

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*

滝 井 健 二**

Studies on Identification of Feeding Stimulants and
Its Application to Diets for Eel *Anguilla japonica*

Kenji TAKII

目 次

| | |
|------------------------------------|----|
| 緒 言 | 4 |
| 第 I 章 ウナギ稚魚の摂餌促進物質の同定 | 6 |
| I-1 材料および方法 | 6 |
| I-2 結果 | 9 |
| I-3 考察 | 15 |
| 第 II 章 ウナギ用配合飼料への摂餌促進物質の添加効果 | 19 |
| II-1 シラス用配合飼料への添加効果 | 19 |
| II-1-1 材料および方法 | 19 |
| II-1-2 結果および考察 | 21 |
| II-2 稚魚用配合飼料への添加効果 | 22 |
| II-2-1 材料および方法 | 22 |
| II-2-2 結果および考察 | 23 |
| II-3 成魚用配合飼料への添加効果 | 25 |
| II-3-1 材料および方法 | 25 |
| II-3-2 結果および考察 | 26 |

* 本論文は東京大学審査学位論文である。

** 近畿大学水産研究所浦神実験場 (Fisheries Lab. of Kinki Univ., Uragami, Wakayama 649-51, Japan)

| | | |
|---------|--|----|
| 第III章 | 摂餌後のウナギ消化酵素活性の経時変化 | 29 |
| III-1 | 材料および方法 | 29 |
| III-2 | 結果および考察 | 31 |
| III-2-1 | 胃組織とその内容物におけるペプシン様酵素活性 の経時変化 | 31 |
| III-2-2 | 腸組織とその内容物におけるトリプシン様酵素 およびアミラーゼ活性の経時変化 | 32 |
| III-2-3 | 消化管内容物量と消化酵素活性 | 35 |
| 第IV章 | 飼料への摂餌促進物質の添加がウナギの消化酵素 および肝臓酵素の活性に及ぼす影響 | 37 |
| IV-1 | 消化酵素活性に及ぼす影響 | 37 |
| IV-1-1 | 材料および方法 | 37 |
| IV-1-2 | 結果 | 38 |
| IV-1-3 | 考察 | 41 |
| IV-2 | 肝臓酵素活性に及ぼす影響 | 46 |
| IV-2-1 | 材料および方法 | 46 |
| IV-2-2 | 結果 | 47 |
| IV-2-3 | 考察 | 49 |
| 第V章 | 飼料への消化酵素剤の添加がウナギの摂餌活性 および消化過程に及ぼす影響 | 51 |
| V-1 | 材料および方法 | 51 |
| V-2 | 結果 | 53 |
| V-3 | 考察 | 60 |
| 摘 | 要 | 63 |
| 文 | 献 | 67 |

本論文では下記の略号を用いた。

(1) アミノ酸名

Ala：L-アラニン

Arg：L-アルギニン

Asp：L-アスパラギン酸

Glu：L-グルタミン酸

Gly：グリシン

His：L-ヒスチジン

Ile：L-イソロイシン

Leu：L-ロイシン

Lys：L-リジン

Met：L-メチオニン

Phe：L-フェニルアラニン

Pro：L-プロリン

Ser：L-セリン

Tau：タウリン

Thr：L-スレオニン

Trp：L-トリプトファン

Tyr：L-チロシン

Val：L-バリン

(2) 核酸関連物質名

ATP：アデノシン三リン酸

ADP：アデノシン二リン酸

AMP：アデノシン5'-リン酸 (アデニル酸)

IMP：イノシン5'-リン酸 (イノシン酸)

UMP：ウリジン5'-リン酸 (ウリジル酸)

GMP：グアノシン5'-リン酸 (グアニル酸)

HxR：イノシン

AdR：アデノシン

NADP：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸

(3) その他

Pi：無機オルトリン酸

結 言

水産生物の化学感覚に関する知見はここ10年間に飛躍的に集積された¹⁾。なかでも魚類の摂餌促進物質については、生物検定法²⁻¹³⁾ および電気生理学的手法¹⁴⁻²²⁾、さらにこれらを組み合わせた方法^{7,22)} を用いて活発に検討され、これまでに遊離アミノ酸、グリシンベタイン、核酸関連化合物などが各種魚類の摂餌促進物質として同定されている。これらの研究により得られた知見は、単に魚類の感覚生理学にとどまらず、生態学および栄養生理学の分野からも多大な興味を持たれている。一方、同定された摂餌促進物質を、漁業や魚類養殖業に応用しようとする試みが種々の立場からなされているが^{23,24)}、実際に応用された例は僅かで²⁵⁾、特に養魚用配合飼料へ摂餌促進物質を飼料用フレーバーとして添加し、その添加効果を成長や飼料効率の面から詳細に検討した報告は僅かしかない²⁶⁾。

ところで、陸上ほ乳類では、好ましい味覚あるいは嗅覚刺激が唾液や胃液の分泌を増大させて食物消化を促進することから、食物の味や臭いとその価値を大きく左右する重要な因子の一つであることが既に明らかにされている²⁷⁾。その機構は、感覚器で受容された刺激が中枢神経に伝達され、そこで処理を受けた後、再び各消化器官へ分泌刺激として伝達されて、唾液および胃液の分泌が促進されることに基づく²⁷⁻³⁰⁾とされている。さらに、この化学刺激は吸収された栄養素が有効に使用されるように代謝を間接的に調節する効果のあることも示唆されている²⁷⁾。このように、ほ乳類では食物摂取という行動は単に必要なエネルギーと栄養素を摂取するだけでなく、化学刺激を介して消化管内腔への消化液の分泌、および吸収された栄養素の代謝を円滑に進行させるための準備行動であると考えられている^{31,32)}。ところが、魚類ではこのような食物摂取に伴う化学刺激の栄養生理学的役割については全く解明されていない。しかし、これまでに幾つかの魚種について、各種消化管における消化酵素³³⁾ および消化管ホルモン³⁴⁾ の特性、ならびに栄養素の代謝調節に関与するホルモンの役割について研究され³⁵⁾、いずれもほ乳類のそれらと基本的な差異のないことが明らかにされている³⁴⁻³⁶⁾。したがって、魚類にもほ乳類と同様に、摂食に伴う化学刺激が栄養生理の上に重要な役割を演じている可能性が推察される。このことを実証することができれば、魚類の感覚生理学や栄養生理学の知見が増すばかりでなく、今後魚類養殖が指向すべき飼養管理技術の向上にも寄与することができるであろう³⁷⁾。

以上の観点から本研究では、淡水養殖魚種のなかで最も生産額が高く³⁸⁾、発達した化学感覚器官を備え³⁹⁾、さらに生理生態⁴⁰⁾ や栄養要求⁴¹⁻⁴⁷⁾ がよく解明されている日本産ウナギ、*Anguilla japonica*、を供試魚として、まず、ウナギ稚魚の摂餌促進物質をイソゴカイ合成エキスを用いた

オミッショントテストにより同定した。続いて、この摂餌促進物質の混合物をウナギ用配合飼料に添加して、シラスウナギ、ウナギ稚魚および成魚に給与し、餌付け促進効果ならびに成長および飼料効率の改善について検討した。さらに、それがウナギの成長・飼料効率を改善した原因を明らかにするために、摂餌促進物質添加飼料を摂取したウナギについて消化管とその内容物における消化酵素活性、肝臓の糖質およびアミノ酸代謝に関与する各種酵素活性、血液成分の経時変化などを調べ、無添加飼料を摂取したウナギと比較した。最後に、市販の消化酵素剤を配合飼料に添加して、そのタンパク源からアミノ酸を遊離させることにより飼料に対するウナギの嗜好性や消化過程が改善されるかどうかを検討した。

これまで、橋本ら⁴⁸⁾、および鴻巣ら⁴⁹⁾によって、アサリ合成エキスからのオミッショントテストで Gly, Ala および Arg の3種のアミノ酸がウナギ誘引物質として同定されたが、これらを単独で使用するより併用した方が誘引効果が顕著であることが明らかにされている。また、Yoshii ら⁵⁰⁾の電気生理学的研究結果から、ウナギの味覚神経は 10^{-2} M 濃度の Ala, Arg, Gly, Pro, Lys, Ser および His の各溶液に対して高い応答を示すことが明らかにされている。これらの知見より、ウナギでも他の多くの魚種^{24,51,52)}と同様に、アミノ酸が摂餌促進物質として中心的な役割を持っているものと推察される。また、ウナギはハマチやマダイと同様に飼料タンパク質に対する要求量が高く、逆に糖質利用能がほ乳類に比較して劣ることなどが知られている⁵³⁾。

本研究で得られた知見が今後魚類の感覚生理学および栄養生理学の発展ならびにウナギ養殖技術の向上のための一助となれば幸いである。

本論文をとりまとめるにあたり、東京大学農学部教授 清水千秋先生、同教授 鴻巣章二先生および高知大学農学部教授 竹田正彦先生には御懇篤な御指導と御校閲を賜った。深く感謝の意を表します。

また、本研究の遂行にあたり、終始貴重な御助言と御指導を賜った高知大学農学部助教授 示野貞夫先生および同講師 細川秀毅先生に深謝いたします。

高知大学農学部水族栄養学講座の各位には、実験に際して多大なる御協力を賜った。また、高知県飼糧畜産株式会社 今植 健氏、丸紅飼料株式会社 梶山英俊氏およびコーキン化学株式会社 和多田暁雄氏には、貴重な御助言と飼料調製に際して御便宜を賜った。これらの方々に対して、心から感謝の意を表します。

近畿大学水産研究所教授 熊井英水先生には本研究の遂行にあたって多大な御激励を賜った。また本論文の掲載に対して近畿大学水産研究所長 原田輝雄先生には種々の御助言と御尽力を賜った。ここに記して両先生に感謝の意を表します。

第 I 章 ウナギ稚魚の摂餌促進物質の同定

魚類の摂餌促進物質に関しては、これまでマダイ^{8,13,22,54}、ハマチ^{55,56}、ヒガンフグ^{7,16,18}、turbot¹⁰、dover sole¹²、pin fish^{2,57}、pig fish^{3,4}、whiting⁵⁸、cod⁵⁹、ニジマス¹¹、コイ⁶⁰などについて調べられ、その結果、遊離アミノ酸、核酸関連化合物、グリシンペタインなど、餌料生物のエキス中に普遍的かつ多量に存在する化合物に摂餌促進活性のあることが報告されている。そこで竹田は⁶¹これらの結果をとりまとめて、摂餌促進活性を持つ化合物の種類や組み合わせは各魚種で多少異なるが、摂餌促進効果を発現するためには2種以上の化合物の協同効果による場合が多く、とりわけ遊離アミノ酸のAlaとGlyまたはAlaとProが、多くの魚種に共通する活性物質であることに着目している。一方、ウナギ *Anguilla japonica* に関しては、これまで橋本ら⁴⁸や鴻巣ら⁴⁹による誘引物質の同定、ならびにYoshiiら⁵⁰の味覚神経に関する電気生理学的研究があるのみで、摂餌促進物質を同定した報告はまだ見当たらない。

そこで、本章ではウナギが好んで摂取する餌料生物のうちで、そのエキス成分がすでに明らかにされているイソゴカイの合成エキス⁶²を用いて、ウナギ稚魚に対する摂餌促進物質を同定した。

I-1 材料および方法

(a) 供試魚および試験水槽

高知市浦戸湾で採捕された平均体重0.15 gのシラスウナギを約2週間イトミミズ *Tubifex* sp. で飼育した後、80 l容(30×60×45 cm)のポリアクリル水槽に、総体重が100 gになるように平均体重0.5 gのウナギ稚魚を収容して各試験区を設けた。なお、試験水槽は側面を黒色ビニルシートで覆い、循環ろ過装置を取り付けた。また、飼育水を通気するとともに、毎日その約1/3量をあらかじめ同じ水温に加熱した新鮮な地下水と換水した。予備飼育ならびに試験期間中の水温は、26~27°Cになるように電気ヒーターで調節した。

(b) 試験飼料

試験に用いた基本飼料の組成、および鴻巣ら⁶⁰の分析値に基づいて調整したイソゴカイ合成エキスの組成をそれぞれTable I-1およびI-2に示した。すなわち、基本飼料には、タンパク質源として北洋魚粉とカゼインを、脂質源として粉末スケトウダラ肝油(理研ビタミンKK製)を、粘結剤を兼ねた糖質源として α -バレイショデンプンを、さらにHalver処方⁶³のビタミンおよびミネラル混合物をそれぞれTable I-1に示す割合で配合した。イソゴカイ合成エキスは、Table I-2に示した組成になるように純品試薬を混合し脱イオン水に溶かして調製した。また、

Table I-1. Composition of the basal diet

| Ingredient | % |
|----------------------------|----|
| White fish meal | 40 |
| Casein (vitamin free) | 30 |
| Pollack liver oil (powder) | 5 |
| α -Potato starch | 21 |
| Vitamin mixture* | 2 |
| Mineral mixture* | 2 |

* Halver mixture⁶³⁾.

Table I-2. Composition of the synthetic extract of marine worm*¹

| Component | mg/170 ml | Component | mg/170 ml |
|---------------------------|-----------|--------------------|-----------|
| Amino acids* ² | | Nucleotides | |
| Ala | 285 | AMP | 58.3 |
| Arg | 22 | UMP•2Na | 2.8 |
| Asp | 97 | IMP•2Na | 10.4 |
| Glu | 196 | ADP•2Na | 7.2 |
| Gly | 508 | ATP•2Na | 4.1 |
| His | 38 | Other compounds | |
| Ile | 54 | Creatine | 34 |
| Leu | 42 | Glycine betaine | 573 |
| Lys | 64 | TMAO* ³ | 1.5 |
| Met | 27 | TMA* ³ | 0.4 |
| Phe | 22 | DMA* ³ | 0.3 |
| Pro | 217 | Ammonia | 28 |
| Ser | 94 | Succinic acid | 24 |
| Tau | 371 | Malic acid | 15 |
| Thr | 59 | Citric acid | 4 |
| Trp | 4 | Fumaric acid | 1 |
| Tyr | 24 | Maltose | 287 |
| Val | 52 | Glucose | 75 |

*1 The composition was based on the analysis⁶²⁾ of the extract of *Perinereis brevicirrus*, and homarine, glycoamine and choline chloride were omitted.

*2 Except Gly and Tau, all amino acids were L-form.

*3 TMAO: Trimethylamine oxide, TMA: Trimethylamine, DMA: Dimethylamine.

その三大構成画分（アミノ酸，核酸関連物質およびその他の化合物）および種々の化合物を含む合成エキスを調製した。いずれの合成エキスも1 N—NaOH または1 N—HCl で pH を6.8 に調整した。試験飼料は脱イオン水で170 ml に定容した合成エキスを基本飼料100 g に添加してよく練り合わせ，ペースト状飼料（練り餌）に調製した。なお，試薬はすべて特級品を使用し，調製に際してはきょう雑物が混入しないよう細心の注意を払った。また，対照飼料には170 ml の脱イオン水のみを基本飼料100 g に添加した。これらの飼料は給餌の都度新しく調製した。

(c) 活性測定法

魚類に対する化学物質の摂餌促進活性を測定する方法は，研究者によってまちまちでそれぞれに一長一短があるが⁶⁴⁻⁶⁶⁾，本実験では，試験物質添加飼料と無添加飼料との摂餌量の差異に基づいて，試験飼料に対する嗜好性を判定する方法を採用した。すなわち，午前9：00にイソゴカイ完全合成エキス添加飼料をすべての試験区のウナギ稚魚に飽食給与した後，午後3：00に各試験区に各試験飼料と対照飼料を同時に給与する二者択一法をラテン方格法に基づいて実施し，試験期間中の両飼料に対する摂餌量を乾物で求めた。なお，給餌に際しては，試験水槽に2個の給餌かごを設置して，一方には試験飼料を，他方には対照飼料を置いて約40分間自由食で給与した。また，供試魚の給餌かごに対する学習を避けるために，試験飼料と対照飼料のかごの位置を給餌の都度入れ替えた。なお実験に用いた魚はイソゴカイ完全合成エキスに馴致させてから，次の実験に用いた。

試験物質の摂餌促進活性を明らかにするため，脱イオン水添加の対照飼料の摂餌量に対する試験飼料の摂餌量の比，すなわち相対摂餌比を求め，また次式により試験飼料に対する嗜好指数を算出した。

$$\text{嗜好指数} = (\text{試験飼料の摂餌量} - \text{対照飼料の摂餌量}) \times 100 / \\ (\text{試験飼料の摂餌量} + \text{対照飼料の摂餌量})$$

なお，この嗜好指数の変域は-100から+100までで，負の指数が得られた場合は，試験物質が対照飼料の摂餌促進活性を減少させる摂餌阻害効果を，正の指数が得られた場合は，試験物質が対照飼料の摂餌促進活性を増大させる摂餌促進効果をもつことを示している。

本研究で用いた摂餌促進物質や阻害物質に関する語句の定義は，竹田ら^{64,67)}の報告に準じた。すなわち，摂餌誘引物質とそれにつづく一連の摂餌行動を促す性質をもつ摂餌刺激物質を区別せずに，併せて摂餌促進物質とし，その活性を摂餌促進活性とした。また，対照飼料の摂餌促進活性を低下させる物質を摂餌阻害物質とし，その活性を摂餌阻害活性と定義した。

I-2 結 果

I-2-1 イソゴカイ完全合成エキスならびにその三大画分の摂餌促進活性

まず、ウナギ稚魚に対するイソゴカイ完全合成エキス、ならびにその三大画分すなわちアミノ酸、核酸関連物質およびその他の化合物の各画分のウナギ稚魚に対する摂餌促進活性を測定した。Table I-3 に示したように、ウナギ稚魚はイソゴカイ完全合成エキスを添加した飼料に対して、相対摂餌比および嗜好指数でそれぞれ3.57および56と顕著に高い摂餌活性を示した。このように、イソゴカイ完全合成エキスはウナギ稚魚の摂餌促進物質を同定するのに好適な試験エキスであることが分かったので、次に本エキス中の三大画分の摂餌促進活性を測定した結果、アミノ酸画分に完全合成エキスに匹敵する最も高い摂餌促進活性が認められ、次いで、その他の化合物画分に比較的高い活性が認められた。しかし、核酸関連物質画分は相対摂餌比が極めて低く、負の嗜好指数しか認められなかった。以上の結果より、本合成エキスの活性は、アミノ酸とその他の化合物の両画分に基づくことが明らかになり、核酸関連物質画分中には摂餌阻害物質が含まれていることが示唆された。

Table I-3. Feeding stimulant activity of the synthetic extract and its major fractions

| Fraction | Diet intake (g) | | Relative diet intake* ¹ | Preference index* ² |
|-------------------|-----------------|---------|------------------------------------|--------------------------------|
| | Test | Control | | |
| Synthetic extract | 65.1 | 18.2 | 3.57 | 56 |
| Amino acid | 15.8 | 4.5 | 3.54 | 56 |
| Nucleotide | 5.1 | 15.3 | 0.34 | -50 |
| Other compound | 10.3 | 5.1 | 2.03 | 34 |

*1 Test diet intake/Control diet intake.

*2 $\frac{\text{Test diet intake} - \text{Control diet intake}}{\text{Test diet intake} + \text{Control diet intake}} \times 100$.

I-2-2 アミノ酸画分中の摂餌促進物質

イソゴカイ合成エキス中のアミノ酸画分に完全合成エキスに匹敵する高い摂餌促進活性のあることが明らかになったので、この画分を構成するアミノ酸を次の4混合物に分けて摂餌促進活性を比較した。すなわち、Ala, Gly, Leu, Ile, Pro, Met, Ser, Tau, Thr および Val から成る中性アミノ酸混合物, Asp と Glu から成る酸性アミノ酸混合物, Arg, His および Lys から成る塩基性アミノ酸混合物, ならびに Tyr, Trp および Phe から成る芳香族アミノ酸混合物について摂餌促進活性を測定した。Table I-4 に示したように、これらの混合物のうち、中性アミノ酸混合物に最も高い活性が認められ、相対摂餌比と嗜好指数はそれぞれ3.25と53と高かつ

Table I-4. Feeding stimulant activity of some groups of amino acids

| Amino acid | Diet intake (g) | | Relative diet intake | Preference index |
|-------------------------------|-----------------|---------|----------------------|------------------|
| | Test | Control | | |
| Neutral amino acids: (An) | 10.2 | 3.1 | 3.25 | 53 |
| Acidic amino acids | 6.0 | 5.6 | 1.07 | 3 |
| Basic amino acids: (Ab) | 7.3 | 3.9 | 1.87 | 30 |
| Aromatic amino acids | 7.6 | 6.1 | 1.25 | 11 |
| An + Ab | 3.1 | 0.6 | 5.17 | 67 |
| A ₈ * ¹ | 4.6 | 1.1 | 4.35 | 63 |
| A ₅ * ² | 2.3 | 0.9 | 2.66 | 45 |
| Ae* ³ | 2.3 | 0.8 | 2.83 | 48 |
| Ane* ⁴ | 1.7 | 1.3 | 1.31 | 13 |

*1 Mixture of Ala, Arg, Gly, His, Lys, Pro, Ser and Thr.

*2 Mixture of Ala, Gly, Pro, Ser and Thr.

*3 Mixture of Ala, Gly and Pro.

*4 Mixture of Ser and Thr.

た。また、塩基性アミノ酸混合物にも相対摂餌比が1.87、嗜好指数が30と比較的高い活性が認められた。しかし、酸性および芳香族アミノ酸の両混合物には活性がほとんど認められなかった。

次いで、高い摂餌促進活性が認められた中性および塩基性の各アミノ酸混合物について、その中に含まれる有効アミノ酸を同定するために、Ala, Gly, Pro, Ser および Thr から成る5種中性アミノ酸グループ(A₅), Ala, Gly および Pro から成る3種中性アミノ酸グループ(A_e), そして Ser と Thr から成る2種アミノ酸グループ (Ane) の3つのグループに分けて摂餌促進活性を調べた。また、同時にすべての中性および塩基性アミノ酸を混合したグループ(An+Ab)ならびに A₅ に3種塩基性アミノ酸を混合したグループ(A₈)についても摂餌促進活性を測定した。Table I-4 に示したように、中性と塩基性のアミノ酸を混合した An+Ab および A₈ に最も高い活性が認められた。次いで中性アミノ酸の A₅ および Ae に比較的高い活性が認められた。しかし、Ane には相対摂餌比が1.3、嗜好指数が13程度と低い活性しか認められなかった。以上の結果から A₅ の活性は Ae のそれに基因することが明らかになり、しかも A₅ と3種塩基性アミノ酸を含む A₈ に高い活性が認められたことから、中性および塩基性アミノ酸混合物 (An+Ab) の活性は、主として Ae (Ala+Gly+Pro) と1~3種の塩基性アミノ酸の協同効果に基づくことが示唆された。

そこで、Ae に Arg, His, Lys を 1 種ずつ併せて基本飼料に添加して、摂餌促進活性を測定した。Table I-5 に示したように、Ae と Lys を併用しても相対摂餌比が2.55、嗜好指数が44と Ae 単独とほぼ等しい活性しか認められなかったが、Ae に Arg または His を併用すると、いずれも Ae より高い活性を示し、特に His の併用効果は顕著であり A₈ の活性より優れていた。

以上の結果より、Ae と His の混合物が高い摂餌促進活性を持つ最少単位のグループとして同定された。そこで、まずこの混合物の摂餌促進活性をイソゴカイ完全合成エキスのそれと比較し、さらに本混合物の活性に対する各中性アミノ酸の寄与を明らかにする目的で、混合物から Ala, Gly および Pro を 1 種ずつ除くオMISSIONテストを行った。Table I-5 に示したよう

Table I-5. Feeding stimulant activity of mixtures of certain amino acids

| Amino acid | Diet intake (g) | | Relative diet intake | Preference index |
|------------------------------------|-----------------|---------|----------------------|------------------|
| | Test | Control | | |
| Ae* ¹ +His | 3.8 | 0.8 | 4.96 | 65 |
| Ae+Arg | 2.4 | 0.7 | 3.36 | 54 |
| Ae+Lys | 2.0 | 0.8 | 2.55 | 44 |
| A ₈ * ¹ | 3.6 | 0.9 | 3.99 | 60 |
| Ae+His | 2.8 | 0.6 | 4.84 | 65 |
| A ₄ * ² -Pro | 4.2 | 1.0 | 4.20 | 62 |
| A ₄ -Gly | 3.7 | 1.3 | 2.85 | 48 |
| A ₄ -Ala | 4.0 | 1.0 | 4.08 | 60 |
| Synthetic extract | 3.7 | 0.7 | 5.19 | 68 |

*1 Refer to Table I-4.

