

大豆油粕主体飼料が養殖対象魚類数種の生理障害に及ぼす影響と
その改善に関する研究

A study on influences of soybean meal-based diets on
physiological disorders in several representative freshwater and
marine cultured fish species and improvement of the disorders

2014

pp. 1-89

東海大学大学院生物科学研究科生物科学専攻
Graduate School of Bioscience, Tokai University

天野 俊二
Shunji Amano

指導 鈴木 伸洋 教授

論文の内容の要旨

論文題目 「大豆油粕主体飼料が養殖対象魚類数種の生理障害に及ぼす影響とその改善に関する研究」

学位申請者 天野 俊二

キーワード：大豆油粕 肝臓 膵臓 マダイ タウリン タウロコール酸

養殖魚飼料の主原料である魚粉は価格の高騰が問題視されており、その代替原料として安価で供給量が多いことから大豆油粕 (SBM) が注目されている。しかしながら、SBM 主体飼料を魚類に給与した場合には成長不良ならびに生理障害が生じることが明らかとなり、養殖飼料の主原料として利用するためには、その原因の解明ならびに改善策の開発が必要とされている。そこで、本研究では魚粉代替飼料の開発の一助とすることを目的とし、SBM を主体とした植物性魚粉代替飼料を給与した養殖対象魚類数種の生理障害ならびにその改善策を組織学的に検討した。

1. 大豆油粕主体飼料を給与した養殖魚数種で生じる生理障害の要因

養殖魚の淡水および海産魚の代表的な数種において SBM 主体飼料を給与した結果、淡水魚のニジマスおよびアマゴでは肝細胞の萎縮、腸管後部での脂質の消化吸収不良を示唆する大型空胞変性が認められた。海産魚のブリおよびマダイでは肝細胞の萎縮が認められ、加えてブリでは腸管後部の粘膜上皮細胞でタンパク質様物質の消化吸収不良を示唆する大型エオシン濃染顆粒が、マダイでは膵臓外分泌部の腺細胞に萎縮変性が認められた。これらのことから、SBM 主体飼料を摂餌した魚類では、肝細胞の萎縮をはじめとした栄養代謝に関わる主要臓器の組織変性に起因する胆汁および各種消化酵素の生成不良、ならびに腸管における栄養物質の消化吸収能力の低下等による栄養障害が生じることが考えられた。

2. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイにおける生理障害に関与する要因

淡水魚のニジマスでは SBM 主体飼料給与時に生じる生理障害には大豆に含まれるサポニンやイソフラボンをはじめとしたアルコール可溶性の抗栄養因子 (ANF) が関与していることが明らかにされている。一方、海産魚では 1. 大豆油粕主体飼料を給与した養殖魚数種で生じる生理障害の要因より生理障害は主要臓器の組織変性により生じるものと考えたが、それらを引き起こす原因物質の解明には至っていない。そこで、マダイを海産魚のモデルケースとして SBM 主体飼料給与時に生じる生理障害の要因を検討した。第一の試験として、ANF の含有量を低くした飼料原料である分離大豆タンパク質 (SPI : SBM を希酸処理して精製)、濃縮大豆タンパク質 (SPC : SBM をアルコール洗浄して精製)、ならびに SPI をさらにアルコールによって洗浄処理を施した飼料 (ASPI) をそれぞれマダイに給与した。その結果、アルコール洗浄を施した ASPI および SPC 主体飼料では、肝臓の組織変性に改善効果があることを確認した。第二の試験では、アルコール洗浄した SBM (ASBM) ならびにアルコール洗浄時に抽出された物質 (AE) を ASBM に再度添加した飼料をそれぞれマダイに給与した。その結果、ASBM 主体飼料では、肝臓の組織変性に一定の改善効果が認められ、AE を再度添加することで肝臓において組織変性の再現性が認められた。これらのことから、海産魚においても SBM に含まれるアルコール可溶性の ANF が生理障害の要因に大きく関与していることが考えられた。

3. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイの生理障害の改善

淡水魚のニジマスでは SBM 主体飼料給与時に生じる生理障害の改善策として、SBM をアルコール洗浄処理して ANF を除去する他に、飼料へタウロコール酸 (C-tau) を添加することで生理障害が改善されることが報告されている。一方、海産魚のマダイやブリではタウリンの生合成能力が乏しいことから、魚粉代替飼料給与時に生じる

成長阻害を改善するには不足するタウリンを補填することが有効であるとされており、生理障害に対しても何らかの改善効果が期待される。そこで、マダイを海産魚のモデルケースとして **SBM** 主体飼料給与時に生じる生理障害の改善策を検討した。第一に、タウリンを添加した **SBM** および **ASBM** 主体飼料をそれぞれマダイに給与した。その結果、**SBM** 主体飼料では肝臓に一定の改善効果が認められ、**ASBM** 主体飼料では魚粉主体飼料給与時と同等の正常な組織像を示すまでに改善されることを確認した。これらのことから **SBM** 主体飼料で生じる生理障害にはタウリン欠乏ならびにアルコール可溶性の大豆 **ANF** が大きく関与している可能性が考えられた。第二に、**C-tau** ならびに複数種の飼料添加剤の併用添加による改善策を検討した。その結果、**C-tau** を添加した **SBM** 主体飼料では肝臓の組織変性に一定の改善効果が認められ、タウリンによる栄養補填をした上で **C-tau** を添加することで、マダイの肝臓における組織変性ならびに成長不良が改善されることが明らかとなった。

以上のことから、**SBM** には淡水魚と海産魚において、栄養代謝に関わる主要臓器の組織変性に伴う栄養障害を引き起こす要因が共通して存在することが明らかになった。そして生理障害の改善策として、従来の成長を指標とした飼育成績の評価に加えて、本研究で明らかにした主要臓器の組織変性を栄養障害の指標として捉え、それら障害の生理的メカニズムに基づいた飼料組成の調整・改善を進めることで、**SBM** 等の植物性原料を魚粉の代替原料として使用することが可能であり、これまでその利用は難しいとされてきた海産魚においてもタウリンなどの生体内で合成できない栄養素等を補填した上で、**ANF** の影響を防除することで魚粉の代替原料として **SBM** を活用できると結論した。

目次

第1章 序論	1
第2章 大豆油粕主体無魚粉飼料を給与した海産養殖魚マダイに及ぼす生理障害の組織学的指標	
2-1 緒言	3
2-2 材料と方法	3
2-3 結果	4
2-4 考察	5
Table	7
Figure	9
第3章 大豆油粕主体飼料における肝臓の生理障害に関与する因子の検討	
3-1 緒言	13
3-2 材料と方法	13
3-3 結果	15
3-4 考察	18
Table	20
Figure	26
第4章 大豆油粕主体飼料への飼料添加物が生理障害に与える影響の検討	
4-1 緒言	34
4-2 材料と方法	35
4-3 結果	36
4-4 考察	39
Table	42
Figure	49
第5章 大豆油粕主体飼料が養殖対象魚類数種の生理障害に及ぼす影響の検討	
5-1 緒言	57
5-2 材料と方法	57
5-3 結果	59
5-4 考察	61
Table	63

Figure	72
第6章 総合考察	78
1. 大豆油粕主体飼料を給与した養殖魚数種で生じる生理障害の要因	78
2. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイにおける生理障害に関与する要因	78
3. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイの生理障害の改善	79
要約	81
Summary	83
謝辞	86
引用文献	87

第1章 序論

現在、養魚飼料は主原料として動物性タンパク質である魚粉が利用されている。日本では、国内において原料魚となるマイワシ等の漁獲量が激減したために、現在は魚粉の供給を海外からの輸入に依存している。しかし、近年の世界的な養殖産業の普及等による魚粉の需要の高まりから、輸入魚粉の価格が高騰し続けている(渡邊 2009)。このため、魚粉をほとんど、または全く使用しない低・無魚粉飼料の開発が今後の養殖業において重要になることが予想されている。

日本では、これまで魚粉に代わる代替原料の研究が行われており、その中でも産業廃棄物である大豆油粕(SBM)は安価でかつ供給量も多く、植物性原料の中でもタンパク質含量が豊富であることなどから、代替原料として有望視されている(渡邊 2009)。しかしながら、SBMを高配合した飼料を給与した養殖魚では、飼育成績が魚粉飼料に比べて低下することから、養殖魚における飼料中のSBMの許容配合率は10~30%とされている(山本 2006)。このため、SBM主体飼料の実用化には成長不良の要因の特定ならびに、それらの要因に対する改善方法を明らかにする必要がある。

淡水養殖魚であるニジマス *Oncorhynchus mykiss* では、SBMを主体とした無魚粉(NFM)飼料を給与すると脂質の消化吸収率や胆汁の代謝不良を示唆する腸管や肝臓での組織変性が生じることが報告されており、これらの生理障害が飼育成績の低下を引き起こす要因であることが示唆されている(Ostaszewska et al. 2005, 岩下ら 2007)。また Yamamoto et al.(2008)では、サケ科魚類においてSBMからアルコール抽出される物質が脂質の消化吸収率や胆嚢内の総胆汁塩量を減少させることを報告している。加えて、岩下ら(2010)では、NFM飼料を給与したニジマスで生じる肝臓及び腸管の生理障害は、SBMに含まれる抗栄養物質(ANF)のうちアルコールで抽出される物質、その中でも大豆サポニンならびに大豆イソフラボンが強く影響を及ぼしていることまで明らかにされている。これらのことから、今後はアマゴをはじめとした同じ淡水養殖魚におけるSBMの利用性に関しても進展があるものと期待されている。

国内における養殖業生産量は、海面養殖業がその大半を占めており、農林水産省より公表された平成25年度の養殖業生産統計では、内水面養殖におけるマス類の収穫量が7,697tなのに対し、海産養殖のマダイ *Pagrus major* は5万6600t、ブリ類では24万tを超えている。このため、飼料開発の重要性は内水面養殖業に比べて海面養殖業でより高く、海産養殖魚においてもSBM主体飼料の利用性を検討していく必要がある。

海産養殖魚におけるSBMの知見では、NFM飼料や高配合のSBM主体飼料を給与すると飼育成績が魚粉飼料に比べて低下することが知られており、マダイおよびブリ *Seriola quinradiata* ではNFM飼料や高配合のSBM主体飼料を給与すると飼育成績が低下し、長期間給与すると肝臓に緑肝症を生じることが報告されている(高木 2007, 竹内 2010)。一方で、これら海産養殖魚におけるSBM主体飼料給与時の成長不良およ

び生理障害のメカニズムはまだ解明されておらず、ニジマスで報告されているような生理障害の解明につながる組織学的な検討もなされていないのが現状である。

一方、マダイやブリなどの海産養殖魚ではタウリンの生合成能力が乏しいことが知られており、齋藤(2009)では、濃縮大豆タンパク質(SPC)を主体とした飼料を給与したブリでみられる成長不良はタウリン添加で大きく改善されることが報告されている。加えて、マダイでも SBM や SPC 主体飼料給与時にみられる成長不良や緑肝症はタウリンを添加することで改善されることが報告されている(Goto et al. 2001, Takagi et al.2006)。これらのことから、海産養殖魚においては SBM 主体飼料給与時に生じる成長不良ならびに生理障害の改善策としてタウリン添加が有効である可能性が示唆されるが、飼料に対するタウリンの添加効果を明らかにするためには組織学的・生化学的なアプローチを用いて更なる検討が必要であるものと考ええる。

そこで、本研究では SBM 主体飼料を給与した重要養殖対象魚で生じる生理障害のメカニズムの解明ならびに海産養殖魚で生じる生理障害の改善策を開発する一助とすることを目的とした。

第2章 大豆油粕主体無魚粉飼料を給与した 海産養殖魚マダイに及ぼす生理障害の組織学的指標

2-1 緒言

海産養殖魚のマダイでは、魚粉を大豆油粕(SBM)で代替した飼料や魚粉を完全にSBMで代替した無魚粉(NFM)飼料を給与すると飼育成績が低下し、さらに長期間給与すると肝臓が緑色を呈する緑肝症を生じることが報告されている(高木 2007, 竹内 2010)。魚類の肝臓は、吸収された栄養物質の蓄積、解毒、造血および抗体産生などの重要な機能を担っており、肝臓で生成される胆汁塩やタウロコール酸(C-tau)をはじめとした胆汁酸は腸管内に分泌され、脂質の消化吸收を促進することが知られている(日比谷 1982, 小栗 1991)。Yamamoto et al. (2007) および岩下ら(2007)では、NFM 飼料を給与したニジマスで肝臓の組織変性が生じ、それに伴い胆嚢中の胆汁塩や C-tau の占める割合が減少する可能性を示唆している。一方、Takagi et al. (2002)では、SBM をアルコール精製してタンパク質含量を高めた濃縮大豆タンパク質(SPC)を主体とした飼料をマダイに長期間給与すると胆嚢中の総胆汁塩量が減少することを報告しており、同じ海産養殖魚のブリでは SBM 主体飼料給与時にみられる飼育成績の低下は、脂質の消化吸收率の低下が要因である可能性を報告されている(示野ら 1992)。これらのことは、肝臓における生理障害が SBM 主体飼料給与時の成長不良に関与している可能性を示唆しているが、SBM 主体飼料を摂餌した海産養殖魚における肝臓の組織学的な観察はほとんどなされていない。また、SBM 主体飼料を給与したニジマスでは腸管の粘膜上皮細胞で大型空胞変性が生じることが確認されており、それらは微絨毛の消失や細胞小器官の発達不良に起因する消化吸收能力の低下が要因である事が推察されている(鈴木・山本 2004, 岩下 2010)。しかしながら、海産養殖魚における SBM 主体飼料給与時の栄養代謝不良の解明につながる肝臓および腸管後部における詳細な組織学的な検討はなされていないのが現状である。

そこで、本章では SBM を主体とした NFM 飼料を給与したマダイの肝臓および腸管後部における組織変性について検討した。

2-2 材料と方法

試験飼料 各試験区の飼料組成を Table2-1 に示した。魚粉を主体とした対照飼料(FM)と主タンパク質源として飼料用加熱処理済み大豆油粕(日清丸紅飼料社製)を使用し、魚粉を完全に代替した無魚粉飼料(NFM)を作製した。NFM 区は乾物換算で粗タンパク質含有量が約 40%、粗脂肪含有量が約 13%となるように調整し、FM 区に比べ不足する

必須アミノ酸およびビタミン・ミネラルを補足した。

飼料の成型は飼料原料を混合後、25%加水してモイスト状にした後、ミートチョッパー（花木製作所 12 号M-1）で直径 1.6mm のペレットとした。ペレットは温風乾燥機を使用し 60℃で 4 時間乾燥し、使用するまで - 18℃で冷凍保存した。

供試魚および飼育条件 近畿大学より購入したマダイ稚魚を三重県の増養殖研究所に搬送後、容量 500L の塩化ビニル製水槽に收容し、予備飼育開始までの約 2 ヶ月間市販の配合飼料（おとひめ;日清丸紅飼料）を 1 日 3 回飽食するまで給与して飼育したものを供試魚とした。試験には 100L の塩化ビニル製水槽を用い、1 水槽につき 24 尾(平均魚体重 9.0g)收容し、水槽内にはくみ上げ海水を 1 分間当たり約 3L 注水した。試験期間中の各水槽の水温は平均 20.0℃であった。FM 区は 2 水槽、NFM 区は 1 水槽設置し、水槽ごとに試験飼料をそれぞれ 10 日間与えて予備飼育をした後、続けて 6 週間与えて本試験を行った。試験飼料は 1 日 2 回、1 週間に 6 日間、8:00 と 16:00 に飽食するまで手撒きで与えた。

サンプリング方法および組織標本の作製方法 試験終了後、各試験区の供試魚は解剖前に 48 時間絶食させた。その後、各水槽から 3 個体をランダムに採取し、2-フェノキシエタノール（Sigma-Aldrich 社製）で麻酔、開腹して肝臓と腸管の後部をそれぞれ摘出した。摘出した臓器は速やかに 10%中性緩衝ホルマリン(pH7.4, 和光純薬社製)で固定した。固定した臓器は常法に従いエタノール系列で脱水後、パラフィンに包埋し、5 μ m の切片を作製した。そして、その切片をマイヤーのヘマトキシレン・エオシン染色を適宜施して光学顕微鏡で観察した。

肝細胞の核径と細胞質径の計測と解析 肝臓組織では顕微鏡デジタルシステム Moticam2000(島津理化器械社製)を用いて FM 区は個体毎に 150 細胞の核長径と 100 細胞の細胞質長径を、NFM 区は個体毎に 300 細胞の核長径と 200 細胞の細胞質長径をそれぞれ顕微鏡デジタルシステム Moticam2000(島津理化器械社製)を用いて計測した。核長径および細胞質径の計測にあたっては試験飼料区によっていずれも萎縮などにより形が変形するため核長径は径の一番長い部分を、細胞質径は核を通り径の一番長い部分をそれぞれ径の長さとした。計測結果は試験区間の平均値の差を比較するため有意水準 5%で *t* 検定を行った。

2-3 結果

腸管後部組織像 FM 区では粘膜上皮細胞の遊離表面には微絨毛が認められ、微絨毛下には細胞膜の飲作用で生じた取り込み消化空胞が存在した。取り込み消化空胞下には楕円状の粘膜上皮細胞の核が存在し、ヘマトキシレンに染色された(Fig.2-1a)。粘膜上皮には大型で杯状または楕円状の粘液細胞が存在した。なお、一部の粘液細胞内には顆粒状の物質が認められた。粘膜固有層の基底層は、結合繊維からなる緻密層で構成され、

緻密層の結合組織にはエオシン顆粒がみられた(Fig.2-1c)。

NFM 区では、FM 区と同等の組織像を示し、ニジマスで報告されているような粘膜上皮の空胞変性ならびに粘膜固有層の基底部での緻密層の結合組織の増生をはじめとした組織変性は認められなかった(Figs.2-1b, 2-1d)。

肝臓組織像 FM 区の肝細胞では細胞質はエオシンに明るく好染し、細胞質内は空胞様構造で占められていた(Fig.2-2a)。核の形状は球形ないしは楕円形で、ヘマトキシレンに好染して、仁が明瞭に確認できた (Fig.2-2a')。肝細胞同士は密に接した状態で索状構造を形成し、索の間隙には赤血球を有する毛細血管が存在していた。

NFM 区では肝細胞の細胞質はエオシンに暗く染色され、肝臓組織全体では細胞質の小型化に伴い肝細胞の索状構造に乱れが生じていた(Fig.2-3b)。肝細胞の核は形状が不均一で、ヘマトキシレンに濃染し、核崩壊を起こしている肝細胞が多数認められた(Fig.2-3b')。肝細胞の核長径および細胞質径は FM 区に比べて有意に小さかった(Table 2-2)。

膵臓外分泌部組織 FM 区の腺細胞では細胞質はヘマトキシレンに鮮明に好染し、膵臓外分泌部組織全体で細胞質の丈は高く、腺細胞同士は密に接した状態で均一に配列していた(Fig.2-3a)。腺細胞の核は細胞質の基底側部に存在し、形状は球形または楕円形で、ヘマトキシレンに好染し、仁が明瞭に確認できた(Figs.2-4a, 2-4a')。また、細胞質内にはエオシンに好染するチモーゲン顆粒が認められ、血管内には赤血球が充満していた(Figs.2-3a, 2-4a)。

NFM 区では腺細胞は核・細胞質ともにヘマトキシレンに暗く染色され、細胞質は FM 区に比べて相対的に小さく、腺細胞間には細胞質の小型化に伴い空隙が生じて腺細胞の配列が著しく乱れていた(Figs.2-3b)。一部の腺細胞では核濃縮が認められ、細胞質も濃染していた(Figs.2-4b, 2-4b')。また、血管内の血液は FM 区に比べて相対的に少なく、一部の膵臓外分泌部では血管内の血液の消失や血管の閉塞も認められた(Fig.2-3b, 2-3c)。

2-4 考 察

Ostaszewska et al. (2005)および岩下ら(2007)では、NFM 飼料や SBM 主体飼料を給与したニジマスにおいて肝臓に組織変性が生じることを報告している。本章では、NFM 飼料を給与したマダイの肝臓組織で肝細胞に強い萎縮が生じていることを確認し、肝細胞の核が濃染し核崩壊を起こしている肝細胞が多数確認された。哺乳類では肝硬変や胆管増生などの肝臓障害が生じると胆嚢中の主な胆汁塩であるコール酸(C-tau)の割合と肝細胞中の C-tau 生成に関与する 12α -水酸化酵素活性が低下することが知られている(樋口 1976)。魚類でも胆汁塩は脂質の消化吸収を促進することが知られており(小栗 1991)、Takagi et al. (2002)では、SPC 主体飼料を長期間給与したマダイでは胆嚢中の

総胆汁塩量が減少することを報告しており、示野ら(1992)では、SBM 主体飼料給与時のブリでみられる飼育成績の低下は、脂質の消化吸収率の低下が要因である可能性を報告している。また、ニジマスではSBM 主体飼料給与時に生じる肝臓の組織変性に伴い、 12α -水酸化酵素活性が低下し、胆嚢中の胆汁塩や C-tau の占める割合が減少する可能性が示唆されている(Yamamoto et al. 2007, 岩下ら 2007)。これらのことから、NFM 飼料を給与したマダイでは肝臓の組織変性に伴う胆汁塩および胆汁酸の生成不良により、腸管での脂質の消化吸収不良が生じる可能性が考えられる。本章において NFM 区の膵臓外分泌部では腺細胞の細胞質に強い萎縮が認められ、一部の腺細胞では核濃縮が認められた。膵臓外分泌部ではトリプシノーゲンやアミラーゼ、リパーゼなどの消化酵素を含む膵液が産生され、哺乳類のラットでは膵液に含まれるリパーゼの働きによって脂肪の一部が乳化力の強いモノグリセライドに分解され、同じく乳化力の強い胆汁とともに残りの脂肪を $0.5\ \mu\text{m}$ 以下の細かい粒子に乳化できるため、脂肪の多くはそのまま腸管の粘膜から吸収されることが分かっており、魚類でも同様の消化・吸収が行われているものと考えられている(池田 1977, 小栗 1991)。また、魚類の膵臓外分泌部は、飢餓状態に陥ると腺細胞の細胞質が萎縮し、腺細胞内の好酸性物質をほとんど含まず、細胞質の好塩基性も失われることが知られており(日比谷 1982)、大豆油粕の配合率が高い飼料を給与したマダイでは、見掛けの糖質の消化率が低下することが報告されている(高木 2002)。これらのことから、NFM 飼料を給与したマダイでは肝臓および膵臓外分泌部の組織変性によって胆汁および膵液の生成量が低下することで、腸管における脂肪や糖質をはじめとした栄養物質の消化吸収能力が低下している可能性が考えられる。

Table 2-1 Composition of the experimental diets for red sea bream

	FM	NFM
<i>Ingredient (% wet weight basis)</i>		
White fish meal	45.50	-
Defatted soybean meal	8.00	71.50
Wheat flour	15.00	5.00
α -Starch	9.55	6.25
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	2.00	2.00
Pollock visceral oil	10.00	10.00
Vitamin mix ¹	1.00	1.00
Mineral mix ²	1.25	1.25
Choline chloride	0.90	0.90
Vitamin E (purity: 50%)	0.10	0.10
Ascorbic acid calcium	0.20	0.20
Cellulose	6.00	0.30
Feeding stimulant ³	0.50	0.50
EAA mix ⁴	-	1.00

¹Vitamin mixture ingredient (mg/100g): Vitamin B1 1.8 g, Vitamin B2 3.0 g, Vitamin B6 1.2g, Vitamin B12 3.0 mg, Niacin 12.0g, Ca-pantotenate 3.0 mg, Inositol 60.0g, Biotine 180.0mg, Folic acid 450 mg, p-Aminobenzoic acid 1.5g, Vitamin K3 1.5g, Vitamin A 1200,000 IU, Vitamin D3 1200,000 IU.

²Mineral mixture ingredients (g/100g): NaCl 4.0 g, MgSO₄·7H₂O 60.0 g, Fe-citrate 10.0 g, Ca-lactate 14.0 g, Trace element mixture 4.0 g, Cellulose 8.0 g. Trace element mixture ingredients (mg/100mg): ZnSO₄·7H₂O 35.3mg, MnSO₄·4H₂O 16.2mg, CuSO₄·5H₂O 3.1mg, KIO₃ 0.3mg, CoCl₂·6H₂O 0.1mg, Cellulose 45.0 mg.

³Proline, 354; Alanine, 232; Inosine 5'-monophosphate, 414 (mg/g).

⁴EAA mixture ingredients (g/100g): Lysine HCL 31.5g, Methionine 42g, Phenylalanine 6.5 g, Valine 5.8g, Cellulose 14.2g.

Table 2-2 Nuclear and cytoplasmic size of hepatocytes of red sea bream fed the experimental diets

	FM	NFM	<i>P</i>
Nucleus (μm) ^{1,5}	4.67 \pm 0.2	3.82 \pm 0.1 ^{a3}	<0.001
Cytoplasm (μm) ^{2,5}	15.53 \pm 0.8	12.43 \pm 0.6 ^{a4}	<0.001

¹Values are mean \pm SD (n=6, mean of 150 cells).

²Values are mean \pm SD (n=6, mean of 100 cells).

³ Values are mean \pm SD (n=3, mean of 300 cells).

⁴ Values are mean \pm SD (n=3, mean of 200 cells).

⁵Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$)

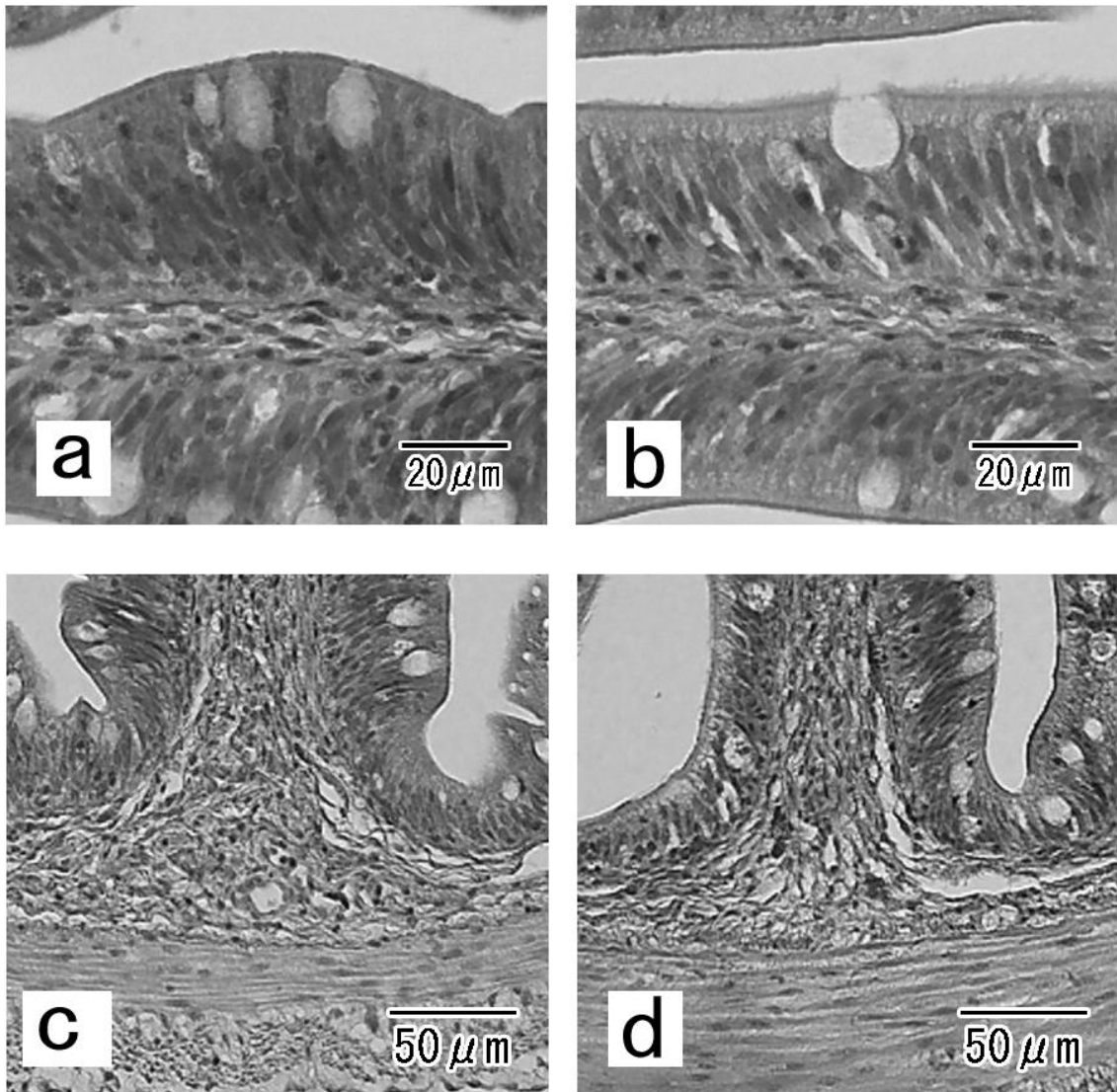


Fig.2-1 Histological sections of mucosal folds and the lamina propria of submucosa in the distal intestine in red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a,c: fish fed diet FM. b,d: fish fed diet NFM.

