

## 摂餌促進物質の添加がトラフグの成長および 消化酵素分泌に及ぼす効果

滝井健二・高岡 治・中村元二・熊井英水

### Dietary Supplement of Feeding Stimulants Stimulates Growth and Digestive Enzyme Secretion in Tiger Puffer

Kenji Takii\*, Osamu Takaoka\*, Motoji Nakamura\* and Hidemi Kumai\*

Tiger puffer *Takifugu rubripes* fed a diet supplemented with feeding stimulants, a mixture of 21 mg aspartic acid, 24 mg serine, 329 mg glycine, 130 mg alanine and 679 mg betaine per 100 g diet, or an unsupplemented diet for 21 days. The supplemented diet group showed better feed intake, weight gain, feed efficiency, protein efficiency ratio and apparent protein retention than the unsupplemented diet group. Moreover, high trypsin-like enzyme activities were detected in the hepatopancreas and intestinal digesta in the supplemented diet group after feeding. These results indicate that preferential chemical stimuli accelerate feeding activity as well as growth performance via promoted digestive and absorptive functions in the tiger puffer which have no stomach.

Key words: tiger puffer, feeding stimulants, growth performance, trypsin-like enzyme activity.

魚類の摂餌促進物質に関する知見が数多く蓄積されるようになった<sup>1)</sup>。魚種によって多少異なるが、これまで摂餌促進物質として同定された化合物は、アミノ酸、核酸関連物質およびアミン類が主体であり、数種の化合物を併用することによって高い効果が得られている<sup>2)</sup>。著者らも<sup>3)</sup>アサリ *Tapes japonica* 合成エキスを用いてトラフグの摂餌促進物質を検索し、アスパラギン酸、セリン、グリシン、アラニンなどのアミノ酸とベタインを併用することによって、アサリ合成エキスと同等かあるいは優れた摂餌促進活性の得られることを前報で示した。そこで、本研究では摂餌促進物質の実用性について検討するために、飼料への添加がトラフグの飼育成績および消化酵素分泌に及ぼす効果について調べた。ウナギ *Anguilla japonica*<sup>4)</sup>、ブリ *Seriola quinqueradiata*<sup>5)</sup> およびマアジ *Trachurus japonicus*<sup>6)</sup> の有胃魚では、飼料への摂餌促進物質の添加によって、摂餌量だけでなく飼料効率をはじめとする飼育成績の向上することが報告されている。これは摂餌に係わる好ましい化学刺激が、中枢神経を介して消化吸收機能を高め、ひいては栄養素の代謝および同化作用を促進したためと考えられる。無胃魚のトラフグでも、飼料へ摂餌促進物質を添加することによって、優れた飼育成績の得られることが期待される。

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

Table 1. Formula and proximate composition of basal diet and feeding stimulants used for the present study\*<sup>1</sup>

Ingredient	(%)
Vitamin-free casein	50
White dextrine	30
Powdered pollack liver oil	7
Vitamin mixture* <sup>2</sup>	2
Mineral mixture* <sup>2</sup>	8
Carboxymethyl cellulose	3
Proximate composition	(%)
Crude protein	49.2
Crude fat	5.1
Sugar	29.7
Crude ash	7.6
Feeding stimulants	mg / 100 g basal diet
L-Aspartic acid	21
L-Serine	24
Glycine	329
L-Alanine	130
Betaine	679

\*<sup>1</sup> Test and control diets, as a moist type pellet, were respectively prepared to add a mixture of 1.183 g feeding stimulants, 8 ml 25% NaOH and 42 ml deionized water and the mixture without the feeding stimulants to 100 g of basal diet.

\*<sup>2</sup> Halver mixtures<sup>7)</sup>.

## 材料および方法

**試験飼料** Table 1に示すように、摂餌促進物質を添加する基本飼料には、タンパク質源にカゼイン、糖質源にホワイトデキストリン、脂質源に粉末スケトウダラ肝油およびビタミン・ミネラル混合物にハルバー処方<sup>7)</sup>のものを、それぞれ50, 30, 7および2・8%配合した。この基本飼料100 gに摂餌促進物質として、アスパラギン酸、セリン、グリシン、アラニンおよびベタインを、それぞれ21, 24, 329, 130および679 mg外割で添加し<sup>3)</sup>、さらに8 ml 25% NaOHで飼料のpHを6.8に調整した後、42 ml 水道水を加えて練り合わせ、試験用造粒機で直径3 mmのモイストペレットに成型し試験飼料とした。対照飼料は摂餌促進物質を除いて試験飼料と同様に調製した。調製後はいずれの飼料も-20℃で凍結保存し、給餌に際しては必要量を解凍して与えた。

**供試魚および飼育方法** 瀬戸内海産トラフグより採卵授精し、本研究所浦神実験場でふ化・養成した平均体重29.4 gの稚魚を、20尾ずつ300 l容の塩ビ製角型水槽(50×100×60 cm)に収容して、試験区および対照区を設けた。各水槽には毎分3 lの割合で濾過海水を注水しエアレーションを行った。給餌は1日2回(8:00および16:00)15分間ずつ行い21日間飼育した。

飼育期間中は7日毎に体重を測定し、開始時および終了時には各区から3尾ずつ取り上げて、全魚体および肝臓の一般成分を測定した。また、終了時には摂餌1, 3および5時間後に3尾ずつ取り上げて、肝臓および腸内容物を採取し、トリプシン様酵素活性を測定した。なお、いずれの

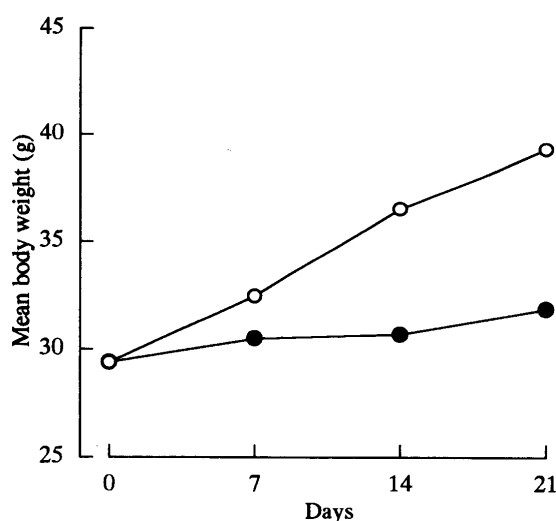


Fig. 1. Changes in mean body weight of fish fed test diet (○) and control diet (●) for 21 days.

測定にも3尾分をまとめて一サンプルとし分析に供した。

**分析方法** 全魚体および肝臓の一般成分はAOAC法<sup>8)</sup>によった。また、飼料の糖質含量および肝臓のグリコーゲン含量は、それぞれフェノール—硫酸法<sup>9)</sup>およびアントロン法<sup>10)</sup>によった。

肝臓のトリプシン様酵素活性はブタエンテロペプチダーゼ (Merck社製) で活性化した後、カゼイン—フォーリン法<sup>11)</sup>で測定した。すなわち、エンテロペプチダーゼを1 mg/mlになるように6.25 mM トリス—塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した溶液4 ml に、1 ml の粗酵素液を加え35℃で60分間インキュベートして活性化した。なお、肝臓の粗酵素液は9倍量の脱イオン水とともにガラスホモジナイザーで磨砕したホモジネートを、12,000×gで20分間遠心分離して得た。これらの操作は4℃以下で行った。

腸内容物のトリプシン様酵素活性は肝臓の場合と同様にして得た粗酵素液を用いて、カゼイン—フォーリン法<sup>11)</sup>で測定した。

いずれのトリプシン様酵素活性もpH 8.0, 35℃, 20分間の反応条件下で、1分間に1 μmolのチロシンが遊離する速度を1 unitと定義し、組織および内容物1 g当たりおよび体重100 g当たりで表示した。

## 結 果

**飼育成績** 試験区および対照区の平均体重の推移をFig. 1に、また飼育成績をTable 2に示した。

いずれの区も平均体重はほぼ直線的に推移したが、試験区の傾きは対照区より大きく、終了時における試験区および対照区の平均体重は、それぞれ39.3 gおよび31.9 gに達した。

飼育成績についてみると、試験区の期間総摂餌量、日間摂餌率、飼料効率、タンパク効率および見掛けのタンパク質蓄積率は、それぞれ299 g, 2.1%, 66%, 1.35および19.5%であり、いずれも対照区の約2倍の値であった。なお、対照区で斃死が1尾認められたが、細菌性疾病によると考えられる外観症状は認められず、主に噛み合いにより尾柄部を欠損したことに基づくものであった。

**全魚体および肝臓の一般成分** 開始時および終了時における両区の、全魚体および肝臓の

**Table 2.** Growth performance of fish fed test diet\* and control diet\* for 21 days

	Diet group	
	Test	Control
No. of fish		
initial	20	20
final	20	19
Weight gain (g)	198.4	44.5
Feed intake (g)	298.6	145.6
Daily feeding rate(%)	2.07	1.16
Feed efficiency (%)	66.4	30.7
Protein efficiency ratio	1.35	0.62
Apparent protein retention (%)	19.5	8.56

\* Refer to the footnote of Table 1.

