

トラフグ, マダイおよびブリに対する糖負荷試験

滝井健二・黒川晶永・中村元二・熊井英水

Glucose Tolerance Test for Tiger Puffer, Red Sea Bream, and Yellowtail

Kenji TAKII*¹, Akinori KUROKAWA*¹, Motoji NAKAMURA*^{1*2}, and Hidemi KUMAI*¹

Glucose tolerance test (GTT) was conducted on tiger puffer, *Takifugu rubripes*, weighing 102 g, red sea bream, *Pagrus major*, weighing 101 g, and yellowtail, *Seriola quinqueradiata*, weighing 268 g. The GTT fishes were intraperitoneally injected 167mg glucose in 0.9% NaCl solution/100 g body weight, and control fishes were done only 0.9% NaCl solution. Mean water temperature and DO were 26.0°C and 5.7 mg/l. Blood glucose of GTT fishes rapidly rose and reached a peak at 3 h after injections (AI), and then fell to the levels immediately before GTT at 24 h AI, opposite to control fishes remaining low and constant levels. Blood glucose peaks of GTT yellowtail, red sea bream, and tiger puffer were respectively 670, 500, and 360mg/100ml at 3 h AI. Hepatic phosphofructokinase and fructose-1,6-bisphosphatase activities did not differ significantly between GTT and control fishes. Hepatic glycogen contents of GTT tiger puffer and red sea bream rose and showed a higher trend than their controls after injection. Hepatic glycogen contents of GTT and control yellowtail showed no difference and slightly fell after injections. The present results using GTT indicate that tiger puffer have more excellent sugar utility than red sea bream and yellowtail.

Key words: tiger puffer, red sea bream, yellowtail, glucose tolerance test (GTT)

陸上ほ乳類と同様に魚類においても糖は必須栄養素ではないが、安価で比較的豊富なエネルギー源であり、しかも、一部の多糖類はバインダーとして優れた特性を持つことから、飼料へ適当量を配合すると成長や飼育成績の向上することが知られている^{1,2)}。これまで、代表的な養殖魚であるコイ *Cyprinus carpio*^{3,4)}、Channel catfish *Ictalurus punctatus*⁵⁾、マダイ *Pagrus major*^{3,4)}、ブリ *Seriola quinqueradiata*^{3,4)}、ニジマス *Oncorhynchus mykiss*⁶⁾などで糖利用能に関する詳細な検討がなされ、いずれの魚種でも糖負荷試験 (Glucose tolerance test ; GTT) における最高血糖値は高く、血糖値の低下に長時間を要すること、また、糖負荷後における肝 (臍) 臓の解糖系酵素活性や血中のインスリン濃度が低く維持される傾向にあったことから、魚類はインスリン不足

*¹ 浦神実験場 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Urugami, Wakayama 649-5145, Japan)

*² 現所属 : 中辺路研究分室 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Nakahechi, Wakayama 646-1402, Japan)

に基づくヒトの糖尿病的体質に類似することが示唆されている⁴⁾。特に、肉食性に分類されるマダイやブリの糖利用能は著しく低く、飼育試験で明らかにされた飼料の至適糖質含量は^{3,4)} 15 および 10%以下であり、陸上ほ乳類の rat の 60%⁷⁾ に比べてかなり低い。しかし、今後の有望な養殖対象魚種の一つであるトラフグの糖利用能については、飼育試験で飼料の至適糖質含量が 20%前後であることが示されただけで⁸⁾、生理および代謝機構からの詳細な検討は殆ど行われていない。そこで、本研究ではトラフグに GTT を実施して血糖値や肝臓の糖代謝酵素活性およびグリコーゲン含量の変化について検討し、併せて行ったマダイやブリにおけるそれらの値と比較して、トラフグの優れた糖利用能を確認しようとした。

