

論文

高濃度ビタミンC投与がヒラメの栄養特性に与える影響について

難波^{※1} 亜紀・森^{※2} 美里・柴崎^{※3} 康宏・間野^{※4} 伸宏・安齋^{※5} 寛・上田^{※6} 龍太郎Nutritional characteristic of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* upon feeding a diet supplemented with high concentration of ascorbic acidAki NAMBA^{※1}, Misato MORI^{※2}, Yasuhiro SHIBASAKI^{※3}, Nobuhiro MANO^{※4}, Hiroshi ANZAI^{※5} and Ryutaro UEDA^{※6}

ABSTRACT

Flounder is a globally important fish species in aquaculture. In the present study, we analyzed the effect of high concentration vitamin C administration on fatty acids in the muscle of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Although the fatty acid content in the muscle of the vitamin C administrated fish tended to be higher than that of the control fish, the fatty acid ratio did not differ between two administrated groups. In the future, it must divide muscles into sections such as the lateral body and engawa muscles, and then analysis each section separately.

1. はじめに

水産物は、良質のタンパク質を含む一方、カロリーが低いという特徴がある¹⁾。またビタミンや必須ミネラル、高度不飽和脂肪酸など健康維持に役立つ栄養素が多く含まれており、世界的に需要が増加している。一方で漁業による水産物の確保は限界に達しており、養殖産業による供給増大が

期待されている。実際、世界的にみると養殖生産量は年々増加しており、2014年には養殖生産量は漁業生産量を上回った²⁾。このような養殖生産量の大幅な増加は、初期餌料や育種など多岐にわたる育成技術の進展によるところが大きいですが、課題も多く残されている。魚類養殖では、経営的な問題から高密度の状態で飼育されることが一般的で

※1 日本大学短期大学部(三島校舎)食物栄養学科 非常勤講師 Part-time lecturer, Department of Food and Nutrition, Junior College (Mishima Campus), Nihon University

※2 日本大学大学院生物資源生産科学専攻・博士後期課程学生 Graduate School of Bioresource Sciences, Bioresource Production Sciences Nihon University

※3 日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科 助教 Assistant Professor, Department of Marine Science and Resources, College of Bioresources Sciences, Nihon University

※4 日本大学生物資源科学部海洋生物資源科学科 准教授 Associate Professor, Department of Marine Science and Resources, College of Bioresources Sciences, Nihon University

※5 日本大学生物資源科学部くらしの生物学科 教授 Professor, Department of Bioscience in Daily Life, College of Bioresources Sciences, Nihon University

※6 日本大学短期大学部(三島校舎)食物栄養学科 教授 Professor, Department of Food and Nutrition, Junior College (Mishima Campus), Nihon University

あり、それだけ魚病の発生リスクが高く、毎年多くの被害が生じている³⁾。また国内だけをみると、調理が面倒などの面から水産物の需要はむしろ減少傾向にあり、魚価も低迷している。

このような状況を背景として、魚病の発生を予防し、より付加価値の高い水産物の養殖生産が模索されている。魚類養殖における魚病対策としては、魚類の自然免疫を向上させる免疫賦活剤が期待されており¹⁾⁴⁾、アスコルビン酸（ビタミンC）などの栄養素、グルカンなどの多糖類、ラクトフェリンなどの機能性タンパク質などが用いられている⁵⁾⁶⁾。著者らも安価で安全性の高いビタミンCに着目し、配合飼料に過剰添加することにより（以後、高濃度ビタミンC投与方法と称す）、魚類の高水温耐性や複数の魚類病原体に対する抗病性向上効果を確認している⁷⁾⁸⁾。

ビタミンCは生体内の結合組織（コラーゲン）の生合成に必須であり⁹⁾、牛などの脂肪前駆細胞にビタミンCを加えると脂肪細胞への分化が促進されるなど¹⁰⁾、肉質の改善にも寄与することが期待されるが、高濃度ビタミンC投与が魚類生体内での脂肪代謝に及ぼす影響についての知見は乏しい。魚種により含有量は異なるが、魚類の可食部にはドコサヘキサエン酸（DHA）やイコサペンタエン酸（EPA）など、人の健康に寄与する多価不飽和脂肪酸が含まれており、免疫賦活剤を利用してこのような脂肪酸も増やすことができれば、栄養学的に価値の高い食材として、より付加価値をつけることが期待できる。

