産物も例外ではなく、消費者が安心して購入できる品質を保証するのは生産者としての義務である。高品質な養殖魚の育成という観点からも養成技術開発が重要である。

今後、PC-HPOの体内蓄積と疾病発生状況との相関

表2 試料魚の概要

試料名	年月日	体重(g)	体長(cm)	肝臓重量(g)	外観及び解剖所見	細菌分離結果
Fresh food						
FF-1	1998.9.16	41.2	14.3	0.35	異常なし	-
FF-2	〃	32.9	12.7	0.30	〃	-
FF-3	〃	37.2	14.1	0.29	〃	-
FF-4	〃	44.1	14.7	0.37	〃	-
FF-5	〃	49.5	15.9	0.39	〃	-
Mean±SD		41.0±5.7	14.34±1.0	0.34±0.04		
Moist pellet						
MP-1	1998.9.16	70.0	17.0	0.99	腹水、鰓蓋発赤	<i>E.tarda</i>
MP-2	〃	86.7	19.0	0.71	異常なし	-
MP-3	〃	64.9	17.0	0.48	〃	-
MP-4	〃	76.6	17.8	0.43	〃	<i>E.tarda</i>
MP-5	〃	32.0	13.0	0.28	鰓発赤	<i>E.tarda</i>
Mean±SD		66.0±18.5	16.8±2.0	0.58±0.25		
Dry pellet						
DP1-1	1998.9.17	259.0	25.5	3.70	異常なし	-
DP1-2	〃	203.8	23.5	1.51	〃	-
DP1-3	〃	219.2	24.0	1.52	〃	-
DP1-4	〃	245.8	24.0	5.73	腹水、肝臓・腎臓・脾臓肥大	<i>E.tarda</i>
DP1-5	〃	272.9	26.5	3.65	鰓蓋発赤	<i>E.tarda</i>
DP1-6	〃	332.4	26.0	6.36	腹水、脱腸、肝臓・腎臓・脾臓肥大	<i>E.tarda</i>
Mean±SD		255.5±41.5	24.9±1.1	3.75±1.86		
DP2-1	1998.9.17	106.6	18.5	1.42	肝臓赤色	-
DP2-2	〃	181.1	22.5	2.91	肝臓周縁部黄色	-
DP2-3	〃	120.5	19.7	1.33	肝臓黄色部多い	-
DP2-4	〃	184.2	23.0	2.53	肝臓黄色	-
DP2-5	〃	98.6	19.0	1.11	肝臓周縁部黄色	-
Mean±SD		138.2±37.0	20.5±1.9	1.86±0.72		
DP2-1	1998.10.2	129.3	19.5	2.61	眼部周辺腫脹、肝臓：黄色	-
DP2-2	〃	153.9	21.5	1.59	腹水少量、肝臓：黄色	-
DP2-3	〃	125.4	21.0	1.70	体色黒色、肝臓：黄色	-
DP2-4	〃	139.9	22.0	1.58	眼部腫脹、肝臓：周縁部うっ血	<i>E.tarda</i>
Mean±SD		137.1±11.0	21.0±0.94	1.87±0.43		
Wild						
NT-1	1998.9.14	499.9	30.6	7.10	異常なし	-
NT-2	〃	692.2	34.9	7.77	〃	-
NT-3	〃	707.4	36.7	8.73	〃	-
NT-4	〃	325.6	27.7	3.29	〃	-
NT-5	〃	261.8	25.5	1.81	〃	-
NT-6	〃	269.3	26.1	3.20	〃	-
NT-7	〃	482.1	30.3	6.12	〃	-
NT-8	〃	376.0	27.5	7.14	〃	-
Mean±SD		451.8±164.9	29.9±3.8	5.65±2.37		

性をさらに検討し、疾病発生予防の評価指標としての有効性を明らかにしたい。

文 献

- 1) 井岡 久・山根玲子：餌料の異なる養殖ヒラメの肉質評価。平成5年度島根水試事業報告, 108-12 (1995).
- 2) 井岡 久・山根玲子・小村治男：餌料の異なる養殖ヒラメの品質評価。平成6年度島根水試事業報告, 92-96 (1996).
- 3) 井岡 久・山中英明：餌料の異なる養殖ヒラメの品質評価。日水誌, 63, 370-377 (1977).
- 4) 富田 勲：食品衛生と過酸化・抗酸化、食衛誌, 38, 39-47 (1997).