材料および方法

供試魚および糖負荷試験 供試魚には本学水産養殖種苗センター浦神事業場で種苗生産した平均体重 102, 101 および 268 g のトラフグ、マダイおよびブリ稚魚を用いた。これらの供試魚をそれぞれ 3 m³容円形水槽に 30~35 尾ずつ収容し、市販の配合飼料（糖質含量 17%；丸紅飼料株式会社製）を 1 日 2 回飽食給与して 7 日間の予備飼育を行った。予備飼育を終了してから 24 時間絶食させた後、2-フェノキシエタノールで麻酔して魚体重を個体毎に測定し、GTT 区にはグルコースを 167 mg/100 g 体重⁴⁾ になるようにシリンジを用いて腹腔内に投与した。なお、グルコースは予め 0.9% NaCl に溶解して用いた。対照区には 0.9% NaCl のみを同様にして投与した。投与 0, 1, 3, 6, 12 および 24 時間後には、GTT および対照区からそれぞれ無作為に 5 尾ずつ取り上げて、尾柄部よりシリンジを用いて採血し、血糖値や肝（臓）の糖代謝酵素活性とグリコーゲン含量を測定した。なお、予備飼育および試験期間中の平均水温および DO (n =10) はそれぞれ 26.0±0.6℃および 5.7±0.9 mg/l であった。

分析方法 採血は尾動脈よりヘパリン処理したシリンジで行った。血糖値は市販のキット（和光純薬工業社製、Glucose CII-Test Wako）を用いて測定した。また、肝（臓）の一部を 5 倍量 (v/w) の氷冷脱イオン水とともに 2 分間 3,000rpm でホモジナイズし、そのホモジネートを 12,000×g で遠心分離して得た上澄部を酵素液として、ホスホフルクトキナーゼ (PFK, EC 2.7.1.11) およびフルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ (FBPase, EC 3.1.3.11) 活性を Nagashima *et al.*^{9,10)} の方法で測定した。なお、酵素タンパク量は Lowry 法¹¹⁾ によって分析した。また、残った肝（臓）を用いてグリコーゲン含量を Anthrone 法¹²⁾ によって測定した。

結果

血糖値 GTT によるトラフグ、マダイおよびブリの血糖値の変化を Fig. 1 に示した。GTT 直前、すなわちグルコース負荷 0 時間後におけるブリの血糖値は 112 mg/100 ml であり、マダイおよびトラフグの 40 mg/100 ml 前後より高かった。血糖値はいずれの魚種でも糖負荷後に急激に上昇し、3 時間後にはトラフグ、マダイおよびブリで、それぞれ 360, 500 および 670 mg/100 ml のピークに達した。その後は大きく低下して 12 あるいは 24 時間後に 0 時間後のレベルにまで低

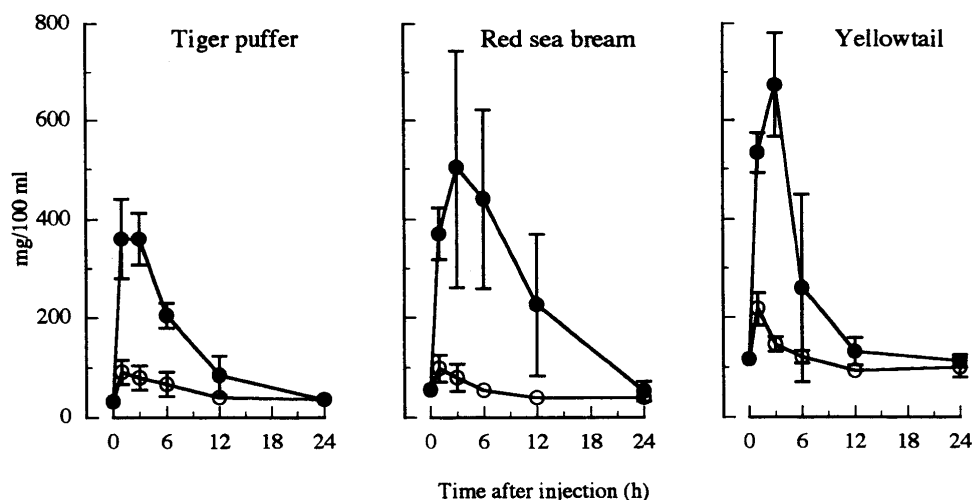


Fig. 1. Blood glucose levels of fishes after intraperitoneal injection of 167 mg glucose/100 g body weight (GTT; ●) and 0.9% NaCl solution (Control; ○). Vertical bar indicates SD (n=5).