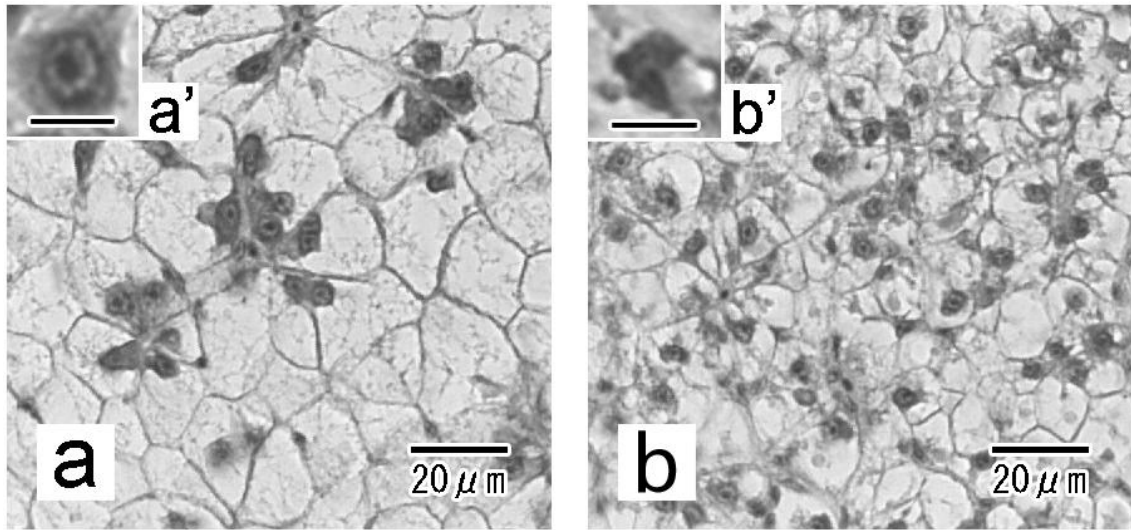


Fig.2-2 Histological sections of hepatocytes of the liver of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM, and magnified figure of nucleus (a'). b: fish fed diet NFM, and magnified figure of nucleus (b'). Bars of magnified figure = $5 \mu\text{m}$.

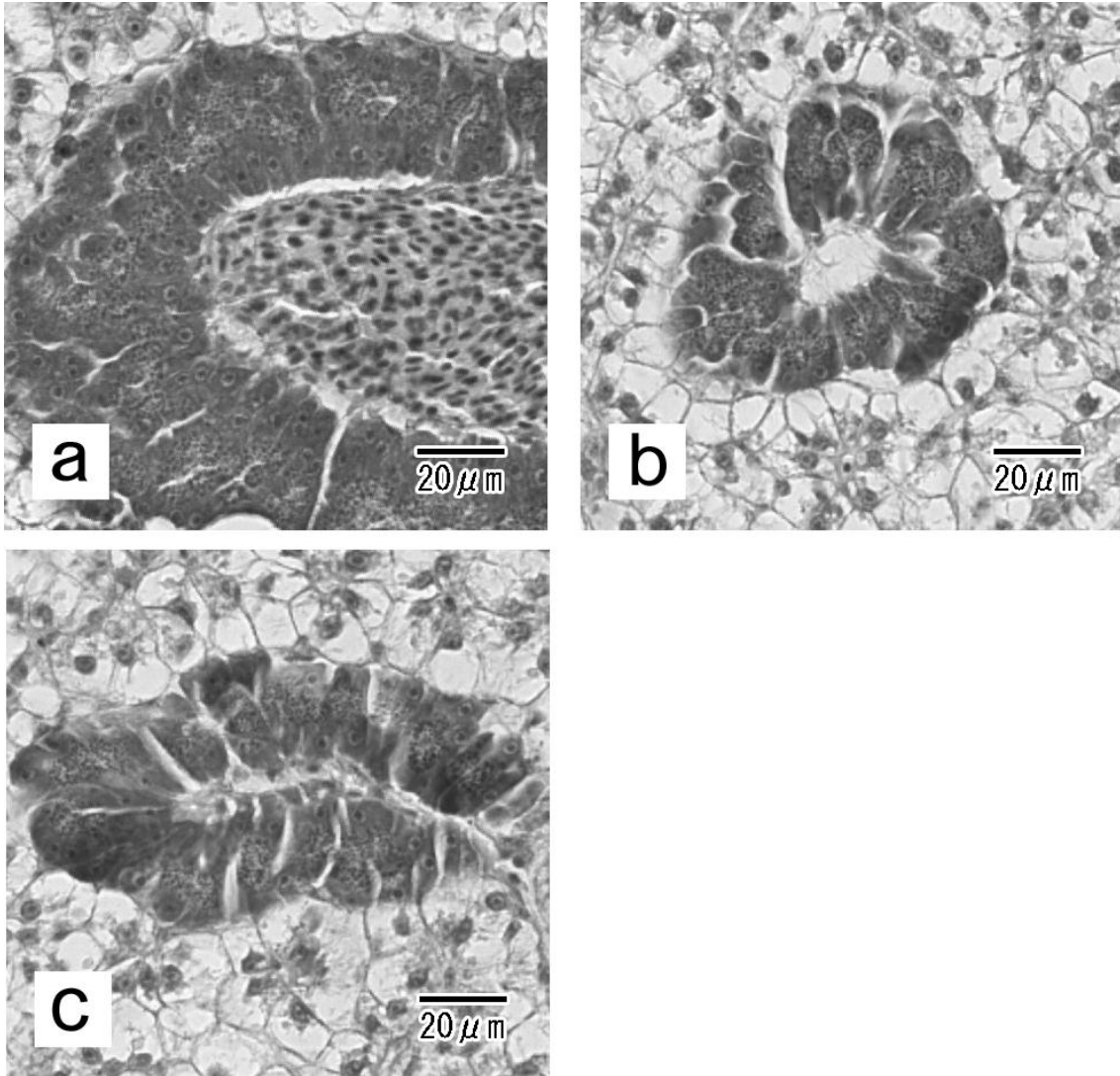


Fig.2-3 Histological sections of exocrine portion of the pancreas of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b,c: fish fed diet NFM.

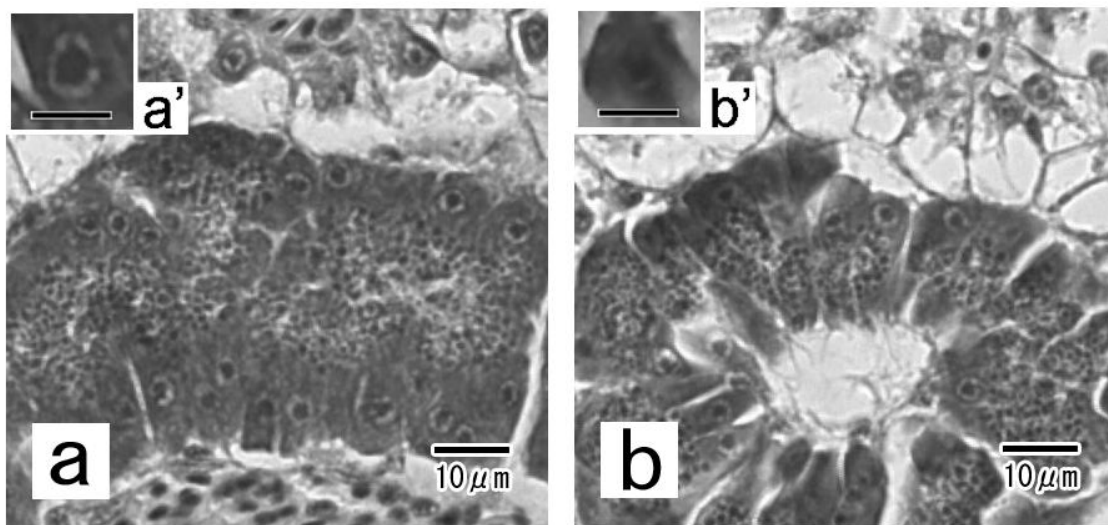


Fig.2-4 Histological sections of adenocyte of exocrine portion of the pancreas of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM, and magnified figure of nucleus (a'). b: fish fed diet NFM, and magnified figure of nucleus (b'). Bars of magnified figure =5 μ m.

第3章 大豆油粕主体飼料における肝臓の生理障害に関する因子の検討

3-1 緒言

第2章より、無魚粉(NFM)飼料を給与したマダイでは、肝臓および膵臓外分泌部で胆汁および膵液の生成不良が生じ、それらが腸管での栄養物質の消化不良を引き起こしている事が推察された。大豆油粕(SBM)には、哺乳類および魚類の体内の栄養代謝に影響を与えるサポニン、イソフラボン、レクチンなどの抗栄養因子(ANF)が含まれており、魚類ではSBMをアルコールや希酸で洗浄精製し、ANFの含有量を低くしたものが利用されている(Francis et al. 2002, 高木 2002)。実際、ニジマスではSBM主体飼料給与時には肝臓および腸管後部における組織変性を起因とした生理障害が生じるが、アルコール洗浄して精製される濃縮大豆タンパク質(SPC)を主体とした飼料を給与した際にはこれらの生理障害が生じないことが報告されている(岩下 2010, 岩下ら 2010)。また、SBMを希酸洗浄して精製される分離大豆タンパク質(SPI)を主体とした飼料ではSBM主体飼料と同様の生理障害を生じるが、SPIをアルコール洗浄した残渣物(ASPI)を主体とした飼料ではこれらの生理障害が生じないことも報告している。一方、高木ら(1999)では、魚粉代替率50%のSPC主体飼料をマダイに給与してもSBM主体飼料給与時のような飼育成績の低下は生じないことを報告しており、同じ海産養殖魚のブリではSBM主体飼料給与時にみられる飼育成績の低下は、SBM中のアルコール可溶物質が膵臓外分泌部の消化酵素や胆汁酸の分泌を抑制するために生じる可能性が報告されている(Nguyen et al. 2011)。したがって、SBM主体飼料を給与したマダイで生じる肝臓組織の異常には、SBM内に存在するANFが関与している可能性が考えられる。しかしながら、海産養殖魚においてはSBM由来の原料を主体とした飼料における知見は乏しく、詳細な組織学的な観察もほとんどなされていないのが現状である。そこで本章では、SBM主体飼料を給与したマダイに生じる肝臓組織の組織変性のメカニズムを解明することを目的とし、SBMに含まれるアルコール可溶性成分がマダイの肝臓および膵臓外分泌部に及ぼす影響を検討した。

3-2 材料と方法

試験飼料

試験 3-2-1 大豆油粕に含まれる抗栄養因子除去による組織学的検討 各試験区の飼料組成を Table 3-2-1 に示した。対照区として魚粉主体飼料(FM 区)と飼料用加熱処理済み大豆油粕(日清丸紅飼料社製)を使用し、魚粉を完全に代替した無魚粉飼料(NFM 区)を、試験区として魚粉由来のタンパク質 50%を大豆油粕、濃縮大豆タンパク質(Danpro A, Aarhus Olie Co. Denmark), 分離大豆タンパク質(Fuji Pro F, Fuji Olie Co Japan), 分

離大豆タンパク質をアルコール洗浄した残渣物でそれぞれ代替した飼料(SBM 区, SPC 区, SPI 区, ASPI 区) を作製した。なお, ASPI は Yamamoto et al. (2008) に基づいて作製した。SBM, SPC, SPI および ASPI 区は FM 区に比べて不足するアミノ酸・ビタミンを補足した。飼料の成型および保存は第 2 章と同様の方法で行った。

試験 3-2-2 アルコール可溶性の大豆抗栄養因子が生理障害に及ぼす組織学的検討
各試験区の飼料組成を Table3-2-2 に示した。対照飼料は FM 区と, 魚粉由来のタンパク質 55% を SBM で代替した SBM 区を用意した。試験区として SBM を原料の 5 倍量の 70% アルコールで 2 回, 90% アルコールで 1 回洗浄処理した後, 風乾を 1 日行ったものを主体とした飼料(ASBM 区), 同方法で魚粉をアルコールで洗浄したものを主体とした飼料(AFM), ASBM 区に SBM からアルコール抽出した物質(AE) を添加した飼料(ASBM+AE), 同様に AFM に SBM から抽出した AE を同量添加した飼料区(AFM+AE) と 2 倍添加した飼料区(AFM+AE2) をそれぞれ作製した。SBM, ASBM, ASBM+AE, AFM, AFM+AE および AFM+AE2 は FM 区に比べて不足するアミノ酸・ビタミンを補足した。

供試魚および飼育条件 供試魚は第 2 章と同様の方法で飼育したものをを用いた。試験に用いた水槽, 海水の注水量は第 2 章と同様とし, 試験期間中の水温は平均 20.0°C であった。飼育試験は, 水槽ごとに試験飼料をそれぞれ 10 日間与えて予備飼育をした後, 続けて 6 週間与えて本試験を行った。試験飼料は 1 日 2 回, 1 週間に 6 日間, 8:00 と 16:00 に飽食するまで手撒きで与えた。

試験 3-2-1 水槽は FM, SBM, SPC, SPI および ASPI 区は各 2 水槽, NFM 区は 1 水槽設置し, 各水槽に 24 匹(平均魚体重 9.0g) 収容して試験を行った。

試験 3-2-2 水槽は試験区ごとに 2 水槽設置した。なお, 平均魚体重 9.0g の個体が揃わなかったため, AFM 区, AFM+AE 区および AFM+AE2 区には平均魚体重 7.0g のマダイを収容して試験を行った。

サンプリング方法 試験終了後, 各試験区の供試魚は解剖前に 48 時間絶食させた。その後, 各水槽から 3 個体をランダムに採取し, 2-フェノキシエタノール

(Sigma-Aldrich 社製) で麻酔し, 開腹して肝臓と腸管の後部をそれぞれ摘出した。摘出した臓器は速やかに 10% 中性緩衝ホルマリン(pH7.4, 和光純薬社製) で固定した。

組織標本の作製方法 ホルマリン固定した臓器は常法に従いエタノール系列で脱水後, パラフィンに包埋し, 5 μ m の切片を作製した。切片はマイヤーのヘマトキシレン・エオシン染色を適宜施し光学顕微鏡で観察した。

肝細胞の核径と細胞質径の計測と解析 肝臓組織では顕微鏡デジタルシステム Moticam2000(島津理化器械社製) を用いて測定した。計測結果は試験区間の平均値の差を比較するため, 第 2 章と同様の方法で各試験区間の有意差検定を行った。有意水準は危険率が 5% 以下とした。

試験 3-2-1 肝細胞の計測は第 2 章と同じ方法で計測した。なお, FM, SBM, SPC,

SPI, ASPI 区は個体毎に 150 細胞の核長径と 100 細胞の細胞質長径を, NFM 区は個体毎に 300 細胞の核長径と 200 細胞の細胞質長径を計測した。

試験 3-2-2 肝細胞の計測は第 2 章と同様の方法で計測した。なお SBM 区, ASBM 区および ASBM+AE 区は固定不良個体と考えられるものが各 1 個体いたため, それらを除外して計測した。

3-3 結果

試験 3-3-1 大豆油粕に含まれる抗栄養因子除去による組織学的検討

腸管後部組織像 本試験では, 各試験区の粘膜上皮細胞, 粘膜固有層および粘膜固有層の基底部分で組織変性は認められず, 第 2 章の FM 区と同様の組織像を示した(Figs.3-3-1, 3-3-2)。

肝臓組織像 NFM 区の肝細胞では第 2 章と同様に核濃縮を呈した萎縮変性が認められ, 肝細胞の核長径および細胞質径は FM 区に比べて有意に小さかった(Fig.3-3-3b, Table 3-3-1)。

SBM 区では肝細胞の細胞質はエオシンに暗く染色され, 組織全体では細胞質の大きさに均一性はなく索状構造に乱れが生じていた(Fig.3-3-3c)。肝細胞の核はヘマトキシレンに暗く染色され, 核濃縮を起こした肝細胞が多数認められた。肝細胞の核長径および細胞質径はともに NFM 区との間に有意差は認められなかった(Table 3-3-1)。

SPC 区では, 肝細胞の細胞質はエオシンに明るく染色され, 肝細胞間では毛細血管の拡張がみられたが, 組織全体では SBM 区のような索状構造の乱れは認められなかった(Fig.3-3-3d)。肝細胞の核はヘマトキシレンに明るく染色され, 核の仁は明瞭に確認できた。肝細胞の核長径および細胞質径は SBM 区との間に有意差はなかったが数値の上では大きく, 細胞質径は FM 区との間にも有意差がなかった(Table 3-3-1)。

SPI 区では, SBM 区と同様に肝細胞の細胞質がエオシンに暗く染色され, 組織全体では細胞質の大きさに均一性はなく索状構造に乱れが生じていた(Fig.3-3-3e)。肝細胞の核はヘマトキシレンに暗く染色され, 核濃縮を起こした肝細胞が多数認められた。肝細胞の核長径および細胞質径はともに SBM 区との間に有意差は認められなかった(Table 3-3-1)。

ASPI 区では, 肝細胞の細胞質はエオシンに明るく染色され, 毛細血管の拡張はみられるものの, 組織全体では SPI 区のような索状構造の乱れは認められなかった(Fig.3-3-3f)。肝細胞の核はヘマトキシレンに明るく染色され, 核の仁も明瞭に確認できた。肝細胞の核長径は SPI 区に比べて有意に大きく, 細胞質径は SPI 区との間に有意差はないものの数値の上では大きく, FM 区との間にも有意差がなかった(Table 3-3-1)。

膵臓外分泌部組織 NFM 区の腺細胞では第 2 章と同様に萎縮が認められ, 細胞質内のチモーゲン顆粒の量は少なかった(Fig.3-3-4b)。

SBM 区では腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンにそれぞれ暗く染色され、全 6 個体中 3 個体では、細胞質は NFM 区と同様に FM 区と比べて相対的に小さく、細胞質の小型化に伴い腺細胞間には空隙が生じ、一部の腺細胞では核萎縮が認められた (Fig.3-3-4c)。残りの 3 個体では、細胞質の丈は高いものの幅は狭く、腺細胞間には空隙が生じていた (Fig.3-3-4d)。また、SBM 区全体では、細胞質内にみられるチモーゲン顆粒が FM 区に比べて相対的に少なく、血管内の赤血球も相対的に少なかった (Figs.3-3-4c, 3-3-4d)。

SPC 区では、腺細胞の核および細胞質はヘマトキシレンにそれぞれ明るく染色され、細胞質の丈は高く、SBM 区のような腺細胞間の空隙は認められなかった (Fig.3-3-4e)。腺細胞の核は仁が明瞭に確認できた。また、細胞質内には SBM 区に比べてチモーゲン顆粒の量は相対的に多く、血管内の赤血球も相対的に多かった。

SPI 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンに暗く染色されたが、細胞質の丈は SBM 区に比べて相対的に高く、腺細胞間の空隙は認められなかった (Fig.3-3-4f)。腺細胞の核は仁が明瞭に確認できた。ただし、細胞質内のチモーゲン顆粒の量は SBM 区と同様に少なく、血管内の赤血球の量も少なかった。

ASPI 区では、腺細胞の核および細胞質は FM 区と同様にヘマトキシレンにそれぞれ明るく染色され、細胞質の丈は高く、腺細胞間に空隙は認められなかった (Fig.3-3-4g)。腺細胞の核は仁が明瞭に確認できた。また、細胞質内のチモーゲン顆粒は、SPI 区に比べて相対的に多く、血管内の赤血球も相対的に多かった。

試験 3-3-2 アルコール可溶性の大豆抗栄養因子が生理障害に及ぼす組織学的検討
腸管後部組織像 本試験では、各試験区の粘膜上皮細胞、粘膜固有層および粘膜固有層の基底部に組織変性は認められず、第 2 章の FM 区と同様の組織像を示した (Figs.3-3-5, 3-3-6)。

肝臓組織像 SBM 区では、肝臓の細胞質はエオシンにそれぞれ暗く染色され、組織全体では細胞質の大きさに均一性がなく索状構造に乱れが生じていた (Fig.3-3-7b)。肝細胞の核はヘマトキシレンに濃染し、組織全体で核濃縮を生じた肝細胞が多数認められた。また、肝細胞の核長径および細胞質径は FM 区に比べて有意に小さかった (Table 3-3-2)。

ASBM 区では、肝細胞の核と細胞質は各染色液に明るく染色されたが、組織全体では細胞質の大きさに均一性がなく索状構造に乱れが生じていた (Fig.3-3-7c)。肝細胞の核は仁が明瞭に確認できた。また、肝細胞の核長径ならびに細胞質径は SBM 区との間に有意差はないものの、数値の上では大きく、FM 区との間にも有意差はなかった (Table 3-3-2)。

ASBM+AE 区では、肝細胞の細胞質はエオシンに暗く染色され、肝細胞の細胞質は大きさに均一性がなく、組織全体で索状構造に乱れが生じていた (Fig.3-3-7d)。肝細胞の核はヘマトキシレンに濃染し、組織全体で核濃縮を生じた肝細胞が多数認められた。また、肝細胞の核長径は SBM 区に比べて有意に小さく、細胞質径は SBM 区との間に

有意差はなかった(Table 3-3-2)。

AFM 区では、肝細胞の核と細胞質は各染色液に暗く染色され、肝細胞の細胞質は大きさに均一性がなく一部の肝細胞で索状構造の乱れが生じていた(Fig.3-3-7e)。組織全体では核濃縮を生じた肝細胞と核の仁が認められる正常な肝細胞とが混在していた。また、肝細胞の核長径は FM 区に比べて有意に小さく SBM 区との間に有意差はなかった。細胞質径は FM 区との間に有意差はなかった(Table 3-3-2)。

AFM+AE 区では肝細胞の細胞質はエオシンに暗く染色され、組織全体では細胞質は大きさに均一性がなく索状構造に乱れが生じていた(Fig.3-3-7f)。肝細胞の核はヘマトキシレンに濃染し、組織全体で核濃縮を起こした肝細胞が多数認められた。また、肝細胞の核長径および細胞質径は AFM 区に比べて有意に小さく、細胞質径は SBM 区との間に有意差はなかった(Table 3-3-2)。

AFM+AE2 区では肝細胞の細胞質はエオシンに暗く染色され、細胞質の大きさに均一性はなく、索状構造の乱れが顕著であった(Fig.3-3-7g)。また、一部の肝細胞間では毛細血管の拡張が認められた。肝細胞の核はヘマトキシレンに濃染し、組織全体で肝細胞の核濃縮が顕著に認められた。肝細胞の核長径ならびに細胞質径は AFM+AE 区との間に有意差はなかったが、どちらも数値の上では小さかった(Table 3-3-2)。

膵臓外分泌部組織 SBM 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンにそれぞれ濃染し、細胞質の萎縮が認められ、腺細胞の核は仁が不明瞭であった(Fig.3-3-8b)。また、膵臓外分泌部の血管は幅が狭く、一部の血管は閉塞していた。細胞質内のチモーゲン顆粒は、FM 区に比べてエオシンに暗く染色され、その量も相対的に少なかった。

ASBM 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンにそれぞれ明るく染色され、線細胞の細胞質は幅が狭く、腺細胞間には空隙が生じていたものの、細胞質の丈は SBM 区に比べて相対的に高かった(Fig.3-3-8c)。腺細胞の核は楕円形で仁は明瞭に確認できた。また、細胞質内のチモーゲン顆粒はエオシンに明るく染色され、その量も SBM 区に比べて相対的に多かった。

ASBM+AE 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンに濃染し、細胞質の萎縮が認められた。腺細胞の核は萎縮しており仁は不明瞭であった(Fig.3-3-8d)。また、膵臓外分泌部の血管は ASBM 区に比べて相対的に幅が狭かった。細胞質内のチモーゲン顆粒はエオシンに暗く染色され、その量は ASBM 区に比べて相対的に少なかった。

AFM 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンに明るく染色された(Fig.3-3-8e)。線細胞の細胞質は FM 区に比べて相対的に幅が狭く、一部の腺細胞間で空隙が生じていたものの、細胞質の丈は高かった。細胞質内のチモーゲン顆粒はエオシンに明るく染色され、FM 区と同様に多量に存在した。

AFM+AE 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンに暗く染色され、細胞質は痩せて幅が狭く、それに伴い腺細胞間には空隙が生じていた(Fig.3-3-8f)。また、一部の腺細胞は萎縮しており、核の仁も不明瞭であった。細胞質内のチモーゲン顆粒は AFM

区に比べてエオシンに暗く染色され、その量も相対的に少なかった。

AFM+AE2 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンに濃染し、萎縮した腺細胞が多数認められ、腺細胞間には空隙が生じていた(Fig.3-3-8g)。また、核の仁が不明瞭な腺細胞が多数認められた。細胞質内のチモーゲン顆粒はエオシンに暗く染色され、その量は AFM+AE 区と同様に少なかった。

3-4 考 察

本研究では試験 3-3-1 および 3-3-2 より、SBM 主体飼料を給与したマダイでは FM 主体飼料給与時に比べて飼育成績が劣り、肝臓組織において 2 章の NFM 区と同様の組織変性を確認した(Tables3-4-1, 3-4-2)。その一方で、試験 3-3-1 の SBM 区では、全 6 個体のうち 3 個体で腺細胞の萎縮は軽度であった。示野ら(1992)では、同じ海産魚のハマチにおいて SBM による魚粉の代替率が高くなると、タンパク質および脂質の消化率が低下する事を報告している。本研究においても飼料中の SBM 配合率は試験 3-3-1 に比べて試験 3-3-2 の SBM 主体飼料がより高いことから、飼料中の SBM 配合率が高いほど肝臓組織における組織変性が顕著となり、それに伴う胆汁および膵液の生成不良により、腸管におけるタンパク質や脂質をはじめとした栄養物質の消化吸収能力が著しく低下している可能性が考えられる。

SBM には哺乳類および魚類の体内の栄養代謝に影響を与える ANF が存在することが知られており(Francis et al. 2002)、魚類では SBM を洗浄精製することで ANF の含有量を低くした飼料の開発・利用が行われている(高木 2002)。この洗浄精製した飼料には SBM をアルコール洗浄した SPC や、SBM を希酸処理した SPI などが知られているが(星 1992)、ニジマスでは SPC 主体飼料ならびに SPI をアルコール洗浄した ASPI 主体飼料において生理障害が改善されることが報告されている(岩下 2010, 岩下ら 2010)。本研究においても SPC および ASPI 主体飼料を給与したマダイでは飼育成績ならびに肝臓および膵臓外分泌部における組織変性が改善され、膵臓外分泌部では SBM 区に比べて腺細胞内のチモーゲン顆粒の量も相対的に増加することを確認した(Table3-4-1)。高木ら(1999)では、魚粉代替率 50%の SPC 主体飼料をマダイに給与しても SBM 主体飼料給与時のような飼育成績の低下は生じないことを報告しており、同じ海産養殖魚のブリでは SBM 主体飼料給与時に生じる成長不良は、SBM に含まれるアルコール可溶物質が膵臓外分泌部の消化酵素および胆汁酸の分泌を抑制するために生じている可能性が報告されている(Nguyen et al.2011)。これらのことから、SBM 主体飼料給与時のマダイにおける肝臓および膵臓外分泌部の組織変性による胆汁および膵液の生成不良をはじめとした生理障害ならびに成長不良は SBM をアルコール洗浄することで改善される可能性が考えられる。

ニジマスでは、カゼイン飼料に SBM からアルコール抽出した物質を添加すると SBM

主体飼料給与時と同様の生理障害が生じることより、大豆油粕に含まれるアルコール可溶性成分が生理障害の要因に強く影響を及ぼすことを示唆している(Yamamoto et al 2008)。本研究では試験 3-3-2 より、SBM をアルコール洗浄した ASBM 区では飼育成績の改善が認められ、組織像では肝臓および膵臓外分泌部に組織変性は認められず、腺細胞内にはチモーゲン顆粒が多量に存在した(Table3-4-2)。一方、ASBM 作製時にアルコール抽出された AE を添加した ASBM+AE 区や AFM+AE 区では肝臓および膵臓外分泌部組織で SBM 主体飼料給与時と同様の組織変性が認められ、腺細胞内のチモーゲン顆粒の量は ASBM 区と比較して相対的に少なかった。また添加量の多い AFM+AE2 区では肝臓および膵臓外分泌部における組織変性がより顕著であった。このことから、SBM 主体飼料を給与したマダイで生じる生理障害の要因には、SBM に含まれるアルコール可溶性の ANF が大きく関与しており、それらを除去する事がマダイの生理障害の改善方法として有効であるものと考えられる。

本研究では試験 3-2-1 より SPI 主体飼料を給与したマダイでは肝臓で組織変性が認められたものの、膵臓外分泌部の腺細胞の萎縮変性に一定の改善効果が認められた。SBM の希酸洗浄は、ANF の一つであるフィチン酸の除去に有効であるとともに、大豆タンパク質の疎水性および乳化性が高まることが報告されている(加藤ら 2002)。したがって SPI 主体飼料給与時のマダイでは、生体内における大豆タンパク質の利用性の向上に伴い、生理障害に一定の改善が得られた可能性が考えられる。ただし、本研究では飼育成績ならびに肝臓組織においてその改善効果は認められず、十分な改善効果を得るにはアルコール可溶性の ANF を除去する必要があるものと考えられる(Table3-4-1, Fig.3-3-3e)。また、本研究では試験 3-2-2 における試験終了時の平均魚体重は SBM 区が 16.8g だったのに対し、AE を添加した ASBM+AE 区の平均魚体重は 18.0g と有意差はないものの数値の上では重く、ASBM 区との間にも有意差はみられなかった(Table3-4-2)。岩下(2010)では、ニジマスにおいて SPC 主体飼料に大豆サポニンやイソフラボンをはじめとした ANF を添加しても SBM 主体飼料給与時のような重度の組織変性を生じないことより、主要臓器における組織変性の重篤化および生理代謝不良の要因には、アルコール可溶性の ANF が結合した大豆タンパク質が関与する可能性を推察している。したがって、SBM 主体飼料を給与したマダイで生じる生理障害ならびに成長不良は、アルコール可溶性の ANF が結合した大豆タンパク質が大きく関与しているものと推察する。

Table 3-2-1 Formulation of the experimental diets

	FM	NFM	SBM	SPC	SPI	ASPI
<i>Ingredients (% wet weight basis)</i>						
White fish meal	45.50	-	10.00	10.00	10.00	10.00
Defatted soybean meal	8.00	71.50	61.50	-	-	-
Soy protein concentrate	-	-	-	43.50	-	-
Soy protein isolate (SPI)	-	-	-	-	33.00	-
Alcohol washed SPI	-	-	-	-	-	31.00
Wheat flour	15.00	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
α -Starch	9.55	6.25	6.25	12.55	16.05	16.00
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Pollock visceral oil	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Vitamin mix ^{*1}	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix ^{*2}	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Choline chloride	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Vitamin E (purity: 50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Ascorbic acid calcium	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Cellulose	6.00	0.30	0.30	12.00	19.00	21.05
Feeding stimulant ^{*3}	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
EAA mix ^{*4}	-	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

¹Vitamin mixture ingredient (mg/100g): Vitamin B1 1.8 g, Vitamin B2 3.0 g, Vitamin B6 1.2g, Vitamin B12 3.0 mg, Niacin 12.0g, Ca-pantotenate 3.0 mg, Inositol 60.0g, Biotine 180.0mg, Folic acid 450 mg, p-Aminobenzoic acid 1.5g, Vitamin K3 1.5g, Vitamin A 1200,000 IU, Vitamin D3 1200,000 IU.

²Mineral mixture ingredients (g/100g): NaCl 4.0 g, MgSO₄·7H₂O 60.0 g, Fe-citrate 10.0 g, Ca-lactate 14.0 g, Trace element mixture 4.0 g, Cellulose 8.0 g. Trace element mixture ingredients (mg/100mg): ZnSO₄·7H₂O 35.3mg, MnSO₄·4H₂O 16.2mg, CuSO₄·5H₂O 3.1mg, KIO₃ 0.3mg, CoCl₂·6H₂O 0.1mg, Cellulose 45.0 mg.

³Proline, 354; Alanine, 232; Inosine 5'-monophosphate, 414 (mg/g).

⁴EAA mixture ingredients (g/100g): Lysine HCL 31.5g, Methionine 42g, Phenylalanine 6.5 g, Valine 5.8g, Cellulose 14.2g.

Table 3-2-2 Formulation of the experimental diets

	FM	SBM	ASBM	ASBM+AE	AFM	AFM+AE	AFM+AE2
<i>Ingredient (% wet weight basis)</i>							
White fish meal	44.50	5.00	5.00	5.00	-	-	-
Alcohol washed FM	-	-	-	-	42.00	42.00	42.00
Defatted soybean meal	5.00	66.20	-	-	5.00	5.00	5.00
Alcohol washed SBM	-	-	62.00	62.00	-	-	-
Wheat flour	15.00	5.00	5.00	5.00	15.00	15.00	15.00
α -Starch	9.55	6.25	6.25	6.25	9.55	9.55	9.55
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Fish visceral oil	9.40	10.00	11.00	11.00	10.00	10.00	10.00
Vitamin mix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix ²	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Choline chloride	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Vitamin E (purity: 50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Ascorbic acid calcium	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Cellulose	10.60	0.60	3.80	3.80	12.50	12.50	12.50
Feeding stimulant ³	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
EAA mix ⁴	-	1.00	1.00	1.00	-	-	-

¹Vitamin mixture ingredient (mg/100g): Vitamin B1 1.8 g, Vitamin B2 3.0 g, Vitamin B6 1.2g, Vitamin B12 3.0 mg, Niacin 12.0g, Ca-pantotenate 3.0 mg, Inositol 60.0g, Biotine 180.0mg, Folic acid 450 mg, p-Aminobenzoic acid 1.5g, Vitamin K3 1.5g, Vitamin A 1200,000 IU, Vitamin D3 1200,000 IU.

²Mineral mixture ingredients (g/100g): NaCl 4.0 g, MgSO₄·7H₂O 60.0 g, Fe-citrate 10.0 g, Ca-lactate 14.0 g, Trace element mixture 4.0 g, Cellulose 8.0 g. Trace element mixture ingredients (mg/100mg): ZnSO₄·7H₂O 35.3mg, MnSO₄·4H₂O 16.2mg, CuSO₄·5H₂O 3.1mg, KIO₃ 0.3mg, CoCl₂·6H₂O 0.1mg, Cellulose 45.0 mg.

³Proline, 354; Alanine, 232; Inosine 5'-monophosphate, 414 (mg/g).

⁴EAA mixture ingredients (g/100g): Lysine HCL 31.5g, Methionine 42g, Phenylalanine 6.5 g, Valine 5.8g, Cellulose 14.2g.

Table 3-3-1 Nuclear and cytoplasmic size of hepatocytes of red sea bream fed the experimental diets

	FM	NFM	SBM	SPC	SPI	ASPI	<i>P</i>
Nucleus (μm) ^{1,5}	4.7	3.8 ^{a3}	4.0 ^{ab}	4.2 ^b	3.89 ^a	4.2 ^b	< 0.001
Cytoplasm (μm) ^{2,5}	15.5 ^a	12.4 ^{b4}	13.5 ^{bc}	15.0 ^{ac}	13.3 ^{bd}	14.7 ^{acd}	< 0.001

¹Values are mean \pm SD (n=6, mean of 150 cells).

²Values are mean \pm SD (n=6, mean of 100 cells).

³ Values are mean \pm SD (n=3, mean of 300 cells).

⁴ Values are mean \pm SD (n=3, mean of 200 cells).

⁵Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$)

Table 3-3-2 Nuclear and cytoplasmic size of hepatocytes of red sea bream fed the experimental diets

	FM	SBM	ASBM	ASBM+AE	AFM	AFM+AE	AFM+AE2	<i>P</i>
Nucleus (μm) ^{1,4}	3.9 ^a	3.7 ^{bc2}	3.8 ^{ab2}	3.4 ^{cd2}	3.7 ^b	3.4 ^{cd}	3.2 ^d	<0.001
Cytoplasm (μm) ^{3,4}	15.7 ^a	13.4 ^b	14.8 ^{ab}	13.7 ^b	15.5 ^a	14.2 ^b	14.0 ^b	<0.001

¹Values are mean \pm SD (n=6, mean of 150 cells).

²Values are mean \pm SD (n=5, mean of 150 cells).

³Values are mean \pm SD (n=6, mean of 100 cells).

⁴Values with the same superscript within the same row are not significantly different (P>0.05)

Table 3-4-1 Growth performance of red sea bream fed the experimental diets

	FM ^{1,3}	NFM ²	SBM ^{1,3}	SPC ^{1,3}	SPI ^{1,3}	ASPI ^{1,3}
Initial BW (g)	9.1	8.9	9.2	9.2	9.1	9.2
Final BW (g)	27.0 ^a	17.1	20.9 ^{bc}	23.1 ^b	19.2 ^c	21.6 ^{ab}
Weight gain (%)	197.4 ^a	90.7	127.4 ^{bc}	151.4 ^b	110.3 ^c	135.7 ^{bc}
Feed efficiency (%)	84.6 ^a	58.1	69.1 ^{bc}	76.6 ^{ab}	70.8 ^{bc}	78.8 ^a

¹Values are means ($n=2$).

²Values are means ($n=1$).

³Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

Table 3-4-2 Growth performance of red sea bream fed the experimental diets

	FM ^{1,2}	SBM ^{1,2}	ASBM ^{1,2}	ASBM+AE ^{1,2}	AFM ¹	AFM+AE ¹	AFM+AE2 ¹
Initial BW (g)	9.1	9.1	9.1	9.1	7.1	7.1	7.1
Final BW (g)	23.4 ^a	16.8 ^b	18.7 ^b	18.0 ^b	18.1	18.0	17.1
Weight gain (%)	92.8 ^a	68.2 ^b	82.9 ^a	78.3 ^a	96.7	94.9	91.3
Feed efficiency (%)	157.9 ^a	84.7 ^b	105.6 ^b	97.7 ^b	153.5	152.4	139.8

¹Values are means ($n=2$).

²Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

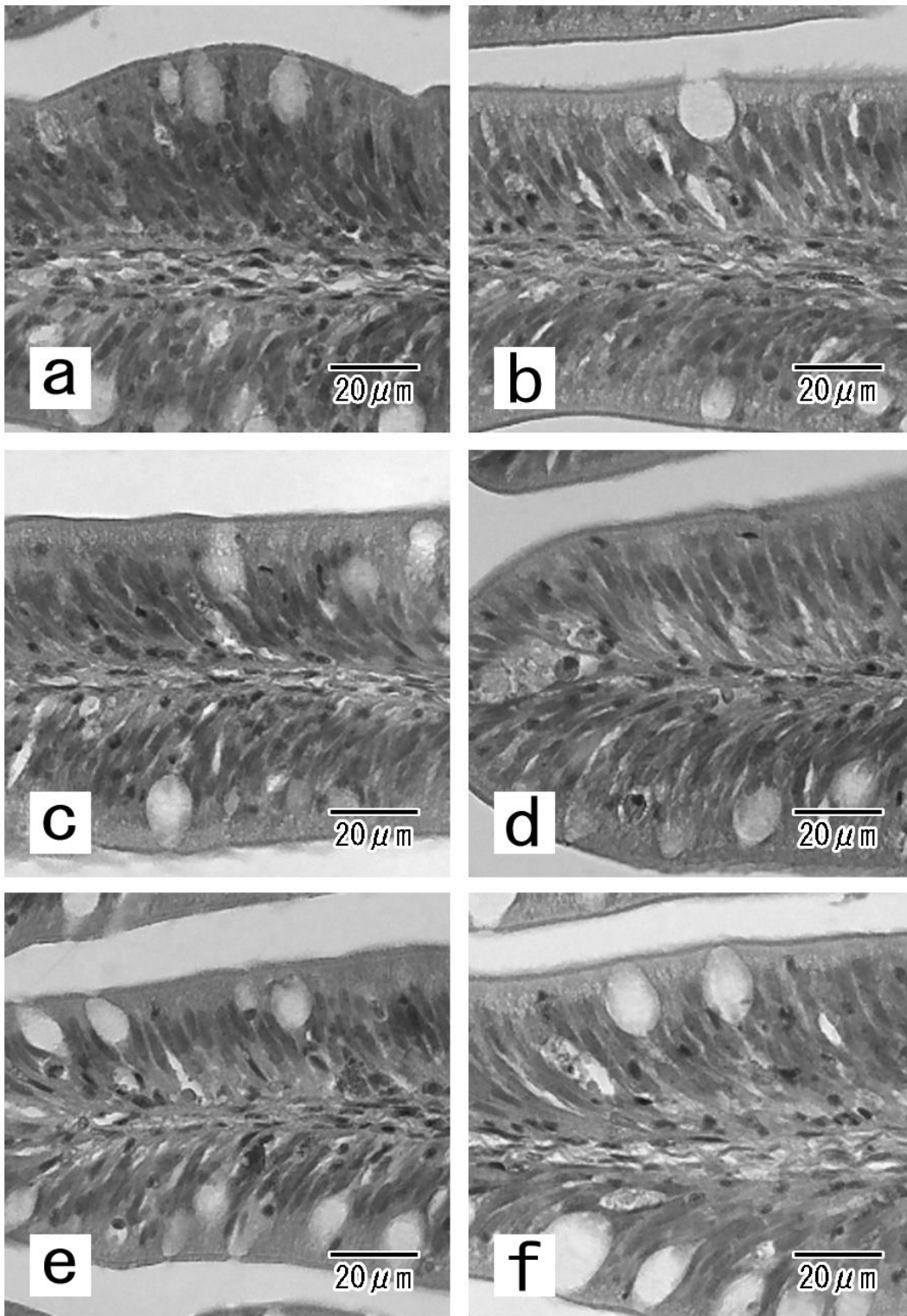


Fig.3-3-1 Histological sections of mucosal folds of the distal intestine of red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet NFM. c: fish fed diet SBM. d: fish fed diet SPC e: fish fed diet SPI. f: fish fed diet ASPI.

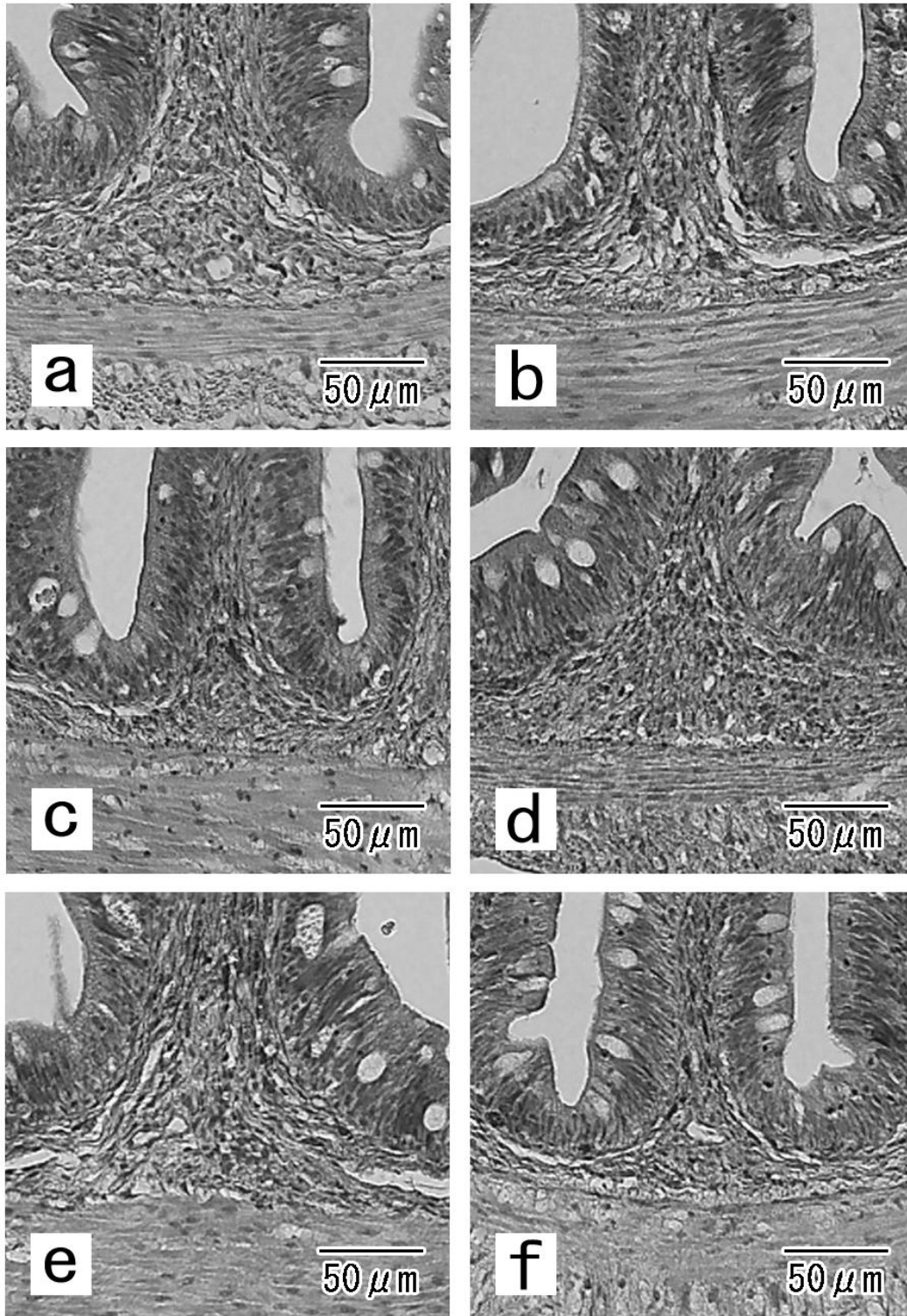


Fig.3-3-2 Histological sections of the lamina propria of submucosa of the distal intestine in red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet NFM. c: fish fed diet SBM. d: fish fed diet SPC e: fish fed diet SPI. f: fish fed diet ASPI.

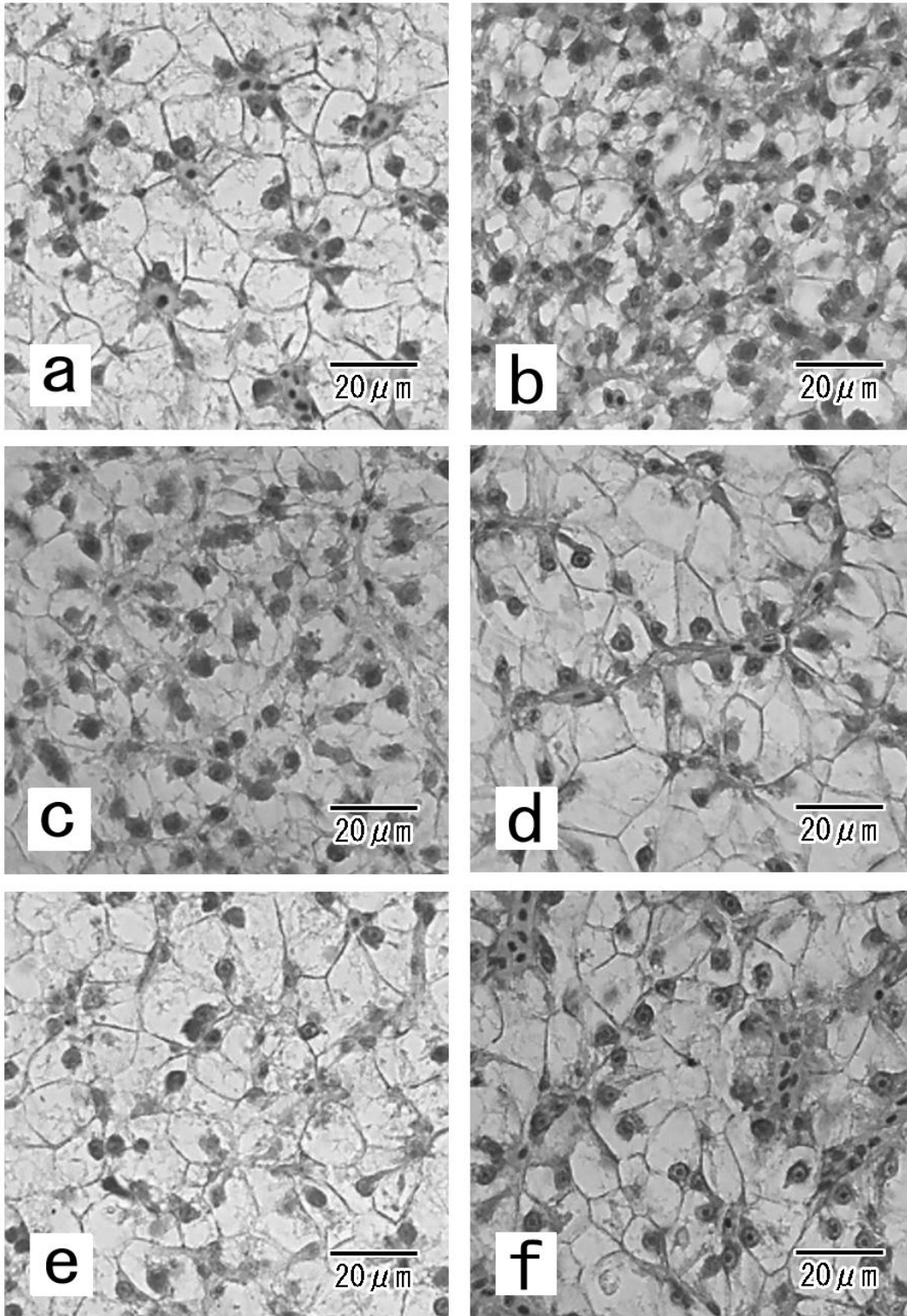


Fig.3-3-3 Histological sections of hepatocytes of the liver of red sea *Pagrus major* bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet NFM. c: fish fed diet SBM. d: fish fed diet SPC. e: fish fed diet SPI. f: fish fed diet ASPI.

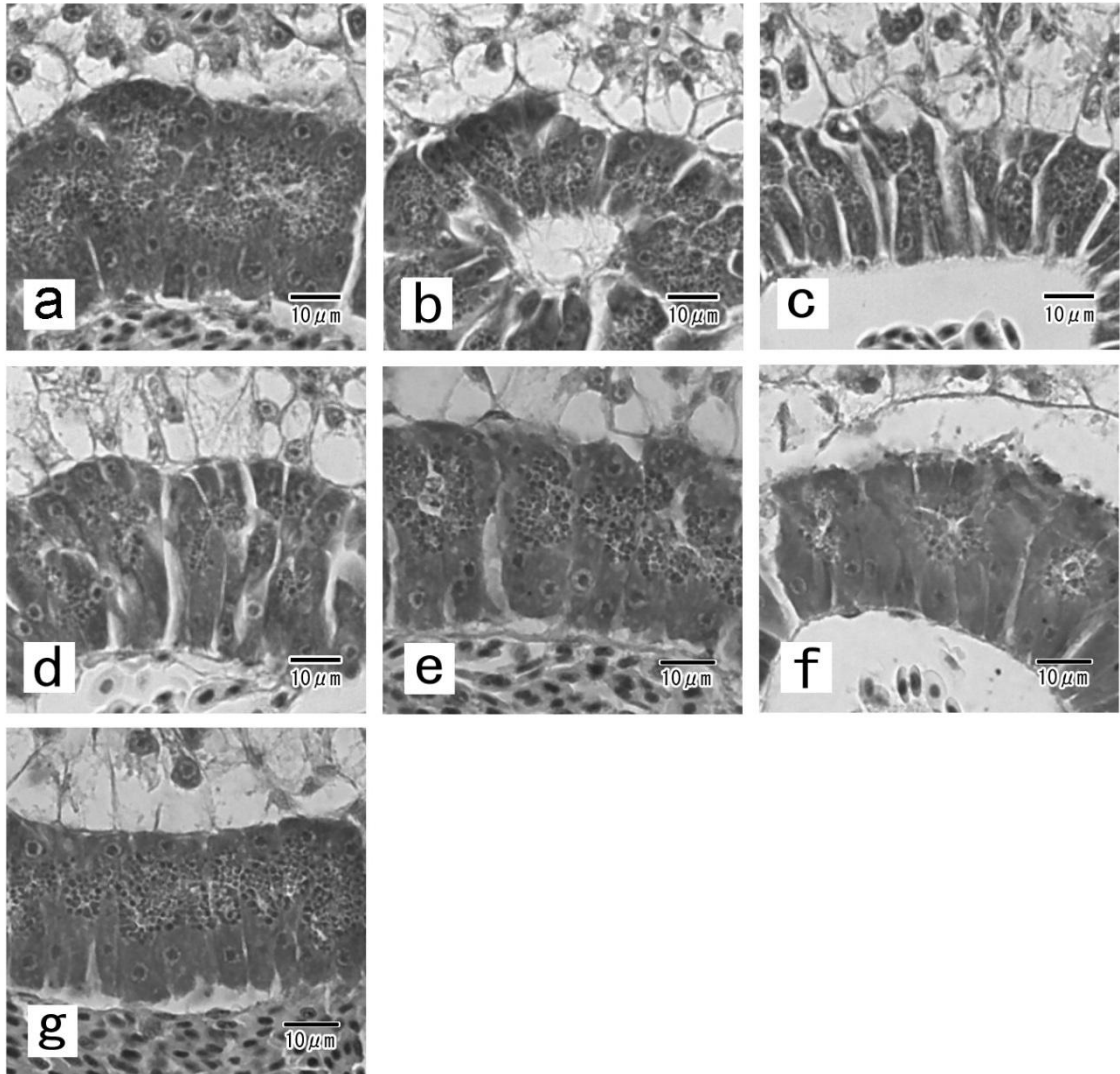


Fig.3-3-4 Histological sections of exocrine portion of the pancreas of red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet NFM. c,d: fish fed diet SBM. e: fish fed diet SPC. e: fish fed diet SPI. g: fish fed diet ASPI.

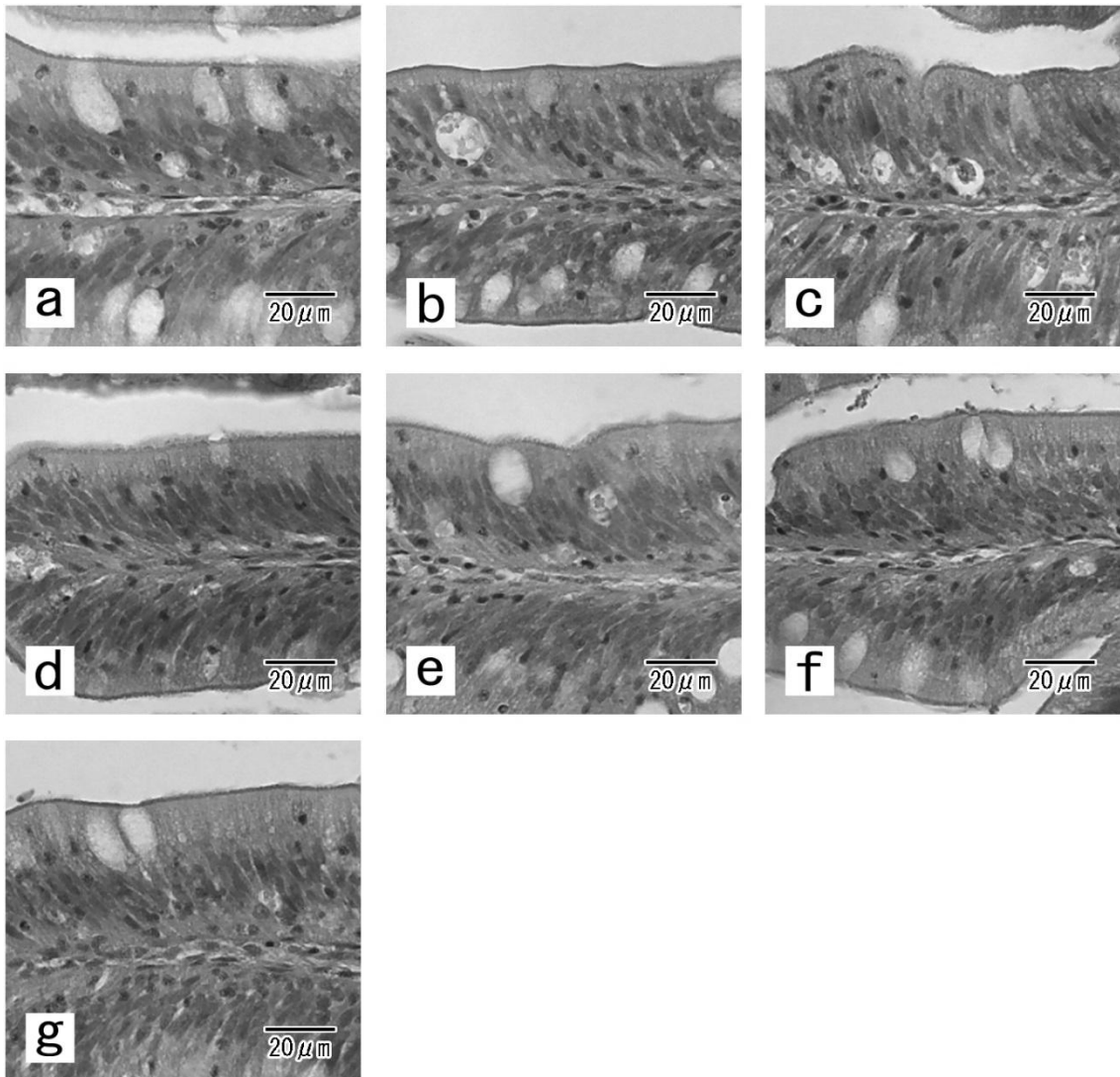


Fig.3-3-5 Histological sections of mucosal folds of the distal intestine of red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet ASBM. d: fish fed diet ASBM+AE. e: fish fed diet AFM. f: fish fed diet AFM+AE. g: fish fed diet AFM+AE2.

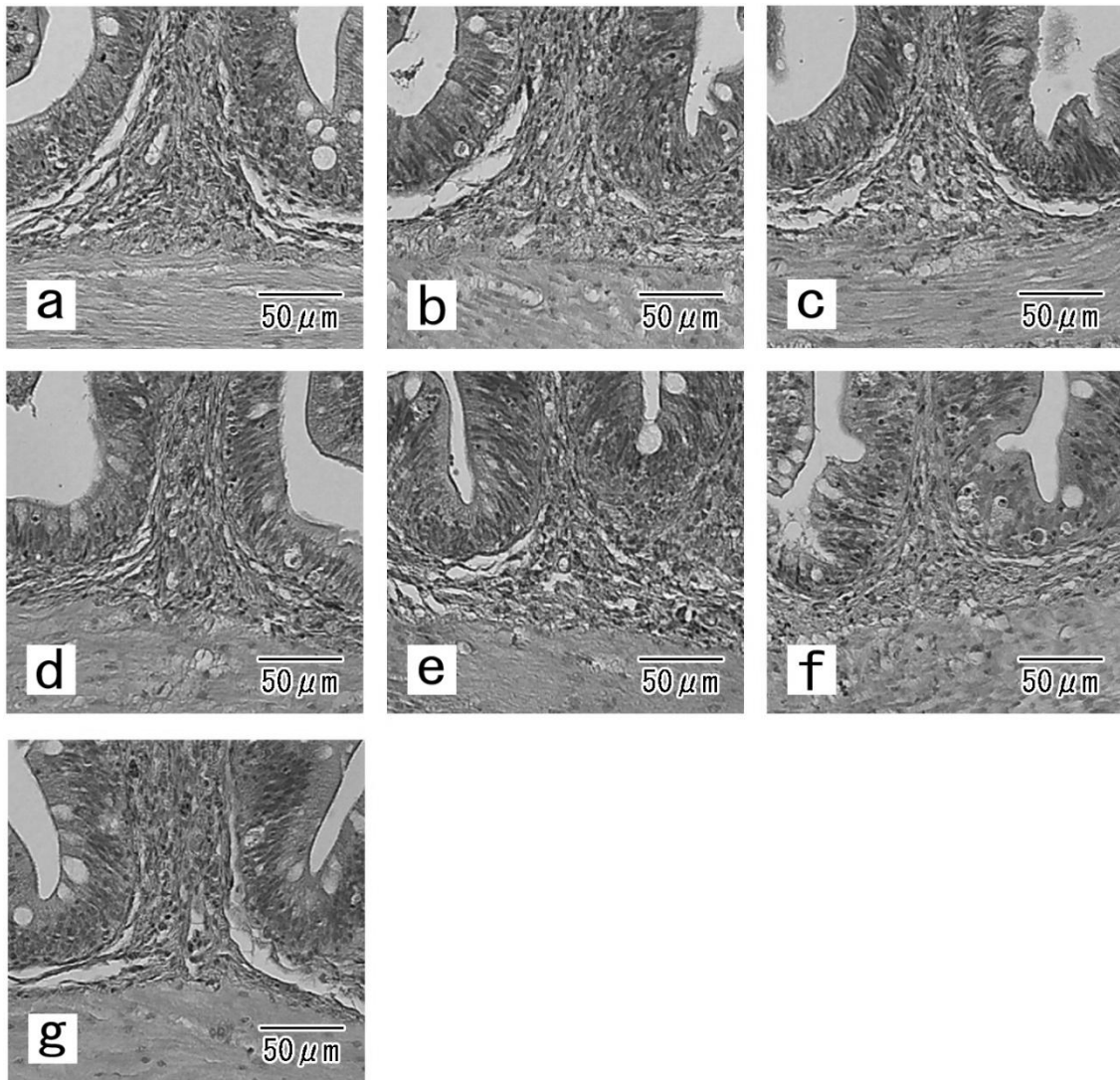


Fig.3-3-6 Histological sections of the lamina propria of submucosa of the distal intestine in red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet ASBM. d: fish fed diet ASBM+AE. e: fish fed diet AFM. f: fish fed diet AFM+AE. g: fish fed diet AFM+AE2.

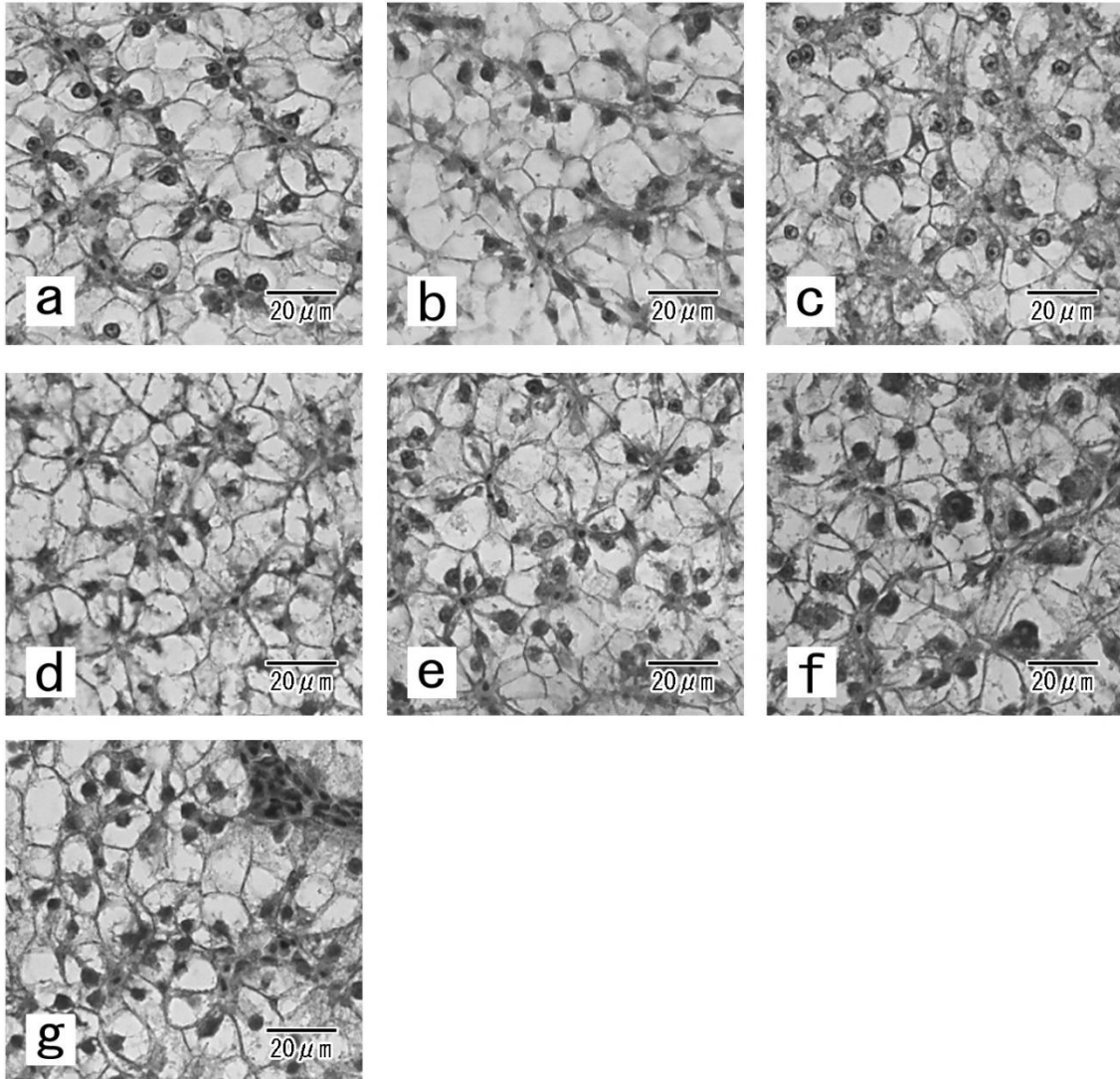


Fig.3-3-7 Histological sections of hepatocytes of the liver of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet ASBM. d: fish fed diet ASBM+AE. e: fish fed diet AFM. f: fish fed diet AFM+AE. g: fish fed diet AFM+AE2.

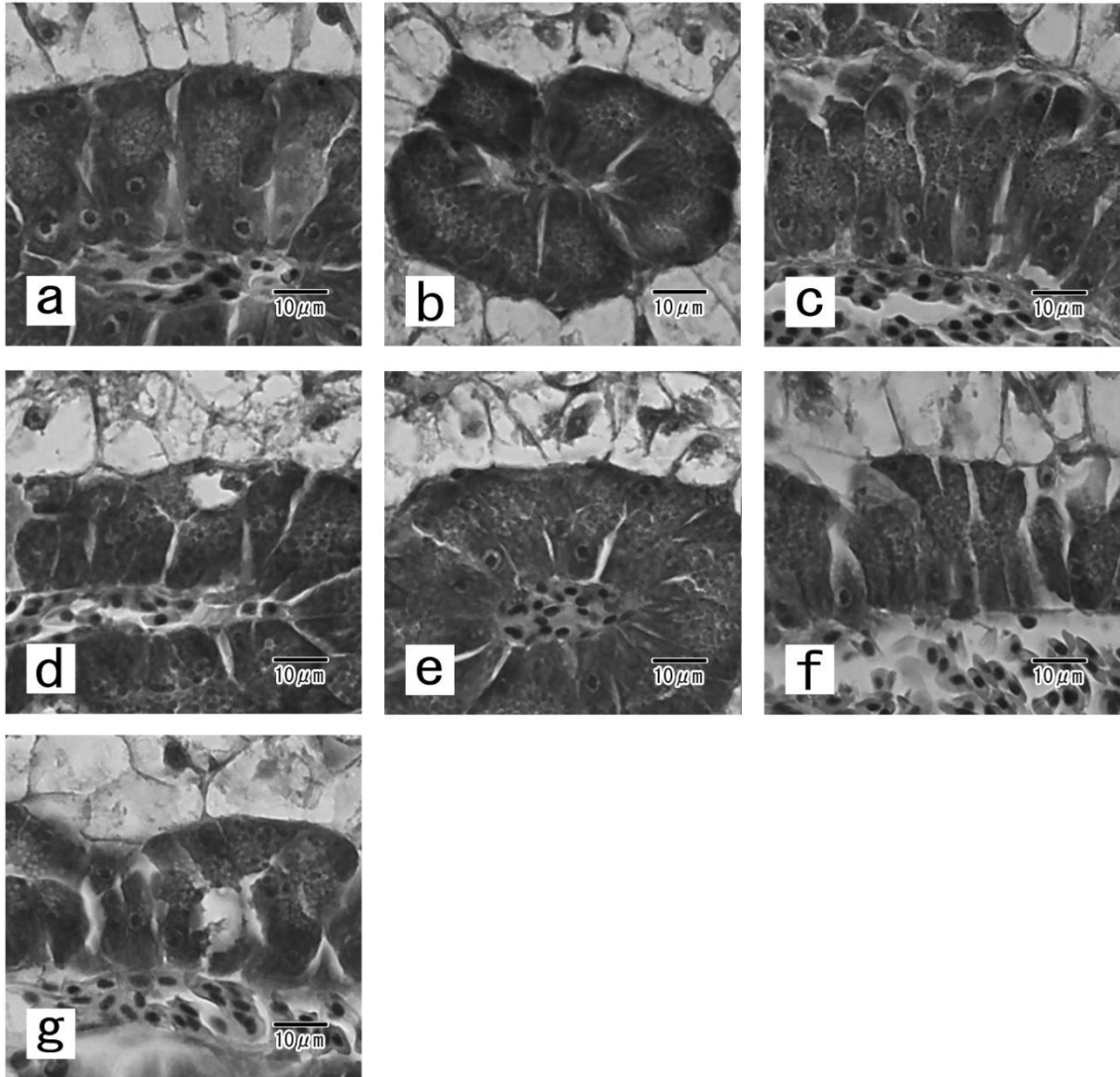


Fig.3-3-8 Histological sections of exocrine portion of the pancreas of red sea bream *Pagrus major* fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet ASBM. d: fish fed diet ASBM+AE. e: fish fed diet AFM. f: fish fed diet AFM+AE. g: fish fed diet AFM+AE2.

第4章 大豆油粕主体飼料への飼料添加物が生理障害に与える影響の検討

4-1 緒言

本研究では第3章より、大豆油粕(SBM)を主体とした飼料を給与したマダイでは、肝臓や膵臓外分泌部の組織変性に伴う栄養代謝不良ならびに成長不良が生じ、その要因にはSBMに含まれるアルコール可溶性の大豆抗栄養因子(ANF)が関与している可能性を推察した。その一方で、本研究では同章より、SBMをアルコール洗浄して精製された濃縮大豆タンパク質(SPC)ならびにアルコール洗浄済み大豆油粕(ASBM)を主体とした飼料を給与した試験区において魚粉主体飼料給与時と同等の飼育成績は得られなかった。養殖魚においてはSBM主体飼料給与時に生じる成長不良の改善策として飼料添加物の利用性が検討されており、Goto et al.(2001)およびTakagi et al. (2006)では、SBM主体飼料給与時のマダイで生じる成長阻害はタウリンを添加することで改善されることを報告している。タウリンは魚類の体内でタウロコール酸(C-tau)をはじめとしたタウリン-胆汁酸抱合体を形成するために必要不可欠なアミノ酸の代謝産物であるが、植物には含まれておらず、タウリンの生合成能力が乏しいマダイやブリに植物由来の魚粉代替飼料を給与した場合には不足するタウリンの補填が必要とされている(竹内 2008, 2010)。これらのことから、SBM主体飼料給与時のマダイで生じる成長不良ならびに肝臓における胆汁生成不良に伴う脂質の代謝不良の要因には、飼料中のタウリン含有量も関与している可能性が考えられ、不足するタウリンをSBM主体飼料に補填することで何らかの改善効果が期待される。

淡水魚のニジマスではSBMに含まれるサポニンやイソフラボンなどの抗栄養因子によって肝臓に組織変性が生じ、胆のう中の総胆汁酸量が減少することが報告されている(岩下ら 2007, 2010)。またIwashita et al. (2008)では、SBM主体飼料にタウロコール酸(C-tau)を添加することでニジマスの飼育成績が改善し、総胆汁酸量も増加することを報告している。C-tauは胆汁酸成分の1つであり、肝細胞で産生され、腸管において脂質の消化・吸収に関与することが知られている(三輪・黒川 2002)。海産魚においては、Takagi et al. (2002)より、マダイにSPC主体飼料を長期間給与した場合には、飼育成績の低下とともに胆のう胆汁酸濃度が低下することが報告されており、本研究においても、第2章よりSBM主体飼料を給与したマダイでは肝臓の組織変性に伴う胆汁生成不良に伴い、脂質の消化吸収能力の低下する可能性を推察している。これらのことから、SBM主体飼料にC-tauを添加することでマダイの生理障害に何らかの影響を与える可能性が考えられる。しかしながら、マダイへのC-tau添加試験はMatsunari et al. (2008)がカゼイン飼料を用いて報告している程度であり、先のタウリンにおいてもSBM主体飼料への添加効果を検討した文献は乏しく、その解明につながる組織学的な検討はタウリンそしてC-tauのどちらでも行われていないのが現状である。

そこで本章では、SBM 主体飼料へのタウリンおよび C-tau の添加がマダイの生理障害に及ぼす影響を検討した。

4-2 材料と方法

試験飼料

試験 4-2-1 魚粉代替飼料に添加したタウリンがマダイの栄養生理に及ぼす組織学的検討 各試験区の飼料組成を Table 4-2-1 に示した。魚粉を主体とした対照飼料(FM 区)と魚粉由来のタンパク質 55%を飼料用加熱処理済み大豆油粕(日清丸紅飼料社製)で代替した大豆油粕主体飼料(SBM 区),大豆油粕を原料の5倍量の70%アルコールで2回,90%アルコールで1回洗浄処理した後,風乾を1日行ったものを主体とした飼料(ASBM 区),SBM 区および ASBM 区にそれぞれタウリンを 0.25%添加した飼料(SBM+T, ASBM+T)を作製した。SBM, SBM+T, ASBM および ASBM+T は FM 区に比べて不足するアミノ酸・ビタミンを補足した。飼料の成型および保存は第2章と同様の方法で行った。

試験 4-2-2 大豆油粕主体飼料へのタウロコール酸およびタウリンの添加がマダイの生理障害に及ぼす影響 試験飼料の組成を Table 4-2-2 に示した。魚粉を主体とした対照飼料 (FM 区) と飼料用加熱処理済み SBM (日清丸紅飼料社製) により FM 区の魚粉由来のタンパク質の 84.5%を SBM 由来のタンパク質で代替した大豆油粕飼料 (SBM 区), およびこの大豆油粕飼料に C-tau (シグマ社製) を 0.5%添加した飼料 (SBM+C 区), タウリン (和光純薬社製) を 0.2%添加した飼料 (SBM+T 区), C-tau0.5%, タウリン 0.2%の両方を添加した飼料 (SBM+C+T 区) をそれぞれ作製した。なお, SBM 区, SBM+C 区, SBM+T 区および SBM+C+T 区では FM 区に比べて不足する必須アミノ酸を補足した。

供試魚および飼育条件 供試魚は第2章と同様の方法で飼育したものをを用いた。試験に用いた水槽,水槽への注水量は第2章と同様とし,試験期間中の水温は平均 20.0°Cであった。試験区ごとに2水槽設置し,水槽ごとに試験飼料をそれぞれ10日間与えて予備飼育をした後,続けて6週間与えて本試験を行った。試験飼料は1日2回,1週間に6日間,8:00と16:00に飽食するまで手撒きで与えた。

試験 4-2-1 各水槽には24尾(平均魚体重9.0g)収容して,試験を行った。

試験 4-2-2 各水槽には24尾(平均魚体重13.3g)収容して,試験を行った。

サンプリング方法 試験終了後,各試験区の供試魚は解剖前に48時間絶食させた。その後,各水槽から3個体をランダムに採取し,2-フェノキシエタノール (Sigma-Aldrich 社製)で麻酔し,開腹して肝臓と腸管の後部をそれぞれ摘出した。摘出した臓器は速やかに10%中性緩衝ホルマリン(pH7.4,和光純薬社製)で固定した。試験 4-2-2 ではサンプリング時に臓器とともに胆のうをそれぞれ摘出し,生化学的分析

時まで-80℃で保存した。残った供試魚は、各試験飼料をさらに4日間、飽食量給与し、最終給餌の12時間後に、各試験区の水槽より3個体(計6個体/試験区)ずつ取り上げ、開腹して腸管を摘出し、腸管内容物をサンプルチューブに採取して-80℃で保存した。

胆のうおよび腸管内容物の胆汁酸の分析 試験4-2-2では胆のう胆汁および腸管内容物中の胆汁酸濃度は総胆汁酸-テストワコー(和光純薬社製)を用いて分析した。なお、胆のうの胆汁酸濃度の分析には別途サンプリングを行い、1飼料区につき10個体(各飼料区の比胆のう重量の平均値に近いもの)より開腹して摘出した胆のうを使用した。腸管内容物中の胆汁酸濃度の分析には、腸管内容物を凍結乾燥後、メタノールにて抽出した胆汁酸を使用した。

組織標本の作製方法 ホルマリン固定した臓器は常法に従いエタノール系列で脱水後、パラフィンに包埋し、5μmの切片を作製した。切片はマイヤーのヘマトキシレン・エオシン染色を適宜施し光学顕微鏡で観察した。

肝細胞の核径と細胞質径の計測と解析 肝臓組織では顕微鏡デジタルシステム Moticam2000(島津理化器械社製)を用いて測定した。計測結果は試験区間の平均値の差を比較するため、第2章と同様の方法で各試験区間の有意差検定を行った。有意水準は危険率が5%以下とした。

試験4-2-1 肝細胞の計測は第2章と同じ方法で個体毎に150細胞の核長径と100細胞の細胞質長径を計測した。

試験4-2-2 肝細胞の計測は第2章と同様の方法で個体毎に300細胞の核長径と200細胞の細胞質長径を計測した。

4-3 結果

試験4-3-1 魚粉代替飼料に添加したタウリンがマダイの栄養生理に及ぼす組織学的検討

腸管後部組織像 本試験では、各試験区の粘膜上皮細胞、粘膜固有層および粘膜固有層の基底部分では組織変性は認められず、第2章のFM区と同様の組織像を示した(Figs.4-3-1, 4-3-2)。

肝臓組織像 FM区の肝細胞では、第2章と同様に正常な組織像を示した(Fig. 4-3-3a)。

SBM区の肝細胞では第3章と同様に核濃縮を呈した組織変性が認められ、肝細胞の核長径および細胞質径はともにFM区に比べて有意に小さかった(Fig.4-3-3b, Table 4-3-1)。

SBM+T区では、肝細胞の細胞質はエオシンに明るく染色されたが、肝細胞の細胞質は大きさに均一性がなく、索状構造に乱れが生じていた(Fig.4-3-3c)。肝細胞の核はヘマトキシレンに明るく染色されたが、一部の肝細胞で核萎縮が認められた。肝細胞の核

長径は SBM 区との間に有意差はみられなかったが、細胞質径は SBM 区に比べて有意に大きく、FM 区との間にも有意差はなかった(Table.4-3-1)。

ASBM 区では、第 3 章と同様に核と細胞質は各染色液に明るく染色されたが、組織全体では細胞質の大きさに均一性がなく索状構造に乱れが生じていた(Fig.4-3-3d)。肝細胞の核は仁が明瞭に確認できた。また、肝細胞の核長径ならびに細胞質径は SBM 区との間に有意差はないものの、数値の上では大きく、FM 区との間にも有意差はなかった(Table.4-3-1)。

ASBM+T 区では、肝細胞の核と細胞質は各染色液に明るく染色され、肝細胞の細胞質は大きさに均一性はないものの、索状構造の乱れは生じていなかった(Fig.4-3-3e)。肝細胞の核は、肝細胞の一部で核萎縮が認められるものの、組織全体では核の仁は明瞭に確認できた。また、肝細胞の核長径は FM 区との間に有意差はなく、細胞質径は ASBM 区との間に有意差はないものの数値の上では大きく、FM 区との間にも有意差はなかった(Table.4-3-1)。

膵臓外分泌部組織 FM 区の腺細胞では、第 2 章と同様に正常な組織像を示し、細胞質内にはエオシンに好染するチモーゲン顆粒が認められた(Fig. 4-3-4a)。

SBM 区の腺細胞では第 3 章と同様に腺細胞の細胞質で萎縮が認められ、細胞質内のチモーゲン顆粒は、FM 区に比べてエオシンに暗く染色され、その量も相対的に少なかった(Fig.4-3-4b)。また、膵臓外分泌部の血管は幅が狭く、一部の血管は閉塞していた。

SBM+T 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンにそれぞれ明るく染色され、核の仁も明瞭であった(Fig.4-3-4c)。腺細胞の細胞質は痩せて幅が狭く、腺細胞間には空隙が生じていたものの、細胞質の丈は高く、SBM 区のような萎縮は認められなかった。また、膵臓外分泌部の血管では、SBM 区のような血管の閉塞は認められなかった。細胞質内のチモーゲン顆粒はエオシンに明るく染色され、その量も SBM 区に比べて相対的に多かった。

ASBM 区では、第 3 章と同様に腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンにそれぞれ明るく染色され、腺細胞の細胞質は幅が狭いものの丈は高く、核の仁も明瞭に確認できた(Fig.4-3-4d)。また、細胞質内のチモーゲン顆粒はエオシンに明るく染色され、その量も SBM 区に比べて相対的に多かった。

ASBM+T 区では、腺細胞の核と細胞質はヘマトキシレンにそれぞれ明るく染色され、核の仁も明瞭であった(Fig.4-3-4e)。腺細胞の細胞質は ASBM 区と同様に幅が狭いものの丈は高かった。細胞質内のチモーゲン顆粒は ASBM 区と同様にエオシンに明るく染色された。

試験 4-3-2 大豆油粕主体飼料へのタウロコール酸およびタウリンの添加がマダいの生理障害に及ぼす影響

胆のう胆汁の胆汁酸濃度 比胆のう重値では SBM 区は FM 区との間に有意な差はみられず、タウリンを添加した SBM+T 区との間でもそれぞれ有意差は認められなかった

(Table 4-3-2)。一方、C-tau を添加した SBM+C 区および SBM+C+T 区では比胆のう重値は SBM 区に比べて高く、FM 区と比べても有意に高い値を示した。胆のう胆汁酸濃度では SBM 区と FM 区との間に有意差はみられず、他の試験区との間にも有意差は認められなかった。

腸管内容物中の胆汁酸濃度 腸管内容物中の胆汁酸濃度は SBM 区が最も低く、次いで SBM+T 区が FM 区に比べて低い値を示した (Table 4-3-2)。一方、C-tau を添加した SBM+C 区および SBM+C+T 区の胆汁酸濃度は FM 区よりも高い値を示し、SBM 区と SBM+C 区の間で有意差が認められた。

腸管後部組織 本試験では、各試験区の粘膜上皮細胞、粘膜固有層および粘膜固有層の基底部分では組織変性は認められず、第 2 章の FM 区と同様の組織像を示した (Figs. 4-3-5, 4-3-6)。

肝臓組織像 SBM 区の肝細胞の核径は FM 区に比べて有意に小さかった (Table 4-3-3)。一方、SBM+T 区では SBM 区に比べて有意に大きく、FM 区との間に有意差はみられなかった。SBM+C 区および SBM+C+T 区の値は FM 区に比べて有意に小さく、SBM 区との間に有意差はなかった。細胞質径は SBM 区で FM 区に比べて有意に小さく、SBM+C 区、SBM+T 区および SBM+C+T 区は SBM 区に比べて有意に大きく、FM 区との間に有意差は認められなかった。

FM 区の肝細胞では、全 6 個体中 4 個体で第 2 章と同様に正常な組織像を示した (Fig. 4-3-7a)。一方、残り 2 個体は、肝細胞の核は不定形でヘマトキシリンに暗く染色され、細胞質はエオシンに暗く染色または濃染しており、細胞質の小型化に伴い一部の肝臓組織において索状構造の乱れが生じていた (Fig. 4-3-7b)。

SBM 区では、FM 区にみられる正常な組織像は全 6 個体中 2 個体で認められたが (Fig. 4-3-7c)、2 個体において肝細胞の核は濃染し、細胞質の大きさは不均一で索状構造に乱れを生じていた (Fig. 4-3-7d)。残り 2 個体では第 3 章と同様に核濃縮を呈した組織変性が認められ、肝細胞の核長径および細胞質径はともに FM 区に比べて有意に小さかった (Fig. 4-3-7e, Table 4-3-1)。

SBM+C 区では、SBM 区でみられる重度な組織変性像は認められず、全 6 個体中 5 個体で肝細胞の核が濃染し、細胞質の小型化に伴う索状構造の乱れがみられたが (Fig. 4-3-7g)、残り 1 個体は FM 区 (Fig. 4-3-7a) とほぼ同様の正常な組織像を示した (Fig. 4-3-7f)。

SBM+T 区では、SBM+C 区と同様に重度な組織変性像は認められず、全 6 個体中 3 個体で肝細胞の核の濃染、細胞質の小型化に伴う索状構造の乱れが生じていたが (Fig. 4-3-7i)、残り 3 個体は正常な組織像を示した (Fig. 4-3-7h)。

SBM+C+T 区は、SBM+C 区および SBM+T 区と同様に重度な組織変性は認められず、全 6 個体中 3 個体で肝細胞の核が濃染し、細胞質の小型化に伴う索状構造の乱れが生じていたが (Fig. 4-3-7k)、残り 3 個体は正常な組織像を示した (Fig. 4-3-7j)。

膵臓外分泌部 FM 区の腺細胞では、全 6 個体中 3 個体で第 2 章と同様に正常な組織像を示し、細胞質内にはエオシンに好染するチモーゲン顆粒が認められた(Fig. 4-3-8a)。一方、残り 3 個体は、腺細胞の核および細胞質はヘマトキシリンに暗く染色され、円柱立方上皮細胞の丈は正常な組織像に比べて低く、細胞質の小型化に伴い腺細胞間に空隙が生じていた (Fig. 4-3-8b)。また、細胞質内に認められるチモーゲン顆粒は正常な組織に比べて相対的に少なかった。

SBM 区では、FM 区で見られるような正常な組織像は認められず、全 6 個体中 3 個体では腺細胞は核および細胞質ともにヘマトキシリンに暗く染色され、円柱立方上皮細胞の丈は FM 区 (Fig.4-3-8a) に比べて低く、細胞質の小型化に伴い腺細胞間には空隙が認められた (Fig. 4-3-8c)。残り 3 個体では腺細胞の核および細胞質はヘマトキシリンに濃染し、細胞質の小型化に伴い腺細胞間には空隙が生じ、腺細胞の配列が著しく乱れた重度の組織変性像を示した (Fig. 4-3-8d)。また、腺細胞内にみられるチモーゲン顆粒は FM 区 (Fig. 4-3-8b) と比べて相対的に少なく、膵臓外分泌部の血管では赤血球の数が正常な組織像に比べて相対的に少なかった。

SBM+C 区では、SBM 区で見られる重度な組織変性像は全 6 個体中 2 個体で認められた (Fig. 4-3-8f)。一方、残り 4 個体は腺細胞の核と細胞質はヘマトキシリンに暗く染色され、腺細胞間には空隙が生じているものの SBM 区 (Fig. 4-3-8d) に比べてその空隙は狭く、腺細胞の配列に大きな乱れはみられなかった (Fig. 4-3-8e)。また腺細胞の細胞質内には SBM 区 (Fig. 4-3-8d) に比べてチモーゲン顆粒が多く認められ、血管内には多数の赤血球が確認された。

SBM+T 区では、重度な組織変性像は 1 個体のみで (Fig. 4-3-8h)、残り 5 個体は、SBM+C 区 (Fig. 4-3-8e) と同様に腺細胞間の空隙は狭く、腺細胞の配列に大きな乱れは認められなかった (Fig. 4-3-8g)。

SBM+C+T 区では、SBM 区で見られる重度な組織変性像は認められず、全 6 個体で SBM+C 区 (Fig. 4-3-8e) や SBM+T 区 (Fig. 4-3-8g) と同様に腺細胞間の空隙は狭く、腺細胞の配列に大きな乱れは認められなかった (Fig. 4-3-8i)。

4-4 考 察

本研究では第 2 章と同様に、各試験において SBM 主体飼料を給与時のマダイは FM 主体飼料給与時に比べて飼育成績が劣り、肝臓および膵臓外分泌部組織で萎縮変性が生じることを確認した(Tables4-4-1, 4-4-2)。また、SBM をアルコール洗浄した ASBM 飼料では第 3 章と同様に、飼育成績の低下ならびに肝臓および膵臓外分泌部での組織変性に改善が認められた(Table4-4-1)。

海産魚のマダイはタウリンの生合成能力が乏しく、SBM をはじめとしたタウリンをほとんど含まない飼料を給与し続けた場合は、タウリン欠乏からなる成長阻害が報告され

ており(竹内・松成 2006, 斎藤 2009, 家戸 2010), それら生理障害には, 不足するタウリンを SBM 主体飼料に補填することが有効であることも報告されている(Goto et al.2001, Takagi et al.2006)。本研究では, 試験 4-3-1 において SBM 主体飼料にタウリン 0.25%を添加することで飼育成績が改善され, 膵臓外分泌部では腺細胞の萎縮の改善ならびにチモーゲン顆粒の増加が認められた(Table4-4-1)。このことから, SBM 主体飼料給与時のマダイで生じる成長不良ならびに生理障害には, タウリンの補てんが有効である可能性が考えられる。一方で, 本研究では同試験の SBM+T 区において一部の肝細胞に核萎縮をはじめとした組織変性が認められ, 試験 4-3-2 の SBM+T 区では, 肝細胞の萎縮変性は改善されたが, 膵臓外分泌部の腺細胞に萎縮変性ならびにチモーゲン顆粒の減少が認められた。竹内(2010)では, 同じ海産魚のブリにおいて SBM および SPC 主体飼料にタウリンを 4.5%添加しても魚粉主体飼料と同等の飼育成績が得られないことを報告されている。このことより, SBM 主体飼料給与時のマダイにタウリンを添加するだけでは生理障害を完全に改善するには不十分である可能性が考えられる。

淡水魚のニジマスでは SBM 飼料給与時に生じる成長阻害および生理障害は, C-tau を添加することで改善されることが報告されている (Iwashita et al. 2008)。一方, SPC 主体飼料を長期間給与したマダイでは胆のう中の総胆汁塩量が減少し, 同じ海産魚のブリでは SBM 主体飼料給与時に脂質の消化吸収率が低下している可能性が報告されている(Takagi et al. 2002, 示野ら 1992)。本研究では, 試験 4-3-2 において SBM 区で胆のう中の胆汁酸濃度の低下は認められなかったものの, 胆汁酸成分である C-tau を添加した SBM+C 区では肝細胞において組織変性の改善が認められ, 胆のう重量比は SBM 区と比べて高い値を示した。硬骨魚類では, 肝細胞で胆汁酸としてコール酸が生成され, 胆のう中ではタウリン抱合型の C-tau として存在し, 腸管において脂質の消化・吸収に関与する事が知られている(小栗 1991)。これらのことから SBM 主体飼料に C-tau を添加することで, マダイで生じる肝臓の組織変性が改善されるとともに腸管における脂質の消化吸収率が向上する可能性が考えられる。加えて, 本研究ではタウリンと C-tau をそれぞれ添加した飼料をマダイに給与することで, 飼育成績ならびに肝臓での組織変性の改善が認められ, 胆のう重量比は SBM+C 区と同様に SBM 区に比べて高い値を示した。また, 膵臓外分泌部では腺細胞の萎縮, チモーゲン顆粒および血管内の赤血球数の減少が改善された。魚類では, 膵臓外分泌部の腺細胞でリパーゼやトリプシン, アミラーゼなどの消化酵素が生成され, それらは腸管での栄養物質の消化吸収に関与する事が知られている (池田 1977, 日比谷 1982, 小栗 1991)。これらのことより, SBM 主体飼料給与時のマダイに C-tau とタウリンをそれぞれ添加することで, 肝膵臓組織の萎縮変性に伴う胆汁および膵液の生成不良が改善されると共に, 腸管での各栄養物質の消化吸収率が向上され, 成長不良が改善される可能性が考えられる。

一方, 本研究では SBM+C 区において飼育成績の改善は認められず, 加えてタウリンを添加した SBM+C+T 区では FM 区と比べて飼料効率が劣り, 膵臓外分泌部では FM

区で見られる正常な組織は認められなかった。淡水魚のニジマスでは SBM 主体飼料給与時に生じる生理障害は SBM に含まれるアルコール可溶性の ANF が要因であり、これらを除去することで生理障害が改善されることが報告されている (Yamamoto et al. 2008, 岩下ら 2010)。事実, Nguyen et al. (2011) はブリの稚魚にアルコール洗浄した SBM 主体飼料を給与することで SBM 主体飼料給与時に生じる成長不良および腸管前部における膵臓酵素活性および胆汁酸含有量の低下が改善され, アルコール抽出物を飼料に再添加することで SBM 主体飼料給与時と同様に生理障害を生じることを報告している。本研究においても, 第 3 章にてアルコール洗浄による改善効果を確認しており, 本章の試験 4-3-2 ではアルコール洗浄を施した ASBM 主体飼料にタウリン 0.25% を添加することで, 飼育成績の改善ならびに肝細胞および膵臓外分泌部において組織変性の改善が認められた。これらのことから, SBM 主体飼料を給与したマダイにおける成長不良および生理障害の改善にはアルコール可溶性の ANF が及ぼす影響の除去ならびに不足するタウリンの補填が重要であるものとする。なお, Biswas et al. (2007) では, マダイにおいて SBM25% 配合の低魚粉飼料を給与すると魚粉主体飼料に比べてタンパク質消化吸収率が劣る要因について, ANF のひとつであるフィチンが関与している可能性を報告している。このため, SBM 主体飼料給与時のマダイで生じる生理障害の改善方法を確立するためには, マダイの生理機能に及ぼす大豆 ANF の影響を別途検討する必要があると考える。

Table 4-2-1 Formulation of the experimental diets

	FM	SBM	SBM+T	ASBM	ASBM+T
<i>Ingredient (% wet weight basis)</i>					
White fish meal	44.50	5.00	5.00	5.00	5.00
Defatted soybean meal	5.00	66.20	66.20	-	-
Alcohol washed SBM	-	-	-	62.00	62.00
Taurine	-	-	0.25	-	0.25
Wheat flour	15.00	5.00	5.00	5.00	5.00
α -Starch	9.55	6.25	6.25	6.25	6.25
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·H ₂ O	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Fish visceral oil	9.40	10.00	10.00	11.00	11.00
Vitamin mix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix ²	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Choline chloride	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Vitamin E (purity: 50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Ascorbic acid calcium	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Cellulose	10.60	0.60	0.35	3.80	3.55
Feeding stimulant ³	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
EAA mix ⁴	-	1.00	1.00	1.00	1.00

¹Vitamin mixture ingredient (mg/100g): Vitamin B1 1.8 g, Vitamin B2 3.0 g, Vitamin B6 1.2g, Vitamin B12 3.0 mg, Niacin 12.0g, Ca-pantotenate 3.0 mg, Inositol 60.0g, Biotine 180.0mg, Folic acid 450 mg, p-Aminobenzoic acid 1.5g, Vitamin K3 1.5g, Vitamin A 1200,000 IU, Vitamin D3 1200,000 IU.

²Mineral mixture ingredients (g/100g): NaCl 4.0 g, MgSO₄·7H₂O 60.0 g, Fe-citrate 10.0 g, Ca-lactate 14.0 g, Trace element mixture 4.0 g, Cellulose 8.0 g. Trace element mixture ingredients (mg/100mg): ZnSO₄·7H₂O 35.3mg, MnSO₄·4H₂O 16.2mg, CuSO₄·5H₂O 3.1mg, KIO₃ 0.3mg, CoCl₂·6H₂O 0.1mg, Cellulose 45.0 mg.

³Proline, 354; Alanine, 232; Inosine 5'-monophosphate, 414 (mg/g).

⁴EAA mixture ingredients (g/100g): Lysine HCL 31.5g, Methionine 42g, Phenylalanine 6.5 g, Valine 5.8g, Cellulose 14.2g.

Table 4-2-2 Formulation and proximate composition of the experimental diets for red sea bream (%)

	FM	SBM	SBM+C	SBM+T	SBM+C+T
Ingredient (wet weight basis)					
White fish meal	45.00	7.00	7.00	7.00	7.00
Defatted soybean meal	6.00	63.20	63.20	63.20	63.20
Cholytaurine	-	-	0.50	-	0.50
Taurine	-	-	-	0.20	0.20
Wheat flour	12.00	5.00	5.00	5.00	5.00
α -Starch	11.00	6.25	6.25	6.25	6.25
$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.00	2.00	2.00	2.00	2.00
Fish oil	8.60	10.00	10.00	10.00	10.00
Vitamin mix ¹	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Choline chloride	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
Vitamin E (purity 50%)	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
Ascorbic acid calcium	0.20	0.20	0.20	0.20	0.20
Mineral mix ²	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Cellulose	10.95	1.10	0.60	0.90	0.40
Feeding stimulant ³	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
EAA mix ⁴	-	1.00	1.00	1.00	1.00
Yttrium oxide (purity 10%)	0.50	0.50	0.50	0.50	0.50
Proximate composition (dry matter basis)					
Crude protein (%)	41.7	40.6	40.9	40.4	40.0
Crude fat (%)	11.6	11.0	11.4	11.0	11.7

¹Vitamin mixture containing vitamin B₁ 1.8 g, vitamin B₂ 3.0 g, vitamin B₆ 1.2 g, vitamin B₁₂ 3.0 mg, niacin 12.0 g, Ca-pantotenate 3.0 mg, inositol 60.0 g, biotine 180.0 mg, folic acid 450 mg, *p*-aminobenzoic acid 1.5 g, vitamin K₃ 1.5 g, vitamin A 1200,000 IU, vitamin D₃ 1200,000 IU/100 g premix.

²Mineral mixture containing NaCl 4.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 60.0 g, Fe-citrate 10.0 g, Ca-lactate 14.0 g, trace element mixture 4.0 g, cellulose 8.0 g. Trace element mixture (mg/100 mg): ZnSO₄ · 7H₂O 35.3 mg, MnSO₄ · 4H₂O 16.2 mg, CuSO₄ · 5H₂O 3.1 mg, KIO₃ 0.3 mg, CoCl₂ · 6H₂O 0.1 mg, cellulose 45.0 mg/100 g premix.

³Feeding stimulant: proline, 354; alanine, 232; inosine 5'-monophosphate, 414 (mg/g premix).

⁴EAA mixture: lysine HCL 31.5 g, methionine 42 g, phenylalanine 6.5 g, valine 5.8 g, cellulose 14.2 g/100 g premix.

Table 4-3-1 Nuclear and cytoplasmic size of hepatocytes of red sea bream fed the experimental diets

	FM	SBM	SBM+T	ASBM	ASBM+T	<i>P</i>
Nucleus (μm) ¹	3.93 ^{a3}	3.65 ^{bc}	3.57 ^b	3.84 ^{ac}	3.77 ^{abc}	<0.001
Cytoplasm (μm) ²	15.74 ^a	13.44 ^b	15.56 ^a	14.75 ^{ab}	15.04 ^{ab}	<0.001

¹Values are mean \pm SD (n=6, mean of 150 cells).

²Values are mean \pm SD (n=6, mean of 100 cells).

³Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$)

Table 4-3-2 Bile acid concentration of gallbladder bile and intestinal digesta of red sea bream fed the experimental diets

	FM	SBM	SBM+C	SBM+T	SBM+C+T	<i>P</i>
<i>Gallbladder</i>						
GBSI (%) ^{1,4}	0.19±0.0 ^a	0.24±0.0 ^{ab}	0.43±0.1 ^c	0.18±0.0 ^a	0.32±0.0 ^b	0.017
Bile acid concentration (mm) ^{2,4}	290.6±37.2	276.1±45.8	277.1±44.6	290.1±32.3	287.1±21.5	0.834
<i>Intestinal digesta</i>						
Bile acid concentration (μmol/g) ^{3,4}	97.9±26.4 ^{ab}	74.3±10.0 ^a	119.5±33.0 ^b	81.0±30.1 ^{ab}	111.6±26.7 ^{ab}	0.030

¹Gallbladder-somatic index (GBSI) expressed as 100 × gallbladder wt./fish wt. Values are means ± SD (*n*=6).

²Values are means ± SD (*n*=10).

³Values are means ± SD (*n*=6).

⁴Values with the same superscript within the same row are not significantly different (*P*>0.05).

Table 4-3-3 Hepatosomatic index and nuclear and cytoplasm size of hepatocytes of red sea bream fed the experimental diets

	FM	SBM	SBM+C	SBM+T	SBM+C+T	<i>P</i>
HSI (%) ^{1,3}	1.36±0.2	1.41±0.1	1.30±0.2	1.12±0.0	1.33±0.1	0.874
Nucleus (μm) ^{2,3}	3.83±0.1 ^a	3.58±0.1 ^b	3.47±0.1 ^b	3.91±0.1 ^a	3.61±0.1 ^b	<0.001
Cytoplasm (μm) ^{2,3}	15.25±0.8 ^a	13.08±1.6 ^b	15.21±0.6 ^a	15.08±0.7 ^a	15.03±1.2 ^a	0.005

¹Hepatosomatic index (HSI) expressed as $100 \times \text{liver wt./fish wt.}$ Values are means \pm SD ($n=6$).

²Means \pm SD ($n=6$), mean of 300 cells for nucleus and mean of 200 cells for cytoplasm.

³Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

Table 4-4-1 Growth performance of red sea bream fed the experimental diets

	FM ^{1,2}	SBM ^{1,2}	SBM+T ¹	ASBM ^{1,2}	ASBM+T ^{1,2}
Initial BW (g)	9.1	9.1	9.1	9.1	9.1
Final BW (g)	23.4 ^a	16.8 ^b	22.4 ^a	18.7 ^b	23.7 ^a
Weight gain (%)	92.8 ^a	68.2 ^b	77.7 ^c	82.9 ^d	86.9 ^{ad}
Feed efficiency (%)	157.9 ^a	84.7 ^b	146.6 ^a	105.6 ^b	160.4 ^a

¹Values are means ($n=2$).

²Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

Table 4-4-2 Growth performance of red sea bream fed the experimental diets

	FM ¹	SBM ¹	SBM+C ¹	SBM+T ¹	SBM+C+T ¹
Initial BW (g)	13.3	13.3	13.3	13.3	13.2
Final BW (g)	54.3 ^a	41.9 ^b	39.5 ^b	52.9 ^a	53.5 ^a
Weight gain (%)	309.8 ^a	215.0 ^b	196.6 ^b	297.9 ^a	304.0 ^a
Feed efficiency (%)	91.2 ^a	78.3 ^b	77.2 ^b	80.3 ^b	81.6 ^b

¹Values are means \pm SD ($n=2$). Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

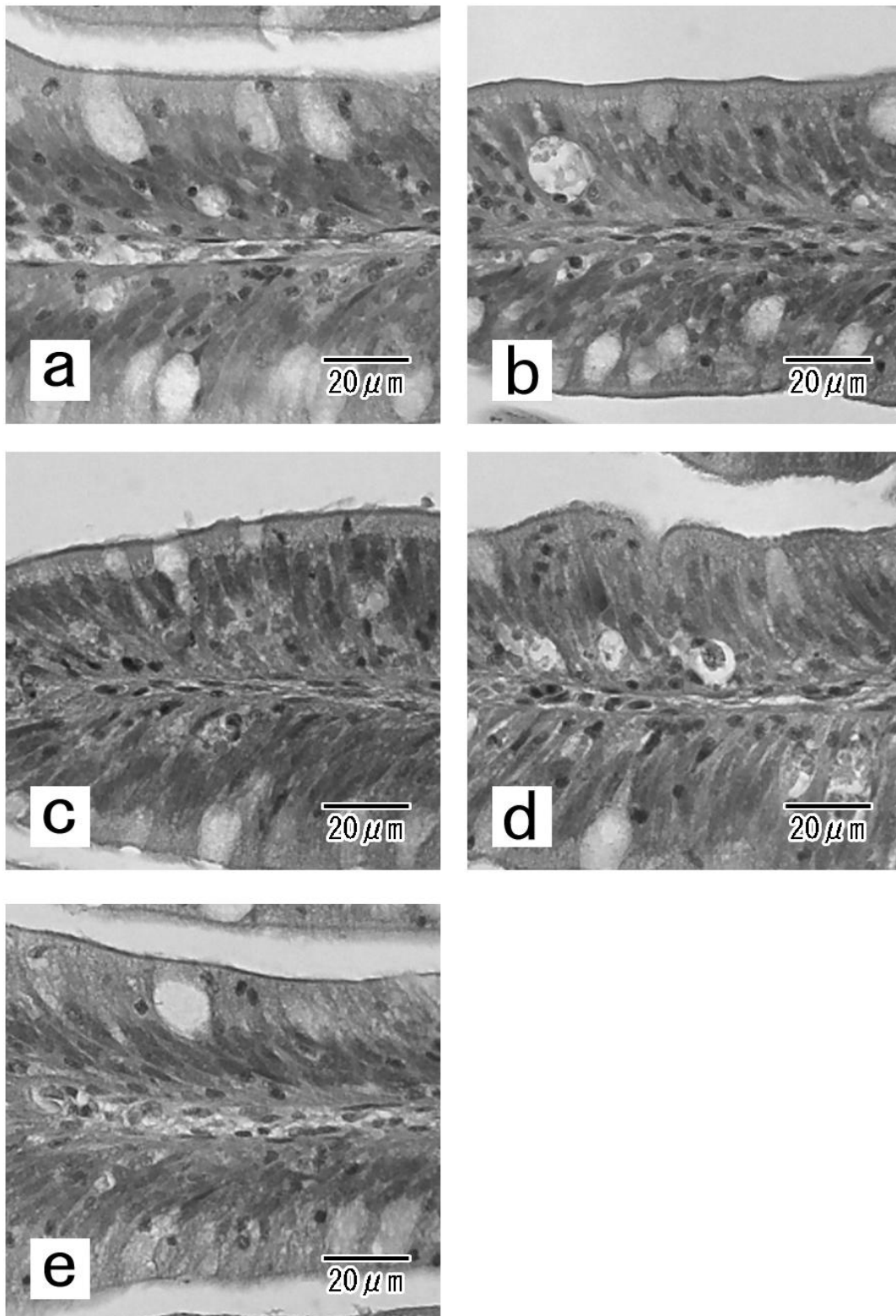


Fig.4-3-1 Histological sections of mucosal folds of the distal intestine of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet SBM+T. d: fish fed diet ASBM. e: fish fed diet ASBM+T.

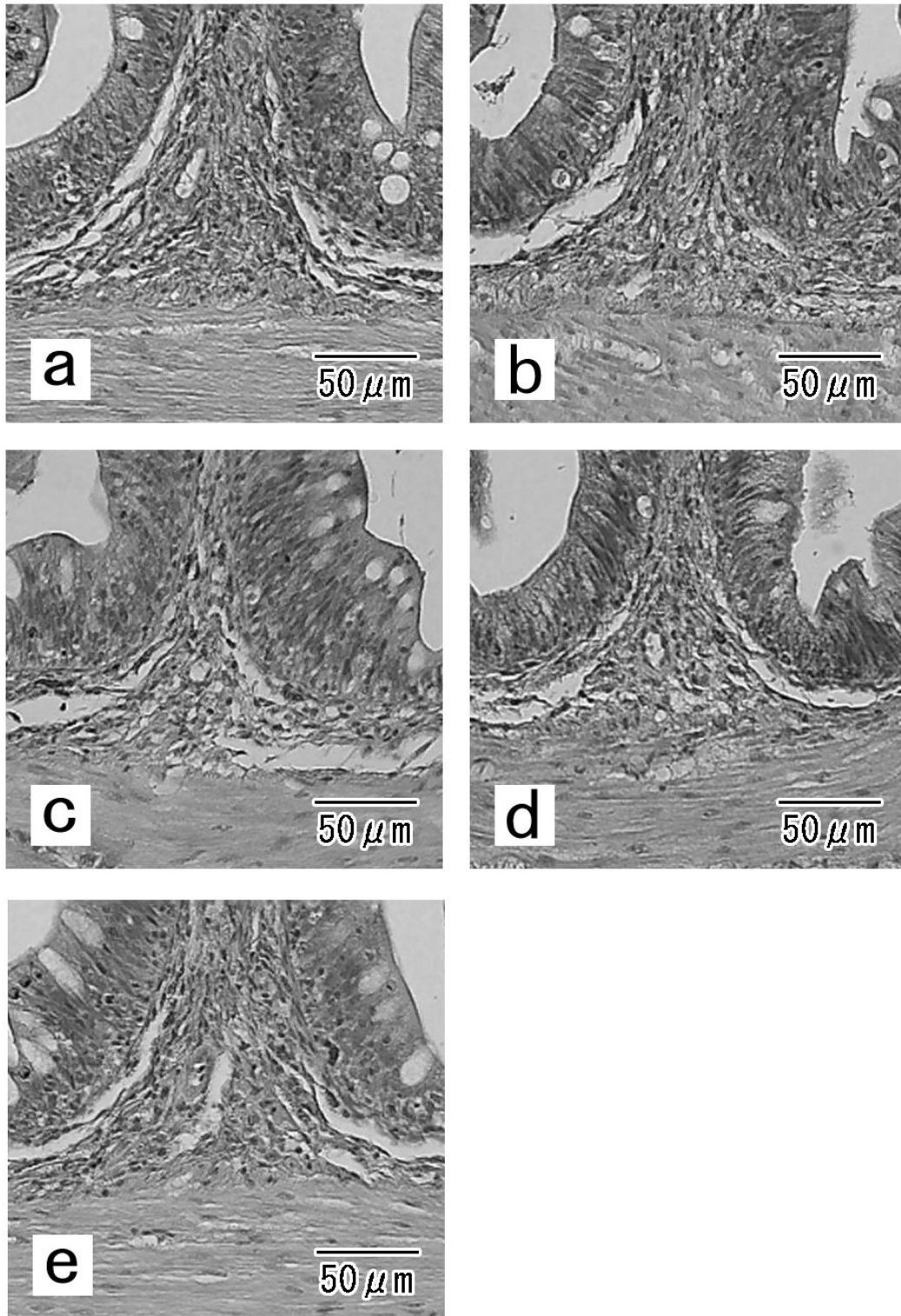


Fig.4-3-2 Histological sections of the lamina propria of submucosa of the distal intestine in red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet SBM+T. d: fish fed diet ASBM e: fish fed diet ASBM+T.

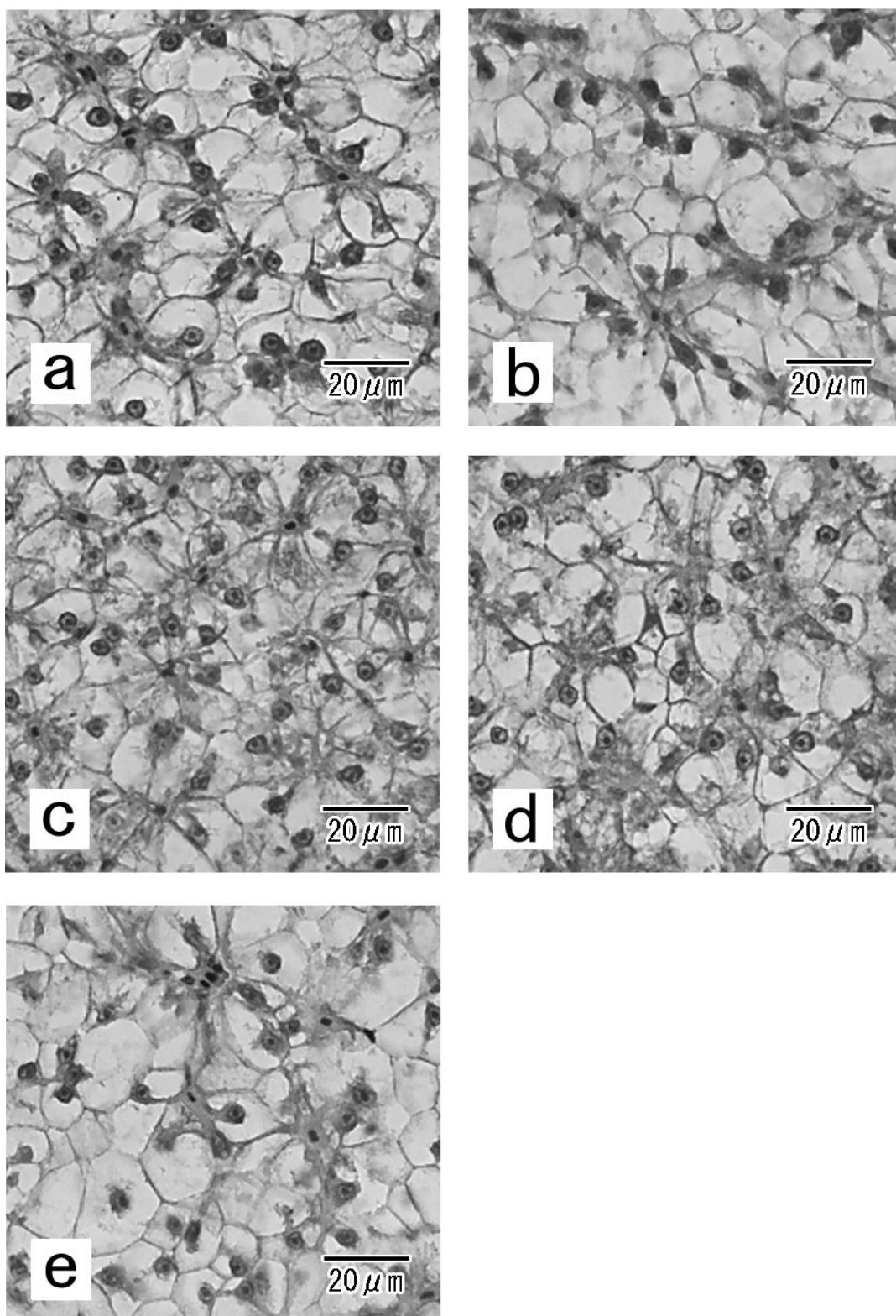


Fig.4-3-3 Histological sections of hepatocytes of the liver of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet SBM+T. d: fish fed diet ASBM. e: fish fed diet ASBM+T.