一般成分をTable 3に示した。

全魚体の水分、粗タンパク質および粗灰分含量は、それぞれ77、14および2.5%前後で、開始時および終了時の両区間に顕著な差異は認められなかったが、終了時における対照区の粗脂質含量は3%であり、開始時および終了時における試験区の5%より僅かに低下した。

終了時における両区の肝臓水分含量は、開始時に比べて増加し、粗脂質含量および体重に対する比肝臓重値は低下する傾向にあった。そこで、終了時における区間差についてみると、試験区の水分含量は42%で対照区の48%に比較して低く、逆に試験区の粗脂質含量は47%で対照区の39%より高かった。しかし、粗タンパク質、粗灰分およびグリコーゲン含量はそれぞれ7、0.6および3%前後であり、顕著な区間差は認められなかった。

**Table 3.** Proximate composition (%) of whole body and the hepatopancreas of fish fed test diet and control diet at the initial and final days of rearing period.

	Whole body			Hepatopancreas		
	Initial	Final		Initial	Final	
		Test	Control		Test	Control
Moisture	76.0	77.1	78.1	35.7	41.7	47.7
Crude protein	13.6	14.3	13.6	8.2	7.9	6.8
Crude fat	5.2	5.8	3.0	52.2	46.7	38.6
Crude ash	2.6	2.1	2.4	0.7	0.6	0.6
Glycogen				3.3	2.7	3.5
Relative weight to body weight				9.1	8.3	7.3

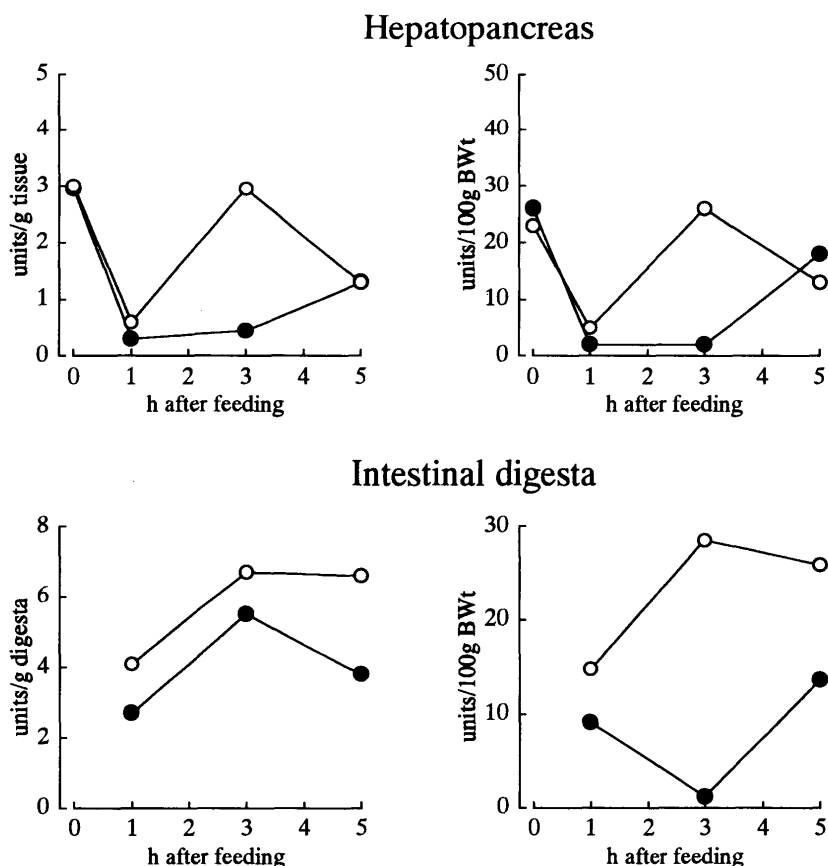


Fig. 2. Trypsin-like enzyme activities in the hepatopancreas and intestinal digesta of fish after feeding test diet (○) and control diet (●).