*2 Mixture of Ala, Gly, Pro and His.

に、Ae+His の相対摂餌比と嗜好指数はそれぞれ4.84と65と完全合成エキスを匹敵する顕著に高い値が得られたことから、イソゴカイ合成エキスのアミノ酸画分に認められた摂餌促進活性は、Ae+His、すなわち Ala, Gly, Pro および His の 4 種アミノ酸混合物 (A₄) のそれに基因することが明らかになった。また、A₄ よりいずれの中性アミノ酸を除いても活性は低下し、特に Gly を除いた場合の活性低下は著しかった。以上の 5 回にわたる実験結果を総括して Fig. I-1 に示した。

I-2-3 核酸関連物質、グリシンペタインおよびマルトースの摂餌促進活性

先の実験でイソゴカイ合成エキス中の核酸関連物質画分は、ウナギ稚魚に対して摂餌阻害活

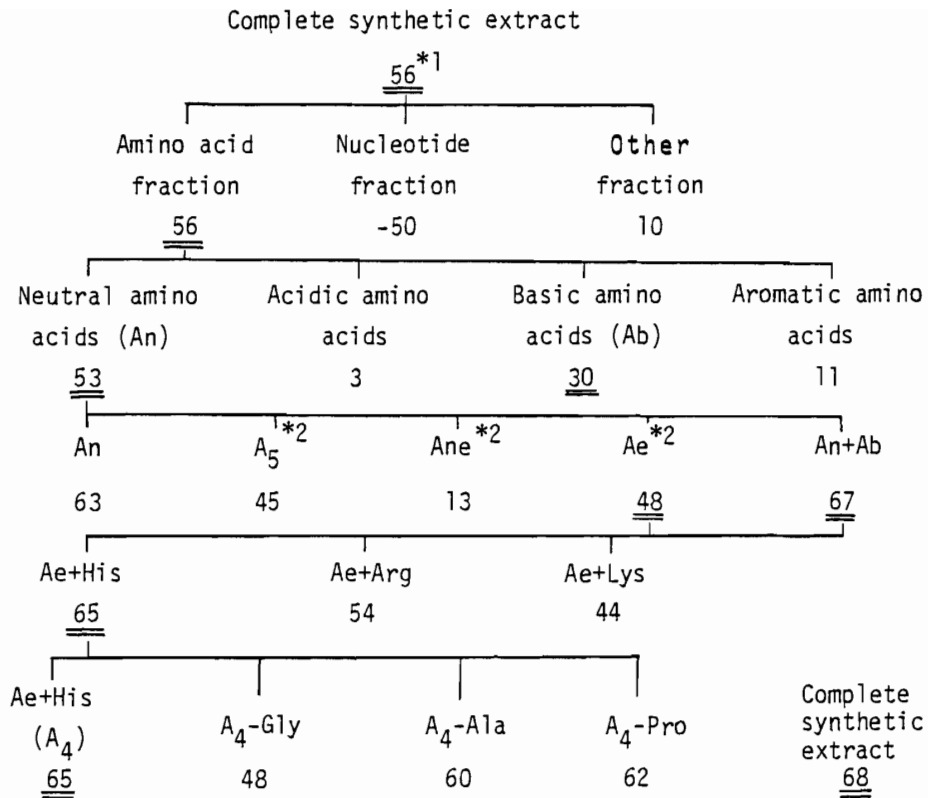


Fig. I-1. Flow chart for identification of feeding stimulants using amino acid fraction of the synthetic extract.

* 1 Preference index cited in Table I-3.

* 2 Refer to Table I-4.

性を有することが明らかになった (Table I-3)。そこで、まず本画分の主要構成成分である AMP について単独添加ならびに同画分からのオミッショントストを行った結果、Table I-6 に示したように、核酸関連物質画分の摂餌促進活性は先の結果とは異なり、嗜好指数で 7 の低い正の値が得られた。一方、AMP を本画分から除いた時の嗜好指数は -8 であった。したがって、核酸関連物質画分およびそれから AMP を除いた試験液は、イソゴカイ合成エキス中の濃度ではウナギ稚魚に対する摂餌促進活性は認められないか、もしくは極めて微弱であることが示唆された。

このように先の実験結果と多少異なる結果が得られた原因は、供試魚の再使用にあるのかもしれない。しかし、AMP を単独添加した際の相対摂餌比および嗜好指数は、それぞれ 0.59 および -26 と極めて低かったことから、AMP はウナギ稚魚に対する摂餌阻害効果を有することは明らかである。

ついで、各種核酸関連物質の活性を詳細に調べるために、本画分の構成成分である AMP, UMP, IMP と、さらに非構成成分であるが他の魚種で摂餌促進活性が明らかにされている^{10,67)}

Table I-6. Feeding stimulant activity of nucleotides, glycine betaine and maltose

| Compound | Diet intake (g) | | Relative diet intake | Preference index |
|-------------------------|-----------------|---------|----------------------|------------------|
| | Test | Control | | |
| Nucleotide fraction (N) | 1.2 | 1.1 | 1.66 | 7 |
| AMP | 1.3 | 2.2 | 0.59 | -26 |
| N-AMP | 1.3 | 1.5 | 0.85 | -8 |
| IMP•2Na* ¹ | 2.0 | 1.5 | 1.30 | 13 |
| UMP•2Na* ¹ | 2.0 | 1.2 | 1.57 | 22 |
| Synthetic extract | 3.5 | 1.0 | 3.48 | 55 |
| AMP* ¹ | 1.5 | 1.8 | 0.81 | -11 |
| GMP•2Na* ¹ | 2.5 | 1.0 | 2.50 | 43 |
| Synthetic extract | 3.7 | 1.1 | 3.43 | 55 |
| Other compound fraction | 10.3 | 5.1 | 2.03 | 34 |
| Glycine betaine | 18.8 | 8.5 | 2.22 | 38 |
| Maltose | 16.3 | 12.3 | 1.32 | 14 |

*1 Added 0.17 mmol of nucleotide to 100 g of the basal diet.

GMP の 4 種核酸関連物質を、それぞれ基本飼料100 g に0.17 mmol で単独添加し、摂餌促進活性を測定した。Table I-6 に示したように、GMP に比較的高い促進活性が、UMP と IMP にも弱い促進活性が認められたが、AMP には嗜好指数で-11という摂餌阻害活性のあることが再確認された。

次に、先の実験で、合成エキス中の他の化合物画分にも比較的高い摂餌促進活性のあることが明らかになったので (Table I-3)、本画分の主要構成成分であるグリシンベタインとマルトースの摂餌促進活性を測定した。Table I-6 に示したように、グリシンベタインの相対摂餌率および嗜好指数はそれぞれ2.22および38と本画分のそれらに匹敵していたことから、本画分の摂餌促進活性は主としてグリシンベタインの活性に基因することが明らかになった。なお、マルトースにも僅かながら摂餌促進活性が認められた。

I-2-4 4種アミノ酸混合物に対する各種核酸関連物質およびグリシンベタインの協同効果

これまでの結果より、アミノ酸画分からは Ala, Gly, Pro および His の 4 種アミノ酸混合物 (A₄) が、核酸関連物質画分からは IMP, UMP および GMP が、また他の化合物画分からはグリシンベタインがそれぞれ摂餌促進物質として同定された。そこで、これらの摂餌促進物質の

中で最も活性の高かった A₄ に、他の摂餌促進物質を一種ずつ併用添加した際の協同効果について調べた。なお、核酸関連物質は基本飼料100 g に対して0.17 mmol で、その他の化合物はすべて Table I-2 に示した濃度でそれぞれ添加した。

Table I-7 および Fig. I-2 に示したように、A₄ に UMP を併用添加するとイソゴカイ合成エ

Table I-7. Feeding stimulant activity of three nucleotides, glycine betaine, A₄ and A₄ plus nucleotide or glycine betaine

| Compound* | Diet intake (g) | | Relative diet intake | Preference index |
|---------------------------------|-----------------|---------|----------------------|------------------|
| | Test | Control | | |
| A ₄ | 5.1 | 1.6 | 3.20 | 52 |
| A ₄ +IMP•2Na | 4.2 | 1.5 | 2.72 | 46 |
| Synthetic extract | 5.4 | 1.6 | 3.29 | 53 |
| UMP•2Na | 3.7 | 3.4 | 1.07 | 3 |
| A ₄ +UMP•2Na | 13.1 | 1.2 | 10.93 | 83 |
| Synthetic extract | 10.2 | 1.6 | 6.29 | 73 |
| GMP•2Na | 6.9 | 2.7 | 2.52 | 43 |
| A ₄ +GMP•2Na | 6.7 | 1.5 | 4.32 | 63 |
| Synthetic extract | 8.2 | 1.3 | 6.53 | 73 |
| Glycine betaine | 2.4 | 1.1 | 2.09 | 35 |
| A ₄ +Glycine betaine | 3.4 | 0.8 | 4.19 | 61 |
| Synthetic extract | 2.9 | 0.6 | 4.87 | 66 |

* Nucleotide was supplemented at a concentration of 0.17 mmol/100 g diet.

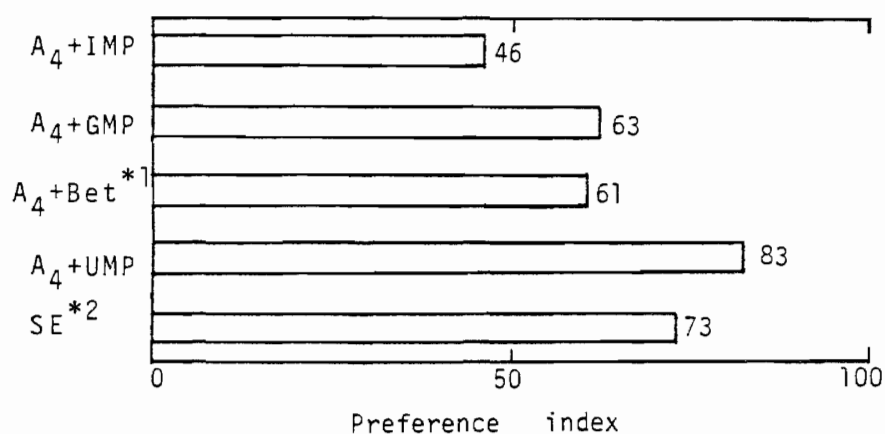


Fig. I-2. Activity of feeding stimulants containing A₄ and nucleotide or glycine betaine.

* 1 Glycine betaine.

* 2 Synthetic extract of marine worm.

キスより高い摂餌促進活性が認められた。しかし、IMP, GMP, グリシンベタインのいずれを A₄ と併用添加しても、イソゴカイ完全合成エキスに比べて僅かに低い活性しか認められなかった。以上の結果より、A₄ と UMP との併用添加、すなわち基本飼料100 g に Ala, Gly, Pro, His および UMP をそれぞれ285, 508, 217, 39 および55 mg 添加すると、協同効果が現れて、ウナギの基本飼料に対する嗜好性は顕著に改善されることが明らかになった。

I-3 考 察

ウナギは嗅覚器の構造³⁹⁾ およびその化学物質に対する電氣的応答⁵⁰⁾ から判断して、嗅覚の鋭い魚 (macrosmatic fish) とされている³⁴⁾。これまでの研究から、シラスウナギは嗅覚を用いて種々の河川水を識別できることが明らかである^{68,69)}。また、ウナギの味覚器は、channel catfish やモツゴと同様にアミノ酸に対する感受性が高く、遠隔受容器として働いていることが示唆されている⁵¹⁾。しかし、本実験条件のように限定された狭い水槽内では、ウナギがいずれの感覚器によって摂餌促進物質を知覚し摂餌行動を誘起・継続したかを明確に判断することはできない。橋本ら⁴⁸⁾ および鴻巣ら⁴⁹⁾ は、アサリエクスおよびその合成エキスを用いたオミッショントテストによりウナギ誘引物質を検索して、それらのアミノ酸画分に高い誘引活性のあることを明らかにした。しかし、この画分を構成するアミノ酸の活性を個別に調べたところ、エキス中の濃度ではすべて無効で、0.3 mmol/10 ml 以上で Arg に、0.6 mmol/10 ml 以上で Ala に、そして1 mmol/10 ml 以上で Gly にそれぞれ活性が認められたにすぎなかったことから、アサリエクスに認められた強い誘引活性は2種以上のアミノ酸の協同効果に基づくものと推定した。一方、Yoshii ら⁵⁰⁾ はウナギの上唇、口蓋前方および顔面神経から種々の化学物質に対する電氣的神経応答を記録して、10⁻² M 濃度の Ala, Gly, Pro, Arg, Lys, His, Ser および Thr に高い応答が認められたこと、ならびに Arg と Gly のいき値が10⁻⁹~10⁻⁸ M、また Ala のそれは10⁻⁸~10⁻⁷ M、とかなり低い濃度であることを明らかにした。そこで本研究では、摂餌実験によりイソゴカイ合成エキス中の活性物質を検索した結果、アミノ酸画分の摂餌促進活性が他の画分に比べて最も高く、その画分中の有効物質として Ala, Gly, Pro および His の4種アミノ酸の混合物が同定され、その活性はイソゴカイ合成エキスのそれに匹敵することが明らかになった。これらの有効アミノ酸の試験飼料中における濃度は、いずれも上記既報の有効濃度に近いかそれ以上であることから、これら有効な4種アミノ酸はおそらく味覚と嗅覚の両方の感覚器を刺激したものと思われる。いずれにしても、これらの実験結果からアミノ酸が摂餌促進物質として同定され、なかでも Ala と Gly は他魚種におけると同様に、ウナギに対しても重要な摂餌促進物質であることが判明した。一方、本研究の結果、His に中性アミノ酸混合物 (Ae) と

の協同効果が認められた点は、Arg に協同効果を認めた橋本ら⁴⁸⁾、鴻巣ら⁴⁹⁾の実験結果と少し異なっている。鴻巣らは、同一魚種を用いても摂餌促進物質同定のために使用されるエキスの種類が異なると、全く別の化合物が活性物質として同定される可能性があることを報告している⁷⁰⁾。事実、細川ら^{55,56)}のハマチの摂餌促進物質に関する研究によると、アジ合成エキスを用いた場合には核酸関連物質が、ツノナシオキアミ合成エキスを用いた場合にはアミノ酸がそれぞれ活性物質として同定されている。したがって、上述の研究者による活性アミノ酸の種類の違いは、実験に用いた合成エキスの違いに基因するものと考えられる。また、今後種々の合成エキスを用いて試験することにより未知の有効物質が同定される可能性がある。

本研究の結果、ある種の核酸関連物質はウナギの摂餌促進物質であって、GMP に比較的高い摂餌促進活性がみられ、IMP と UMP にも弱い活性のあることが明らかになった。核酸関連物質の摂餌促進活性については、これまでハマチ⁵⁵⁾、マダイ⁵⁴⁾、turbot¹⁰⁾ およびマアジ⁶⁷⁾ で認められ、IMP および GMP が主要な活性物質であることが報告されている。ところで、Mackie and Adron¹⁰⁾ は摂餌促進活性を有する核酸関連物質の構造上の特性として、プリン塩基を骨格に持ち、リボースの 5' の位置にリン酸基を持つことが活性発現の条件であることを述べている。ところが、本実験結果から、ウナギはピリミジン塩基を持つ UMP に弱いながら摂餌活性を示すことが明らかになった。池田ら⁶⁷⁾ も同様に UMP の摂餌促進活性をマアジで確認している。また、ヒガンフグ⁷¹⁾、ブリ⁷²⁾ およびモツゴ⁷³⁾ の味覚神経から UMP に対する高い電気応答が得られている。このように、ある種の魚類では UMP を知覚して摂餌行動を誘起・継続することは確かなようであるから、活性発現に必要な核酸関連物質の構造上の特性は、先に述べた Mackie and Adron のいう特性よりもさらに複雑なものと考えられる。原⁷⁴⁾ が嗅覚刺激物質の構造に関して解析しているように、物質の立体構造と受容サイトモデルからの解析が核酸関連物質の摂餌促進活性発現に必要な構造上の特性を解く鍵になるかもしれない。一方、これまで摂餌促進物質として同定された核酸関連物質の種類には魚種による相違が若干認められる。すなわち、回遊魚のハマチ⁵⁵⁾ では IMP, ADP, および ATP が、沿岸性魚類のマダイ⁵⁴⁾ およびマアジ⁶⁷⁾ ではそれぞれ IMP と ADP および IMP, GMP と UMP が、底生魚の turbot¹⁰⁾ と brill⁵²⁾ では IMP と HxR が、そして汽水性魚類のウナギでは本実験結果から IMP, GMP および UMP がそれぞれ活性物質として同定された (Fig. I-3)。これらの知見を概観すると、摂餌促進活性を持つ核酸関連物質の中で IMP が各魚種に共通して同定されていることから、ヒトの場合と同様に、魚類でも IMP を好ましい味覚物質として感知しているのかもしれない。ところが、IMP 以外の核酸関連物質の摂餌促進活性は種類の生態と関連がありそうで、回遊性→沿岸性→汽水性→底生性の魚種の順に高エネルギー化合物から順次低エネルギー化合物に移行する

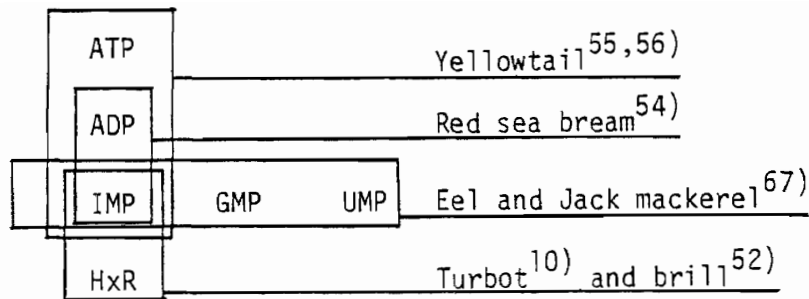


Fig. I-3. Relationship between nucleotides having feeding stimulant activity and fish species.

傾向が認められる。この傾向はこれらの魚種が摂食する餌料生物の運動力に関係するものと推察されるが、今後検討を要する興味ある課題である。

一方、AMPはウナギに対する摂餌阻害活性を有することが本実験から初めて明らかになった。これまで、魚類の忌避物質に関する報告は数多くあるが^{76,77)}、摂餌阻害物質が餌料生物のエキス中から同定された例は少なく、僅かに池田ら⁶⁷⁾がマアジに対するHxRの摂餌阻害活性を明らかにしたのみである。ウナギやマアジは軟体動物や甲殻類を好んで摂取することが知られている。これらの餌料生物にはAMP-deaminaseがなく、核酸関連物質の死後変化はIMPを経ずにAdRからHxRが生成される⁷⁸⁾。また新井⁷⁹⁾は軟体動物の死後におけるATPの急速な減少とAMPの蓄積を報告していることから、ウナギやマアジでは餌料エキス中のHxRまたはAMPを、餌料鮮度の良否を判別する指標としている可能性が推察される。

魚類の味覚神経がグリシンベタインに高い応答を示すことはウナギ⁵⁰⁾、ヒガンフグ¹⁶⁾、マダイ¹⁷⁾、モツゴ⁷³⁾などの多くの魚種で認められている。本行動実験においてもグリシンベタインのウナギに対する摂餌促進活性が認められたが、4種アミノ酸混合物(A₄)の活性に比較してかなり劣っていた。一方、Hidakaら^{7,16)}はヒガンフグで、グリシンベタインと特定のアミノ酸の摂餌促進活性の間に顕著な協同効果のあることを、またYoshiiら⁵⁰⁾はウナギで、グリシンベタインと数種のアミノ酸の味覚応答の間に相乗効果のあることを認めている。そこで、本実験でもグリシンベタインとA₄との協同効果について検討したが、顕著な活性の増大は認められなかった。この点については、両者の濃度を変化させて追試する必要がある。一方、A₄とUMPとの間に優れた相乗効果のあることが明らかになった。細川ら⁵⁶⁾はハマチ稚魚で、IMPとAla, ProおよびMetの3種アミノ酸混合物との間に相乗効果のあることを認めている。ヒトの味覚にはIMPまたはGMPとグルタミン酸ナトリウムとの間にうま味の相乗効果のあることがよく知られている^{80,81)}。この様に魚類ではプリン塩基をもつ核酸関連物質だけでなくピリミジン塩基をもつUMPとアミノ酸との間に相乗効果が認められた点は、ヒトの味覚とは異なるところ

ろである。

ウナギは通常餌料として小魚、甲殻類、貝類および環形動物を好んで摂取する⁸²⁾。これらの餌料生物のうち、魚類エキス中には魚種による差異は認められるが、His, Tau, Lys, 核酸関連物質などが比較的多く含まれている⁸³⁾。また、甲殻類、貝類、環形動物などのエキス中には Tau, Pro, Gly, Ala, Arg, グリシンベタインなどが高濃度で存在している⁸³⁾。本実験で同定されたウナギ摂餌促進物質はこれら餌料エキス中に高濃度に含まれる化合物の種類とよく一致している。また、ハマチの摂餌促進物質にも同様の一致がみられたことから^{55,56)}、魚類の摂餌促進物質を同定する際には、一般にその魚が好んで摂取する餌料生物の合成エキスをもちいてオミッシンテストを行うことが望ましい。

Sole¹²⁾ と herring⁸⁴⁾ では成長に伴う摂餌促進物質の変化が報告されている。さらに、新井⁸⁵⁾ らはニジマスでは有機酸が摂餌促進活性を示すことを認め、Yoshii ら⁵⁰⁾ もウナギの味覚神経は有機酸に高い電氣的応答を示すことを報告している。したがって、今後はウナギの成長に伴う摂餌促進物質の変化ならびに有機酸のウナギに対する摂餌促進活性について検討する必要がある。

第II章 ウナギ用配合飼料への摂餌促進物質の添加効果

前章で、イソゴカイ合成エキスに含まれる Ala, Gly, Pro, His の4種アミノ酸ならびに UMP がウナギ稚魚の摂餌促進物質であることを明らかにした。そこで、本章ではこの摂餌促進物質のウナギ養殖への応用の可能性を明らかにすることを目的として、配合飼料への摂餌促進物質の添加が、シラスウナギの餌付けに及ぼす影響、ならびにウナギ稚魚および成魚の成長・飼料効率に及ぼす影響について検討した。

II-1 シラス用配合飼料への添加効果

現在シラスウナギの餌付けにイトミミズが繁用されているが、それには考察で述べるような種々の問題点が指摘されている。そこで、イトミミズに代わる嗜好性の高い餌付け用配合飼料の開発が望まれる。本実験ではその基礎資料を得ることを目的として、市販のウナギ稚魚用配合飼料へ上記の摂餌促進物質の混合物（以下、フレーバーと略記）を添加してシラスウナギに給与し、その餌付け促進効果を調べた。

II-1-1 材料および方法

(a) 供試魚および試験水槽

高知市浦戸湾で採捕された平均体重0.15 gのシラスウナギを供試した。すなわち、既述（I-1）の試験水槽に、総体重が100 gになるようにシラスウナギを収容して所定の試験区を設けた。試験開始前3日間絶食させ、この間に飼育水温を20°Cから試験開始時の27°Cになるように徐々に上昇させた。飼育水の換水は、予備飼育から試験期間をとおして、毎日水槽の約1/3量をあらかじめ加温した新鮮な地下水と交換した。なお試験期間中の水温は27°Cに調節した。

(b) 試験飼料

本実験に用いたシラスウナギ用基本飼料ならびに市販シラスウナギ用飼料（日本農産工業KK製）の配合組成と一般成分組成を Table II-1 に示した。シラスウナギ用基本飼料の配合組成は第I章の実験で用いた基本飼料とほぼ同じであるが、シラスウナギに適した粘着性を持たせるため、 α -バレイショデンプンの約半量を小麦グルテン、ポリアクリル酸ナトリウムおよびグアガムに代替した。また、市販シラスウナギ用配合飼料には嗜好性を増す目的で、オキアミ粉末と Gly がすでに添加されている。これらの基本飼料と市販飼料にそれぞれ Table II-2 に示したフレーバー No.1 および No.2 を添加してフレーバー添加飼料を調製した。すなわち、既述の方法（I-1）で、飼料100 g 当たり脱イオン水で250 ml (No.1) または180 ml (No.2) に定容したフレーバー容液 (pH 6.8) を添加しよく練り合わせてペースト状の飼料を調製した。一

Table II-1. Compositions of basal diet and commercial diet (%)

| Ingredient | Basal diet | Commercial diet* ¹ |
|----------------------------|-----------------|-------------------------------|
| White fish meal | 40 | 66 |
| Casein (vitamin free) | 30 | — |
| Pollack liver oil (powder) | 5 | — |
| Vitamin mixture | 2* ² | — |
| Mineral mixture | 2* ² | — |
| Wheat gluten | 8 | — |
| Arginic acid · Na | 0.5 | — |
| Polyacrylic acid · Na | 0.4 | — |
| Guar gum | 1.1 | — |
| α -Potato starch | 11 | 5 |
| Proximate composition | | |
| Moisture | 7.3 | 8.0 |
| Crude protein | 59.1 | 63.0 |
| Crude fat | 7.9 | 4.9 |
| Ash | 10.2 | 11.7 |
| Digestible carbohydrate | 13.4 | 9.8 |

*1 A commercial preparation by Nihon Nosan Kogyo Co., Ltd.

*2 Halver mixture⁶³⁾.

Table II-2. Compositions of flavour mixture (mg/100 g diet)

| Component | Basal diet (No. 1) | Commercial diet (No. 2) |
|-----------|--------------------|-------------------------|
| Ala | 285 | 75.7 |
| Gly | 508 | 63.8 |
| Pro | 217 | 168 |
| His | 39.0 | 39.8 |
| UMP · 2Na | 63.0 | 62.6 |

方，対照飼料のフレーバー無添加飼料およびイトミミズエキス添加飼料はそれぞれ脱イオン水および鴻巣らの方法で⁶²⁾ エタノール抽出した100 g相当量のイトミミズエキスをフレーバー添加飼料と同様に添加して調製した。そして，これらの飼料のほかにイトミミズ（生き餌）を加

えた3種類の飼料を対照として、フレーバー添加飼料に対するシラスウナギの嗜好性を検討した。

(c) 給餌法および測定項目

同一魚群にフレーバー添加飼料と各対照飼料を同時に給与する二者択一法により添加効果を判定した。すなわち、飼料を1日3回(9:00, 13:00, 17:00)各30分間自由食で与えて2日間飼育し、両飼料の乾物摂餌量を測定して相対摂餌比および嗜好指数を算出した。

II-1-2 結果および考察

シラスウナギ用基本飼料を担体に用いた場合の試験結果を Table II-3 に示した。フレーバー

Table II-3. Feeding stimulant activity of the flavour (No. 1) for glass eel (basal diet)

| Control | Diet intake (g) | | Relative diet intake* ¹ | Preference index* ¹ |
|--|-----------------|---------|------------------------------------|--------------------------------|
| | Flavoured | Control | | |
| Water | 2.34 | 1.47 | 1.59 | 23 |
| Extract of <i>Tubifex</i> * ² | 1.61 | 3.87 | 0.42 | -41 |
| <i>Tubifex</i> | 0.11 | 0.74 | 0.14 | -74 |

*1 Refer to Table I-3.

*2 The 70% ethanol extract was prepared from 100 g of *Tubifex* sp. and supplemented to 100 g of the basal diet.

無添加飼料に対するフレーバー添加飼料の相対摂餌比および嗜好指数はそれぞれ1.59および23と高く、フレーバーに餌付け促進効果のあることが示唆されたが、イトミミズ添加飼料やイトミミズに対するフレーバー添加飼料の相対摂餌比は極端に低く、さらに嗜好指数はいずれも負の値が得られた。特にイトミミズとの間の嗜好指数は-74と極めて低い値が得られた。この結果から、フレーバーのシラスウナギに対する餌付け促進効果はイトミミズならびにイトミミズエキスに比較して劣ることが分かった。ただし、イトミミズエキス添加飼料は粘着性が著しく劣り、水中への散逸量が多かったため、表示の摂餌量は見掛の値である。また、イトミミズは生き餌であることから、シラスウナギに対する視覚刺激やペースト飼料との間の物性の差異は無視できない。そこで、イトミミズエキスを添加しても粘着性の劣化の少ない市販シラス用配合飼料を担体に用いて、シラスウナギに対するフレーバーの餌付け促進効果を再検討した。対照飼料にはイトミミズを除くフレーバー無添加飼料とイトミミズエキス添加飼料を用いた。また、市販シラス用配合飼料にはすでにオキアミ粉末と Gly が添加されていることから、フレーバー No. 1 の中性アミノ酸添加量を減量した No. 2 を用いた。Table II-4 に示すように、市販

Table II-4. Feeding stimulant activity of the flavour (No. 2) for glass eel (commercial diet)

| Control | Diet intake (g) | | Relative diet intake | Preference index |
|-----------------------------|-----------------|---------|----------------------|------------------|
| | Flavoured | Control | | |
| Water | 8.08 | 4.54 | 1.78 | 28 |
| Extract of <i>Tubifex</i> * | 8.05 | 6.01 | 1.34 | 14 |

* Refer to Table II-3.

シラス用飼料に対するシラスウナギの嗜好性は、シラスウナギ用基本飼料に対するより明らかに良好であった。また、これにフレーバーを添加するとさらに嗜好性が顕著に高まり、脱イオン水ならびにイトミミズエキスを添加した対照飼料に比べて、相対摂餌比がそれぞれ1.78ならびに1.34、嗜好指数がそれぞれ28ならびに14といずれも高い値が得られた。以上の結果から、市販シラス用配合飼料へフレーバーを添加することにより、本飼料に対するシラスウナギの嗜好性は明らかに向上し、シラスウナギを直接配合飼料に餌付けできることが明らかになった。

シラスウナギの餌付けには極度に富栄養化した下水を生息域にしているイトミミズが広く用いられている。したがって、イトミミズとともに多種類の病原菌が飼育水中に侵入する可能性は高く、特にパラコロ病菌の感染経路にイトミミズの関与していることが示唆されている⁸⁶⁾。さらに生物餌料であることから供給面にも問題がある。そこで、本フレーバーを飼料に添加することによりシラスウナギを直接配合飼料に餌付けできることが明らかになったことは、今後パラコロ病による被害の減少にもつながる。しかし、シラスウナギに対するイトミミズの摂餌促進活性は本フレーバーより優れていた。これはおそらくイトミミズの動きによる視覚刺激に基づくものと思われるが、その体内に含まれる未知の誘引物質や摂餌促進物質による化学刺激が関与している可能性もある。コイが餌料中の蛍光物質⁸⁷⁾によって誘引されたり、魚類の味覚器が有機酸^{50,85)}や糖質⁸⁸⁾にも応答することが知られているので、イトミミズに含まれているこれら化学物質に対してシラスウナギがどのような反応を示すかは、今後の興味深い課題である。

II-2 稚魚用配合飼料への添加効果

ウナギ稚魚をフレーバー添加飼料で一定期間飼育し、成長や飼料効率に及ぼすフレーバー添加の影響について検討した。

II-2-1 材料および方法

(a) 供試魚および試験水槽

市販のウナギ稚魚用配合飼料（日本農産工業KK製）で約2週間予備飼育した平均体重13.5g

のウナギを、10尾ずつ80 l容のポリアクリル水槽に収容して、飼育水温を27°Cおよび24°Cに調節したフレーバー無添加の対照区、ならびに24°Cに調節したフレーバー添加区の合計3試験区を設けた。なお、試験水槽および飼育水の換水は第I章に記したとおりである。

(b) 試験飼料

Table II-5 に示した一般成分組成の市販ウナギ稚魚用配合飼料に、表示の化学物質5種を脱イオン水に溶解したフレーバー溶液を、170 ml/100 g 飼料の割合で添加して試験飼料を調製し、また、脱イオン水のみを添加して対照飼料とした。なお、フレーバー溶液の pH は6.8に調整した。

Table II-5. Compositions of commercial diet* and flavour

| Commercial diet | % |
|-------------------------|---------------|
| Moisture | 7.9 |
| Crude protein | 51.2 |
| Crude fat | 5.5 |
| Digestible carbohydrate | 18.3 |
| Ash | 12.1 |
| Flavour | mg/100 g diet |
| Ala | 185 |
| Gly | 156 |
| Pro | 412 |
| His | 97 |
| UMP · 2Na | 150 |

* A commercial preparation by Nihon Nosan Kogyo Co., Ltd.

(c) 給餌法および測定項目

飼育水温を24°Cおよび27°Cに調節した無添加区ならびに24°Cに調節したフレーバー添加区に、それぞれの飼料を1日1回、午前9時に約30分間自由食で与えて20日間飼育した。この間の各区の摂餌量（乾物）ならびに増重量を測定するとともに、日間摂餌率、増重率および飼料効率（増重量×100/乾物摂餌量）を算出して、フレーバー添加効果を判定した。

II-2-2 結果および考察

Table II-6 に各試験区の20日間の飼育成績を示した。期間中の摂餌量はフレーバー添加区（24°C）に最も多く、対照の両無添加区では24°Cの区より27°Cの区に多かった。しかし日間摂餌

Table II-6. Effect of the supplementation of the flavour to commercial diet on growth and feed efficiency of eel reared at 24°C and 27°C

| | 24°C Flavoured | 24°C Unflavoured | 27°C Unflavoured |
|------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| No. of fish | | | |
| Initial | 10 | 10 | 10 |
| Final | 10 | 10 | 10 |
| Av. body weight (g) | | | |
| Initial | 13.5 | 13.3 | 13.5 |
| Final | 18.3 | 16.1 | 16.2 |
| Total weight gain (g) | 48.0 | 28.0 | 26.4 |
| Growth rate (%) | 35.6 | 21.1 | 20.0 |
| Feed intake (g) | 39.9 | 27.5 | 33.7 |
| Daily feeding rate (%) | 1.3 | 0.9 | 1.1 |
| Feed efficiency (%) | 120.4 | 101.9 | 78.4 |

率に換算すると顕著な区間差はなく、添加区と27°C無添加区との値の差は僅かに0.2%であった。総増重量は添加区で48.0 gと最も多く、ついで24°C無添加区、27°C無添加区の順となった。飼料効率も増重量と同様に、添加区、24°C無添加区、27°C無添加区の順に低下した。

以上の結果から、配合飼料へフレーバーを添加することによって、ウナギの摂餌量が増すばかりでなく、成長や飼料効率も向上することが明らかになった。添加したフレーバーにはウナギの必須アミノ酸である His が含まれているが、試験飼料には His 含量の高い北洋魚粉がタンパク質源として多量に配合されているので、フレーバー (His) の添加により飼料のタンパク質の栄養価が改善されたとは考えられない。したがって、良好な飼育成績の得られた原因はおそらく飼料へのフレーバーの添加により、ウナギの化学感覚器が刺激された結果、飼料の消化・吸収が促進されたためではないかと推察される。ほ乳類では視覚、嗅覚および味覚刺激に基づく摂食の予知が、唾液、胃液、膵液などの消化液の生成と分泌を誘発し、摂食した食物の消化吸収作用を促進することが知られている²⁶⁾。おそらく、フレーバー添加飼料を摂取したウナギ稚魚でも、ほ乳類の場合と同様に消化液分泌が促進されたものと推察される。一方、本実験により、稚ウナギの飼育水温を27°Cから24°Cに下げても、飼料へフレーバーを添加することにより27°Cの無添加区より優れた飼育結果の得られることが明らかになった。この結果は、ウナギの加温養殖における省エネルギーを図る際に、飼料へのフレーバー添加が役立つことを示唆していて興味深い。

II-3 成魚用配合飼料への添加効果

本章II-2で、ウナギ稚魚用配合飼料へフレーバーを添加すると成長や飼料効率が向上することを明らかにした。本実験ではウナギ成魚を対象に同様の実験を行い、飼育成績に及ぼす飼料へのフレーバー添加の影響について調べた。

II-3-1 材料および方法

(a) 供試魚および試験水槽

高知市内の養殖業者から購入したウナギを、市販のウナギ成魚用配合飼料（日本農産工業KK製）で20日間予備飼育した。240 l容の塩ビ角型水槽（80×60×50 cm）に、平均体重78 gのウナギを30尾ずつ収容して2試験区を設けた。各試験水槽には循環ろ過装置を取り付けて通気し、飼育水温を24°Cに調節した。また、給餌後に飼育水の約1/3をあらかじめ24°Cに加温した新鮮な地下水と交換した。

Table II-7. Compositions of basal diet and flavour

| Basal diet | % |
|---|------|
| White fish meal | 40 |
| Casein (vitamin free) | 30 |
| Pollack liver oil (powder) | 5 |
| α -Potate starch | 21 |
| Vitamin mixture* | 2 |
| Mineral mixture* | 2 |
| Proximate composition (on dry weight basis) | |
| Crude protein | 55.3 |
| Crude fat | 5.5 |
| Digestible carbohydrate | 22.9 |
| Ash | 8.3 |
| Flavour | |
| Ala | 285 |
| Gly | 508 |
| Pro | 217 |
| His | 39 |
| UMP · 2Na | 63 |

* Halver mixture⁶³⁾.

(b) 試験飼料

試験に用いた配合飼料の組成、その一般成分組成およびフレーバーの組成を Table II-7 に示した。この配合飼料に、II-2 で記した方法でフレーバーを添加したペースト状のフレーバー添加飼料と、対照の脱イオン水のみを添加した無添加飼料を調製した。

(c) 給餌法および測定項目

フレーバー添加区と対照の無添加区のウナギに、午前9時から約30分間自由食でそれぞれの飼料を給与して25日間飼育した。期間中の両区の摂餌量（乾物）および増重量を求めて、日間摂餌率、飼料効率ならびに各種蓄積率を算出した。また、飼育終了時の摂餌6時間後に、両区より3尾ずつ採取して全魚体の一般分析を行った。

II-3-2 結果および考察

両区の飼育成績を Table II-8 に示した。フレーバー添加区における総摂餌量は452 g であったのに対して、無添加区では401 g とかなり少なかった。しかし、体重を考慮した日間摂餌率は区間差が認められなかった。この結果は、両区の間摂餌量の差は認められたが、体重当たりのエネルギー摂取量には差のないことを示している。

Table II-8. Performance of eel fed flavoured and control diet for 25 days

| | Flavoured | Control |
|--------------------------|-----------|---------|
| No. of fish | 30 | 30 |
| Av. body weight (g) | | |
| Initial | 77.6 | 77.7 |
| Final | 93.3 | 80.6 |
| Total weight gain (g) | 489.0 | 201.2 |
| Feed intake (g) | 451.8 | 401.1 |
| Daily feeding rate (%) | 0.70 | 0.66 |
| Survival rate (%) | 100 | 93.3 |
| Feed efficiency (%) | 108.2 | 50.2 |
| Protein efficiency ratio | 1.96 | 0.91 |
| Protein retained (%) | 34.4 | 16.0 |
| Fat retained (%) | 334.5 | 148.4 |
| Energy retained (%) | 78.6 | 35.9 |

フレーバー添加区の増重量と飼料効率は、対照の無添加区のそれらの約2倍であった。また、タンパク質効率ならびにタンパク質、脂質およびエネルギーの各蓄積率もフレーバー添加区のほうがはるかに優れていた。以上の結果から、先に述べたウナギ稚魚の場合（II-2）と同様に、ウナギ成魚の場合も、フレーバーの添加により飼料の栄養価が改善されることが明らかになった。

全魚体の一般分析結果を Table II-9 に示した。この表から明らかなように、両区の各成分には区間差は認められなかった。この結果は、飼料へフレーバーを添加しても魚体各成分に悪い影響を及ぼさないことを示唆している。

Table II-9. Proximate composition of eel fed flavoured and control diet (%)

| | Moisture | Crude protein | Crude fat | Ash |
|------------|----------|---------------|-----------|-----|
| Whole body | | | | |
| Initial | 65.6 | 16.3 | 15.9 | 1.8 |
| Final | | | | |
| Flavoured | 65.0 | 17.6 | 17.0 | 2.2 |
| Control | 65.0 | 17.6 | 16.3 | 1.8 |

伊奈ら⁸⁹⁻⁹¹⁾は、植物タンパク質を主原料とする飼料へ魚類の内臓自己消化物を添加してマダイを飼育し、市販配合飼料で飼育したマダイの成長や飼料効率に匹敵する優れた飼育成績が得られたことを報告している。この原因について、飼料脂質含量の差異とともに植物タンパク質の制限アミノ酸が、魚類内臓自己消化物を添加することによって補足され、アミノ酸バランスが改善されたことがあげられるが、魚類内臓自己消化物中に存在する誘引物質や摂餌促進物質がマダイの化学感覚器を刺激することにより、消化されにくい植物タンパク質の消化・吸収が促進されて、飼料の栄養価が改善されたことも一因として考えられる。Metailler ら²⁶⁾は、摂餌促進物質の混合物を添加した配合飼料で、dover sole を飼育した結果、無添加飼料を摂取した魚に比べて良好な飼育成績が得られたことを報告している。これは、飼料への摂餌促進物質の添加が供試魚の摂餌活性を高めて、摂餌時間が短縮されたことから、飼料成分の水中への流失がある程度抑制されたこと、ならびに摂餌促進物質が間接的に代謝調節に良い影響を及ぼしたことに基因するものと推察している。Yamada and Yone⁹²⁾は、コイを用いてそしゃくによる飼料中のアミノ酸損失率を調べ、それが意外に高いことを報告している。したがって、本実験

で得られたフレーバー添加区的良好な飼育成績は、摂餌促進物質をフレーバーとして飼料へ添加することによりウナギの嗜好性が向上して、飼料の摂餌時間が短縮され飼料の真の摂取率が高まったことに基因しているのかもしれない。また、ほ乳類では味覚への甘味刺激が速やかなインシュリン分泌を促すことが知られている^{93,94)}。したがって、フレーバー添加区のウナギでは消化吸收作用が促進されるだけでなく、代謝調節にかかわるインシュリンの分泌も促進されていたのかもしれない。以上の推察を裏付けるためには、飼料へフレーバーを添加することにより、ウナギの消化・吸収過程および肝臓酵素活性が、どのような影響を受けるかを詳細に検討する必要がある。しかし、魚類ではこれらの事柄に関する知見はまだ見当たらない。

第Ⅲ章 摂餌後のウナギ消化酵素活性の経時変化

第Ⅱ章で、摂餌促進物質を飼料用フレーバーとして配合飼料に添加して、ウナギ稚魚および成魚を飼育すると、成長、飼料効率ならびに各種蓄積率が無添加飼料で飼育したものに比べて顕著に向上することを明らかにした。この良好な飼育成績の得られた原因に、飼料の真の摂取率の向上、消化吸収の促進ならびに栄養代謝への好影響が推察された。そこで、本章では配合飼料摂取後の消化吸収に及ぼすフレーバー添加の影響を明らかにするため、まず予備実験として、消化管とその内容物における消化酵素の経時変化について調べた。これまで、ウナギの消化酵素に関して2, 3の報告があるが^{95,96)}、飼料摂取に伴う消化酵素活性の経時変化やその分泌機構についての知見は見当たらない。一方、大西ら^{97,98)}はコイを用いて配合飼料摂取後の消化酵素活性の経時変化を調べている。

Ⅲ-1 材料および方法

(a) 供試魚、飼育方法および試料採集方法

高知市内の養殖業者より購入したウナギ成魚を市販配合飼料（日本農産工業KK製）で2週間予備飼育したのち、平均体重118 gのウナギを、第Ⅰ章で記した80 l容ポリアクリル水槽に4尾ずつ収容して5試験区を設けた。飼育水温は27°Cに調節した。試験飼料には、Table III-1に示

Table III-1. Compositions of basal diet and flavour

| Basal diet | % |
|----------------------------|---------------|
| White fish meal | 40 |
| Casein (vitamin free) | 30 |
| Pollack liver oil (powder) | 6 |
| Vitamin mixture* | 2 |
| Mineral mixture* | 2 |
| α -Potato starch | 20 |
| Flavour | mg/100 g diet |
| Ala | 285 |
| Gly | 508 |
| Pro | 217 |
| His | 39 |

* Halver mixture⁶³⁾.

す基本飼料に Ala, Gly, Pro および His の 4 種アミノ酸から成る摂餌促進物質（フレーバー）を添加したペースト状の飼料を用いた。そして24時間絶食の各区のウナギに約40分間上記のフレーバー添加飼料を自由食で給与し，0，1，3，5，12時間後に各水槽から順次4尾を取り上げ，消化管とその内容物を採取し秤量した後，消化酵素活性の分析に供した。なお，摂餌0時間後には絶食したウナギを用いた。

(b) 酵素活性測定法

胃および腸組織はそれぞれの内容物を取り除いてから，その9倍量の氷冷脱イオン水ならびに少量の海砂とともにガラスホモジナイザーで磨砕した。一方，胃および腸内容物は，その9倍量ないし19倍量の氷冷脱イオン水とともに同様に磨砕した。得られたホモジネートを20分間，5000 rpm，0°Cで遠心分離して，その上清部を粗酵素液として酵素分析に供した。これらの操作はすべて0°C～5°Cの範囲で行った。なお，得られた粗酵素液は分析に供すまで-20°Cで凍結保存し，酵素分析に際して適量の氷冷脱イオン水で希釈し酵素活性を測定した。また，粗酵素液の窒素量はセミマイクロケールダール法で測定した。

摂餌1時間後の腸内容物は極めて少なかったことから，4尾分をまとめ一試料として分析した。また摂餌5時間および12時間後にはそれぞれ1尾および2尾の消化管に内容物が認められなかった。

ペプシン様酵素 (EC 3.3.4.1) およびトリプシン様酵素 (EC 3.4.4.4) の活性は Casein-Folin 法⁹⁸⁾ で測定した。すなわち，胃組織およびその内容物のペプシン様酵素活性は pH 2.5，30°C，20分間，腸およびその内容物のトリプシン様酵素活性は pH 9.5，30°C，20分間それぞれ反応させて遊離する Tyr 量を測定した。これらの pH は既報⁹⁵⁾ の至適 pH を参考にした。両プロテアーゼ活性は組織または内容物 1 g 当たり，体重100 g 当たりおよび酵素タンパク質 1 mg 当たりで1分間に遊離した 1 μ mol の Tyr を 1 unit と定義し，それぞれ g 当たりの活性，全活性および比活性として表示した。

腸組織およびその内容物のアミラーゼ (EC 3.2.1.1) 活性は Tauber-Kleiner 法¹⁰⁰⁾ を改変した Kawai and Ikeda¹⁰¹⁾ の方法によった。すなわち，pH 6.2，30°C，60分間の反応で遊離したグルコースを測定した。アミラーゼ活性は先のプロテアーゼ活性と同様に，1分間に遊離する 1 μ mol のグルコースを 1 unit と定義し，それぞれ g 当たりの活性，全活性および比活性として表示した。

III-2 結果および考察

III-2-1 胃組織とその内容物におけるペプシン様酵素活性の経時変化

摂餌後の胃組織およびその内容物におけるペプシン様酵素活性の経時変化を Fig. III-1 に示した。なお、図中の活性値はいずれも4尾についての平均値を示す。

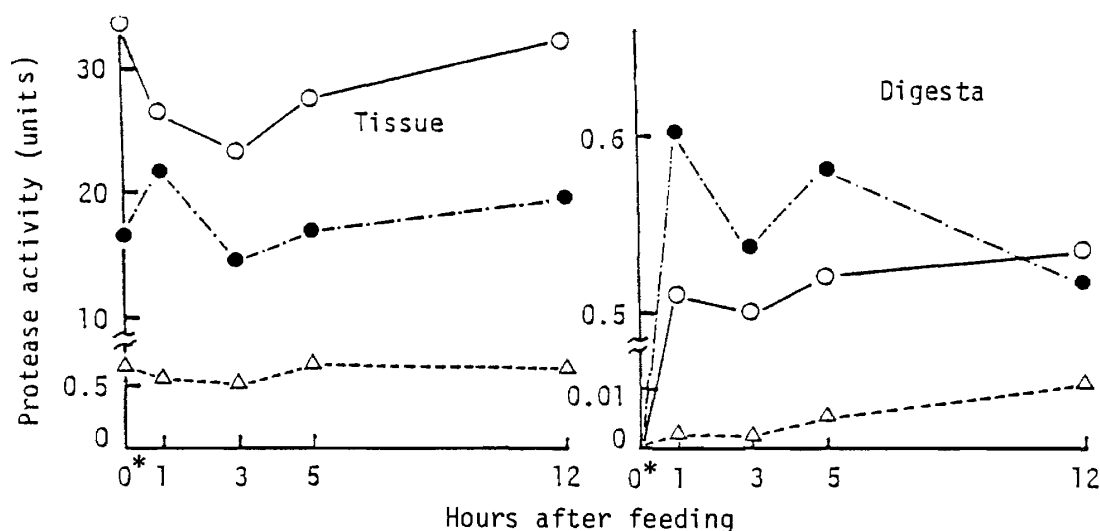


Fig. III-1. Changes in protease activity of gastric tissue and digesta of eel after feeding.

○—○ per g tissue or digesta, ●—● total activity, △—△ specific activity.

* No digesta at 0 hours.

いずれの活性表示法でも、これらの経時変化に同じ傾向が認められた。すなわち、胃組織における活性の経時変化は、摂餌後減少して3時間後に最低になり、その後12時間後まで徐々に増大した。ところが、胃内容物の活性は組織の活性に比べて著しく低い活性しか認められず、しかも摂餌12時間後まで大きな変化は認められなかった。この様に、胃組織では高いペプシン様酵素活性が認められ、しかも摂餌3時間後までかなり減少していたことから、胃内腔へペプシン様酵素がかなり分泌されていたものと推察されるが、胃内容物における活性は上昇せず、著しく低い水準で推移した。この結果は、胃組織より多量の胃液が分泌されても、その大部分が消化液として作用せずに、胃内容物とともに比較的速やかに腸内腔に移行することを示唆している。そこで、摂餌後の胃内容物におけるpHの経時変化を、表面と内部に分けて測定し、その結果を Fig. III-2 に示した。胃内容物表面におけるpHは摂餌3時間後に4.2の比較的低い値を示した以外は、いずれの経時時間でもpH 5.2前後で大きな変化は認められなかった。また、胃内容物内部におけるpHも飼料自体のpH 5.6前後で推移していた。この様に、胃内容物におけるpHは摂餌後ほとんど低下しなかったことから、先に示したように、分泌された胃液は速や

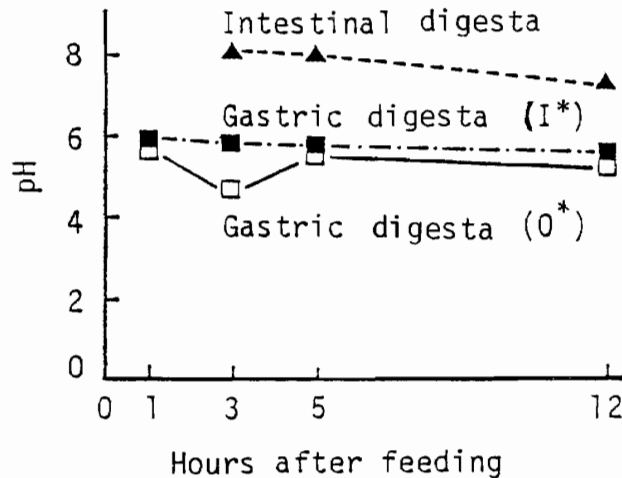


Fig. III-2. Changes in pH of gastric and intestinal digesta of eel after feeding pH 5.6 diet.
I * inner part, O * outer part.

かにその内容物とともに腸内腔へ移行したものと推察される。さらに、森下ら⁹⁵⁾はウナギペプシンの至適 pH は2.5付近であることを報告しているので、本実験で認められたような高い pH 条件下では、多量のペプシン様酵素が分泌されても、十分にタンパク質を加水分解できるかどうか疑わしい。

一般的に、肉食性の魚類の胃組織におけるペプシンおよびペプシン様酵素活性は高いことが知られていて^{95,102)}、消化過程における胃でのタンパク質消化作用が重要視されている。安永は¹⁰³⁾ハマチ消化管の組織学的研究の結果、胃組織でのペプシン様酵素活性が高いことを確認したが、この高い活性が直接胃での消化作用に関連するかどうか疑問であると述べている。したがって、本実験で認められたように、ウナギ胃内容物における低ペプシン様酵素活性は、消化過程における胃の役割に関して、これまでの知見とは異なる役割のあることを示唆しているように考えられる。ちなみに、高等ほ乳類では胃の働きはタンパク質消化器官としての役割よりは、むしろ腸内腔での本格的な消化吸收作用を受けるための準備段階として、摂取した食物をいったん溜めておく貯蔵器官の役割をもっていることが明らかにされている^{28,104)}。ウナギの胃もほ乳類のそれに類似する役割を持つのかもしれない。

III-2-2 腸組織とその内容物におけるトリプシン様酵素およびアミラーゼ活性の経時変化

摂餌後の腸組織とその内容物におけるトリプシン様酵素およびアミラーゼ活性の経時変化を Fig. III-3 および III-4 に示した。図中の活性値はいずれも4尾についての平均値を示す。また、

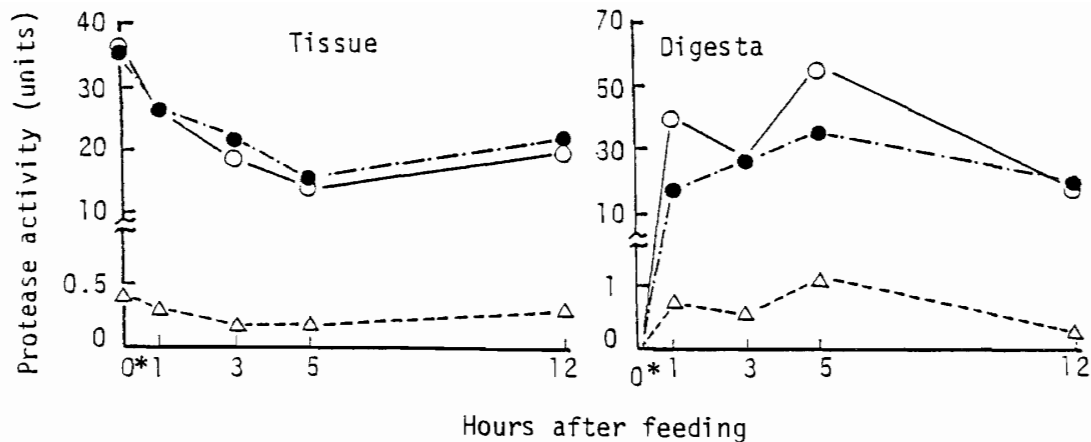


Fig. III-3. Changes in protease activity of intestinal tissue and digesta of eel after feeding.

○—○ per g tissue or digesta, ●—·—● total activity, △-----△ specific activity.

* Refer to Fig. III-1.

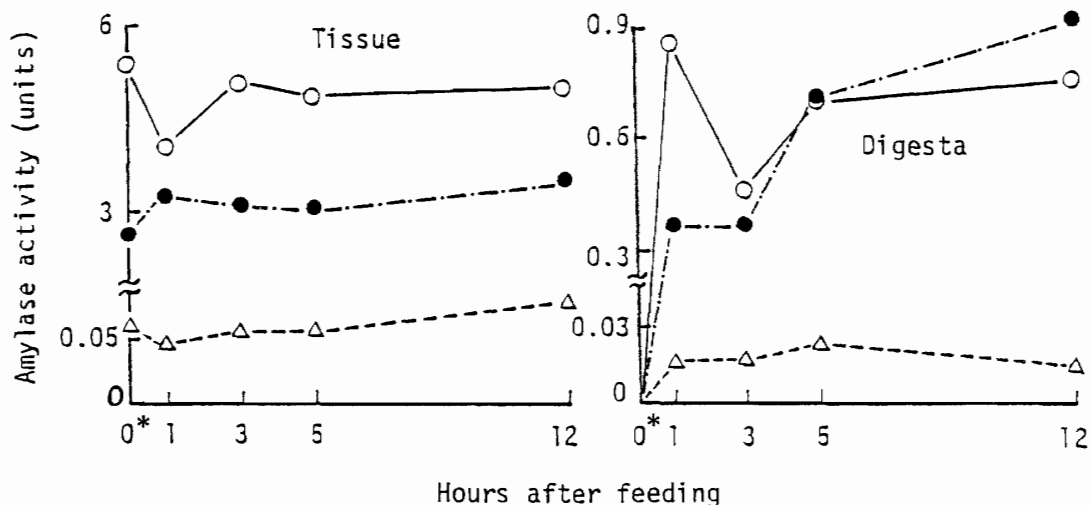


Fig. III-4. Changes in amylase activity of intestinal tissue and digesta of eel after feeding.

○—○ per g tissue or digesta, ●—·—● total activity, △-----△ specific activity.

* Refer to Fig. III-1.

これらの活性の経時変化はいずれの活性表示法で示しても同様な傾向がみられたので、ここでは全活性の変化について示した。腸組織のトリプシン様酵素活性は摂餌後急速に低下して、5時間後に最低になった。その後活性は徐々に上昇して12時間後には0時間後における活性の約70%にまで回復した。一方、腸内容物におけるトリプシン様酵素活性は、その組織での活性とは対照的な経時変化を示し、しかも胃内容物におけるペプシン様酵素活性に比較して顕著に高かった。すなわち、その活性は摂餌後上昇して5時間後に最高になり、その後急速に低下して

12時間後には最低値を示した。

腸組織のアミラーゼ活性は、摂餌後大きな変化を示さず比較的安定した経時変化が認められたのに対して、腸内容物における活性は腸組織の活性に比べて著しく低かったが、摂餌3時間後から5時間後にかけて増大し、その後一定かもしくは僅かに増大する傾向にあった。

以上の結果から、腸内容物におけるトリプシン様酵素活性は、胃内容物のペプシン様酵素活性に比較して顕著に高く、しかも摂餌後から5時間後にかけて速やかに上昇すること、ならびにアミラーゼ活性は低レベルで推移するが、摂餌後徐々に増大する傾向にあることが明らかになった。この腸内容物における両消化酵素活性の経時変化から推察すると、ウナギ腸内腔へのトリプシン様酵素の分泌はアミラーゼに比べて摂餌後比較的速やかで、しかも多量に分泌されるものと思われる。そこで、この両酵素の分泌機序の相違をさらに明らかにするために、腸内容物とその組織におけるトリプシン様酵素活性とアミラーゼ活性との比を、全活性の値を用いて各経過時間毎に算出し Table III-2 に示した。まず、腸内容物における活性比は摂餌3時間後まで速やかに低下し、その後徐々に増大して12時間後には1時間後の値の約2倍にまで達した。一方、腸組織における活性比は摂餌後増大して5時間後に最高に達し、12時間後にかけて僅かに減少した。大西ら^{97,98)}はコイを用いて同様に摂餌後の腸内容物とその組織における両酵素の活性比を調べて、腸内容物では摂餌3時間後まで減少し、それ以後増大することを認めている。このように、ウナギでも無胃魚のコイと同様に腸内容物における両酵素活性比の経時変化が認められたこと、ならびに、ウナギ腸内容物のトリプシン様酵素活性が胃内容物のペプシン様酵素活性に比べて著しく高かったことを併せて考えると、有胃魚のウナギでも摂取した飼料の消

Table III-2. Ratios* of amylase activity to protease activity in intestinal digesta and tissue at intervals after feeding

| Hours after feeding | Ratio | |
|---------------------|---------|--------|
| | Digesta | Tissue |
| 0 | — | 76.3 |
| 1 | 22.3 | 123.1 |
| 3 | 14.0 | 146.5 |
| 5 | 20.2 | 197.1 |
| 12 | 53.0 | 158.5 |

*Ratio was calculated from the following formula ; Ratio=

$$\frac{\text{Total activity of amylase} \times 10^3}{\text{Total activity of protease}}$$

化は主に腸内腔で行われるのかもしれない。この活性比の経時変化から、ウナギでも摂餌後に腸内腔へトリプシン様酵素がアミラーゼより速やかに分泌されることが確認されたことは、魚類のタンパク質に対する要求性の高いこと^{105,107)}に関連するものと解釈される。また、アミラーゼの分泌が摂餌数時間を経て認められ、しかも腸内容物での活性が低かったことは、摂餌後の比較的早い時間に腸内腔に多量の糖質が存在していてもこれを十分に消化できないことを示している。さらに、Fig. III-4 にみられるようなウナギ腸内容物におけるアミラーゼ活性の緩やかな増大から推察すると、ウナギの場合もコイ、マダイ、ハマチなどの場合¹⁰⁸⁾と同様に、摂餌後におけるインシュリン分泌が比較的緩やかであるのかもしれない。これは今後の興味ある課題である。

III-2-3 消化管内容物量と消化酵素活性

体重100 g 当たりの胃内容物ならびに腸内容物の重量、つまり、比胃内容物重量ならびに比腸内容物重量を算出し、これらと体重100 g 当たりのペプシン様酵素、トリプシン様酵素およびアミラーゼの各活性との相関を調べ、Fig. III-5 に示した。比胃内容物重量とペプシン様酵素活性との間には、相関係数0.39と低い相関しか認められなかったのに対して、比腸内容物重量とトリプシン様酵素またはアミラーゼ活性との間には、それぞれ0.72および0.76のいずれも5%の危険率で有意な正の相関係数が得られた。

以上の結果は、腸内容物のトリプシン様酵素活性およびアミラーゼ活性は、内容物1 g 当たりの活性で表示すると、摂餌後の時間による差異は少なく比較的一定であることを示している

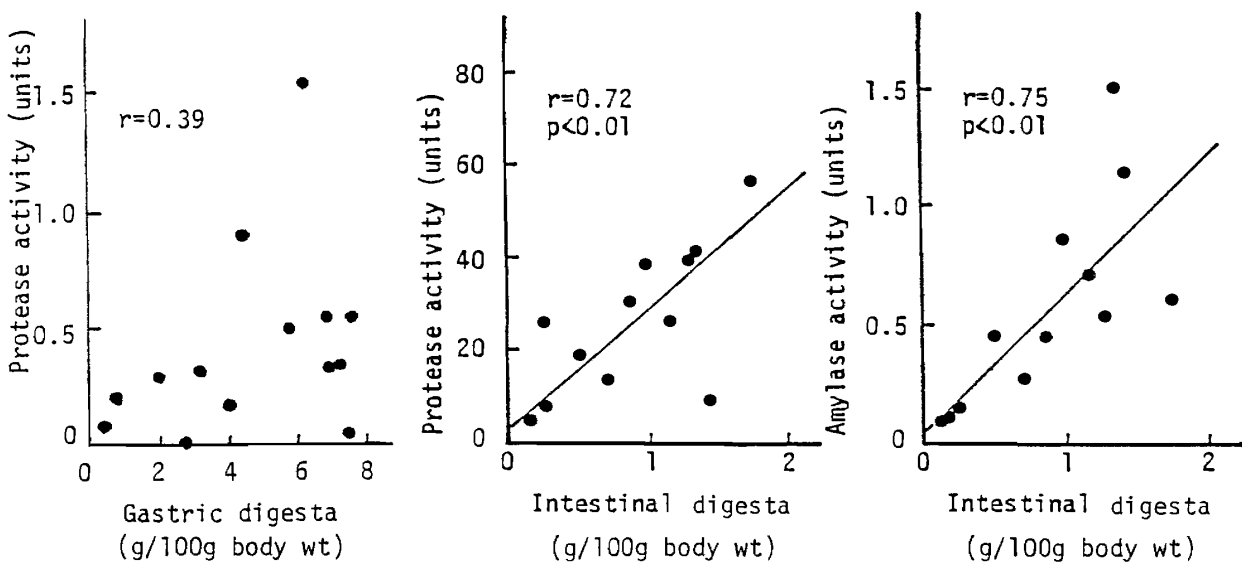


Fig. III-5. Relationships of gastrointestinal digesta and those enzyme activities in eel after feeding.

ともに、胃より腸内腔に移行する内容物量の変化に応じて、両酵素の分泌量が調節されていることを示唆している。Greenら¹⁰⁹⁾はラット膵臓酵素の分泌機構について調べ、トリプシンおよびキモトリプシンの分泌は腸内腔に移行した食塊中のタンパク質含量に応じて調節されていることを明らかにした。また、Meyer¹¹⁰⁾もイヌ膵臓の消化酵素分泌刺激について調べたところ、腸内容物中の Tyr, Phe など芳香族アミノ酸が分泌刺激となり、これらのアミノ酸含量が多いと分泌量が増大することをみた。これらの報告からも、ほ乳類における膵液分泌は十二指腸に移行した食塊量やそれに含まれる物質によって調節されていることは確かであろう。本実験から、ウナギでも腸内腔へのトリプシン様酵素やアミラーゼの分泌が、胃から腸に移行した内容物量によって調節されていることが示唆された。魚類にもほ乳類に類似した腸内腔への消化酵素分泌機構があるのかもしれない。

本章の実験結果を総合考察すると、(1)胃内容物中のペプシン様酵素活性は組織に比べて顕著に低かったことから、胃は消化器官としての役割よりは貯蔵器官としての役割を持つことが示唆された。(2)腸内容物でのトリプシン様酵素活性が高く維持されていたことから、飼料タンパク質は主に腸内腔で消化されることが推察された。(3)腸内容物のアミラーゼ活性は摂餌後徐々に増大する傾向にあったが、腸組織のアミラーゼ活性に比べてかなり低く、ウナギの飼料糖質の利用能の低さとの関連性が類推された。(4)腸内腔へのトリプシン様酵素およびアミラーゼの分泌は、胃より腸へ移行した内容物の量に対応して調節されていることが示唆された。

第IV章 飼料への摂餌促進物質の添加がウナギの消化酵素および肝臓酵素の活性に及ぼす影響

第II章で、配合飼料への摂餌促進物質の添加は、ウナギの成長や飼料効率を向上させる効果のあることを明らかにした。この効果は真の摂餌率が改善されたことが直接の要因であろうが、化学感覚器に対する刺激が飼料の消化吸收ならびに代謝の機能を高めたことも間接的な要因であろうと推察される。そこで、本章では摂餌促進物質をフレーバーとして添加した飼料をウナギに給与して一定期間飼育し、摂餌後の消化酵素活性と消化率ならびに糖質・アミノ酸の異化代謝に関与する肝臓酵素活性を測定して、無添加飼料で飼育したウナギのそれらと比較検討し、摂餌促進物質の添加が消化吸收および代謝機能に及ぼす影響を明らかにしようとした。

ほ乳類では化学感覚を含む摂食の予知が唾液、胃液などの消化液分泌を増大させて栄養素の消化や吸収を促進させるだけでなく、インシュリン分泌を増大させて、吸収された各栄養素の代謝をより活発にすることが知られている^{93,94)}。ウナギにもこの様な機構のあることが予想される。

IV-1 消化酵素活性および消化率に及ぼす影響

飼料へのフレーバーの添加が、消化器官とその内容物における各消化酵素活性ならびにタンパク質・糖質の消化率に及ぼす影響について検討した。

IV-1-1 材料および方法

(a) 供試魚、試験水槽および飼料

本実験に供したウナギ、試験水槽および試験飼料は、いずれも第II章第3節に記したとおりである。

(b) 試験方法

第III章での結果から、腸内容物におけるアミラーゼとトリプシン様酵素活性の比が摂餌3時間後に最低になること、ならびに腸内容物におけるアミラーゼ活性は摂餌5時間以後ほぼ一定かまたは僅かに上昇する傾向のあることが明らかになった。そこで、本実験では第II章第3節の飼育終了日に、フレーバー添加区と対照の無添加区から摂餌3および6時間後に無作為に4尾ずつ取り上げて、各固体より注意深く消化管を採取し、それぞれ胃、膵臓を含む腸組織ならびにそれらの内容物に分けて秤量した後分析に供した。

(c) 酸素分析方法

胃組織およびその内容物におけるペプシン様酵素活性、膵臓を含む腸組織とその内容物におけるトリプシン様酵素およびアミラーゼ活性は、いずれも第III章に記した方法で測定した。これらの酵素活性は1分間の反応で遊離する1 μmol の Tyr またはグルコースを1 unit と定義して、組織または内容物1 g 当たりならびに体重100 g 当たりの活性に換算して表示した。

(d) 消化率およびトリクロル酢酸 (TCA) 可溶性窒素量

飼料タンパク質および糖質に対するみかけの消化率を酸化クロムを指標とする間接法により測定した。すなわち、飼育終了日の5日前より酸化クロムを含む飼料を与えて、終了日の摂餌6時間後に両区のウナギから全腸内容物を採取して分析試料とした。なお、酸化クロム、タンパク質および糖質の定量法は、それぞれ古川ら¹¹¹⁾の湿式灰化法、セミマイクロケールダール法およびフェノール硫酸法¹¹²⁾によった。

胃内容物中の TCA 可溶性窒素量はセミマイクロケールダール法によった。すなわち、終了日の摂餌6時間後に両区のウナギから胃内容物を採取し、10% TCA (w/v) 溶液とともにホモジナイズした。このホモジネートを3000 rpm, 20分間, 0°Cで遠心分離して得られた上清画分を試料として測定した。

IV-1-2 結 果

(a) 消化器官とその内容物重量

飼育終了日の摂餌3および6時間後における両区の胃、腸ならびにそれらの内容物重量（湿重量）を、体重に対する百分率に換算し、それぞれ比胃重、比腸重ならびに比胃内容物重、比腸内容物重として Table IV-1 に示した。