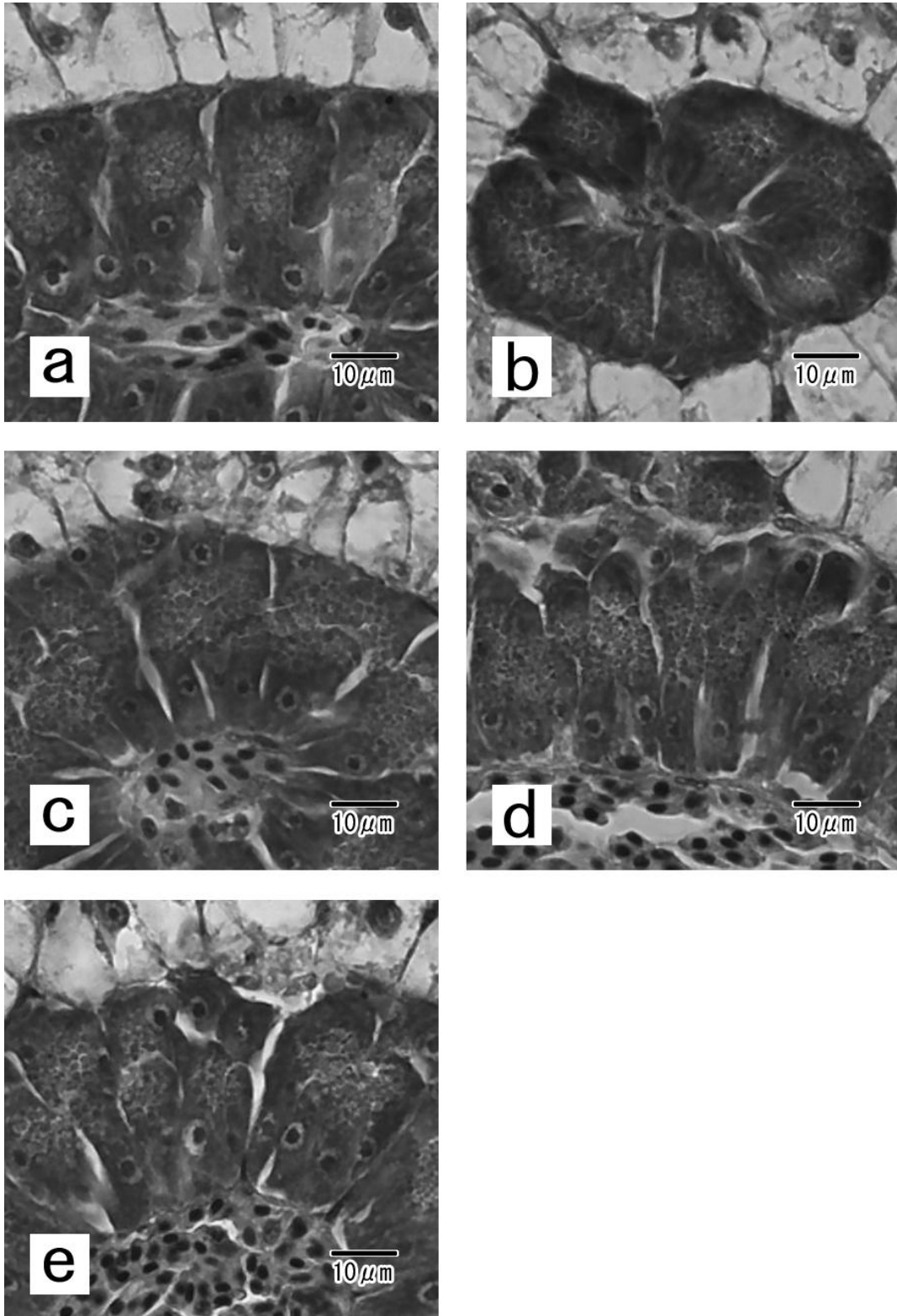


Fig.4-3-4 Histological sections of exocrine portion of the pancreas of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet SBM+T. d: fish fed diet ASBM. e: fish fed diet ASBM+T.

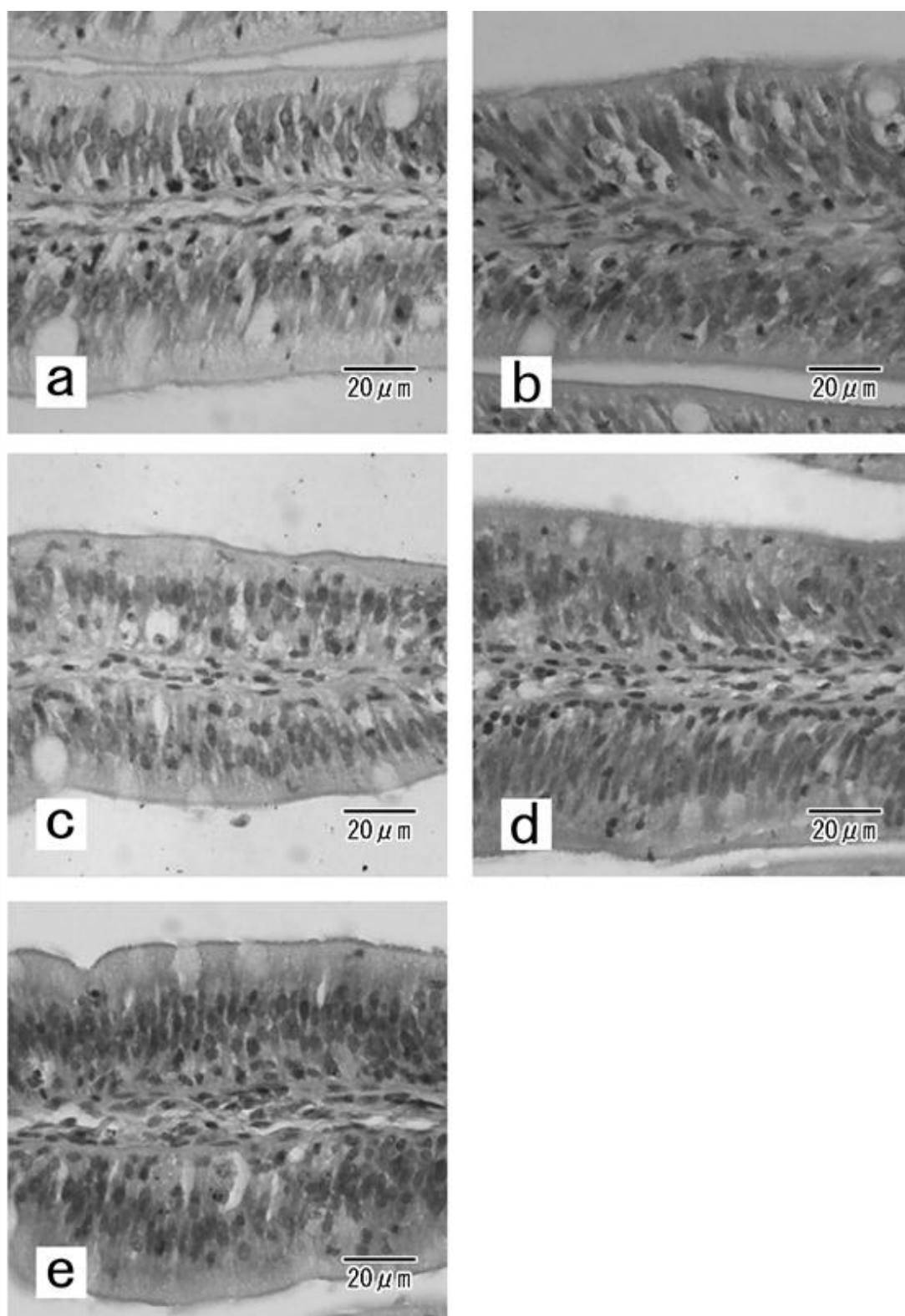


Fig.4-3-5 Histological sections of mucosal folds of the distal intestine of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet SBM+C. d: fish fed diet SBM+T. e: fish fed diet SBM+C+T.

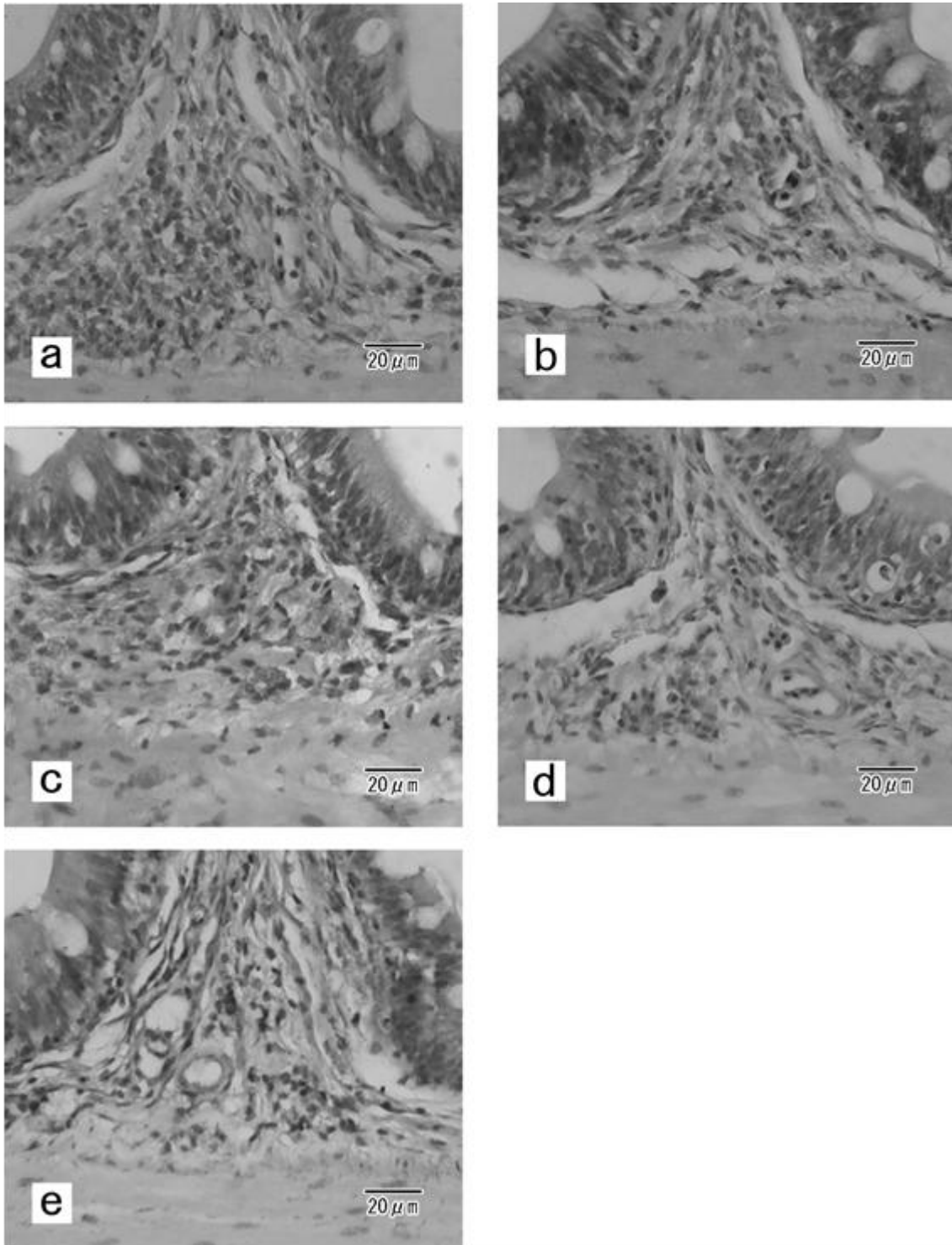


Fig.4-3-6 Histological sections of the lamina propria of submucosa of the distal intestine in red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM b: fish fed diet SBM. c: fish fed diet SBM+C. d: fish fed diet SBM+T. e: fish fed diet SBM+C+T.

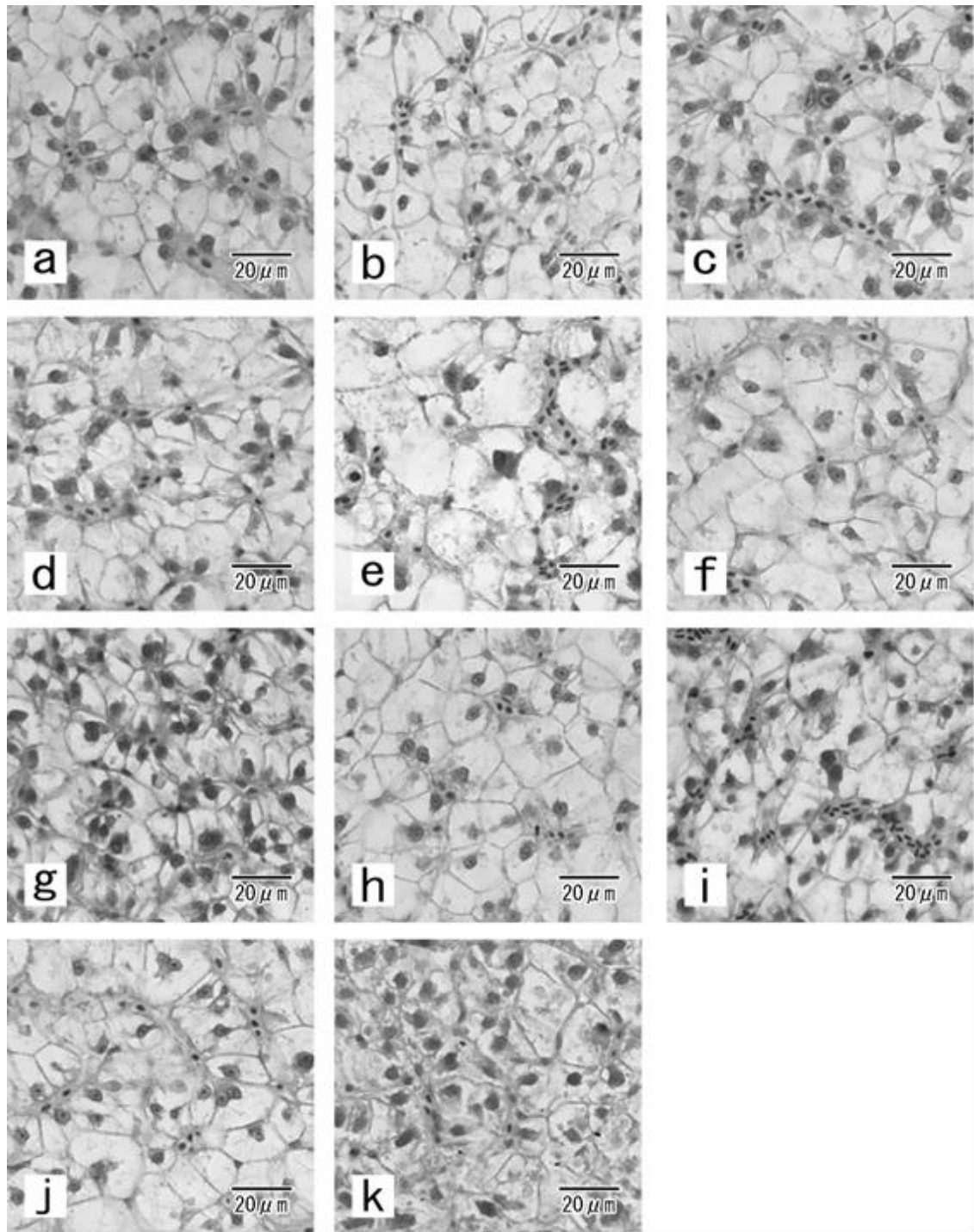


Fig.4-3-7 Histological sections of hepatocytes in the hepatopancreas of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM (normal). b: fish fed diet FM (moderate). c: fish fed diet SBM (normal). d: fish fed diet SBM (moderate). e: fish fed diet SBM (abnormal). f: fish fed diet SBM+C (normal). g: fish fed diet SBM+C (moderate). h: fish fed diet SBM+T (normal). i: fish fed diet SBM+T (moderate). j: fish fed diet SBM+C+T (normal). k: fish fed diet SBM+C+T (moderate).

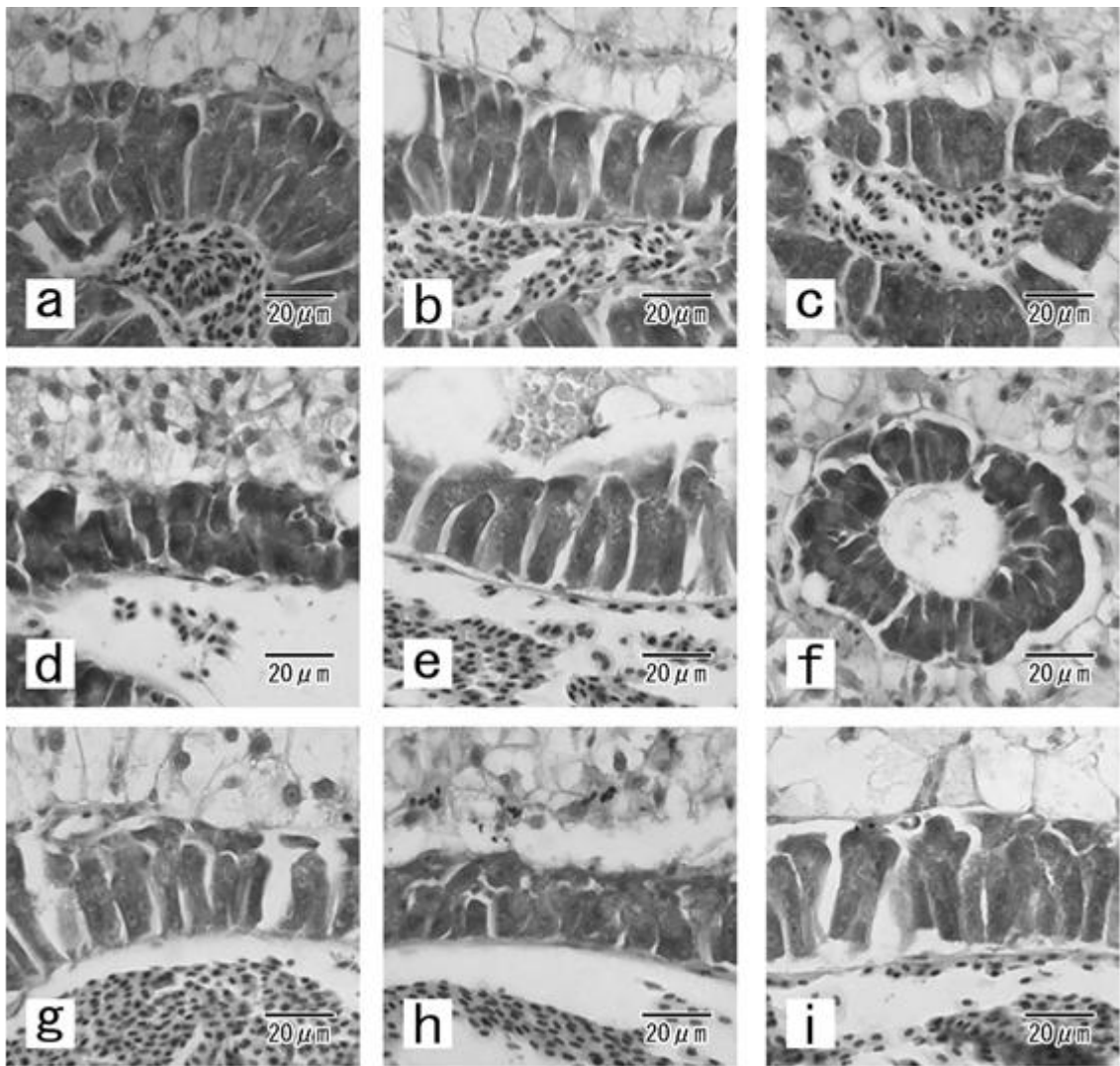


Fig.4-3-8 Histological sections of exocrine portion in the pancreas of red sea bream fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM (normal). b: fish fed diet FM (moderate). c: fish fed diet SBM (moderate). d: fish fed diet SBM (abnormal). e: fish fed diet SBM+C (moderate). f: fish fed diet SBM+C (abnormal). g: fish fed diet SBM+T (moderate). h: fish fed diet SBM+T (abnormal). i: fish fed diet SBM+C+T (moderate).

第5章 大豆油粕主体飼料が養殖対象魚類数種の生理障害に及ぼす影響の検討

5-1 緒言

大豆油粕(SBM)を主体とした魚粉代替飼料をニジマスに給与すると脂質の消化吸収率や胆汁の代謝不良を示唆する肝臓や腸管後部での組織変性が生じることが報告されており(Ostaszewska et al. 2005, 岩下ら 2007), それら生理障害の要因にはSBMに含まれるアルコール可溶性の抗栄養因子(ANF)が大きく関与している可能性が報告されている(Yamamoto et al. 2008, 岩下ら 2010)。本研究では第2章より, SBM主体飼料給与時のマダイにおいて肝臓および膵臓外分泌部で組織変性が生じることを確認し, ついで第3章よりこれら主要臓器の組織変性の要因にはニジマスと同様にアルコール可溶性のANFが大きく関与しているものと推察した。一方, SBM主体飼料が養殖魚の生理障害に及ぼす影響の検討は, Yamamoto et al (2013)においてSBM主体飼料を給与したアマゴで飼育成績が低下することが報告されており, 示野ら(1992)では, 海産魚のブリにおいてSBM主体飼料給与時に生じる成長不良は, 脂質の消化吸収率の低下が要因である可能性が報告されている。これらのことから, マダイやニジマスだけでなくSBM主体飼料を給与した養殖魚では共通して栄養物質の消化吸収率の低下に伴う生理障害が生じている可能性が考えられる。しかしながら, 養殖魚においてはSBM主体飼料給与時の生理障害の解明につながる栄養代謝に関与する主要臓器における詳細な組織学的な検討はほとんどなされておらず, 淡水魚と海産魚で生じる生理障害における詳細な比較検討もなされていないのが現状である。

そこで, 本章では養殖対象魚におけるSBM主体飼料が栄養代謝に関わる主要臓器組織へ及ぼす影響を組織学的に検討する事を目的とし, SBM主体飼料を給与したニジマス, アマゴならびにブリの肝臓および腸管後部における組織変性について検討した。

5-2 材料と方法

試験飼料 本章では, 3回に分けて飼育試験を行った。各試験の飼料組成ならびに飼料の成型方法は以下のとおりである。

試験 5-2-1 大豆油粕主体飼料を給与した淡水養殖魚ニジマスに及ぼす生理障害の組織学的指標 対照飼料区として魚粉主体飼料区 (FM 区), 市販の加熱処理済み SBM (日清丸紅飼料社製) を主タンパク質源とした大豆油粕主体飼料区 (SBM 区) を用意した (Table. 5-2-1)。全飼料区で飼料中の栄養価を同等とするため必須アミノ酸を各飼料区で適量添加し, 粗タンパクは約 40%, 粗脂肪は約 15% に調整した。

試験 5-2-2 大豆油粕主体飼料を給与した淡水養殖魚アマゴに及ぼす生理障害の組織学的指標 試験飼料区として魚粉主体飼料区 (FM 区), 市販の加熱処理済み SBM (日

清丸紅飼料社製)を主タンパク質源とした大豆油粕主体飼料区(SBM区)を用意した(Table5-2-2)。全飼料区で飼料中の栄養価を同等とするため必須アミノ酸を各飼料区で適量添加し、粗タンパクは約46.7%、粗脂肪率は約10.0%に調整した。

試験 5-2-3 大豆油粕主体飼料を給与した海産養殖魚ブリに及ぼす生理障害の組織学的指標 試験飼料区として魚粉主体飼料区(FM区)、市販の加熱処理済みSBM(日清丸紅飼料社製)を主タンパク質源とした大豆油粕主体飼料区(SBM区)を用意した(Table5-2-3)。全飼料区で飼料中の栄養価を同等とするため必須アミノ酸を各飼料区で適量添加し、粗タンパクは約50.0%、粗脂肪率は約15.0%に調整した。

供試魚 各試験で用いた供試魚は以下のとおりである。

試験 5-2-1 滋賀県醒井養鱒場で得たニジマス稚魚を養殖研究所玉城庁舎に運送後、十分な流水を施した150ℓの塩化ビニル製水槽に收容し、予備飼育するまでの数ヶ月間5%タラ肝油を添加した市販の鱒用飼料(日本配合飼料社製)を1日2回飽食するまで給与したものを供試魚とした。

試験 5-2-2 (独)水産総合研究センター増養殖研究所にて継代飼育している山梨県アルビノ系と三重県美杉系の交雑種の稚魚を試験開始時まで市販飼料で養成し、試験に先立ち二分し、それぞれにFMおよびSBM主体飼料に約2週間馴致したものを供試魚とした。

試験 5-2-3 高知県沖で採集されたモジャコを高知大学水族栄養学研究室に運送後、十分な流水を施した1000ℓ水槽に收容した。予備飼育するまでの8週間、市販のブリ用飼料を1日1回給与したものを供試魚とした。

飼育条件

試験 5-2-1 1試験区につき60ℓ水槽を2つ設置し、平均体重18gのニジマス稚魚を48尾收容した後、各試験飼料を10週間給与した。飼育水は1分間4ℓの注水を施し、試験期間中の各水槽の水温は平均16.0℃であった。給餌は1週間に6日間、1日に2回、8:00と17:00に飽食するまで手撒きによる飽食給餌を行った。

試験 5-2-2 1飼料区につき150ℓ水槽を3つ設置し、各水槽には平均体重7gの選抜したアマゴ60尾を收容した後、各試験飼料を10週間給与した。飼育水は1分間4ℓの注水を施し、試験中の平均水温は15.4℃であった。給餌は1週間に6日間、1日2回、8:00と17:00に飽食するまで手撒きによる飽食給餌を行った。

試験 5-2-3 1飼料区につき1000ℓFRP製水槽を3つ設置し、各水槽には平均体重188gのブリ幼魚を25尾收容した後、各試験飼料を8週間給与した。試験期間中の各水槽の水温は開始時で23.1℃であり、試験経過と共に水温は低下し、終了時には18.6℃を示した。給餌は1週間に7日間、1日に1回行い、給餌量は魚体重の2%と制限した。**サンプリング方法および組織標本の作製方法** 各試験の供試魚は解剖前に48時間絶食させた後にサンプリングを行い、麻酔して体重を計測した後、肝臓と腸部後部を摘出した。摘出した臓器は速やかに10%中性緩衝ホルマリン(pH 7.4, 和光純薬社製)にて固定した後、常法に従いエタノール系列で脱水後、パラフィンに包埋し、3ないしは5

μm の切片を作製した。そして、その切片をマイヤーのヘマトキシレン・エオシン染色を適宜施して光学顕微鏡で観察した。なお、サンプリングは各水槽からランダムに採取し、その尾数は試験 5-2-1 では各試験区につき 8 個体を、試験 5-2-2 および 5-2-3 では各試験区につき 9 個体を採取した。

肝細胞の核径と細胞質径の計測と解析 各試験では、顕微鏡デジタルシステム Moticam2000（島津理化器械社製）を用いて肝臓組織の核長径と細胞質長径を計測した。核長径および細胞質径の計測にあたっては試験飼料区によっていずれも萎縮などにより形が変形するため核長径は径の一番長い部分を、細胞質径は核を通り径の一番長い部分をそれぞれ径の長さとした。計測結果は試験区間の平均値の差を比較するため有意水準 5% で t 検定を行った。なお、肝細胞の計測数は試験 5-2-1 では個体毎に 100 細胞の核長径と細胞質長径を、試験 5-2-2 では個体毎に 150 細胞の核長径と 100 細胞の細胞質長径を、試験 5-2-3 では個体毎に 300 細胞の核長径と 150 細胞の細胞質長径を計測した。

5-3 結果

試験 5-3-1 大豆油粕主体飼料を給与した淡水養殖魚ニジマスに及ぼす生理障害の組織学的指標

腸管後部組織像 FM 区では粘膜上皮細胞の遊離表面に微絨毛が認められ、微絨毛下には微絨毛が取り込んだ栄養物質である取り込み消化空胞が存在した (fig.5-3-1a)。粘膜上皮細胞は規則正しく配列し、粘膜上皮細胞の核はヘマトキシリンに好染した。粘膜固有層の基底層は、結合繊維からなる緻密層で構成され、緻密層の結合組織にはエオシン顆粒がみられた (Fig.5-3-1c)。

SBM 区では FM 区でみられた粘膜上皮細胞の微絨毛はほとんど認められず、取り込み消化空胞も消失していた。また粘膜上皮細胞内には取り込み消化空胞が識別が不可能な様々な形状をした空胞が不規則に配列していた (Fig5-3-1b)。粘膜固有層の基底層では、緻密層の結合繊維の増生がみられた (Figs.5-3-1d)。

肝臓組織像 FM 区の肝細胞では細胞質はエオシンに好染し、細胞質内は栄養蓄積を示す空胞様構造で占められていた (Fig5-3-2a)。核の形状は球形ないしは楕円形で、ヘマトキシリンに好染して、仁が明瞭に確認できた。肝細胞同士は密に接した状態で索状構造を形成し、索の間隙には赤血球を有する毛細血管が存在していた。

SBM 区では肝細胞の細胞質はエオシンに暗く染色され、肝臓組織全体では細胞質の小型化に伴い肝細胞の索状構造に乱れが生じていた (Fig.5-3-2b)。肝細胞の核は形状が不均一で、ヘマトキシリンに濃染し、核崩壊を起こしている肝細胞が多数認められた。肝細胞の細胞質長径は FM 区に比べて有意に小さかった (Table 5-3-1)。

試験 5-3-2 大豆油粕主体飼料を給与した淡水養殖魚アマゴに及ぼす生理障害の組織学

的指標

腸管後部組織像 FM 区では、粘膜上皮細胞の遊離表面に微絨毛が認められ、絨毛下には微絨毛が取り込んだ栄養物質である取り込み消化空胞が多数みられた (Fig.5-3-3a)。粘膜上皮細胞は規則正しく配列し、粘膜上皮細胞の核はヘマトキシリンに好染した。粘膜固有層の基底部は、結合繊維からなる緻密層で構成され、緻密層の結合組織にはエオシン顆粒がみられた (Fig.5-3-3c)。