そこで本研究では、魚類に対する高濃度ビタミンC投与方法を栄養学的な観点から評価することを目的として、同投与を行った重要養殖魚の一種であるヒラメ *Paralichthys olivaceus* を対象に、筋肉の脂肪酸組成および脂肪酸含有量に及ぼす影響について解析を行った。

2. 材料および方法

2.1 供試魚

実験には、マリンテック株式会社より購入した2歳魚のヒラメ 70.1 ± 15.6 g（平均値±標準偏差）12尾を用いた。水温を20℃に設定した500 Lの上面濾過式水槽を2槽設置し、それぞれビタミンC

投与水槽および対照水槽として、1水槽につき6尾ずつ収容した。その後、総体重の3%となるように市販の配合飼料（ひらめEPF-4、日清丸紅飼料株式会社：粗蛋白50.0%、粗脂肪6.0%、粗繊維2.0%、粗灰分17.0%、カルシウム2.5%、リン1.7%）を毎日与えることにより馴致した後、下記試験を実施した。

2.2 供試薬剤および調整

供試薬剤には、L-アスコルビン酸（以後、ビタミンC；Wako）を使用した。既報¹¹⁾に従い、ビタミンCは蒸留水で溶解後、直ちにビタミンC濃度が2,000 mg/kg飼料となるように配合飼料に展着させた（以後、ビタミンC展着飼料）。なお、対照用の飼料には同量の蒸留水を加えた配合飼料を用いた（対照飼料）。調整した各飼料は使用時まで-20℃で保存した。

2.3 飼育試験およびサンプリング手順

2.2で調整した飼料を1日1回、総体重の3%となるように給餌した。7日間給餌した後、全尾取り上げ、0.2g/L 3-aminobenzoic acid ethyl ester（Sigma）を用いて麻酔した。体重を測定後、尾柄血管より採血を行い、脱血した。次に包丁を使ってえんがわを含む筋肉を切り出し、皮を剥いで細切した。1尾当りの筋肉重量が 29.5 ± 7.1 gと測定必要量である50 gに達しなかったため、2尾分の筋肉をプールしたものを1筋肉試料として、脂肪酸組成および脂肪酸含有量の分析に用いた。更に、ビタミンC組織含有量測定のため、開腹して肝臓を採取し¹²⁾、使用時まで-80℃で保存した。

2.4 ビタミンC組織含有量の測定

ビタミンCの測定は、ヒドラジン法により肝臓からビタミンCを抽出した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）法により実施した（衛生試験法・注解2000.219-220）。実施の詳細は下記に示す。

1) ビタミンCの抽出

ビタミンCの抽出はヒドラジン法により行った。すなわち、2.3で得た肝臓0.02gに1,200 μlの

5 % (W/V) メタリン酸を加え、ホモジナイズした。遠心後 (4℃, 12,000×g, 10分)、得られた上清 1 ml にインドフェノール溶液を色が消失しない程度に数滴加え、さらに 2 % チオ尿素-メタリン酸溶液 2,000 μl および 2 % ヒドラジン硫酸溶液 500 μl を加え、50℃ で 90 分加温した後、酢酸エチルを 2 ml 加え、60 分間混和した。遠心後 (室温, 2,000×g, 5 分)、得られた上清に対して、無水硫酸ナトリウムを少量加えて脱水させた。最後に 0.50 μm の PTFE フィルター (ADVANTEC 社) で濾過したものを抽出試料として、測定まで常温暗所で保存した。

また、ビタミン C の検量線を作成するため、ビタミン C を 5 % (W/V) メタリン酸溶液に直接溶解させ、0、2、6、10、および 20 μg/ml となるように調整した。以後、肝臓と同一手順で各濃度溶液 1.0 ml からビタミン C の抽出を行った。

2) HPLC 法による定量

ビタミン C の測定は、シリカゲルカラム (Silica-215-N, 株式会社センシュウ科学) を用いた HPLC 法により実施した。なお、移動相には酢酸、n-ヘキサン、酢酸エチルを 1 : 4 : 5 (V/V/V) の割合で混和し、0.50 μm の PTFE メンブレンフィルター (ADVANTEC) により濾過したものをを用いた。測定は、抽出試料 20 μl をアプライし、流速 1.5 ml/min、カラムオープン温度 40℃、検出 495 nm の定量条件で行った。なお、1 試料につき測定は 3 回行い、その平均値を 1) で抽出処理したビタミン C 標準液で求めたピーク面積を基準として作成した検量線にあてはめることにより、ビタミン C 濃度を得た。そして、最終的に組織含有量 100 g 当りのビタミン C 含有量を算出した。

2.5 脂肪酸組成

脂肪酸組成は、筋肉試料に 0.5 M 水酸化ナトリウムのメタノール溶液を加えてけん化した後、三フッ化ホウ素メタノール錯体メタノール溶液に溶解させた。ヘキサンに溶解後、飽和食塩水を加え、ヘキサン層を採取した。得られたものをガスクロマトグラフィー (Agilent 7890B, アジレント・テクノロジー株式会社) にて測定を行った。

2.6 脂肪酸含有量の測定

脂肪酸含有量の測定は、筋肉試料からクロロホルム-メタノール混合液を用いて脂質を抽出した後、ロータリーエバポレーターにて濃縮・乾固した。得られた総脂質を少量のクロロホルムなどに溶かして -20℃ で測定まで保存した。その後、2.5 の脂肪酸組成と同一手順で実施した。

2.7 脂肪酸含有量の算出

試料中の脂肪酸含有量は、以下の計算式を用いてヘプタデカン酸メチルによる内部標準法により算出した。

$$\text{試料中の脂肪酸含有量 (g/100 g)} = \frac{A \times C \times K}{B \times W} \times 0.1$$

A : 被定量脂肪酸メチルの面積
B : ヘプタデカン酸メチルの面積
C : ヘプタデカン酸の添加量 (mg)
K : 感度補正係数
W : 試料採取量 (g)

3. 結果

3.1 肝臓中のビタミン C 含有量

ヒラメ肝臓中のビタミン C 含有量を測定した結果、ビタミン C 展着区では 20.4 ± 3.2 mg/100g 組織重量であったのに対し、対照区では 8.2 ± 1.7 mg/100g 組織重量となり、ビタミン C 展着区において有意 (p < 0.05) な増加が認められた (図 1)。

3.2 脂肪酸組成

表 1 にヒラメ筋肉中の脂肪酸組成を示した。ビタミン C 展着区と対照区を比較したところ、脂肪酸組成比に明瞭な差異は認められなかった。比率の高い脂肪酸をみると、飽和脂肪酸ではパルミチン酸が最も高く、ビタミン C 展着区 18.3 ~ 18.7 %、対照区 18.8 ~ 18.9 % であった。一価不飽和脂肪酸ではオレイン酸/cis-パルミチン酸が高く、ビタミン C 展着区 14.0 ~ 15.3 %、対照区 13.4 ~ 14.3 % であった。多価不飽和脂肪酸ではドコサヘキサエン酸が高く、ビタミン C 展着区 21.8 ~ 24.7 %、対照区 22.9 ~ 25.6 % であった。

3.3 脂肪酸含量

表 1 にヒラメ筋肉中の各脂肪酸含量を示した。

ビタミンC展着区の総脂肪酸含量は0.3~0.5 g/100g可食部であったのに対して、対照区は0.3 g/100g可食部であり、ビタミンC展着区の方が高い傾向がみられた。また、飽和脂肪酸も、対照区が0.1 g/100g可食部であったのに対してビタミンC展着区は0.1~0.2 g/100g可食部と高い傾向を示した。しかし、両区ともに多くの測定項目が測定限界以下であり、明瞭な差を示す測定項目は認められなかった。

4. 考察

本研究において、実験に供したヒラメの肝臓中のビタミンC含量をみると、ビタミンC展着区は対照区と比較して2倍近い値であり、有意な差がみられたことから、実験期間を通して十分量の給餌および魚体内での蓄積はできていたものと判断した。

