

## アユ用配合飼料への 自己消化酵母 *Hansenula anomala* の利用

滝井健二<sup>1</sup>, 石丸克也<sup>2</sup>, 吉田幸功<sup>1</sup>, 井上修一<sup>1</sup>, 日高久美<sup>3</sup>, 眞岡孝至<sup>3</sup>, 谷本文男<sup>3</sup>, 敬伏木省三<sup>1</sup>

### Dietary *Hansenula anomala* Autolysate Stimulates Growth and Disease Resistance of Ayu

Kenji TAKII<sup>1</sup>, Katsuya ISHIMARU<sup>2</sup>, Yukinori YOSHIDA<sup>1</sup>, Shuichi INOUE<sup>1</sup>, Kumi HIDAKA<sup>3</sup>, Takashi MAOKA<sup>3</sup>,  
Fumio TANIMOTO and the late Shozoh FUSHIKI

We investigated the effect of dietary yeast *Hansenula anomala* autolysate (Ha) for ayu *Plecoglossus altivelis* growth and disease resistance for streptococciosis infection. Chilean fishmeal diets supplemented with Ha at the levels of 18%, 9% and 3% were given on the fish weighing 35.7 g, 4 times daily, 6 days a week for 70 days. Moreover, consecutive feeding and daily alternative feeding protocols of 3%-Ha diet and/or a control diet 0%-Ha were conducted on the fish weighing 33.0 g for 50 days. Weight gains and feed efficiencies of the fish fed with 9% and 3%-Ha diet were similar and better than those with 18%-Ha and 0%-Ha diets. Peculiar streptococciosis symptoms due to natural infection with *Streptococcus* sp. were observed in the fish with Ha supplemented diets (71~76%), slightly less than the fish on 0%-Ha (85%). The consecutive feeding and daily alternative feeding protocols with 3%-Ha diet induced higher growth rates than the consecutive feeding protocol with 0%-Ha diet. Moreover, the streptococciosis symptoms due to natural infection decreased in the daily alternative feeding protocol (28.6%), followed by consecutive feeding protocols with 0% Ha (45%) and 3%-Ha diets (50%), at the end of the feeding trial. These results suggest that dietary Ha supplement is an useful strategy for improving growth performance as well as disease resistance for *Streptococcus* sp. of ayu

Key words: ayu, yeast autolysate, growth, streptococciosis

食の安全・安心に関する消費者意識が高揚するなかで、魚類の疾病に対しても従来の抗生物質に頼る対処療法から、養成方法の見直しを含めた予防療法への変革を迫られている。これまで、養殖魚の健康維持や生態防御(能)の向上を目的として、多くの飼料添加物の効果が比較検討されており、数種のハーブ (Jian and Wu 2003) や微生物起源のキトサン・マンナン (Han et al. 2005; Feng et al. 2004) など難消化性糖

<sup>1</sup> 近畿大学水産研究所新宮実験場 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Shingu, Wakayama 647-1101, Japan)

<sup>2</sup> 近畿大学水産研究所白浜実験場 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Shirahama, Wakayama 649-2211, Japan)

<sup>3</sup> サン・バイオレクス (Sun Biorex Co. Ltd., Morimoto, Shimogamo, Kyoto 606-0850, Japan)

質の有効性が確認されつつある。ハーブについては病原菌に対する増殖阻止効果が認められているが、難消化性糖質と魚類の生態防御能との関連性については、不明な部分が多く残されている。

そこで本研究では、アユ *Plecoglossus altivelis* の高成長と疾病の予防を目指す養成技術を確立するために、和歌山県内のミカン畑で採取した酵母 *Hansenula anomala* の自己消化物 (Ha) に注目し (Otaka et al. 2002), その飼育成績やレンサ球菌症の予防についての効果を検証しようとした。なお, Ha は 10% *H. anomala* 懸濁液を pH 4~5, 45°C で 27 h インキュベートし, 凍結乾燥したもので, 自己消化率は 15% 前後であった (Takii et al. 2004)。また, *H. anomala* 乾燥粉末はマダイ *Pagrus major* において, タンパク質源として比較的優れていることが報告されているが (秋山ら; 2001, Akiyama et al. 2001), アユに対する添加効果は検討されていない。

## 材料および方法

### 試験飼料

Table 1 に試験飼料の組成を示す。Ha 無配合の飼料 Ha-0 は対照飼料で, タンパク質源としてチリミールおよび小麦グルテンを, 脂質源にスケトウダラ肝油を, 糖質源に  $\alpha$ -馬鈴薯デンプンをそれぞれ配合した。また, 飼料 Ha-18, Ha-9 および Ha-3 には Ha を 18%, 9% および 3% 配合した。Ha 配合による飼料組成の過不足はチリミール, 小麦グルテンおよび  $\alpha$ -馬鈴薯デンプンなどで置換えた。なお, スケトウダラ肝油, Halver 処方 のビタミン・ミネラル混合物 (Halver 1957) はいずれも共通して配合し, Ha-0 および Ha-3 にはさらにセルロースを配合した。各原料を秤量し均質になるまで混合した後, 外割で 30% 水道水

Table 1. Dietary formula and proximate composition (%) of ayu in the present study

	Ha-0	Ha-18	Ha-9	Ha-3
<i>Hansenula anomala</i> autolysate* <sup>1</sup> (Ha)	-	18	9	3
Chilian fish meal	62	50	56	62
Wheat gluten	9	8	8	8
Pollack liver oil	5	5	5	5
$\alpha$ -Potato starch	12	9	10	12
Vitamin mixture* <sup>2</sup>	5	5	5	5
Mineral mixture* <sup>2</sup>	5	5	5	5
Cellulose	2	-	2	-
Proximate composition				
Crude protein	54.0	53.8	53.1	54.1
Crude lipid	11.3	11.2	12.0	11.5
Reducing sugar	15.2	17.1	15.8	16.7
Crude ash	13.6	13.3	13.3	14.2

\*<sup>1</sup> Autolysis was conducted at 45°C, pH 4-5 for 27h.

\*<sup>2</sup> Halver (1957).

滝井, 石丸, 吉田, 井上, 日高, 眞岡, 谷本, 伏木: アユ飼料への自己消化酵母 *Hansenula a.* の利用

を加えて練り合わせ, 試験用造粒機で直径 1.2 mm のペレットに調製し凍結乾燥した。これら飼料の粗タンパク質, 粗脂質, 還元糖および粗灰分含量に顕著な差異はなく, それぞれ 54, 12, 16 および 14%前後であった。

## 供試魚, 飼育方法および分析方法

### 試験 1

近畿大学水産研究所新宮実験場で種苗生産した平均体重 35.7 g の海産系アユを, 1.5 m<sup>3</sup> 容円型 FRP 水槽にそれぞれ 220 尾ずつ収容して 4 試験区を設けた。各試験区には所定の試験飼料を 1 日 4 回 (08:00, 10:00, 13:00 および 15:00), 1 週間に 6 日飽食給与して 10 週間飼育した。給餌に際しては残餌をださないうような細心の注意を払った。また, 各水槽へは河川水を 43 L/min で注水し, 室内の照明は蛍光灯で 12L:12D に調節した。平均水温は 18.0±1.50°C (SD) であった。

飼育期間中は 2 週間毎に体重測定を実施するとともに, 開始および終了時には必要尾数を取上げて, 全魚体と肝臓の一般成分と消化器官重量を測定した。さらに, 終了時にはレンサ球菌症の症状の有無を個体ごとに調べ発症率を求めた。

飼料, 魚体および肝臓の水分, 粗タンパク質, 粗脂質および粗灰分含量は AOAC 法 (AOAC 1984) によった。また, それらの還元糖含量はフェノール・硫酸法 (Hodge and Hofreiter 1962) で測定した。

### 試験 2

近畿大学水産研究所新宮実験場で種苗生産した平均体重 33 g の海産アユを, 50 尾ずつ 1.5 m<sup>3</sup> 容円型 FRP 水槽に収容して 3 試験区を設け, Ha-0 および Ha-3 の連続投与区 (Ha-0 および Ha-3), そして Ha-0 と Ha-3 を毎日交互に与える交互投与区 (Ha-3,0) を設け, 所定の飼料を 1 日 4 回, 1 週間に 6 日飽食給与して 12 週間飼育した。他の飼育条件は試験 1 に準じた。なお, 終了時には *Streptococcus* sp. によるレンサ球菌症の発症率とともに, 白血球の貪食率, リゾチーム活性および溶血補体価を, 改良ポンドサイドキットマニュアル (日本資源保護協会 1998) および矢野ら (1988) に準じて測定した。平均水温は 18.0±2.17°C であった。

## 統計処理

各区の体重および消化器官重について, 一元分散分析で処理による有意差を検定した後 ( $P<0.05$ ), 平均値の差異を Duncan の多重範囲検定法 (Harter 1960) で有意差判定を行なった ( $P<0.05$ )。

## 結果および考察

### 試験 1

Table 2 に飼育成績, 終了時における消化器官重および全魚体と肝臓の一般成分を示す。終了時における平均体重は Ha-3 区が最も重く, ついで Ha-9, Ha-0 および Ha-18 区の順に低下し, Ha-3 と Ha-18 区間に有意差が認められた。生残率は Ha-0 と Ha-9 区で 75%, Ha-18 と Ha-3 区で 70% と若干低かった。日間給餌率は Ha-18, Ha-0, Ha-3 および Ha-9 区の順に低下したが, 日間成長率には日間給餌率と逆の順位がみられたことから, 飼料効率とタンパク質効率は, Ha-9 および Ha-3 区が対照の Ha-0 より優れて

**Table 2.** Growth performance, digestive organ weight and proximate composition of carcass and liver of ayu fed on Ha-0, 18, 9 and 3 diets for 70 days

	Ha-0	Ha-18	Ha-9	Ha-3
Mean body weight (g)				
initial	36.2	36.1	34.8	36.4
final	59.9 <sup>ab*</sup>	53.2 <sup>b</sup>	60.5 <sup>a</sup>	62.6 <sup>a</sup>
Survival (%)	75.1	70.3	74.8	70.0
Daily feed intake (%)	1.23	1.33	1.12	1.21
Daily gain (%)	0.70	0.55	0.77	0.76
Feed efficiency (%)	57.2	41.1	68.7	62.5
Protein efficiency ratio	0.91	0.63	1.15	1.07
Final digestive organ weight (%)				
stomach	1.22 <sup>a</sup>	0.96 <sup>b</sup>	0.84 <sup>b</sup>	1.04 <sup>ab</sup>
intestine with pyloric ceaca	3.64 <sup>a</sup>	2.63 <sup>b</sup>	2.85 <sup>b</sup>	2.85 <sup>b</sup>
Final carcass composition (%)				
moisture	70.3	74.9	71.5	73.2
crude protein	12.2	12.0	12.8	12.7
crude lipid	11.9	10.3	12.1	10.6
crude ash	2.7	2.4	2.6	2.2
Final liver composition (%)				
moisture	76.7	76.6	75.2	74.8
crude protein	18.0	19.3	17.1	18.1
crude lipid	2.6	1.0	2.1	2.3
crude ash	1.6	1.6	1.6	1.7

\* The same superscript in a row indicates no significant difference ( $P < 0.05$ ).

いた。しかし、Ha-18 区の飼育成績は最も劣っていた。

体重に対する胃重量および幽門垂を含む腸重量比、すなわち、比胃重および比腸重値についてみると、両項目とも全体的に Ha 添加区が Ha-0 区より有意に低かった。

全魚体および肝臓の一般成分は、Ha-18 区で肝臓の脂質含量が他の区に比べて有意に低かったことを除いて、水分、粗タンパク質、粗脂質および粗灰分含量に区間差は認められなかった。

終了時におけるレンサ球菌症発症率を Fig. 1 に示す。本疾病は終了 10 日前ごろから自然発症し、口唇、鰭基部、体側および尾柄に糜爛、潰瘍、出血などの症状を呈した。Ha-0 区の発症率は 85%であったが、Ha-18、-9 および-3 では 76%以下で低い傾向にあった。

Ha-9 および Ha-3 区の飼育成績は対照の Ha-0 区より優れていたが、Ha-18 区では他の区に比べて劣っていた。アユは付着藍藻や珪藻を摂取するので(落合・田中 1986)、細胞膜に難消化性糖質を含む酵母でも十分に利用できる可能性を推察したが、Ha を多量(18%)に配合すると飼育成績は低下し、少量(9 および 3%) 配合では飼育成績の向上する傾向がみられた。酵母細胞壁にはキチン、キトサン、マンナンなど難消化性糖質の含まれることが一般的に知られている。Ha の必須アミノ酸バランスは大豆粕に比べ

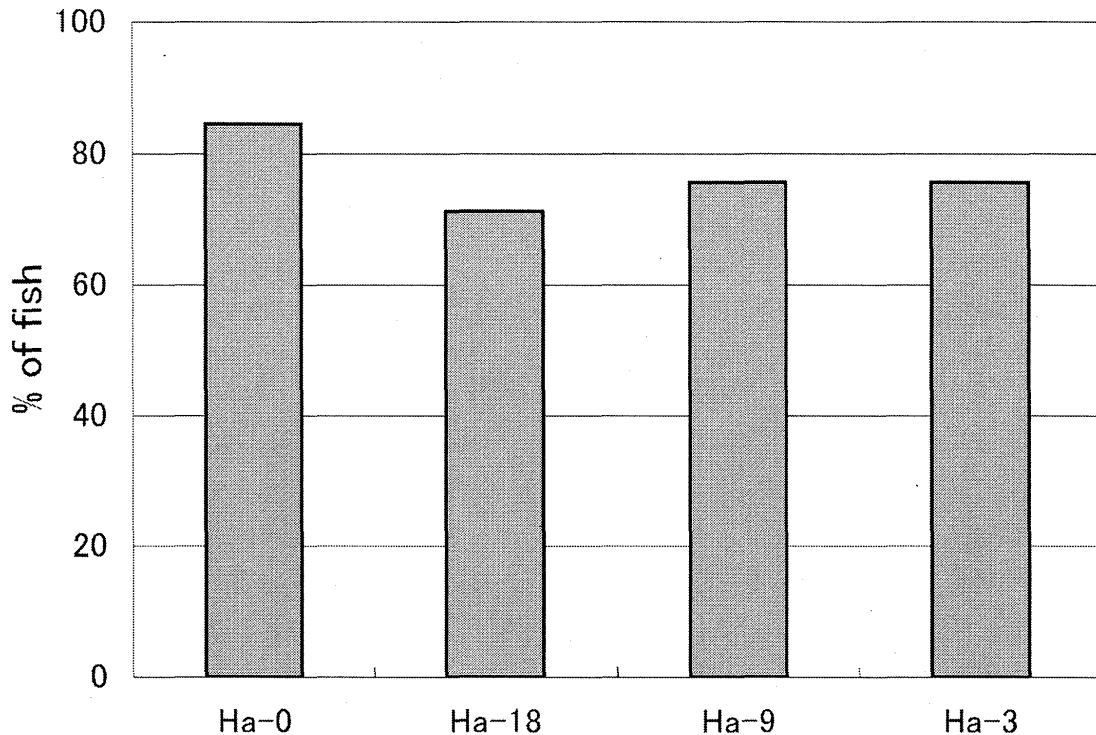


Fig. 1. Streptococciosis outbreak (%) of fish fed on Ha-0, 18, 9 and 3 diets for 70 days.

優れていることから(秋山ら;2001), Ha 多量投与はこれら糖質による消化吸収阻害につながったものと考えられる。一方, Ha の少量投与は, おそらく, 難消化性糖質による適度な粘性と消化管への刺激が, 胃から腸への食塊の移行量の調節や消化酵素の分泌を亢進し, 消化吸収や成長を促進したのであろう。比腸重値が H-0 区より各 Ha 添加区で有意に低かったこともこの仮説を支持する。示野ら(1993)はブリにおける配合飼料の消化過程について検討し, 配合飼料区では生餌区に比べて, 摂餌後の比較的早い時間から胃から腸への食塊の移行量が増大するため, 腸での消化吸収を高く維持するため, 幽門垂を含む腸組織が肥大することを示した。宇川ら(1995)も消化の劣る大豆粕を飼料に配合すると, マダイの体重に対する比腸重値が増大することを報告している。

## 試験 2

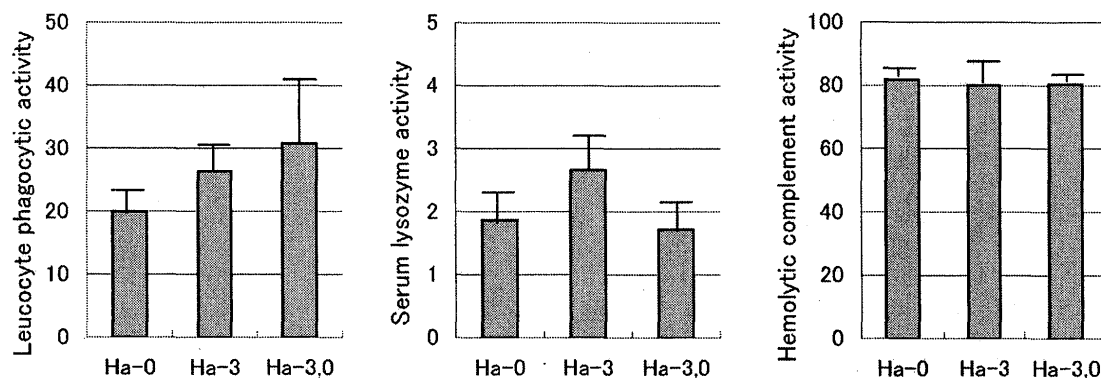
先の試験 1 から, Ha の少量添加が成長促進および生体防御能を高める可能性が示唆されたので, 試験 2 では Ha-3 飼料を用いて生体防御能を高める給餌方法を検討した。

Table 3 に飼育成績を示す。終了時における平均体重は Ha-3 および Ha-3,0 区が対照の Ha-0 区より大きく, 試験 1 の結果を再確認した。また, 飼料効率は Ha-3,0 区が 67%, Ha-0 および Ha-3,0 区でも 57% で, 試験 1 の値と大きな差異はなかった。一方, 飼育終了時の約 2 週間前から試験 1 と同様にレンサ球菌症が自然発症し, Ha-3 区では生残率が 46% と低下し, Ha-0 および Ha-3,0 区でも 70% で全体的に低かった。飼料効率は Ha-3,0 区が Ha-0 および Ha-3 区より高かった。

Fig. 2 に終了時におけるレンサ球菌症の発症率と, 各区の白血球の貪食率, 血漿のリゾチーム活性および溶血補体価(相対値)を示す。Ha-3 区では生残率は低くかつ発症率は最も高かった。Ha-0 の生残率は Ha-3,0 区とほぼ同等であったが, Ha-3,0 区の発症率は低かった。終了時に測定した貪食率では Ha-3,0 区が, リゾチーム活性は Ha-3 区が高かったが, 溶血補体価に区間差は認められなかった。

**Table 3.** Growth performance and streptococciosis outbreak of ayu fed on Ha-0 and Ha-3 consecutively and alternatively (Ha-3,0) for 50 days

	Ha-0	Ha-3	Ha-3,0
Mean body weight (g)			
initial	32.9	33.1	33.0
final	57.4	68.0	63.2
Survival (%)	70	46	68
Outbreak of streptococciosis (%)	45.2	50.0	28.6



**Fig. 2.** Leucocyte phagocytic activity, serum lysozyme activity and hemolytic complement activity of fish fed on Ha-0 and Ha-3 consecutively and alternatively (Ha-3,0) for 50 days.

Ha-3区ではHa-0区に比べて飼料効率に差異はなく、先の試験1と異なる結果が得られた。これは他の区に比べて比較的早い時期からレンサ球菌症の発症がみられ、斃死魚が増加し摂餌量が低下したことに起因する。Iguchi et al. (2003) は水温 13~21℃で異なる飼育密度のもとでアユを 28 日間飼育したところ、高密度飼育 (8.0 kg/m<sup>3</sup>) では冷水病の自然感染による斃死率が 50% 近くにまで達したが、中密度 (2.6 kg/m<sup>3</sup>) および低密度 (0.6 kg/m<sup>3</sup>) でも 20% であることを示した。本研究における飼育密度は開始時で 1.1 kg/m<sup>3</sup>、終了時で 1.5 kg/m<sup>3</sup> と低かった。しかし、Iguchi et al. (2003) は 2.5 m<sup>3</sup> 容の角型水槽を用いたのに対して、本研究では 1.5 m<sup>3</sup> 容の円型水槽を用いた。病原菌の違いによって斃死率に差異はあるが、今後はより大型の水槽で試験を実施する必要がある。

難消化性糖質はヒトや陸上哺乳類の腸免疫グロブリン A (IgA) の産生・分泌を促進し、生態防御機能の向上に寄与することが報告されている。さらに、特定の微生物がプロバイオティクスとしてアレルギーの抑制効果や、腸内フローラの制御を介して免疫系に影響を及ぼすことや、多糖類が腸管免疫系を解して NK 活性を増強することも知られている (八村 2005)。Ha-3,0 区の低い斃死率とレンサ球菌症の発症率は、白血球の貪食率が高く維持されていたことに基づくと考えられるが、免疫グロブリン IgM も関与していた可能性が推察される。Iguchi et al. (2003) はアユ冷水病の感染と血漿 IgM 含量との関係について検討し、斃死率と IgM 含量は逆の相関関係にあることをすでに報告している。一方、微生物起源の多糖類を魚類の免疫賦活剤として利用する場合は、連続投与より数日あるいは 1 週間隔で交互投与するのが効果的かつ一般的である。本研究によって、Ha-3 および Ha-0 飼料を 1 日毎に交互に給与することにより、レンサ球菌症に対する防御機能の向上が認められた。今後は、さらに効果的な投与方法について検討する必要がある。

## 要 約

飼料への自己消化酵母 *Hansenula anomala* (Ha) の添加が, アユの飼育成績やレンサ球菌症の自然発症率に及ぼす効果について調べた。チリ魚粉をタンパク質源とした飼料に, Ha を 18, 9 および 3% 配合した飼料 (Ha-18, -9 および -3) を, 体重 35.7 g のアユに 1 日 4 回, 1 週間に 6 日飽食給与して 12 週間飼育したところ, Ha-9 および Ha-3 区の成長および飼育成績は, 対照の Ha 無配合飼料区 (Ha-0) や Ha-18 区より優れていた。また, 終了時におけるレンサ球菌症の発症率は, Ha 配合区が Ha-0 区より僅かに低かった。ついで, レンサ球菌症の発症を抑えるための, Ha-3 飼料の効果的な給餌法を検討するため, 平均体重 33.0 g のアユに Ha-0 および Ha-3 をそれぞれ連続給与する区, Ha-3 と Ha-0 を毎日交互に給与する (Ha-3,0) 区などを設けて 10 週間飼育したところ, 増重率は Ha-3 給与によって向上し, 発症率は Ha-3,0 区で 28.6% で低く, Ha-0 区の 45%, Ha-3 区の 50% の順に増加した。以上の結果から, 飼料の Ha 添加は成長促進だけでなく, レンサ球菌の感染防御にも効果のあることが示唆された。

