

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月6日現在

機関番号：32644

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：平成22年度～平成23年度

課題番号：22658061

研究課題名（和文） 魚類消化管を用いた飼料の人工消化方法の確立に関する研究

研究課題名（英文） Establishment of the artificial digestion method using a gastrointestinal tract of fish

研究代表者

木原 稔 (KIHARA MINORU)

東海大学・生物理工学部・海洋生物科学科・教授

研究者番号：40405684

研究成果の概要（和文）：摘出した胃をまるごとそのまま培養する技術を人工消化方法として確立するために、培養胃内、生きた魚体胃内、および胃液をつかった試験管内での飼料の消化性を比較した。この結果、(1)魚体胃内での消化率：68%、(2)培養胃内での消化率：51%、(3)試験管内での胃液による消化率：33%であり、培養胃内での消化は生体胃内よりは低いものの、試験管内消化より高いことがわかった。このことから、培養胃内人工消化方法は試験管内人工消化よりも生体内に近い結果を得られる方法であろうと考えた。

研究成果の概要（英文）：Gastric digestion was studied in the isolated *ex vivo* stomach of rockfish. The digestibility of the *ex vivo* stomach was compared to *in vivo* and *in vitro* stomachs so that this technique could be used as a new artificial gastric digestion method. The digestibility was varied among groups (*in vivo*: 68%, *ex vivo*: 51%, *in vitro*: 33%, respectively), however, the *ex vivo* technique appears a better digestibility than the artificial digestion using an *in vitro* test. These findings suggest that the *ex vivo* stomach should be useful in evaluation of fish gastric digestion, as a new artificial method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	3,000,000	0	3,000,000
2011年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	120,000	3,520,000

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：魚類、培養胃、ペプシン、人工消化、飼料、タンパク質、増養殖

1. 研究開始当初の背景

(1) 輸入魚粉の高騰により魚粉無使用飼料など、魚粉代替タンパク質を使った飼料の研究開発がさかんになっている。

こういった魚類用飼料の研究・開発は、試

験水槽やイケス内の魚に試験飼料を長期間給餌してその成長量から飼料評価する手法がこれまでとられてきたが、時間や労力（人件費）、すなわち開発コストが高くなりがちであった。したがって試験の短期化やコスト

ダウンのためには、試験飼料を給餌して成長を確認するという飼育実験のいっぽうで、臓器や細胞、消化酵素等をつかった生体外による評価方法も必要であると考えられている。

(2) そこで試験の短期化やコストダウンのために、飼育実験のいっぽうインビトロによる評価方法もおこなわれており、飼料評価法として現在までに人工消化液や粗酵素溶液をつかった試験管内での人工消化試験が実施されている。

しかしこれらは、実際の魚類消化管内での消化の過程を模しているわけではない。

なぜなら、人工消化がガラス製容器内で実施されていることから、たとえば消化液の分泌リズムや消化管運動、飼料による物理刺激などは完全に無視されていることになるからである。

さらに従来の人工消化方法は、胃組織から物理化学的に抽出した粗酵素液をつかったり、胃酸を模した塩酸溶液をつかったりして飼料タンパク質の消化性を評価する方法である。しかしこれは、酵素自体の能力を評価したり、酸自体の能力を評価したりしているだけであって、生体を持つ胃という消化器官の消化能力を評価したことにはならない。

つまり従来の方法は実際の消化管内での消化条件とはまったく異なるのである。

(3) 以上のことから、従来の試験管内人工消化法に代わる、魚類の消化管内条件に近い人工消化方法の確立が必要なのである。

2. 研究の目的

本研究者により、魚類の胃をまるごとそのまま培養し、その胃をつかって人工消化試験ができる可能性がしめされた。

本研究による培養胃は袋状であることから「人工消化用の容器」とみなすこともできる。培養中の胃は、消化酵素の分泌能、運動能をしめすこともあきらかとなっており、この人工消化用の容器は消化液の分泌リズムや消化管運動、飼料による物理刺激などが確保されていると判断できる。

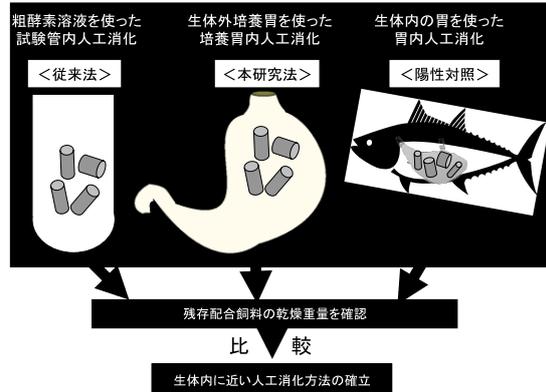
つまりこの人工消化用の容器である培養胃の中に評価したいタンパク質や飼料などをいれて人工消化すれば、実験室内で、従来法よりも生体に近い状態の実験、すなわち外挿性の高い実験で消化を評価できると考えられる。

したがって、この生体外培養胃内での飼料の消化性を、従来の試験管内での人工消化方

法による消化性や生体内での消化性と比較する。

すなわち、飼料の、

① 生体外培養胃内での消化性



イメージ図

② 生体内の胃内での消化性

③ 粗酵素法での試験管内による消化性を比較することで、より生体内に近い人工消化方法の確立を確認することが目的である(イメージ図)。

3. 研究の方法

(1) 培養胃内人工消化 クロソイを無麻酔で開腹後、胃をすみやかに摘出し、胃内にカマボコ状の疑似飼料を挿入して、噴門部、幽門部に耐酸チューブを装着保定した。この胃を、 $O_2 : CO_2$ (95 : 5) 混合ガスを連続通気、温度 $20^\circ C$ に調節した細胞培養用培地(培養外液)にひたし、送液ポンプを介して生理食塩水(培養内液)を噴門側から胃内へ流入させた。こうして胃内を通過し、幽門部から流出する培養内液を経時的に定量回収した(図1)。このような胃培養を6時間継続し、回収した培養内液、すなわち胃流出液中に分泌される消化酵素活性(ペプシン活性)の変化を確認した。また、培養後に胃から取り出した胃内の残存飼料量を乾燥重量で求めた。

また、比較のために胃内に疑似飼料を挿入しない試験群(ブランク群)、胃内に物理刺激のみを有するガラスビーズを挿入した試験群(対照群)も設け、カマボコを挿入した疑似飼料群の培養胃内消化とペプシン活性との関係を確認した。

胃内に挿入した疑似飼料は、冷凍魚肉スリ身(80%)、水(17%)、塩(3%)をホモジナイズして作製した。以下の(2)、(3)の実験においても同様に作成した。

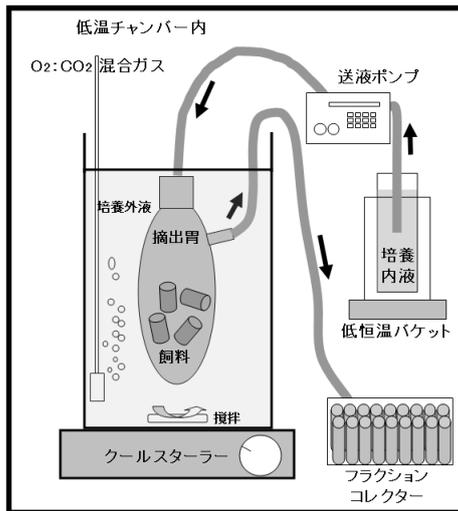


図1 胃生体外培養実験

(2) 生体内の胃内人工消化 72時間
絶食したクロソイにカマボコ状疑似飼料を給餌した。クロソイは水温 20℃の水槽内で維持した。給餌から 6 時間経過後、麻酔下で胃を摘出し、胃内の残存飼料量を乾燥重量で求めた。

(3) 試験管内胃液人工消化 クロソイ胃を(1)の条件で培養し(ただしこの際疑似飼料は挿入していない)、胃液を回収した。この胃液中のペプシン活性を測定し、(1)の実験で得られた胃液ペプシン活性の平均値と等しくなるよう希釈して人工消化に用いた。ガラス製試験管内にカマボコ状疑似飼料を入れ、ここに希釈胃液を 6mL 入れて温度 20℃に調節したウォーターバス内で 6 時間消化した。試験管内の残存飼料量を乾燥重量で求めた。

4. 研究成果

(1) 培養胃内人工消化の結果

対照群(ビーズ挿入)に比べ、疑似飼料挿入時のペプシン様酵素活性が培養開始 90 分~270 分で有意に高かった。対照群のペプシン様酵素活性は、ブランク群とかわらなかった。

培養胃内での疑似飼料消化は、乾物あたりの減少量で見ると、51.1±9.3%であった。

以上のことから、疑似飼料の培養胃内消化には物理刺激(胃壁への接触刺激)は関与しておらず、疑似飼料から溶出する成分を認識して酵素分泌が生じ、消化が起こっているのではないかと考えられた。

したがって飼料中の水溶性成分は、胃内消化において重要な因子であろうと推察された。

(2) 生体内の胃内人工消化の結果

生体内での疑似飼料消化は、乾物あたり

の減少量で見ると、67.6±8.6%であった。

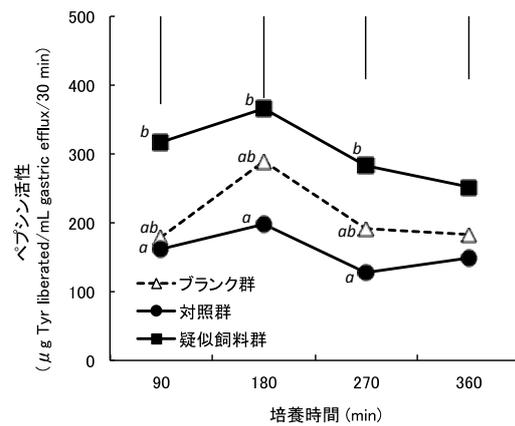


図2 培養胃内人工消化中の胃内液ペプシン活性変化! 同一時間のなかで、異符号間に有意差有り(p<0.05, !Mann-Whitney!U 検定)! 縦棒線はプールした標準偏差

(3) 試験管内胃液人工消化の結果

試験管内での疑似飼料消化は、乾物あたりの減少量で見ると、33.0±1.0%であった。

以上の結果をまとめると、図3のとおりであるが、群間に有意な差はみとめられなかった。このことから消化率の優劣を判断することは難しいものの、培養胃内での消化は生体内より低い、試験管内消化よりも生体内での消化に近いものであると評価した。

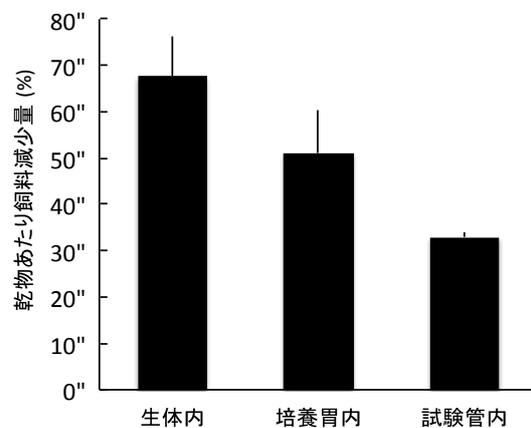


図3 胃内での飼料の乾物あたり減少量比較 (平均値±標準偏差)"

これまでの実験で、培養胃が運動をしめすことや、管腔内の刺激の質を識別することがわかっている。

胃が摘出されることにより神経系や血管系からの制御がなくなることが原因のひとつであろうが、生体内よりも培養胃内での消化は劣る。しかしながら、試験管内では再現

できない運動や刺激応答が確保されていることが培養胃内消化の優位点であろうと考えられた。

このことから、摘出した魚類培養胃内で人工消化が可能であり、その方法は試験管内人工消化よりも生体内に近い結果を得られる方法であろうと考えられた。

このような人工消化方法はこれまでに報告が無く、まったく新しい発想の研究手法である。

培養胃を用いた飼料評価法は、随時代替タンパク質等の消化試験や消化刺激物質のスクリーニングが可能となることから、魚類の消化機能に裏付けされた効率的・スピーディな飼料開発が実施できるであろう。

今後は本研究技術を利用した実用配合飼料の試験研究が期待される。

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)

[雑誌論文] (計2件)

① Minoru Kihara, Makoto Igarashi, Tomohiro Suzuki, Fumiaki Itou, Satoshi Kozeni, Mihoko Toyomane, Junko Nakano, Ikumi Yamai (2011) Stimulative effect of skipjack tuna soluble extract on pepsin-like protease in the stomach of rockfish (*Sebastes schlegelii*) using an in vitro perfusion method. Comparative Biochemistry and Physiology 158A, 444-449. 査読有り

② Minoru Kihara, Yutaro Abe, Hiroshi Kaga (in press) Acidity and pepsin-like protease activity of the gastric juice of farmed Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis*. Aquaculture Science 査読有り

[学会発表] (計5件)

① 佐藤結衣・鈴木智博・木原 稔 (2011) 「胃刺激物質添加飼料のクロソイ培養胃内での消化亢進」

平成23年度日本水産学会春季大会

② 佐藤結衣・鈴木智博・木原 稔 (2011) 「クロソイ生体胃内および培養胃内での消化」

平成23年度日本水産学会秋季大会

③ 佐藤結衣・木原 稔 (2010) 「カツオ煮汁濃縮液はクロソイ胃のペプシン様酵素分泌を刺激する」

平成22年度日本農芸化学会北海道支部大会

③ 佐藤結衣・木原 稔 (2010) 「培養胃内消化の誘起には飼料溶出成分が関与する」

平成22年度日本水産学会秋季大会

④ 佐藤結衣・木原 稔 (2010) 「飼料中への胃

刺激物質：カツオエキスの添加によるクロソイ稚魚の成長促進作用」

平成22年度日本水産学会北海道支部大会

⑤ 木原 稔 (2010) 「魚類飼料開発用臓器ツールとしての魚類摘出培養胃の有用性」

2010年度 Hindgut Club Japan Symposium

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

科学新聞 (2011. 3. 18 掲載)

北海道新聞 朝刊 (2012. 1. 27 掲載)

ホームページ

<http://www.u-tokai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木原 稔 (KIHARA MINORU)

東海大学生物理工学部海洋生物科学科・教授

研究者番号：40405684

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし