

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07579

研究課題名(和文)消化ホルモンCCKに着目した植物飼料の摂餌量低下要因の究明

研究課題名(英文)A reduction of feed intake of plant based diet by fish focused on CCK

研究代表者

益本 俊郎(Toshiro, Masumoto)

高知大学・教育研究部自然科学系農学部門・教授

研究者番号：10238917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物原料で魚粉を置き換えた持続可能な低魚粉飼料には養魚の摂餌量が低下する問題がある。しかしなぜ摂餌量が低下するか、また摂餌量を増やす有効な方法について明らかにされていない。本研究では食欲を抑制するホルモンであるCCK8は短期的な摂餌停止の要因として働いていないと考えられた。また摂餌量の増量には大豆リン脂質が有効で、フォスファチジルコリン画分に効果が強いことがわかった。

研究成果の概要(英文)：High demand and low supply of fishmeal in the market necessitates the replacement of fishmeal in feeds with plant protein sources but a major drawback of using plant proteins is a reduction of the feed intake by fish. However, it is not clear a mechanism of the low feed intake of feed with a high inclusion of plant protein and effective measures to increase feed intake, either. The present research elucidated that CCK, which is known as an appetite-suppressing hormone, concentration in blood did not increase right after feeding suggested that CCK did not act as a signal to terminate feeding behavior. On the other hand, a feed intake of fish increased with a supplementation of SBL and it was found that an effective fraction in SBL was phosphate.

研究分野：魚類栄養飼料学

キーワード：養魚飼料 植物原料 摂餌量 プリ 養殖

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の養魚飼料は、有限な魚資源を原料にした魚粉に依存しているため持続可能性が低い。そこで魚粉に依存した養魚飼料から脱却するため、低魚粉で大豆など植物原料を使った低魚粉植物飼料の開発研究が進められている。しかしながら植物原料を多用した飼料では養魚の摂餌量が落ち、その結果成長が低下することが問題となっている。

(2) そのため養魚の摂餌を増進する摂餌刺激物質を飼料に添加がしているが、その効果は限定的で抜本的な解決にはなっていない。

(3) したがって、なぜ植物原料を含む飼料を魚が食べないのか、その根本的な理由を明らかにし、その上で摂餌量を増加させる方策を見出す必要がある。

(3) 動物の食欲は神経やホルモンで調節されている。中でも食欲を抑制するホルモンとしてコレシストキニン(CCK)が陸上動物および魚類でも広くその効果が知られている。

(4) また陸上実験動物では大豆を摂取するとCCKの分泌が増加して摂餌量が低下するといった報告がある。

## 2. 研究の目的

(1) 植物原料を含む飼料を与えた魚が、どのような作用機序で飼料消費量が落ちるのかを明らかにする目的で、脳で食欲を抑制する作用を持つペプチドホルモンであるコレシストキニン(CCK)に着目して研究を行った。

(2) 植物原料を含む飼料の摂餌量を増加させる有効な成分を探索してその効果を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 摂餌後のCCK濃度の測定

一定期間陸上水槽で予備飼育をしたブリ養魚を試験魚とした。摂餌前、摂餌行動を停止した直後および摂餌3時間後に試験魚を取り上げ、ヘパリン処理したシリンジで心臓から採血したのちに、腹部を開腹して幽門垂、小腸前部と中央部および頭部から脳を摘出して液体窒素で瞬時に凍結した。その後組織を10倍量の緩衝液とともにホモジナイザーでホモジナイズしたのちに遠心分離して上澄みを得た。血液は遠心分離した血漿を得た。遠心分離した上澄みおよび血漿中のCCKを酵素免疫測定法(ELISA)で測定した。

### (2) 植物飼料を摂取した魚の行動

CCK受容体阻害剤投与の有無が摂餌量に影響するか調べた。また大豆タンパク質を主体とする魚粉を含まない無魚粉飼料に、摂餌刺激物質を添加した飼料を与え、摂餌行動が止まるまで飽食給餌したところで、さらに魚粉飼料を給与して再度摂餌をするか調べた。

### (3) リン脂質の摂餌増量効果

大豆タンパク質に含まれるフラボノイド類は一般に苦味を呈すると言われている。また魚類を含む動物は苦味を含む飼料は忌避して摂餌しない。一方リン脂質に含有するホ

スファチジン酸には苦味を抑える効果があることが陸上実験動物で報告されている。そこで魚粉を含まない大豆タンパク飼料に大豆リン脂質を段階的に添加して摂餌量が増加するか調べた。さらに、大豆リン脂質から精製調製し特定のリン脂質画分を多く含む大豆リン脂質(ホスファチジルセリン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸)を飼料に添加してどの画分に摂餌量の増加効果があるか調べた。

## 4. 研究成果

### (1) CCK濃度の測定

従来はCCK遺伝子の発現量を目安に組織のCCKの分泌応答を調べてきたので、実際の濃度変化については不明だった。そこで消化管の幽門垂および小腸組織のCCK濃度の測定を試みたところ、小腸の前半部と中央部では、濃度が摂餌から3時間の間に摂餌前の約50-60%低下したことから、摂餌に伴うCCKの分泌を初めて明らかにすることができた。さらにこの結果から、ブリの小腸前半部の組織ではCCKが貯蔵されており、摂取した飼料の到来に応答して分泌する重要な部位であることも明らかとなった。一方消化管でCCKの高い遺伝子発現量が報告されている幽門垂では小腸ほど摂餌後に顕著な濃度の低下が認められなかった。幽門垂では分泌と同時に合成が活発に行われているからだと考えられた。

またCCKは食欲抑制に効果があることから、魚が摂餌を止めた直後の脳全体のホモジネートを使ってCCKの濃度を測定したところ、予想に反して摂餌直後ではCCKの濃度は上昇しておらずわずかに減少していた。食欲を調節する部位は脳のごくわずかな容積を占める視床下部に位置しているので、摂餌に伴う特定の部位の微小な濃度変化が、他の大部分の組織濃度に影響されて、実際減少していたのに感知できなかった可能性が考えられた。今後は脳の各部位における摂餌前後のCCK濃度の測定をする必要があることがわかった。

一方CCKの腸から脳への移動が血液を介しておこなわれているのかを調べる目的で、血中CCK濃度も経時的に測定したところ、血液(血漿)のCCK濃度は摂餌直後から3時間にかけてわずかに上昇するにとどまり、哺乳類で報告されているような大量で一過性の分泌は認められなかった。もし大豆や植物含有飼料の摂餌によっておこる早期の摂餌行動の停止が、消化管から分泌されたCCKによっておこるのであれば、血中CCK濃度は摂餌を停止した時に上昇するはずだが、そのような濃度の増加はみられず、陸上動物で報告されているような大豆の摂取によるCCKの分泌増加はなかった。

以上のことから、ブリが摂餌を停止した摂餌直後にCCKが小腸から分泌されたにもかかわらず、血液や脳におけるCCK濃度が上昇し

なかったことから、CCK は摂餌直後に瞬時には血液を介して移動しないこと、さらにブリではCCKが短期的な摂餌を停止する要因として機能してはいない可能性が示唆された。

#### (2) 植物飼料を摂取した魚の行動

大豆を含む植物飼料を与えて摂餌行動が停止した魚に対して、魚粉飼料を給与すると摂餌行動を再開することがわかった。したがって大豆飼料を与えて摂餌行動を停止した時でもブリの食欲自体は低下しておらず、上記の食欲抑制ホルモンであるCCK濃度を測定してCCK濃度に変化がなかった結果と矛盾しなかった。したがって大豆飼料によるブリの摂餌量の低下は、CCKが関与する食欲の低下ではなく、大豆や植物飼料に含まれる摂餌行動を抑制する物質の存在に原因があると考えられた。

#### (3) リン脂質の摂餌増量効果

大豆タンパク質を主タンパク質として魚粉を全く含まない無魚粉飼料をブリに与えると口には含むが飲み込まずに吐き出した。その飼料にアミノ酸と核酸などの摂餌刺激物質を添加すると口には含むが嚥下したが摂餌量は魚粉飼料の場合の6割程度に過ぎなかった。そこで陸上動物で苦味を抑制する効果があると報告されているホスファチジン酸を含む大豆リン脂質を添加したところ、2%以上の添加で摂餌量の有意な増加がみられ、魚粉飼料の摂餌量の8割程度までになった。さらに大豆リン脂質の摂餌増強効果を有するリン脂質画分を調べたところ、予想に反してホスファチジン酸には全く効果が無く、大豆タンパク質飼料の摂餌低下は苦味が原因では無い可能性が示唆された。有意な摂餌量の増加が認められたのはホスファチジルコリンを主に含む画分だった。またリン脂質に一定量含まれる中性脂肪酸を除去してもその効果には差がなかったことから、大豆リン脂質のリン脂質画分に効力があることがわかった。さらにリゾ型のリン脂質では摂餌量の増加が少なく、特定の塩基の存在とともに炭素骨格の構造が重要だと考えられた。一方、大豆タンパク質飼料に摂餌刺激物質を添加せずに大豆リン脂質だけを添加すると、ブリは全く摂餌せず飼料を嚥下しなかったことから、大豆リン脂質自体にはブリに対する嗜好性がないことがわかった。したがって大豆リン脂質による大豆飼料の摂餌量増加効果は、大豆や植物原料に含まれる忌避物質をマスキングしたためだと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) La Xuan, Thao, Ishikawa Manabu, Siriporn Tola, Fukada Haruhisa and Masumoto Toshiro. Effects of dietary phospholipid level and fraction on the

feed intake of non-fish meal diet in yellowtail, *Seriola quinqueradiata* Temminck & Schlegel, 1845 Aquaculture Research 49 569-575 (2018) 査読有

(2) Matsumoto Yasuaki, La Xuan Thao, Morioka Katuji, Fukada Haruhisa and Masumoto Toshiro. Effects of graded levels of taurine supplement to the no-fishmeal diet on the growth and physiology in juvenile yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Aquaculture Science 65 239-246 (2018) 査読有

(3) Nguyen Hung, Khaoian Peerapon, Furutani, Takahiro, Nagano Jyunya, Fukada Haruhisa and Masumoto Toshiro. Effects of alcohol extract of defatted soybean meal on growth performance and digestive physiology of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Fisheries Science 83 99-106 (2017) 査読有

(4) Nguyen Hung, Khaoian, Peerapon, Fukada Haruhisa, Suzuki Nobuyuki and Masumoto Toshiro. Feeding fermented soybean meal diet supplemented with taurine to yellowtail *Seriola quinqueradiata* affects growth performance and lipid digestion. Aquaculture Research 46 1101-1110 (2015) 査読有

##### 〔学会発表〕(計 2 件)

(1) La Xuan Thao、石川学、深田陽久、益本俊郎：ブリ稚魚における大豆リン脂質の摂餌量増加効果 2018年3月東京海洋大学

(2) 松本泰明、渡邊 浩幸、芝 優生、深田陽久、益本俊郎：大豆タンパク質を給与したブリ幼魚の組織カルニチン含量 2016年3月東京海洋大学

##### 〔図書〕(計 件)

##### 〔産業財産権〕

##### 出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

##### 取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

益本俊郎 (Masumoto Toshiro)  
高知大学 教育研究部・教授  
研究者番号：10238917

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )