

平成21年5月29日現在

研究種目：萌芽研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19658074

研究課題名（和文） 植物性養魚飼料に不足する必要栄養素の自発摂餌を用いた探索

研究課題名（英文） Searching of essential nutrients for fish using the self-feeding device in the fish feed from vegetable ingredients

研究代表者

延東 真 (ENDO MAKOTO)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

80128355

研究成果の概要：加速度センサー型自発摂餌スイッチの開発に成功した。これを用いて植物性飼料に含まれないタウリンを指標にして、タウリンを含む餌と含まない餌をマダイに選択させる実験を行った。その結果、マダイはタウリンを含む餌を自発的に摂餌する強い選択性は見られなかった。しかし、タウリン以外にも多くの未知栄養素が存在するはずで、多くのミネラル類などが候補になる。生理的に物質が不足した場合、高い選択性が認められる可能性はある。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|------|-----------|
| 2007年度 | 1,900,000 | 0 | 1,900,000 |
| 2008年度 | 1,000,000 | 0 | 1,000,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 0 | 2,900,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：無魚粉飼料、自発摂餌、栄養素

1. 研究開始当初の背景

現在、魚類養殖で使用する飼料のタンパク質源は魚粉に大きく依存しており、使用割合はおよそ50%以上を占めている。また、中国をはじめとした世界的な魚介類消費量の増大や、養殖業の拡大などにより、魚粉価格の上昇や、人の食料となりうる魚を飼料として使用することに対する批判なども生じ始めている。そのような状況から、現在、飼料のタンパク質源を植物性のものへと転換しようという動きが高まってきている。しかし、

植物性タンパク質を使用した飼料は、摂餌量が減る、成長率が悪くなる、種々の体調不良を引き起こす、などといった問題がみられることから実用化するまでには至っていない。それらの問題の理由はいくつか考えられ、その一つとして、まずタンパク含有率の低さが挙げられる。植物性素材はタンパク含有率がいずれも40%未満と低いため、タンパク要求の高い魚類の飼料原料とするには、素材中のタンパク質を濃縮する必要がある。次に、タンパク消化率の低さが挙げられる。一般的に

植物性原料のタンパク質消化率は魚粉と比較して低く、その主要な原因の一つとして原料中の生理阻害物質の存在が考えられており、直接的にはトリプシンの阻害物質やレクチンによる消化率の低下が報告されている。最後に、魚粉使用飼料と植物性飼料では含まれている栄養素に違いがあるという点が挙げられる。例えば必須アミノ酸については、植物性原料の必須アミノ酸バランスは、魚粉に比較して劣っているため、改善のため何らかの処置が必要であるという。また、魚粉削減飼料で飼育したブリやマダイの成魚は緑肝症を呈するとともに、ブリ親魚では産卵しなくなるが、タウリンを添加することにより症状の改善と産卵が可能になることも明らかになった。このように、植物性タンパク質を使用した飼料に従来の養魚飼料と同等の効果を持たせるためには、多くの課題を克服する必要があるといえる。しかし、わが国における植物性飼料の利用状況をみると、その課題の克服は順調に進んでいるとはいえない。その中でも特に、魚粉使用飼料に比べ植物性飼料では不足している栄養素（ここでは不足栄養素と呼ぶことにする）の探索は特に困難な課題であると考えられる。なぜならば、現在の探索法は主に成長率や死亡率を指標とする方法であるため、手間や時間、経費が莫大であり、効率よく不足栄養素を探ることができていない状況にあるためである。そこで、より簡便な不足栄養素の新しい探索方法が必要であると考えられる。

その新たな手法として考えられるのが、自発摂餌装置による探索方法である。自発摂餌装置とは、『センサー』『制御装置』『給餌器』からなる給餌装置であり、魚がセンサーをついたり引っ張ったりすることで、その刺激が信号に換えられ、給餌器から餌が供給される、という仕組みになっている。自発摂餌装置は魚が餌を食べたいときに食べることができるという魚本位の給餌システムであり、かつ魚の摂餌行動を摂餌回数として表すことができる。それに加え、魚が自分に不足する栄養素があることを認識し、その不足栄養素の添加された飼料を自発的・選択的に摂取することができれば、自発摂餌装置の作動回数の違いなどから簡単に不足栄養素を特定できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、自発摂餌装置の特徴と、魚が不足栄養素の添加された飼料を自発的、選択的に摂取する可能性を利用した。不足栄養素を摂餌回数の違いから簡単に探索するシス

テムの構築を最終的な目的とする。それにあたり研究では、この探索システムが正常に機能するための前提条件である、魚が不足栄養素の添加された飼料を自発的、選択的に摂取するという点を証明する。そのため、植物性飼料に不足する栄養素として代表的なタウリンを不足栄養素とし、魚はタウリンを選択的に摂取することを証明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験 1

① 供試魚と環境

供試魚には、体長 7.6cm のマダイ (*Pagrus major*) を 30 尾使用した。容量 300ℓ、直方体の循環式飼育槽を使用した。また水質維持装置として、間歇濾過装置(プレスカ)と泡沫分離装置(プレスカ)を使用し、水温は 23℃、pH は 7.6~7.8、アンモニア濃度は 0.2ppm 以下、亜硝酸濃度は 0.2ppm 以下、塩分濃度は 35‰ という飼育環境を維持して実験を行った。

② 試験飼料

使用した飼料は購入した原料から作製した。飼料は、タンパク質源として魚粉を一切使用せず、その代わりに牛乳由来のカゼインタンパク質を使用した。飼料は、タウリン 5% 添加飼料、タウリン 0.25% 添加飼料、タウリン無添加飼料の 3 種類を作製し、実験 1 ではタウリン 5% 添加飼料とタウリン無添加飼料を使用した。

飼料作製にあたり、Mineral mix に含まれる trace element mixture を作製した。Trace element mixture の作製には、材料を乳棒と乳鉢を用いて粉状になるまですりつぶし、混合した。このとき、材料全てが満遍なく混ざるよう使用量の少ないものから順にすりつぶして混合した。次に、Mineral mix を trace element mixture と同様に作製した。

飼料の作製は以下のように行った。まず、液体である Feed oil (フィードオイル) と Soybean lechitine (大豆レシチン) 以外の材料を、使用量の少ないものから順に混合し、さらに万能混合攪拌器 (株式会社三栄製作所 25AM-02-QRS) でよく攪拌した。次にそこへ Feed oil と Soybean lechitine を加え、再び万能混合攪拌器でよく攪拌した。さらに蒸留水を作製する飼料の約 3 分の 1 程度加え、万能混合攪拌器でよく攪拌した。攪拌後、それをミートチョッパー (平賀工作所製 AEZ12M) を用いて挽肉状にし、それを手で適当な大きさにほぐした後、ザルを用いて目的の大きさのペレットに成型した。

成型した飼料は、真空凍結乾燥機 (共和真

空技術株式会社製 RLE II-206) を用いて 18 時間程度乾燥させ、実験開始まで 5°C で保存した。

③ 自発摂餌装置・データ記録装置

給餌は加速度センサー式自発摂餌装置 (ケイコムエンジニアリング株式会社) を用いて行った。センサーの感度設定については、残餌発生状況を考慮したうえで、残餌が多く見られるようになるごとに、感度を 1 段階ずつ下げた。また、自発摂餌装置の作動はデータ・ロガー (NEC, omniace II RA1100) により作動時間、回数を記録した。

④ 飼育

飼育槽の両端に自発摂餌装置を設置し、飼育実験開始 2 週間前に両装置からタウリン 5% 添加飼料とタウリン無添加飼料を 1:1 に混合したものを給餌し、装置と飼料に馴致させた。馴致完了は摂餌リズムが安定するまでとし、残餌がほとんど発生しなくなるまでとした。

馴致完了後、装置の一方にはタウリン 5% 添加飼料、もう一方にはタウリン無添加飼料を装填し、10 日間、自発摂餌装置による給餌を行い、摂餌される回数を測定した。10 日後、これら 2 種類の飼料の位置を交換し、さらに 10 日間給餌を行い、計 20 日間の飼育実験を行った。なお、自発摂餌装置の作動時間、回数の記録については、上述のデータロガーを用いて行った。また、paired t-test を用いて、タウリン添加飼料とタウリン無添加飼料の摂餌回数に差があるか否かを検定した。

(2) 実験 2

① 供試魚と環境

実験 1 と同様に供試魚には、体長 7.6cm のマダイ (*Pagrus major*) を 30 尾使用した。実験 1 と同様に容量 3000、直方体の循環式飼育槽を使用した。また水質維持装置として、間歇濾過装置 (プレスカ) と泡沫分離装置 (プレスカ) を使用し、水温は 23°C、pH は 7.6~7.8、アンモニア濃度は 0.2ppm 以下、亜硝酸濃度は 0.2ppm 以下、塩分濃度は 35‰ という飼育環境を維持して実験を行った。

② 試験飼料

タウリン 0.25% 添加飼料とタウリン無添加飼料をそれぞれ使用した。

③ 血中総コレステロール値測定

タウリン無添加飼料での馴致飼育終了後と飼育実験終了後の供試魚から、それぞれ任意に 5 個体選び、それらから採取した血液を

用いて行った。またタウリン欠乏度合いを比較するコントロール区として、馴致飼育区とは別個に設けた飼育槽において市販のマダイ用飼料 (マルハ株式会社 養魚飼料ノヴァ EP-1) を、馴致飼育において給餌されたタウリン無添加飼料とほぼ同じ量だけ与えて 2 週間飼育した供試魚から 5 個体を任意に選び、採血し、コレステロール値を測定した。

測定方法は、まず採取した血液を遠心分離 (4°C、1500rpm、5min) し、血漿成分のみをスポットケム専用チューブに 30~40 μ l 分注した。次に、そのチューブをスポットケムに設置し、血中総コレステロール値を測定した。

4. 研究成果

(1) 実験 1

① 1~10 日目については、タウリン 5% 添加飼料の合計摂餌回数が 614 回、タウリン無添加飼料の合計摂餌回数が 481 回であり、両者に有意な差異は認められなかった。11~20 日目については、タウリン 5% 添加飼料の合計摂餌回数が 542 回、タウリン無添加飼料の合計摂餌回数が 398 回であり、タウリン 5% 添加飼料の方が有意に回数が多いという結果であった

② 合計摂餌回数の点から見れば、タウリン添加飼料の方が多く、タウリンを選択的に摂取していたものと考えられる。しかし、タウリン無添加飼料の摂餌回数の方が多き日もあり、検定結果を考慮しても、確実にタウリンを選択的に摂取していたとは言いがたい。このように、両者の摂餌回数の違いに顕著な差が見られなかった理由としては、まず添加したタウリンの割合が大きすぎたのではないかという可能性が挙げられる。つまり、タウリン添加の割合が大きい飼料ならば、その飼料を少量摂取するだけで必要量が満たされるため、コンスタントにタウリン添加飼料を摂取する必要がなかったという可能性が示唆される。また、その他の可能性として飼育期間が短かったという点が考えられる。仮にタウリン添加飼料が給餌されるのがどちらの装置であるか、区別できるようになったのが 10 日目であったとすると、11 日目からは給餌される飼料の種類が変わってしまうため、11 日目から再び、飼料の違いを認識するまで時間を費やすこととなり、結果的に、タウリンを選択的に摂取できる状態ではなかったことが懸念される。

(2) 実験 2

① 1~20 日目については、タウリン 0.25% 添加

飼料の合計摂餌回数が 1306 回、タウリン無添加飼料の合計摂餌回数が 2676 回であり、タウリン無添加飼料の方が有意に回数が多いという結果であった。21~40 日目については、タウリン 0.25%添加飼料の合計摂餌回数が 1866 回、タウリン無添加飼料の合計摂餌回数が 964 回であり、タウリン 0.25%添加飼料の方が有意に回数が多いという結果であった。41~60 日目については、タウリン 0.25%添加飼料の合計摂餌回数が 724 回、タウリン無添加飼料の合計摂餌回数が 586 回であり、両者に有意な差は無いという結果であった。なお、給餌器の不具合や過剰な残餌の発生などが生じた 1、2、11、27、39 日目のデータは省いた。

②1~20 日目については、タウリン 0.25%添加飼料の合計給餌量が 118.5g、タウリン無添加飼料の合計給餌量が 166.4g であり、検定を行ったところ、両者に有意な差異はないという結果であった。21~40 日目については、タウリン 0.25%添加飼料の合計給餌量が 190.8g、タウリン無添加飼料の合計給餌量が 69.3g であり、タウリン 0.25%添加飼料の方が給餌量が有意に多いという結果であった。41~60 日目については、タウリン 0.25%添加飼料の合計給餌量が 163.0g、タウリン無添加飼料の合計給餌量が 90.3g であり、タウリン 0.25%添加飼料の方が給餌量が有意に多いという結果であった。なお、給餌器の不具合や過剰な残餌の発生などが生じた 1、2、11、27、39 日目のデータは省いた。

③タウリン無添加飼料給餌区の馴致飼育（2 週間）終了後における血中総コレステロール値は、平均 97.5mg/dl、市販の飼料を与えて 2 週間飼育したコントロール区の血中総コレステロール値は、平均 120.5mg/dl であった。飼育実験終了後における血中総コレステロール値は平均 125.4mg/dl であり、その後追加した 20 日間の飼育実験終了後の血中総コレステロール値は、150.2mg/dl であった。

④21~40 日目についてはタウリン 0.25%添加飼料の摂餌回数の方が多く、1~20 日目についてはタウリン無添加飼料の摂餌回数の方が多く、タウリンに対する選択性は見られなくなっていることが示唆される。このような結果となった要因として 2 点が考えられる。まず 1 つ目は、供試魚はタウリンに対する生理的な要求によってタウリン添加飼料を選択的に摂取していたのではなく、タウリンのもつ嗅覚的・味覚的刺激により誘引され、タ

ウリン添加飼料を選択的に摂取していたのではないかという点である。タウリンはアミノ酸の一種であり、マダイの捕食物である頭足類や甲殻類に多く含まれているため、嗅覚的・味覚的刺激による摂餌誘引効果を発揮することが考えられる。したがって、実験 1 では実験 2 に比べタウリンが多く含まれていたため、嗅覚的・味覚的刺激による摂餌誘引効果が強く働き、実験 2 以上の選択性を引き起こしたのではないかと考えられる。そして 2 つ目の要因として考えられるのは、給餌場所が選択性に影響を及ぼしているのではないかという点である。給餌場所について摂餌回数を比較してみると、給餌場所における摂餌回数の方が多く、給餌場所が摂餌行動に少なからず影響を与えていることが示唆される。このように、供試魚が一方の給餌場所に偏って摂餌する場合、魚が自ら行動せずとも、給餌場所が交換されれば、気に入った給餌場所から不足栄養素を摂取できるようになってしまうため、選択的に不足栄養素を含む飼料を摂取することがなくなり、摂餌回数の違いを指標とした探索システムは成り立たなくなってしまうと考える。しかし、給餌場所による影響が不足栄養素に対する欲求よりも勝るかどうかについては、今回の実験結果からだけでは断定できないため、無魚粉飼料と、嗅覚的・味覚的、そして生理的にも強い摂餌刺激効果をもたらすと思われる市販の養魚飼料を用いて今回と同じ条件で飼育実験を行い、常に市販の養魚飼料の方が摂餌回数が多い、という結果になる必要があると考える。

さらにここで、追加した飼育実験（41~60 日目）の結果をみると、餌箱交換後、約 10 日間は給餌場所における摂餌回数の方が多く、それ以降は、タウリン添加飼料が給餌されるほうが、摂餌回数が多くなっていた。このことから、餌箱交換後の数日間は給餌場所の影響を受けていたとしても、次第に給餌場所の影響よりもタウリンに対する選択性の方が強くはたらし、タウリン添加飼料の方を多く摂取するようになったことが考えられる。一方、飼育実験 1~20 日目ではタウリン添加飼料の方を多く摂取するようにはならなかったが、これは給餌場所の影響に加え、タウリン添加飼料を摂取しておらず、タウリン添加飼料に馴れていなかったことがその原因であると考えられる。

次に、給餌量の計測結果について考察する。計測結果をみると、摂餌回数の差が 10 回未満と少ない場合に限り、摂餌回数はタウリン無添加飼料の方がタウリン添加飼料より多いにもかかわらず、給餌量はタウリン無添加

飼料の方が少ない、またはその逆という結果となる日もあったが、双方の摂餌回数と給餌量の増減は対応していると考えられる。したがって、『給餌量の変動から得られる結果』は『摂餌回数から得られる結果』とほぼ同じ意味を持つと考えられるため、摂餌回数の違いのみを、不足栄養素の指標としても問題は無いと思われる。

最後に血中総コレステロール値測定結果について考察する。実験前のコレステロール値に比べ、実験後では血中コレステロール値が上昇したため、タウリン要求量は満たされていたと考えられる。これはタウリン添加量を減らしても、必要量を満たすようにタウリンを摂取できていたことを示しており、結果としてタウリン添加量を半分に減らしても、タウリン添加飼料に対する強い選択性を引き起こすことは無かったと考えられる。したがって供試魚にタウリンを選択的に摂取させるためには、単純にタウリン添加量を変えたり、供試魚をタウリン欠乏状態にするだけでなく、前述したように給餌場所が摂餌行動に与える影響なども考慮し、全体的な実験系の見直しをして対処する必要があると考える。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

延東 真

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：80128355

(2) 研究分担者

佐藤 秀一：

東京海洋大学・海洋科学部・教授

研究者番号：80154053

片桐 孝之

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教

研究者番号：50361811

芳賀 穰

東京海洋大学・海洋科学部・助教

研究者番号：00432063