下した。一方、生理食塩水を投与した対照区の血糖値は、いずれの魚種でも1時間後に僅かに上昇しただけで、6時間後まではGTT区に比べて著しく低く推移した。しかし、ブリのGTTおよび対照区の血糖値は、いずれの時間でもトラフグおよびマダイより高値を維持した。

肝(膵)臓のPFKおよびFBPase活性 GTTによるトラフグ、マダイおよびブリのPFK活性の変化をFig. 2に示した。なお、活性は反応条件下で1分間に $1\mu\text{mole}$ のNADHが酸化される速度を1 unitと定義し、体重100g当たりの全活性、組織1g当たりおよび酵素タンパク1mg当たりの比活性で示した。グルコース負荷後における各魚種のPFK活性には、いずれの活性表示法でも大きな変化は認められなかった。また、各魚種のGTTおよび対照区における区間差についてみると、負荷6時間後におけるブリGTT区が有意に低下したことを除いて、糖負荷に基づくと考えられる有意差や一定の傾向は得られなかった。

GTTによるトラフグ、マダイおよびブリのFBPase活性の変化をFig. 3に示した。なお、活性は反応条件下で1分間に $1\mu\text{mole}$ のNADが還元される速度を1 unitと定義し、体重100g当たりの全活性、組織1g当たりおよび酵素タンパク1mg当たりの比活性で示した。糖負荷後におけるFBPase活性は先のPFK活性と同様に、いずれの魚種および活性表示法でも大きな変化は認められず、糖負荷に基づくと考えられる有意な区間差や一定の傾向は得られなかった。

肝(膵)臓のグリコーゲン含量 GTTによるトラフグ、マダイおよびブリの肝(膵)臓グリコーゲン含量の変化をFig. 4に示した。なお、グリコーゲン含量は体重100g当たりに換算して表示した。負荷直前におけるグリコーゲン含量はトラフグで400 mg/100gと最も高く、マダイおよびブリではそれぞれ250および100 mg/100gと低かった。糖負荷後においてトラフグおよびマダイでは経時的に上昇してそれぞれ800および350 mg/100gにまでに達したが、ブリでは負荷後減少して30 mg/100gにまで低下した。しかし、いずれの魚種でもGTTおよび対照区との間に有意差は認められなかった。

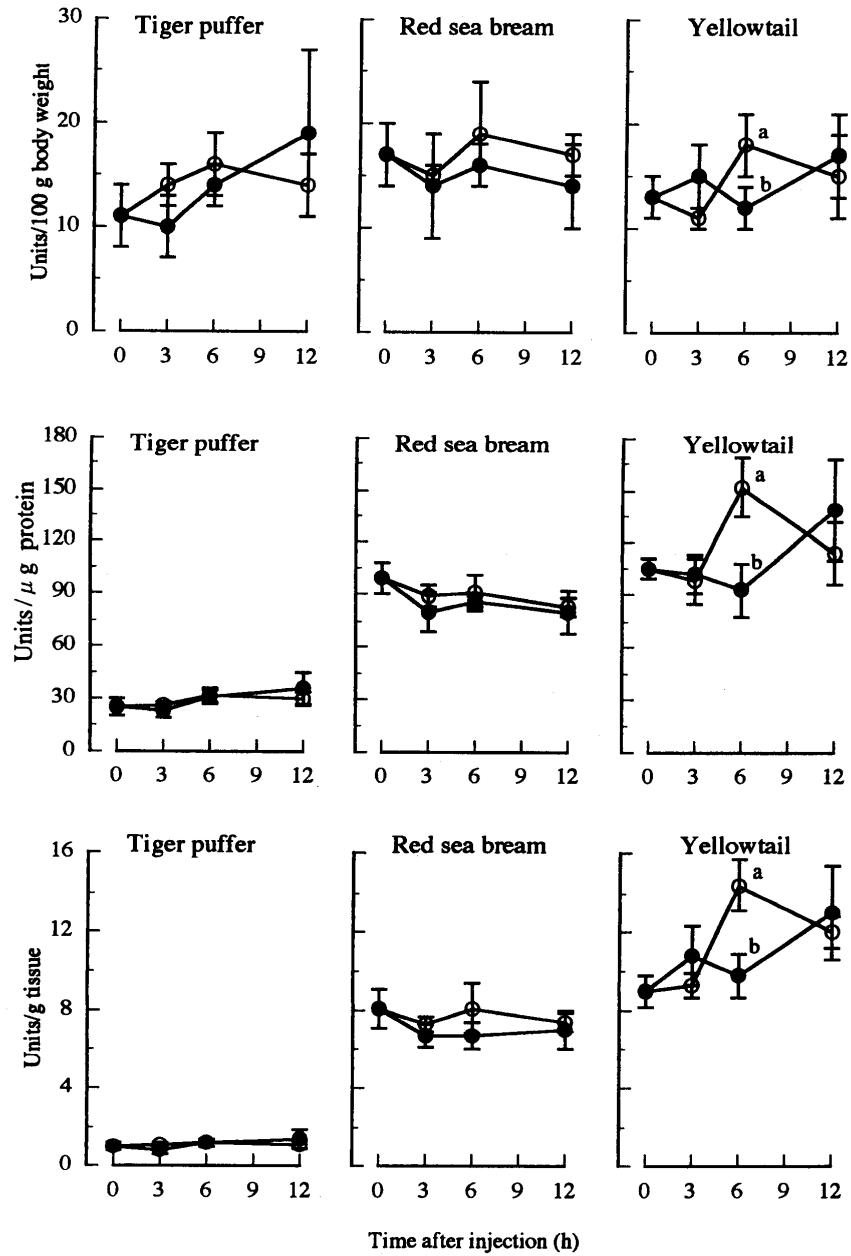


Fig. 2. Hepatic phosphofructokinase activities of fishes after intraperitoneal injection of 167 mg glucose/100 g body weight (GTT; ●) and 0.9% NaCl solution (Control; ○). Vertical bar indicates SD (n=3). * Different letters of symbols indicate significant difference between them (P<0.05), by Duncan's Multiple Range Tests¹⁴⁾.

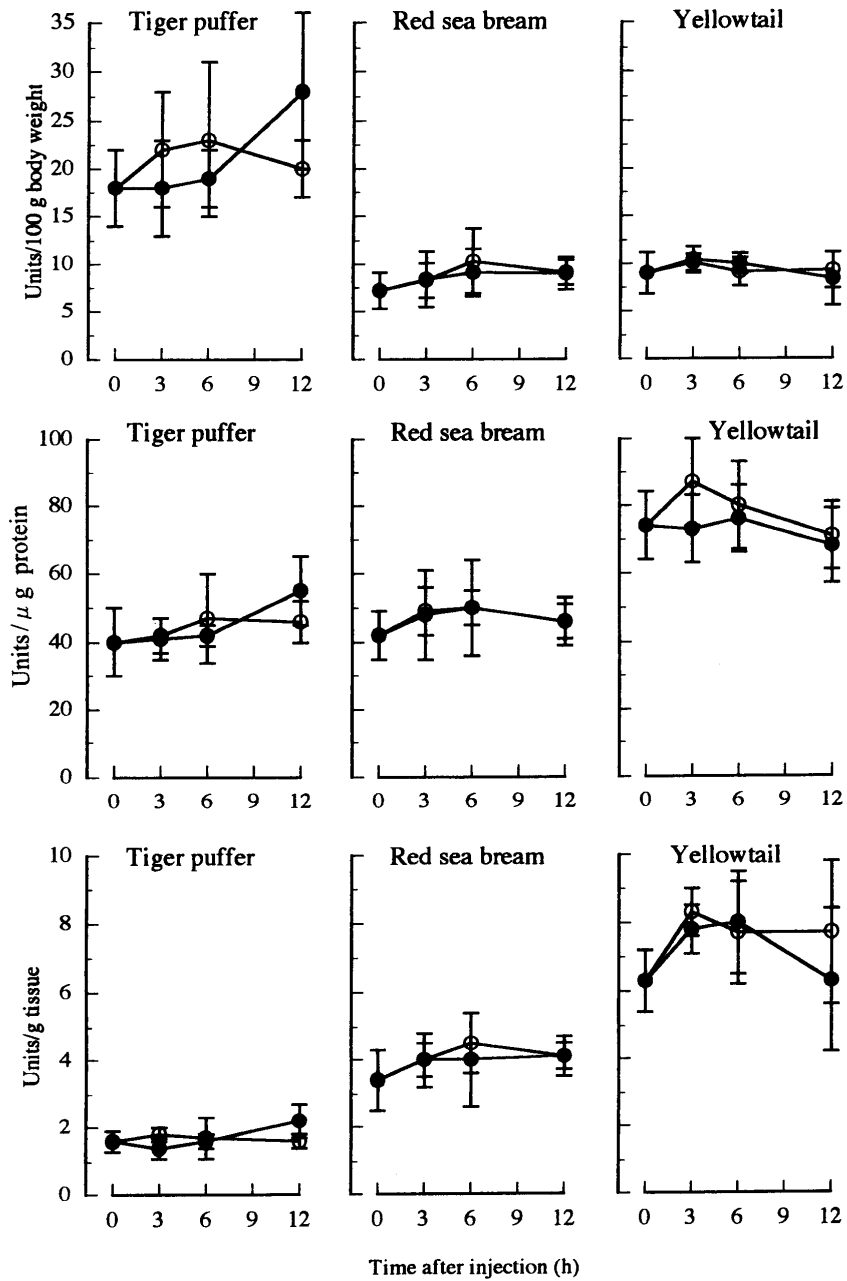


Fig. 3. Hepatic fructose-1, 6-bisphosphatase activities of fishes after intraperitoneal injection of 167 mg glucose/100 g body weight (GTT; ●) and 0.9% NaCl solution (Control; ○). Vertical bar indicates SD (n=3).

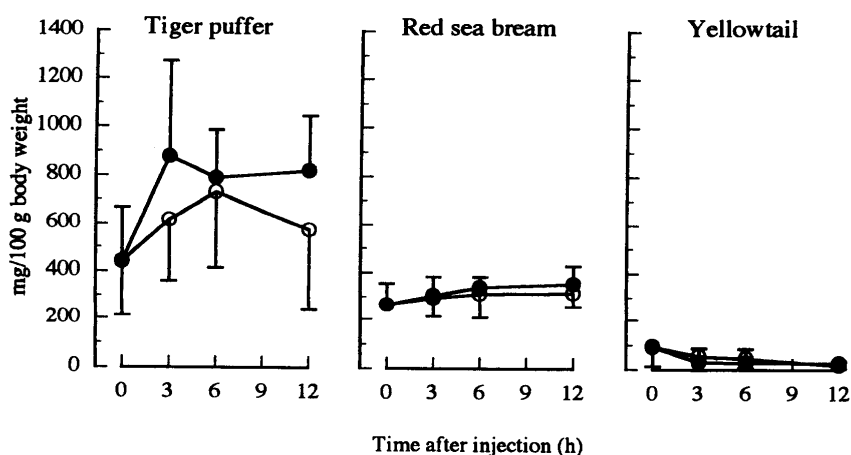


Fig. 4. Hepatic glycogen contents of fishes after intraperitoneal injection of 167 mg glucose/100 g body weight (GTT; ●) and 0.9% NaCl solution (Control; ○). Vertical bar indicates SD (n=3).

考 察

いずれの魚種においても予備飼育時および試験期間中に斃死魚や異常魚は全く観察されなかった。予備飼育時には各魚種に共通して糖質含量が14%の配合飼料を給与した。ブリ用配合飼料の至適糖質含量は10%かそれ以下であるので³⁾、ブリに対して若干高い糖質含量の飼料を給与したことになる。しかし、予備飼育期間が比較的短く異常魚も認められなかったことから、高糖質飼料による影響は小さかったものと考えられる。

本研究ではGTTを確実にを行うために、グルコース(167 mg/100 g 体重)⁴⁾を0.9% NaClに溶解しシリンジを用いて腹腔内に強制投与した。いずれの魚種でも糖負荷後の最高血糖値は3時間後に認められ、ブリでは700 mg/100 ml前後で最も高く、次いでマダイおよびトラフグの500および350 mg/100 mlの順に低下した。これまでの経口投与⁴⁾に比べて血糖値が大きく上昇したのは、麻酔やハンドリングによるストレスにも関与すると考えられるが、主にはグルコースの負荷方法の違いに起因すると推察される。Furuichi⁴⁾はデキストリンを0, 10および40%配合した飼料で30日間飼育したコイ、マダイおよびブリに、経口投与方法によってGTTを実施したところ、糖負荷後の最高血糖値はいずれの魚種および飼料区でも200 mg/100 ml前後と差異はなかったが、最高血糖値に達する時間に違いが認められ、コイが負荷1時間後と最も早く、次いでマダイおよびブリがそれぞれ負荷2および3時間後であった。また、飼育試験からも糖利用能はコイが高く、マダイおよびブリの順に低下することを示した。示野³⁾もコイおよびブリの糖利用能について生化学および栄養学的な検討を行い、ブリの糖利用能はコイに比べて著しく低いことを報告するとともに、ブリでは飼料糖質含量の高い飼料を与えると、摂餌後における最高血糖値も上昇することを示した。これらの知見を踏まえて考えると、本研究で得られた糖負荷後における最高血糖値の魚種間差は、糖利用能の差異に基づくともみなしても大きな問題はないと考えられる。魚類でも糖質の代謝にはインスリンによる調節が行われている⁴⁾。おそらく、本研究のトラフグ、マダイおよびブリにおいても、急激なグルコース負荷によって膵組織からインスリン分泌が促進されていたものと思われる。インスリンは体細胞のレセプターに結合することによって、細胞膜の

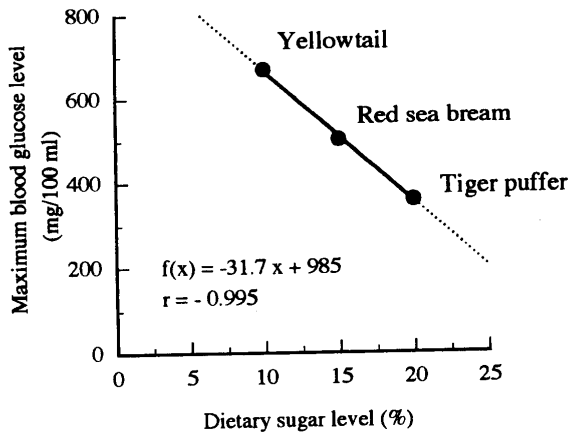


Fig. 5. Relationship between the optimum dietary sugar levels indicated previously and the maximum blood glucose levels of fishes after intraperitoneal injection of 167 mg glucose/100 g body weight in the present study.

グルコース透過酵素数を増加させてグルコース吸収を促進するとともに、グリコーゲン合成を活性化させることがほ乳類で知られている。そこで、グルコース負荷後の各魚種におけるグリコーゲン含量と肝（膵）臓の糖代謝酵素活性を測定したところ、トラフグおよびマダイのグリコーゲン含量は対照区より高く推移する傾向にあったが、解糖系および糖新生系の律速酵素である PFK および FBPase 活性に、明瞭な応答や魚種間差は得られなかった。Furuichi⁴⁾ は糖負荷後のマダイおよびブリの PFK および FBPase 活性は、いずれも僅かに上昇して血糖値の維持に結びつく代謝応答は得られなかったが、高糖質飼料で長期間飼育すると低糖質飼料より高い PFK 活性を維持することを示した。また、逆に

FBPase 活性はマダイの高糖質飼料区で低かったが、ブリでは区間差が認められなかったことを報告した。本研究からも供試した 3 魚種は急激な糖負荷に対して、解糖系酵素の速やかな誘導を行わなかったが、糖利用能が比較的の高いトラフグおよびマダイでは血糖値の維持に、グリコーゲン合成を促進していることが示唆された。一方、糖負荷後におけるブリのグリコーゲン含量はいずれの区でも僅かに低下した。これは多量の糖負荷によって糖利用能が低いブリの糖代謝調節に異常が生じたことによるかもしれない。おそらく、急激な糖負荷に対してその多くを尿糖として速やかに排泄したのであろう。

これまでの魚類の糖利用能に関する報告から、トラフグ、マダイおよびブリにおける飼料の至適糖質含量は、それぞれ 20、15 および 10% かそれ以下であることが示されている^{3, 4, 6)}。そこで、各魚種の飼料糖質含量と本研究における最高血糖値との相関性について調べたところ、Fig. 5 に示すような高い負の相関関係 ($r = -0.995$) を認めた。これらの報告の供試魚体重や飼育条件に違いがあるとともに、魚類の GTT や血糖値に関する報告が少ないことから、単純に関係式 ($f(x) = 985 - 31.7x$) を導き出すことには多くの問題はあがあるが、これまで糖利用能について全く検討されていない魚種でも、GTT を実施することによって、飼料の至適糖質含量を大まかに推測できるかもしれない。

Furuichi⁴⁾ はコイ、マダイおよびブリに、グルコースとともに 2 IU/100g 体重のカツオ *Katsuwonus pelamis* インスリンを投与すると、グルコースを投与した場合より血糖値の上昇が抑制されるとともに、糖負荷後における血中インスリン濃度は大きく上昇しないことを示し、魚類の低い糖質利用能は主にインスリンの合成・分泌能の低さによると推察した。一方、Gutierrez *et al.*¹³⁾ はニジマスの低糖質利用能は、細胞膜に存在するインスリンレセプター数が少ないことによることを示唆した。魚類の糖利用能がほ乳類よりおしなべて低いことは共通しているが、その原因については魚種によって異なるようである。糖利用能には魚種間差だけでなく個体差のあることも考えられるので、今後は個体差に着目して選抜育種を重ね、糖利用能に関しても優良な形質を持つトラフグ養殖種苗を作出したい。

要 約

トラフグとともにマダイおよびブリに対する糖負荷試験 (GTT) を実施したところ、血糖値はいずれの魚種でも共通してグルコース負荷3時間後にピークに達し、しかも最高血糖値はブリ、マダイおよびトラフグの順に低下した。一方、肝臓ホスホフルクトキナーゼおよびフルクトース-1, 6-ビスホスファターゼ活性には、糖利用能の魚種間差に基づくと考えられる一定の傾向はみられなかったが、トラフグおよびマダイの肝臓グリコーゲン含量はグルコース負荷後に大きく上昇したのに対して、ブリの肝臓グリコーゲン含量は経時的に低下した。以上の GTT 試験からも飼育試験の場合と同様に、トラフグ糖利用能はマダイやブリより優れていることを確認した。

謝 辞

本研究を実施するのに当たって、浦神実験場教職員、大学院農学研究科および農学部水産学科学学生各位には、供試魚の飼育や試料の採取に多大のご助力を賜った。ここに記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) NRC (1993): Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, D. C., p. 114.
- 2) Weatherley, A. H. and H. S. Gill (1987) : Nutrition, in "The Biology of Fish Growth", Academic Press, London, pp. 23-50.
- 3) 示野貞夫 (1974): 魚類の炭水化物代謝に関する研究. 高知大水実研報, No. 2, p. 107.
- 4) Furuichi, M. (1983): Studies on the Utilization of Carbohydrate by Fishes. *Rep. Fish. Res. Lab. Kyusyu Univ.*, No. 6, p. 59.
- 5) Wilson, R. P. and W. E. Poe (1987): Apparent inability of channel catfish to utilize dietary mono- and disacchadides as energy sources. *J. Nutr.*, 117, 280-285.
- 6) Palmer, T. N. and B. E. Ryman (1972): Studies on oral glucose intolerance in fish. *J. Fish. Biol.*, 4, 311-319.
- 7) Fangyan, D., D. A. Higginbtham, and B. D. White (2000): Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.*, 130, 514-521.
- 8) Takii, K., M. Ukawa, M. Nakamura, and H. Kumai (1995): Suitable sugar level in brown fish meal diet for tiger puffer. *Fisheries Sci.*, 61, 837-840.
- 9) Nagashima, K., T. Nakagawa, and F. Nagayama (1989): Properties of phosphofruktokinase from carp, eel and rainbow trout liver. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 897-903.
- 10) Nagashima, K., T. Nakagawa, and F. Nagayama (1989): Properties of fructose-1,6-bisphosphatase from carp, eel and rainbow trout liver. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 897-903.

- 11) 吉中禮二・佐藤 守 (1989):水産化学実験法. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 55-57.
- 12) Carroll, N. V., R. W. Longley, and J. H. Roe (1956): The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, 220, 583-593.
- 13) Gutierrez, J., T. Asgard, F. Fabbri, and E. M. Plisetskaya (1991): Insulin-receptor binding in skeletal muscle of trout. *Fish Physiol. Biochem.*, 9, 351-360.
- 14) Harter, H. L. (1960): Critical values for Duncan's new multiple range tests. *Biometrix*, 16, 671-685.