SBM 区では粘膜上皮細胞の遊離表面では微絨毛は消失し、核はヘマトキシレンに暗く濃染した。粘膜上皮細胞内には粘液細胞とは別に、取り込み消化空胞か識別が不可能な様々な形状をした空胞が認められ、それにより粘膜上皮細胞の配列は大きく乱れていた (Fig.5-3-3b)。粘膜固有層の基底部では、緻密層の結合繊維の増生がみられた (Fig.5-3-3d)。

肝臓組織像 FM 区の肝細胞では肝細胞の細胞質はエオシンに好染し、細胞質内は栄養蓄積を示す空胞様構造で占められていた (Fig.5-3-4a)。肝細胞の核はヘマトキシレンに暗く染色され、仁が認められた。また、細胞質同士は密に接して、肝臓組織特有の索状構造を形成していた。

SBM 区では、肝細胞の核は萎縮し、ヘマトキシレンに暗く染色され、一部の核では仁が認められなかった。肝細胞の細胞質は萎縮し、エオシンに濃染しており、一部の肝細胞では FM 区でみられた空胞様構造が認められず、索状構造に乱れが生じていた (Fig.5-3-4b)。肝細胞の核長径および細胞質径は FM 区との間に有意差は認められなかった (Table 5-3-2)。

試験 5-3-3 大豆油粕主体飼料を給与した海産養殖魚ブリに及ぼす生理障害の組織学的指標

腸管後部組織 FM 区では粘膜上皮の遊離表面に微絨毛が存在し、絨毛下には微絨毛が取り込んだ栄養物質である取り込み消化空胞が認められた (Fig.5-3-5a)。また、上皮細胞内には顆粒状でエオシンに淡染するタンパク質様物質 (PD) がみられた。粘膜固有層の基底部は、結合繊維からなる緻密層で構成され、緻密層の結合組織にはエオシン顆粒がみられた (Fig.5-3-5c)。

SBM 区ではニジマスやアマゴでみられた微絨毛の消失や粘膜上皮細胞での細胞内消化不良に伴う大型空胞変性、粘膜固有層の基底部における緻密層の結合組織の増生は認められなかった (Fig.5-3-5b, 5-3-5d)。一方で、粘膜上皮細胞内にはエオシンに濃染する大型の PD が多量に滞留蓄積している組織像が認められた。

肝臓組織 FM 区では、肝細胞の核が球の形状を呈し、核はヘマトキシレンに好染し、仁が明瞭に確認できた (Fig.5-3-6a)。肝細胞の細胞質はエオシンに好染し、肝細胞の細胞質内には栄養蓄積を示す楕円や多角の形状を呈した空胞が認められた。肝細胞は互いに接して索状構造を形成していた。

SBM 区では肝細胞に核濃縮を伴った肝細胞の萎縮が認められ、一部の肝細胞では肝

細胞の壊死が認められた(Fig.5-3-6c)。また、肝細胞の細胞質には栄養蓄積を示す空胞がほとんど認められず、肝臓組織全体では細胞質の萎縮に伴い間隙の拡張ならびに索状構造の乱れが生じていた。なお、肝細胞の核長径および細胞質径は FM 区との間に有意差は認められなかった(Table 5-3-3)。

5-4 考察

Ostaszewska et al. (2005)および岩下ら(2007)では、NFM 飼料や SBM 主体飼料を給与したニジマスにて肝臓に組織変性が生じることを報告している。本章においても試験 5-3-1 にて SBM 飼料を給与したニジマスの肝細胞に肝細胞の萎縮をはじめとした組織変性が認められ、試験 5-3-2 では同じ淡水魚のアマゴで同様の組織変性を生じることが確認された。哺乳類では肝硬変をはじめとした肝臓障害が生じることで胆嚢中の主な胆汁塩であるコール酸(C-tau)の割合と肝細胞中の C-tau 生成に関与する 12α -水酸化酵素活性が低下することが知られており(樋口 1976)、ニジマスでは SBM 主体飼料給与時に生じる肝臓の組織変性に伴い、 12α -水酸化酵素活性が低下し、胆嚢中の胆汁塩や C-tau の占める割合が減少する可能性が示唆されている(Yamamoto et al. 2007, 岩下ら 2007)。一方、本研究では第 2 章より、海産魚のマダイに SBM 主体無魚粉飼料を給与した場合には肝細胞で核濃縮をはじめとした重度の組織変性が生じることを確認し、本章の試験 5-3-3 では同じ海産魚のブリで同様の組織変性を生じることが確認された。Takagi et al. (2002)では、SPC 主体飼料を長期間給与したマダイでは胆嚢中の総胆汁塩量が減少することを報告しており、示野ら(1992)では、SBM 主体飼料給与時のブリでみられる飼育成績の低下は、脂質の消化吸収率の低下が要因である可能性を報告している。これらのことから、SBM 主体飼料を給与した各種養殖魚では肝臓の組織変性に伴う胆汁塩および胆汁酸の生成不良によって、腸管での脂質の消化吸収不良が生じる可能性が考えられる。

Ostaszewska et al. (2005)および鈴木・山本(2004)では SBM 主体飼料を給与したニジマスは直腸の粘膜上皮細胞の微絨毛や取り込み消化空胞の消失ならびに大型空胞が細胞中に充満する組織変性が生じることを報告している。本章では試験 5-3-1 にてニジマスの SBM 区で同様の組織変性を確認しており、試験 5-3-2 ではアマゴにおいても同様の組織変性が生じることが確認された。岩下(2010)では、SBM 主体飼料を給与したニジマスの腸管で生じる大型空胞変性の要因には粘膜上皮細胞の微絨毛の消失ならびに細胞小器官の発達不良に伴う消化吸収能力の低下であることを推察している。一方、試験 5-3-3 では海産魚のブリにおいてニジマスやアマゴで認められるような微絨毛の消失を伴う大型空胞変性はみられなかったが、粘膜上皮細胞内において FM 区ではみられない大型のエオシン濃染顆粒が多数確認された。海産魚の稚仔魚の腸管上皮細胞では、上皮細胞内にエオシン好染する物質が認められ、これらは微絨毛の飲作用により取り込

まれた飼料のタンパク質が細胞内消化時に一時的に蓄積されたものと報告されている(渡辺 1984, 鈴木 1993)。また, 上皮細胞内に蓄積されたエオシン好染顆粒はゴルジ体由来のライソゾームにより加水分解され, 最終的に完全に消化されることが知られている(渡辺 1984)。一方, 鈴木・山本(2004)ではニジマスに SBM 主体飼料を給餌すると上皮細胞内のゴルジ体ならびにライソゾームの発達が著しく悪化し, それに伴って大型空胞変性が生じている可能性を報告している。これらのことから, SBM 主体飼料を給与した養殖魚では, 飼料内のタンパク質や脂質をはじめとした栄養物質の細胞内消化の遅延に伴い, 腸管の消化吸収能力が低下する可能性が考えられる。

SBM には魚類の体内の栄養代謝に影響を与えるサポニン, イソフラボンをはじめとした ANF が存在することが確認されており(山本 2009), SBM 主体飼料給与時のニジマスで生じる生理障害は SBM に含まれるアルコール可溶性の ANF が要因であり, これらを除くことで生理障害が改善されることが報告されている(Yamamoto et al. 2008, 岩下ら 2010)。本研究では第 3 章より海産魚のマダイにおいて SBM をアルコール洗浄することで生理障害が改善されることを確認し, ニジマスと同様に SBM に含まれるアルコール可溶性の ANF が生理障害の要因に関与しているものと推察している。また, Nguyen et al. (2011) はブリの稚魚にアルコール洗浄した SBM 主体飼料を給与することで SBM 主体飼料給与時に生じる成長不良および腸管前部における膵臓酵素活性および胆汁酸含有量の低下が改善され, アルコール抽出物を飼料に再添加することで SBM 主体飼料給与時の症状が再現されることを報告している。これらのことから, 養殖魚各種における SBM 主体飼料給与時に報告される成長不良ならびに生理障害の要因には, SBM 由来の ANF が関与している可能性があるものと考えられる。

Table 5-2-1 Composition of the experimental diets for red rainbow trout

	FM	SBM
<i>Ingredient (% wet weight basis)</i>		
White fish meal	48.00	-
Defatted soybean meal	4.40	50.26
Com gluten meal	2.00	17.80
Wheat flour	16.00	10.00
Fish oil	6.79	9.54
Soybean oil	2.86	1.36
α -Starch	6.00	-
Lysine HCL	-	1.67
Methionie	-	0.48
Betaine	-	0.50
Mineral mix ¹	3.00	5.00
Cellulose	9.70	2.14
Constant components ²	1.25	1.25

¹Yamamoto et al.(2007).

²Vitamin mix (Yamamoto et al.2002),0.50; choline chloride,0.25;yttrium oxide(10%),0.50g/100g diet.

Table 5-2-2 Composition of the experimental diets for amago salmon

	FM	SBM
<i>Ingredient (% wet weight basis)</i>		
White fish meal	51.00	5.00
Defatted soybean meal	4.50	52.00
Corn gluten meal	3.00	20.86
Wheat flour	24.00	8.00
Fish oil	3.79	6.69
α -Starch	2.50	-
Vitamin mix ¹	0.50	0.50
Choline chloride	0.25	0.25
Betaine	-	0.50
Mineral mix ¹	3.00	5.00
Cellulose	6.96	0.70
Yttrium oxide	0.50	0.50

¹Yamamoto et al.2002.

Table 5-2-3 Composition of the experimental diets for yellowtail

	FM	SBM
<i>Ingredient (% wet weight basis)</i>		
White fish meal	65.0	34.0
Defatted soybean meal	-	42.0
krill meal	5.0	5.0
Liver oil	8	10.0
α -Starch	10	-
Lysine HCL	-	0.8
Methionie	-	0.5
Cellulose	6.0	1.7
Vitamine	2.0	2.0
Mineral	2.0	2.0
Carboxymethyl cellulose	1.5	1.5
Guar gum	0.5	0.5

Table 5-3-1 Nuclear and cytoplasmic size of hepatocytes of rainbow trout fed the experimental diets

	FM	SBM	<i>P</i>
Nucleus (μm) ^{1,2}	6.2 \pm 0.2	6.1 \pm 0.3	<0.001
Cytoplasm (μm) ^{1,2}	15.0 \pm 0.6 ^a	12.4 \pm 0.5 ^b	<0.001

¹ Values are mean \pm SD (n=8, mean of 100 cells).

²Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

Table 5-3-2 Nuclear and cytoplasmic size of hepatocytes of amago salmon the experimental diets

	FM	SBM	<i>P</i>
Nucleus (μm) ^{1,3}	4.99 \pm 0.1	5.13 \pm 0.4	<0.001
Cytoplasm (μm) ^{2,3}	13.8 \pm 1.2	13.0 \pm 0.4	<0.001

¹ Values are mean \pm SD (n=9, mean of 150 cells).

² Values are mean \pm SD (n=9, mean of 100 cells).

³Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

Table 5-3-3 Nuclear and cytoplasmic size of hepatocytes of yellowtail the experimental diets

	FM	SBM	<i>P</i>
Nucleus (μm) ^{1,3}	3.2 \pm 0.1	3.1 \pm 0.2	<0.001
Cytoplasm (μm) ^{2,3}	9.3 \pm 0.5	8.8 \pm 0.6	<0.001

¹ Values are mean \pm SD (n=9, mean of 300 cells).

² Values are mean \pm SD (n=9, mean of 150 cells).

³Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

Table 5-4-1 Growth performance of rainbow trout fed the experimental diets

	FM ¹	SBM ¹
Initial BW (g)	18.5	18.2
Final BW (g)	80.3 ^a	58.4 ^b
Weight gain (%)	333 ^a	220 ^b
Feed efficiency (%)	102 ^a	83 ^b

¹Values are means ($n=2$). Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

Table 5-4-2 Growth performance of rainbow amago salmon the experimental diets

	FM ¹	SBM ¹
Initial BW (g)	6.96	6.96
Final BW (g)	37.7 ^a	24.5 ^b
Weight gain (%)	442 ^a	252 ^b
Feed efficiency (%)	107 ^a	92 ^b

¹Values are means ($n=2$). Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

Table 5-4-3 Growth performance of rainbow yellowtail the experimental diets

	FM ¹	SBM ¹
Initial BW (g)	188.2	188.3
Final BW (g)	324.1 ^a	283.8 ^b
Weight gain (%)	72 ^a	51 ^b
Feed efficiency (%)	64.7 ^a	48.4 ^b

¹Values are means ($n=2$). Values with the same superscript within the same row are not significantly different ($P>0.05$).

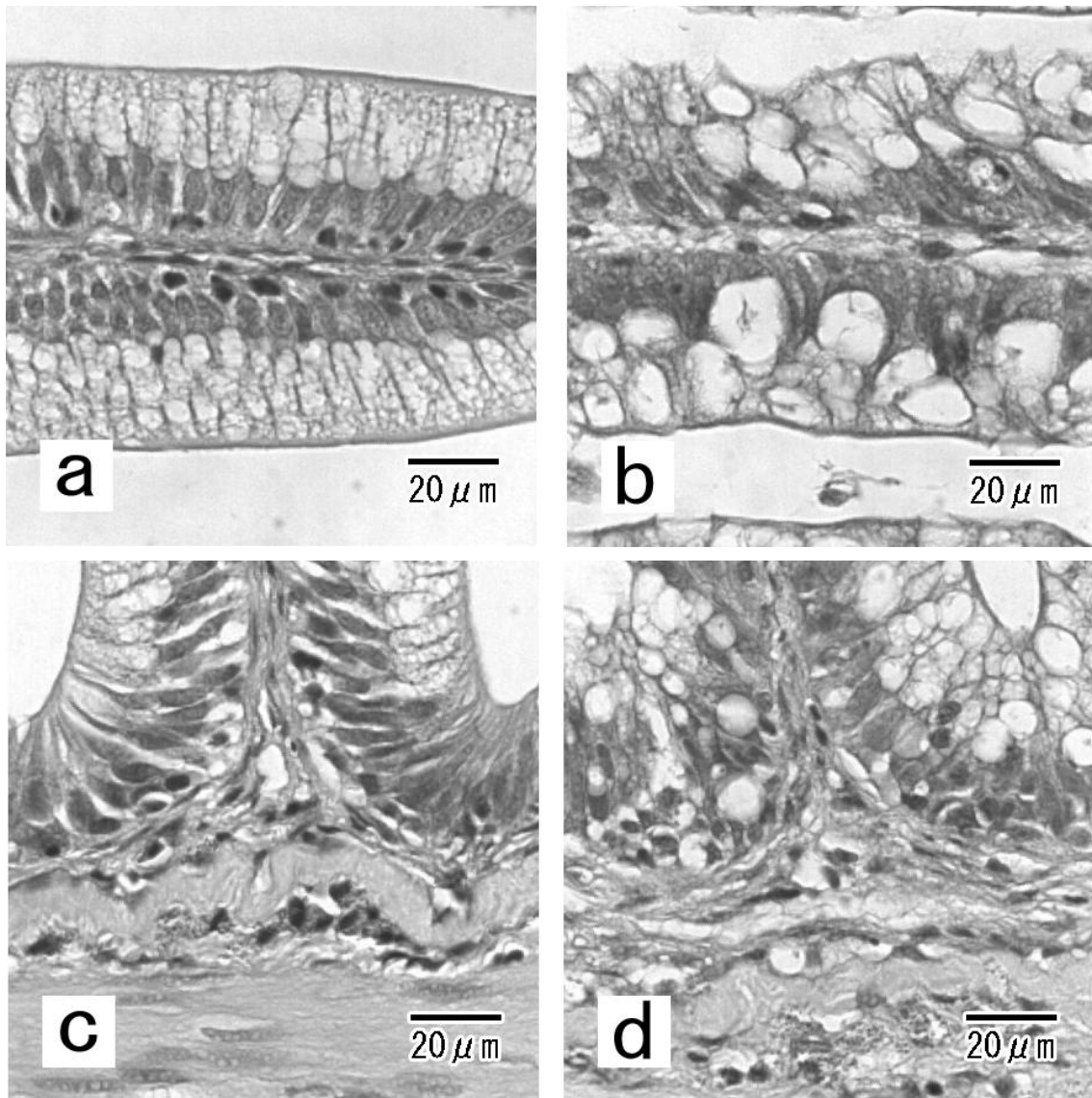


Fig.5-3-1 Histological sections of mucosal folds and the lamina propria of submucosa in the distal intestine of rainbow trout fed the experimental diets (HE-stained). a,c: fish fed diet FM. b,d: fish fed diet SBM.

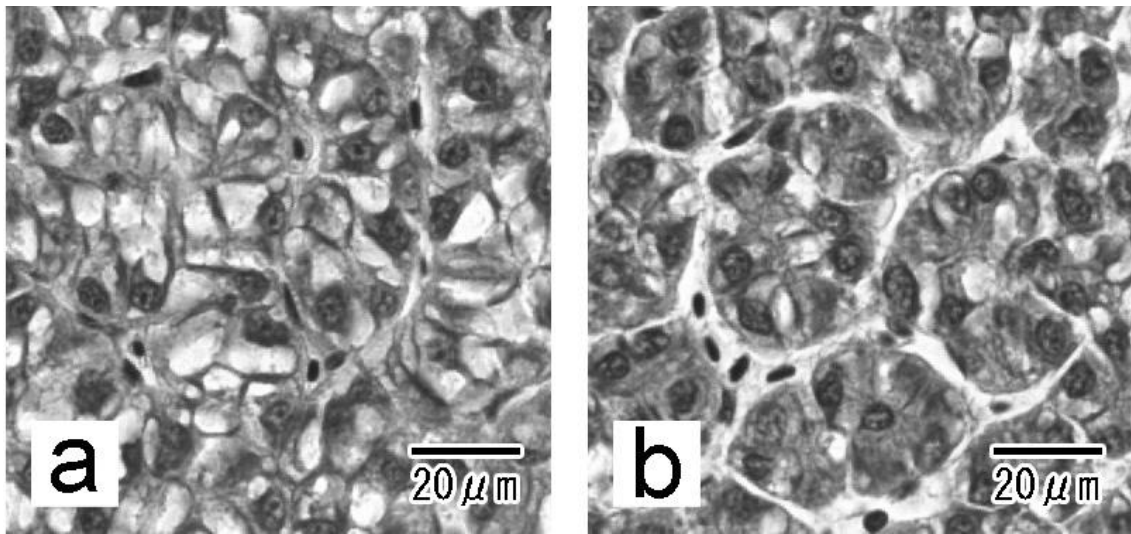


Fig.5-3-2 Histological sections of hepatocytes of the liver of rainbow trout fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM.

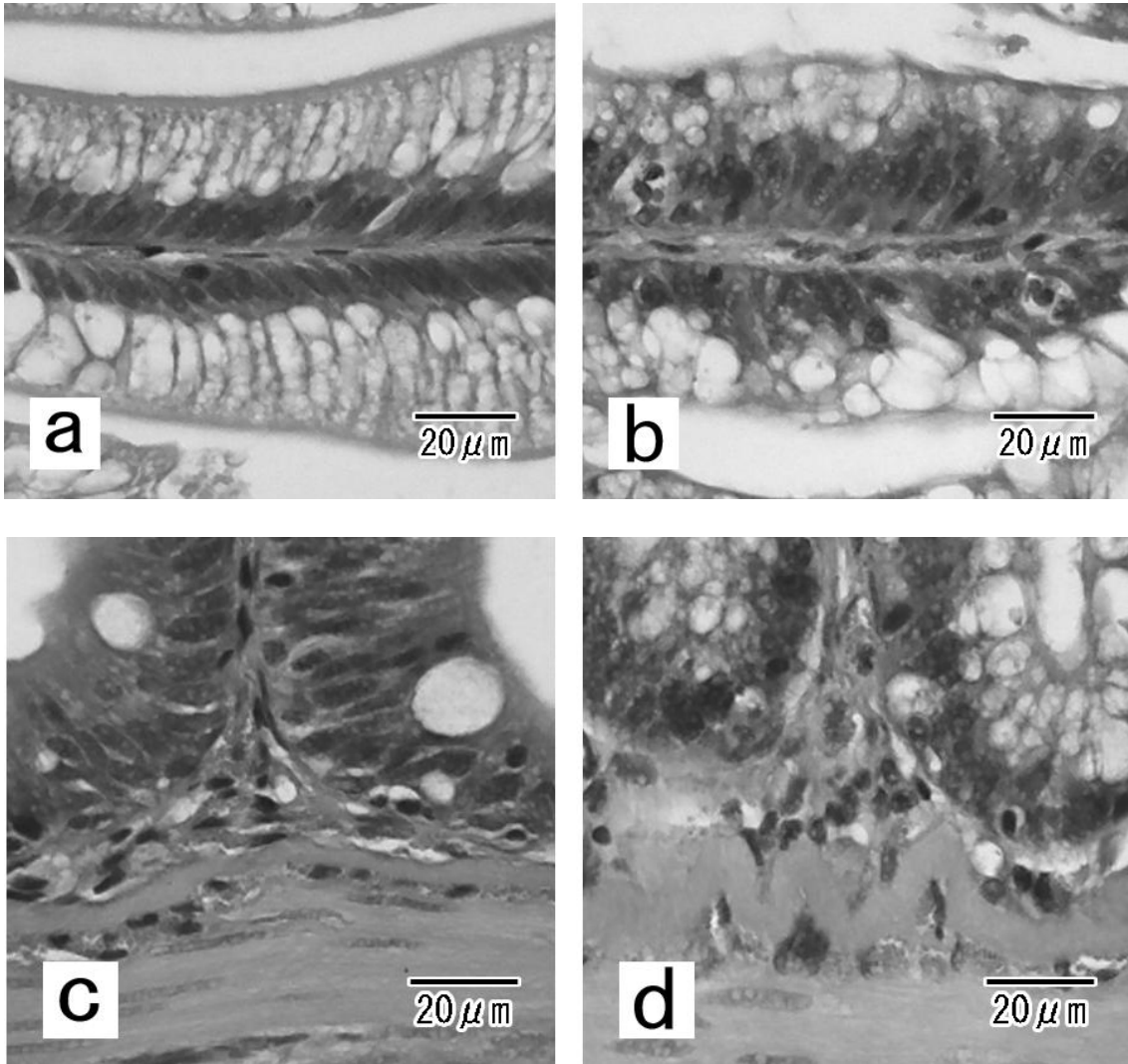


Fig.5-3-3 Histological sections of mucosal folds and the lamina propria of submucoa in the distal intestine of amago salmon fed the experimental diets (HE-stained). a,c: fish fed diet FM. b,d: fish fed diet SBM.

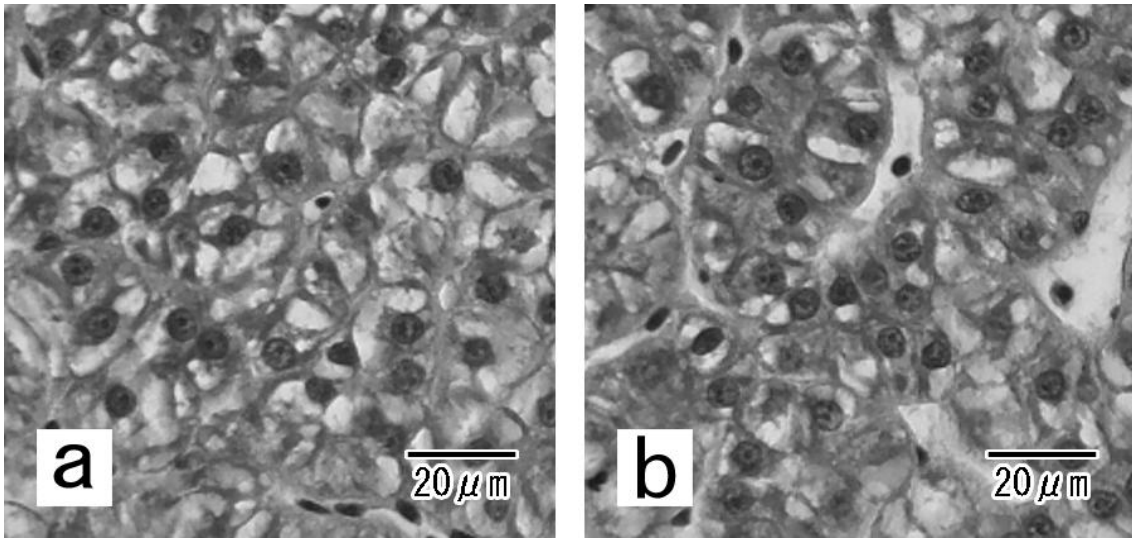


Fig.5-3-4 Histological sections of hepatocytes of the liver of amago salmon fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM.

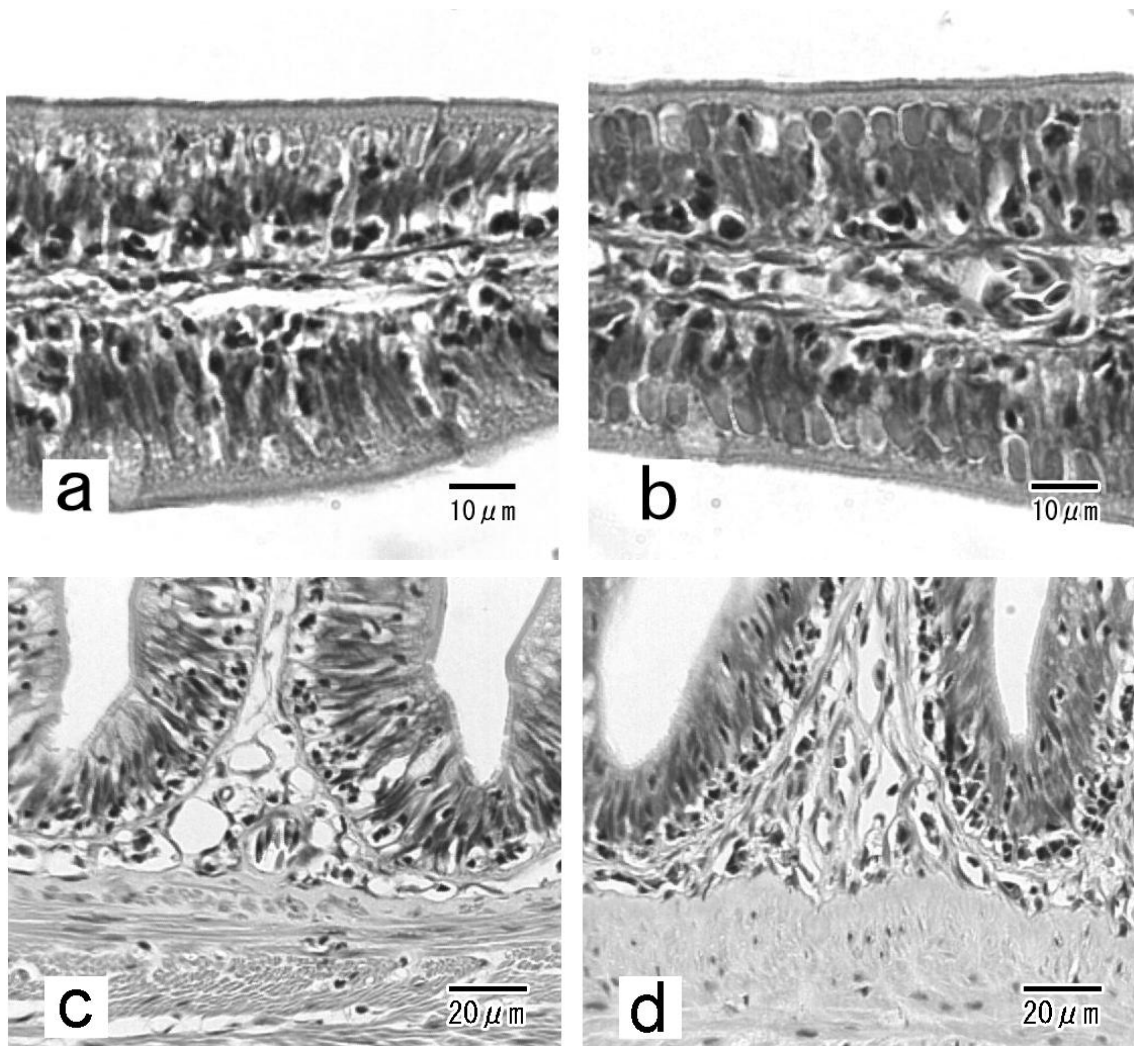


Fig.5-3-5 Histological sections of mucosal folds and the lamina propria of submucoa in the distal intestine of yellowtail fed the experimental diets (HE-stained). a,c: fish fed diet FM. b,d: fish fed diet SBM.

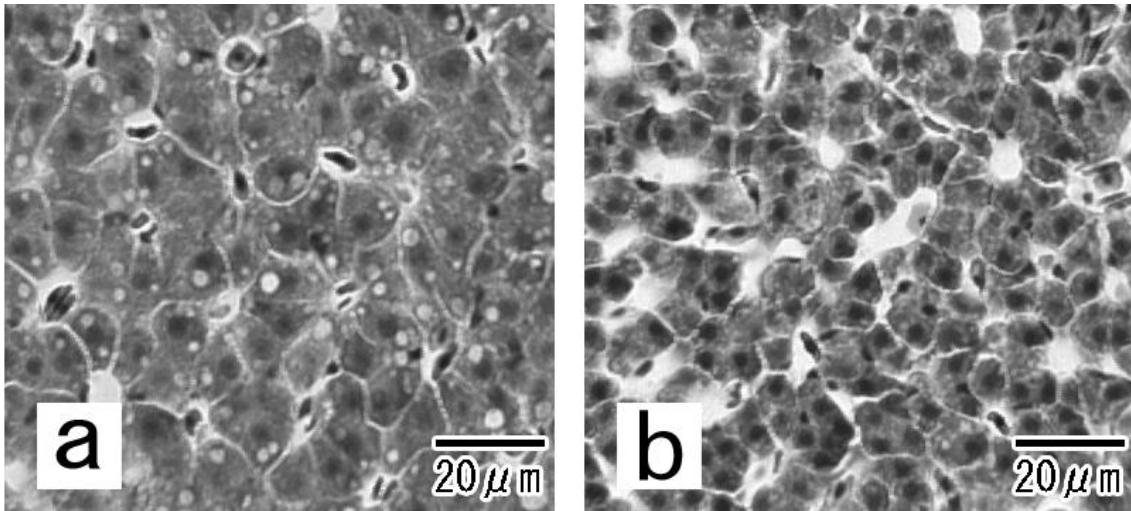


Fig.5-3-6 Histological sections of hepatocytes of the liver of yellowtail fed the experimental diets (HE-stained). a: fish fed diet FM. b: fish fed diet SBM.

第6章 総合考察

1. 大豆油粕主体飼料を給与した養殖魚数種で生じる生理障害の要因

淡水魚のニジマスでは大豆油粕(SBM)で魚粉を全て代替した飼料(NFM)を給与すると脂質の消化吸収率や胆汁の代謝不良を示唆する腸管後部や肝臓での組織変性が生じることが報告されており、それらの生理障害が飼育成績の低下を引き起こす要因である可能性が示唆されている(Ostaszewska et al. 2005, 岩下ら 2007)。本研究では、SBM主体飼料を給与したニジマスにおいて報告にあった腸管後部および肝臓での組織変性を確認するとともに、アマゴにおいて肝臓組織で胆汁の生成不良を示唆する核濃縮を呈した萎縮変性が、腸管後部で脂質の消化吸収不良を示唆する大型空胞変性が確認された。一方、海産魚のブリやマダイではNFM飼料や高配合のSBM主体飼料を給与すると淡水魚のニジマスと同様に飼育成績が低下することが報告されており、長期間給与し続けた場合には肝臓が緑色を呈する緑肝症を生じることが報告されている(高木 2007, 竹内 2010)。本研究ではブリおよびマダイにおいて報告にあるような緑肝症は認められなかったが、SBM主体飼料を給与したブリでは、肝臓組織で肝細胞の萎縮変性を確認し、腸管後部ではタンパク質の消化吸収不良を示唆するエオシン濃染顆粒の滞留が認められた。ついでNFM飼料給与したマダイでは肝臓組織においてブリと同様に肝細胞の萎縮変性が認められ、膵臓外分泌部では腺細胞の萎縮および腺細胞の細胞質内のチモーゲン顆粒の量の減少が認められた。膵臓外分泌部で産生される膵液にはリパーゼをはじめとした消化酵素が含まれる事が知られており、このうちリパーゼと胆汁の作用によって脂肪の多くはそのまま腸管の粘膜から吸収されることが分かっており、魚類でも同様の消化・吸収が行われているものと考えられている(池田 1977, 小栗 1991)。これらのことから、SBM主体飼料を摂餌した魚類では、肝細胞の萎縮をはじめとした栄養代謝に関わる主要臓器の組織変性に起因する胆汁および各種消化酵素の生成不良、ならびに腸管における栄養物質の消化吸収能力の低下等による栄養障害が生じている可能性が考えられる。

2. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイにおける生理障害に関与する要因

ニジマスではSBM主体飼料給与時に生じる生理障害はSBMからアルコール抽出される物質(AE)を飼料に添加することで再現されることが報告されており(Yamamoto et al. 2008), 岩下(2010)では、SBMに含まれるアルコール可溶性成分のうち、大豆サポニンおよびイソフラボンをはじめとした抗栄養因子(ANF)が生理障害に関与している可能性を報告している。事実、SBMには哺乳類および魚類の栄養代謝に影響を与える抗栄養因子(ANF)が含まれていることが知られており(Francis et al. 2002 高木 2002), 魚類では、SBMを希酸処理して精製される分離大豆タンパク質(SPI)やSBMをアルコール洗浄した濃縮大豆タンパク質(SPC)など、ANFの含有量を低くした飼料が開発・利

用されている(星 1992)。本研究では、マダイにおいて SPI 主体飼料給与をした場合には SBM 主体飼料給与時と同様に肝臓および膵臓外分泌部組織の萎縮変性が認められたが SPI をアルコール洗浄した飼料(ASPI)や、SPC 主体飼料ではこれらの組織変性が改善されることを確認した。岩下(2010)ならびに岩下ら(2010) では、ニジマスにおいても SPI 主体飼料を給与した場合では生理障害が生じるが、ASPI および SPC 主体飼料では、それらの生理障害が改善されることが報告されている。このことから、SBM 主体飼料を給与したマダイで生じる生理障害には SBM に含まれるアルコール可溶性成分が関与している可能性が考えられる。次いで本研究では、マダイにおいてアルコール洗浄した SBM を主体とした飼料(ASBM)を給与した場合では肝臓および膵臓外分泌部組織の組織変性が改善されることを確認し、ASBM の精製時に抽出した AE を再度飼料に添加することで、SBM 主体飼料給与時と同様の組織変性が生じることを確認した。これらのことから、海産魚のマダイにおいても SBM に含まれるアルコール可溶性成分は、生理障害に強い影響を及ぼすことが考えられるとともに、その影響の要因には大豆サポニンおよびイソフラボンをはじめとした ANF の存在が強く関与している可能性が考えられる。

3. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイの生理障害の改善

海産魚のマダイではタウリンの生合成能力が乏しく、SBM をはじめとしたタウリンをほとんど含まない飼料で生じる成長不良には、不足するタウリンを補填することで改善されることが報告されている(Goto et al.2001, Takagi et al.2006)。本研究では、SBM にタウリンを添加した飼料をマダイに給与することで、飼育成績が改善されることを確認し、肝臓および膵臓外分泌部組織では組織変性がやや改善され、腺細胞内のチモーゲン顆粒の量が増加することを確認した。このことから、タウリン添加には SBM 飼料給与時のマダイで生じる生理障害に対して一定の改善効果をもたらす可能性が考えられる。一方で、本研究ではタウリンを添加した SBM 主体飼料を給与したマダイにおいても肝臓組織および膵臓外分泌部に組織変性が生じている個体が出現することを確認した。竹内(2010)では、同じ海産魚のブリにおいてタウリンを 4.5%添加した SBM および SPC 主体飼料を給与しても魚粉主体飼料給与時と同等の飼育成績は得られないことを報告している。このことから SBM 主体飼料給与時のマダイで生じる生理障害を完全に改善するにはタウリンの補填だけでは不十分である可能性が考えられる。

淡水魚のニジマスでは SBM 飼料給与時には成長不良ならびに胆のう中の総胆汁塩量が減少することが報告されており、胆汁酸成分であるタウロコール酸(C-tau)を添加することでこれらの生理障害が改善されることが報告されている (Iwashita et al. 2008)。一方、マダイでは SPC 主体飼料を長期間給与した場合には胆のう中の総胆汁塩量が減少することを報告されており、同じ海産魚のブリでは SBM 主体飼料給与時に飼育成績の低下とともに脂質の消化吸収率が低下している可能性が報告されている(Takagi et

al. 2002, 示野ら 1992)。本研究では SBM 主体飼料を給与したマダイにおいて胆のう中の胆汁酸濃度の低下は認められなかったが、C-tau を添加した SBM 主体飼料を給与することで、肝臓の組織変性が改善され、胆のう重量比は SBM 区と比べて高い値を示すことを確認した。加えて、C-tau とタウリンをそれぞれ添加した SBM 主体飼料を給与することで、成長不良ならびに肝臓および膵臓外分泌部の組織変性が改善されることを確認した。これらのことから、SBM 主体飼料にタウリンによる栄養補填をした上で C-tau を添加することで、マダイの生理障害が改善される可能性が考えられる。

なお、本研究ではマダイにタウリンを添加した ASBM 主体飼料を給与することで肝臓および膵臓外分泌部における組織変性が改善され、腺細胞内のチモーゲン顆粒の量が増加することを確認した。すでに 2. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイにおける生理障害に関与する要因で述べた研究成果を踏まえて鑑みるに、SBM 主体飼料給与時のマダイにおける生理障害を改善するには、タウリンなどの不足する栄養素等を補填した上で、アルコール可溶性の大豆 ANF の影響を防除することが重要であるものと考えられる。海産魚におけるタウリン欠乏と ANF の影響については、同じ海産魚のブリにおいて高配合の SBM 主体飼料にタウリンを多量に添加しても魚粉と同等の効果は得られないことを報告しており、その要因の一つとして大豆 ANF の影響を挙げている(竹内 2010)。淡水魚においては 2. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイにおける生理障害に関与する要因で述べた通り、ニジマスでは大豆サポニンやイソフラボンをはじめとしたアルコール可溶性の ANF の影響が生理障害に大きく関与していることが報告されている。以上のことから、養殖魚において SBM 等の植物性原料を魚粉の代替原料として使用するには栄養障害を引き起こす要因である ANF の影響を防除することが重要であり、これまでその利用は難しいとされてきた海産魚においてもタウリンなどの生体内で合成できない栄養素等を補填した上で、ANF の影響を防除することで魚粉の代替原料として SBM を活用できる可能性が考えられた。

要 約

養殖魚飼料の主原料である魚粉は価格の高騰が問題視されており、その代替原料として安価で供給量が多いことから大豆油粕（SBM）が注目されている。しかしながら、SBM 主体飼料を魚類に給与した場合には成長不良ならびに生理障害が生じることが明らかとなり、養殖飼料の主原料として利用するためには、その原因の解明ならびに改善策の開発が必要とされている。そこで、本研究では魚粉代替飼料の開発の一助とすることを目的とし、SBM を主体とした植物性魚粉代替飼料を給与した養殖対象魚類数種の生理障害ならびにその改善策を組織学的に検討した。

1. 大豆油粕主体飼料を給与した養殖魚数種で生じる生理障害の要因

養殖魚の淡水および海産魚の代表的な数種において SBM 主体飼料を給与した結果、淡水魚のニジマスおよびアマゴでは肝細胞の萎縮、腸管後部での脂質の消化吸収不良を示唆する大型空胞変性が認められた。海産魚のブリおよびマダイでは肝細胞の萎縮が認められ、加えてブリでは腸管後部の粘膜上皮細胞でタンパク質様物質の消化吸収不良を示唆する大型エオシン濃染顆粒が、マダイでは膵臓外分泌部の腺細胞に萎縮変性が認められた。これらのことから、SBM 主体飼料を摂餌した魚類では、肝細胞の萎縮をはじめとした栄養代謝に関わる主要臓器の組織変性に起因する胆汁および各種消化酵素の生成不良、ならびに腸管における栄養物質の消化吸収能力の低下等による栄養障害が生じることが考えられた。

2. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイにおける生理障害に関与する要因

淡水魚のニジマスでは SBM 主体飼料給与時に生じる生理障害には大豆に含まれるサポニンやイソフラボンをはじめとしたアルコール可溶性の抗栄養因子（ANF）が関与していることが明らかにされている。一方、海産魚では 1. 大豆油粕主体飼料を給与した養殖魚数種で生じる生理障害の要因より生理障害は主要臓器の組織変性により生じるものと考えたが、それらを引き起こす原因物質の解明には至っていない。そこで、マダイを海産魚のモデルケースとして SBM 主体飼料給与時に生じる生理障害の要因を検討した。第一の試験として、ANF の含有量を低くした飼料原料である分離大豆タンパク質（SPI：SBM を希酸処理して精製）、濃縮大豆タンパク質（SPC：SBM をアルコール洗浄して精製）、ならびに SPI をさらにアルコールによって洗浄処理を施した飼料（ASPI）をそれぞれマダイに給与した。その結果、アルコール洗浄を施した ASPI および SPC 主体飼料では、肝膵臓の組織変性に改善効果があることを確認した。第二の試験では、アルコール洗浄した SBM（ASBM）ならびにアルコール洗浄時に抽出された物質（AE）を ASBM に再度添加した飼料をそれぞれマダイに給与した。その結果、ASBM 主体飼料では、肝膵臓の組織変性に一定の改善効果が認められ、AE を再度添加すること

で肝臓において組織変性の再現性が認められた。これらのことから、海産魚においても SBM に含まれるアルコール可溶性の ANF が生理障害の要因に大きく関与していることが考えられた。

3. 大豆油粕主体飼料を給与したマダイの生理障害の改善

淡水魚のニジマスでは SBM 主体飼料給与時に生じる生理障害の改善策として、SBM をアルコール洗浄処理して ANF を除去する他に、飼料ヘタウロコール酸(C-tau)を添加することで生理障害が改善されることが報告されている。一方、海産魚のマダイやブリではタウリンの生合成能力が乏しいことから、魚粉代替飼料給与時に生じる成長障害を改善するには不足するタウリンを補填することが有効であるとされており、生理障害に対しても何らかの改善効果が期待される。そこで、マダイを海産魚のモデルケースとして SBM 主体飼料給与時に生じる生理障害の改善策を検討した。第一に、タウリンを添加した SBM および ASBM 主体飼料をそれぞれマダイに給与した。その結果、SBM 主体飼料では肝臓に一定の改善効果が認められ、ASBM 主体飼料では魚粉主体飼料給与時と同等の正常な組織像を示すまでに改善されることを確認した。これらのことから SBM 主体飼料で生じる生理障害にはタウリン欠乏ならびにアルコール可溶性の大豆 ANF が大きく関与している可能性が考えられた。第二に、C-tau ならびに複数種の飼料添加剤の併用添加による改善策を検討した。その結果、C-tau を添加した SBM 主体飼料では肝臓の組織変性に一定の改善効果が認められ、タウリンによる栄養補填をした上で C-tau を添加することで、マダイの肝臓における組織変性ならびに成長不良が改善されることが明らかとなった。

以上のことから、SBM には淡水魚と海産魚において、栄養代謝に関わる主要臓器の組織変性に伴う栄養障害を引き起こす要因が共通して存在することが明らかになった。そして生理障害の改善策として、従来の成長を指標とした飼育成績の評価に加えて、本研究で明らかにした主要臓器の組織変性を栄養障害の指標として捉え、それら障害の生理的メカニズムに基づいた飼料組成の調整・改善を進めることで、SBM 等の植物性原料を魚粉の代替原料として使用することが可能であり、これまでその利用は難しいとされてきた海産魚においてもタウリンなどの生体内で合成できない栄養素等を補填した上で、ANF の影響を防除することで魚粉の代替原料として SBM を活用できると結論した。

A study on influences of soybean meal-based diets on physiological disorders in several representative freshwater and marine cultured fish species and improvement of the disorders

Summary

Soybean meal (SBM) is advantageous because of its low price and high supply, and is gaining attention as an alternative to fish meal, the main raw material in cultured fish diets, because of the high price of fish meal. However, feeding fish an SBM-based diet results in poor growth and physiological disorders. Therefore, understanding the cause for poor growth and developing measures to improve growth are required to utilize SBM as the main raw material in cultured fish diets. In this study, I histologically investigated physiological disorders of several cultured fish species fed with SBM-based vegetable diets containing no fish meal to help develop a diet in which fish meal is replaced by another material. I also studied methods to treat these disorders.

1. Factors of the physiological disorders that develop in cultured fish species fed with soybean meal-based diets

Several representative cultured freshwater as well as marine fish species were fed SBM-based diets. As a result, in freshwater rainbow trout and amago salmon, hepatocellular atrophy and vacuolar degeneration in the distal intestine, which indicates indigestion and malabsorption of lipid, were observed. Hepatocellular atrophy was observed in marine yellowtail and red sea bream. In addition, in mucosal epithelial cells of yellowtail, large granules densely stained by eosin in the distal intestine were observed, indicating indigestion and malabsorption of protein-like substances, whereas atrophy and degeneration were observed in glandular cells of the exocrine pancreas of red sea bream.

Therefore, these results suggest that fish fed an SBM-based diet develop poor production of bile and various digestive enzymes caused by tissue degeneration of major organs involved in nutrient metabolism, such as hepatocellular atrophy and nutritional disturbance partly due to the reduced capacity of the intestine to digest and absorb nutrients.

2. Factors involved in physiological disorders of red sea bream fed a soybean meal-based diet

It has been revealed that the physiological disorders of freshwater rainbow trout that develop when the fish are fed an SBM-based diet involve alcohol-soluble antinutritional factors (ANFs) including saponin and isoflavone contained in soybean. In contrast, although it was assumed that these disorders were caused by major tissue organ degeneration in marine fish fed an SBM-based diet, the substance that caused the disorders has not been identified yet. Therefore, I investigated the factors of the physiological disorders using red sea bream as a marine fish model. In the first experiment, red sea bream was fed a diet in which ANF content was reduced, such as soy protein isolate (SPI: purified by treating SBM with dilute acid), soy protein concentrate (SPC: purified by washing SBM with alcohol), and SPI washed with alcohol (ASPI). As a result, the diets based on ASPI and SPC that were washed with alcohol improved tissue degeneration in the hepatopancreas. In the second experiment, red sea bream was separately fed SBM washed with alcohol (ASBM) and ASBM again added with substances extracted from the alcohol wash (AE). As a result, the ASBM-based diet resulted in less hepatopancreatic tissue degeneration, whereas addition of the AE again led to proliferation of tissue of hepatopancreas. Therefore, the results suggest that it is likely that alcohol-soluble ANFs contained in SBM are significantly involved in physiological disorders in the marine fish as well.

3. Improvement in physiological disorders of red sea bream fed a soybean meal-based diet

It has been reported that in order to improve physiological disorders in rainbow trout caused by being fed an SBM-based diet, removal of ANFs by washing the SBM with alcohol and addition of taurocholic acid (C-tau) to the diet are effective. On the other hand, marine fish such as red sea bream and yellowtail, have a poor capacity to biosynthesize taurine, which is effective to improve growth inhibition that occurs in fish fed a diet in which the fish meal is replaced by another material. Therefore, taurine supplementation is expected to improve the physiological disorders as well. I studied methods to improve the physiological disorders in marine fish fed a SBM-based diet using red sea bream as a marine fish model. First, red sea bream were fed SBM and taurine-supplemented with ASBM separately. As a result, the SBM-based diet improved the function of hepatopancreas, whereas the ASBM-based diet restored the normal histology equivalent to that of fish fed a fish meal-based diet. Thus, it is likely that a taurine deficiency and alcohol-soluble soybean ANFs are significantly involved in the physiological disorders that develop

in fish fed an SBM-based diet. Second, I studied methods to improve these disorders, such as addition of C-tau and multiple types of diet additives. As a result, the SBM-based diet supplemented with C-tau resulted in less tissue degeneration in the liver, clearly demonstrating that addition of C-tau in addition to nutritional supplementation with taurin improved tissue degeneration of the hepatopancreas and poor growth in red sea bream.

Conclusion

The above results have clarified that SBM contains factors causing nutritional disorders because of tissue degeneration in major organs which involve nutrient metabolism both in freshwater and marine fish. Moreover, as remedial measures for these physiological disorders, if I further improve diet composition based not only on a conventional evaluation of feeding performance using growth as an index but also the physiological mechanism of the disorders, which shows that tissue degeneration in the major organs is an index of nutritional disturbance, it is possible to use vegetable materials such as SBM as an alternative material to fish meal. SBM can be utilized as a raw material to replace fish meal in marine fish diets, even for marine fish for which SBM has been considered difficult to use, if nutrients that the marine fish cannot synthesize *in vivo*, such as taurine and other substances are supplemented to remove the influence by ANF.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、研究の機会を与えて頂き、終始惜しみのない、熱心なご指導とご鞭撻をしていただいた、東海大学大学院生物科学研究科の鈴木伸洋教授に心から厚く御礼申し上げます。

(独)水産総合研究センター増養殖研究所養殖システム部の松成宏之博士、山本剛史博士の各位には本研究の遂行にあたって多大なる御支援を頂きました。東海大学伊勢原研究推進部生命科学統合支援センター室長の秦野伸二教授、同支援センターの組織部門長の河邊昇氏をはじめとした職員の皆様には本論文の作製にあたり、御配慮ならび御支援を頂きました。これらの方々に厚くお礼を申し上げます。

東海大学大学院海洋学研究科の中廣篤人学士をはじめとした鈴木研究室の卒業生の方々には、組織薄切の作製に協力していただき、研究遂行時に貴重な御意見を頂きました。ここに深く御礼申し上げます。

引用文献

- Biswas, A. K., S. C. Ji, M. Seoka and K. Takii (2007) Effect of dietary soybean meal and phytase supplementation on digestibility and phosphorus discharge in red sea bream. *Aquacult. Sci.*, 55, 459-465.
- Francis, G., Z. Kerem, H. P. S. Makkar and K. Becker (2002) The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*, 88, 587-605.
- Goto, T., S. Takagi, T. Ichiki, T. Skai, M. Endo, T. Yohida, M. Ukawa and H. Murata (2001) Studies on the green liver in cultured red sea bream fed low level and non-fish meal diets: Relationship between hepatic taurine and biliverdin levels. *Fish. Sci.*, 67, 58-63.
- 樋口勝 (1976) 胆汁酸肝障害にかんする実験的研究 ケノデオキシコール酸代謝と肝毒性. 奈良医学雑誌, 27, 181-194.
- 日比谷 京 (1982) VII 消化器系 Digestive system 魚類組織図 正常組織と病理組織 (日比谷 京編), 講談社, 東京, pp. 74-93.
- 星 祐二 (1922) 7.1 大豆タンパク質製品の種類と製造法 シリーズ《食品の科学》大豆の科学(山内文男, 大久保一保編), 朝倉書店, 東京, pp. 134-151.
- 池田静徳 (1977) 6. 消化酵素 改訂増補 魚類生理(川本 信之編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 140-159.
- 岩下恭朗 (2010) 大豆油粕主体無魚粉飼料のニジマスにおける抗栄養因子の生理障害作用とその防除に関する研究. 東海大学大学院平成 22 年度博士論文, 5+ i ~ iv +1~141.
- 岩下恭朗・山本剛史・後藤孝信・鈴木伸洋 (2007) 胆汁末を添加した大豆油粕主体の無魚粉飼料を給与したニジマスの肝臓および直腸の組織学的検討. 水産増殖, 55, 225-230.
- Iwashita, Y., N. Suzuki, T. Yamamoto, J. Shibata, K. Isokawa, Ang H. Soon, Y. Ikehata, H. Furuita, T. Sugita and T. Goto (2008) Supplemental effect of cholytaurine and soybean lecithin to a soybean meal-based fish meal-free diet on hepatic and intestinal morphology of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.*, 74, 1083-1095.
- 岩下恭朗・鈴木伸洋・松成宏之・古板博文・杉田毅・天野俊二・山本剛史 (2010) カゼイン主体飼料へのコレステラミン添加および濃縮大豆タンパク質主体飼料への大豆のサポニンとイソフラボンの添加がニジマスの肝臓組織に及ぼす影響, 水産増殖, 58(3), 411-419.
- 家戸敬太郎(2010) 高魚粉飼料へのタウリン添加がマダイの体表にもたらす効果~皮の

- 厚さ、”脱鱗しやすさ”に有意差~. アクアネット, 東京, 13, 8, 44-47.
- 加藤美樹・金 東浩・永沼孝子・小川智久・村本光二 (2002) 分離大豆たん白質からのフィチン酸の酸抽出除去とそれのたん白質特性への影響. 大豆たん白質研究, Vol.5, 41-46.
- Matsunari, H., T. Takeuchi, T. Yamamoto, Kim Shin-Kwon and T. Goto (2008) Optimum dietary taurine level in casein-based diet for juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Fish. Sci.*, 74, 347-353.
- 三輪 理・黒川忠英 (2002) 第 9 章 消化・吸収. 魚類生理学の基礎 (会田勝美編), 恒星社厚生閣, pp. 193.
- Nguyen, H. P., P. Khaoian, T. Furutani, J. Nagano, H. Fukada and T. Masumoto (2011) Effects of alcohol extract from soybean meal on pancreatic digestive enzyme and bile acid secretion in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquacult. Sci.*, 59, 465-472.
- 小栗幹郎 (1991) 第 4 章 消化と吸収. 新版 魚類生理学概論(田村 保編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 84-103.
- Ostaszewska, T., K. Dabrowski, M. E. Palacios, M. Olejniczak and M. Wiczorek (2005) Growth and morphological changes in the digestive tract of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) due to casein replacement with soybean proteins. *Aquaculture*, 245, 273-286.
- 齋藤太郎 (2009) -エサの最新動向を探る- 第 10 回 FEED STUDY タウリンの飼料添加物指定について 養殖, 46, 11, 64-67.
- 示野貞夫・細川秀毅・森江 整・竹田正彦・宇川正治 (1992) ハマチ飼料に対する大豆油粕の配合. 水産増殖, 40, 51-56.
- 鈴木伸洋 (1993) 海産魚類マハゼの腸管上皮細胞の微細構造. 南西水研研報, 26, 113-132.
- 鈴木伸洋・山本剛史 (2004) 大豆油粕無魚粉飼料で飼育したニジマスに認められた腸管組織変性とレシチン添加の組織学的観察. 東海大学紀要海洋学部, 2(3), 25-36.
- 高木修作 (2002) 代替タンパク質の実力 魚粉依存の飼料から脱却できるか 栄養価からみた代替タンパク質. 養殖, 東京, 39, 10, 62-67.
- 高木修作 (2007) 話題の広場 海産魚用低・無魚粉飼料におけるタウリン補足の必要性. 日本水産資源保護協会 月報, 6月号, 7-12.
- 高木修作・細川秀毅・示野貞夫・毎田正志・宇川正治・上野慎一 (1999) マダイ用飼料における濃縮大豆タンパク質の利用. 水産増殖, 47, 1, 77-87.
- Takagi, S., K. Tiba, T. Kuramoto, M. Ukawa and T. Goto (2002) Biliary Bile Salts Reduction in Red Sea Bream Fed on Soybean Meal Diet. *SUISANZOSHOKU*, 50, 2, 239-240.

- Takagi, S., H. Murata, T. Goto, T. Ichiki, M. Endo, H. Hstake, T. Yoshida, T. Sakai, H. Yamashita and M. Ukawa (2006) Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yerling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fish. Sci.*, 72, 1191-1199.
- 竹内俊郎 (2008) 飼料添加物以外の添加商品【認可が望まれるサプリメント】タウリン. 養殖, 45 (4) 92-95.
- 竹内俊郎 (2010) 話題 合成タウリンで魚も元気! 日本水産学会誌, 76(2), 298-303.
- 竹内俊郎・松成宏之(2006) 養魚飼料の栄養トピックス - 最近の動向と研究成果 - 第10回 タウリンの有効性 養殖, 東京, 43, 10, 72-75.
- 山本剛史 (2006) III章 飼料にかかわる最近の話題 最近の代替タンパク質に関する研究. 養殖, 東京, 43(4), 94-96.
- 山本剛史 (2009) 大豆給与による生理異常とその改善 養殖, 46(10), 46-48
- Yamamoto, T., T. Shima, H. Furuita, N. Suzuki (2002) Influence of feeding diets with and without fish meal by hand and by self-feeders on feed intake, growth and nutrient utilization of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 214, 289-305.
- Yamamoto, T., N. Suzuki, T. Sugita, N. Tnaka and T. Goto (2007) Supplemental effect of bile salts to soybean meal-based diet on growth and feed utilization of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Sci.*, 73, 123-131.
- Yamamoto, T., T. Goto, Y. Kine, Y. Endo, Y. Kitaoka, T. Sugita, H. Furuita, Y. Iwashita and N. Suzuki (2008) Effect of an alchol extract from a defatted soybean meal supplemented with a casein-based semi-purified diet on the biliary bile status and intestinal conditions in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquacult. Res.*, 39, 986-994.
- Yamamoto T, Okamoto H, Iwashita Y, Matsunari H, Amano S, Suzuki N (2013) Growth performance and physiological condition of amago salmon *Oncorhynchus masou ishikawae* juveniles fed a low fish meal diet. *Aquac Sci* 61, 1, 9-17
- 渡辺良朗 (1984) 2 仔稚魚の消化吸收機構, 海産魚類の初期生活史. 海洋と生物, 32 (6), 191-197.
- 渡邊 武 (2009) 1. 魚類養殖と養魚飼料の現状. 改訂 魚粉の栄養と飼料 (渡邊 武編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 1-16.