

アノイリナーゼに関する研究

コイの組織のビタミン B₁ 含有量に及ぼすビタミン試験食の影響*

佐藤 雅子

Studies on Aneurinase

Effect of Vitamin Test Diet on Thiamine Concentration in Tissues of Carp

Masako SATO

序 論

アノイリナーゼについては古くから研究が行われており、アノイリナーゼの分布、分解機構、その他一般諸性質など多くの報告がある^{1)~7)}。しかしながらアノイリナーゼの生理作用については不明な点が多く疑問が残されている。

アノイリナーゼを保有する生飼料の投与により動物に B₁ 欠乏症がみられることについては、古くは Green ら⁸⁾ はキツネに生コイを与えると“Chastek paralysis”と称する B₁ 欠乏症があらわれることを報告しており、最近では養魚にカタクチイワシを与えると B₁ 欠乏があらわれるという報告もある^{9)~11)}。一方アノイリナーゼを保有する組織にも B₁ は存在しており、アノイリナーゼ不活性後 B₁ 定量を行うと相当量の B₁ が検出される¹²⁾¹³⁾。B₁ 欠乏食で魚を飼育するとマスでは比較的短期間に B₁ 欠乏が出現するがコイでは B₁ 欠乏を起こしにくく¹⁴⁾ 高炭水化物食、抗サイアミン剤添加食ではコイでも B₁ 欠乏があらわれる¹⁵⁾ など、コイは B₁ 欠乏に抵抗性があると考えられている。他方試験管内でアノイリナーゼによりピリミジンの塩基置換体とチアゾールからわずかながら B₁ 合成が行われるという報告¹⁶⁾ もみられる。

本実験ではアノイリナーゼを保有するコイに4種類のビタミン試験食 (B₁ 無添加食, B₁ 適量食, B₁ 過剰食) を与え12週間あるいは10カ月間飼育し、これらのビタミン試験食がアノイリナーゼを保有するコイの組織の B₁ 量に及ぼす影響を検討したので報告する。

実 験 方 法

(1) 飼料組成

実験に使用したビタミン試験食の組成は Table 1, 2 に示したが、これは Halver らのビタミン試験飼料を一部変更したものである。タラ肝油のかわりに β -カロチン、カルシフェロールを使用し、水は固形物 100g に対し 130g 添加した。B₁ 添加は固形物 100g にそれぞれ、B₁ を 0, 5, 50, 500mg

* 1975年11月1日 受理

Table 1. Composition of the Vitamin test diet.

Casein (Vitamin free)	38 g	Riboflavin	20 mg	Sodium chrolide	173.1 mg
Gelatin	12	Pyridoxin HCl	5	Magnesium sulfate	545.3
Dextrin	28	Cholin chloride	500	Sodium biphosphate	347.1
α -Cellulose	9	Nicotinic acid	75	Potassium phosphate	954.4
Corn oil	7	Calcium pantothenate	50	Calcium biphosphate	540.1
Water	130	Inositol	200	Ferric titrate	118.2
		Biotin	0.5	Calcium lactate	1301.5
		Folic acid	1.5	Aluminium chrolide	0.597
		Cyanocobalamin	0.01	Zinc sulfate	11.94
		Ascorbic acid	100	Cuprous chloride	0.398
		β -Carotene	2.4	Manganous sulfate	3.184
		Calciferol	0.12	Potassium iodide	0.597
		Menadione	4	Cobaltous chloride	3.98
		α -Tocopherol	40		

Table 2. Thiamine concentration in the test diets.

Diet	Thiamine added (mg%) on dry basis	Thiamine concentration in the diet (mg%)
I Deficient	0	0.001
II Adequate	5	2.03
III Excess	50	19.3
IV Excess	500	194

添加し I 群 B₁ 欠乏食, II 群 B₁ 適量食, III 群, IV 群は B₁ 過剰食とした。このようにして調整した飼料中の B₁ 含量は Table 2 に示す通りである。

給飼量は魚の体重の約 8% に相当する量を 1 日 2 回, 午前 10 時と午後 4 時に投飼した。給飼したものは完全に摂取するようにし, 残渣がみられる時は給飼量を調整した。

(2) 実験動物

実験魚は生後 5~6 カ月の稚コイを求め, ネグホン, メチレンブルーで処理後, B₁ 5mg 添加の飼料で約 2 週間予備飼育した。100ℓ 容量のポリビニール製タンク (43×64×38cm) に体重約 10g の稚コイを 20 匹宛入れ, 循環濾過式, 水温 23°C で飼育した。水は 3 日毎必要に応じて毎日交換した。

(3) 組織の B₁ 定量

飼育 4 週毎に MS-222 で麻酔し, 体重, 体長を測定後, 組織の B₁ 量測定を行った。組織の浸出は硫酸浸出法¹³⁾, B₁ 定量はチオクロム法¹⁸⁾ で行った。飼料転換効率は飼育期間中の体重増重量に対する投飼量を百分比で表わしたものである。

実験結果

(1) 淡水魚の組織の B₁ 含有量

淡水魚の組織の B₁ 量を Table 3 に示した。分析には養魚場の淡水魚を 2 例から小さいものは 10

例使用した。生活環境の相異が考えられかなり個体差があるが、コイ、フナいずれも組織の B_1 量は肝臓より筋肉で高く、卵巣にも多いが腎臓、鰓、脳では低くなる。眼球の B_1 量は組織の中ではもっとも高く筋肉の約10倍程度であった。

成熟の異なるものの組織の B_1 量を検討したが、10~20g の1年魚、100~200g の2~3年魚、500~600g の3~4年魚の間に大きな相異は認められなかったので、本実験には、体重10g前後の1年魚の稚コイを用いた。飼育中の組織の B_1 量の測定は肝臓、筋肉、眼球の3組織について行った。

Table 3. Thiamine concentration in the various tissues.

Fish	Body weight	Kidney	Gills	Hepato-pancreas	Brain	Testes	Ovaries	Muscle	Eyes
	g	mg/100 g wet tissues							
Carp	500~600	0.032	0.010	0.053	0.041	—	0.103	0.460	3.262
	200~300	0.022	0.005	0.102	0.022	0.020	—	0.574	1.588
	200~300	0.010	0.009	0.087	0.035	—	0.272	0.348	2.520
	100~200	—	—	0.065	—	0.021	—	0.206	2.246
	10~20	—	—	0.085	—	—	—	0.244	2.679
Crucian	500~600	0.035	0.015	0.083	0.031	—	0.148	0.320	4.800
	200~300	0.051	0.012	0.071	0.029	—	0.174	0.259	4.051
	200~300	—	—	0.080	—	0.053	—	0.342	5.367
	100~200	—	—	0.071	—	—	0.073	0.360	4.593
	10~20	—	—	0.081	—	—	—	0.660	6.362

(2) 成長曲線

飼育中の平均体重の変化は Table 4, Figure 1 に示した。

飼育期間が長くなると個体差が大きくなるが、4群中 B_1 無添加の I 群、 B_1 5mg 添加の II 群、 B_1 500mg 添加の IV 群は比較的類似した成長曲線を示したが、 B_1 50mg 添加の III 群はもっとも良好な成長曲線を示し、 B_1 50mg 添加の稚ゴイの成長に効果があったものと思われる。体長の変化も同じような結果であった。

Table 4. Body weight of the carp.