そこで脂肪酸含量をみると、ビタミンC展着区は対照区と比較して多い傾向がみられた。哺乳動物では、ビタミンCが脂肪前駆細胞の分化に影響をもたらすことが報告されている¹³⁾。本研究では多くの測定項目が測定限界以下となり比較することができなかったが、中山・高嶋(2016)は、養殖と天然のヒラメで脂肪酸組成を比較し、その比率が大きく変わることを報告している¹⁴⁾。これは摂餌物の違いを反映したものと予想され、脂肪酸の蓄積が外部から得る栄養素の影響を受けることを示唆している。しかし、本研究では、ビタミンC展着区と対照区の間で、脂肪酸組成において明瞭な違いは認められなかった。

人の神経細胞に影響をもたらす、脳の発達促進や認知症予防などの効果が期待される栄養素として注目していたDHAやEPAも、両区の間で差は認められなかった。中山・高嶋(2016)が示した組成比は、養殖ヒラメのDHAが平均37.9%であったのに対し、本研究ではビタミンC展着区で21.8~24.7%、対照区で22.9~25.6%と約半分程度の値であった。一方、EPAは6.4%であったのに対して本研究におけるビタミンC展着区では7.9~8.2%、対照区では8~8.3%と数割高い値を示した。これらの相違は、魚体サイズ、給餌期間、配合飼料中に含まれる脂肪酸含量や組成の違いによるものと推察される。

中山・高嶋(2016)は、ヒラメの筋肉中の脂肪酸組成についてブリ、トラフグ、クロマグロと比較し、DHAについてはヒラメが最も高い比率であったことを報告しており、魚類の中でも栄養学的に有用な水産物であるといえる。なお、ヒラメなどの異体類の筋肉組織は、通常、体側筋以外に背鰭や臀鰭を動かす軟条を動かす筋肉組織である縁側(えんがわ)があり、脂肪酸比率などが異なることが報告されている¹⁵⁾。本研究でも筋肉組織毎の測定も試みたが、魚体サイズの的に実施することができず、全ての筋肉部位を混合させて測定を実施せざるをえなかった。今後、より大型の魚体を用いて、えんがわなどの筋肉組織を区分して脂肪酸組成をみることで、ビタミンCの投与のより詳細な効果検証ができるものと考えている。

文献

- 1) 若林久嗣: 第9章 環境性疾患およびストレス。「改訂・魚病学概論」(小川和夫、室賀清邦編)。恒星社厚生閣、東京、2008、123-134。
- 2) 岩下 誠: 第5章 養殖「水族育成学入門」(間野伸宏、鈴木伸洋編)成山堂書店、東京、2020、57-73。
- 3) 泉 庄太郎: 第6章 養殖形態と関連施設。「水族育成学入門」(間野伸宏、鈴木伸洋編)。成山堂書店、東京、2020、74-89。
- 4) 小林牧人、金子豊二、会田勝美: 第4章内分泌。「魚類生理学の基礎」(会田勝美編)恒星社厚生閣、東京、2002、128-159。
- 5) Roy A. Dalmo and Jarl Bogwald: β -glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 2008, 384-396。
- 6) M. Sasaki: Current research status of fish immunostimulants, *Aquaculture* 172, 1999, 65-92。
- 7) T. Ishikawa, N. Mano, K. Minakami, A. Namba, T. Kojima, H. Hirose and T. Nakanishi: Efficacy of high-concentration ascorbic acid supplementation against Infectious Hematopoietic Necrosis in salmonid fish influenced by viral strain and fish size. *Fish Pathology*, 48(4), 2013, 113-118。
- 8) T. Ishikawa N. mano, T. Nakanishi and H. Hirose: Adverse and benerical effects of long-term high-