## 謝 辞

本研究を実施するのに当たって, 近畿大学水産研究所新宮実験場の清水寿一技術係長, 山本慎一技術主任および仲 和弘技術員には, 飼育試験の実施や分析に多大のご助力を賜った。これらの方々に衷心より謝意を表します。

## 文献

- 秋山真一・滝井健二・眞岡孝至・中川雅雄・北野尚男・熊井英水 (2001a). 酵母タンパク質に対するマダインの嗜好性と利用性. *水産増殖* 49, 47-52.
- Akiyama, S., K. Takii, T. Maoka, K. Otaka, Y. Sano and H. Kumai (2001b). Dietary yeast protein, *Candida utilis* rather than *Rhodotorula glutinis*, sustains growth performance of juvenile red sea bream. *Suisanzoshoku* 49, 219-224.
- A.O.A.C. (1984). Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 14th edition, Arlington, VA., p. 1141.
- Feng, J., L. Zhao and Q. Yu (2004). Receptor-mediated stimulatory effect of oligochitosan in macrophages. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 317, 414-420.
- 八村敏志 (2005). 食品と免疫・接点としての腸管免疫系を中心に. *化学と生物* 43, 509-515.
- Halver, J.E. (1957). Nutrition of salmonid fishes III. Water-soluble vitamin requirements of chinook salmon. *J. Nut.* 62, 225-243.
- Han, Y., L. Zhao, Z. Yu, J. Feng and Q. Yu (2005). Role of mannose receptor in oligochitosan-mediated stimulation of macrophage function. *Internat. Immunopharmacol.* 5, 1533-1542.
- Harter, H.L. (1960). Critical values for Duncan's new multiple range tests. *Biometrics* 16, 671-685.
- Hodge, J.E. and B.T. Hofreiter (1962). Determination of reducing sugars and carbohydrates. In "Methods in Carbohydrate Chemistry, Vol. 1", (ed. by R.L. Whistler and L.M. Wolfrom), Academic Press, New York, pp. 388-389.

- Iguchi, K., K. Ogawa, M. Nagae and F. Ito (2003). The influence of rearing density on stress response and disease susceptibility of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Aquaculture* 220, 515-523.
- Jian, J. and Z. Wu(2003). Effect of traditional Chinese medicine on nonspecific immunity and disease resistance of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. *Aquaculture* 218, 日本水産資源保護協会 (1998). 改良ポンドサイドキットマニュアル平成9年度版.
- 落合 明・田中 克 (1986). 魚類学 (下), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 465-488.
- Otaka, K., K. Hidaka, A. Nakajima and T. Maoka (2002). Characterization and application of sugar components produced by autolysis of *Hansenula anomala* SB1020. *J. Biol. Macromol.* 2, 64-74.
- 示野貞夫・竹田正彦・滝井健二・小野俊和 (1994). ブリ幼魚における生餌および配合飼料の消化と血漿化学成分. 日本水産学会誌 59, 507-513.
- Takii, K., S. Akiyama, T. Maoka, K. Hidaka, K. Otaka, M. Seoka and H. Kumai (2004). Evaluation of dietary yeast autolysates for red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku* 52, 387-394.
- 宇川正治・滝井健二・中村元二・熊井英水 (1996). トラフグ用シングルモイストペレットに対する大豆油粕の利用. 水産増殖 44, 217-223.
- 矢野友紀, 畑山幸宏, 松山博子, 中尾実樹 (1988), 主要養殖魚の補体代替経路活性の測定法について. 日本水産学会誌 54, 1049-1054.