Feeding period (week)	Diet			
	I B_1 -0	II B_1 -5	III B_1 -50	IV B_1 -500
	g			
0	10.96±0.84	10.20±0.53	10.83±1.19	10.74±0.96
4	22.63±1.69	21.86±1.42	23.09±2.24	23.05±2.15
8	48.97±4.65	44.99±3.07	54.80±6.77	42.86±4.31
12	78.91±8.61	74.21±4.00	97.50±9.77	77.43±2.69

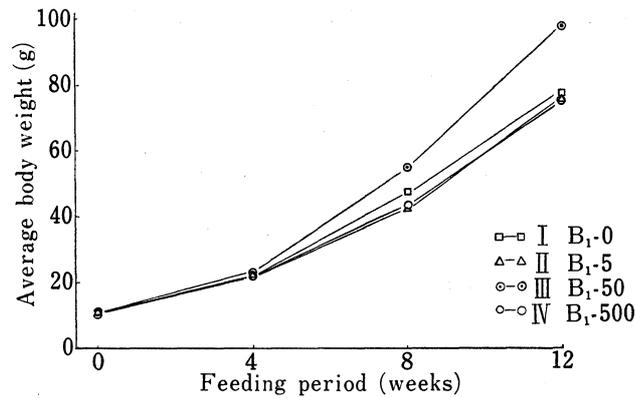


Fig. 1. Body weight curves of the carp

飼料転換効率は8週までは良好であったが、その後やや低下した。4群中 B₁ 50mg 添加の III 群の飼料転換効率がもっとも高かった。(Table 5)

斃死は II 群, III 群で 1 匹ずつみられたが、体重測定直後の斃死であり、恐らく事故死であったと思われる。その後いずれの群にも斃死がみられなかった。

飼育期間中 B₁ 無添加食群も B₁ 添加食群も大体同じような挙動を示し、体重測定後、数日間食欲不振がみられたが、その後は回復し元気に活動した。B₁ 無添加の I 群は 8~12 週に飼料転換効率はやや低下したが、食欲は他の群よりむしろ旺盛であり、皮膚のうっ血などの B₁ 欠乏症も認められず、斃死もみられなかった。

Table 5. Feed conversion and mortality of the carp.

Feeding period (week)	Diet			
	I B ₁ -0	II B ₁ -5	III B ₁ -50	IV B ₁ -500
Feed conversion (%)				
0~4	40	40	43	42
4~8	45	40	51	36
8~12	30	34	42	32
Mortality (%)				
0~4	0	5	5	0
4~8	0	0	0	0
8~12	0	0	0	0

(3) 組織の B₁ 含有量

飼育はじめの稚ゴイの組織の B₁ 量を Table 6 に示した。これはコイを入手後、2 週間 B₁ 5mg 添加食で 2 週間予備飼育したものの B₁ 量である。分析には 12 例のコイを使用した。

飼育 4 週後の稚ゴイの組織の B₁ 量を Table 7, Figure 2 に示した。B₁ 量の異なる 4 種類の試験食の飼育により、コイの組織の B₁ 量に明らかな変動がみられた。

Table 6. Thiamine concentration in the tissues at start.

Hepatopancreas		Muscle		Eye	
Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁
mg/100 g wet tissues					
0.105	0.001	0.195	0.006	2.247	2.241

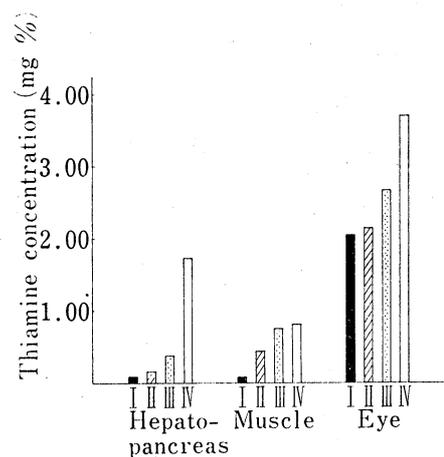
Table 7. Thiamine concentration in the tissues after 4 weeks.

Thiamine added mg %	Hepatopancreas		Muscle		Eye	
	Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁
mg/100 g wet tissues						
I B ₁ -0	0.091	0.011	0.068	0.003	2.049	1.948
II B ₁ -5	0.154	0.013	0.462	0.007	2.164	2.164
III B ₁ -50	0.387	0.112	0.751	0.017	2.688	2.640
IV B ₁ -500	1.713	1.050	0.814	0.020	3.711	3.651

B₁ 無添加の I 群では肝膵臓、筋肉、眼球いずれの組織の B₁ 量も飼育はじめの B₁ 量より減少しているのに対し、B₁ 5mg 添加の II 群では筋肉の B₁ 量は飼育はじめの約 2 倍、B₁ 50mg 添加の III 群と B₁ 500mg 添加の IV 群では約 4 倍に増加した。B₁ 過剰食の III 群、IV 群では眼球の B₁ 量増加もみられたが、肝膵臓の B₁ 量増加は顕著であり、III 群で 0.387mg%, IV 群で 1.713mg% であった。B₁ 増加の顕著であった肝膵臓の B₁ 形態を総 B₁ に占める遊離型 B₁ の比率で見ると、I 群、II 群では 10% 以下であるが、III 群では 28%、IV 群で 61% であり、飼料の B₁ 量が高いもの程、肝膵臓の B₁ 量は高く、遊離型 B₁ の比率も高かった。飼

育 4 週後、組織の B₁ 定量は飼料投与後 6~8 時間に行ったが、この時間には、腸の末端部は飼料と同じ黄色を帯びており、投与した飼料の一部は吸収されていないものと思われた。

そこで B₁ の体内移行をみるために、B₁ 5mg 添加の飼料で約 1 カ月間飼育したコイ (体重約 35g) 10 匹を 2 群にわけ、1 群にそれぞれ B₁ 500mg 添加の飼料 45g を 5 回に分割して両群同じ方法で 3 日間投与し、飼料投与後 4 時間、24 時間の肝膵臓、筋肉、眼球の B₁ 量を測定した。その結果は Table 8 に示したが、飼料投与後 4 時間の肝膵臓の B₁ 量は 2.217mg% であり、遊離型 B₁ の比率は 52% であった。一方 24 時間後の肝膵臓の B₁ 量は 0.197mg% であり、これは 4 時間後の B₁ 量の約 1/10 であり、B₁ 形態は遊離型 8% であった。24 時間後の肝膵臓の B₁ 量は 4 時間値に比較してきわめて低かったが、この傾向はマウス¹⁹⁾ などでも報告されている。4 時間後の遊離型 B₁ の比率が高かったが、これは飼料の B₁ 量が高いこともあって遊離型 B₁ は活性化されずに肝膵臓にとどまっ

**Fig. 2.** Thiamine concentration in the tissues after 4 weeks.

ていたものと思われる。24時間後の肝膵臓の B₁ 量が4時間値の約1/10でありきわめて低かった現象とは対照的に24時間後の筋肉, 眼球の B₁ 量は4時間値よりも高く, これらのことから, 腸から吸収され肝膵臓へ運ばれた B₁ は肝膵臓にとどまるが, 肝膵臓の B₁ 保留量はコイでは比較的少なく, 過剰の B₁ は肝膵臓よりむしろそれ以外の組織, たとえば筋肉, 眼球などに貯えられるものと思われる。以後組織の B₁ 定量は飼料投与約24時間後に行った。

Table 8. Distribution in the tissues after administration of thiamine.

Time after administration hour	Hepatopancreas		Muscle		Eye	
	Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁ mg/100 g wet tissues	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁
4	2.217	1.155	0.543	0.018	2.524	2.520
24	0.197	0.016	0.772	0.013	2.808	2.808

飼育8週, 12週の組織の B₁ 量を Table 9, 10, Figure 3, 4 に示したが, B₁ 無添加の I 群では4週に続いて8週12週の組織の B₁ 量は更に減少し8週の肝膵臓, 眼球の B₁ 量は飼育はじめの約1/2, 12週には約1/5に減少, 筋肉は8週目に1/10以下に減少した。B₁ 5mg 添加の II 群では肝膵臓, 筋肉, 眼球いずれもわずかながら増加を続け, 飼育はじめと比較すると12週の眼球, 肝膵臓の B₁ 量の増加はわずかであるが, 筋肉の B₁ 量は4倍に増加した。B₁ 過剰食の III 群, IV 群でも, 組織の B₁ 量は増加したが, 8週目の 50mg 添加の III 群と, B₁ 500mg 添加の IV 群の組織の B₁ 量は大体同

Table 9. Thiamine concentration in the tissues after 8 weeks.