- concentration ascorbic acid supplementation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Science* 77(6), 2011, 1009-1014.
- 9) 池田静徳、佐藤守、吉中禮二：魚類のコラーゲン合成におけるビタミンCの役割. *ビタミン*, 57, 1983, 433-449.
 - 10) 鳥居伸一郎、松田恭子、大山路世、松井徹、矢野秀雄：黒毛和種から単離した脂肪前駆細胞の影響. *肉用牛研究会報*, 60, 1995, 27-28.
 - 11) M. Mori, T. Ito, R. Washio, Y. Shibasaki, A. Namba, T. Yabu, D. Iwazaki, N. Wada, H. Anzai, H. Shiba, T. Nakanishi and N. Mano: Enhancement of immune proteins expression in skin mucus of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* upon feeding a diet supplemented with high concentration of ascorbic acid. *Fish and Shellfish Immunology*, 114, 2021, 20-27.
 - 12) K-J Lebastese, K-W Kim and S C Bai: Effects of different dietary levels of L-ascorbic acid on growth and tissue vitamin C concentration in juvenile Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*, 29, 1998, 237-244.
 - 13) 末長将志、河内浩行、松井徹：アスコルビン酸リン酸による3T3-L1脂肪前駆細胞の分化促進作用のメカニズムの検討, *Trace Nutrients Research*, 25, 2008, 61-64.
 - 14) 中山祐輔、高嶋康晴：脂肪酸分析によるブリ、ヒラメ、トラフグ、クロマグロの養殖判別法の検討, *食品関係等調査研究報告*, 2016, 40.
 - 15) 佐藤守、吉中禮二、西中義裕、森本晴之、小島朝子、山本義和、池田静徳：天然および養殖ヒラメ肉の栄養成分の比較. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52(6), 1986, 1043-1047.

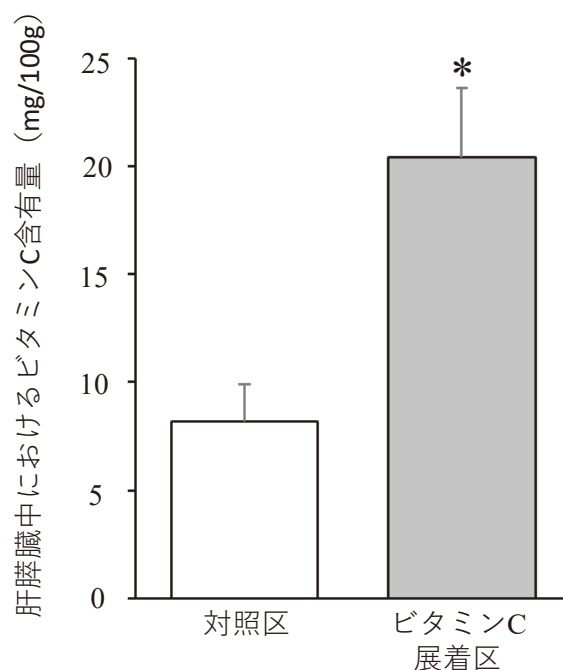


図1 ヒラメ肝臓中におけるビタミンC含有量。
* ; $p < 0.05$, studentのt検定.

表 1 各試験区におけるヒラメ筋肉組織中の脂肪酸含有量および脂肪酸組成

炭素数： 二重結合数		対照区				ビタミンC展着区			
		No. 1		No. 2		No. 1		No. 2	
項目	含有量 (g/100 g 可食部)	脂肪酸 組成 (%)	含有量 (g/100 g 可食部)	脂肪酸 組成 (%)	含有量 (g/100 g 可食部)	脂肪酸 組成 (%)	含有量 (g/100 g 可食部)	脂肪酸 組成 (%)	含有量 (g/100 g 可食部)
総脂肪酸	0.3 g		0.3 g		0.3 g		0.3 g		0.5 g
飽和脂肪酸	0.1 g		0.1 g		0.1 g		0.1 g		0.2 g
一価不飽和脂肪酸	検出限界以下		検出限界以下		検出限界以下		検出限界以下		0.1 g
多価不飽和脂肪酸	0.2 g		0.2 g		0.2 g		0.2 g		0.2 g
n-3系多価不飽和脂肪酸	0.2 g		0.2 g		0.2 g		0.2 g		0.2 g
n-9系多価不飽和脂肪酸	検出限界以下		検出限界以下		検出限界以下		検出限界以下		0.1 g
ミリスチン酸	14:00	検出限界以下	3.1	3.3	検出限界以下	2.9	検出限界以下	3.3	検出限界以下
ペンタデカン酸	15:00	検出限界以下	0.4	0.5	検出限界以下	0.4	検出限界以下	0.4	検出限界以下
パルミチン酸	16:00	0.1 g	18.9	0.1 g	18.8	18.7	0.1 g	18.3	0.2 g
パルミトレイン酸	16:01	検出限界以下	3.2	3.4	検出限界以下	3	検出限界以下	3.4	検出限界以下
ヘキサデカジエン酸	16:02	検出限界以下	0.2	0.2	検出限界以下	0.2	検出限界以下	0.2	検出限界以下
ヘプタデカン酸	17:00	検出限界以下	0.4	0.5	検出限界以下	0.4	検出限界以下	0.4	検出限界以下
ヘプタデセン酸	17:01	検出限界以下	0.3	0.3	検出限界以下	0.3	検出限界以下	0.3	検出限界以下
ステアリン酸	18:00	検出限界以下	5.6	5.5	検出限界以下	5.7	検出限界以下	5.6	検出限界以下
オレイン酸/cis-バクセン酸	18:01	検出限界以下	14	14.3	検出限界以下	13.4	検出限界以下	14.3	検出限界以下
リノール酸	18:2n-6	検出限界以下	3.6	3.9	検出限界以下	3.6	検出限界以下	3.8	検出限界以下
γ-リノレン酸	18:3n-6	検出限界以下	-	検出限界以下	-	-	検出限界以下	-	検出限界以下
α-リノレン酸	18:3n-3	検出限界以下	0.6	0.6	検出限界以下	0.5	検出限界以下	0.6	検出限界以下
オクタデカテトラエン酸	18:4n-3	検出限界以下	0.9	0.9	検出限界以下	0.8	検出限界以下	0.9	検出限界以下
アラキジン酸	20:00	検出限界以下	0.2	0.2	検出限界以下	0.2	検出限界以下	0.2	検出限界以下
イコセン酸	20:01	検出限界以下	2	2	検出限界以下	1.9	検出限界以下	2	検出限界以下
イコサジエン酸	20:2n-6	検出限界以下	0.3	0.3	検出限界以下	0.3	検出限界以下	0.3	検出限界以下
ジホモ-γ-リノレン酸	20:3n-6	検出限界以下	0.2	0.1	検出限界以下	0.2	検出限界以下	0.1	検出限界以下
エイコサトリエン酸	20:3n-3	検出限界以下	0.2	0.2	検出限界以下	0.1	検出限界以下	0.1	検出限界以下
アラキドン酸	20:4n-6	検出限界以下	2.2	2.3	検出限界以下	2.3	検出限界以下	2.3	検出限界以下
イコサテトラエン酸	20:4n-3	検出限界以下	0.5	0.5	検出限界以下	0.5	検出限界以下	0.5	検出限界以下
イコサペンタエン酸	20:5n-3	検出限界以下	8	8.4	検出限界以下	7.9	検出限界以下	8.3	検出限界以下
ヘンニコサペンタエン酸	21:5n-3	検出限界以下	0.3	0.3	検出限界以下	0.3	検出限界以下	0.3	検出限界以下
ドコセン酸	22:01	検出限界以下	0.8	1	検出限界以下	0.8	検出限界以下	0.9	検出限界以下
ドコサテトラエン酸	22:4n-6	検出限界以下	0.2	0.2	検出限界以下	0.2	検出限界以下	0.2	検出限界以下
ドコサペンタエン酸	22:5n-6	検出限界以下	1	0.9	検出限界以下	1	検出限界以下	1	検出限界以下
ドコサペンタエン酸	22:5n-3	検出限界以下	2.7	2.6	検出限界以下	2.7	検出限界以下	2.7	検出限界以下
ドコサヘキサエン酸	22:6n-3	0.2 g	25	0.2 g	25.6	24.7	0.2 g	23.2	0.2 g
リグノセリン酸	24:00:00	検出限界以下	-	検出限界以下	-	-	検出限界以下	-	検出限界以下
テトラコエン酸	24:01:00	検出限界以下	0.3	0.4	検出限界以下	0.3	検出限界以下	0.4	検出限界以下
未同定		-	4.8	5.4	-	5.8	-	5.8	-