**摂餌後における肝膵臓および腸内容物のトリプシン様酵素活性の変化** 摂餌0, 3および5時間後における、肝膵臓および腸内容物のトリプシン様酵素活性の変化を、組織・内容物1 g当たりおよび体重100 g当りに換算してFig. 2に示した。

肝膵臓の酵素活性についてみると、いずれの活性表示法でも類似した変化が認められ、試験区では摂餌0時間から1時間後にかけて急激に低下した後、上昇して摂餌3時間後には摂餌0時間後のレベルにまで達した。摂餌3時間後からは再び低下して摂餌5時間後には対照区の活性とほぼ等しくなった。一方、対照区では試験区と同様に摂餌0時間から1時間後にかけて急激に低下したが、摂餌3時間後までは低い活性で推移し、その後は僅かに上昇した。このように、摂餌3時間後の酵素活性に大きな区間差の認められたことが注目される。

腸内容物の酵素活性には表示法の違いにより異なった変化が認められた。内容物1 g当たりの活性でみると、摂餌3時間後までは両区とも上昇したが、いずれの時間においても試験区の活性が対照区より高く推移した。摂餌3時間後から5時間後にかけて、試験区では高い活性を維持したのに対して対照区では低下した。次に、体重100 gあたりの活性で比較すると、試験区では内容物1 g当たりの変化に類似し、摂餌3時間後まで急激に上昇し、その後は摂餌5時間後まで高い活性を維持したのに対して、対照区では摂餌1時間後まで上昇した後、摂餌3時間後にかけて低下し、その後は再び上昇したが、いずれの時間でも試験区より著しく低い活性しか得られなかった。

## 考 察

本研究に使用したトラフグの摂餌促進物質は、6日間という短期の日間摂餌率を指標に求めたものである<sup>3)</sup>。しかし、本研究結果から摂餌促進物質を添加した試験区が、21日間の飼育において終始高い摂餌活性を維持したことから、比較的長期間の飼育においても摂餌促進物質が有効に作用することが示された。また、試験区の飼料効率をはじめとする飼育成績は、対照区に比べて優れていた。さらに、全魚体および肝臓の粗脂質含量は、対照区より試験区で高かった。これらは主に試験区の摂餌量が増加したことに基づくと考えられるが、間接的に消化過程にも良い影響を及ぼしたことが推察されたので、摂餌後における肝臓および腸内容物のトリプシン様酵素活性を測定した。その結果、試験区では摂餌3時間後までの比較的早い時間における、トリプシン様酵素の合成・分泌が促進されていることが示された。滝井<sup>4)</sup> および Takii *et al.*<sup>5)</sup> は有胃魚のウナギおよびブリを供試して、摂餌促進物質が飼料の消化吸収に及ぼす効果について検討し、消化酵素分泌や腸への食塊の移行量を調節して消化吸収を促進するだけでなく、肝臓の糖およびアミノ酸代謝をも活性化することを示唆した。無胃魚のトラフグでも摂餌に係わる好ましい化学感覚刺激が、中枢神経系や消化管ホルモンの作用を介して、トリプシン様酵素活性の合成・分泌を高めたものと推察される。

一方、試験および対照区の飼育成績はこれまでの報告成績に比べてかなり劣っていた。Takii *et al.*<sup>12,13)</sup> はタンパク質、糖質および脂質源に沿岸魚粉、デキストリンおよびマイワシ *Sardinops melanostictus* オイルを用いて、トラフグの糖質および脂質要求量について検討し、それぞれ飼料の20および11%程度であることを報告した。本研究で用いた基本飼料の糖質および粗脂質含量は、それぞれ30および5%と大きくかけ離れていた。本研究の両区で認められた低い飼育成績は、用いたタンパク質源の違いも関与すると考えられるが、主に飼料の糖質および脂質含量が適正でなかったことに基づくと推察される。しかし、栄養要求に合致しない組成の飼料に、摂餌促進物質を添加することによって、終始高い摂餌活性を維持できた点は注目し得る。おそらく、今後は魚類用配合飼料への良質の動物タンパク質源である魚粉の使用量は抑えられ、その代替源として大豆粕、ナタネ粕、酵母タンパク質などが多量に利用されるようになると考えられる<sup>14)</sup>。植物タンパク質の多くには抗栄養因子が含まれており、生理的に悪影響を及ぼすだけでなく摂餌活性を低下させることが知られている<sup>15,16)</sup>。植物タンパク質を多く配合した飼料に対する低い嗜好性を高めるには、摂餌促進物質を添加することが有効な手段の一つになるであろう。魚類養殖業の発展のために、摂餌促進物質の検索を多くの魚種を対象にして、より精力的に押し進める必要がある。