Thiamine added mg %	Hepatopancreas		Muscle		Eye	
	Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁ mg/100 g wet tissues	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁
I B ₁ -0	0.047	0.002	0.011	0.002	1.024	1.007
II B ₁ -5	0.116	0.003	0.664	0.009	2.623	2.620
III B ₁ -50	0.245	0.004	1.022	0.016	4.171	4.168
IV B ₁ -500	0.282	0.008	1.138	0.016	4.199	4.190

Table 10. Thiamine concentration in the tissues after 12 weeks.

Thiamine added mg %	Hepatopancreas		Muscle		Eye	
	Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁ mg/100 g wet tissues	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁
I B ₁ -0	0.022	0.001	0.008	0.001	0.378	0.369
II B ₁ -5	0.131	0.004	0.841	0.004	2.891	2.805
III B ₁ -50	0.268	0.009	0.974	0.012	4.194	4.152
IV B ₁ -500	0.279	0.002	1.104	0.019	4.183	4.149

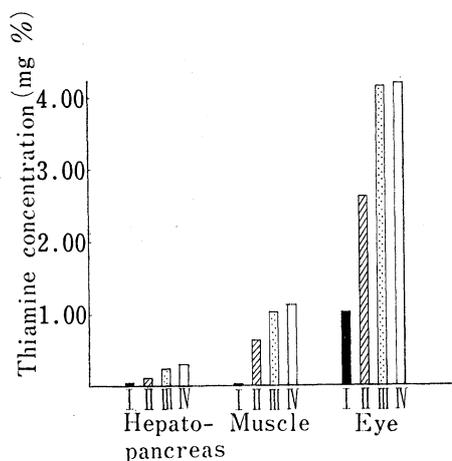


Fig. 3. Thiamine concentration in the tissues after 8 weeks.

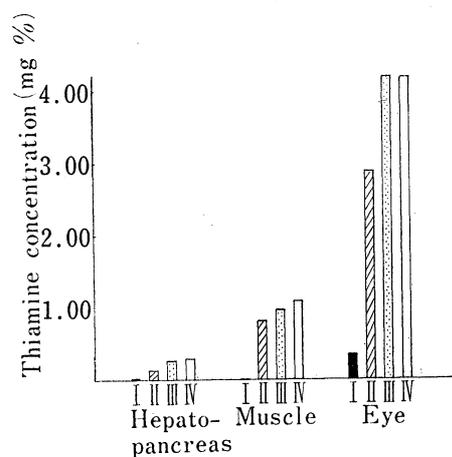
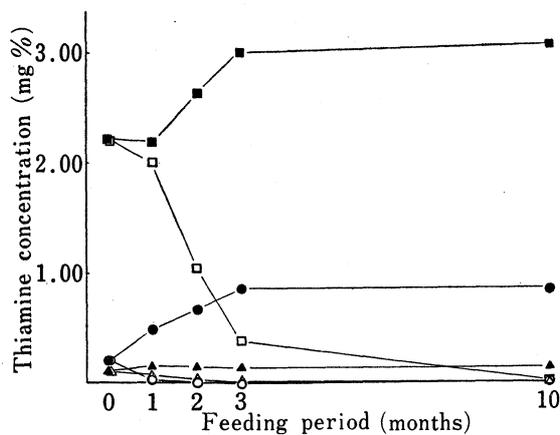


Fig. 4. Thiamine concentration in the tissues after 12 weeks.

じであり、飼育はじめと比較すると、肝膵臓は約2.5倍、筋肉は約5倍、眼球は約2倍の増加であった。12週目はⅢ群、Ⅳ群いずれも組織の B₁ 量の増加はみられず、8週目の B₁ 量と大体同じであり、この時期には B₁ 多量投与の効果は認められなかった。

12週間後、Ⅲ群、Ⅳ群の B₁ 過剰食飼育の組織の B₁ 量は増加に変動がみられなくなったが、B₁ 無添加のⅠ群、B₁ 5mg 添加のⅡ群はその後も組織の B₁ 量の減少あるいは増加が考えられたので引続き継続飼育した。飼育10カ月後の組織の B₁ 量を Table 11 に示したが、B₁ 無添加のⅠ群の B₁ 量は更に減少し眼球の B₁ 量は 0.02mg% でありこれは飼育はじめの眼球の B₁ 量の 1% であった。肝膵臓、筋肉の B₁ 量は12週後と大体同じであった。B₁ 5mg 添加のⅡ群の B₁ 量は12週よりもやや増加したが、増加量は比較的小さく B₁ 5mg 添加食ではこれ以上組織の B₁ 量は増加しないものと考えられる。(Figure 5)



△-△ B₁-0 Hepatopancreas ○-○ B₁-0 Muscle □-□ B₁-0 Eye
▲-▲ B₁-5 Hepatopancreas ●-● B₁-5 Muscle ■-■ B₁-5 Eye

Fig. 5. Thiamine concentration in the tissues.

Table 11. Thiamine concentration in the tissues after 10 months.

Thiamine added mg %	Hepatopancreas		Muscle		Eye	
	Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁	Total B ₁	Free B ₁
I B ₁ -0	0.024	0.001	0.009	0.001	0.026	0.022
II B ₁ -5	0.161	0.003	0.823	0.005	3.024	3.020

考 察

青江らは¹⁴⁾ Halver のビタミン試験飼料の B₁ 無添加食でコイを飼育したが16週間 B₁ 欠乏がみられなかったこと、またアサリ食（アサリの B₁ 分解後、加熱処理しアノイリナーゼを分解したもの）の B₁ 無添加食でマス、コイを飼育した結果、マスは4週目に B₁ 欠乏を起し8週には斃死率80%であったが、コイは8週間 B₁ 欠乏の出現はなく正常に成長したことを報告している。本実験では青江らの Halver 食とカゼイン、デキストリンの組成は異なるがその他はほとんど同じ飼料組成の試験食を用い、同様に B₁ 無添加食でコイを10カ月間飼育したが、食欲は他の3群よりむしろ旺盛であり、皮膚のうっ血など B₁ 欠乏症は認められず、斃死もなく B₁ 添加食群と同じような挙動を示した。B₁ 無添加食群では組織の B₁ 量は顕著に減少し飼育12週には体内 B₁ 量はきわめて微量であった。組織の中では筋肉の B₁ 減少がもっとも大きく、眼球の B₁ も減少するが、肝臓の減少率は小さかった。青江らは¹⁵⁾ コイは B₁ 欠乏症を起しにくいが高炭水化物食では7週目に食欲不振、褪色などの B₁ 欠乏症が出現し、B₁ 欠乏は抗サイアミン剤添加により早められること、また各種ビタミンの最低必要量中、B₁, B₂, ナイアミンの3種のビタミンは最低必要量の数倍添加するとコイの成長は良好であることなどを報告しており²⁰⁾、これらの報告からも B₁ はコイに必須のビタミンであると考えられる。本実験ではコイは10カ月間、B₁ 無添加食に耐え、斃死もなく B₁ 欠乏症もみられず元気に成長したが、これはコイがきわめて微量の B₁ 量で体内需要を充足することが出来るのか、あるいは、試験管内でアノイリナーゼの B₁ 生成が可能であったように、生体内でも最低必要量の B₁ 量は合成されているのか更に検討を加えたい。

B₁ 添加量について Halver はビタミン試験飼料として B₁ 5mg 添加であり、この添加量でもコイは充分成長し組織の B₁ 量も増加するが、12週間の飼育結果から B₁ 50mg 添加のⅢ群は、体重増加量、飼料転換効率は4種類の試験食群の中でもっとも高く、組織の B₁ 量も B₁ 500mg 添加のⅣ群と大体同じであり、B₁ 50mg 添加食はコイにとってより望ましい飼料であると思われる。B₁ 500mg 添加は短期間の飼育には添加効果が認められるが、長期飼育では余り添加効果は期待出来ない。

コイはアノイリナーゼを保有しているが、飼料の B₁ 添加量を増加し、長期間飼育すると組織の B₁ 量は明らかに増加し相当量の B₁ が体内に保留したものである。この現象はネズミでみられた結果²¹⁾と同じような結果であり、一般に B₁ 多量投与では、腸からの吸収量、体内保留量に限界があることを考えると、コイの体内でアノイリナーゼによる B₁ 分解が行われるとは考えられそうにない。

結 論

4種類のビタミン試験食、B₁ 0, 50, 500mg 添加の Halver 試験食でコイを12週間、または10カ月間飼育し組織の B₁ 量を測定し次のような結果を得た。

- (1) B₁ 無添加食群ではコイの体内 B₁ 量は顕著に減少を続け、10カ月飼育後の肝臓、筋肉、眼

球の B₁ 量は 0.01~0.03mg% であり、この量は眼球では飼育はじめの眼球の B₁ 量の 1% にすぎなかった。筋肉の B₁ は比較的飼育はじめに減少し、眼球の B₁ は徐々に減少するが、肝臓の減少率は低かった。

B₁ 無添加食群のコイは10カ月間、他の3種の B₁ 添加食群と同じような挙動を示し、食欲はむしろ旺盛であり、B₁ 欠乏も斃死もみられず、正常に成長した。

- (2) B₁ 添加食では B₁ 50mg 添加食群のコイは体重増加量、飼料転換効率、いずれも4群中、もっとも高く、組織の B₁ 量は B₁ 500mg 添加食群と大体同じであり、B₁ 添加効果が認められた。B₁ 50mg 添加食群の12週飼育後の組織の B₁ 量は飼育はじめと比較して肝臓は約2.5倍、筋肉は約5倍、眼球は約2倍に増加した。

本研究にあたり、御指導賜った鹿児島大学医学部 大保不二夫教授に深く感謝致します。

参 考 文 献

- 1) 藤田秋治, 小塚俊一: 生化学, **22**, 207 (1950).
- 2) 藤田秋治: ビタミン, **7**, 1 (1954).
- 3) Fujita A.: *Adv. in Enzymol.*, **15**, 389 (1954).
- 4) J. L. Wittliff & R. L. Airth: *Methods in Enzymology*, [18A] 229 (1970).
- 5) Magrimas J. A.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**, 409 (1963).
- 6) Fujita A.: *J. Vitaminal.*, **18**, 67 (1972).
- 7) Murata K., Tanaka R.: *J. Nutr. Sci. & Vitaminol.*, **20**, 351 (1974).
- 8) Green. R. G. *Science* **92**, 154 (1940).
- 9) 石原 忠, 保田正人: 日水誌, **38**, 1281 (1972).
- 10) 石原 忠, 保田正人: 日水誌, **40**, 309 (1974).
- 11) 石原 忠, 紀成尚志: 日水誌, **40**, 775 (1974).
- 12) 渡辺 弘: ビタミン1, 91 (1948).
- 13) 佐藤雅子: 鹿大教育学部紀要, **25**, 48 (1974).
- 14) Aoe H., Masuda I., Saito T.: *Bull. J. Soc. Sci. Fish.*, **33**, 970 (1967).
- 15) Aoe H., Masuda I., Mimura T.: *ibid.*, **35**, 459 (1969).
- 16) Fujita A., Nose Y.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 313 (1952).
- 17) J. E. Halver, J. A. Coates: *Prog Fish-Cult.*, **19**, 112 (1957).
- 18) 藤原元典: ビタミン, **9**, 148 (1955).
- 19) 佐藤善重, 高橋忠男: *Radioisotopes.*, **15**, 117 (1966).
- 20) Aoe H., Masuda I.: *Bull. J. Soc. Sci. Fish.*, **37**, 124 (1971).
- 21) 柴田長夫: ビタミン, **3**, 23 (1950).