Table IV-1. Relative weights of liver, gastrointestinal organ and digesta to body weight after feeding (%)

| | After 3 hours | | After 6 hours | |
|--------------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------------|
| | Flavoured | Control | Flavoured | Control |
| Body weight (g) | 99.5 \pm 19.9 | 90.2 \pm 15.2 | 117.1 \pm 15.8 | 91.4 \pm 18.5 |
| Liver | 1.63 \pm 0.31 | 1.74 \pm 0.21 | 1.42 \pm 0.21 | 1.70 \pm 0.16 |
| Gastric organ | 0.74 \pm 0.19 | 0.67 \pm 0.24 | 0.51 \pm 0.13 | 0.55 \pm 0.12 |
| Gastric digesta | 1.40 \pm 0.44 | 1.76 \pm 0.32 | 0.83 \pm 0.79 | 0.71 \pm 0.42 |
| Intestinal organ | 1.47 \pm 0.19 | 1.66 \pm 0.04 | 1.22 \pm 0.08 | 1.52 \pm 0.12 |
| Intestinal digesta | 0.35 \pm 0.16 | 0.69 \pm 0.08 | 0.21 \pm 0.03 | 0.80 \pm 0.22 |

比胃重と比胃内容物重には両区間に差異は認められなかった。ところが、比腸重はいずれの経過時間でも無添加区に比べてフレーバー添加区に小さくなる傾向が認められた。さらに、フレーバー添加区の比腸内容物重は、いずれの時間でも無添加区より有意に少なく、摂餌後経時的に減少していたのに対して、無添加区では逆に増大していたことが特に注目された。

そこで、摂餌後における消化官内容物重量（体重％）の経時変化を Fig. IV-1 に示した。なお、0 時間の胃内容物量は湿重量での給餌率におきかえて表示した。消化管内容物量を湿重量で示すことには多少問題があるが、胃内容物はいずれの区でも給餌後速やかに減少して、摂餌 6 時間後には 0 時間の約半量以下にまで減少した。一方、比腸内容物量の変化には明らかな区間差がみられ、フレーバー添加区の値は、いずれの経過時間でも無添加区の値より顕著に低かった。次いで、これらの比胃内容物量と比腸内容物量を加算した全消化管内容物量（体重％）の経時変化を調べたところ、両区間に著しい差異のあることが明らかになった。すなわち、フレーバー添加区では摂餌直後から 6 時間後までほぼ直線的に減少したが、無添加区では摂餌 3 時間後まで減少せず、それ以後減少した。

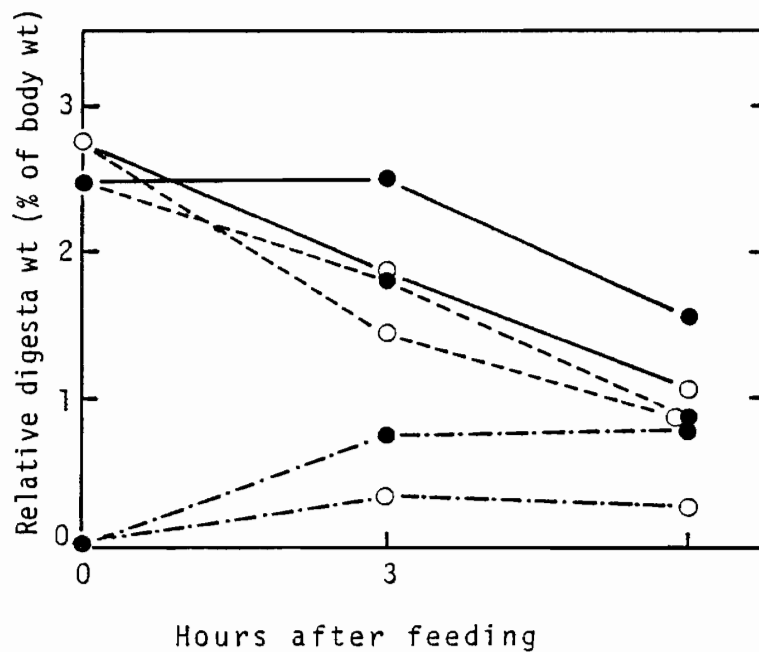


Fig. IV-1. Changes in gastrointestinal digesta after feeding.

○ Flavoured diet, ● Control diet.
 Gastric digesta.
 - · - Intestinal digesta.
 ——— Gastrointestinal digesta.

(b) タンパク質および糖質の消化率

フレーバー添加区ならびに無添加区におけるタンパク質および糖質の消化率を Table IV-2

Table IV-2. Apparent digestibilities of diets

| Diet | Apparent digestibility (%) | | Free nitrogen in gastric digesta* |
|-----------|----------------------------|--------------|-----------------------------------|
| | Protein | Carbohydrate | |
| Flavoured | 88.4 | 87.8 | 3.80 |
| Control | 85.3 | 77.1 | 3.39 |

*mg/g wet digesta.

に示した。全腸内容物を試料に用いたにもかかわらず、両区の消化率はいずれも比較的高かった。両区の消化率を比較すると、フレーバー添加区の糖質消化率は87.8%と無添加区のそれより約10%高かった。また、タンパク質消化率もフレーバー添加区のほうに約3%高かった。以上の結果から、飼料へのフレーバーの添加は、飼料タンパク質および糖質の消化率を向上させることが明らかになった。

(c) 消化管およびその内容物中の消化酵素活性

飼育終了日の摂餌3および6時間後における両区の胃組織とその内容物のペプシン様酵素活性、ならびに腸組織とその内容物のトリプシン様酵素活性を Table IV-3 に示した。

いずれの活性表示法でも、胃組織のペプシン様酵素活性には顕著な区間差は認められなかった。ところが、フレーバー添加区の摂餌3時間後における胃内容物のペプシン様酵素活性(g内容物当たり)は、無添加区のその2倍の高い値を示し、すでに6時間後の活性レベルにまで達していた。一方、無添加区ではその活性の上昇は緩やかで、6時間後にフレーバー添加区と同等のレベルにまで増大した。この様に、フレーバー添加区では摂餌後の比較的早い時間にペプシン様酵素の分泌が促進されていることが明らかになった。そこで、摂餌6時間後の胃内容物のTCA可溶性窒素量を調べたところ、フレーバー添加区のほうに僅かに高かった(Table IV-2)。以上の結果から、フレーバー添加区では胃内腔へのペプシン様酵素の分泌が摂餌後の比較的早い時間から促進され、したがって、無添加区に比べて胃内消化が進んでいることが示唆された。

腸組織のトリプシン様酵素活性は、前述した胃組織のペプシン様酵素活性の場合と同様に、いずれの活性表示法で示しても両区間に顕著な差異は認められなかった。ところが、腸内容物のトリプシン様酵素活性を内容物1g当たりの活性で比較すると無添加区のほうに高くなる傾向が認められ、さらに全活性で比較すると無添加区のほうに有意に高い活性が認められた。これらの結果から、フレーバー添加区では腸内腔へのトリプシン様酵素の分泌量が比較的 low に維持されたが、無添加区では腸内容物量が多いことに対応して、多量のトリプシン様酵素が分泌

Table IV-3. Protease and amylase activities in gastrointestinal tissue and digesta after feeding

| | After 3 hours | | After 6 hours | |
|--------------------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| | Flavoured | Control | Flavoured | Control |
| Protease activity* | | | | |
| Gastric tissue | | | | |
| per g tissue | 58.8±6.79 | 48.4±10.1 | 54.3±12.2 | 44.9±13.0 |
| per 100 g body wt | 44.0±13.2 | 32.3±13.1 | 28.8±13.6 | 25.9±12.3 |
| Gastric digesta | | | | |
| per g digesta | 0.20±0.09 | 0.10±0.07 | 0.24±0.12 | 0.26±0.06 |
| per 100 g body wt | 0.30±0.20 | 0.19±0.17 | 0.17±0.18 | 0.17±0.08 |
| Intestinal tissue | | | | |
| per g tissue | 24.4±8.11 | 21.9±1.93 | 21.5±7.34 | 17.7±5.24 |
| per 100 g body wt | 36.1±13.0 | 30.9±9.49 | 25.9±8.11 | 24.2±11.6 |
| Intestinal digesta | | | | |
| per g tissue | 49.5±14.7 | 64.6±14.0 | 36.7±17.8 | 40.5±2.76 |
| per 100 g body wt | 17.5±8.33 | 44.6±12.7 | 7.51±3.53 | 32.9±10.7 |
| Amylase activity* | | | | |
| Intestinal tissue | | | | |
| per g tissue | 1.61±0.58 | 1.12±0.69 | 0.93±0.73 | 2.24±1.01 |
| per 100 g body wt | 2.53±1.29 | 2.01±1.31 | 0.94±0.73 | 3.67±1.37 |

*Units expressed as μmol of Tyr and glucose liberated per one min under the assay condition.

されたことが推察される。

そこで、両区の腸トリプシン様酵素の分泌機構を比較するために、比腸内容物量とトリプシン様酵素活性との相関について調べ Fig. IV-2 に示した。無添加区では両者の間に、相関係数が0.40の低い相関しか認められなかったが、フレーバー添加区では0.89の統計的に有意な正の相関係数が得られた。

腸組織のアミラーゼ活性は、無添加区に比べてフレーバー添加区では、摂餌3時間後には僅かに高く、摂餌6時間後に低かった。

IV-1-3 考 察

(a) 胃内消化について

飼料へのフレーバー添加の有無にかかわらず、摂餌後6時間における胃内容物のペプシン様

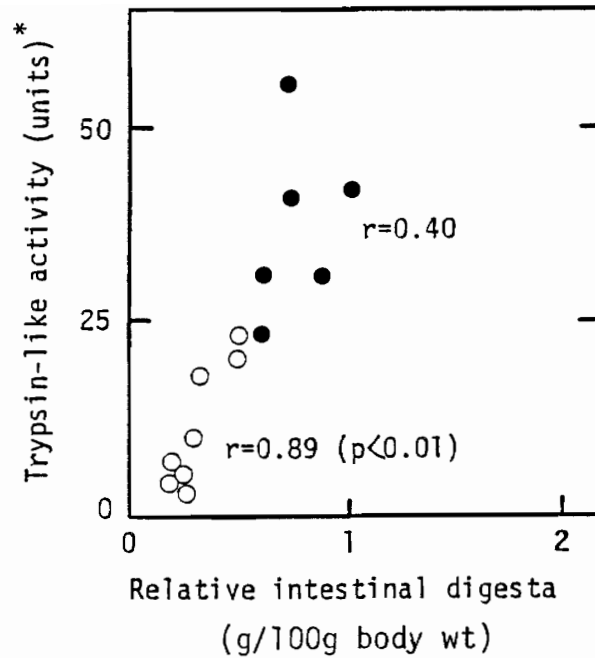


Fig. IV-2. Relationship of intestinal digesta weight and its trypsin-like activity.

- * Total activity.
- Flavoured diet group.
- Control diet group.

酵素活性は、胃組織や腸内容物のペプシン様およびトリプシン様酵素活性に比べて顕著に低かった。この結果は第三章に既述した結果を再確認するもので、ウナギの胃もほ乳類と同様に、本格的なタンパク質消化器官としてよりは、むしろ腸内腔における本格的な消化吸收作用を受けるための一時的な食物の貯蔵器官として機能していることを示唆している。しかし、フレーバー添加区では摂餌3時間後における胃内容物のペプシン様酵素活性が、無添加区でのそれより倍増していたことは、フレーバー添加により胃液の分泌作用が高まったことを示唆している。これまで、魚類における胃ペプシンの分泌刺激に関して、胃内腔への食物の導入による拡張刺激³⁴⁾とヒスタミンによる化学刺激が知られているが³⁴⁾、それ以外の機構についての詳細な研究はほとんどなされていない。一方、ほ乳類における胃液分泌機構についてはよく調べられていて、脳相、胃相および腸相の3相による分泌調節機構の存在が知られている²⁸⁾。すなわち、脳相とは、化学感覚を含む摂食の予知により誘起された刺激が中枢神経で処理を受けた後、胃液分泌中枢より分泌刺激が迷走神経を経て胃主細胞に伝達され、胃液が分泌される機構である²⁸⁾。イヌを用いた実験で、摂餌後に起こる胃液分泌の1/3以上がこの脳相によることが報告されている¹¹³⁾。胃相とは、食物摂取に基づく胃の拡張刺激およびその内容物中にある化合物による化学刺激によって起こる胃液分泌機構であって²⁸⁾、化学刺激物質にはヒスタミンがよく知られてい

る^{28,29)}。また、この胃液分泌には消化管ホルモンの一種ガストリンの役割が重視されている²⁹⁾。腸相分泌とは、胃内腔で消化された消化産物が十二指腸内に移行すると、十二指腸粘膜に対して物理的・化学的刺激を与え、これが胃液分泌を引き起こす機構をいう²⁸⁾。牛肉や肝臓の浸出液、タンパク質消化産物などが胃液分泌を高め、逆に脂肪、グルコース、塩酸などは分泌を抑制する^{28,29)}。しかし、この腸相分泌の果たす役割は小さいものと考えられている²⁸⁾。この様にはほ乳類では各相が相互に複雑にしかも時間的なずれを持って胃液分泌が調節されているが、なかでも脳相分泌の果たす役割が大きく、摂取した食物の味や臭いが胃液の分泌に強く影響することが明らかにされている^{27,28)}。Ash¹¹⁴⁾は高等ほ乳類で認められるこのような胃液分泌機構が魚類でも存在しているものと推察している。本実験の結果、フレーバー添加区で摂餌後まもなく胃液の分泌が高まることが示唆されたことは、ウナギでも化学感覚刺激に基づく脳相分泌機構が存在することを示唆していて興味深く、上記の Ash の推察を裏付けている。特にほ乳類では摂餌後の比較的早い時間における胃液分泌は脳相分泌に基づく割合の高いことが報告されていて¹¹³⁾、本実験による結果と一致していることは注目される。一方、無添加区では胃内容物におけるペプシン様酵素活性が比較的緩やかに増大し、摂餌6時間後にフレーバー添加区の活性レベルにまで上昇した。これは脳相以外の胃相ならびに腸相による胃液分泌刺激に基づくものと考えられる。いずれにしても、飼料へのフレーバー添加はウナギの胃内の初期消化を促進させる効果のあることが明らかになった。今後は各種魚類について胃液分泌に及ぼす飼料フレーバーの影響を明らかにする必要がある。

(b) 腸内消化について

ウナギは独立した膵臓器官を持つ数少ない魚種の一つであるので³⁶⁾、ほ乳類と同様に、この器官より主としてトリプシン様およびキモトリプシン様のプロテアーゼを不活性体のチモーゲンとして腸内へ分泌する⁹⁵⁾。さらに、これらのチモーゲンが腸内腔に分泌されると、腸組織から分泌されたエンテロキナーゼまたはトリプシンにより修飾部が加水分解されて活性化されることが報告されている³⁴⁾。また、これらの膵臓起源のプロテアーゼが腸内腔でのタンパク質消化作用の中心的な働きをすること、ならびにアミノ酸や低分子ペプチドの吸収機構および吸収部位などについての知見が種々の魚類で得られつつある^{34,114)}。これらの知見から、胃の場合と同様に、魚類の腸内腔における消化吸収機構はほ乳類のそれにほぼ類似することが推測されている³⁴⁾。本実験のフレーバー添加区では、無添加区に比べて摂餌後の腸内容物量が少なく、全消化管内容物量は摂餌後速やかに減少し、さらにタンパク質と糖質の消化率も高かった。これらの結果は、飼料へのフレーバー添加により、腸内における飼料栄養素の消化吸収作用が促進されたことを示している。

ところが、無添加区における腸内容物のトリプシン様酵素活性はいずれの表示法で比較してもフレーバー添加区の値より高く、特にその全活性には有意な区間差がみられた。これは無添加区における胃内タンパク質消化がフレーバー添加区より遅れていたことに基因するのかもしれない。Percival and Schneeman¹¹⁵⁾は、熱変成カゼインを主成分とする試験飼料をラットに給与すると、未変成カゼイン飼料を摂取したラットに比べて腸内容物量が増大する上に、そのトリプシン活性が高くなることをみた。そして、この結果は消化され難い基質がトリプシン自己消化作用に対する保護効果を示したことに基因すると推察している。また、Schneemanら¹¹⁶⁾はラットを用いて膵臓トリプシノーゲンの分泌機構について調べ、腸内容物中のトリプシン活性と膵臓からのこのチモーゲンの分泌は負のフィードバック機構によって調節されていることを報告している。このように、ラットでは分解されにくい基質に対して多量のトリプシンが腸内腔へ分泌されて、より強力な消化作用が発揮できるような分泌機構が備わっている。したがって、無添加区のウナギはフレーバー添加区と同じ組成の飼料を摂取したにもかかわらず、胃内でペプシン様酵素による消化を十分に受けなかった内容物が腸内腔へ移行したために、腸内腔での消化により多量のトリプシン様酵素を分泌して腸内容物中でのその活性が高く維持されたものと推察される。さらに、無添加区では腸内腔での消化吸収には比較的長時間を要することから、腸内容物が滞留して経時的に増量し、消化率が低下したものと推察される。

無添加区における消化吸収過程とは逆に、フレーバー添加区では胃内消化を十分に受けた内容物が腸内腔に移行したために、比較的少量のトリプシン様酵素が分泌されても十分に消化されて消化率が向上し、速やかに吸収されて腸内容物が少なくなったものと考えられる。また、フレーバー添加区では腸内容物量とそのトリプシン様酵素活性との間に有意な相関関係が認められたが、無添加区では有意な相関関係は認められなかった。これは、フレーバー添加区では腸内腔へのトリプシン様酵素の分泌が胃内腔から腸内腔へ移行して来た内容物量の多少によって調節されていたことを示している。このように、本実験のフレーバー添加区に第III章で述べたと同様の結果が認められたことは、ウナギにもほ乳類に似た膵液分泌機構が存在する可能性があり、この機構にフレーバーが有効に作用していることを示唆している。ほ乳類のこの分泌機構には、胃から十二指腸に移行した食塊中のタンパク質、ペプチドならびに芳香族アミノ酸などが関与することを先に述べた。これらの化合物が十二指腸粘膜にある基底顆粒細胞を刺激してセクレチン、コレシストキニンなどの消化管ホルモンを分泌させるとともに、これらのホルモンが膵臓や肝臓に作用して消化液を分泌させることはすでに明らかにされている²⁹⁾。したがって、本実験のフレーバー添加区でも胃内消化の促進が消化管ホルモンの分泌を刺激して、膵臓の消化酵素分泌を調節していたものと推察される。ちなみに、ウナギ腸管ホモジネートに

セクレチンやコレシストキニン様物質の存在することが既に報告されている¹¹⁷⁾。

以上のように、ウナギでもフレーバーによる化学感覚の刺激が胃液の分泌量を増大させるだけでなく、腸内腔での消化吸収を促進させる役割を持つことが示唆され(Fig. IV-3)，配合飼料への摂餌促進物質すなわちフレーバー添加の有効性が認識された。また，胃内での消化の程度がその後の腸内腔における消化吸収機構にも大きく影響することが示唆されたことから，今後の魚類消化生理の研究においては，各消化器官の役割を一連の連続した機構として把握する必要があると考えられる。

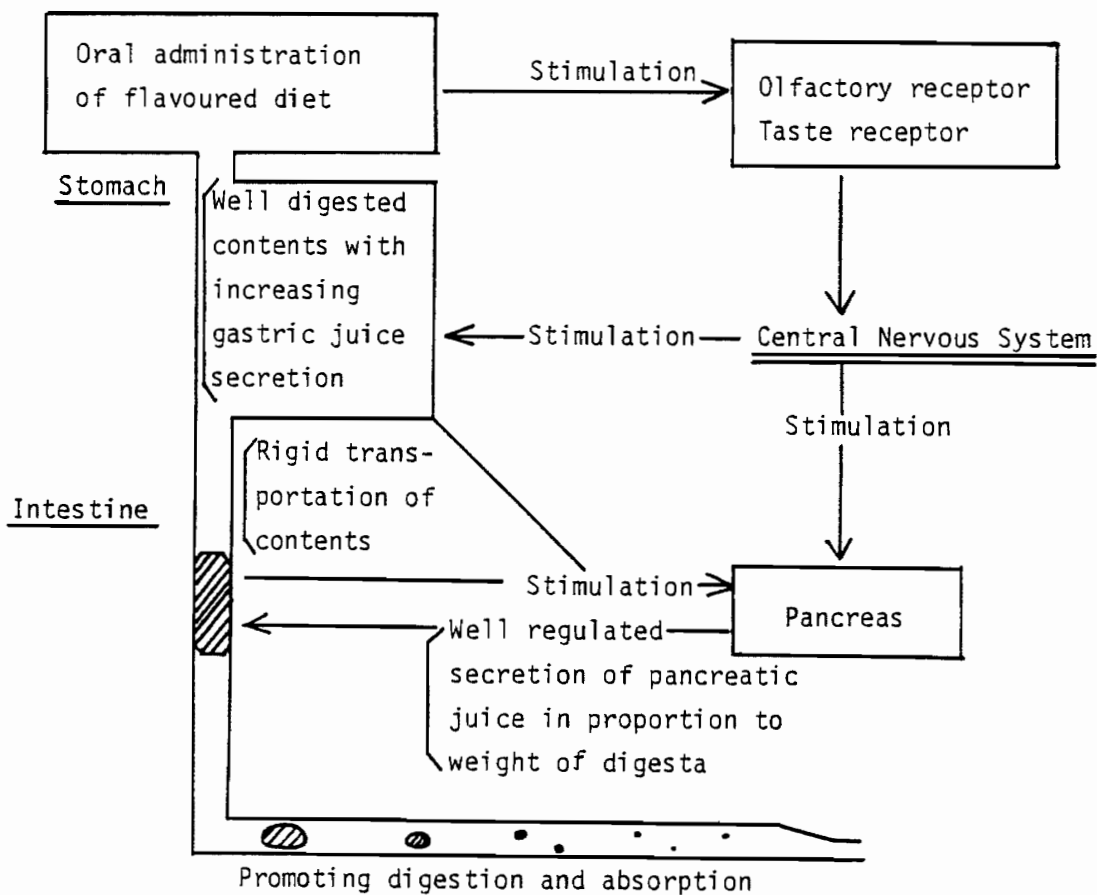


Fig. IV-3. Digestive process in eel fed the flavoured diet.

第II章第3節で述べた無添加区における低成長は，フレーバー添加区で認められたような一連の消化吸収機構が連続して進行しなかったことが主な原因と考えられるが，腸内容物が経時的に増量していたことも注目される。ほ乳類では，小腸での吸収能を越える過剰の栄養素が遊離の状態では腸内腔に滞留した場合には消化不良性の下痢を起こすとされている²⁸⁾。この消化不良性下痢が本実験の無添加区に起こっていた可能性もある。今後この点について詳細に検討する必要がある。また，フレーバー添加区では無添加区に比べて脂質およびエネルギーの蓄積率

が顕著に向上していた。この原因については、消化吸收機構の改善が主として考えられるが、飼料タンパク質や糖質がエネルギー源や体成分の蓄積に有効に利用されたことも一因であると推察される。この点については次節で検討する。

以上の本実験結果から、飼料へのフレーバーの添加はウナギの摂餌活性を高めるだけでなく、胃液の分泌および腸内腔での消化吸收を促進させることが示唆され、養魚飼料の栄養価改善にも有効であることが明らかになった。

IV-2 肝臓酵素活性に及ぼす影響

前節で、飼料へのフレーバー添加が、摂餌活性を増大させるだけでなく飼料の消化吸收をも促進し、消化率を向上させる効果のあることを明らかにした。したがって、フレーバー添加区に認められた良好な飼育成績には、この様な消化率の向上が第一義的に影響したものと思われるが、吸収したタンパク質や糖質がエネルギー源や体成分の蓄積に効率よく利用されたことも第二義的に関与したものと推測される。そこで、本節ではこの点を確認するために、飼料へのフレーバーの添加が摂餌後の血液成分ならびに肝臓におけるアミノ酸および糖質の代謝に及ぼす影響について調べた。

これまで、飼料へのフレーバー添加が魚類の肝臓酵素活性に及ぼす影響を調べた報告は見当たらない。一方、ほ乳類では摂餌後に起こる急激な栄養素の体内への流入に対処するため、味覚刺激が膵臓からのインシュリン分泌を促すことが報告されている^{93,94)}。

IV-2-1 材料および方法

(a) 供試魚、試験飼料および試験方法

本実験に供したウナギ、試験水槽および試験飼料とその調製方法はいずれも第II章第3節に記したとおりである。25日間の飼育終了日の摂餌3および6時間後に、フレーバー添加区と無添加区より無作為に4尾ずつ取り上げた。そして、個体別に心臓動脈球よりヘパリン処理した注射器で採血し、3000 rpm で10分間遠心分離して得られた血漿を試料として、血漿遊離アミノ態窒素量 (PAA) と血糖値を測定した。また、採血した個体より肝臓を採取してアミノ酸ならびに糖代謝に関与する肝臓酵素活性を測定した。

(b) PAA、血糖値および肝臓酵素活性の測定方法

PAA および血糖値はそれぞれ Goodwin らの DNFB 法¹¹⁷⁾ およびグルコースオキシダーゼ法 (和光純薬 KK 製キット) を用いて測定した。

個体別に採取した肝臓を細断し、その9倍量の脱イオン水とともに約2分間ガラスホモジナ

イザーで磨碎してホモジネートを得た。このホモジネートを10分間3000 rpm, 0°Cで遠心分離して得られた上清画分を粗酵素液とし、適宜希釈して活性を測定した。これらの操作はすべて0～5°Cの条件下で行った。

肝臓の alanine aminotransferase (GPT EC 2.6.1.2) および aspartate aminotransferase (GOT EC 2.6.1.1) の活性を Reitman-Frankel 法 (和光純薬 KK 製キット) を用いて測定した。また、肝臓の glucose-6-phosphatase (G6Pase EC 3.1.3.9), phosphoglucose isomerase (PGI EC 5.3.1.9), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH EC 1.1.1.49) および phosphogluconate dehydrogenase (PGDH EC 1.1.1.44) の活性をいずれも示野の方法⁵³⁾により測定した。

GPT および GOT 活性はいずれも 1 分間に遊離する 1 μ mol のピルビン酸を、G6Pase と PGI 活性は 1 分間に遊離する 1 μ mol の Pi とフルクトース-6-リン酸をそれぞれ 1 unit と定義した。また、G6PDH および PGDH 活性は 1 分間に生成される 1 μ mol の NADPH を 1 unit と定義した。これらの活性はいずれも肝臓組織 1 g 当たり、または体重 100 g 当たりの全活性として表示した。

IV-2-2 結 果

(a) 肝臓の一般成分組成

飼育終了日の摂餌 3 および 6 時間後における肝臓の一般成分組成を Table IV-4 に示した。

Table IV-4. Proximate composition of liver (%)

| Diet | Moisture | Crude protein | Crude fat | Ash | Glycogen |
|-----------|----------|---------------|-----------|-----|----------|
| Flavoured | 74.4 | 14.0 | 4.5 | 1.0 | 2.3 |
| Control | 71.2 | 15.3 | 3.6 | 1.0 | 4.1 |

粗タンパク質、粗脂肪ならびに灰分含量には、フレーバー添加区と無添加区の間には全く差異は認められなかった。無添加区のグリコーゲン含量はフレーバー添加区のその1.78倍と比較的高かったが、既報¹²³⁾の値より幾分低かった。

(b) PAA 値および肝臓のアミノ酸代謝酵素活性

飼育終了日の摂餌 3 および 6 時間後における PAA 値ならびに肝臓の GOT および GPT 活性を Table IV-5 に示した。フレーバー添加区の PAA 値は、いずれの経時時間でも無添加区のそれより低く維持されていた。これとは逆に、肝臓 GOT 活性はいずれの活性表示法でもフレーバー添加区に高くなる傾向が認められ、肝臓 1 g 当たりの活性で表示した場合に、摂餌 6 時

Table IV-5. Plasma amino acid-nitrogen level (PAA) and hepatic transaminase activities after feeding

| | After 3 hours | | After 6 hours | |
|-------------------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| | Flavoured | Control | Flavoured | Control |
| PAA (mg/100 ml) | 5.40±0.48 | 6.36±2.26 | 4.75±0.88 | 5.32±1.05 |
| GOT* | | | | |
| per g liver | 27.3±3.35 | 26.4±3.43 | 30.5±2.04 | 25.7±2.60 |
| per 100 g body wt | 44.6±10.9 | 40.5±9.07 | 43.0±6.17 | 39.0±6.47 |
| GPT* | | | | |
| per g liver | 13.3±4.90 | 11.3±2.13 | 18.2±2.96 | 16.4±5.03 |
| per 100 g body wt | 20.8±7.70 | 17.6±5.45 | 25.4±3.01 | 24.7±7.85 |

* Units expressed as μ mol of pyruvate liberated per one min under the assay condition.

間後の両区間に5%の危険率で有意な差異が認められた。フレーバー添加区のGPT活性は、全活性で表示した場合、摂餌3時間から6時間後にかけて20.8から25.4 unitへと僅かに上昇していた。一方、無添加区では摂餌3時間後に17.6 unitと、フレーバー添加区のそれより低い値が認められたが、6時間後にはフレーバー添加区の活性レベルにまで上昇していた。

(c) 血糖値および糖代謝酵素活性

飼育終了日の摂餌3および6時間後における血糖値および糖代謝酵素活性をTable IV-6に示した。

フレーバー添加区の血糖値は、摂餌3時間後に202 mg/100 ml、6時間後に174 mg/100 mlと比較的安定していたが、無添加区では摂餌3時間後で175 mg/100 mlであったのが、6時間後には283 mg/100 mlと著増していた。したがって、両区の摂餌6時間後の血糖値には5%の危険率で有意差が認められた。

肝臓の糖代謝酵素のうち、糖新生にかかわるG6Paseの活性にはいずれの時間でも両区間に差異は認められなかった。一方、糖の異化代謝にかかわる解糖系酵素のPGIならびに五炭糖リン酸回路酵素のG6PDHおよびPGDHの各活性は、いずれの経過時間でも無添加区よりフレーバー添加区に高くなる傾向が認められた。なかでも、摂餌6時間後の肝臓1g当たりのPGIおよびG6PDHの活性に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

以上の結果から、フレーバー添加飼料を摂取したウナギは、無添加飼料を摂取したものに比べて糖質およびアミノ酸の異化代謝に関与する肝臓酵素の活性を高水準に維持することが明らかになった。

Table IV-6. Blood glucose and activities* of hepatic enzyme relating to carbohydrate metabolism after feeding

| | After 3 hours | | After 6 hours | |
|---------------------------|---------------|-----------|---------------|-----------|
| | Flavoured | Control | Flavoured | Control |
| Blood glucose (mg/100 ml) | 202±25.9 | 175±113 | 174±48.1 | 283±46.7 |
| G6Pase | | | | |
| per g liver | 6.26±1.12 | 6.15±0.70 | 6.36±1.03 | 6.45±1.54 |
| per 100 g body wt | 10.0±1.39 | 9.39±1.55 | 8.97±1.95 | 9.55±0.56 |
| PGI | | | | |
| per g liver | 124±20 | 127±15 | 139±11 | 116±7 |
| per 100 g body wt | 204±60 | 199±57 | 197±33 | 178±41 |
| G6PDH | | | | |
| per g liver | 56.2±4.3 | 42.8±12.3 | 60.2±8.3 | 45.3±6.5 |
| per 100 g body wt | 91.1±15.1 | 68.8±29.1 | 85.7±18.7 | 70.7±23.3 |
| PGDH | | | | |
| per g liver | 22.2±4.7 | 20.8±3.8 | 23.1±2.4 | 17.0±4.4 |
| per 100 g body wt | 35.8±8.8 | 33.4±12.5 | 32.4±3.2 | 26.6±11.4 |

*Units expressed as μmol of substrate or coenzyme converted per one min under the assay condition.

IV-2-3 考察

IV-1の実験で、フレーバー添加区の糖質消化率は無添加区に比べてかなり高いことを明らかにした。したがって、フレーバー添加区では糖質の吸収が促進されたと考えられる。既往の知見¹¹⁹⁾から、各種糖質に対するウナギの消化率はコイに比べて低いことが知られており、また、本実験結果からもウナギの肝臓 PGI 活性はコイに比べて低いハマチのそれと同程度で、逆に G6PDH, PGDH 活性はコイやハマチに比べて高い傾向が認められた。これらの結果および示野の報告⁵³⁾から、ウナギの糖利用能はコイとハマチのその間に位置するものと解釈される。Furuichi¹⁰⁸⁾はコイ、マダイおよびハマチに配合飼料を給与して、摂餌後の血中インシュリン濃度の経時変化について調べたところ、いずれの魚種でもインシュリン濃度は摂餌直後には上昇せず、摂餌3時間頃より上昇し始めたがその濃度はほ乳類での摂餌後の濃度に比較して極めて低く推移することを明らかにした。これらの結果から、一般的に魚類の糖代謝はほ乳類でみられる糖尿病的な症状に酷似することを報告している。他の既報の研究でも類似した結果が得られている^{53,120,121)}。したがって、魚類のインシュリンの絶対的不足がその糖利用能の低さに関連することは確かであろう。一方、インシュリンを魚類に負荷すると、血糖値と PAA 値が低下し、

肝臓グリコーゲンならびに PFK, GOT などのアミノ酸および糖質の異化代謝に関与する酵素活性が増大することが知られている^{108,120,122)}。Inui ら¹²³⁾ はウナギにほ乳類のインシュリンを負荷してその後の血液成分および肝臓酵素活性の変化を詳細に調べたところ、血糖値, PAA 値および肝臓グリコーゲン量は減少したが、肝臓の GOT, GPT, fructose diphosphatase および phosphofructokinase の活性には大きな変化が認められなかったことを報告している。本実験でのフレーバー添加区では無添加区に比べて血糖値, PAA 値および肝臓グリコーゲン量が減少したが、肝臓の GOT, GPT, PGI, G6PDH および PGDH の活性は増大する傾向を認めた。これらの結果は Inui ら¹²³⁾ の結果と多少異なるが、他の魚類で認められたインシュリン負荷後の代謝変動に酷似していることから、フレーバー添加区で肝臓の異化代謝系酵素の活性が増大したのは、摂餌後の比較的早い時間よりインシュリンが分泌されていたためと思われる。弓狩ら²⁷⁾ はほ乳類には味覚刺激（甘味刺激）がインシュリン分泌を促進して摂餌後に吸収されるであろう各栄養素の代謝を高める準備をする機構のあることを述べている。したがって、フレーバー添加区のウナギでは、フレーバーによる化学感覚刺激によりインシュリンの分泌が促進されたものと推察される。また、ウナギの消化過程に消化管ホルモンが関与している可能性を先に示唆した。この消化管ホルモンやそのホルモン様物質については、現在ほ乳類を中心に研究が進展しており、その機能の詳細が明らかにされつつある^{29,30)}。これらの消化管ホルモンのなかで、コレシストキニン（CCK）ならびに gastric inhibitory polypeptide（GIP）がインシュリン分泌に深く関与していることが明らかになっている²⁹⁾。したがって、ウナギ腸組織にこれら消化管ホルモンが存在するかどうかは明らかにされていないが、もし存在するとすればそれがインシュリンの分泌を通して間接的にフレーバー添加区における代謝を調節している可能性もある。

以上の既往の研究結果と本実験結果を合わせて考察すると、フレーバー添加飼料を摂取したウナギでは、おそらく、化学感覚の刺激と消化管ホルモンの作用によりインシュリンの分泌量が増大し、その結果、肝臓のアミノ酸および糖質の異化代謝に関与する酵素活性が高まったものと考えられる。したがって、フレーバー添加区のウナギでは、摂取したアミノ酸・糖質をエネルギー源や体成分としてより効率よく利用したものと推察される。

本章（IV-1 および IV-2）の実験結果をまとめると、飼料へのフレーバーの添加は単にウナギの摂餌活性を増大させるばかりでなく、これにつづく消化吸收作用も促進させ、さらに栄養代謝にまで間接的によい影響を与えることが明らかになった。したがって、今後の実際の養魚および栄養試験においては、飼料の各栄養素のバランスやエネルギー含量はもちろん、味や臭いに関係する物質の存否にも留意する必要があるだろう。

第 V 章 飼料への消化酵素剤の添加がウナギの 摂餌活性および消化過程に及ぼす影響

これまでの結果より、飼料へのフレーバー添加がウナギの摂餌活性、成長、消化吸収ならびに肝臓のアミノ酸・糖質の異化代謝酵素活性などの向上に寄与することが明らかになった。しかし、本研究に用いたフレーバーは純品を混合したものであり、養殖経営の立場からこれを多用するのは経済的に困難である。そこで、フレーバーの添加に代わる他の嗜好性改善方法について検討する必要がある。伊奈ら^{89,91)}は、植物タンパク質主体の配合飼料に魚類内臓自己消化物を添加した飼料でマダイを飼育し、市販配合飼料を給与したマダイと比べて成長や飼料効率に差異のないことを示した。この自己消化物中には多量の遊離アミノ酸や核酸関連物質が含まれることから、これを利用することも有効な手段の一つである。また、本フレーバーを構成する各化合物を遊離の状態が多量に含有する未利用生物資源を検索することも必要であろう。一方、Fujimaki ら¹²⁴⁾は魚類タンパク濃縮物を消化酵素剤で処理すると、アミノ酸や低分子ペプチドが遊離されて肉味 (Broothy taste) の増大することをみた。この消化酵素剤のなかで、アスペルギロペプチダーゼ A と α -アミラーゼを持つモルシン (Molsin) の効果が最も顕著であったと報告している。そこで、本章ではフレーバー添加に替えてモルシンを飼料へ添加し、ウナギの摂餌活性や消化過程に及ぼす影響について調べた。

V-1 材料および方法

(a) 供試魚、試験水槽および試験飼料

高知市内の養殖業者より購入し、市販飼料を与えて 2 週間 25°C で予備飼育した平均体重 105 g のウナギを、240 l 容の塩ビ角型水槽 (80×60×50 cm) に 30 尾ずつ収容して、モルシン添加区と無添加区の 2 試験区を設けた。なお、試験水槽には循環ろ過装置を設置するとともに、電気ヒーターを用いて水温を 24~25°C に調節した。また、飼育水の換水は第 II 章第 3 節に記した方法で行った。

本実験に用いたモルシン (盛進製薬 KK 製) は黒麹菌 *Aspergillus saitoi* を適当な培地で培養し、培養産物を抽出分離後乾燥粉末にしたもので、本菌の生産するアスペルギロペプチダーゼ A、 α -アミラーゼ、S-アミラーゼ、セルラーゼ、リボヌクレアーゼ、ペクチナーゼ等を含有している。また、プロテアーゼ剤としての至適 pH は 2.5 から 3.0 付近にあり、そのペプシン様酵素ならびにアミラーゼ活性は第三章に記した方法により測定し Table V-1 に示した。

Table V-1. Composition of diet*¹ and digestive enzyme activity in Molsin*²

| Diet | % |
|------------------------------|------------------------|
| Crude protein | 49.5 |
| Crude fat | 5.0 |
| Ash | 15.6 |
| Digestible carbohydrate | 32.9 |
| Energy (Kcal/100 g dry diet) | 354.9 |
| Digestive enzyme activity | units* ³ /g |
| Pepsin-like | 22.38 |
| Amylase | 20.18 |

*1 A commercial preparation by Nihon Nosan Kogyo Co., Ltd.

*2 A commercial preparation by Seishin Chemicals Co., Ltd.

*3 Units expressed as μmol of Tyr and glucose liberated per one min under the assay condition.

試験飼料には、Table V-1 に示す一般成分組成を持つ市販配合飼料（日本農産工業 KK 製）100 g に、モルシンを外割りで0.025 g（前期）または0.05 g（後期）添加し160 mlの水とよく練り合わせたペースト状の飼料と、市販飼料100 g に水160 mlだけを添加して同様に調製した無添加飼料を用いた。

(b) 試験方法

モルシン添加区と無添加区に所定の試験飼料を午前9時から約30分間自由食で与えて23日間飼育した。この間の前半12日間は0.025%で後半11日間は0.05%の割合でモルシンを添加し、この増量にともなう摂餌率の変化を調べるとともに、飼育終了日の摂餌3および6時間後に両区より無作為に4尾ずつ取り上げて、消化管とその内容物における消化酵素活性、血糖値、PAA値および肝臓の酵素活性を測定した。また終了日の摂餌6時間後における両区の胃・腸内容物の遊離アミノ態窒素量および遊離糖質含量ならびにタンパク質および糖質の消化率を測定した。さらに、モルシン添加飼料の Tyr 含量を測定した。

(c) 分析方法

モルシン添加飼料調製後の経時時間に伴う遊離 Tyr 含量の増加を Folin 法¹²⁵⁾で測定した。すなわち、調製後0, 10および30分後に4倍量の10% TCA 溶液とともにガラスホモジナイザーで磨砕してホモジネートを得た。このホモジネートを20分間5000 rpm で遠心分離して得られた上清画分について Tyr を定量した。

血糖値，PAA 値ならびにタンパク質および糖質の消化率はいずれも第IV章に記した方法で測定した。

胃および腸内容物における遊離のアミノ態窒素量ならびに糖質含量は，消化酵素活性測定のために第III章で記した方法で抽出した粗酵素液を適宜水で希釈して，それぞれ Goodwin らの DNFB 法¹¹⁸⁾ ならびにフェノール硫酸法¹¹²⁾ で測定した。

消化管とその内容物中のペプシン様酵素，トリプシン様酵素およびアミラーゼの各活性を第III章に記した方法で測定し，エステラーゼ活性 (EC 3.1.1.3) を，高橋ら¹²⁶⁾ の β -ナフチルアセテートを基質に用いる方法で測定した。また，肝臓の GOT, G6Pase, PGI および G6PDH の各活性を，それぞれ第IV章第2節に記した方法で測定した。

V-2 結 果

(a) 全魚体および肝臓の一般成分組成

Table V-2 に示したように，開始時と終了時におけるモルシン添加区と無添加区の全魚体の一般成分組成には差異は認められなかった。また，終了時の両区の肝臓一般成分組成にも区間差はなかった。以上の結果から，飼料へのモルシン添加は全魚体や肝臓の一般成分組成に影響を及ぼさないことが分かった。

Table V-2. Proximate composition of eel fed Molsin supplemented test diet and control diet (%)

| | Moisture | Crude protein | Crude fat | Ash | Glycogen |
|------------|----------|---------------|-----------|------|----------|
| Whole body | | | | | |
| Initial | 67.2 | 17.5 | 13.2 | 1.98 | |
| Final | | | | | |
| Test | 65.0 | 16.1 | 14.8 | 2.05 | |
| Control | 65.7 | 15.9 | 14.8 | 1.56 | |
| Liver | | | | | |
| Final | | | | | |
| Test | 71.5 | 13.9 | 3.72 | 1.09 | 7.84 |
| Control | 72.0 | 12.2 | 2.67 | 1.13 | 9.58 |

(b) 飼育成績および組織重量

Table V-3 に両区の飼育成績ならびに肝臓，胃および腸の組織重量を体重比で示した。モルシン添加区の増重量は無添加区に比べて僅かに優れていた程度であったが，モルシン添

Table V-3. Performance and relative organ weight of eel fed test and control diet for 23 days

| | Test | Control |
|----------------------------|-------------|-------------|
| No. of fish | 30 | 30 |
| Av. body weight (g) | | |
| Initial | 104.7± 11.2 | 104.7± 11.1 |
| Final | 137.4± 20.2 | 134.8± 20.6 |
| Total weight gain (g) | 844.5 | 793.8 |
| Feed intake (g) | 885.5 | 756.6 |
| Daily feeding rate (%) | | |
| 1st period | 1.28±0.36 | 1.14±0.45 |
| 2nd period | 1.35±0.61 | 1.00±0.52 |
| Feed efficiency (%) | 95.4 | 104.6 |
| Protein efficiency ratio | 2.06 | 2.27 |
| Protein retained (%) | 22.4 | 21.7 |
| Fat retained (%) | 118.6 | 132.9 |
| Energy retained (%) | 73.6 | 79.6 |
| Relative organ weight (%)* | | |
| Liver | 2.19±0.39 | 2.52±0.46 |
| Stomach | 0.53±0.06 | 0.66±0.10 |
| Intestine | 1.57±0.24 | 1.59±0.23 |

* Relative weight to body weight on wet weight basis.

加区の摂餌量は著しく多かった。そこで、前・後期に分けて両区の日間摂餌率を算出したところ、無添加区ではそれぞれ1.14%ならびに1.00%であったのに対して、モルシン添加区では1.28%ならびに1.35%と高く、特に前期から後期にかけてモルシン添加区の日間摂餌率が上昇したことが注目される。一方、モルシン添加区では飼料効率、脂質ならびにエネルギー蓄積率がいずれも無添加区に比べて僅かに劣った。しかしタンパク質蓄積率には区間差が認められなかった。

両区の比肝重、比胃重および比腸重の値には僅かな差異が認められたが、有意な区間差はなかった。

(c) モルシン添加飼料の遊離 Tyr 含量と消化管内容物量の変化

0.05%モルシン添加飼料調製後の遊離 Tyr 含量の経時変化を Table V-4 に示した。調製後10分までは両飼料とも遊離 Tyr 含量に大きな変化は認められなかったが、その後30分までにモ

Table V-4. Changes in free Tyr concentration in diets after preparation ($\mu\text{g/g}$ wet diet)

| | Test | Control |
|--------------|------|---------|
| After 0 min | 3.68 | 3.87 |
| After 10 min | 3.69 | 3.91 |
| After 30 min | 4.25 | 3.93 |

ルシン添加飼料の Tyr 含量は $3.69 \mu\text{g/g}$ から $4.25 \mu\text{g/g}$ に増加した。しかし無添加飼料では一定であった。

ついで、両区の消化管内容物の摂餌後における経時変化を Fig. V-1 に示した。各時間毎に採取した内容物量に変動が大きく一定の減少傾向が認められなかった。そこで、胃および腸内容物を全消化管内容物に対する比率で示したところ、モルシン添加区では無添加区に比較して、摂餌3および6時間後のいずれにおいても腸内容物の占める割合が多く、腸内腔に多量の内容物が滞留していることが分かった。

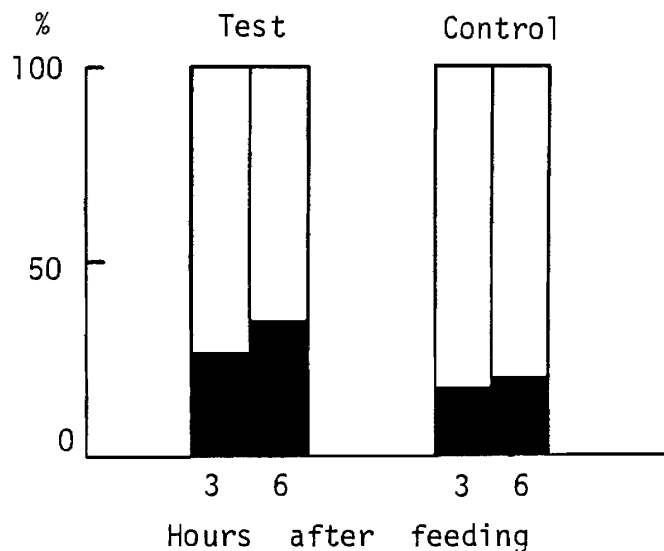


Fig. V-1. Ratio of gastric and intestinal digesta weight.

□ Gastric digesta.
 ■ Intestinal digesta.

(d) 消化率ならびに消化管内容物における遊離アミノ態窒素量，糖質含量および血液成分の変化

終了日の摂餌6時間後における全腸内容物を採取し，みかけのタンパク質および糖質の消化率を測定して Table V-5 に示す結果を得た。両区のタンパク質消化率は72%前後で差異は認め

Table V-5. Apparent digestibilities of diets (%)

| Diet | Protein | Carbohydrate |
|---------|---------|--------------|
| Test | 72.5 | 77.5 |
| Control | 71.7 | 85.7 |

られなかった。ところが、無添加区の糖質消化率は85.7%と比較的高い値が得られたのに対して、モルシン添加区のそれは77.5%と低い値しか得られなかった。

このようにモルシン添加区の糖質消化率が劣った原因を明らかにする目的で、摂餌3および6時間後における消化管内容物の遊離糖質ならびにアミノ態窒素量を測定した。その結果はTable V-6に示すとおり、胃内容物ならびに腸内容物の遊離アミノ態窒素量にはモルシン添加区と無添加区の間いずれの経過時間でも差異はなく、先程のタンパク質消化率の測定結果によく符合していた。ところが、遊離糖質含量はいずれの時間でもモルシン添加区に顕著に高かった。すなわち、モルシン添加区における胃内容物のそれは摂餌3時間から6時間後にかけて120 mg/gの高い値を示したのに対して、無添加区では84.2 mg/gから44.5 mg/gに減少した。また、モルシン添加区における腸内容物中の遊離糖質含量も摂餌3時間から6時間後にかけて92.8 mg/gから121.0 mg/gに増大したが、無添加区では70 mg/g程度と比較的低い値で推移した。この結果から、糖質消化率の劣っていたモルシン添加区の消化管内容物中に遊離糖質含量が高く、逆にその消化率の優れていた無添加区に内容物中の遊離糖質含量が低くなっていたことが明らかになった。

ついで、両区における糖質とアミノ酸の吸収過程を比較するために、血糖値とPAA値を測定

Table V-6. Free carbohydrate and amino acid nitrogen (FAA-N) levels in gastrointestinal digesta after feeding (mg/g)

| | After 3 hours | | After 6 hours | |
|--------------------|---------------|---------|---------------|---------|
| | Test | Control | Test | Control |
| Gastric digesta | | | | |
| Free carbohydrate | 127.3 | 84.2 | 121.4 | 44.5 |
| FAA-N | 0.65 | 0.71 | 0.64 | 0.62 |
| Intestinal digesta | | | | |
| Free carbohydrate | 92.8 | 74.9 | 121.0 | 69.7 |
| FAA-N | 6.45 | 6.00 | 6.90 | 6.00 |

して、Fig. V-2 に示す結果を得た。両区の血糖値と PAA 値は摂餌 3 時間後まで急速に上昇した。ところが、それ以後摂餌 6 時間後まで無添加区ではいずれの値も減少傾向を示したのに対して、モルシン添加区では僅かに上昇した。しかし、いずれの時間の血糖値および PAA 値にも有意な区間差は認められなかった。

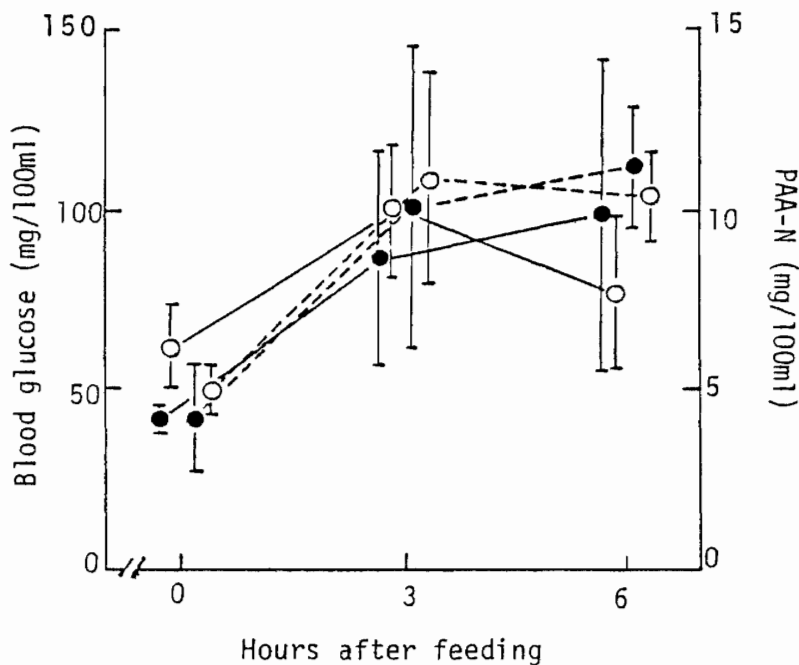


Fig. V-2. Changes in blood glucose and plasma free amino acid nitrogen levels after feeding.

● Test, ○ Control.
 — Blood glucose.
 - - - Plasma amino acid nitrogen.

以上の消化率、消化管内容物の遊離糖質量およびアミノ態窒素量ならびに血液成分の測定結果より、モルシン添加区に認められた低糖質消化率は、無添加区に比べて糖質の吸収が抑制されたことに基因するものと推察される。

(e) 消化管およびその内容物における消化酵素活性

胃および膵臓を含む腸組織と内容物における各消化酵素活性を Figs. V-3, V-4 および V-5 に示した。

Fig. V-3 に示すように、胃組織のペプシン様酵素活性には顕著な区間差がなく類似した経時変化が認められた。しかし胃内容物の同活性は、内容物 1 g 当たりの活性および体重 100 g 当たりの全活性のいずれの活性表示法でも著しい区間差が認められ、モルシン添加区の活性はいずれの経時時間でも無添加区に比べて顕著に低かった。

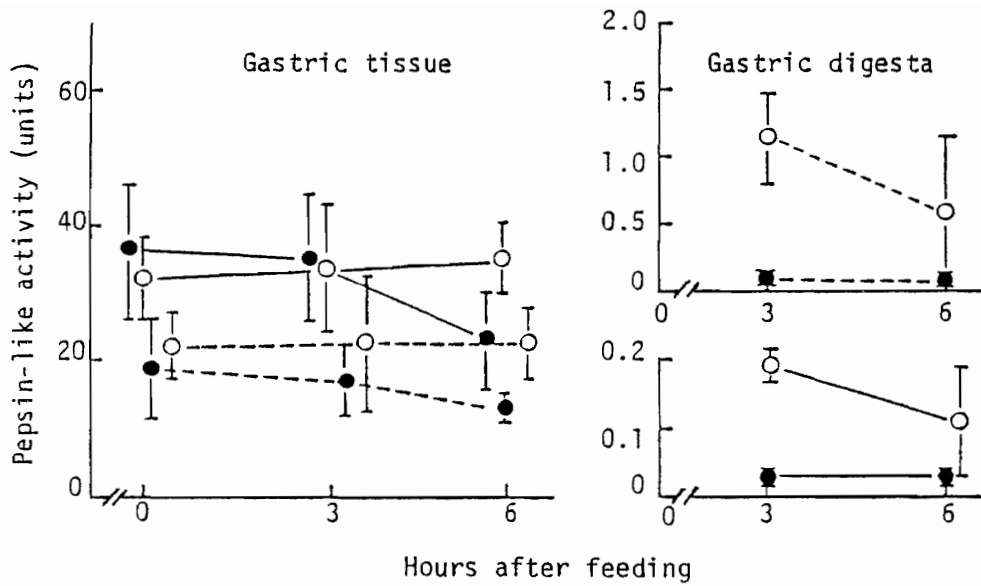


Fig. V-3. Changes in pepsin-like activity of gastric tissue and digesta of eel after feeding.

—— per g tissue or digesta, - - - - - total activity.
 ● Test, ○ Control.

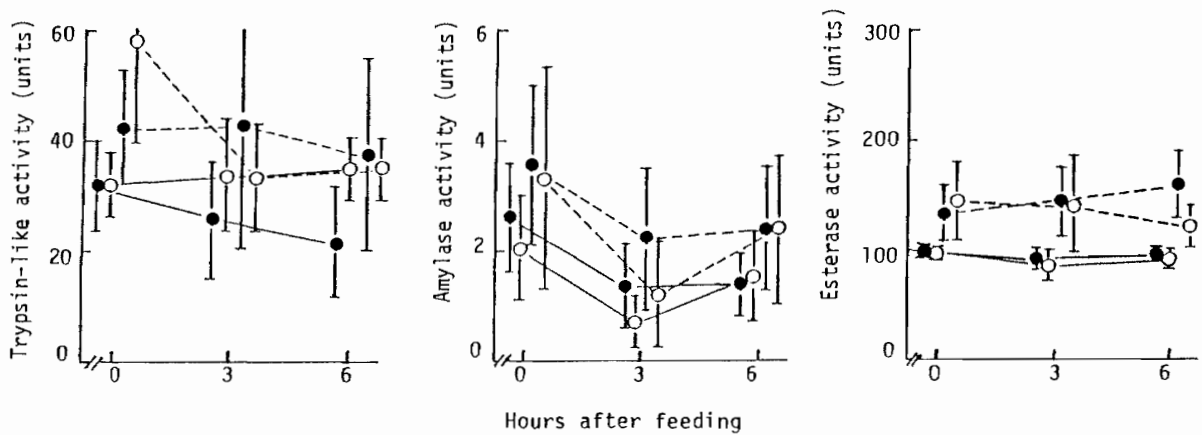


Fig. V-4. Changes in digestive enzyme activity of intestinal tissue after feeding.

—— per g tissue, - - - - - total activity.
 ● Test, ○ Control.

腸組織のトリプシン様酵素，アミラーゼおよびエステラーゼ活性には，いずれも区間差が認められなかった (Fig. V-4)。ところが，腸内容物のトリプシン様酵素およびエステラーゼ活性は僅かにモルシン添加区に高い傾向が認められたが，両区の値に統計的な有意差はなかった。また，アミラーゼ活性にも区間差が認められなかった (Fig. V-5)。

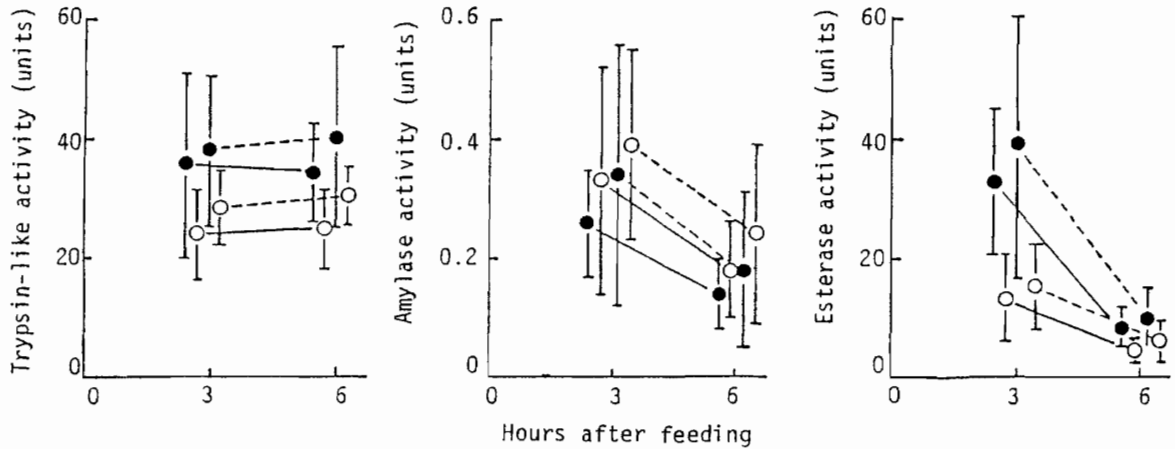


Fig. V-5. Changes in digestive enzyme activity of intestinal digesta after feeding.
 — per g tissue, - - - - - total activity.
 ● Test, ○ Control.

(f) 肝臓酵素活性

モルシン添加区と無添加区の摂餌0, 3および6時間後における肝臓 GOT, G6Pase, PGI および G6PDH の各酵素活性を体重100 g 当たりの全活性で Fig. V-6 に示した。この表から明らかのように、これらの肝臓酵素活性には顕著な区間差が認められなかった。

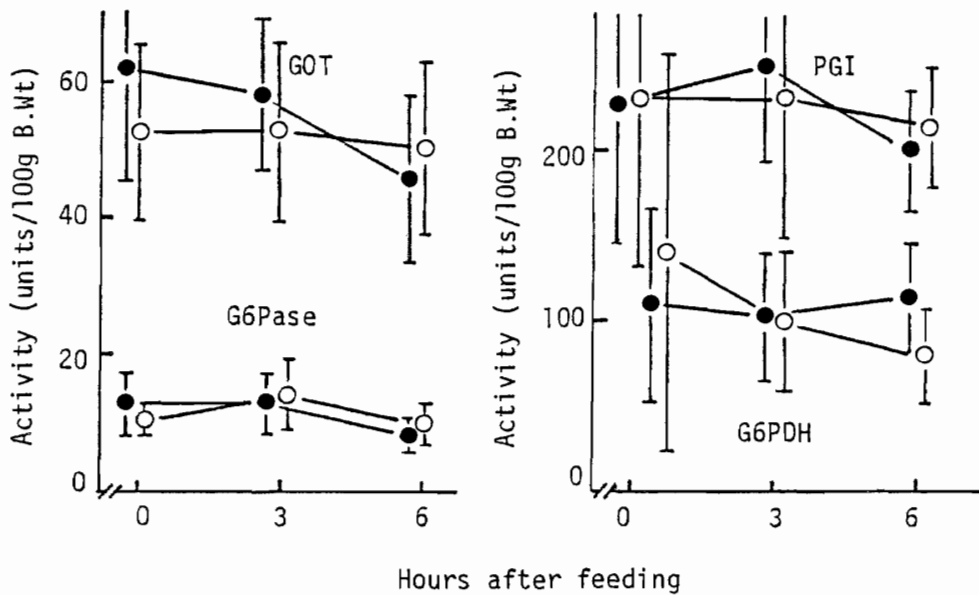


Fig. V-6. Changes in activity of some hepatic enzymes after feeding.
 ○ Test, ● Control.

V-3 考 察

0.05%の割合でモルシンを添加した飼料の遊離 Tyr 含量は、調製後30分間にかけて増大した。本実験に用いた消化剤モルシンの消化力はブタペプシンに比べて強く、タンパク質をより低分子にまで分解する作用を持ち、Met, Glu, Arg, Tyr, Val, Phe, His, Gly, Ser, Ala, Asp, Lys などのアミノ酸を主に遊離することが知られている。これらのアミノ酸のなかに第I章で摂餌促進物質として同定されたアミノ酸の多くが含まれていることから、モルシン添加区の摂餌量が無添加区より増大したものと推察される。しかも、モルシン0.05%添加飼料で飼育した後期の摂餌率が、その0.025%添加飼料で飼育した前期に比べて増大していたことは、モルシンのタンパク分解作用によって遊離したアミノ酸がウナギの摂餌活性を促進させたことを裏付けているのかもしれない。竹田ら¹²⁷⁾はハマチ用配合飼料へ市販消化酵素剤を添加することによって、低水温期のハマチの摂餌活性を高く維持できたことを報告し、その原因は消化酵素剤の加水分解作用による遊離アミノ酸含量の増加に基因することを示した。また Fujimaki ら¹²⁴⁾は、魚類タンパク濃縮物へのモルシン添加はヒトに対する魚肉味を増強させる効果を持つことを示し、これはモルシンのタンパク分解作用によるアミノ酸と低分子ペプチドの遊離に基づくことを明らかにした。このように、飼料への市販消化酵素剤の添加は、ウナギの摂餌活性の促進にも有効な手段であることが明白となった。今後はウナギ摂餌促進物質を多量に含む未利用の生物資源を検索する必要がある。

モルシン添加区では無添加区に比べて摂餌量が増大したにもかかわらず、飼料効率や各種蓄積率が僅かに劣っていた。そこで両区の摂餌後の消化吸收過程と肝臓の代謝酵素活性などを測定したところ、モルシン添加区では無添加区に比べて全消化管内容物に占める腸内容物の割合がかなり高く、逆に糖質消化率は8%程度低かった。この事実は第IV章第1節で指摘した腸内容物量の増大と消化率の低下との関連を支持するものであろう。そこで、モルシン添加区で認められた低糖質消化率の原因を明らかにするために、各種項目について分析を行ったところ、胃・腸内容物中の遊離アミノ態窒素量、PAA 値、血糖値、肝臓のアミノ酸・糖質代謝酵素活性などには区間差が認められなかったのに対して、胃・腸内容物中の遊離糖質含量は無添加区よりモルシン添加区に顕著に高く維持されていた。この結果からモルシン添加区に認められた低糖質消化率は、腸での糖質吸収の抑制に基づくものと推測される。すなわち、第III章で述べたように、ウナギ腸内容物のアミラーゼ活性は、摂餌3時間後まではあまり増大せずそれ以後徐々に高くなる傾向が認められることから、モルシン添加区では腸内腔に比較的早くから多量の糖質が遊離していても、それを効率よく吸収することができなかったものと推察される。この点はウナギの糖利用能の低さに関連するのかもしれない。

モルシン添加区では無添加区に比べて、胃内容物におけるペプシン様酵素活性が顕著に抑制されていたが、その遊離アミノ態窒素量には差異が認められなかった。この主な原因は、先のモルシン中のアミラーゼによる遊離糖質の増大と同じく、モルシンに含まれるプロテアーゼの作用によるものと推測される。なお、モルシン添加区の胃内容物のペプシン様酵素活性が比較的低かったのは、腸内容物中の高濃度の遊離糖質によるものかもしれない。ほ乳類では腸内腔に過剰の栄養素が滞留すると腸組織からエンテロガストロン¹⁰⁴⁾、CCK^{28,29)} および GIP²⁹⁾ などの消化管ホルモンが分泌されて、胃の運動や胃液の分泌が抑制されることが知られている。したがって、本実験でも、腸内腔に多量の糖質が滞留したモルシン添加区では、胃液の分泌を抑制させるような消化管ホルモンおよびホルモン様物質が分泌されていた可能性が推察される (Fig. V-7)。さらに、第IV章第1節で示した消化不良性下痢がモルシン添加区にも起こり、無添加区より比較的低い飼料効率や各種蓄積率が得られたのかもしれない。このように、糖利用能の低いウナギでは、摂餌後の比較的早い時間に消化管内に多量の糖質が遊離生成されると、それを効率よく吸収できないだけでなく、他の栄養素の消化吸収にも悪影響を及ぼすことが示唆された。Furuichi ら^{128,129)} はハマチとマダイで、摂餌後早い時間に糖質を吸収してもこれを効率よく代謝できないのは、インシュリンの絶対的不足が間接的原因であるとしている。今後、各種の養殖魚について、摂餌後の急速な糖質吸収がタンパク質および脂質の吸収ならびにこれらの消化酵素の活性に及ぼす影響を詳細に追究する必要がある。

本章の実験から、配合飼料への消化酵素剤モルシンの添加はウナギの嗜好性を向上させる手段として有効であることが明らかになった。しかし、モルシン添加区のウナギでは、モルシンに含まれるアミラーゼの作用で、摂餌後速やかに多量の糖質が消化管内に遊離することが明らか

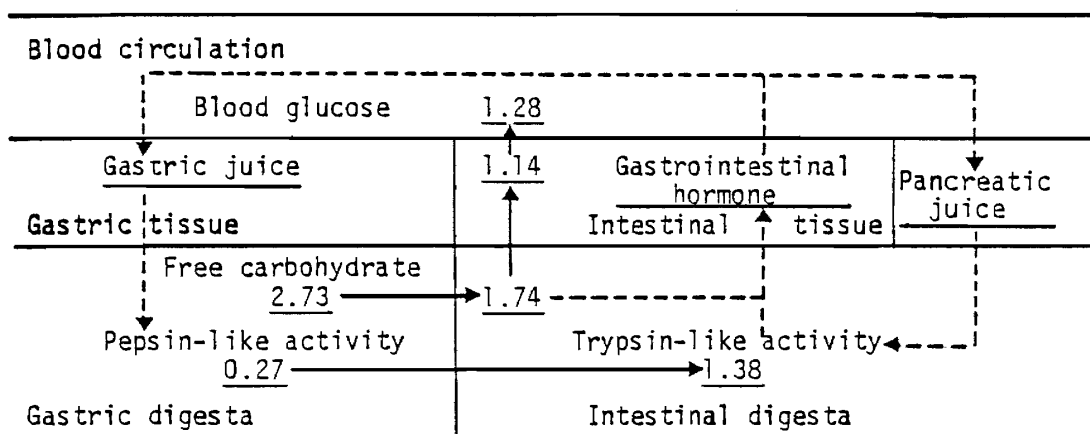


Fig. V-7. Schematic flow chart of free carbohydrate and protease activity in gastrointestinal tissue and digesta at 6 hours after feeding. Values in this figure were expressed as ratio of activity and concentration in Molsin diet group to those in control group.

かになった。したがって、モルシン添加区の飼育成績が無添加区のそれより僅かに劣ったのは、この遊離糖質が十分に吸収利用されずに、腸内に滞留して胃液の分泌を抑制し、タンパク質の消化を多少阻害したためであろうと推察した。したがって、今後はアミラーゼを含有しない酸性プロテアーゼ剤を用いて飼料への添加効果を検討する必要がある。

摘 要

養魚飼料へ摂餌促進物質をフレーバーとして利用する場合、本来の摂餌促進効果とともに飼料の消化吸收過程や栄養代謝に及ぼす好影響が期待されるが、この方面の研究はこれまでほとんど行われていない。そこで、本研究では、魚類養殖学の立場から、養魚飼料への摂餌促進物質の添加効果を詳細に調べることを目的として、現在養殖されている淡水魚の中でとりわけ重要なウナギを試験魚として、まずその摂餌促進物質を同定し、次にそれを配合飼料へ添加した際の摂餌促進効果、ならびに栄養素の消化および代謝に及ぼす影響について検討した。

(1) まず、ウナギの摂餌促進物質の同定を試みた。すなわち、ウナギ稚魚はイソゴカイ合成エキスを添加した北洋魚粉とカゼインをベースにした試験飼料に高い摂餌活性を示したので、この合成エキスをアミノ酸、核酸関連物質およびその他の化合物の3大画分に分けて、それらの摂餌促進活性を調べた。その結果、アミノ酸画分にイソゴカイ合成エキスの摂餌促進活性に相当する高い活性が認められ、また他の化合物画分にも僅かな活性のあることが明らかになった。しかし、核酸関連物質画分には摂餌阻害活性しか認められなかった。

最も高い摂餌促進活性が認められたアミノ酸画分について、その構成アミノ酸を種々のグループに分けて活性を比較検討したところ、最終的に Ala, Gly, Pro, His の4種アミノ酸混合物にイソゴカイ合成エキスを匹敵する高い活性が認められた。また、その他の化合物画分の主成分であるグリシンベタインにも、本画分に相当する摂餌促進活性が認められた。

核酸関連物質画分を構成する化合物ならびに非構成成分である GMP の摂餌促進活性を調べたところ、IMP と UMP に弱い活性が、GMP に比較的強い活性がそれぞれ認められたが、AMP には摂餌阻害活性しか認められなかった。

これらの摂餌促進活性を持つ化合物のうちで最も活性の高かった Ala, Gly, Pro および His の4種アミノ酸混合物に、グリシンベタイン、GMP, IMP および UMP を一種ずつ併用添加してウナギ稚魚に対する摂餌促進活性を調べた。その結果、4種アミノ酸混合物に UMP を併用添加した時にのみイソゴカイ合成エキスの活性より優れた摂餌促進活性のあることが明らかになった。

以上の結果から、最終的に Ala, Gly, Pro, His および UMP の混合物がウナギ稚魚の摂餌促進物質として同定された。

(2) シラスウナギ用配合飼料に前述の摂餌促進物質をフレーバーとして添加して、その餌付け促進効果を検討した。シラスウナギはフレーバー添加飼料に対して、対照のイトミミズエキス添加飼料や水だけを添加した飼料より高い摂餌活性を示し、本フレーバーはシラスウナギの

餌付け促進に有効であることが明らかになった。しかし、イトミミズ（生き餌）の摂餌促進活性に比較するとかなり劣った。このイトミミズの高活性は、生き餌であったことから、その動きに起因する視覚刺激が大きく関与していたものと推察される。

(3) 上記のフレーバー添加飼料を用いて、ウナギ稚魚および成魚を飼育し、飼育成績に及ぼす飼料へのフレーバー添加の影響を調べた。フレーバー添加区では対照の無添加区より摂餌量は増加したが日間摂餌率には大きな区間差はなかった。しかし、増重量、飼料効率および各種蓄積率はいずれもフレーバー添加区に顕著に高かった。また、ウナギ稚魚に、27°Cで無添加飼料を給与するよりも、24°Cでフレーバー添加飼料を給与した方が優れた飼育成績が得られたことから、飼料へのフレーバーの添加は加温養殖におけるエネルギーの節約にも有効なことが明らかになった。更に、ウナギ成魚では、脂質およびエネルギーの蓄積率がフレーバー添加により倍増したことから、飼料へのフレーバーの添加は単にウナギの摂餌を促進させるだけでなく、摂取した栄養素の利用効率を高める効果もあることが示唆された。

(4) ウナギの消化吸收機構に及ぼす飼料へのフレーバー添加の影響を明らかにするため、予備実験としてフレーバー添加飼料摂取後の消化器官の組織と内容物における消化酵素活性の経時変化を調べた。

胃組織中のペプシン様酵素活性は摂餌3時間後まで低下し、それ以後増大した。胃内容物中の同活性は組織での活性に比べて顕著に低く、また大きな経時変化も認められなかった。脾臓を除く腸組織中のトリプシン様酵素活性は摂餌後速やかに低下し5時間後に最低になった。一方、腸内容物中の同活性は胃内容物中のペプシン様酵素活性に比べて顕著に高く、さらに腸組織中の同活性とは対照的に摂餌5時間後に最高に達し、それ以後減少した。摂餌後の腸組織中のアミラーゼ活性には大きな経時変化が認められず、比較的一定していた。ところが、腸内容物中の同活性は組織中のそれに比べて著しく低く、摂餌3時間後から徐々に上昇する傾向にあった。

腸内腔への消化酵素の分泌機序を検討するために、腸内容物重の体重比と消化酵素活性との相関関係を調べたところ、トリプシン様酵素とアミラーゼの活性はともに腸内容物重の体重比と正の相関を示した。

以上の結果から、ウナギでは胃はタンパク質消化器官としての役割が比較的小さく、むしろ腸内腔での本格的な消化吸收を受ける前の一時的な食物の貯蔵器官としての役割が大きいものと推察された。また、腸内腔へのトリプシン様酵素ならびにアミラーゼの分泌量は、胃から腸管へ移行した食塊量の多少によって調節されることが推察された。

(5) 先の実験で示唆されたフレーバー添加による栄養素の利用促進効果を裏付けるために、

フレーバー添加飼料と無添加飼料でウナギを25日間飼育し、飼育終了日の摂餌3および6時間後に両区より固体別に肝臓、消化管およびその内容物を採取して、消化率、消化酵素活性および肝臓酵素活性を測定し、フレーバー添加の影響を調べた。

(イ) まず、両区の胃内容物量の経時変化を調べたところ、いずれもそれは摂餌6時間後までほぼ直線的に減少した。しかし、フレーバー添加区における腸内容物量は無添加区に比べて顕著に少なかった。胃と腸の内容物を合わせた全消化管内容物量についてみると、フレーバー添加区で摂餌後速やかに減少したが、無添加区では摂餌3時間後まで減少せずそれ以後減少した。

(ロ) 摂餌6時間後の全腸内容物についてタンパク質および糖質のみかけの消化率を測定したところ、いずれもフレーバー添加区に高く、特に糖質の消化率が著しく高かった。

(ハ) 摂餌3および6時間後の消化管とその内容物中の消化酵素活性を測定したところ、両区の胃組織中のペプシン様酵素活性には差異は認められなかったが、摂餌3時間後の胃内容物中の同活性は、無添加区に比べてフレーバー添加区で約2倍も高く既に6時間後の活性レベルに達していた。一方、腸組織中のトリプシン様酵素活性には区間差が認められなかったが、腸内容物中の同活性は胃内容物中のペプシン様酵素活性の場合とは逆に、フレーバー添加区より無添加区の方に高かった。また、フレーバー添加区では腸内容物量とそのトリプシン様酵素活性との間に有意に高い正の相関関係が認められたのに対して、無添加区では低い相関関係しかみられなかった。

以上の3つの実験結果から、飼料へフレーバーを添加するとウナギの消化吸收作用が促進されることは明らかである。おそらく、ウナギでもほ乳類と同様に化学感覚を介する胃液の脳相分泌により、摂餌後の胃内腔へのペプシン様酵素の分泌が比較的早くから活発になるものと思われる。さらに、フレーバー添加区では胃より腸内腔に移行してきた内容物量に応じてトリプシン様酵素の分泌量が調節されることも示唆された。

(ニ) 両区の肝臓の GOT, GPT, G6Pase, PGI, G6PDH, PGDH などの酵素活性を比較したところ、G6Pase を除く 5 酵素の活性はいずれもフレーバー添加区に高い傾向が認められた。血糖値と血漿遊離アミノ態窒素量は逆にフレーバー添加区に低い傾向が認められた。

以上の(イ)~(ニ)の結果を総括すると、飼料へのフレーバーの添加は単にウナギの摂餌を促進させるだけでなく、消化吸收作用を促進させ、さらに吸収した糖質やタンパク質の異化代謝に関与する肝臓酵素の活性を高めることが明らかになった。したがって、飼料へのフレーバーの添加は飼料栄養素の利用を改善し、飼料効率を向上させる副次的効果のあることが分かった。

(6) ウナギの飼料に対する嗜好性を向上させる実用的方法の一つとして、飼料へ市販消化酵素剤（モルシン）を添加してタンパク質の一部を分解し、摂餌促進活性を持つアミノ酸を遊離

させることを試みた。まず、飼料へのモルシン添加により、30分後に遊離アミノ酸含量が増大することを確認したのち、モルシン添加飼料と対照の無添加飼料でウナギを23日間飼育したところ、モルシン添加区では無添加区に比べて摂餌量は増大したにもかかわらず、飼育成績は逆に劣った。この原因について調べた結果、モルシン添加区では無添加区に比較して、摂餌3および6時間後の全消化管内容物量に対する腸内容物量の割合や消化管内容物中の遊離糖質含量が高く、糖質消化率が低かった。一方、モルシン添加区の胃内容物のペプシン様酵素活性は無添加区に比べて極めて低く維持され、腸内容物のトリプシン様酵素活性は逆に高かった。しかし、腸内容物のアミラーゼ活性には区間差は認められなかった。

以上の結果から、飼料に市販消化酵素剤モルシンを添加するとウナギの飼料に対する嗜好性は向上するが、モルシンに含まれるアミラーゼの作用により摂餌後の比較的早い時間より腸内腔に多量の糖質が遊離・滞留し、その結果胃液の分泌が抑制されることが明らかになった。このことが、モルシン添加区での低成長の一因であると考えられた。

(7) 以上の本研究結果より、飼料へのフレーバー添加は、摂餌行動の誘起、刺激および継続を促進してウナギの摂餌活性を増大させるばかりでなく、味覚や嗅覚を介した化学感覚刺激が中枢神経系に作用して、摂取した栄養素の消化吸收を促進させるとともに、肝臓の代謝酵素活性を高めて吸収された栄養素を効率よく利用させるなど、ウナギの栄養代謝機能の向上に極めて有効であることが明らかになった。また、ほ乳類に酷似する複雑な消化吸收過程がウナギにも存在することが示されたことから、今後はさらに他の多くの魚種について摂餌促進物質が同定されることが望まれるとともに、消化吸收過程や代謝に及ぼす神経系、消化管ホルモンおよび内分泌系ホルモンの影響についての基礎的研究の推進が望まれる。

文 献

- 1) 野村 正：“海洋生物の生理活性物質”，南江堂，東京，1978，pp. 1-211.
- 2) W.E.S. Carr and T.B. Chaney：Comp. Biochem. Physiol., 54A, 437-441 (1976).
- 3) W.E.S. Carr：Comp. Biochem. Physiol., 55A, 153-157 (1976).
- 4) W.E.S. Carr, K.M. Blumental, J.C. Netherton III：Comp. Biochem. Physiol., 58A, 69-73 (1977).
- 5) A.W. Sangster, S.E. Thomas and N.L. Tingling：Tetrahedron., 31, 1135-1137 (1975).
- 6) 竹井 誠：東海水研報, 65, 47-51 (1971).
- 7) T. Ohsugi, I. Hidaka and M. Ikeda：Chem. Senses Flavor 3, 355-368 (1978).
- 8) 伊奈和夫・松井博司：農化, 54, 7-12 (1980).
- 9) 伊奈和夫・東 久美：農化, 52, 19-23 (1978).
- 10) A.M. Mackie and J.W. Adron：Comp. Biochem. Physiol., 60A, 79-83 (1978).
- 11) J.W. Adron and A.M. Mackie：J. Fish Biol., 12, 303-310 (1978).
- 12) A.M. Mackie, J.W. Adron and P.T. Grant：J. Fish Biol., 16, 701-708 (1980).
- 13) S. Fuke, S. Konosu and K. Ina：Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 47, 1631-1635 (1981).
- 14) J. Caprio：Comp. Biochem. Physiol., 52A, 247-251 (1975).
- 15) S. Kiyohara, S. Yamashita and S. Harada：Physiol. Behav., 26, 1103-1108 (1981).
- 16) I. Hidaka, T. Ohsugi and T. Kubomatsu：Chem. Senses Flavor 3, 341-354 (1978).
- 17) Y. Goh and T. Tamura：Comp. Biochem. Physiol., 66C, 217-224 (1980).
- 18) I. Hidaka, S. Kiyohara, M. Tabata and K. Yonezawa：Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 41, 275-281 (1975).
- 19) S. Kiyohara, I. Hidaka and T. Tamura：Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 41, 383-391 (1975).
- 20) J.E. Bardach, L.H. Todd and R. Crickmer：Science, 155, 1276-1278 (1967).
- 21) J. Caprio：J. Comp. Physiol., 123, 357-371 (1978).
- 22) Y. Goh and T. Tamura：Comp. Biochem. Physiol., 66C, 225-229 (1980).
- 23) 竹田正彦：“魚類の化学感覚と摂餌促進物質”（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 109-119.
- 24) J. Atema：“Chemical Senses, Chemical Signals and Feeding Behavior in Fishes” (ed. by J.E. Bardach, J.J. Magnuson, R.C. May and J.M. Reinhart) International Center

- for Living Aquatic Resources Management, Manila, 1980, pp. 57-101.
- 25) 木船絃雨・伊奈和夫：昭和55年度日本水産学会春季大会講演要旨集, No. 613.
 - 26) R. Metailler, M. Cadena-Roa and J. Rerson-LeRuet : J. World Maricult. Soc., 14, 679-683 (1983).
 - 27) 弓狩康三・鳥居邦夫：“味覚の科学” (佐藤昌康編), 朝倉書店, 東京, 1981, pp. 244-266.
 - 28) 吉村寿一・井上太郎・三好正人・片山吉穂：“新医科生理学” (吉村寿一編), 南江堂, 東京, 1968, pp. 1-158.
 - 29) 伊藤 漸：“消化管ホルモン” (講談社サイエンティフィック編), 講談社, 東京, 1980, pp. 212-258.
 - 30) L.O. Uttenthal : Proc. Nutr. Soc., 44, 53-61 (1985).
 - 31) P.J. Hornnes, C. Kuhl, J.J. Hoist, K.B. Lauritsen, J.F. Rehfeld and T.W. Schmartz : Metabolism, 29, 777-779 (1980).
 - 32) 藤田恒夫：生体の科学, 25, 35-45 (1974).
 - 33) 池田静徳：“魚類の栄養と飼料” (荻野珍吉編), 恒星社厚生閣, 東京, 1980, pp. 27-37.
 - 34) R. Fange and D. Grove : “Fish Physiology VIII” (ed. by W.S. Hoar, D.J. Randall and J. R. Brett), Academic Press, New York, 1979, pp. 161-260.
 - 35) 野村 正：“水産動物のホルモン” (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1976, pp. 60-78.
 - 36) 小栗幹夫：“魚類生理学概論” (田村 保編), 恒星社厚生閣, 東京, 1977, pp. 127-155.
 - 37) 鴻巣章二・山口勝己：“生物活性天然物質” (柴田承二編), 医歯薬出版, 東京, 1978, pp. 193-204.
 - 38) 農林水産省統計情報部：昭和59年度漁業・養殖業生産統計年報, 193-227 (1985).
 - 39) 上田一夫・佐藤真彦・岡 良隆：“魚類の化学感覚と摂餌促進物質” (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, 1981, pp. 9-25.
 - 40) 落合 明：“魚類学下”, 恒星社厚生閣, 東京, 1986, pp. 555-570.
 - 41) T. Nose : Bull. Freshwater Fish Res. Lab., 19, 31-36 (1969).
 - 42) Y. Hashimoto, S. Arai and T. Nose : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 36, 791-797 (1970).
 - 43) S. Arai, T. Nose and Y. Hashimoto : Bull. Freshwater Fish Res. Lab., 21, 161-177 (1971).
 - 44) S. Arai, T. Nose and Y. Hashimoto : Bull. Freshwater Fish Res. Lab., 22, 69-79 (1972).

- 45) S. Arai, T. Nose and Y. Hashimoto : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 38, 753-759 (1972).
- 46) T. Nose and S. Arai : Bull. Freshwater Fish Res. Lab., 23, 145-154 (1973).
- 47) 清水千秋：“養魚飼料-基礎と応用”（米 康夫編），恒星社厚生閣，東京，1985，pp. 53-63.
- 48) 橋本芳郎・鴻巣章二・伏谷伸宏・能勢健嗣：日水誌，34，78-83（1968）.
- 49) 鴻巣章二・伏谷伸宏・能勢健嗣・橋本芳郎：日水誌，34，84-87（1968）.
- 50) K. Yosii, N. Kamo, K. Kurihara and Y. Kobatake : J. Gen. Physiol., 74, 301-317 (1979).
- 51) 清原貞夫：“魚類の化学感覚と摂餌促進物質”（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 63-74.
- 52) A.M. Mackie and A.I. Mitchell：“Nutrition and Feeding in Fishes”（ed. by C.B. Cowey, A.M. Mackie and J.G. Bell），Academic Press, New York, 1985, pp. 177-189.
- 53) 示野貞夫：高知大水実研報，No. 2，1-107（1974）.
- 54) 細川秀毅・滝井健二・竹田正彦：昭和53年度日本水産学会春季大会講演要旨集，No. 133.
- 55) 細川秀毅・竹田正彦・滝井健二・植月則幸：昭和51年度日本水産学会春季大会講演要旨集，No. 142.
- 56) 細川秀毅・滝井健二・菊地達人・竹田正彦：昭和52年度日本水産学会春季大会講演要旨集，No. 608.
- 57) W.E.S. Carr, A.R. Gondeck and R.L. Delanoy : Comp. Biochem. Physiol., 54A, 161-166 (1976).
- 58) M.G. Powson : Comp. Biochem. Physiol., 56A, 129-135 (1977).
- 59) M.G. Powson : J. Cons. Int. Eyplor., 37, 316-318 (1978).
- 60) 津嶋純一・伊奈和夫：農化，52，19-23（1978）.
- 61) 竹田正彦：“魚類の栄養と飼料”（荻野珍吉編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 12-26.
- 62) S. Konosu, Y.N. Chen and Y. Hashimoto : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 32, 881-886 (1966).
- 63) J.E. Halver : J. Nutr., 62, 225-243 (1957).
- 64) 竹田正彦：遺伝，34，45-51（1980）.
- 65) 竹井 誠：東海水研報，49，119-129（1969）.
- 66) 石渡直典：日水誌，34，785-791（1968）.
- 67) 池田 至・細川秀毅・竹田正彦：昭和61年度日本水産学会春季大会講演要旨集，No. 223.

- 68) J.G. Mile : J. Fish. Res. Bd. Canada, 25, 1591-1602 (1968).
- 69) P.W. Sorensen : Maritimes, 28, 8-10 (1984).
- 70) 鴻巣章二・福家真也：“魚類の化学感覚と摂餌促進物質”（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 96-108.
- 71) I. Hidaka, S. Kiyohara and S. Oda : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 43, 423-428 (1977).
- 72) 日高馨夫・大杉 正：昭和54年度日本水産学会春季大会講演要旨集，No. 411.
- 73) T. Kaku, M. Tumagari, S. Kiyohara and S. Yamashita : Physiol. Behav., 25, 99-105 (1980).
- 74) 原 俊明：“魚類の化学感覚と摂餌促進物質”（日本水産学会編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 48-62.
- 75) 国中 明：農化，34，489-492 (1960).
- 76) 日高秀夫・立川 涼：生態化学，8，17-27 (1985).
- 77) T.J. Hara, Y.M.C. Law and S. Macdonald : J. Fish. Res. Bd. Canada, 33, 1568-1573 (1976).
- 78) 池田静徳：“魚介類の微量成分”（池田静徳編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 32-51.
- 79) 新井健一：日水誌，32，174-179 (1966).
- 80) S. Yamaguchi : J. Food Sci., 32, 473-479 (1967).
- 81) S. Yamaguchi, T. Yoshikawa, T. Ninomiya and S. Ikeda : J. Food Sci., 36, 846-849 (1971).
- 82) Y. Suehiro : Jpn. J. Zool., 10, 1-303 (1962).
- 83) 坂口守彦：“魚介類の微量成分”（池田静徳編），恒星社厚生閣，東京，1981，pp. 2-31.
- 84) C.H. Dempsy : J. Mar. Biol. Assoc. U.K., 58, 739-747 (1978).
- 85) 新聞弥一郎・新聞脩子：淡水研報，18，169-178 (1968).
- 86) F. Salti : Master Thesis, Kochi Univ., 1-73 (1984).
- 87) 伊奈和夫：化学増刊，75，167-183 (1978).
- 88) I. Hidaka and S. Yokota : Jpn. J. Physiol., 17, 652-666 (1967).
- 89) 伊奈和夫：日水誌，47，627-630 (1981).
- 90) 伊奈和夫：日水誌，47，1351-1354 (1981).
- 91) 伊奈和夫・大須賀穂作・鈴木雄策：水産増殖，31，111-114 (1983).
- 92) S. Yamada and Y. Yone : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52, 673-676 (1986).
- 93) H.R. Berthoud, E.R. Trimble, E.G. Siegel, D.A. Bereiter and B. Jeanrenaud : Am. J.

- Physiol., 238, E336-E340 (1980).
- 94) A.B. Steffens: *Am. J. Physiol.*, 230, 1411-1415 (1976).
- 95) 森下達雄・野田宏行・北御門学・高橋 喬・立野新光: 三重県立大水産学部紀要, 6, 239-246 (1964).
- 96) R. Yoshinaka, M. Satou, T. Suzuki and S. Ikeda: *Comp. Biochem. Physiol.*, 80B, 5-9 (1985).
- 97) T. Onishi, S. Murayama and M. Takeuchi: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 42, 921-929 (1976).
- 98) 大西登史良・村山繁雄・竹内昌昭: 東海水研報, 75, 33-38 (1973).
- 99) 荻原丈二: “酵素研究法 No. 2” (赤堀四郎編), 朝倉書店, 東京, 1955, pp. 237-246.
- 100) H. Tauber and I.S. Kleiner: *J. Biol. Chem.*, 99, 249-255 (1932).
- 101) S. Kawai and S. Ikeda: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 37, 333-337 (1971).
- 102) 示野貞夫・細川秀毅・平田 博・竹田正彦: 日水誌, 43, 212-217 (1977).
- 103) 安永義暢: 東海水研報, 65, 5-10 (1971).
- 104) B. Richards and D.F. Chapman: “ひとりで学べる解剖と生理 5” (山田英智監修), 広川書店, 東京, 1979, pp. 32-72.
- 105) N.R.C.: “Nutrient Requirements of Warmwater Fishes and Shell Fishes”, National Academic Press, Washington D.C., 1983, pp. 1-102.
- 106) N.R.C.: “Nutrient Requirements of Coldwater Fishes”, National Academic Press, Washington D.C., 1981, pp. 1-62.
- 107) 荻野珍吉: “魚類の栄養と飼料” (荻野珍吉編), 恒星社厚生閣, 東京, 1980, pp. 111-139.
- 108) M. Furuichi: *Rep. Fish. Res. Lab., Kyushu Univ.*, No. 6, 1-59 (1983).
- 109) G.M. Green, B.A. Olds, G. Matthews and R.L. Lyman: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142, 1162-1167 (1973).
- 110) J.H. Meyer: “Endocrinology of the gut” (ed. by W.Y. Chey and F.P. Brooks), Charles B. Slack Co., New York, 1974, pp. 241-252.
- 111) 古川 厚・塚原宏子: 日水誌, 32, 502-506 (1966).
- 112) J.E. Hodge and B.T. Hofreiter: “Methods in Carbohydrate Chemistry Vol. 1” (ed. by R.L. Whistler and M.L. Wolfrom), Academic Press, New York, 1962, pp. 388-389.
- 113) L. Olbe: *Gastroenterology*, 44, 463-468 (1963).
- 114) R. Ash: “Nutrition and Feeding in Fish” (ed. by C.B. Cowey, A.M. Mackie and J.G.

- Bell), Academic Press, New York, 1985, pp. 69-93.
- 115) S.S. Percival and B.O. Schneeman : J. Nutr., 109, 1609-1614 (1979).
- 116) B.O. Schneeman and R.L. Lyman : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 148, 897-903 (1975).
- 117) E.J.W. Barrington and G.J. Dockray : Gen. Comp. Endocrinol., 19, 80-87 (1972).
- 118) J.F. Goodwin : Clin. Chem., 14, 1080-1090 (1968).
- 119) 能勢健嗣：“魚類の栄養と飼料”（荻野珍吉編），恒星社厚生閣，東京，1980，pp. 37-60.
- 120) M. Nagai : Ph.D. Thesis, Kyoto Univ., 1-80 (1972).
- 121) 示野貞夫：“魚類の物質代謝”（永山文雄編），恒星社厚生閣，東京，1983，pp. 9-22.
- 122) 示野貞夫・細川秀毅・梶山英俊・竹田正彦：高知大水実研報，No. 3, 89-99 (1978).
- 123) Y. Inui and M. Yokote : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 41, 965-972 (1975).
- 124) M. Fujimaki, S. Arai, M. Yamashita, H. Kato and M. Noguchi : Agr. Biol. Chem., 37, 2891-2898 (1973).
- 125) 岡村 浩・岡本 奨・武藤聡雄：“食品栄養学実験”（広田 望編），地球社，東京，1981，pp. 189-218.
- 126) 高橋 喬・森下達雄・立野新光：日水誌，33, 560-566 (1967).
- 127) 竹田正彦・示野貞夫・滝井健二・桑原秀俊：昭和59年度日本水産学会秋季大会講演要旨集，No. 132.
- 128) M. Furuichi and Y. Yone : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 48, 945-948 (1982).
- 129) M. Furuichi, H. Taira and Y. Yone : Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 52, 99-102 (1986).