## 要 約

カゼイン主体の基本飼料100gに、アスパラギン酸21mg、セリン24 mg、グリシン329 mg、アラニン130 mgおよびベタイン679 mgからなるトラフグ摂餌促進物質を添加した飼料を与えて21日間飼育し、トラフグに対する摂餌促進物質の添加効果を検討した。

添加区では無添加区に比べて、摂餌量、増重率、飼料効率、タンパク効率および見掛けのタンパク質蓄積率はいずれも優れていた。さらに、摂餌後の比較的早い時間における肝臓および腸内容物のトリプシン様酵素活性も添加区で高かった。これらの結果から、無胃魚のトラフグにお

いても、摂餌促進物質は摂餌を促進するだけでなく、消化酵素の合成・分泌を高進して、飼育成績を向上させる実用的な効果を持つことが示唆された。

## 謝 辞

本研究を実施するのにあたって、農学部水産学科水産増殖学専攻卒業生の原 勝久氏に供試魚の飼育および分析に多大のご助力を賜った。また、浦神実験場技術職員各位には飼育に当たって、多くのご助言を賜った。これら関係各位に衷心より謝意を表します。

## 文 献

- 1) 滝井健二 (1994): アミノ酸. 魚介類に対する摂餌促進物質. 水産学シリーズ101 (原田勝彦編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 55-65.
- 2) Takeda, M. and K. Takii (1992): Gustation and nutrition in fishes: application to aquaculture. Fish chemoreception (ed. By T.J. Hara). Chapman & Hall, London, pp. 271-287.
- 3) Takaoka, O., K. Takii, M. Nakamura, H. Kumai and M. Takeda (1995): Identification of feeding stimulants for tiger puffer. *Fisheries Sci.*, **61**, 833-836.
- 4) 滝井健二 (1989): ウナギの摂餌促進物質とその配合飼料への応用に関する研究. 近大水研報, **No. 3**, 1-72.
- 5) Takii, K., S. Shimeno, M. Akutsu and M. Takeda (1994): Dietary supplement of feeding stimulants on performance and digestive function of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bull. Fish. Lab. Kinki Univ.*, **NO. 4**, 127-137.
- 6) 池田 至 (1988): マアジの摂餌刺激物質に関する研究. 愛媛大学連合大学院学位論文, 松山, pp. 113-138.
- 7) Halver, J.E. (1957): Nutrition of salmonid fish-III. Water-soluble vitamin requirements of chinook salmon. *J. Nutr.*, **62**, 225-243.
- 8) AOAC (1984): Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists. 14th edition, Arlington, p. 1141.
- 9) Hodge, J.E. and B.T. Hofreiter (1962): Methods in carbohydrate chemistry Vol. 1 (ed. R.L. Whiter and M.L. Wolform). Academic Press, New York, pp. 388-389.
- 10) Carroll, N.V., R.W. Longley and J.E. Roe (1956): The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **220**, 583-593.
- 11) 荻原丈二 (1955): Protease. 酵素研究法No. 2. (赤堀四郎編), 朝倉書店, 東京, pp. 237-246.
- 12) 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.
- 13) Takii, K., M. Ukawa, M. Nakamura and H. Kumai (1995): Suitable lipid level in brown fish meal diet for tiger puffer. *Fisheries Sci.*, **61**, 841-844.
- 14) 中山 寛 (1994): 養魚飼料の現状と課題. 新しい養魚飼料—代替タンパク質の利用. 水産学シリーズ100 (渡邊 武編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 11-22.

- 15) NRC (1993): Nutrient requirements of fish. National Academy Press, Washington, D.C., pp. 38-42.
- 16) Liu, K-S (1997): Soybeans-chemistry, technology and utilization. Chapman & Hall, London, pp. 36-113.