

マダイ用魚粉削減飼料の有効性検討と
利用性向上に関する研究

Studies on the Effectiveness and the Improvement of the Nutritional Quality of the Low or
Non-fish Meal Diets in Red Sea Bream (*Pagrus major*)

平成 28 年度
(2017 年 3 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
応用生命科学専攻

松倉 一樹

目 次

緒 言	13
第1章 マダイ用低・無魚粉飼料の有効性検討	
第1節：マダイ0才魚における低・無魚粉 EP 飼料の有効性検討	16
第2節：マダイ1才魚における低・無魚粉 EP 飼料の有効性検討	23
第2章 マダイ用無魚粉飼料に対する酵素混合物添加効果	
第1節：マダイ0才魚における無魚粉 EP 飼料への酵素混合物添加効果	31
第2節：マダイ1才魚における無魚粉粉末飼料への酵素混合物添加効果	38
第3節：マダイ1才魚における無魚粉 EP 飼料への酵素混合物添加効果	46
第3章 低・無魚粉 EP 飼料を給餌したマダイの <i>Edwardsiella tarda</i> に対する抵抗性	59
第4章 マダイ1才魚に対する低魚粉 EP 飼料の実用性	71
総 括	80
謝 辞	81

緒言

マダイ *Pagrus major* の養殖は、人工種苗生産技術の進展に伴いその生産量が増加し、1994年には年間 76,900 トンを記録した。その後、1999年の 87,232 トンをピークに生産量はやや減少傾向を示している。直近の 2014 年における国内の養殖生産量は 61,702 トンであり、これは国内の魚類養殖において魚種別では 2 番目に多い。従って、マダイは国内における最も重要な養殖魚の 1 つであると言える。

マダイ養殖では、初期はイワシ等の冷凍魚が用いられていたが、配合飼料の研究の進展に伴い、モイストペレット、ドライペレット (DP)、エクストルーデッドペレット (EP) が開発され、近年までに DP や EP 等の配合飼料の普及が進んでいる。マダイ用配合飼料の主原料は魚粉であり、近年は南米産のカタクチイワシを原料としたアンチョビーミールが主に用いられてきた。しかし、世界的な養殖生産量の増加により魚粉の需要は高まる傾向にあり、魚粉生産国の資源管理強化も伴い、魚粉価格は近年上昇傾向が続いている。このような状況から、国内における養魚用飼料の価格が値上げされており、このことは養殖経営を圧迫する大きな要因となっている。また、魚粉 1kg を製造するためには多くの原料魚を必要とすることから、魚粉を多く配合した飼料で魚を養殖することは、限られた資源を有効活用する観点から考えても好ましくない。

これらの状況から、魚粉削減飼料の研究が以前から行われており、マダイについても有用な知見が数多く報告されている。先行研究の結果では、濃縮大豆タンパク質、大豆油粕、コーングルテンミール、チキンミール、ミートミール等が代替原料として有効と考えられている (Aoki et al. 2000a, 2000b, 高木ら 1999, 2000a, 2000b, 2000c, 2000d)。さらにマダイ 1 才魚では、それらを配合してリジン、メチオニン等の必須アミノ酸組成を調整することにより、飼料中に

含まれる魚粉の 90~100% を代替できる可能性が示唆されている (高木ら 2000d)。しかし、国内のマダイ養殖の現場では未だに魚粉が 40~50% 量配合された飼料が主に流通し、給餌されているのが現状である。その原因として、魚粉削減飼料を産業規模で長期間給餌した場合の摂餌性や成長および抗病性について、養殖業者等の関係者が不安を抱いていることが挙げられる。

以上の状況をふまえて、本研究では、実用的な魚粉削減飼料の開発および導入促進に必要な知見を得ることを目的とし、リジン、メチオニン等の必須アミノ酸およびタウリンを配合した低・無魚粉飼料の有効性を 0 才魚および 1 才魚で検討した。無魚粉飼料については、摂餌および成長の向上を期待して、酵素混合物 (以下、酵素とする) の添加効果も併せて検討した。さらに、低・無魚粉飼料で飼育したマダイについて、主要な疾病であるエドワジエラ症に対する抗病性の研究を行い、低魚粉飼料については、養殖場での実証試験による実用性も併せて検討した。

第 1 章では、マダイ 0 才魚および 1 才魚における低・無魚粉飼料の有効性を 12~16 週間の飼育試験により検討した。マダイ 0 才魚については、EP 飼料を用いて魚粉 50% 区、魚粉 20% 区および魚粉 0% 区の 3 区を設定し、12 週間の飼育試験を行ったところ、魚粉 20% 区では魚粉 50% 区と比べて日間給餌率、日間増重率および増肉係数等の飼育成績が遜色ない結果を示した。一方、魚粉 0% 区では、増肉係数が魚粉 50% 区に比べて遜色ない値を示したものの、日間給餌率および日間増重率は劣る傾向を示した。このことから、マダイ 0 才魚では低魚粉飼料の有効性が示唆されたが、無魚粉飼料は主に摂餌性の面で更なる改善が必要だと考えられた (第 1 節)。次に、マダイ 1 才魚については、EP 飼料を用いて魚粉 50% 区、魚粉 25% 区および魚粉 0% 区の 3 区を設定し、16 週間の飼育試験を行った。その結果、魚粉 25% 区では魚粉 50% 区に比べて

日間給餌率がやや劣るものの、日間増重率および増肉係数は優れる値を示した。魚粉 0%区では、日間給餌率および日間増重率が魚粉 50%区に比べてやや劣る傾向を示した。以上のことから、マダイ 1 才魚でも 0 才魚同様、低魚粉飼料の有効性が示唆されたが、無魚粉飼料は摂餌性の改善が必要だと考えられた（第 2 節）。

第 2 章では、無魚粉飼料を給餌した場合の摂餌性および成長の改善を目的として、セルラーゼ等を含む酵素の添加効果を検討した。マダイ 0 才魚を対象として魚粉 50%区、魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区を設定し、12 週間の飼育試験を行った結果、魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区の日間給餌率、日間増重率は、魚粉 50%区に比べて有意に劣っていた。また、魚粉 0%区と魚粉 0%+酵素区の間では、それらの項目が同等の値を示した。このことから、マダイ 0 才魚では無魚粉飼料に対する酵素の添加による摂餌促進および成長促進効果が認められなかった（第 1 節）。次に、マダイ 1 才魚を対象として 0 才魚と同様の試験区を設定した 12~16 週間の飼育試験を実施した。魚粉 0%+酵素区の日間給餌率および日間増重率は、魚粉 50%区に比べて遜色ない値であり、魚粉 0%区に比べて高い傾向を示した。各区における給餌後の胃内容物量および血漿中性脂肪値の変動を調べた結果、魚粉 0%区では魚粉 50%区に比べて消化速度が遅くなる傾向となり、魚粉 0%+酵素区では魚粉 50%区と同等の速さに改善されることが示唆された。（第 2 節、第 3 節）。

第 3 章では、マダイの主要な疾病であるエドワジエラ症を対象として、低・無魚粉飼料を給餌したマダイの抗病性を検討した。低・無魚粉飼料で 6 週間以上飼育したマダイ 1 才魚を *Edwardsiella tarda* の菌液に浸漬して、計 2 回の細菌攻撃試験を行った結果、攻撃後 1 ヶ月間の累積死亡率、腎臓または脾臓の保菌率、および脾臓の生菌数に統計的な有意差はみられなかった。このことから、アミノ酸バランスを調整し、タウリン等を補足した実用的な低・無魚粉

飼料で飼育したマダイについては、*E. tarda* に対する抗病性が低下しない可能性が考えられた。

第 4 章では、長崎県のマダイ養殖場において、リジン・メチオニン等の必須アミノ酸および酵素を配合し、粗タンパク量を増量した魚粉量 25%の低魚粉 EP 飼料によるマダイ 1 才魚の実証試験を行い、その有効性を検討した。約 7 ヶ月間にわたる実証試験の結果、魚粉 25%区の日間増重率、増肉係数は、対照区（魚粉量 40%）に比べて優れる値を示し、飼育期間中の餌代を約 15%削減できたことが試算された。このことから、魚粉量 25%の実用的な低魚粉 EP 飼料は、マダイの日間増重率および増肉係数に悪影響を与えることなく、養殖場においても十分に活用できることが実証された。

本研究により、魚粉量 20~25%の実用的な低魚粉飼料については、マダイの摂餌性、成長および抗病性に問題はなく、産業規模の飼育条件においても飼育コストの削減に寄与することが明らかとなった。さらに、無魚粉飼料については、主に摂餌性の課題がみられたが、酵素の添加により改善できる可能性が示唆された。将来的には、これらの知見を基に、マダイの摂餌性、成長および抗病性を良好に維持できる魚粉削減飼料の開発が可能になると考えられる。

参考文献

- Aoki, H., Y. Sanada, M. Furuichi, R. Kimoto, M. Maita, A. Akimoto, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000a): Partial or complete replacement of fish meal by alternate protein sources in diets for yellowtail and red sea bream. *SUISANZOSHOKU*, 48, 53-63.
- Aoki, H., M. Furuichi, K. Watanabe, S. Satoh, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000b): Use of non-fish meal diets for red sea bream. *SUISANZOSHOKU*, 48, 65-72.
- 高木修作・細川秀毅・示野貞夫・舞田正志・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, 77-87.

高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治(2000a) マダイ飼料におけるコーングルテンミールの利用. 日水誌, 66, 417-427.

高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治 (2000b) マダイ飼料におけるチキンミールの利用. 日水誌, 66, 428-438.

高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治(2000c) マダイ稚魚飼料におけるタンパク質源併用による魚粉の削減. 水産増殖, 48, 523-530.

高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治 (2000d) マダイ 1 歳魚飼料におけるタンパク質源併用による魚粉の削減. 水産増殖, 48, 545-552.

第1章 マダイ用低・無魚粉飼料の有効性検討

第1節 マダイ0才魚における低・無魚粉EP飼料の有効性検討

魚粉の原魚の資源管理強化、および世界的な養殖生産量の増加等に伴い、魚粉の供給量がその需要に対して少ない傾向であり、その傾向は今後も続くことと予測される（山岡 2016）。今後も魚類養殖業が持続的に発展していくためには、供給量に限りがある魚粉の代替原料を広く探索する必要があり、これは喫緊の課題であると考えられる。このような状況から、魚粉の代替原料の可能性に関する研究は主要養殖魚であるマダイについても多く検討され、多くの知見が得られている。今までの研究により、マダイ0才魚については、濃縮大豆タンパク質単独の配合許容量が27%であること、コーングルテンミールは魚粉の30%を代替可能であること、大豆油粕、コーングルテンミール、およびチキンミールの配合で魚粉の70%を代替可能であること（高木ら 2000b）が報告されている。また、飼料中の魚粉を植物性原料で代替した場合にはマダイでタウリン不足による緑肝症が発症したものの、飼料にタウリンを補足することでその症状が改善したことが報告されている（Takagi et al. 2006）。さらに、大豆油粕およびコーングルテンミール等の植物性代替タンパク質、およびタウリンを配合した魚粉量15～40%の低魚粉飼料について、マダイ0才魚の成長と利用性を検討した事例もあり、その結果、魚粉25%飼料では対照区とほぼ同等の成長を示したことが報告されている（Linn et al. 2014）。

このように、マダイ0才魚の魚粉削減飼料に関する研究事例、ならびに動物性タンパク原料を配合した魚粉削減飼料の可能性を示唆する知見は多くあるものの、魚粉を大豆油粕、コーングルテンミール等の植物性原料のみで代替し、タウリンを補足した低・無魚粉飼料についての飼育を報告した事例は少ない。限りある生

物資源を有効活用して人類のタンパク質源を安定的に供給していくためには、可能な範囲で植物性原料を多く配合した低・無魚粉飼料を開発することが望ましい。そこで本研究では、大豆油粕、コーングルテンミール、濃縮大豆タンパクおよびタウリンを配合した低・無魚粉EP飼料のマダイ0才魚における利用性を12週間の飼育試験により検討した。

材料および方法

試験区の設定、試験飼料の配合組成および成分分析

試験区として魚粉50%区、魚粉20%区および魚粉0%区の3区を設定し、試験飼料には中部飼料（株）で作製された直径5mmのEP飼料を用いた。試験飼料の粗タンパク質は、ケルダール法により窒素タンパク質換算係数を6.25として測定した。粗脂肪含量は、クロロホルム：メタノール（2:1）混合抽出法（Folch et al. 1957）により求めた。粗灰分は電気炉を用いて650℃で8時間灰化して求め、水分はインキュベーターを用いて常圧加熱乾燥法により約110℃で加熱して測定した。構成アミノ酸および遊離アミノ酸は、アミノ酸分析装置（日本電子株式会社、JLC-500/v）を用いて測定した。アミノ酸分析装置のカラムにはイオン交換樹脂を充填した多段式カラム（4mmφ×120mm）を用い、検出器の測定波長に440、570、690nmを採用し、発色試薬にニンヒドリン試薬を用いた。

飼育試験に用いた各試験飼料の配合組成および成分分析結果をTable 1、Table 2に示す。魚粉20%区および魚粉0%区については、魚粉代替原料として、大豆油粕、コーングルテンミールおよび濃縮大豆タンパクを配合し、タウリン、リジン、メチオニン、トリプトファンおよびスレオニンも併せて配合した。成分分析の結果、魚粉20%飼料の粗脂肪量が魚粉50%および魚粉0%飼料に比べてやや低い値を示したが、粗脂肪量以外の一般成分は各飼料で同等の値を示し

た。魚粉 50%飼料については、灰分が魚粉 20% および 0%飼料に比べて多く、タウリン量は低い値を示した。また、実験 1 で用いた魚粉 20% および魚粉 0%飼料に含まれる必須アミノ酸の量は、バリン、ヒスチジン、リジン、アルギニンが魚粉 50%飼料に比べてやや低い値を示したが、それ以外の必須アミノ酸については、同等またはそれ以上の値を示した。

供試魚および飼育方法

供試魚は、長崎県内の種苗生産業者から入手したマダイ 0 才魚を用いた。長崎県総合水産試験場の海面小割生簀 (3 m×3 m×3 m) で市販飼料 (林兼産業, ノヴァ EP 3~4 号) を給餌して 2 ヶ月間予備飼育した後、平均体重 106~108 g に達したマダイ 0 才魚を各生簀 50 尾ずつ 6 生簀 (1.5 m×1.5 m×2 m) に収容し、飼育試験を実施した。飼育試験は 2 反復で行い、飼育期間は 12 週間とした。給餌頻度は 1 日 1 回週 5 回を基本とし、ほぼ飽食量を与えた。4 週間毎に供試魚の尾叉長および体重を測定した。終了後には各区 5 尾から血液を採取し、血液性状および血漿成分の分析に供した。

統計処理

飼育成績の各項目、血液性状および血漿成分は、一元配置の分散分析に引き続き Fisher の PLSD 法を実施し、Stat-view5.0 を用いて危険率 5%における有意差を判定した。

結 果

飼育成績

飼育期間中の水温は 18.0~27.0℃の間で推移した。試験期間中の飼育成績を Table 3 に示す。各区の死亡率は 0~0.5%であり、魚病の発生等による死亡はほとんどみられなかった。各区の日間増重率は、魚粉 50%区が 1.12%、魚粉 20%区が 1.10%、魚粉 0%区が 0.89%であり、魚粉 0%区が魚粉 50%および魚粉 20%区に比べて有

意に低い値を示した ($P < 0.05$)。終了時における各区の平均体重は、魚粉 50%区が 181.2 g、魚粉 20%区が 196.9 g、魚粉 0%区が 170.5 g であり、魚粉 20%区が最も重く、魚粉 0%が最も軽い値を示した。各区の日間増重率および増重率も終了時の平均体重と同様の傾向であり、魚粉 0%区の平均体重、日間増重率および増重率は、魚粉 20%区に比べて有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。増肉係数は、魚粉 50%区が 1.83、魚粉 20%区が 1.58、魚粉 0%区が 1.59 であり、各区间で統計的な有意差は認められなかったが、魚粉 50%区が魚粉 20%および魚粉 0%区に比べて高い傾向を示した。タンパク質効率も、魚粉 50%区が 0.89、魚粉 20%区が 1.01、魚粉 0%区が 1.00 であり、各区间で統計的な有意差は認められなかったが、魚粉 50%区が魚粉 20%および魚粉 0%区に比べて低い傾向を示した。

血液性状および血漿化学成分分析

飼育試験終了後の各区における血液性状および血漿化学成分の分析結果を Table 4 に示す。血液ヘマトクリット値は、各区间で統計的な有意差が認められなかった。魚粉 20%区および魚粉 0%区の血漿総コレステロール値 (TCHO) および血漿グルコース値 (GLU) は、魚粉 50%区に比べて有意に低い値を示した。それ以外の血漿成分 (総タンパク値、尿素窒素値) については、各区间で統計的な有意差が認められなかった。

考 察

本研究では、3 種類の植物性魚粉代替原料 (大豆油粕、コーングルテンミール、濃縮大豆タンパク)、タウリン、リジン、メチオニン等を配合した低・無魚粉 EP 飼料について、マダイ 0 才魚における利用性を検討した。その結果、魚粉 20%飼料については、摂餌性および飼育成績が魚粉 50%飼料と同等以上の結果を示し、従来の魚粉主体飼料と遜色なくマダイ 0 才魚で利用されることが示唆された。無魚粉飼料について

は、今回用いた3種類の中で摂餌および増重率が最も低い結果となったが、増肉係数は魚粉主体飼料および魚粉20%飼料と比べて遜色ない値を示した。無魚粉飼料を給餌した場合にマダイ0才魚における成長が劣る現象は、先行研究（Aoki et al. 2000a, 2000b, Takagi et al. 1999, 2000a, 2000c）と類似しているが、摂餌性と増肉係数のそれぞれについて個別に検討すると、異なる点も認められる。まず、本研究で用いた無魚粉飼料の摂餌性については、魚粉主体飼料に比べて明確に劣る結果となり、これはAoki et al. (2000b)、高木ら (1999, 2000a) と類似しているが、Aoki et al. (2000a)、高木ら (2000c) とは異なる結果である。

本研究と無魚粉飼料の摂餌性が類似していたAoki et al. (2000b) および高木ら (1999, 2000a) の研究は、植物性原料（濃縮大豆タンパク、大豆油粕およびコーングルテンミール）を合計48～55%、動物性原料（オキアミミールおよびミートミール）を10～20%配合して作製した無魚粉飼料のマダイ0才魚における利用性を検討したものである。無魚粉飼料の摂餌および成長が劣った原因について、Aoki et al. (2000b) および高木ら (1999, 2000a) は、濃縮大豆タンパクまたはコーングルテンミールの配合量を多くすることにより、リジンおよびメチオニンが不足し、魚体内でのアミノ酸合成が効率的に行われないこと等、無魚粉飼料のアミノ酸組成に問題があったことを考察している。次に、摂餌性が本研究と異なっていた、Aoki et al. (2000a) および高木ら (2000c) の研究は、植物性原料（大豆油粕およびコーングルテンミール）を0～20%、動物性原料（オキアミミール、ミートミール、肉骨粉、チキンミール、フェザーミールおよび血粉）を45%～59%配合して作製した無魚粉飼料のマダイ0才魚における利用性を検討したものである。Aoki et al. (2000a) の研究では、無魚粉飼料の摂餌性および増肉係数は魚粉主体飼料と遜色ない結果を示し、高木ら (2000c) の研究では、摂餌性は魚粉主体飼料と遜色ないが、

増肉係数は劣る結果を示した。高木ら (2000c) は、無魚粉飼料で増肉係数および成長が劣った原因として、チキンミール単独の高配合に伴う飼料のアミノ酸組成の変化、およびタンパク質消化率の低下を考察している。

このように、先行研究の結果から、マダイ0才魚における無魚粉飼料の摂餌性は、無魚粉飼料に含まれる魚粉代替原料の種類および配合量によって異なり、植物性原料が多い場合は摂餌性の低下が認められ、動物性原料が多い場合においては摂餌性の低下が起こりにくい傾向を示している。本研究で用いた無魚粉飼料は、植物性原料（コーングルテンミール、濃縮大豆タンパクおよび大豆油粕）を63%、オキアミミールを3%配合し、リジン、メチオニン、トリプトファンおよびスレオニンを補足しており、各植物性原料の配合量はアミノ酸組成のバランスに注意を払った設計としている。各試験飼料の必須アミノ酸組成の分析結果から、本研究で用いた無魚粉飼料のアミノ酸組成は、魚粉主体飼料と遜色なかったものと判断され、先行研究で認められた必須アミノ酸の不足により摂餌および成長の低下が生じたとは考えにくい。以上のことから、大豆油粕、濃縮大豆タンパク、コーングルテンミール等の植物性原料には、アミノ酸組成以外でマダイ0才魚の摂餌低下につながる何らかの作用がある可能性が想定されるが、現状では不明であり、今後の検討課題であると考えられる。

低・無魚粉飼料を給餌したマダイ0才魚の血液性状および血漿成分は、魚粉主体飼料に比べて概ね明確な違いが認められなかったが、血漿総コレステロール値（TCHO）および血漿グルコース値（GLU）が有意に低い結果を示した。本研究では飼育期間中に供試魚の衰弱および死亡がほとんどみられなかったこと、TCHOおよびGLU以外の項目については、試験区間で明確な違い認められなかったことから、今回用いた低・無魚粉飼料はマダイ0才魚の健康状態に悪影響を与えていたとは考えにくい。しかし、

ブリでは血漿 TCHO と抗病性についての関連性が報告されていることから (Maita et al. 2006), 低・無魚粉飼料で飼育したマダイの抗病性については, 今後精査すべき課題であると考えられる。また, 血漿 GLU が変動する要因としては, 食後変動, 重度の飢餓状態, 低栄養状態, 細菌性疾患等によるストレス等が知られている (池田ら 1986)。本研究の飼育成績から, 重度の飢餓状態, 低栄養状態, および細菌性疾患が生じていたことは考えにくい。マダイにおいても, 摂餌した餌が魚体内で消化吸収される過程で血漿 GLU が変動することが確認されていることから (Takii et al. 1997), 本研究で低・無魚粉飼料を給餌したマダイ 0 才魚の血漿 GLU が低い傾向だった要因の 1 つとして, 低・無魚粉飼料の消化性に影響された可能性が考えられ, 今後, 更なる検討が必要であると思われる。

以上の結果から, 大豆油粕, コーングルテンミールおよび濃縮大豆タンパクをバランス良く配合し, リジン, メチオニンおよびタウリン等を補足した魚粉 20%EP 飼料は, マダイ 0 才魚における利用性が魚粉主体飼料と遜色ないことが明らかとなった。一方で, 魚粉 20%飼料と同様に植物性原料主体で魚粉を代替した無魚粉 EP 飼料については, アミノ酸およびタウリンを補足してもなお, マダイ 0 才魚の摂餌および成長が低下することが示唆された。

要 約

植物性原料 (大豆油粕, コーングルテンミールおよび濃縮大豆タンパク) を配合し, リジン, メチオニン, タウリン等を補足した低・無魚粉 EP 飼料について, マダイ 0 才魚における利用性を検討した。

魚粉 50%, 20%および 0%の 3 区を設定し, 試験飼料をマダイ 0 才魚に 12 週間給餌して, 飼育成績, 血液性状および血漿成分を調査した。その結果, 魚粉 20%区では対照区と遜色ない飼育成績を示し, 血液性状および血漿成分の分析

値も概ね問題ないと考えられた。一方, 魚粉 0%区では成長の低下が認められ, それは摂餌性の低下が強く関連していることが示唆された。以上の結果から, マダイ 0 才魚においては, 魚粉 20%の低魚粉 EP 飼料を開発できることが明らかとなった。無魚粉飼料については, 摂餌性等の面で更なる改善が必要だと考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり, (株)長崎県漁業公社の皆様には, 供試魚の提供および運搬等についてのご協力をいただいた。この場を借りて深謝いたします。また, 飼育実験を手伝っていただきました阿部裕氏, および長崎県総合水産試験場関係者の皆様に感謝いたします。

文 献

- Aoki, H., Y. Sanada, M. Furuichi, R. Kimoto, M. Maita, A. Akimoto, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000a) Partial or complete replacement of fish meal by alternate protein sources in diets for yellowtail and red sea bream. *Suisanzoshoku*, 48, 53-63.
- Aoki, H., M. Furuichi, K. Watanabe, S. Satoh, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000b) Use of non-fish meal diets for red sea bream. *Suisanzoshoku*, 48, 65-72.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloan-Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- 池田彌生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎 (1986) 血液性状による診断法. 魚類血液図鑑, 309-310.
- Linn S. M, M. Ishikawa, S. Koshio, S. Yokoyama, T. Murata, Y. Hamasaki and L. Nankervis (2014) Effects of replacing fish meal with plant protein on growth performance, feed utilization and oxidative condition of red sea bream *Pagrus major*. *Aquacult.*

Sci. 62, 341-352.

Maita, M, J. Maekawa, K. Satoh, K. Futami, and S. Satoh (2006): Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fisheries Sci.*, 72, 513-519.

高木修作・細川秀毅・示野貞夫・舞田正志・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, 77-87.

高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治 (2000a) マダイ飼料におけるコーングルテンミールの利用. 日水誌, 66, 417-427.

高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治 (2000b) マダイ飼料におけるチキンミールの利用. 日水誌, 66, 428-438.

高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治 (2000c) マダイ 1 歳魚飼料におけるタンパク質源併用による魚粉の削減. 水産増殖, 48, 545-552.

Takagi, S., H. Murata, T. Goto, T. Ichiki, M. Endo, H. Hatate, T. Yoshida, T. Sakai, H. Yamashita and M. Ukawa (2006) Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries. Sci.*, 72, 1191-1199.

Takii, K., K. Konishi, M. Ukawa, M. Nakamura and H. Kumai (1997) Comparison of digestive and absorptive functions between tiger puffer and red sea bream. *Fisheries. Sci.* 63, 349-354.

山岡鉄也 (2016) 魚粉～魚粉の種類と需給の現状～. 養殖ビジネス, 臨時増刊号, 24-29.

Table 1. Ingredients and proximate composition of the experimental diets

	FM50	FM20	FM0
<i>Ingredients (% wet matter)</i>			
Anchovy meal	50.0	20.0	-
Soybean meal	11.0	19.0	16.0
Soy protein concentrate	-	6.0	21.0
Corn gluten meal	-	19.0	26.0
Krill meal	-	2.0	3.0
Wheat flour	14.5	12.4	8.8
Tapioca starch	5.0	5.0	5.0
Rice bran	7.5	-	-
Fish oil	9.0	10.7	12.0
Taurine	-	0.3	0.5
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	-	1.5	2.5
Vitamin mixture ¹	2.0	2.0	2.0
Mineral mixture ²	1.0	1.0	1.0
Others ³	-	1.1	2.2

Proximate composition

Protein (% Dry matter)	49.1	50.0	48.7
Lipid (% Dry matter)	15.9	13.0	15.2
Moisture (%)	20.3	20.8	23.0
Ash (% Dry matter)	10.4	7.8	6.5
Taurine (mg/g Dry matter)	1.76	4.17	5.45

- 1 Vitamin mixture composition (unit/kg mix): vitamin A, 1,000,000 IU; cholecalciferol, 125,000IU; vitamin E, 10 g; menadione sodium bisulfite, 0.5 g; thiamin nitrate, 1.0 g; riboflavin, 1.0 g; pyridoxine hydrochloride, 1.0 g; nicotinic acid, 1.29 g; calcium pantothenate, 2.5 g; biotin, 0.05 g; folic acid, 0.25 g; cyanocobalamin, 0.02 g; inositol, 40 g; choline chloride, 250 g; sodium-calcium-L-ascorbic acid-2-phosphate ester, 142.9 g.
- 2 Mineral mixture composition (unit/kg mix): copper sulfate exsiccated, 1.4 g; manganese sulfate, 11.3 g; zinc sulfate, 15.7 g; cobalt sulfate exsiccated, 0.05 g; calcium iodate, 0.29 g; aluminium hydroxide, 0.49 g; magnesium sulfate, 96.9 g, ferrous fumarate, 39.6 g.
- 3 Lysine (0.5-1.0%), Methionine (0.25-0.5%), Tryptophan (0.1-0.2%), Threonine (0.25-0.5%)

Table 2. Essential amino acid composition of the experimental diets

	FM50	FM20	FM0
<i>Amino acid (mg/g dry matter)</i>			
Threonine	20.6	21.3	21.8
Valine	23.8	22.1	20.3
Methionine	13.2	13.4	13.9
Isoleucine	20.3	19.7	18.3
Leucine	36.5	49.0	49.1
Phenylalanine	20.7	24.6	25.1
Histidine	14.7	12.8	11.2
Lysine	34.9	28.9	27.9
Tryptophan	6.1	5.9	6.5
Arginine	29.6	25.8	25.2

Table 3. Daily feed intake and growth performance of red sea bream in the experiment

	FM50	FM20	FM0
Initial weight (g)	107.9 ± 12.29 ^a	108.6 ± 8.61 ^a	106.1 ± 16.94 ^a
Final weight (g)	181.2 ± 25.48 ^{ab}	196.9 ± 23.97 ^a	170.5 ± 48.72 ^b
Feed conversion ratio ¹	1.83 ± 0.02 ^a	1.58 ± 0.14 ^a	1.59 ± 0.05 ^a
Specific growth rate (%) ²	0.62 ± 0.01 ^{ab}	0.73 ± 0.07 ^a	0.57 ± 0.03 ^b
Growth rate (%) ³	68.0 ± 1.57 ^{ab}	82.2 ± 9.51 ^a	60.7 ± 3.52 ^b
Daily feed intake (%/day) ⁴	1.12 ± 0.01 ^a	1.10 ± 0.01 ^a	0.89 ± 0.01 ^b
Protein efficiency ratio ⁵	0.89 ± 0.01 ^a	1.01 ± 0.09 ^a	1.00 ± 0.03 ^a
Mortality (%) ⁶	0.0 ± 0.00 ^a	0.5 ± 0.72 ^a	0.0 ± 0.00 ^a

*Values (means±S.D. of duplicate groups) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

¹ Feed intake (dry matter)/weight gain.

² $100 \times (\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) / \text{feeding days}$.

³ $100 \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight}) / \text{initial body weight}$.

⁴ $\text{Feed intake (dry matter)} \times 100 / [(\text{initial fish weight} + \text{final fish weight} + \text{dead fish weight}) \times \text{feeding days} \times 2]$.

⁵ weight gain/protein intake (dry matter).

⁶ $100 \times \text{dead fish number} / \text{initial fish number}$

Table 4. Hematocrit value and plasma components of red sea bream in the experiment

	FM50	FM20	FM0
Hematocrit value (%)	37.2 ± 1.79 ^a	36.8 ± 2.49 ^a	32.2 ± 8.04 ^a
Plasma components			
Total cholesterol (mg/dl)	229 ± 50 ^a	132 ± 27 ^b	148 ± 40 ^b
Total protein (g/dl)	3.5 ± 0.2 ^a	3.4 ± 0.4 ^a	3.0 ± 0.4 ^a
Triglyceride (mg/dl)	107 ± 28 ^a	117 ± 43 ^a	112 ± 17 ^a
Glucose (mg/dl)	48.6 ± 37.4 ^a	11.6 ± 6.9 ^b	14.8 ± 7.0 ^b
Urea nitrogen (mg/dl)	4.5 ± 0.9 ^a	3.8 ± 0.5 ^a	4.2 ± 1.1 ^a

*Values (means±S.D. of 5 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

第1章 マダイ用低・無魚粉飼料の有効性検討

第2節 マダイ1才魚における低・無魚粉EP飼料の有効性検討

前節では、マダイ0才魚に対する低・無魚粉EP飼料の有効性を検討した。マダイ1才魚における魚体の増重量および給餌量は、0才魚に比べて多いので、餌代および魚粉の消費量を削減するためには1才魚に対する低・無魚粉飼料の開発がより重要である。今までの研究により、マダイ1才魚については、濃縮大豆タンパク質単独の配合許容量が50%であること、コーングルテンミールは魚粉の70%を代替可能であること、チキンミールを主原料とすることにより魚粉の90%~100%を代替可能であることが報告されている(高木ら 1999, 2000a, 2000b, 2000c)。また、飼料中の魚粉を植物性原料で代替した場合にはマダイでタウリン不足による緑肝症が発症したものの、飼料にタウリンを補足することでその症状が改善したことが報告されている(Takagi et al. 2006)。

このように、マダイ1才魚の魚粉削減飼料に関する研究事例、ならびに動物性タンパク原料を併用した魚粉削減飼料の可能性を示唆する知見は多くあるものの、大豆油粕、コーングルテンミール等の植物性原料主体で代替し、タウリンを補足した低・無魚粉飼料についての飼育を報告した事例は少ない。限りある資源を有効活用して人類のタンパク質源を安定的に供給するためには、植物性原料主体で養魚用飼料中の魚粉を代替することが望ましい。そこで本研究では、大豆油粕、コーングルテンミールおよびタウリンを配合した低・無魚粉飼料のマダイ1才魚における利用性を16週間の飼育試験により検討した。

材料および方法

試験区の設定、試験飼料の配合組成および成分

分析

試験区として魚粉50%区、魚粉25%区および魚粉0%区の3区を設定し、試験飼料には日清丸紅飼料(株)で作製された直径6mmのエクストルーデッド飼料(EP)を用いた。試験飼料の粗タンパク質は、ケルダール法により窒素タンパク質換算係数を6.25として測定した。粗脂肪含量は、クロロホルム:メタノール(2:1)混合抽出法(Folch et al. 1957)により求めた。粗灰分は電気炉を用いて650°Cで8時間灰化して求め、水分はインキュベーターを用いて常圧加熱乾燥法により約110°Cで加熱して測定した。構成アミノ酸および遊離アミノ酸は、アミノ酸分析装置(日本電子株式会社, JLC-500/v)を用いて測定した。アミノ酸分析装置のカラムにはイオン交換樹脂を充填した多段式カラム(4mmφ×120mm)を用い、検出器の測定波長に440, 570, 690nmを採用し、発色試薬にニンヒドリン試薬を用いた。試験飼料のコレステロール量は、(一財)日本食品分析センターへガスクロマトグラフ法による分析を委託した。

飼育試験に用いた各試験飼料の配合組成および成分分析結果をTable 1, Table 2に示す。魚粉25%区および魚粉0%区については、魚粉代替原料として、コーングルテンミールおよび大豆油粕を計31~56%、チキンミールおよびフェザーミールを計12~13%配合し、併せて、タウリンおよび4種類の必須アミノ酸(リジン, メチオニン, トリプトファン, スレオニン)も配合した。成分分析の結果、無魚粉飼料の粗タンパクおよび粗脂肪量が魚粉50%と魚粉25%飼料に比べてやや低い値を示したが、魚粉50%飼料と魚粉25%飼料の一般成分は概ね類似していた。魚粉50%飼料については、タウリン量が魚粉25%および0%飼料に比べて少ない値を示した。各試験飼料に含まれるコレステロール量は、魚粉量の削減に伴い低下する傾向を示した。また、魚粉25%および魚粉0%飼料に含まれる必須アミノ酸の量は、バリン, イソロイシン, ヒスチジン, リジンおよびアルギニンが魚粉50%飼料

に比べてやや低い値を示した。

供試魚および飼育方法

供試魚は、長崎県内の養殖業者から入手したマダイ 1 才魚を用いた。長崎県総合水産試験場の海面小割生簀 (3 m×3 m×3 m) で市販飼料 (日清丸紅飼料, マダイ EP しらぬい 40-6 号) を給餌して 2 ヶ月間予備飼育した後, 平均体重 601~623 g に達したマダイ 1 才魚を各生簀 25 尾ずつ 6 生簀に収容し, 飼育試験を実施した。飼育試験は 2 反復で行い, 飼育期間は 16 週間とした。給餌頻度は 1 日 1 回週 4 回を基本とし, ほぼ飽食量を与えた。4 週間毎に供試魚全個体の尾叉長および体重を測定した。

検体採取, 血液性状および血漿化学成分分析

飼育終了後, 各生簀から 5 尾 (10 尾/区) を無作為に取り上げ, 生きた状態で直ちに尾部血管から血液を採取し, 血液性状および血漿成分の分析に供した。なお, 血液採取の際は, 抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを用いた。採取した魚体は, 尾叉長および体重の測定を行った後解剖し, 肥満度, 内臓重量率 (心臓および腎臓以外の腹腔内に存在する臓器および脂肪の総重量が体重に占める割合), 比肝重の測定に供した。血液は, 採取後直ちにヘモグロビン量 (Hb) およびヘマトクリット値の測定を行ない, その後血漿を採取し血漿成分の分析を行った。なお血漿成分は, 総コレステロール (TCHO), 総タンパク (TP), アルブミン (ALB), トリグリセライド (TG), グルコース (GLU), GOT, GPT, 総ビリルビン (TBIL), および尿素窒素 (BUN) の濃度を分析した。ヘマトクリット値はヘマトクリット遠心機 (HITACHI, HEMATOCRIT MC-201), Hb 量および血漿成分は生化学自動分析装置 (富士フィルム株式会社, 富士ドライケム 7000) を用いて測定した。

統計処理

飼育成績の各項目, 魚体の肥満度, 内臓重量

率, 比肝重, 血液性状および血漿化学成分は, 一元配置の分散分析に引き続き Fisher の PLSD 法を実施し, Stat-view5.0 を用いて危険率 5%における有意差を判定した。

結 果

飼育成績

飼育期間中の水温は 20.9~27.5°Cの間で推移した。試験期間中の飼育成績を Table 3 に示す。全ての試験区で死魚および衰弱魚はみられなかった。各区の日間増重率は, 魚粉 50%区が 0.62%, 魚粉 25%区が 0.65%, 魚粉 0%区が 0.59%であり, 魚粉 25%区>魚粉 50%>魚粉 0%区の順に高く, 各区間で統計的な有意差が認められた ($P < 0.05$)。終了時における各区の平均体重は, 魚粉 50%区が 1207 g, 魚粉 25%区が 1295 g, 魚粉 0%区が 1165 g であり, 日間増重率と同様に, 各区間で統計的な有意差が認められた ($P < 0.05$)。増肉係数は, 魚粉 50%区が 1.71, 魚粉 25%区が 1.50, 魚粉 0%区が 1.68 であり, 魚粉 25%区が魚粉 50%区および魚粉 0%区に比べて有意に低い値を示した。日間給餌率は, 魚粉 50%区が 1.02, 魚粉 25%区および魚粉 0%区が 0.94 であり, 魚粉 50%区が魚粉 25%区および魚粉 0%区に比べて有意に高い値を示した。PER は, 魚粉 50%区が 1.20, 魚粉 25%区が 1.33, 魚粉 0%区が 1.27 であり, 魚粉 25%区>魚粉 0%>魚粉 50%区の順に高く, 各区間で統計的な有意差が認められた ($P < 0.05$)。

魚体の肥満度, 内臓重量率および比肝重値

飼育試験終了時に採取した魚体の肥満度, 内臓重量率, および比肝重の測定結果を Table 4 に示す。肥満度および内臓重量率は, 魚粉 0%区が魚粉 50%区および魚粉 25%区に比べて有意に低い値を示した。比肝重は, 魚粉 50%区が魚粉 25%区および魚粉 0%区に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。

血液性状および血漿化学成分

飼育試験終了時に採取した血液について、血液性状および血漿成分の分析結果を Table 5 に示す。血液のヘマトクリット値およびHb量は、各区間で統計的な有意差が認められなかった。血漿 TCHO 値は、魚粉 50%区が魚粉 25%および魚粉 0%区に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。TCHO 値以外の血漿成分 (TP, ALB, TG, GLU, GOT, GPT, TBIL, BUN) については、各区間で統計的な有意差が認められなかった。

考 察

本研究では、2種類の植物性原料(大豆豆粕, コーングルテンミール)を主な魚粉代替原料として配合し、チキンミール, フェザーミールの他、タウリン, リジン, メチオニン, トレオニン, トリプトファンを配合した低・無魚粉 EP 飼料について、マダイ 1 才魚における利用性を検討した。その結果、魚粉 25%飼料については、摂餌性が魚粉 50%飼料に比べてやや劣ったものの、日間増重率および増肉係数はむしろ優れる値を示した。このことから、今回用いた魚粉 25%飼料のマダイ 1 才魚における利用性は、魚粉 50%飼料に比べて優れていることが示唆された。高木ら (1999, 2000a, 2000c) は、マダイ 1 才魚の濃縮大豆タンパク, コーングルテンミール, チキンミールの利用性, およびそれらの代替原料を併用した場合の効果について検討した結果、マダイ 1 才魚は 0 才魚に比べて濃縮大豆タンパク, コーングルテンミールおよびチキンミールの配合許容量が多く、その原因として必須アミノ酸の要求量が 0 才魚に比べて低い可能性を考察している。本研究で用いた魚粉 25%飼料のバリン, イソロイシン, ヒスチジン, リジン, アルギニンの含有量は魚粉 50%飼料に比べて少ない傾向であったが、魚粉 25%区の飼育成績は優れる傾向であり、このことは前述した高木ら (1999, 2000a, 2000c) の見解を支持する結果だ

と考えられる。また、高木ら (2000b) は、各種代替原料を併用することにより、植物性原料由来の難消化性糖質や抗栄養因子の量を低くおさえる効果が見込まれ、魚粉主体飼料に劣らない高性能な低魚粉飼料の開発が可能であることを指摘している。本研究における魚粉 25%区の結果は、この見解とも矛盾しない結果であると考えられる。その一方で、本研究で魚粉 25%区におけるマダイの日間増重率および増肉係数が魚粉 50%区に比べて優れる結果であった理由は、現状では不明である。本研究で用いた魚粉 25%飼料のタウリン量は 6.07 mg/g であり、魚粉 50%飼料の 3.56 mg/g に比べて多いことが確認された。マダイ仔魚では、餌料のタウリン強化により成長および飢餓耐性を向上する効果が報告されている (陳ら 2004)。また、マダイ稚魚に対してカゼイン飼料を給餌した実験では、タウリン添加区の成長および飼料効率が無添加区に比べて有意に改善し、マダイ稚魚におけるカゼイン飼料に対するタウリンの必要量は 0.5%以上であると考えられている (Matsunari et al. 2008)。このように、タウリンの飼餌料への添加によりマダイの飼育成績が改善する報告は複数あることから、本研究で魚粉 25%区の日間増重率および増肉係数が魚粉 50%区に対して優れた原因の 1 つが、飼料中のタウリン量に影響された可能性は考えられる。また、第 1 節のマダイ 0 才魚を対象とした実験における試験飼料のタウリン分析値は、魚粉 50%飼料が 1.76 mg/g であり、本研究で用いた魚粉 50%飼料の 3.56 mg/g と比べて更に少ないことから、配合する魚粉そのものの品質によってタウリン量等が変動する可能性も想定され、飼料中のタウリン量がマダイ成魚の飼育成績へ及ぼす影響については、今後の検討課題だと考えられる。

魚粉 0%飼料については、摂餌性および日間増重率が魚粉 50%飼料に比べて劣る傾向であり、増肉係数は同等の値を示した。このことから、今回用いた魚粉 0%飼料のマダイ 1 才魚におけ

る利用性は、特に摂餌性の面で改善が必要であると考えられた。無魚粉飼料のマダイ1才魚における摂餌性が魚粉主体飼料に比べて明確に劣る結果は、高木ら(1999, 2000a, 2000b)の研究と類似している。高木ら(1999, 2000a, 2000b)の研究では、植物性原料(濃縮大豆タンパク、大豆油粕およびコーングルテンミール)を合計44~55%、動物性原料(オキアミミールおよびチキンミール)を10~25%配合して作製した無魚粉飼料のマダイ1才魚における利用性を検討している。無魚粉飼料の摂餌および成長が劣った原因について、高木ら(1999, 2000a, 2000b)は、濃縮大豆タンパクまたはコーングルテンミールの配合量を多くすることにより、リジンおよびメチオニンが不足し、魚体内でのアミノ酸合成が効率的に行われないうこと等、無魚粉飼料のアミノ酸組成に問題があったことを考察している。本研究で用いた魚粉0%飼料のアミノ酸組成は、バリン、イソロイシン、ヒスチジン、リジン、アルギニンが魚粉50%飼料に比べてやや低い値を示しており、アミノ酸組成に問題があった可能性は否定できない。しかし、魚粉0%飼料と同じく数種類のアミノ酸分析値が魚粉50%飼料に比べて低い傾向を示した魚粉25%飼料については、前述のとおり魚粉50%区に優る飼育成績を示していること、高木ら(1999, 2000a, 2000b)の研究では増肉係数の悪化も魚粉0%区で生じていたことから、本研究における魚粉0%飼料の摂餌低下の原因がアミノ酸組成だけであるとは考えにくい。高木ら(2000c)は、チキンミールのみで魚粉を代替した魚粉0%飼料がマダイ1才魚において魚粉主体飼料と遜色ない摂餌性および増肉係数を示したことを報告し、その理由として、チキンミール中にトリプシンインヒビター等の抗栄養因子や難消化性糖質が含まれない、もしくは少ないことを考察している。本研究で用いた魚粉0%飼料については、大豆油粕およびコーングルテンミールを合計66%配合しており、抗栄養因子や難消化性物質の影響を受けていた可能性は想定され、魚粉0%

飼料のマダイ1才魚における摂餌性の低下と抗栄養因子または難消化性物質の関連性については、今後検討する必要があると考えられる。低・無魚粉飼料を給餌したマダイ1才魚の血液性状および血漿成分は、魚粉主体飼料に比べて概ね明確な違いが認められなかったが、血漿TCHO値が有意に低い結果を示した。血漿TCHO値は、体外から摂取する外因性コレステロールと体内で合成される内因性コレステロールの総和を反映して変動することが知られている。また、ブリでは血漿TCHO値が著しく低い場合、貧血および抗病性の低下につながる可能性が報告されている(Maita et al. 2006)。本研究では、試験飼料に含まれるコレステロール量が魚粉量の削減に伴い減少する傾向を示したが、飼育実験中における供試魚の衰弱、死亡および貧血は全く確認されなかった。このことから、本研究で観察された血漿TCHOの低下は、少なくとも試験期間中の生残率や魚の健康状態に影響しなかったことが考えられた。

魚体の解剖および臓器重量の測定結果から、低・無魚粉飼料区では魚粉主体飼料区に比べて肥満度、内臓重量率および比肝重が減少する傾向を示した。また、飼育試験終了時に採取したマダイは、全ての試験区で腹腔内脂肪の貯留が確認された。これらの現象および試験飼料のコレステロール量の分析結果から、飼料中のコレステロール量の違いが魚体内での脂質代謝に影響を及ぼし、肝臓の大きさや腹腔内脂肪の量の変化につながった可能性は考えられるが、本研究の結果だけでは不明確であり、今後の検討課題だと考えられる。

以上の結果から、大豆油粕、コーングルテンミール、チキンミールおよびフェザーミールをバランス良く配合し、リジン、メチオニンおよびタウリン等を補足した魚粉25%EP飼料は、マダイ1才魚における利用性が魚粉主体飼料と比較してむしろ優れる可能性が示唆された。一方で、魚粉25%飼料と同様に植物性原料主体で魚粉を代替した魚粉0%EP飼料については、ア

ミノ酸およびタウリンを補足してもなお、マダイ1才魚の摂餌および成長が魚粉主体飼料に及ばないことが示唆された。今後は、無魚粉飼料がマダイの摂餌低下を引き起こす原因について更に検討し、マダイにおける無魚粉飼料の利用性を改善する方法を模索していきたい。

要 約

植物性原料（大豆油粕，コーングルテンミール，チキンミールおよびフェザーミール）を配合し、リジン，メチオニン，タウリン等を補足した低・無魚粉 EP 飼料について，マダイ1才魚における利用性を検討した。

魚粉 50%，25%，0%の3区を設定し，試験飼料をマダイ1才魚に16週間給餌して，飼育成績，血液性状および血漿成分等を調査した。その結果，魚粉25%区では対照区よりも優れる飼育成績を示し，血液性状および血漿成分の分析値も概ね問題ないと考えられた。一方，魚粉0%区では成長の低下が認められ，それは摂餌性の低下が強く関連していることが示唆された。以上の結果から，マダイ1才魚においては，魚粉25%の低魚粉 EP 飼料を開発できることが明らかとなった。無魚粉飼料については，摂餌性等の面で更なる改善が必要だと考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり，有馬屋水産（株）には，供試魚の提供および運搬等についてのご協力をいただいた。この場を借りて深謝いたします。また，飼育実験を手伝っていただきました西澤央騎氏，服部広大氏，および長崎県総合水産試験場関係者の皆様に感謝いたします。

文 献

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloan-Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of

total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.

Maita, M, J. Maekawa, K. Satoh, K. Futami, and S. Satoh (2006): Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fisheries Sci.*, 72, 513-519.

Matsunari, H., H. Furuita, T. Yamamoto, S.-K. Kim, Y. Sakakura and T. Takeuchi (2008) Effect of dietary taurine and cysteine on growth performance of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 274, 142-147.

高木修作・細川秀毅・示野貞夫・舞田正志・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，47，77-87.

高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治（2000a）マダイ飼料におけるコーングルテンミールの利用．日水誌，66，417-427.

高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治（2000b）マダイ稚魚飼料におけるタンパク質源併用による魚粉の削減．水産増殖，48，523-530.

高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治（2000c）マダイ1歳魚飼料におけるタンパク質源併用による魚粉の削減．水産増殖，48，545-552.

Takagi, S., H. Murata, T. Goto, M. Endo, H. Hatate, T. Yoshida, T. Sakai, H. Yamashita and M. Ukawa (2006) Efficiency of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream, *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Sci.* 72, 1191-1199.

陳昭能・竹内俊郎・高橋隆行・友田努・小磯雅彦・桑田博（2004）マダイ仔魚の成長および飢餓耐性に及ぼすタウリン強化ワムシの効果．日水誌，70，542-547.

Table 1. Ingredients and proximate composition of the experimental diets

	FM50	FM25	FM0
<i>Ingredients (g / 100 g wet matter)</i>			
Anchovy meal	50.00	25.00	-
Soybean meal	4.00	15.00	25.00
Soy protein concentrate	-	-	-
Corn gluten meal	4.00	16.00	31.00
Poultry by-product meal	-	8.00	7.00
Feather meal	-	4.00	6.00
Wheat flour	9.00	8.00	3.30
Tapioca starch	7.00	7.00	7.00
Rice bran	12.00	-	-
Fish oil	11.00	8.00	10.00
Palm oil	-	3.00	2.00
Taurine	-	0.50	1.00
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	-	1.50	2.70
Vitamine mixture ¹	2.00	2.00	2.00
Mineral mixture ²	1.00	1.00	1.00
L-Lysine	-	0.45	0.90
L-Methionine	-	0.23	0.46
L-Threonine	-	0.23	0.46
L-Tryptophan	-	0.09	0.18
<i>Externally added</i>			
Soybean oil (g / 100g wet matter)	-	-	-
Skipjack peptide ³ (g / 100g wet matter)	-	0.50	0.50
Enzyme complex ⁴ (g / 100g wet matter)	-	0.20	0.20
Astaxanthin (ppm)	-	40.00	40.00
<i>Proximate composition</i>			
Protein (% Dry matter)	45.4	46.2	44.0
Lipid (% Dry matter)	15.8	16.1	14.8
Moisture (%)	7.3	7.6	6.6
Taurine (mg / g Dry matter)	3.56	6.07	8.37
Cholesterol (mg / 100g Dry matter)	376.5	218.6	127.7

¹ See Takagi et al. (2005)² See Takagi et al. (2005)³ Marubeni Nisshin Feed Co., Ltd.⁴ Alltech.

Table 2. Essential amino acid composition of the experimental diets

	FM50	FM25	FM0
<i>Amino acid (mg/g dry matter)</i>			
Threonine	14.1	13.6	13.0
Valine	18.1	14.0	12.4
Methionine	8.1	8.6	8.3
Isoleucine	11.7	8.5	7.5
Leucine	26.4	28.9	31.0
Phenylalanine	14.0	14.8	14.5
Histidine	10.5	7.8	5.3
Lysine	23.2	18.8	14.8
Tryptophan	1.9	2.4	2.4
Arginine	19.2	17.2	12.6

Table 3. Daily feed intake and growth performance of red sea bream in the experiment

	FM50	FM25	FM0
Initial weight (g)	601 ± 9.62 ^a	623 ± 5.37 ^a	603 ± 8.56 ^a
Final weight (g)	1207 ± 2.19 ^b	1295 ± 6.65 ^a	1165 ± 10.68 ^c
Feed conversion ratio ¹	1.71 ± 0.02 ^a	1.50 ± 0.00 ^b	1.68 ± 0.01 ^a
Specific growth rate (%) ²	0.62 ± 0.02 ^b	0.65 ± 0.01 ^a	0.59 ± 0.00 ^c
Daily feed intake (%/day) ³	1.02 ± 0.01 ^a	0.94 ± 0.01 ^b	0.94 ± 0.01 ^b
Protein efficiency ratio ⁴	1.20 ± 0.02 ^c	1.33 ± 0.00 ^a	1.27 ± 0.01 ^b
Mortality (%) ⁵	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00

*Values (means±S.D. of duplicate groups) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

¹ Feed intake (dry matter)/weight gain.

² $100 \times (\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) / \text{feeding days}$.

³ $\text{Feed intake (dry matter)} \times 100 / [(\text{initial fish weight} + \text{final fish weight} + \text{dead fish weight}) \times \text{feeding days} \times 2]$.

⁴ Weight gain/protein intake (dry matter).

⁵ $100 \times \text{dead fish number} / \text{initial fish number}$

Table 4. Condition factor and relative weights of internal organs to body weights (%) in red sea bream fed the test diets in the experiment

	FM50	FM25	FM0
Condition factor ¹	24.9 ± 1.98 ^a	24.3 ± 1.28 ^a	22.6 ± 1.02 ^b
Viscerosomatic index ²	12.6 ± 1.63 ^a	11.4 ± 1.80 ^a	9.4 ± 1.28 ^b
Hepatosomatic index ³	1.84 ± 0.25 ^a	1.52 ± 0.16 ^b	1.40 ± 0.22 ^b

*Values (means±S.D. of 10 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

¹ $\text{Body weight (g)} / \text{Fork length (cm)}^3 \times 10^3$.

² $\text{Total weight of internal organs (g)} / \text{body weight (g)} \times 100$.

³ $\text{Liver weight (g)} / \text{body weight (g)} \times 100$.

Table 5. Hematocrit value, hemoglobin content and plasma components of red sea bream in the experiment

	FM50	FM25	FM0
Hematocrit value (%)	34.0 ± 3.4 ^a	33.1 ± 3.9 ^a	32.5 ± 5.8 ^a
Hemoglobin content (g/dl)	9.2 ± 0.6 ^a	9.1 ± 1.1 ^a	9.0 ± 1.2 ^a
Plasma components			
Total cholesterol (mg/dl)	191 ± 27 ^a	140 ± 22 ^b	126 ± 26 ^b
Total protein (g/dl)	4.3 ± 0.3 ^a	4.1 ± 0.3 ^a	4.0 ± 0.4 ^a
Albumin (g/dl)	0.8 ± 0.09 ^a	0.8 ± 0.07 ^a	0.7 ± 0.11 ^a
Triglyceride (mg/dl)	139 ± 17 ^a	140 ± 24 ^a	138 ± 18 ^a
Glucose (mg/dl)	50 ± 5.3 ^a	47 ± 4.2 ^a	51 ± 2.8 ^a
GOT (AST) (U/l)	49 ± 37 ^a	27 ± 19 ^a	46 ± 53 ^a
GPT (ALT) (U/l)	3.3 ± 1.0 ^a	3.1 ± 1.1 ^a	3.7 ± 2.4 ^a
Total bilirubin (mg/dl)	0.1 ± 0.00 ^a	0.1 ± 0.00 ^a	0.1 ± 0.03 ^a
Urea nitrogen (mg/dl)	3.1 ± 0.5 ^a	3.6 ± 0.4 ^a	3.3 ± 1.0 ^a

*Values (means±S.D. of 10 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

第2章 マダイ用無魚粉飼料に対する酵素混合物添加効果

第1節 マダイ0才魚における無魚粉EP飼料への酵素混合物添加効果

前章では、マダイ用無魚粉飼料の開発に向けた課題の1つとして、摂餌性の低下を克服する必要性が確認された。植物性原料中には、プロテアーゼインヒビター、フィチン、難消化性物質等の抗栄養因子が含まることが知られており（山本 2009）、過去にはフィチンを分解する酵素フィターゼの活用により、マダイにおける植物性原料の利用性を改善できることが報告されている（Biswas et al. 2007）。また、フィターゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、 β -グルカナーゼ、キシラナーゼおよび α -アミラーゼを含む酵素混合物（以下、酵素とする）を低魚粉飼料へ添加することにより、マダイ0才魚の成長が改善されたことも報告されている（Hanini et al. 2013）。このように、酵素の活用によって低魚粉飼料の利用性が期待されるが、マダイで無魚粉飼料に対する添加効果を検討した報告はない。

そこで本研究では、マダイ0才魚における無魚粉EP飼料の利用性を改善するために、酵素混合物の添加効果を検討した。なお、本研究で用いた酵素は、Hanini et al. (2013) が検討したものと同一のフィターゼ、プロテアーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、 β -グルカナーゼ、キシラナーゼおよび α -アミラーゼを含むオルテック社製の混合飼料（商品名 SSF）とした。

材料および方法

試験区の設定、試験飼料の配合組成および成分分析

試験区として魚粉50%区（FM50）、魚粉0%区（FM0）、魚粉0%+酵素区（FM0S）の3区を設定し、試験飼料には中部飼料（株）で作製

された直径5mmのEP飼料を用いた。粗タンパク質は、ケルダール法により窒素タンパク質換算係数を6.25として測定した。粗脂肪含量は、クロロホルム：メタノール（2:1）混合抽出法（Folch et al. 1957）により求めた。粗灰分は電気炉を用いて650°Cで8時間灰化して求め、水分はインキュベーターを用いて常圧加熱乾燥法により約110°Cで加熱して測定した。構成アミノ酸および遊離アミノ酸は、アミノ酸分析装置（日本電子株式会社、JLC-500/v）を用いて測定した。アミノ酸分析装置のカラムにはイオン交換樹脂を充填した多段式カラム（4mm ϕ ×120mm）を用い、検出器の測定波長に440, 570, 690nmを採用し、発色試薬にニンヒドリン試薬を用いた。

飼育試験に用いた各試験飼料の配合組成および成分分析結果をTable 1, Table 2に示す。魚粉0%区および魚粉0%+酵素区については、魚粉代替原料として、コーングルテンミール、濃縮大豆油粕および濃縮大豆タンパクを計69%配合し、併せて、タウリン、リジンおよびメチオニンも配合した。成分分析の結果、魚粉50%区の粗脂肪量が魚粉0%区と魚粉0%+酵素区に比べてやや高い値を示したが、粗タンパク量は各区とも概ね類似していた。魚粉50%区のタウリン量は、魚粉0%区および0%+酵素区に比べて少ない値を示した。また、魚粉0%区および魚粉0%+酵素区に含まれる必須アミノ酸の量は、スレオニンおよびアルギニンが魚粉50%区に比べてやや低い値を示した。

供試魚および飼育方法

供試魚は、長崎県内の種苗生産業者から入手したマダイ0才魚を用いた。長崎県総合水産試験場の海面生簀（3m×3m×3m）で市販飼料（林兼産業、ノヴァEP3号）を給餌して2ヶ月間予備飼育した後、平均体重61.4~62.0gに達したマダイ0才魚を各生簀25尾ずつ6生簀（1.5m×1.5m×2m）に収容し、飼育試験を実施した。飼育試験は2反復で行い、飼育期間は12

週間とした。給餌頻度は1日1回週5回を基本とし、ほぼ飽食量を与えた。4週間毎に供試魚全個体の尾叉長および体重を測定した。

検体採取，血液性状および血漿化学成分分析

飼育終了後，各区から5尾を無作為に取り上げ，生きた状態で直ちに尾部血管から血液を採取し，血液性状および血漿成分の分析に供した。魚体は採取後直ちに冷凍庫へ運搬し，成分分析直前まで -20°C の条件で冷凍保管した。なお，血液採取の際は，抗凝固剤としてヘパリンナトリウムを用いた。血液は，採取後直ちにヘマトクリット値を測定し，その後血漿の採取および血漿成分の分析を行った。なお血漿成分は，総コレステロール (TCHO)，総タンパク (TP)，アルブミン (ALB)，トリグリセライド (TG)，グルコース (GLU)，GOT，GPT，総ビリルビン (TBIL)，および尿素窒素 (BUN) の濃度を分析した。ヘマトクリット値はヘマトクリット遠心機 (HITACHI, HEMATOCRIT MC-201)，Hb 量および血漿成分は生化学自動分析装置 (富士フィルム株式会社，富士ドライケム 7000) を用いて測定した。魚体は，超遠心粉碎機 (Retch 社，ZM200) でミンチ状にした後，一般成分，リン含量，およびアミノ酸組成を分析した。乾燥させる必要がある試料は，真空凍結乾燥機 (共和真空技術株式会社製，共和式凍結乾燥装置 RLE II -206) を用いて凍結乾燥した。

統計処理

平均体重，増肉係数，日間増重率，日間給餌率，タンパク質効率 (PER) および死亡率は，一元配置の分散分析に引き続き Fisher の PLSD 法を実施し，Stat-view5.0 を用いて危険率 5% における有意差を判定した。

結 果

飼育成績

飼育期間中の水温は $17.3\sim 27.3^{\circ}\text{C}$ の間で推移

した。試験期間中の飼育成績を Table 3 に示す。魚粉 0%+酵素区で2尾死亡したが (累積死亡率 4%)，その他の試験区では死魚および衰弱魚がみられず，魚病の発生は認められなかった。各区の日間増重率は，魚粉 50%区が 1.20%，魚粉 0%区が 0.92%，魚粉 0%+酵素区が 0.93% であり，魚粉 50%区が魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。終了時における各区の平均体重は，魚粉 50%区が 170.2 g，魚粉 0%区が 132.8 g，魚粉 0%+酵素区が 134.2 g であり，日間増重率と同様に，魚粉 50%区が魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。増肉係数は，魚粉 50%区が 1.65，魚粉 0%区が 1.90，魚粉 0%+酵素区が 1.82 であり，魚粉 50%区が魚粉 0%区に比べて有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。日間給餌率は，魚粉 50%区が 1.83，魚粉 0%区が 1.66，魚粉 0%+酵素区が 1.59 であり，各区間で有意差が認められ ($P < 0.05$)，特に魚粉 50%区の他の2試験区に比べて高い傾向であった。なお，魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区においては，一度咀嚼した飼料を吐き出し再び摂餌する行動がほぼ毎回観察されたが，魚粉 50%区ではそのような行動はほとんど認められなかった。PER は，魚粉 50%区が 1.28，魚粉 0%区が 1.12，魚粉 0%+酵素区が 1.14 であり，魚粉 50%区が魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。死亡率は，各区間で統計的な有意差が認められなかった。

血液性状および血漿化学成分分析

飼育試験終了時に採取した血液について，血液性状および血漿成分の分析結果を Table 4 に示す。血液のヘマトクリット値は，各区間で統計的な有意差が認められなかった。魚粉 50%区の血漿 TCHO 値は，魚粉 0%区に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。TCHO 値以外の血漿成分 (TP, ALB, TG, GLU, GOT, GPT, TBIL, BUN) については，各区間で統計的な有

意差が認められなかった。

魚体の一般成分，リン含量およびアミノ酸組成

飼育試験終了時に採取した魚体について，魚体の一般成分およびリン含量の分析結果を Table 5 に示す。脂質量は，魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区が魚粉 50%区およびに比べてやや少なく，水分量は魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区が魚粉 50%区に比べてやや多い傾向を示した。タンパク質量およびリン含量は，各区とも同等の値を示した。魚粉 0%区および魚粉 0%+酵素区の必須アミノ酸については，魚粉 50%区に比べて明確に少ない項目が認められなかった。

考 察

本研究では，3 種類の植物性原料（コーングルテンミール，大豆油粕，濃縮大豆タンパク）を魚粉代替原料として配合し，さらにタウリン，リジンおよびメチオニンを配合した無魚粉 EP 飼料に対する酵素の添加効果をマダイ 0 才魚について検討した。その結果，成長に関する項目（日間増重率，増肉係数，および PER）は魚粉 0%区と魚粉 0%+酵素区の間で統計的な有意差が認められず，両区とも魚粉 50%区に比べて劣る結果を示した。このことから，マダイ 0 才魚を無魚粉 EP 飼料で飼育する場合においては，酵素の添加による成長促進効果を期待できないことが示唆された。しかし，Hanini et al. (2013) は，植物性原料を配合した魚粉 20%飼料に対して酵素を添加することによりマダイ 0 才魚の摂餌，成長およびリンの蓄積を改善できる可能性を報告しており，この結論は本研究と異なっている。本研究および Hanini et al. (2013) の研究で用いた酵素は，前述のとおり，フィターゼ，プロテアーゼ，セルラーゼ，ペクチナーゼ， β -グルカナゼ，キシラナーゼおよびアミラーゼが含まれていることから，タンパク質消化促進の他，抗栄養因子の 1 つであるフィチン酸の分

解および難消化性多糖類の分解が期待される。本研究で用いた試験飼料は無魚粉 EP 飼料であることに対して，Hanini et al. (2013) の研究では魚粉量 20%のドライペレットを用いている。フィチン酸等の抗栄養因子が含まれる大豆油粕およびコーングルテンミールの配合量は，本研究が合計 43%，Hanini et al. (2013) の研究が合計 41%とほぼ同等であることから，両研究の結果の違いは，EP 飼料とドライペレットの違いに起因する可能性が考えられる。一般に EP 飼料は，エクストルーダー処理により植物性原料中のデンプン質の α 化，フィチン酸や抗原性物質等抗栄養因子の分解等が起こり，植物性原料に含まれる炭水化物やタンパク質の魚体内での利用性が高まることが知られている（山本 2009）。このことから，本研究で用いた試験飼料は，もともと Hanini et al. (2013) が用いた試験飼料に比べてフィチン酸等の抗栄養因子が少なかったため，本研究では酵素の明確な添加効果が認められなかったと推察される。本研究で試作された無魚粉 EP 飼料は，摂餌性および供試魚の飼育成績が魚粉 50%EP 飼料に比べて明確に劣っていたことから，更なる改善が必要だと考えられる。特に摂餌性については，給餌の際，マダイが咀嚼してから吐き出す行動が頻繁に観察されたことから，給餌ロスにつながり，増肉係数にも悪影響を及ぼしていた可能性が考えられ，今後優先的に解決すべき課題であると考えられる。

飼育期間中の生残率，血液性状および血漿成分の分析結果から総合的に判断して，本研究においては，無魚粉 EP 飼料の給餌によりマダイ 0 才魚の健康状態に悪影響を及ぼしていたとは考えにくい。しかし，終了時の血漿 TCHO 値は無魚粉 EP 飼料を給餌した試験区で魚粉 50%EP 飼料を給餌した対照区に比べて有意に低い値を示していること，ブリでは無魚粉飼料の給餌により血漿コレステロール値の低下，貧血および抗病性の低下が起こり得ることから (Maita et al. 2006)，無魚粉 EP 飼料の給餌がマダイの抗病

性に及ぼす影響については、更なる検討が必要であり、今後の課題であると考えられる。

要 約

植物性原料（コーングルテンミール、大豆油粕および濃縮大豆タンパク）を配合し、リジン、メチオニン、タウリンを補足した無魚粉 EP 飼料に対する酵素の添加効果について、マダイ 0 才魚で検討した。

魚粉 50%区、魚粉 0%区、0%+酵素区の 3 区を設定し、試験飼料をマダイ 0 才魚に 12 週間給餌して、飼育成績、血液性状および血漿成分を調査した。その結果、魚粉 0%区と魚粉 0%+酵素区共に、摂餌および飼育成績が魚粉 50%区に比べて劣る傾向であり、本研究で試作した無魚粉 EP 飼料に対する酵素の明確な添加効果は認められないことが示唆された。また、飼育期間中の生残率、血液性状および血漿成分の分析値は概ね問題ないと考えられたが、血漿 TCHO 値は魚粉 50%区に比べて有意に低い値を示していたことから、今後無魚粉 EP 飼料の給餌がマダイの抗病性へ及ぼす影響について更なる検討が必要だと考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、(株)長崎県漁業公社の皆様には、供試魚の提供および運搬等についてのご協力をいただいた。この場を借りて深謝いたします。また、飼育実験を手伝っていただきました飯野翔太氏、西澤央騎氏、および長崎県総合水産試験場関係者の皆様に感謝いたします。

文 献

秋元淳志 (1994) エクストルーダー処理による魚粉代替タンパク質の利用性改善. 新しい養魚飼料-代替タンパク質の利用 (渡邊 武 編), 恒

星社厚生閣, 東京, pp. 43-53.

Biswas, A. K., H. Kaku, S. C. Ji, M. Seoka and K. Takii (2007) Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 267, 284-291.

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloan-Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.

Hanini, I., Md. S. A. Sarker, S. Satoh, Y. Haga, S. Corneillie, T. Ohkuma and H. Nakayama (2013) Effects of taurine, phytase, and enzyme complex supplementation to low fish meal diets on growth of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquacult. Sci.* 61, 367-375.

Maita, M., J. Maekawa, K. Satoh, K. Futami, and S. Satoh (2006): Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fisheries Sci.*, 72, 513-519.

山本剛史 (2009) 原料の利用性改善. 改訂魚類の栄養と飼料 (渡邊 武 編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 326-342.

Table 1. Ingredients and proximate composition of the experimental diets

	FM50	FM0	FM0S
<i>Ingredients (g / 100 g wet matter)</i>			
Anchovy meal	50.00	-	-
Soybean meal	14.00	23.00	23.00
Soy protein concentrate	-	20.00	20.00
Corn gluten meal	-	26.00	26.00
Wheat flour	13.00	9.00	9.00
Tapioca starch	5.00	5.00	5.00
Rice bran	9.00	-	-
Fish oil	6.00	9.50	9.50
Taurine	-	0.50	0.50
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	-	2.50	2.50
Vitamine mixture ¹	2.00	2.00	2.00
Mineral mixture ²	1.00	1.00	1.00
L-Lysine	-	1.00	1.00
L-Methionine	-	0.50	0.50
<i>Externally added</i>			
Soybean oil (g / 100g wet matter)	3.00	3.00	3.00
Enzyme complex ¹ (g / 100g wet matter)	-	-	0.13
<i>Proximate composition</i>			
Protein (% Dry matter)	47.3	47.7	48.1
Lipid (% Dry matter)	19.9	17.8	15.8
Moisture (%)	3.1	4.9	4.9
Taurine (mg / g Dry matter)	3.94	4.57	4.64

1 Vitamin mixture composition (unit/kg mix): vitamin A, 1,000,000 IU; cholecalciferol, 125,000IU; vitamin E, 10 g; menadione sodium bisulfite, 0.5 g; thiamin nitrate, 1.0 g; riboflavin, 1.0 g; pyridoxine hydrochloride, 1.0 g; nicotinic acid, 1.29 g; calcium pantothenate, 2.5 g; biotin, 0.05 g; folic acid, 0.25 g; cyanocobalamin, 0.02 g; inositol, 40 g; choline chloride, 250 g; sodium-calcium-L-ascorbic acid-2-phosphate ester, 142.9 g.

2 Mineral mixture composition (unit/kg mix): copper sulfate exsiccated, 1.4 g; manganese sulfate, 11.3 g; zinc sulfate, 15.7 g; cobalt sulfate exsiccated, 0.05 g; calcium iodate, 0.29 g; aluminium hydroxide, 0.49 g; magnesium sulfate, 96.9 g; ferrous fumarate, 39.6 g.

3 Alltech (SSF)

Table 2. Essential amino acid composition of the experimental diets

	FM50	FM0	FM0S
<i>Amino acid (mg/g dry matter)</i>			
Threonine	13.2	12.3	12.2
Valine	9.6	9.0	8.9
Methionine	4.6	7.2	7.1
Isoleucine	7.7	7.4	7.5
Leucine	21.2	35.3	35.0
Phenylalanine	12.6	18.3	17.7
Histidine	6.2	6.4	6.7
Lysine	20.1	21.2	21.5
Tryptophan	2.7	3.1	3.4
Arginine	22.1	18.1	18.3

Table 3. Daily feed intake and growth performance of red sea bream in the experiment

	FM50	FM0	FM0S
Initial weight (g)	62.0 ± 1.48 ^a	61.5 ± 0.35 ^a	61.6 ± 1.13 ^a
Final weight (g)	170.2 ± 5.23 ^a	132.8 ± 2.83 ^b	134.2 ± 0.35 ^b
Feed conversion ratio ¹	1.65 ± 0.09 ^a	1.90 ± 0.03 ^b	1.82 ± 0.00 ^{ab}
Specific growth rate (%) ²	1.20 ± 0.07 ^a	0.92 ± 0.03 ^b	0.93 ± 0.02 ^b
Daily feed intake (%/day) ³	1.83 ± 0.02 ^a	1.66 ± 0.03 ^b	1.59 ± 0.01 ^c
Protein efficiency ratio ⁴	1.28 ± 0.07 ^a	1.12 ± 0.02 ^b	1.14 ± 0.00 ^b
Mortality (%) ⁵	0.0 ± 0.00 ^a	0.0 ± 0.00 ^a	4.0 ± 5.66 ^a

*Values (means±S.D. of duplicate groups) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

¹ Feed intake (dry matter)/weight gain.

² $100 \times (\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) / \text{feeding days}$.

³ $\text{Feed intake (dry matter)} \times 100 / [(\text{initial fish weight} + \text{final fish weight} + \text{dead fish weight}) \times \text{feeding days} \times 2]$.

⁴ Weight gain/protein intake (dry matter).

⁵ $100 \times \text{dead fish number} / \text{initial fish number}$

Table 4. Hematocrit value and plasma components of red sea bream in the experiment

	FM50	FM0	FM0S
Hematocrit value (%)	38.6 ± 4.6 ^a	39.6 ± 2.5 ^a	41.0 ± 5.4 ^a
Plasma components			
Total cholesterol (mg/dl)	211 ± 56 ^a	131 ± 30 ^b	173 ± 34 ^{ab}
Total protein (g/dl)	3.5 ± 0.9 ^a	3.5 ± 0.4 ^a	4.0 ± 0.8 ^a
Albumin (g/dl)	0.6 ± 0.2 ^a	0.7 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.2 ^a
Triglyceride (mg/dl)	197 ± 54 ^a	295 ± 150 ^a	339 ± 181 ^a
Glucose (mg/dl)	34 ± 1.7 ^a	36 ± 5.0 ^a	36 ± 12.3 ^a
GOT (AST) (U/l)	63 ± 54 ^a	62 ± 25 ^a	63 ± 47 ^a
GPT (ALT) (U/l)	30 ± 27 ^a	25 ± 19 ^a	18 ± 7 ^a
Total bilirubin (mg/dl)	0.1 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.1 ^a	0.1 ± 0.0 ^a
Urea nitrogen (mg/dl)	3.2 ± 0.9 ^a	3.8 ± 0.6 ^a	3.3 ± 0.6 ^a

*Values (means±S.D. of 5 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Proximate composition and essential amino acid composition of the whole body from the fish at the end of the experiment 1*

	FM50	FM0	FM0S
<i>Proximate composition</i>			
Protein (% wet matter)	18.2	18.3	18.7
Lipid (% wet matter)	15.7	11.5	11.1
Moisture (%)	61.7	64.7	64.7
Phosphorus (mg/g wet matter)	8.2	7.9	8.2
Taurine (mg/g wet matter)	7.80	11.92	11.14
<i>Amino acid (mg/g Dry matter)</i>			
Threonine	16.2	18.2	18.2
Valine	11.3	13.0	12.3
Methionine	11.3	12.7	12.5
Isoleucine	9.2	10.5	9.7
Leucine	26.8	29.1	29.9
Phenylalanine	14.9	16.1	16.9
Histidine	8.4	9.7	9.8
Lysine	31.0	32.8	34.6
Tryptophan	4.7	4.2	5.7
Arginine	23.8	26.7	26.6

* A pooled sample of 5 fish, without replication.

第2章 マダイ用無魚粉飼料に対する酵素混合物添加効果

第2節 マダイ1才魚における無魚粉粉末飼料への酵素混合物添加効果

世界的に養殖生産量は増加し続けている一方で魚粉の生産量は減少傾向にあり、その需給動向は逼迫している。このような状況から、国内の主要な養殖対象種であるマダイ *Pagrus major* についても魚粉代替原料の利用性に関する研究が行われており、その結果、濃縮大豆タンパク質、大豆油粕、コーングルテンミール、チキンミール、ミートミール等が代替原料として有効であることが明らかとなっている（高木ら 1999, Aoki et al. 2000a, 2000b, 高木ら 2000a, 2000b, 2000c, 2000d）。更にマダイ1才魚では、それらを配合してアミノ酸組成を調整することにより、飼料中に含まれる魚粉の90~100%を代替できる可能性が示唆されている（Aoki et al. 2000b; 高木ら 2000d）。また、飼料中の魚粉を植物性原料で代替した場合にはタウリン不足による緑肝症の発症がみられるものの、飼料にタウリンを補足することでその症状が改善することが報告されている（Takagi et al. 2006）。一方、飼料中の魚粉を植物性原料で代替する場合において、タウリンを補足してもなお魚粉主体飼料に比べて飼育成績が劣る事例も報告されており（Takagi et al. 2008）、植物性原料中にはプロテアーゼインヒビター、フィチン、難消化性糖質等の抗栄養因子の存在が指摘されている（山本 2009）。抗栄養因子は、植物性原料をアルコール処理や加熱処理することで除去または低減できることが知られている他（山本 2009）、植物性原料の発酵処理（山本 2010）やフィチンを分解する酵素フィターゼの活用（Biswas et al. 2007）により、それらの魚での利用性を改善する効果が確認されている。

麹菌 *Aspergillus niger* により主にふすまを含む特定の培地を発酵させた麹菌発酵物には、フ

ィターゼだけでなくタンパク質分解酵素のプロテアーゼや糖類の分解酵素であるセルラーゼ、ペクチダーゼ、 β -グルカナーゼ、キシラナーゼおよび α -アミラーゼが含まれている（Alltech, SSF, 以下 酵素混合物）。魚粉を植物性原料で代替した低魚粉飼料へ酵素混合物を添加することにより、マダイ0才魚の成長が改善されたことも報告されている（Hanini et al. 2013）。このように、酵素混合物の活用によって低魚粉飼料の利用性および飼育魚の成長向上が期待されるが、マダイで無魚粉飼料への添加効果を検討した報告はない。

そこで本研究では、マダイ1才魚における無魚粉粉末飼料の利用性を改善するために、酵素混合物の添加効果を検討した。

材料および方法

飼料

試験飼料の組成、一般成分およびリン含量の分析値を Table 1 に示す。魚粉含量が50%の飼料を FM50、無魚粉飼料を FM0、FM0 に酵素混合物を添加した飼料を FM0S とした。魚粉代替原料には大豆油粕、コーングルテンミール、濃縮大豆タンパクを用いて、FM50 以外の飼料へ合成タウリン、リジン、メチオニン、トリプトファンおよびスレオニンを添加した。試験1では、粉末飼料に水と魚油および麹菌発酵物を添加して混合攪拌後、シングルモイストペレット（SMP）を作製した。

試験飼料の一般成分は、FM50 の粗脂肪が他の試験区に比べて少し低い値を示したものの、粗タンパク質は各区間で概ね類似していた。灰分とリン含量は、飼料中の魚粉含量が多いほど高い傾向にあった。

供試魚および飼育方法

長崎県内の漁業協同組合から入手したマダイ1才魚を用いた。長崎県総合水産試験場の海面小割生簀（3 m×3 m×3 m）で市販飼料を給餌

して 37 日間予備飼育した後、平均体重 970～1030g に達したマダイ 1 才魚を各生簀 77 尾ずつ 3 生簀に收容し、飼育試験を実施した。飼育試験は反復なしで行い、飼育期間は 12 週間とした。給餌頻度は 1 日 1 回週 5 回を基本とし、ほぼ飽食量を与えた。4 週間毎に供試魚の体重を測定し、分析に用いる試料は 8 週目と終了時に各試験区から 5 尾ずつ採取した。なお、採取した試料は分析に供するまで -20℃ で冷凍保管した。

試料の一般成分、リン含量、アミノ酸分析

各試験飼料は麹菌発酵物添加後のものを分析に供し、一般成分（粗タンパク質、粗脂肪、水分および灰分）、リン含量、アミノ酸組成（構成アミノ酸および遊離アミノ酸）を測定した。魚体の成分分析は、遠心粉碎機（Retsch 社、ZM200）を使用して 0.5mm のスクリーンで粉碎した後、一般成分およびリン含量の分析を実施した。粗タンパク質は、ケルダール法により窒素タンパク質換算係数を 6.25 として測定した。粗脂肪含量は、クロロホルム：メタノール (2:1) 混合抽出法（Folch et al., 1957）により求めた。粗灰分は電気炉を用いて 650℃ で 8 時間灰化して求め、水分はインキュベーターを用いて常圧加熱乾燥法により約 110℃ で加熱して測定した。リンの分析は、試料をマイクロウェーブオーブン（MILESTONE 社、m1s1200mega）で湿式灰化法により加熱分解した後、供試液を緩衝溶液で pH4.0 に調節し、1% アスコルビン酸水溶液を還元剤としたモリブデン酸-青比色法により分光光度計（島津製作所、UV-265FM）を用いて波長 750nm で定量した。構成アミノ酸および遊離アミノ酸は、アミノ酸分析装置（日本電子株式会社、JLC-500/v）を用いて測定した。アミノ酸分析装置のカラムにはイオン交換樹脂を充填した多段式カラム（4mm φ × 120mm）を用い、検出器の測定波長に 440, 570, 690nm を採用し、発色試薬にニンヒドリン試薬を用いた。

統計処理

平均体重、血液性状および血漿化学成分分析値は、一元配置の分散分析に引き続き Fisher の PLSD 法を実施し、Stat-view5.0 を用いて危険率 5% における有意差を判定した。

結 果

1～8 週目の飼育成績

飼育期間中の飼育成績を Table 2 に示す。1～4 週目にかけてレンサ球菌症 (*Streptococcus iniae*) による死亡がみられたものの、最終的な生残率は各区とも 96% 以上を示した。飼育水温は 28.7～20.9℃ の間で推移し、平均 24.8℃ を示した。日間増重率は、FM0S 区 (0.50%)、FM50 区 (0.41%)、FM0 区 (0.35%) の順に高い傾向であった。日間給餌率は、FM50 区が 1.06% であり、FM0 区 (1.43%) および FM0S 区 (1.54%) に比べて低い傾向を示した。飼料効率は、FM50 区 (37%) が FM0 区 (25%) および FM0S 区 (30%) に比べて高い傾向を示した。また、FM0S 区の日間給餌率および飼料効率は、FM0 区に比べてやや高い傾向であった。

9～12 週目の飼育成績

飼育期間中、全ての試験区において死亡はみられなかった。飼育水温は 20.9～18.8℃ の間で推移し、平均 19.9℃ を示した。日間増重率は、FM0 区の 0.49% が最も高く、FM50 区および FM0S 区は 0.41～0.42% でほぼ同等の値を示した。日間給餌率は、FM0S 区 (1.69%)、FM0 区 (1.46%)、FM50 区 (1.15%) の順に高い傾向であった。FM0S 区の飼料効率は 25% を示し、FM50 区および FM0 区 (34～36%) に比べて低い傾向であった。

1～12 週目の飼育成績

試験終了時の平均体重は各区間で有意差がなかったものの、FM0S 区の日間給餌率および日間増重率がそれぞれ 1.34% と 0.48% を示し、

FM50区(0.94%と0.41%)およびFM0区(1.26%と0.40%)に比べて高い傾向を示した。FM50区の飼料効率率は37%であり、FM0区(27%)およびFM0S区(29%)に比べて高い傾向を示した。FM0S区とFM0区の飼料効率は、同等の値を示した。なお、FM0区およびFM0S区では、飼育開始～終了時までの間、餌を吐き出して再び食べる行動が頻繁に認められた。

飼料のアミノ酸組成および魚体の一般成分、リン含量

試験飼料中のタンパク質に含まれるアミノ酸組成およびタウリン含量の分析結果をTable 3に示す。FM0区およびFM0S区のリジン、アラニンおよびグリシンは、FM50区に比べて低い傾向であった。魚体の一般成分およびリン含量は各区で同等の値を示した(Table 4)。

血液性状および血漿化学成分分析

飼育試験終了後の各区における血液性状および血漿化学成分の分析結果をTable 5に示す。TCHOおよびHbは、FM0がFM50に比べて有意に低い値を示した($P < 0.05$)。一方、FM50区とFM0S区の間には各項目で統計的な有意差が認められなかった。

考 察

本研究では、マダイを対象として酵素混合物の添加による無魚粉飼料に対する利用性の改善効果を検討した。その結果、水温が21℃以上の1～8週目においては、FM0S区の日間増重率および飼料効率がFM0区に比べて高い傾向を示した。しかし、水温が21℃未満に低下した9～12週目においては、FM0S区の飼育成績が悪化し、日間増重率および飼料効率はFM0区に比べて劣る傾向を示した。日間給餌率は、水温の変動に関わらず一貫してFM0S区がFM0区に対して高い傾向を示した。これらのことから、酵素混合物の無魚粉飼料への添加により、マダイ

の摂餌が促進されたことが示唆された。併せて、水温の低下に伴い酵素混合物の添加による影響が変化する可能性も推察された。佐藤ら(2002)は、魚粉へ酵素処理を施すことにより低水温期のブリにおけるタンパク質の消化性や飼育成績が向上するが、その処理を過剰に行なうと逆に飼育成績が低下することを確認し、その原因として、酵素処理の結果過剰に生成された低分子ペプチドの量とブリ魚体内での吸収速度との相違が生じたことを推察している。また、魚は変温動物であり、水温が消化率に影響を与えることも指摘されているため(竹内1991)、酵素混合物の添加効果と水温変化との関連性は存在することが考えられ、その詳細については今後の検討課題であると思われる。

FM0区およびFM0S区は、12週間通算の増肉係数がFM50区に比べて劣る傾向を示した。無魚粉粉末飼料に配合した植物性原料中には、フィチンやトリプシンインヒビター等の抗栄養因子が存在していることから(山本2009)、FM0区およびFM0S区で増肉係数が劣っていた原因は、抗栄養因子による影響を受けた可能性が考えられた。本研究で用いた酵素混合物中に含まれる酵素の1つであるフィターゼについては、低魚粉飼料への添加によりマダイの体内におけるリンの吸収および成長が改善すること、その理由として、抗栄養因子の1つであるフィチンを分解しその悪影響を軽減したことが推察されている(Biswas et al. 2007, Hanini et al. 2013)。しかし、8週目と終了時に採取した魚体内のリン含量は、各区の間で顕著な差がみられなかったことから、本研究では、酵素混合物中のフィターゼが魚体内でのリンの吸収および成長促進に寄与したとは考えにくい。また、増肉係数がFM0区とFM0S区で同等の値を示したことから、酵素混合物中のプロテアーゼによりタンパク質の消化・吸収が促進されたことも考えにくい。前述のとおり、本研究では酵素混合物の添加による摂餌促進の効果が認められたが、その理由は現段階では不明確である。植物性原料中

に含まれる成長阻害因子としては、フィチンやトリプシンインヒビター等の抗栄養因子の他、難消化性多糖類の存在が知られている（山本 2009）。また、高木ら（2000c）は、大豆油粕に含まれる難消化性糖質やトリプシンインヒビターの低減、アミノ酸組成の調整等により、マダイ用飼料の大幅な魚粉削減が可能であることを考察している。本研究で用いた酵素混合物中には、セルラーゼ、ペクチダーゼ等、複数の糖質を分解可能な酵素が含まれている。以上のことから、本研究で用いた酵素混合物がマダイに対して作用している影響については、難消化性糖質との関連も想定され、今後は魚体内での消化速度等を別の機会で検討したい。

試験飼料の成分分析の結果、リジン、アラニンおよびグリシンが FM50 区に比べて低い傾向を示した。飼育期間中は一貫して FM0 区と FM0S 区で餌を吐き出す行動が頻繁に観察されたこと、アラニンおよびグリシン等についてはトラフグの摂餌促進、消化酵素の合成・分泌の高進および飼育成績を向上させる効果が報告されていることから（滝井ら 1998）、本研究で用いた無魚粉飼料は、アラニンやグリシン等の不足によりマダイの嗜好性が低下していた可能性が考えられる。魚の嗜好性と成長には正の相関が報告されている事例もあることから、無魚粉飼料の開発にはマダイの嗜好性を高める物質の探索と配合が必要だと考えられる。

試験終了後に実施した血液検査の結果、FM0 区および FM0S 区における Hb 量と TCHO 値は FM50 区に比べて低い傾向にあり、特に FM0 区は FM50 区に比べて有意に低い値を示した。同様の結果は、過去にマダイおよびブリでも確認されている（高木ら 2000a, Ukawa et al. 1994）。またブリでは、TCHO 値の低下と抗病性の低下との間に関連があることも報告されている（Maita et al. 1998, 2006）。これらのことから、今回の試験では生残率に各試験区間で顕著な差がなかったものの、少なくとも無魚粉飼料を用いた試験区においては生理状態が悪化して

いた可能性が示唆され、抗病性に及ぼす影響については更なる検討が必要だと考えられる。また、FM0S 区では、FM0 区に対して Hb 量および TCHO 値の向上がみられたことから、酵素混合物を無魚粉飼料へ添加することにより、FM50 区には及ばないものの生理状態が少し改善していた可能性が推察される。

以上の結果から、酵素混合物を無魚粉粉末飼料へ添加することにより、マダイの摂餌および成長を促進できる可能性が示唆された。しかし本研究では、その作用機序について詳細に検討するに至っていないので、今後の更なる研究が必要であると考えられる。

要 約

無魚粉飼料への酵素混合物の添加効果について、マダイ 1 才魚を対象に検討した。

魚粉を 50% 含む飼料を対照とし、魚粉含量を 0% に削減した飼料、およびそれらに酵素混合物を 0.05% 添加した飼料を用いてマダイ 1 才魚を 12 週間飼育した。その結果、水温が 28.7~20.9°C の間で推移した 1~8 週目における飼育成績は、酵素混合物添加区で改善し対照区と同等以上の日間増重率を示した。しかし、水温が 21°C 未満に下降した 9 週目以降の飼育期間においては、飼育成績が悪化した。

以上の結果から、水温が比較的高い条件においては酵素混合物の添加によりマダイの無魚粉飼料の利用性を改善し、成長促進に寄与することが示唆された。一方で、水温が低い条件下での添加効果については不明であり、今後の検討課題だと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、新三重漁業協同組合の関係者の皆様には、供試魚の販売および運搬等についてのご協力をいただいた。この場を借りて深謝いたします。

文 献

- Aoki, H., Y. Sanada, M. Furuichi, R. Kimoto, M. Maita, A. Akimoto, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000a) Partial or complete replacement of fish meal by alternate protein sources in diets for yellowtail and red sea bream. *Suisanzoshoku*, 48, 53-63.
- Aoki, H., M. Furuichi, K. Watanabe, S. Satoh, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000b) Use of non-fish meal diets for red sea bream. *Suisanzoshoku*, 48, 65-72.
- Biswas, A. K., H. Kaku, S. C. Ji, M. Seoka and K. Takii (2007) Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 267, 284-291.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloan-Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226, 497-509.
- Hanini, I., Md. S. A. Sarker, S. Satoh, Y. Haga, S. Corneillie, T. Ohkuma and H. Nakayama (2013) Effects of taurine, phytase, and enzyme complex supplementation to low fish meal diets on growth of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquacult. Sci.* 61, 367-375.
- 佐藤公一・真田康広・日高悦久・木本圭輔 (2002) 低水温期のブリの成長, 飼料効率およびタンパク質消化率に及ぼす酵素処理した魚粉の飼料効果. *水産増殖*, 50, 219-226.
- 高木修作・細川秀毅・示野貞夫・舞田正志・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, 77-87.
- 高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治 (2000a) マダイ飼料におけるコーングルテンミールの利用. *日水誌*, 66, 417-427.
- 高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治 (2000b) マダイ飼料におけるチキンミールの利用. *日水誌*, 66, 428-438.
- 高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治 (2000c) マダイ稚魚飼料におけるタンパク質源併用による魚粉の削減. *水産増殖*, 48, 523-530.
- 高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治 (2000d) マダイ 1 歳魚飼料におけるタンパク質源併用による魚粉の削減. *水産増殖*, 48, 545-552.
- Takagi, S., H. Murata, T. Goto, M. Endo, H. Hatate, T. Yoshida, T. Sakai, H. Yamashita and M. Ukawa (2006) Efficiency of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream, *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Sci.* 72, 1191-1199.
- Takagi, S., H. Murata, T. Goto, M. Endo, H. Yamashita and M. Ukawa (2008) Taurine is an essential nutrient for yellowtail, *Seriola quinqueradiata* fed non-fish meal diets based on soy protein concentrate. *Aquaculture*, 280, 198-205.
- 竹内俊郎 (1991) 消化と栄養. 魚類生理学 (板沢靖男・羽生功 編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 67-101.
- 滝井健二・高岡治・中村元二・熊井英水 (1998) 摂餌促進物質の添加がトラフグの成長および消化酵素分泌に及ぼす影響. *近大水研報*, 6, 159-166.
- Ukawa, M., K. Takii, M. Nakamura, M. Akutsu, H. Kumai and M. Takeda (1994) Effect of iron supplements on soy protein concentrate diet on hematology of yellowtail. *Fisheries Sci.*, 60, 165-169.
- 山本剛史 (2009) 原料の利用性改善. 改訂魚類の栄養と飼料 (渡邊 武 編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 326-342.
- 山本剛史 (2010) 養殖用飼料における植物性原料の利用性とその改善に関する研究. *日水誌*, 76, 344-347.

Table 1. Composition (%), proximate composition, and phosphorus content in test diets used for adult red sea bream

	Daietary group		
	FM50	FM0	FM0S
Fish meal	50.00	-	-
Soy protein concentrate	-	21.00	21.00
Defatted soy bean meal	11.00	16.00	16.00
Corn gluten meal	-	26.00	26.00
Krill meal	-	3.00	3.00
Wheat flour	14.50	8.80	8.80
Tapioca starch	5.00	5.00	5.00
Defatted rice bran	7.35	-	-
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	-	2.50	2.50
L-lysine	-	1.00	1.00
Methionine	-	0.50	0.50
Tryptophan	-	0.20	0.20
L-threonine	-	0.50	0.50
Taurine	-	0.50	0.50
Marigold powder	0.15	-	-
Vitamin mixture ¹	2.00	2.00	2.00
Mineral mixture ²	1.00	1.00	1.00
Fish oil	9.00	12.00	12.00
SSF ³	-	0.00	0.05
Proximate composition			
(Dry matter basis)			
Crude protein (%)	46.7	46.9	46.5
Crude fat (%)	14.9	18.7	19.2
Crude ash (%)	11.3	6.1	6.0
Phosphorus (mg/g)	17.7	11.6	11.5

1 Vitamin mixture composition (unit/kg mix): vitamin A, 1,000,000 IU; cholecalciferol, 125,000IU; vitamin E, 10 g; menadione sodium bisulfite, 0.5 g; thiamin nitrate, 1.0 g; riboflavin, 1.0 g; pyridoxine hydrochloride, 1.0 g; nicotinic acid, 1.29 g; calcium pantothenate, 2.5 g; biotin, 0.05 g; folic acid, 0.25 g; cyanocobalamin, 0.02 g; inositol, 40 g; choline chloride, 250 g; sodium-calcium-L-ascorbic acid-2-phosphate ester, 142.9 g.

2 Mineral mixture composition (unit/kg mix): copper sulfate exsiccated, 1.4 g; manganese sulfate, 11.3 g; zinc sulfate, 15.7 g; cobalt sulfate exsiccated, 0.05 g; calcium iodate, 0.29 g; aluminium hydroxide, 0.49 g; magnesium sulfate, 96.9 g, ferrous fumarate, 39.6 g.

3 Alltech

Table 2. Growth performance of adult red sea bream fed the experiment diets for 12 weeks

Dietary group	Average body weight (g)		Specific growth rate (%)	Feeding efficiency (%)	Daily feed intake (%)	Survival rate (%)	Water temperature (°C)
	Initial	Final					
1-8 week (58 days feeding)							
FM50	1012 ^{a*}	1282 ^a	0.41	37	1.06	97	24.8 (28.7-20.9)
FM0	963 ^a	1180 ^a	0.35	25	1.43	100	
FM0S	959 ^a	1279 ^a	0.50	30	1.54	96	
9-12 week (28 days feeding)							
FM50	1282 ^a	1438 ^a	0.41	36	1.15	100	19.9 (20.9-18.8)
FM0	1180 ^a	1355 ^a	0.49	34	1.46	100	
FM0S	1279 ^a	1438 ^a	0.42	25	1.69	100	
Total feeding period (86 days feeding)							
FM50	1012 ^a	1438 ^a	0.41	37	0.94	97	22.9 (28.7-18.8)
FM0	963 ^a	1355 ^a	0.40	27	1.26	100	
FM0S	959 ^a	1438 ^a	0.48	29	1.34	96	

*¹ Figures in a row with different superscripts are significantly different from each other ($P < 0.05$) when analyzed Fisher's PLSD test.

Table 3. Amino acid composition (% in protein) of test diets used for adult red sea bream

	Dietary group		
	FM50	FM0	FM0S
Essential amino acid (EAA)			
Arginine	6.7	5.5	5.7
Lysine	8.0	5.8	6.6
Histidine	3.2	2.1	2.1
Phenylalanine	4.3	5.3	5.1
Leucine	7.7	10.9	10.0
Isoleucine	3.1	4.0	3.2
Methionine	2.7	2.7	2.9
Valine	3.6	4.2	3.1
Threonine	4.6	4.5	4.8
Tryptophan	0.9	0.7	0.8
Non-essential amino acid			
Taurine	0.9	1.0	1.1
Cysteine	0.4	1.0	0.6
Cystathionine	ND [*]	ND	ND
Alanine	10.0	6.9	8.3
Tyrosine	3.5	4.2	4.1
Glycine	6.2	3.5	3.6
Glutamic acid	15.9	18.8	19.1
Serine	4.9	5.1	5.5
Aspartic acid	10.1	8.4	9.0
Proline	3.2	5.5	4.5

* "ND" means "not detected".

Table 4. Proximate composition (%) and phosphorus content of whole body of adult red sea bream fed the experimental diets *

Dietary group	Moisture (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Crude ash (%)	phosphorus (mg/g)
At 58th day					
FM50	63.8	18.2	15.7	3.9	7.0
FM0	65.5	16.7	14.3	3.3	6.7
FM0S	63.4	18.2	14.6	3.3	6.9
At the end of feeding test					
FM50	61.6	18.2	12.6	4.6	8.6
FM0	60.8	19.2	14.0	3.8	8.5
FM0S	62.9	18.4	13.0	3.8	8.4

* Samples from 5 fish were pooled for analysis.

Table 5. Results of hemochemical examination in red sea bream fed the experimental diets *

	Daietary group		
	FM50	FM0	FM0S
Hb (g / 100 ml)	10.8 ± 0.7 ^a	9.0 ± 1.2 ^b	9.8 ± 0.8 ^{ab}
TCHO (mg / 100 ml)	230 ± 48.0 ^a	141 ± 9.5 ^b	168 ± 29.1 ^{ab}
TP (g / 100 ml)	4.1 ± 0.5 ^a	3.4 ± 0.6 ^a	3.8 ± 0.3 ^a
TG (mg / 100 ml)	197 ± 81.2 ^a	145 ± 51.1 ^a	142 ± 36.7 ^a
BUN (mg / 100 ml)	2.0 ± 0.2 ^a	1.9 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^a
GLU (mg / 100 ml)	49 ± 16.3 ^a	50 ± 20.5 ^a	53 ± 13.6 ^a
ALP (IU / l)	40 ± 11.5 ^a	95 ± 46.7 ^a	70 ± 15.6 ^a

* Mean ± standard deviation (n=5). Figures in a row with different superscripts are significantly different from each other (P<0.05) when analyzed Tukey's multiple range test.

第2章 マダイ用無魚粉飼料に対する酵素混合物添加効果

第3節 マダイ1才魚における無魚粉粉末飼料への酵素混合物添加効果

(Effect of supplementation with enzyme complex to non-fish meal diet in adult red sea bream *Pagrus major*) : Aquaculture Science (2017)

Abstract

The effect of supplementation with an enzyme complex (produced by solid state fermentation, SSF) to a non-fish meal diet for adult red sea bream was evaluated. The SSF complex contained protease, amylase, xylanase, β -glucanase, pectinase, cellulase, and phytase. A fish meal based diet (50% fish meal, FM50) was used as the control diet, also a non-fish meal diet (FM0) was used as the basal diet, formulated with corn gluten meal, soy protein concentrate, and defatted soybean meal. SSF complex was supplemented to the non-fish meal diet at a level of 0.13% (FM0S). Adult red sea bream weighing 328.8 g on average, were fed the experimental diets for 16 weeks. Depression of the daily feed intake was observed in fish fed FM0 diet ($P < 0.05$), on the other hand, daily feed intake in fish fed FM0S was improved to the same level as FM50 group. Growth was highest in fish fed FM0S diet. After feeding, the gastric evacuation rate and plasma triglyceride level from fish fed FM0S respectively were faster and higher than fish fed FM0. These results suggested that supplementation with SSF complex to a non-fish meal diet enhances feed intake and growth in adult red sea bream.

Introduction

The necessity of reduction of the fish meal content

in fish feeds is increasingly important due to minimize the effects of oscillations in availability and costs associated with fish meal. Therefore, low or non-fish meal diets for red sea bream *Pagrus major*, one of the main cultured fish in Japan, have been tested in previous studies (Takagi et al. 1999; Aoki et al. 2000a, 2000b; Takagi et al. 2000a, 2000b, 2000c, 2000d; Goto et al. 2001; Takagi et al. 2006). However, effective utilization of plant protein ingredients in fish diets is often limited because of the presence of anti-nutritional factors such as phytic acid, poor palatability, insufficiency of some essential amino acids and other undesirable characteristics which may negatively affect the growth of fish (Fowler 1980). It is reported that taurine synthesis ability is limited in red sea bream (Matsunari et al. 2008), and that the green liver appearance and inferior feed performances that occur in red sea bream fed the low fish meal diet without taurine supplementation are caused by dietary taurine deficiency (Takagi et al. 2006). The presence of phytic acid included in plant protein sources is another problem associated with the use of plant proteins in fish feeds. Phytase supplementation in diets containing plant protein ingredients have been reported to improve the utilization of plant phosphorus in juvenile red sea bream diets (Biswas et al. 2007). Also, it is reported that supplementing other enzymes can help reduce the effects of anti-nutritional factors and improve fish growth performance (Farhangi and Carter 2007; Lin et al. 2007; Soltan 2009). The effect of feeding low fish meal diets with enzyme supplementation on the growth performance of juvenile red sea bream has been demonstrated in the previous study (Hanini et al. 2013). However, there are no published reports on the effect of supplemental enzymes with plant protein based diets for adult red sea bream, and a non-fish meal diet viable for red sea bream has not been developed yet. Therefore,

the present study was conducted to investigate the effect of feeding a non-fish meal diet supplemented with an enzyme complex on the growth performance (Experiment 1), gastric evacuation rate (Experiment 2), and changes in plasma components (Experiment 3) of adult red sea bream.

Materials and Methods

Feed formulation

Isonitrogenous control and two test diets were prepared for this study (Table 1). The diets were prepared as extruded pellets (5 mm in diameter) using a large size twin screw extruder (Chubushiryo Co., Ltd.). Anchovy meal was the main protein source (50%) for the control diet (FM50). In FM0 and FM0S, the combination of 26% corn gluten meal, 21% soy protein concentrate and 16% soybean meal were used to completely replace the fish meal in the control diet (fish meal 0%). Control and test diets were supplemented with vitamin mixture, mineral mixture, and taurine at 2, 1 and 0.2-0.5%, respectively. Fish oil was added at 9-12% to adjust the lipid level to approximately 14-16%. After preparing the extruded pellets, FM50 diet was supplemented with taurine (0.2%), water (20%) and soybean oil (3%), respectively. Taurine was supplemented with FM50 diet in order to equalize the levels in each experimental diets. FM0 diet was supplemented with water (20%) and soybean oil (3%) after preparing the extruded pellets, respectively. FM0S diet was supplemented with water (20%), soybean oil (3%) and enzyme complex (liquid type, 1.25ml/kg diet) after preparing extruded pellets, respectively. The enzyme complex used in this experiment was produced by solid state fermentation (SSF) using a selected strain of (non-GMO) *Aspergillus niger* (Alltech Inc, Kentucky, USA). This enzyme complex contains protease, amylase, xylanase, β

-glucanase, pectinase, cellulase, and phytase. After preparation, experimental diets were kept in freezer (-20°C) until use.

The proximate composition and essential amino acid (EAA) composition of the experimental diets are shown in Tables 1 and 2. The crude protein contents were 46.7-46.6% in the experimental diets. The crude lipid level of the FM50 diet was 14.1%, and was slightly lower than FM0 and FM0S diets (15.8%). The crude ash content of FM50 diet was higher than that of the other two diets. The EAA composition in the experimental diets were similar to each other (Table 2).

Culture conditions, fish and feeding

Expt. 1: 0 year old red sea bream were fed the FM50, FM0, and FM0S diets for about 8 months in order to settle into experimental diets before starting the trial, were divided into 3 groups of 45 fish (1 year old, average weight 328.8 g) per net cage (3 m \times 3 m \times 3 m) in duplicate manner. At the dividing the fish, 40 fish (body weight over 200 g) were selected and divided into the experimental net cage which were compatible with the diet having been fed for last 8 month, and 5 fish were added from the group fed FM50 diet last 8 month. The fish were fed 4 days per week (once a day) to near satiation for 16 weeks. The water temperature ranged from 20.9 to 29.9 $^{\circ}\text{C}$ (average 25.7 $^{\circ}\text{C}$).

Expt. 2: Before starting the experiment, 1 year old red sea bream (average weight 89.1 -90.8 g) were divided into 3 groups of 45 fish per net cage (1.5 m \times 1.5 m \times 2 m), and they were fed the FM50, FM0 and FM0S diets 3 days per week (once a day) nearly 0.75% of body weight for 6 weeks in order to settle into experimental diets. After 6 weeks feeding, they (average weight 112.2 - 116.1 g) were kept in a starved condition for about 3 days. The water temperature ranged from 21.8 to 22.3 $^{\circ}\text{C}$ at the sampling.

Expt. 3: Before starting the experiment, 1 year old red sea bream (average weight 887.8 g) were divided into 3 groups of 24 fish per net cage (3 m × 3 m × 3 m), and they were fed the FM0 diet 2 days per week (once a day) near satiation for 45 weeks in order to settle into FM0 diet. After 45 weeks feeding, they (average weight 1458.7 g) were kept in a starved condition for about 3 days. The water temperature was 20.9°C at the sampling.

Sample collection and chemical analyses

Expt. 1: At the end of the feeding trial, all fish were measured the body weight after 72 h fasting. 5 fish were taken from each lot for determination of the hematocrit value and concentration of plasma components to evaluate the health condition of the fish. Hematocrit value was analyzed by a hematocrit centrifuge (HEMATOCRIT MC-201, Hitachi Koki Co., Ltd. Tokyo, Japan). Plasma components were analyzed by a clinical chemistry analyzer (FUJI DRI-CHEM 7000i, Fujifilm Corp. Tokyo, Japan).

A pooled sample of five fish at the beginning and the end of the feeding trial was stored at -20°C for whole body analysis. Pooled samples were minced using a centrifugal mill (Retsch ZM 2000, Retsch GmbH, Haan, Germany) fitted with a 0.25 mm screen. The homogenate was stored at -20°C for analysis. Analyses of crude protein, ash, and moisture were determined by standard methods (AOAC 1995). Total lipids were extracted from samples using a mixture of chloroform and methanol (2:1) and determined as described by Folch et al. (1957). Phosphorus were analyzed using a spectrophotometer (UV-2550, Shimadzu Corp, Kyoto, Japan) at wavelength of 750 nm. EAA composition were analyzed using a fully automated amino acid analyzer (JLC500, JEOL Ltd. Tokyo, Japan).

Expt. 2: After 0.5, 3, 6 and 24 hours of feeding FM50, FM0 and FM0S diets under an equivalent

feeding rate (1.4% of body weight), 5 fish were taken from each lot and were stored at -20°C for determination of changes in gastric and intestinal contents. Weight of the gastric and intestinal contents were assayed on a dry basis. Analyses of crude moisture of the gastric and intestinal contents were determined by standard method (AOAC 1995).

Expt. 3: Before and after 1.5, 3, 24, and 72 hours of feeding the FM50, FM0 and FM0S diets to near satiation, 5 or 4 fish were taken from each lot for determination changes in plasma triglyceride (TG) and glucose (GLU). Plasma TG and GLU were analyzed by a clinical chemistry analyzer (FUJI DRI-CHEM 7000i, Fujifilm Corp. Tokyo, Japan).

Statistical analysis

Results of daily feed intake, growth performance, hematocrit value, plasma components, gastric and intestinal contents, plasma TG and plasma GLU were analyzed by one-way ANOVA (Stat-view 5.0). Differences between treatments were compared by Fisher's PLSD test. Values were considered significant at $P < 0.05$.

Results

Growth performance (Expt. 1)

The daily feed intake (DFI) and growth performance of 1 year old red sea bream from Expt.1 are shown in Table 3. The DFI was depressed when fish were fed FM0 ($P < 0.05$), however, the DFI of FM0S increased reaching the same level as fish fed FM50 without a significant difference ($P > 0.05$). At the end of the 16 week feeding, final body weight of the group fed FM0S was significantly higher than FM50 and FM0 ($P < 0.05$). The growth rate (GR) of the group fed FM0S was significantly higher than FM0 ($P < 0.05$). On the other hand, there was no significant difference

between the group fed FM50 and FM0 in GR ($P > 0.05$). The feed conversion ratio (FCR) of the group fed FM50 was significantly higher than FM0 and FM0S ($P < 0.05$).

Hematocrit value and plasma components (Expt. 1)

Hematocrit value of and plasma components of the fish in Expt. 1 are shown in Table 4. Hematocrit value from the fish fed FM0 were significantly higher than fish fed FM50 and FM0S ($P > 0.05$). Plasma components except total protein (TP) and TG were not significantly different in each group ($P > 0.05$). TP from the fish fed FM0 was significantly higher than FM50 ($P < 0.05$), on the other hand, TP from FM0S was not significantly different compared with FM50 ($P > 0.05$). TG from the fish fed FM50 was significantly higher than FM0 and FM0S ($P < 0.05$).

Proximate composition and EAA composition (Expt. 1)

The proximate composition and EAA composition of the whole body from fish in Expt. 1 are shown in Table 5. At the end of the 16 week feeding, proximate composition except phosphorus and taurine in the whole body were similar to each other. The phosphorus content of the fish fed FM50 tended to be slightly higher than fish fed FM0 and FM0S. The taurine content of the fish fed FM50 tended to be lower than fish fed FM0 and FM0S. The EAA composition in the fish sampled at the end of 16 week feeding were similar to each other.

Growth performance (Expt.2)

The DFI and growth performance of 1 year old red sea bream from Expt. 2 are shown in Table 6. At the end of the 6 week feeding, there were no significantly difference in final body weight. FCR of the group fed FM50 was slightly lower than FM0 and FM0S. SGR, GR and protein efficiency ratio

(PER) of the group fed FM50 was slightly higher than FM0 and FM0S. FCR, GR and PER in the group fed FM0 and FM0S were similar to each other.

Changes in gastric and intestinal contents (Expt. 2)

The changes in gastric and intestinal contents from the fish in Expt. 2 are shown in Fig. 1. Gastric contents did not show significant differences between each group. However, gastric evacuation from the fish fed FM0S tended to be faster than fish fed FM50 and FM0 after 0.5 to 6 hours from the feeding. Gastric evacuation from the fish fed FM0 tended to be slower than fish fed FM50 after 3 to 6 hours from the feeding. On the other hand, intestinal contents in each group were constantly maintained low levels relatively after 0.5 to 24 hours from the feeding. Intestinal contents from the fish fed FM0S after 6 hours from the feeding was significantly lower than FM50 and FM0 ($P < 0.05$).

Changes in plasma TG and GLU (Expt. 3)

The changes in plasma TG and GLU from the fish in Expt. 3 are shown in Fig. 2. After 24 hours from the feeding, plasma TG in the fish fed FM0S was significantly higher than FM50 and FM0 ($P < 0.05$). Plasma GLU in the fish fed FM50, FM0 and FM0S gradually increased after feeding, reaching a plateau at 3 - 24 hours post-feeding. After 72 hours from the feeding, plasma GLU in the fish fed FM50 was significantly lower than FM0 and FM0S ($P < 0.05$). On the other hand, there were similar changes in plasma GLU from the fish fed FM0 and FM0S.

Discussion

In the Expt. 1, the depression of DFI was observed in fish fed the FM0 diet in which 100% of fish meal was replaced by plant proteins. In previous studies, depression of DFI has also been observed in adult

red sea bream fed non-fish meal diet (Takagi et al. 2000a, 2000c). However, in this case, GR and FCR in fish fed FM0 were not inferior to the control diet (FM50), and were not in line with that of previous studies (Takagi et al. 1999, 2000a, 2000c). These differences were probably due to supplementation 0.5% taurine and well-balanced plant protein source components in diet FM0. Previous studies found that taurine is necessary for the growth of red sea bream (Takagi et al. 2006; Matsunari et al. 2008). Also, it is considered that the fish meal component can be substituted by a combination of various protein ingredients without ill effects because of well-balanced amino acid composition and reducing anti-nutritional factors (Aoki et al. 2000a, 2000b, Takagi et al. 2000c). Whole body taurine content and EAA content in fish fed FM0 and FM0S tended to be equivalent or higher than FM50. It confirmed that taurine and EAA were satisfied in fish fed FM0 and FM0S.

FM0S significantly increased final body weight, GR, and DFI compared fish fed FM0. These results were similar to the previous finding that supplementing a low fish meal diet with an enzyme complex and taurine in feed for red sea bream has a positive effect on fish growth (Hanini et al. 2013), and the addition of phytase at 1000 FTU/kg diet enhanced the growth of red sea bream (Biswas et al. 2007). However, in this study, whole body phosphorus content in fish fed FM0S was clearly not higher than FM0 at the end of the feeding. That is not in line with previous studies (Hanini et al. 2013; Biswas et al. 2007), and implies that phytase in FM0S could not improve the utilization of phosphorus in this study. FM0 and FM0S diets were supplemented 2.5% $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, on the other hand, 1.0% $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ was supplemented with test diets in previous study (Hanini et al. 2013). In this study, it is considered that phosphorus in fish fed FM0 and FM0S were satisfied irrespective of the

phytase supplementation.

Plasma components except TP and TG were similar to each other groups. Hematocrit value and plasma TP in fish fed FM0 tended to be higher than FM50 and FM0S, also, plasma TG in fish fed FM0 and FM0S tended to be higher than FM50. However, these were not markedly different among the groups and previous studies (Takagi et al. 1999, 2000a, 2000b, 2000d). In yellowtail *Seriola quinqueradiata*, it was reported that plasma cholesterol in fish fed non-fish meal diet was significantly lower than in control fish, and mortality due to a natural infection with bacteria occurred among fish fed the non-fish meal diet, but not among the control fish (Maita et al. 1998). In this study, plasma cholesterol in fish fed FM0 and FM0S were not significantly different compared with FM50. Therefore, it was suggested that fish fed the FM0 and FM0S diets were not in a poor health condition compared with FM50. However, the mechanism of increasing hematocrit value, plasma TP and TG content in fish fed FM0 is unclear. Investigation into the cause of differences in blood parameter and plasma components in red sea bream fed non-fish meal diet should be the subject of a future study.

Gastric evacuation in fish fed FM0S was faster than FM50 and FM0 from 0.5 to 6 hours after the feeding, and plasma TG in fish fed FM0S was significantly higher than FM50 and FM0 24 hours after the feeding. On the other hand, gastric evacuation in fish fed FM0 tended to be slower than FM50 and FM0S from 0.5 to 6 hours after the feeding. These indicate that the digestion in fish fed FM0 diet was slower than FM50, and SSF complex in FM0S enhanced digestion of the diet and gastric evacuation. In a previous study, it was found that the daily feed intake of juvenile grouper, *Epinephelus tauvina* was closely related to the amount of feed remaining in the stomach and intestine (Thia-Eng and Seng-Keh 1978). Also, high

apparent digestibilities and plasma TG of the red sea bream were detected until 9 or 12 hours after feeding in another study (Takii et al. 1997). Therefore, it is considered that the depression of DFI in fish fed FM0 in the Expt. 1 were influenced by slower digestion, and SSF complex in FM0S promoted digestion of the test diet and feed intake in adult red sea bream.

In the Expt. 2, GR, FCR and PER in fish fed FM0 and FM0S tended to be inferior to FM50. These are not in line with Expt. 1. In previous studies, it is considered that adult red sea bream is superior to juvenile red sea bream in availability of the substitute protein sources due to the improvement in availability of the nutrient component, the improvement in resistance against anti-nutritional factor and the change in requirement of the EAA (Takagi et al. 2000c). In the Expt. 2, 1 year old red sea bream were fed the test diets, however, their weight were more right (initial average weight: 89.1 - 90.1 g) compared to the fish in the Expt. 1 (initial average weight: 328.8 g). The depression of growth parameters in fish fed FM0 and FM0S in Expt. 2 were probably due to the low availability of the substitute protein sources in small red sea bream. Growth parameters in fish fed FM0S was similar to FM0, this is not in line with Expt. 1, too. In the Expt. 2, fish were fed the test diets 3 days per week (once a day) nearly 0.75% of body weight, not near satiation. It was considered that the growth performance in fish fed FM0S was not different from FM0 in the Expt. 2 because of the controlled feeding.

The results of the present study demonstrated that the non-fish meal diet supplemented with taurine satisfyingly with well-balanced plant protein ingredients have the potential to grow adult red sea bream as well as fish meal diets in right water temperature condition for red sea bream (20 to 30°C). However, it was suggested that feed intake in

fish fed non-fish meal diet were depressed due to the influence of feed remaining in the stomach and intestine. Supplementing a non-fish meal diet with SSF complex has a positive effect on feed intake and fish growth in adult red sea bream. Therefore, this non-fish meal diet could replace fish meal based diets for adult red sea bream. However, in present study, fish were settle into non-fish meal diet for about 8 month before starting Expt. 1. Better feeding method to settle into non-fish meal diet is necessary from a practical application perspective, and should be the subject of a future study.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of Nagasaki-ken Gyogyokosha Co., Ltd. for providing of juvenile red sea bream. We are grateful to Y. Abe and K. Akiba (Tokyo University of Marine Science and Technology) for assistance in collecting and caring for the fish. We are grateful to T. Nakao (Chubushiryo Co., Ltd.) for assistance with preparation of experimental diets. We are grateful to Dr. S. Corneillie (Alltech Japan) for valuable discussion and information.

References

- AOAC (1995) *Official Methods of Analysis of Official Analytical Chemists International 16th ed.* Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA. 45 pp.
- Aoki, H., Y. Sanada, M. Furuichi, R. Kimoto, M. Maita, A. Akimoto, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000a) Partial or complete replacement of fish meal by alternate protein sources in diets for yellowtail and red sea bream. *Suisanzoshoku* 48, 53-63.
- Aoki, H., M. Furuichi, K. Watanabe, S. Satoh, Y.

- Yamagata and T. Watanabe (2000b) Use of low or non-fish meal diets for red sea bream. *Suisanzoshoku* 48, 65-72.
- Biswas, A. K., H. Kaku, S. C. Ji, M. Seoka and K. Takii (2007) Use of soybean meal and phytase for partial replacement of fish meal in the diet of red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 267, 284-291.
- Farhangi, M. and C. G. Carter (2007) Effect of enzyme supplementation to dehulled lupin-based diets on growth, feed efficiency, nutrient digestibility and carcass composition of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research* 38, 1274-1282.
- Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane-Stanley (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Fowler, L. G. (1980) Substitution of soybean and cottonseed products for fish meal in diets fed to chinook and coho salmon. *Prog. Fish-Cult.* 42, 86-91.
- Goto, T., S. Takagi, T. Ichiki, T. Sakai, M. Endo, T. Yoshida, 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. *Fisheries Sci.* 67, 58-63.
- Hanini, I., Md. S. A. Sarker, S. Satoh, Y. Haga, S. Corneillie, T. Ohkuma and H. Nakayama (2013) Effects of taurine, phytase, and enzyme complex supplementation to low fish meal diets on growth of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquacult. Sci.* 61, 367-375.
- Lin, S., K. Mai and B. Tan (2007) Effects of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia, *Oreochromis niloticus* × *O. aureus*. *Aquaculture Research* 38, 1645-1653.
- Maita, M., H. Aoki, Y. Yamagata, S. Satoh, N. Okamoto and T. Watanabe (1998) Plasma biochemistry and disease resistance in yellowtail fed a non-fish meal diet. *Fish Pathol.* 33, 59-63.
- Matsunari, H., H. Furuita, T. Yamamoto, S. K. Kim, Y. Sakakura and T. Takeuchi (2008) Effect of dietary taurine and cysteine on growth performance of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture* 274, 142-147.
- Soltan, M. A (2009) Effect of dietary fish meal replacement by poultry by-product meal with different grain source and enzyme supplementation on performance, feces recovery, body composition and nutrient balance of Nile tilapia. *Pakistan J. Nutr.* 8, 395-407.
- Takagi, S., H. Hosokawa, S. Shimeno, M. Maita, M. Ukawa and S. Ueno (1999) Utilization of soy protein concentrate in a diet for red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku* 47, 77-87 (in Japanese with English abstract).
- Takagi, S., H. Hosokawa, S. Shimeno and M. Ukawa (2000a) Utilization of corn gluten meal in a diet for red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 66, 417-427 (in Japanese with English abstract).
- Takagi, S., S. Shimeno, H. Hosokawa and M. Ukawa (2000b) Replacement of fish meal by inclusion of alternative protein sources in a diet for juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku* 48, 523-530 (in Japanese with English abstract).
- Takagi, S., H. Hosokawa, S. Shimeno and M. Ukawa (2000c) Replacement of fish meal by combined inclusion of alternative protein sources in a diet for yearling red sea bream, *Pagrus major*. *Suisanzoshoku* 48, 545-552 (in Japanese with English abstract).
- Takagi, S., S. Shimeno, H. Hosokawa and M. Ukawa (2000d) Utilization of poultry by-product meal in a diet for red sea bream, *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi* 66, 428-438 (in Japanese

with English abstract).

Takagi, S., H. Murata, T. Goto, M. Endo, H. Hatate, T. Yoshida, T. Sakai, H. Yamashita and M. Ukawa (2006) Efficiency of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream, *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fisheries Sci.* 72, 1191-1199.

Takii, K., K. Konishi, M. Ukawa, M. Nakamura and H. Kumai (1997) Comparison of digestive and absorptive functions between tiger puffer and red sea bream. *Fisheries. Sci.* 63, 349-354.

Thia-Eng, C. and T. Seng-Keh (1978) Effects of feeding frequency on the growth of young estuary grouper, *Epinephelus tauvina* (Forsk.) cultured in floating net-cages. *Aquaculture* 14, 31-47.

Table 1. Ingredients and proximate composition of the experimental diets

	FM50	FM0	FM0S
<i>Ingredients (% wet matter)</i>			
Anchovy meal	50	-	-
Soybean meal	11	16	16
Soy protein concentrate	-	21	21
Corn gluten meal	-	26	26
Krill meal	-	3	3
Wheat flour	15	9	9
Tapioca starch	5	5	5
Rice bran	7	-	-
Fish oil	9	12	12
Taurine	-	1	1
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	-	3	3
Vitamin mixture	2	2	2
Mineral mixture	1	1	1
Others *	-	2	2
<i>Externally added (% wet matter)</i>			
Water	20	20	20
Soybean oil	3	3	3
Enzyme complex (SSF complex)	-	-	0.13
Taurine	0.2	-	-
<i>Proximate composition</i>			
Protein (% Dry matter)	46.7	47.6	47.5
Lipid (% Dry matter)	14.1	15.8	15.8
Moisture (%)	16.3	16.0	16.6
Ash (% Dry matter)	9.4	5.5	5.5
Phosphorus (mg/g Dry matter)	15.1	10.6	10.5
Taurine (mg/g Dry matter)	5.56	6.83	6.59

* Others: Lysine (1.0%), Methionine (0.5%), Tryptophan (0.2%), Threonine (0.5%)

Table 2. Essential amino acid composition of the experimental diets

	FM50	FM0	FM0S
<i>Amino acid (mg/g dry matter)</i>			
Threonine	21.5	26.5	24.5
Valine	20.2	20.4	18.8
Methionine	6.9	8.7	8.5
Isoleucine	17.3	18.0	17.3
Leucine	36.0	53.3	53.4
Phenylalanine	22.5	28.2	28.5
Histidine	10.4	9.0	9.2
Lysine	36.2	32.8	32.0
Tryptophan	2.8	2.2	2.9
Arginine	23.3	24.4	23.7

Table 3. Daily feed intake and growth performance of red sea bream in Experiment 1*

	FM50	FM0	FM0S
Initial weight (g)	328.0 ± 7.15 ^a	328.7 ± 5.89 ^a	325.5 ± 6.92 ^a
Final weight (g)	652.2 ± 4.97 ^a	650.7 ± 8.59 ^a	686.9 ± 12.30 ^b
Feed conversion ratio ¹	1.92 ± 0.06 ^a	1.76 ± 0.05 ^b	1.77 ± 0.02 ^b
Specific growth rate (%/day) ²	0.60 ± 0.01 ^a	0.60 ± 0.03 ^a	0.66 ± 0.01 ^a
Growth rate (%) ³	98.8 ± 2.82 ^{ab}	98.0 ± 6.16 ^a	111.1 ± 0.71 ^b
Daily feed intake (%/day) ⁴	1.11 ± 0.01 ^b	1.00 ± 0.00 ^a	1.12 ± 0.01 ^b
Protein efficiency ratio ⁵	1.12 ± 0.03 ^a	1.21 ± 0.04 ^a	1.19 ± 0.02 ^a
Mortality (%) ⁶	0.0 ± 0.00 ^a	1.1 ± 1.56 ^a	0.0 ± 0.00 ^a

*Values (means±S.D. of duplicate groups) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

¹ Feed intake (dry matter)/weight gain.

² $100 \times (\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) / \text{feeding days}$.

³ $100 \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight}) / \text{initial body weight}$.

⁴ $\text{Feed intake (dry matter)} \times 100 / [(\text{initial fish weight} + \text{final fish weight} + \text{dead fish weight}) \times \text{feeding days} \times 2]$.

⁵ $\text{weight gain} / \text{protein intake (dry matter)}$.

⁶ $100 \times \text{dead fish number} / \text{initial fish number}$

Table 4. Hematocrit value and content of plasma components of red sea bream in Experiment 1*

	FM50	FM0	FM0S
Hematocrit value (%)	32.2 ± 1.64 ^a	40.2 ± 3.70 ^b	33.4 ± 1.82 ^a
Plasma components			
Total cholesterol (mg/dl)	181 ± 26 ^a	170 ± 23 ^a	157 ± 32 ^a
Total protein (g/dl)	3.7 ± 0.5 ^a	5.0 ± 0.7 ^b	4.2 ± 0.4 ^{ab}
Triglyceride (mg/dl)	80 ± 32 ^a	136 ± 47 ^b	131 ± 32 ^b
Glucose (mg/dl)	36.4 ± 5.7 ^a	32.5 ± 27.4 ^a	42.2 ± 4.0 ^a
Urea nitrogen (mg/dl)	4.0 ± 1.05 ^a	3.6 ± 0.23 ^a	4.5 ± 1.04 ^a

*Values (means±S.D. of 5 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Proximate composition and essential amino acid composition of the whole body from the fish at the end of Experiment 1*

	FM50	FM0	FM0S
<i>Proximate composition</i>			
Protein (% wet matter)	19.6	19.1	19.1
Lipid (% wet matter)	14.7	13.3	14.4
Moisture (%)	59.5	61.9	61.0
Ash (% wet matter)	5.2	5.7	4.8
Phosphorus (mg/g wet matter)	10.1	8.6	8.7
Taurine (mg/g wet matter)	7.54	9.41	9.88
<i>Amino acid (mg/g Dry matter)</i>			
Threonine	19.6	19.9	20.5
Valine	17.2	16.5	18.6
Methionine	10.7	11.7	11.7
Isoleucine	14.6	13.5	15.8
Leucine	32.1	31.3	33.3
Phenylalanine	18.5	18.1	18.7
Histidine	8.4	8.7	8.5
Lysine	38.2	37.6	39.4
Tryptophan	3.2	3.0	1.9
Arginine	15.4	28.6	22.9

* A pooled sample of 5 fish, without replication.

Table 6. Daily feed intake and growth performance of red sea bream in Experiment 2¹

	FM50	FM0	FM0S
Initial weight (g)	90.4	89.1	90.8
Final weight (g)	116.1	112.2	112.6
Feed conversion ratio ¹	1.28	1.42	1.51
Specific growth rate (%) ²	0.58	0.54	0.50
Growth rate (%) ³	28.4	25.9	24.0
Daily feed intake (%/day) ⁴	0.74	0.76	0.75
Protein efficiency ratio ⁵	1.68	1.48	1.40
Mortality (%) ⁶	0.0	0.0	0.0

¹ Feed intake (dry matter)/weight gain.

² $100 \times (\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) / \text{feeding days}$.

³ $100 \times (\text{final body weight} - \text{initial body weight}) / \text{initial body weight}$.

⁴ $\text{Feed intake (dry matter)} \times 100 / [(\text{initial fish weight} + \text{final fish weight} + \text{dead fish weight}) \times \text{feeding days} \times 2]$.

⁵ $\text{weight gain} / \text{protein intake (dry matter)}$.

⁶ $100 \times \text{dead fish number} / \text{initial fish number}$

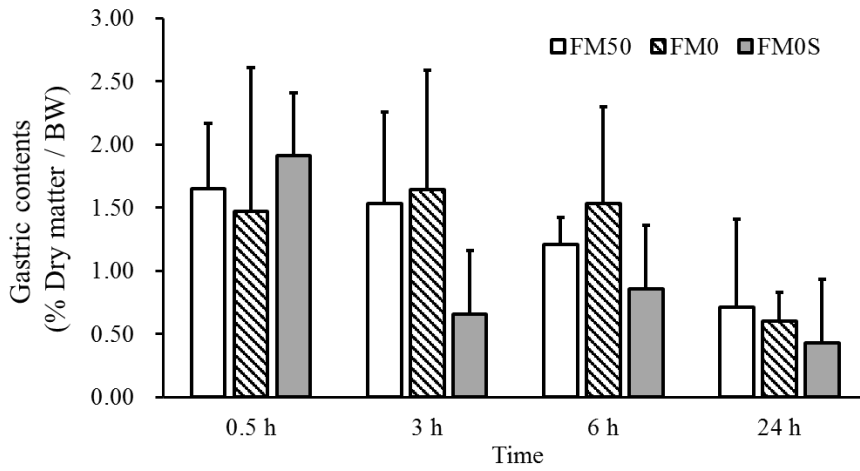


Fig. 1a. Changes in gastric contents in the fish fed FM50, FM0 and FM0S diets in Experiment 2. Values are mean \pm SD of 5 fish. Values in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

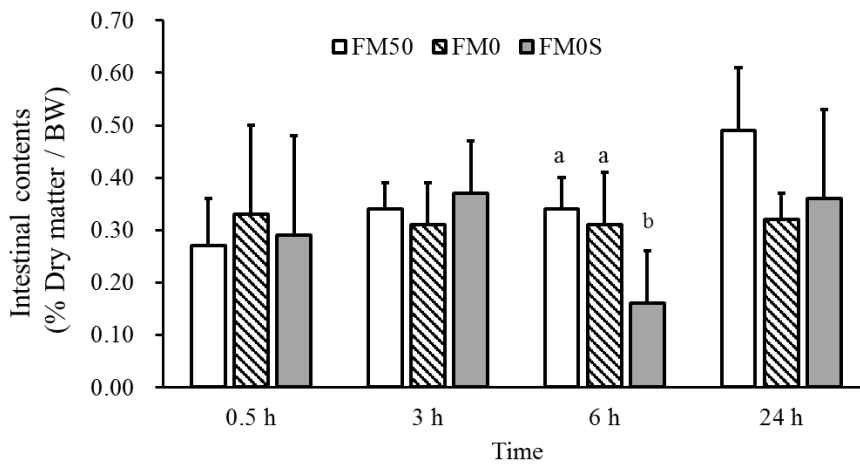


Fig. 1b. Changes in intestinal contents in the fish fed FM50, FM0 and FM0S diets in Experiment 2. Values are mean \pm SD of 5 fish. Values in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

第3章 低・無魚粉 EP 飼料を給餌したマダイの *Edwardsiella tarda* に対する抵抗性

世界的に養殖生産量は増加し続けている一方で魚粉の生産量は減少傾向にあり、魚粉の需給動向は逼迫している。このような状況から、国内の主要な養殖対象種であるマダイ *Pagrus major* では魚粉代替原料の利用性に関する研究が行われており、その結果、濃縮大豆タンパク質、大豆油粕、コーングルテンミール、チキンミール、ミートミール等が代替原料として有効と考えられている (Aoki et al. 2000a, 2000b, 高木ら 1999, 2000a, 2000b, 2000c, 2000d)。さらにマダイ 1 才魚では、それらを配合して必須アミノ酸組成を調整することにより、飼料中に含まれる魚粉の 90~100% を代替できる可能性が示唆されている (Aoki et al. 2000b, 高木ら, 2000d)。また、飼料中の魚粉を植物性原料で代替した場合にはマダイでタウリン不足による緑肝症が発症したものの、飼料にタウリンを補足することでその症状が改善したことが報告されている (Takagi et al. 2006)。

低・無魚粉飼料で飼育した魚については、成長と共に抗病性が低下する可能性が指摘されており、大豆油粕等の植物性原料を主原料とした飼料で養殖魚を飼育した場合に、ブリでは成長低下と血漿コレステロール値の低下および *Lactococcus garvieae* 攻撃時の死亡率の上昇 (Maita et al. 2006)、マダイでは飼育期間中の死亡率上昇や白血球貪食活性の低下 (山下, 2013)、ニジマスでは肝臓組織の変性 (天野ら 2012, 岩下ら 2010) がみられている。その一方で、適正に配合設計されている低魚粉飼料であれば養殖魚 (鮭類) の生残率は悪化しないこと (濱崎 2013)、低魚粉飼料へのアスタキサンチンの配合によりマダイの飼育期間中の死亡率が有意に改善されたこと (山下 2013) も報告されている。

このように、低・無魚粉飼料で飼育した魚の抗病性に関連する報告は複数存在するが、魚粉

主体飼料と同等の飼育成績を示した低・無魚粉飼料について、病原体の攻撃試験により評価した事例は認められず、適正と考えられる配合設計の低・無魚粉飼料で飼育したマダイの抗病性は不明確である。

そこで本研究では、魚粉主体飼料と同等の成長を示した低・無魚粉飼料について、それらがマダイの抗病性に及ぼす影響を、本種の主要な病気の 1 つであるエドワジエラ症の原因細菌 *Edwardsiella tarda* を用いた 2 回の攻撃試験により検討した (実験 1 および 2)。

材料および方法

試験飼料

実験 1 および 2 に用いた各試験飼料の配合組成および成分分析結果を Table 1, 実験 1 に用いた各試験飼料の必須アミノ酸組成の分析結果を Table 2 に示す。試験飼料中の魚粉量は 50%, 20%, 0% または魚粉 50%, 25%, 0% の各 3 種類とし、直径 5~6 mm のエクストルーデッド飼料 (EP) を用いた。成分分析の結果、実験 1 に用いた魚粉 50% 飼料の粗脂肪量が魚粉 20% および魚粉 0% 飼料に比べてやや高い値を示したが、粗脂肪量以外の一般成分は各飼料で同等の値を示した。実験 1 および 2 で用いた魚粉 50% 飼料のリン含量は、魚粉 20%, 25%, 0% 飼料に比べて高い値を示した。また、実験 1 で用いた魚粉 20% および魚粉 0% 飼料に含まれる必須アミノ酸の量は、魚粉 50% 飼料に比べて同等またはそれ以上の値を示した。

供試魚および予備飼育

実験 1

長崎県総合水産試験場の 3 m × 3 m × 3 m 生簀 3 面に、マダイ 1 才魚 (平均体重 90 g) を 45 尾ずつ収容し、2014 年 4 月 23 日から 61 日間の予備飼育を行った。予備飼育中は、総魚体重の 0.7~0.8% 程度を目安に各試験飼料を週 3 日の頻度で等量ずつ給餌した。予備飼育後は各生簀から

供試魚 19 尾ずつを選別し（平均体重 112～116 g）、細菌攻撃までの 4 日間、容量 500 L の円形水槽 3 基で飼育した（馴致期間）。馴致期間中は無給餌として、自然水温下（水温 24.1～24.3℃）で紫外線殺菌海水の流水飼育を行った。

実験 2

長崎県総合水産試験場の 3 m×3 m×3 m 生簀 3 面に、マダイ 1 才魚（平均体重 398 g）を 25 尾ずつ収容し、2015 年 8 月 1 日から 81 日間の予備飼育を行った。予備飼育中は、総魚体重の 0.8%程度を目安に各試験飼料を週 3 日の頻度で等量ずつ給餌した。予備飼育後は各生簀から供試魚 20 尾ずつを選別し（平均体重 630～665 g）、細菌攻撃までの 1 日間、容量 500 L の円形水槽 3 基で飼育した。馴致期間中は無給餌として、自然水温下（水温 23.1℃）で紫外線殺菌海水の流水飼育を行った。

供試菌株

供試菌株には 2012 年に長崎県内の養殖マダイから分離された *E. tarda* Ns12 sousui12 株を用いた。これらの菌株は凍結保存株を融解後、1.5%NaCl ブレインハートインヒュージョン寒天培地（日水製薬）で培養後、1.5%NaCl ブレインハートインヒュージョン液体培地に接種し、25℃で 48 時間振とう培養したものを供試菌液として用いた。

細菌攻撃

細菌攻撃は、菌液 500L（実験 1：3.65×10⁶ CFU/mL、実験 2：1.13×10⁷ CFU/mL）を入れた円形水槽 1 基（攻撃水槽、容量 1000 L）の中にトリカルネット製の円筒形カゴ（目合：1.5 cm×1.5 cm）3 個を設置し、カゴ内へ各区のマダイを試験区毎に収容後、1 時間浸漬する浸漬法とした。なお、浸漬中は菌液をヒーターで 25℃に加温し、水槽内の菌液濃度が均一になるよう強く通気した。

細菌攻撃後の飼育

細菌攻撃後のマダイはカゴごと各飼育水槽（500 L 円形水槽、1 水槽/区）へ移動し、カゴを反転させて飼育水槽内へ収容した。攻撃水槽から飼育水槽内への移動にかかる時間は各区 30 秒に統一した。なお、実験 1 では飼育水槽への移動の際に麻酔処理を行わなかったが、実験 2 では、供試験魚の総重量が重く移動時に魚に生じるスレ等の負担が大きいと考えられたため、攻撃直後に 0.05%の 2-フェノキシエタノールで麻酔処理を行い、各飼育水槽へ移動した。飼育水槽への移動後、各区のマダイはヒーターで加温した紫外線殺菌海水での流水飼育（7 L/分）を行った。なお、攻撃後の飼育中は無給餌とし、実験 1 では 22 日間、実験 2 では 29 日間の経過観察を行った。実験期間中の水温は、実験 1 で 24.7～25.3℃、実験 2 では 23.1～24.3℃で推移した。

死亡魚および生残魚の検査

実験期間中に生じた死亡魚は、魚体の外観および臓器の所見を確認した後、腎臓から SS 寒天培地に菌分離を行い、*E. tarda* の分離が確認された魚を本症による死亡とした。また、実験終了時に生残していた魚各 10 尾を採取し、脾臓保菌率、体表および鱗のスレ、体表の潰瘍、腎臓の結節様小白点の有無を調査した。なお、調査した生残魚のうち、実験 1 では各 10 尾、実験 2 では各 4 尾について、脾臓生菌数も併せて調べた。なお、死魚の菌分離については、腎臓に白金耳を刺突する方法により行った。一方、生残魚から脾臓の保菌率および生菌数を確認する際は、より確実に菌を分離するために、脾臓を磨砕処理した後に菌分離を行った。

統計処理

予備飼育終了時における各区の平均体重および肥満度は、Fisher の PLSD 法による検定を行った。実験終了時における各区の累積死亡率、生残魚の脾臓保菌率、脾臓生菌数、体表のスレおよび潰瘍、腎臓の結節様小白点出現率は、

Fisher の直接確率計算法による検定を行った。

結 果

実験 1

各区の日間給餌率および飼育成績を Table 3 に示す。試験飼料の給餌飼育中の海水温は 16.7°C~22.8°C の間で推移し (平均 20.4°C), 全ての試験区でエドワジエラ症の発症および死亡魚は認められなかった。各区の飼育成績を Table 3 に示す。試験飼料の給餌飼育終了時の平均体重および肥満度は, 各区間で有意差がみられなかった ($P > 0.05$)。日間増重率は, 各区間でほぼ同等の値を示した。増肉係数は魚粉 50% 区 : 1.28, 魚粉 20% 区 : 1.35, 魚粉 0% 区 : 1.42 であり, 飼料中の魚粉削減量に伴いやや高くなる傾向を示した。細菌攻撃から実験終了までの期間における各区の死亡率の推移を Fig. 1 に, 実験終了時における各区の累積死亡率, 生残魚の脾臓保菌率, 脾臓生菌数, 体表および鰭のスレ出現率, 体表の潰瘍出現率, 腎臓結節様小白点出現率を Table 4 に示す。実験終了時の累積死亡率は, 魚粉 50% 区 : 15.8%, 魚粉 20% 区 : 26.3%, 魚粉 0% 区 : 15.8% を示し, 各区間で有意差がみられなかった ($P > 0.05$)。なお, 全ての死亡魚には体表および鰭のスレ, 体表の潰瘍が認められ, 腎臓から *E. tarda* が分離された。生残魚には体表および鰭のスレが全く認められず, 脾臓保菌率は, 魚粉 50% 区および 20% 区 : 70%, 魚粉 0% 区 : 60% を示し, 各区間で有意差がみられなかった ($P > 0.05$)。また, 生残魚における体表の潰瘍出現率および腎臓結節様小白点出現率にも各区間で有意差がみられず ($P > 0.05$), 脾臓生菌数は魚粉 50% 区 : 3.77 log CFU/g, 魚粉 20% 区 : 3.20 log CFU/g, 魚粉 0% 区 : 3.59 log CFU/g であり, 各区で同等の値を示した ($P > 0.05$)。

実験 2

試験飼料の給餌飼育中の海水温は, 27.7°C~

23.0°C の間で推移し (平均 25.5°C), 魚粉 25% 区で 1 尾死亡したが, 全ての試験区でエドワジエラ症の発症は認められなかった。各区の飼育成績を Table 5 に示す。試験飼料の給餌飼育終了時の平均体重は, 各区間で有意差がみられなかった ($P > 0.05$)。肥満度は, 魚粉 50% 区 : 22.0, 魚粉 25% 区 : 21.8, 魚粉 0% 区 : 21.2 を示し, 魚粉 0% 区が魚粉 50% 区に比べて有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。日間増重率は, 魚粉 25% 区が魚粉 50% 区および魚粉 0% 区に比べてやや高い傾向であり, 魚粉 50% 区と魚粉 0% 区はほぼ同等の値を示した。増肉係数は魚粉 50% 区 : 1.40, 魚粉 25% 区 : 1.29, 魚粉 0% 区 : 1.44 であり, 魚粉 25% 区が魚粉 50% 区および魚粉 0% 区に比べてやや低い傾向を示した。細菌攻撃から実験終了までの期間における各区の死亡率の推移を Fig. 2 に, 実験終了時における各区の累積死亡率, 生残魚の脾臓保菌率, 脾臓生菌数, 体表および鰭のスレ出現率, 体表の潰瘍出現率, 腎臓結節様小白点出現率を Table 6 に示す。実験終了時の累積死亡率は, 魚粉 50% 区 : 0.0%, 魚粉 25% 区 : 5.0%, 魚粉 0% 区 : 0.0% を示し, 死魚は魚粉 25% 区の 1 尾だけであった。魚粉 25% 区で生じた死魚は体表にスレおよび潰瘍が認められ, 腎臓から *E. tarda* が分離された。生残魚には体表および鰭のスレが全く認められず, 脾臓保菌率は, 魚粉 50% 区 : 60%, 魚粉 25% 区および 0% 区 : 70% を示し, 各区間で有意差がみられなかった ($P > 0.05$)。また, 生残魚における体表の潰瘍出現率および腎臓結節様小白点出現率にも各区間で有意差がみられず ($P > 0.05$), 脾臓生菌数は魚粉 50% 区 : 4.47 log CFU/g, 魚粉 25% 区 : 4.35 log CFU/g, 魚粉 0% 区 : 4.57 log CFU/g であり, 各区で同等の値を示した ($P > 0.05$)。

考 察

実験 1 の結果では, 飼料中の魚粉量を削減するに伴い日間増重率および増肉係数が劣る傾向を示したが, その差はごくわずかであり, 試

験飼料の給餌飼育終了時における平均体重および肥満度に統計的な有意差はみられなかった ($P > 0.05$)。実験2では、魚粉25%区の日間増重率および増肉係数が魚粉50%区および魚粉0%区に比べてやや優れる傾向を示し、魚粉50%区と魚粉0%区の間ではそれらの項目が同等の値を示した。実験2の試験飼料給餌飼育終了時における肥満度は、魚粉0%区が魚粉50%区に比べて有意に低い値を示したが ($P < 0.05$)、その差は比較的小さく、平均体重には統計的な有意差がみられなかった ($P > 0.05$)。以上のことから、実験1および2の両方において、低・無魚粉飼料で飼育したマダイ1才魚は、魚粉主体飼料と比べて概ね遜色ない成長を示していたと判断された。高木ら(2000d)は、195日間に及ぶ飼育試験の結果から、必須アミノ酸組成を考慮して大豆油粕、コーングルテンミール、チキンミール等の代替タンパク質を配合することにより、マダイ1才魚においては飼料中の魚粉量を大幅削減できることを示唆している。また、Aoki et al. (2000b)は、87日間の飼育試験の結果、大豆油粕、コーングルテンミール、チキンミール等の代替タンパク質を配合し、必須アミノ酸を補足した無魚粉飼料ではマダイの成長および健康状態に悪影響を及ぼさなかったことを報告している。本実験で用いた低・無魚粉飼料は、それらの知見を参考として、大豆油粕およびコーングルテンミール、一部には濃縮大豆タンパクやチキンミールも配合している。さらに、魚粉削減に伴い不足が懸念されるリジンおよびメチオニン等の必須アミノ酸を補足し、マダイにおいても餌からの摂取の必要性が報告されているタウリン(Takagi et al. 2006, Matsunari et al. 2008)の添加も行っている。このように、本研究の実験1および2で用いた低・無魚粉飼料は、各種代替タンパク原料および必須アミノ酸等の配合組成に注意を払った設計であり、特に実験1では、試験飼料の分析の結果、必須アミノ酸量およびタウリン量が魚粉主体飼料と同等以上の値を示したことから、低・

無魚粉飼料区のマダイ1才魚が魚粉主体飼料区と遜色ない飼育成績を示したものと考えられる。

本研究では、マダイにおけるエドワジエラ症の特徴的な症状が出やすく、実験感染法として適していると判断された浸漬感染による細菌攻撃を行った(黒原ら2008)。羽生ら(2014)は、エドワジエラ症を自然発病したマダイの臓器にみられる小白点が肉芽腫であることを明らかにした上で、白金耳の臓器への刺突による菌分離では肉芽腫内の*E. tarda*を十分に分離できず、結果として菌分離率が低下する病期があることを確認している。その知見をふまえて、実験1および2では、脾臓保菌率を確認する際に脾臓を磨砕した上で菌分離を行った。実験1および2での脾臓における*E. tarda*保菌率が各区60~70%を示し、死魚に体表の潰瘍および腎臓の結節様小白点をはじめとする*E. tarda*の特徴的な症状(楠田ら1977, 安永1977, 安永ら1982)が認められたことから、本研究では、細菌攻撃と菌分離が問題なく行われたものと考えられる。

実験1, 2ともに、細菌攻撃から実験終了までの期間における累積死亡率、実験終了時における生残魚の脾臓保菌率および生菌数は、各区間で差がみられなかった。このことから、本研究では少なくとも感染後22~29日後の期間において、低・無魚粉飼料で飼育したマダイの保菌状況および*E. tarda*に対する抵抗性は、魚粉主体飼料区と同等であったことが示唆された。ブリでは、無魚粉飼料の給餌により貧血が生じた結果、*L. garvieae*に対する抵抗性が低下したこと、タウリンの添加により貧血が改善されたことが報告されている(Maita et al. 2006)。また、山下(2013)は、マダイを対象とした低・無魚粉飼料による飼育試験の結果、飼料中の魚粉量が低いほどエドワジエラ症等による死亡率が上昇したが、低魚粉飼料へのアスタキサンチンの添加により死亡率が有意に改善されたことを報告している。このように、低・無魚粉飼料

で養殖魚を飼育する場合においても、不足する成分を補足することにより、抗病性の改善は可能であることが示唆されている。また、肥満度が低いマダイは *E. tarda* の保菌率が高くなる傾向を示し、その原因として十分な栄養を摂取できていないことが推察されている（羽生・宮本 2015）。今回用いた低・無魚粉飼料は、タウリンおよびリジン、メチオニン等の結晶アミノ酸を添加し、魚粉主体飼料と比較してタウリンおよび必須アミノ酸の不足が生じないように魚粉代替原料の配合組成に注意を払った上で作製されたため、本研究では魚体内でそれらの必要な成分の不足が生じにくい条件であったと考えられ、試験飼料の給餌飼育中における低・無魚粉飼料区のマダイの飼育成績は魚粉主体飼料区と同等の数値を示した。以上のことから、十分な栄養を摂取可能である適正な配合組成の低・無魚粉飼料は、マダイの *E. tarda* に対する抵抗性に著しい悪影響を及ぼさないことが示唆された。

実験 1 では、全ての死魚で体表および鰭のスレが認められたのに対し、生残魚はそれらの症状が全く認められなかった。このことから、実験 1 では、体表および鰭のスレがマダイの生死に大きな影響を与えたことが推察される。*E. tarda* の魚への侵入経路は、腸管や鰓だけでなく体表も疑われていること（Ling et al. 2001）、本実験は浸漬法により細菌攻撃を行ったことから、体表を経由して菌が侵入した可能性が考えられ、その際、体表および鰭の傷が菌の侵入を促したことが推察される。

実験 2 では、死魚、生残魚の両方において、体表および鰭の傷が全く認められなかった。このことから、実験 1 と 2 における体表および鰭の傷の出現率の違いは、両実験の攻撃直後における供試魚取り扱い方法の違いにより生じたことが推察される。また、実験 2 では、同じ菌株を用いて菌液の濃度が実験 1 に比べてやや高かったにも関わらず、累積死亡率は 0.0～5.0% と実験 1 に比べて低い値を示した。この原因と

しては、攻撃後における体表および鰭の傷の有無、供試魚の体重および肥満度の違い（実験 1：平均体重 112～116 g・肥満度：20.8～21.1、実験 2：平均体重 630～665 g・肥満度 21.2～22.0）、またはその両方が考えられるが、本研究の結果ではその因果関係は不明である。羽生ら（2015）は、飼育密度の高さまたは肥満度の低さが *E. tarda* 感染耐過マダイの保菌率に負の影響を与える傾向にあることを報告している。今後は、体表および鰭の傷の有無がマダイの *E. tarda* に対する抵抗性に及ぼす影響について、更なる検討が必要と考えられる。

本研究では、低・無魚粉飼料で飼育し、魚粉主体飼料と同等の飼育成績を示したマダイ 1 才魚について、*E. tarda* 攻撃 22～29 日後における累積死亡率、脾臓保菌率および生菌数等を調べた結果、各群における *E. tarda* に対する抵抗性の大きな違いは認められなかった。*E. tarda* は、貪食細胞内に取り込まれた後でも生存可能であることが知られており（Miyazaki and Kaige 1985）、養殖漁場においてもマダイが長期に保菌し、感染耐過魚の保菌がその後の累積死亡率に大きな影響を及ぼすことが示唆されている（羽生・宮本 2015）。また、マダイについては、大豆由来原料を用いた魚粉削減飼料の給餌により、肝細胞の萎縮（天野ら 2012）、白血球貪食能の低下（山下 2013）等の影響が生じた事例も報告されている。本研究では、肝細胞の組織または白血球貪食能について未検討だが、低・無魚粉飼料の給餌によりそれらの影響が生じた場合、長期的にみて *E. tarda* に対する抵抗性に負の影響を与える可能性も想定される。したがって、*E. tarda* を保菌した後に低・無魚粉飼料で長期飼育したマダイの本症に対する抵抗性については、将来的に検討した方が良い課題であると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、水産研究・教育機構

中央水産研究所の石田典子主任研究員，三重県水産研究所尾鷲水産研究室の青木秀夫室長，愛媛県農林水産研究所水産研究センターの山下主任研究員，農林水産・食品産業技術振興協会の秋山敏男氏，日清丸紅飼料株式会社水産研究所の興石友彦所長，東北大学大学院の片山知史教授には有益な助言を賜った。中部飼料株式会社の中尾貴尋氏には試験飼料の提供をいただいた。実験魚の飼育等，本研究の実施にあたっては大川由美子氏，坂本真奈美氏，古谷久美子氏等の長崎県総合水産試験場職員の皆様に多大なご協力を賜った。また，本研究の一部は，農林水産省農林水産技術会議事務局「農林水産業の革新的技術緊急展開事業」の予算（平成26年～27年）で行った。これらの関係者の方々に對し，この場を借りて深謝いたします。

文 献

- 天野俊二・鈴木伸洋・松成宏之・岩下恭朗・山本剛史（2012）：マダイにおける大豆油粕主体無魚粉飼料へのタウリン添加効果の組織学的検討。水産増殖，60, 459-467.
- Aoki, H., Y. Sanada, M. Furuichi, R. Kimoto, M. Maita, A. Akimoto, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000a): Partial or complete replacement of fish meal by alternate protein sources in diets for yellowtail and red sea bream. *SUISANZOSHOKU*, 48, 53-63.
- Aoki, H., M. Furuichi, K. Watanabe, S. Satoh, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000b): Use of non-fish meal diets for red sea bream. *SUISANZOSHOKU*, 48, 65-72.
- 濱崎祐太（2013）サーモン養殖での抗病性に関する取組。日水誌，79，453.
- 羽生和弘・宮本敦史・中井敏博（2014）：*Edwardsiella tarda* 人為感染マダイにおける保菌。日水誌，80, 572-577.
- 羽生和弘・宮本敦史（2015）：マダイ養殖場におけるエドワジエラ症耐過魚の保菌に関する予備的疫学調査。三重県水産研究所研究報告，24, 9-18.
- 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, 411-419.
- 黒原健朗・木村喜洋・関口洋介・川井研兒（2008）：エドワジエラ症の感染方法がマダイ *Pagrus major* 体内の原因菌動態に及ぼす影響。水産増殖，56, 551-558.
- 楠田理一・伊丹利明・宗清正広・中島博司（1977）：養殖チダイから分離された病原性 *Edwardsiella* の性状について。日水誌，43, 129-134.
- Ling, S. H. M., X. H. Wang, T. M. Lim and K. Y. Leung (2001): Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. *FEMS Microbiology Letters* 194, 239-243.
- Maita, M., J. Maekawa, K. Satoh, K. Futami, and S. Satoh (2006): Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fisheries Sci.*, 72, 513-519.
- Matsunari, H., H. Furuita, T. Yamamoto, S.K. Kim, Y. Sakakura and T. Takeuchi (2008): Effect of dietary taurine and cystine on growth performance of juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Aquaculture*, 274, 142-147.
- Miyazaki, T. and N. Kaige (1985): Comparative histopathology of Edwardsiellosis in fishes. *Fish Pathol.*, 20, 219-227.
- 高木修作・細川秀毅・示野貞夫・舞田正志・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, 77-87.
- 高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治（2000a）：マダイ飼料におけるコーングルテンミールの利用。日水誌，66, 417-427.

高木修作・細川秀毅・示野貞夫・宇川正治
(2000b)：マダイ飼料におけるチキンミールの
利用. 日水誌, 66, 428-438.

高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治
(2000c)：マダイ稚魚飼料におけるタンパク質
源併用による魚粉の削減. 水産増殖, 48, 523-530.

高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治
(2000d)：マダイ1歳魚飼料におけるタンパク
質源併用による魚粉の削減. 水産増殖, 48,
545-552.

Takagi, S., H. Murata, T. Goto, T. Ichiki, D. M.
Munasinghe, M. Endo, T. Matsumoto, A. Sakurai, H.
Hatate, T. Yoshida, T. Sakai, H. Yamashita M.
Ukawa and T. Kuramoto (2005): The green liver
syndrome is caused by taurine deficiency in
Yellowtail, *Seriola quinqueradiata* fed diets without
fishmeal. *Aquaculture Sci.*, 53, 279-290.

Takagi, S., H. Murata, T. Goto, M. Endo, H. Hatate,
T. Yoshida, T. Sakai, H. Yamashita and M. Ukawa
(2006): Efficiency of taurine supplementation for
preventing green liver syndrome and improving
growth performance in yearling red sea bream,
Pagrus major fed low-fishmeal diet. *Fisheries Sci.*,
72, 1191-1199.

安永統男 (1977)：潰瘍・結節を伴う養殖マダ
イの新疾病の原因菌. 長崎県水産試験場研究報
告, 3, 1-4.

安永統男・小川七朗・畑井喜司雄 (1982)：数
種の海産養殖魚から分離された病原性
Edwardsiella の性状

山下浩史 (2013) マダイの抗病性. 日水誌, 79,
456.

Table 1
Ingredients and proximate composition of the experimental diets

	Experiment 1			Experiment 2		
	FM50	FM20	FM0	FM50	FM25	FM0
<i>Ingredients (g / 100 g wet matter)</i>						
Anchovy meal	50.00	20.00	-	50.00	25.00	-
Soybean meal	14.00	23.00	23.00	4.00	15.00	25.00
Soy protein concentrate	-	-	20.00	-	-	-
Corn gluten meal	-	26.00	26.00	4.00	16.00	31.00
Poultry by-product meal	-	-	-	-	8.00	7.00
Feather meal	-	-	-	-	4.00	6.00
Wheat flour	13.00	12.45	9.00	9.00	8.00	3.30
Tapioca starch	5.00	5.00	5.00	7.00	7.00	7.00
Rice bran	9.00	-	-	12.00	-	-
Fish oil	6.00	8.00	9.50	11.00	8.00	10.00
Palm oil	-	-	-	-	3.00	2.00
Taurine	-	0.30	0.50	-	0.50	1.00
Ca(H ₂ PO ₄) ₂	-	1.50	2.50	-	1.50	2.70
Vitamine mixture ¹	2.00	2.00	2.00	-	-	-
Vitamine mixture ²	-	-	-	2.00	2.00	2.00
Mineral mixture ³	1.00	1.00	1.00	-	-	-
Mineral mixture ⁴	-	-	-	1.00	1.00	1.00
L-Lysine	-	0.50	1.00	-	0.45	0.90
L-Methionine	-	0.25	0.50	-	0.23	0.46
L-Threonine	-	-	-	-	0.23	0.46
L-Tryptophan	-	-	-	-	0.09	0.18
<i>Externally added</i>						
Soybean oil (g / 100g wet matter)	3.00	3.00	3.00	-	-	-
Skipjack peptide ⁵ (g / 100g wet matter)	-	-	-	-	0.50	0.50
Enzyme complex ⁶ (g / 100g wet matter)	-	-	-	-	0.20	0.20
Astaxanthin (ppm)	-	-	-	-	40.00	40.00
<i>Proximate composition</i>						
Protein (% Dry matter)	47.3	48.1	47.7	45.4	46.2	44.0
Lipid (% Dry matter)	19.6	16.4	15.3	15.8	16.1	14.8
Moisture (%)	3.1	6.8	4.9	7.3	7.6	6.6
Phosphorus (mg / g Dry matter)	19.5	12.0	12.3	18.1	14.7	11.2

¹ Chubushiryo Co., Ltd.² See Takagi et al. (2005)³ Chubushiryo Co., Ltd.⁴ See Takagi et al. (2005)⁵ Marubeni Nisshin Feed Co., Ltd.⁶ Alltech

Table 2
Essential amino acid composition of the experimental diet in Experiment 1

	FM50	FM20	FM0
<i>(mg / g Dry matter)</i>			
Threonine	13.2	16.7	12.3
Valine	9.6	11.3	9.0
Methionine	4.6	6.4	7.2
Isoleucine	7.7	9.5	7.4
Leucine	21.2	35.8	35.3
Phenylalanine	12.6	17.2	18.3
Histidine	6.2	6.6	6.4
Lysine	20.1	19.0	21.2
Tryptophan	2.7	1.5	3.1
Arginine	22.1	19.2	18.1

Table 3
Daily feed intake and growth performance of red sea bream in Experiment 1*

	Fish meal 50%	Fish meal 20%	Fish meal 0%
Initial weight (g)	90.4 ± 9.0 ^a	89.7 ± 10.9 ^a	89.1 ± 11.1 ^a
Final weight (g)	116.1 ± 11.8 ^a	114.0 ± 12.9 ^a	112.2 ± 22.1 ^a
Condition factor ¹	21.1 ± 1.4 ^a	20.8 ± 1.1 ^a	21.1 ± 1.5 ^a
Feed conversion ratio ²	1.28	1.35	1.42
Specific growth rate (%) ³	0.58	0.56	0.54
Daily feed intake (% / day) ⁴	0.74	0.75	0.76
Mortality (%) ⁵	0.0	0.0	0.0

*Values (means±S.D. of 45 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

¹ $1000 \times [\text{g individual body weight} / (\text{cm individual fork length})^3]$.

² Feed intake (dry matter)/weight gain.

³ $100 \times (\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight}) / \text{feeding days}$.

⁴ Feed intake (dry matter) $\times 100 / [(\text{initial fish weight} + \text{final fish weight} + \text{dead fish weight}) \times \text{feeding days} \times 2]$.

⁵ $100 \times \text{dead fish number} / \text{initial fish number}$.

Table 4

Cumulative mortality, carrier rate and symptoms of red sea bream in experiment 1*

	Fish meal 50%	Fish meal 20%	Fish meal 0%
<i>Investigation of dead fish in challenge test</i>			
Cumulative mortality (%) ¹	15.8 (3/19) ^a	26.3 (5/19) ^a	15.8 (3/19) ^a
Observation and dissection of dead fish ²			
Scuff (body surface or fin, %)	100.0 (3/3)	100.0 (5/5)	100.0 (3/3)
Ulcerative lesion (body surface, %)	100.0 (3/3)	100.0 (5/5)	100.0 (3/3)
Tubercle like white spot (kidney)	33.3 (1/3)	100.0 (5/5)	66.6 (2/3)
<i>Investigation of survived fish after challenge test</i>			
Carrier rate (%) ³	70.0 (7/10) ^a	70.0 (7/10) ^a	60.0 (6/10) ^a
Number of viable cells (log/g) ⁴	3.77 ^a	3.20 ^a	3.59 ^a
Observation and dissection of survived fish ⁵			
Scuff (body surface or fin, %)	0.0 (0/10) ^a	0.0 (0/10) ^a	0.0 (0/10) ^a
Ulcerative lesion (body surface, %)	10.0 (1/10) ^a	20.0 (2/10) ^a	30.0 (3/10) ^a
Tubercle like white spot (kidney, %)	40.0 (4/10) ^a	30.0 (3/10) ^a	20.0 (2/10) ^a

* Fish were immersed in a bacterial suspension at 3.65×10^6 CFU/mL for 1.0 hour.

1 Figures represent percentages of cumulative mortality. Figures in the parenthesis represent no. of dead fish/no. of fish tested.

2 Figures represent percentages of scuff or symptoms positive fish to the dead fish. Figures in the parenthesis represent no. of scuff or symptoms positive fish/no. of dead fish.

3 Figures represent percentages of *E. tarda* positive fish to the fish survived. Figures in the parenthesis represent no. of *E. tarda* positive fish/no. of fish survived (n=10).

4 Figures represent means of fish survived (n=10).

5 Figures represent percentages of scuff or symptoms positive fish to the fish survived. Figures in the parenthesis represent no. of scuff or symptoms positive fish/no. of fish survived (n=10).

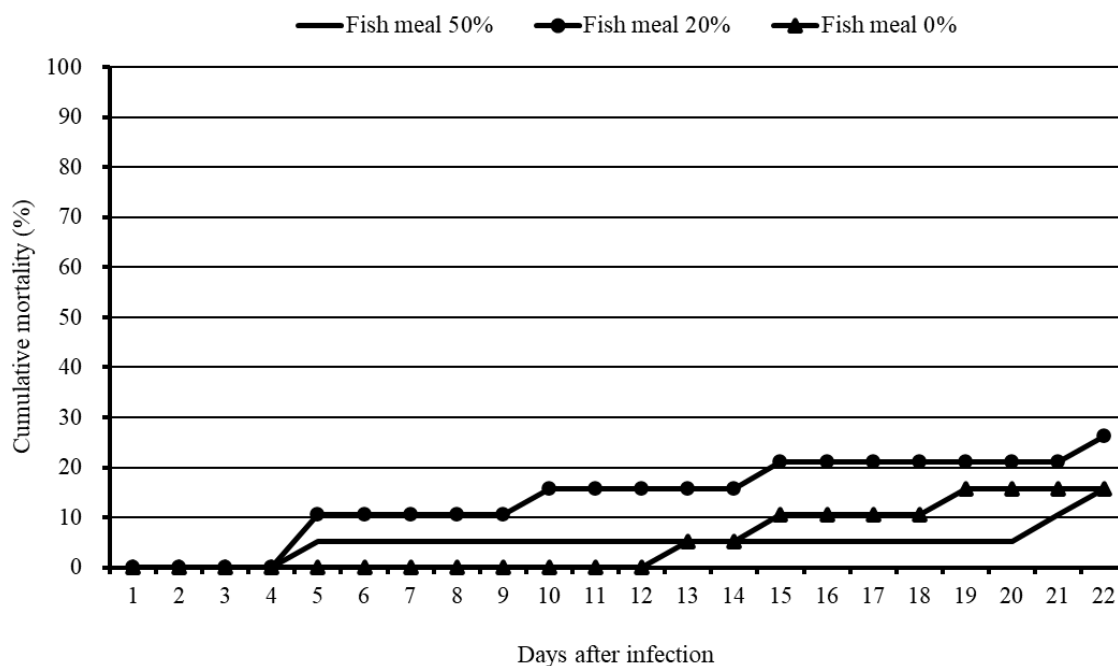


Fig. 1 Cumulative mortality of red sea bream challenged with *E. tarda* in experiment 1.

Table 5

Daily feed intake and growth performance of red sea bream in Experiment 2*

	Fish meal 50%	Fish meal 25%	Fish meal 0%
Initial weight (g)	409.6 ± 69.6 ^a	396.8 ± 71.9 ^a	387.2 ± 56.1 ^a
Final weight (g)	658.4 ± 75.0 ^a	665.4 ± 91.7 ^a	630.4 ± 65.3 ^a
Condition factor ¹	22.0 ± 1.1 ^a	21.8 ± 0.9 ^{ab}	21.2 ± 1.0 ^b
Feed conversion ratio ²	1.40	1.29	1.44
Specific growth rate (%) ³	0.59	0.64	0.60
Daily feed intake (% / day) ⁴	0.81	0.81	0.85
Mortality (%) ⁵	0.0	0.0	0.0

*Values (means±S.D. of 25 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P<0.05$).¹ $1000 \times [\text{g individual body weight}/(\text{cm individual fork length})^3]$.² Feed intake (dry matter)/weight gain.³ $100 \times (\ln \text{ final body weight} - \ln \text{ initial body weight})/\text{feeding days}$.⁴ Feed intake (dry matter) $\times 100/[(\text{initial fish weight} + \text{final fish weight} + \text{dead fish weight}) \times \text{feeding days} \times 2]$.⁵ $100 \times \text{dead fish number}/\text{initial fish number}$.

Table 6

Cumulative mortality, carrier rate and symptoms of red sea bream in experiment 2*

	Fish meal 50%	Fish meal 25%	Fish meal 0%
<i>Investigation of dead fish in challenge test</i>			
Cumulative mortality (%) ¹	0.0 (0/20) ^a	5.0 (1/20) ^a	0.0 (0/20) ^a
Observation and dissection of dead fish ²			
Scuff (body surface or fin, %)	- (0/0)	0.0 (0/1)	- (0/0)
Ulcerative lesion (body surface, %)	- (0/0)	100.0 (1/1)	- (0/0)
Tubercle like white spot (kidney)	- (0/0)	100.0 (1/1)	- (0/0)
<i>Investigation of survived fish after challenge test</i>			
Carrier rate (%) ³	60.0 (6/10) ^a	70.0 (7/10) ^a	70.0 (7/10) ^a
Number of viable cells (log/g) ⁴	4.47 ^a	4.35 ^a	4.57 ^a
Observation and dissection of survived fish ⁵			
Scuff (body surface or fin, %)	0.0 (0/10) ^a	0.0 (0/10) ^a	0.0 (0/10) ^a
Ulcerative lesion (body surface, %)	100.0 (10/10) ^a	100.0 (10/10) ^a	90.0 (9/10) ^a
Tubercle like white spot (kidney)	30.0 (3/10) ^a	40.0 (4/10) ^a	40.0 (4/10) ^a

* Fish were immersed in a bacterial suspension at 1.13×10^7 CFU/mL for 1.0 hour.

1 Figures represent percentages of cumulative mortality. Figures in the parenthesis represent no. of dead fish/no. of fish tested.

2 Figures represent percentages of scuff or symptoms positive fish to the dead fish. Figures in the parenthesis represent no. of scuff or symptoms positive fish/no. of dead fish.

3 Figures represent percentages of *E. tarda* positive fish to the fish survived. Figures in the parenthesis represent no. of *E. tarda* positive fish/no. of fish survived (n=10).

4 Figures represent means of fish survived (n=4).

5 Figures represent percentages of scuff or symptoms positive fish to the fish survived. Figures in the parenthesis represent no. of scuff or symptoms positive fish/no. of fish survived (n=10).

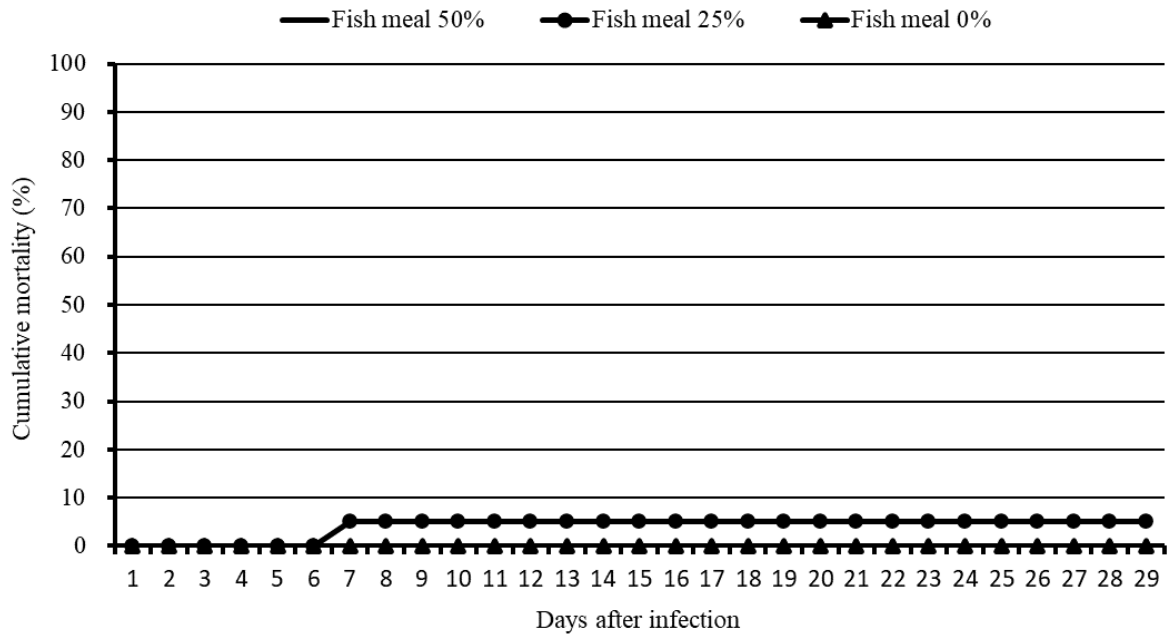


Fig. 2 Cumulative mortality of red sea bream challenged with *E. tarda* in experiment 2.

第4章 マダイ1才魚に対する低魚粉EP飼料の実用性

わが国の海産魚類養殖業は、海面養殖全体の生産量の24%、生産額では53%を占めており、重要な漁業種類である（平成26年度農林水産統計データ）。養殖魚のうちマダイの生産量はブリ類に次ぐ規模で推移しており、マダイは主要な養殖魚種に位置付けられる。マダイ養殖業では個人経営体および会社経営体とも利益幅が小さく、販売単価の低下によりコスト割れにつながりやすい構造であると指摘されている（平成25年度水産白書）。そのため、養殖経営の安定化には、生産コストの削減をはかることが重要である。マダイ養殖業にかかる生産コストの内訳をみると、支出費目のうち飼料費の割合が70%前後で最も多い。海産魚用の配合飼料には、一般的に魚粉が主タンパク質源として50%前後配合されており、その大半が国外からの輸入されている。そのため、配合飼料の販売価格は輸入魚粉の価格に大きな影響を受ける。近年では魚粉の国際的な市場価格の高騰に伴い飼料の価格が上昇しており、これが養殖経営を圧迫する大きな要因となっている。さらに、輸出国における魚粉の生産量はその原料となる多獲性魚類の漁獲量に左右され、不安定となっている。

こうした状況のなか、配合飼料の安定供給を図り価格の高騰に対処するため、これまでに多くの海産魚を対象として魚粉代替原料の利用性に関する研究が実施され、各種の動・植物性原料を有効に利用できることが明らかにされている（青木2009）。マダイ用飼料では大豆油粕、コーングルテンミール、ミートミール等の利用性が検討され、稚魚ではこれらを単独あるいは併用して飼料中に30~40%程度配合し、魚粉割合の半分程度を置き換えられることが報告されている（Aoki et al. 1997, 1998）。またマダイ1才魚では、それらの原料を用いることで魚粉の全量を置き換えられるという知見が得ら

れている（Aoki et al. 2000, 高木ら2000a）。

しかしながら、マダイ用飼料における魚粉代替原料の有効利用に関するこれらの知見は、市販される飼料の配合設計に十分活用されているとは言い難い。その理由としては、代替原料の利用に関する多くの研究は、研究機関における小規模の飼育施設で比較的短期間に行われたものであり、数千尾以上を生簀に収容し1~1.5年以上飼育するマダイ養殖業と比較して飼育条件が大きく異なり、研究結果をそのまま実用規模へ展開するとリスクが大ききことが主な要因であると考えられる。これまでに海産魚を対象として魚粉削減飼料の可能性を実用規模で調査した事例はあるが、その報告は少ない。そこで本研究では、マダイに対する低魚粉飼料の実用性を検討するため、長崎県内の養殖業者の生簀でマダイ1才魚を対象とした魚粉量25%低魚粉EP飼料の実証試験を行った。

材料および方法

試験飼料

試験飼料の配合組成および一般成分をTable 1に示す。本研究では、低魚粉EP飼料（魚粉量25%）と市販EP飼料（魚粉量40%）の2種類の飼料を用い、それぞれの給餌区を低魚粉区および市販飼料区とした。低魚粉飼料には、魚粉以外のタンパク質源として大豆油粕（以下、SBM）を20%、コーングルテンミール（以下、CGM）を25%配合した。脂質源としては魚油8%とパーム油4%を配合し、その他、ビタミン類、ミネラル類、デンプン、リジン+メチオニン+スレオニン+トリプトファンからなる結晶アミノ酸混合物、タウリン、摂餌促進物質（日清丸紅飼料、カツオペプチド）、酵素混合物（Alltech, SSF）、アスタキサンチン等を添加した。試験飼料はいずれも日清丸紅飼料株式会社製であり、両試験飼料の直径は6~8mmとして、魚体の大きさに適したサイズの飼料を使用した。低魚粉飼料と市販飼料の粗タンパク質含量

は、それぞれ 46.3%、43.3%で、低魚粉飼料の粗タンパク質含量の方が、市販飼料に比べてやや高かった。粗脂肪含量は、前者が 14.6%、後者は 15.1%であり、同等の値を示した。

飼育条件

本研究は、長崎県五島市のマダイ養殖漁場で飼育試験を実施した。試験区は市販飼料区と低魚粉区の 2 区を設定し、試験期間は 2015 年 7 月 8 日から 2016 年 1 月 29 日までの 206 日間とした。供試魚は、大分県の種苗生産業者から入手し、長崎県五島市の養殖場で約 1 年間飼育した平均体重 543 g のマダイ 1 才魚（人工種苗、n = 100）として、10 m × 10 m × 10 m の網生簀に各 6,000 尾を収容した。給餌頻度は、開始時から 10 月 13 日までは 2 日に 1 回、それ以後終了時までには 3 日に 1 回とし、毎回両区とも等量を与えた。試験期間中における養殖漁場の水深 1m の水温は、15.5~27.0℃であった。試験期間中は、2~3 ヶ月ごとに各区から 50 尾ずつ無作為に採取し、オイゲノール（FA100）で麻酔処理を行なった後、尾叉長と体重を個体ごとに測定した。

飼育成績

魚体重測定データのデータをもとに試験魚の平均魚体重を算出するとともに、魚体の総重量と給餌量から増重率、増肉係数、日間給餌率およびタンパク質効率を次式により求めた。

$$\text{増重率 (\%)} = 100 \times \{ (TWf + TWs - TWi) / TWi \}$$

$$\text{増肉係数} = F / (TWf + TWs - TWi)$$

$$\text{日間給餌率 (\%)} = 100 \times \{ F / [t \times (TWf + TWs + TWi) / 2] \}$$

$$\text{タンパク質効率} = (TWf + TWs - TWi) / P$$

TWi : 開始時の総重量 (kg)

TWf : 終了時の総重量 (kg)

TWs : サンプル魚と死亡魚の総体重 (kg)

F : 総給餌量 (kg)

t : 飼育日数

P : タンパク質摂取量 (kg)

筋肉の一般成分

試験開始 2 ヶ月後に各区から試験魚を 5 尾ずつ取り上げ、背側筋肉を採取して水分、粗タンパク質、粗脂肪含量を分析した。水分は常圧加熱乾燥法 (110℃) で試料を乾燥させて測定した乾燥重量をもとに算出した。粗タンパク質はセミマイクロケルダール法で定量した窒素量に 6.25 (窒素-タンパク質換算係数) を乗じて算出した。粗脂肪はジエチルエーテルを用いたソックスレー法で分析した。

統計処理

各区から試験魚を取り上げて計測した魚体重および各形質の値について、対応のない 2 群の比較検定として、分散が等しいときまたは異なるときの t 検定により有意差の有無を検定した。検定の有意水準は 5% とした。

結果

飼育成績

飼育成績を Table 2 に、平均魚体重の推移を Fig. 1 に示す。

試験飼料に対する試験魚の摂餌性はいずれの区も活発であった。開始時における両区の平均体重は、市販飼料区が 567 g、低魚粉区が 519 g であり、市販飼料区が低魚粉区に比べて有意に重い値を示した ($P < 0.05$)。試験開始から終了時までの 7 ヶ月間における低魚粉区の増重率は 155.1% であり、市販飼料区 (120.1%) に比べて優れる傾向を示し、終了時における低魚粉区の平均体重は市販飼料区に比べて有意に重い値であった ($P < 0.05$)。日間給餌率は、市販飼料区が 0.87%、低魚粉区が 0.85% を示し、両区とも同等の値であった。増肉係数は、市販飼料区が 2.38、低魚粉区が 2.02 を示し、低魚粉区の方が優れていた。各区の死亡率は 0.2~0.3% であり、魚病の発生および蔓延は認められなかつ

た。

肥満度，比肝重値，内臓重量比，血液ヘマトクリット値および血漿化学成分値

終了時に採取した魚体の肥満度，比肝重値および内臓重量比の測定結果を Table 3 に示す。肥満度および比肝臓重値に市販飼料区と低魚粉区の間で有意差はみられなかったが，低魚粉区の内臓重量比が市販飼料区に比べて有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。終了時における血液ヘマトクリット値および血漿化学成分の分析結果を Table 4 に示す。血液ヘマトクリット値は，両区の間で統計的な有意差が認められなかった。総コレステロール（以下，TCHO）値は，低魚粉区の方が市販飼料区に比べて有意に低い値を示した ($P < 0.05$)。TCHO 値以外の血漿化学成分値については，両区の間で統計的な有意差が認められなかった。

一般化学成分

試験開始 2 ヶ月後に採取した魚体筋肉の水分，粗タンパク質，粗脂肪の含量の分析結果を Table 5 に示す。粗タンパク質，粗脂肪含量は，それぞれ 72.6~73.0%，21.9~22.0%，4.6~4.9%で，いずれの成分についても両区の間で統計的な有意差は認められなかった。

考 察

本研究では，マダイにおける魚粉代替原料の有効利用に関する既存の知見をもとに，1 才魚を対象に配合設計した低魚粉 EP 飼料の現場での実用性を長崎県五島市の養殖漁場で検証した。その結果，低魚粉 EP 飼料に対するマダイの摂餌性は問題なく，低魚粉 EP 飼料の給餌に起因するような試験魚の遊泳異常や魚病の発生は認められなかった。低魚粉区における終了時の平均魚体重や増重率，および増肉係数は，市販飼料区より優れる傾向を示した。これらのことから，本研究で使用した低魚粉 EP 飼料は

マダイ 1 才魚に対して市販飼料と同等かそれ以上の栄養価を有し，現場での実用性に問題はないと判断された。

マダイでは，魚粉代替原料の配合率が高くなるほど，成長や増肉係数は悪化する傾向であり，この要因としては，魚粉代替原料の配合率の増加に伴い，飼料のタンパク質含量やエネルギー量が低下すること，アミノ酸組成の悪化，不消化成分や残存する抗栄養因子の増加等が考えられる（青木 2009）。本研究で使用した低魚粉 EP 飼料は，魚粉含量を 25%まで削減し，魚粉代替原料として SBM および CGM を計 45%配合した。各原料の粗タンパク質含量は，SBM が 45%程度，CGM は 65%程度と他の植物性原料と比べて高く（秋元 2009），これらを使用することで，低魚粉 EP 飼料の粗タンパク質含量を魚粉含量 40%の市販 EP 飼料よりも高めることができた。また SBM と CGM の両方を配合することで，それぞれの第一制限アミノ酸であるリジンとメチオニンを相互に補うとともに，アミノ酸混合物を添加することにより，飼料のアミノ酸組成が改善されたと推察される。これまでの研究においても，低魚粉飼料では同じ魚粉含量でも代替タンパク質を単独で使用する場合と比べて，数種の原料を配合することにより飼料のタンパク質含量やアミノ酸組成を改善でき，飼育成績が向上することが報告されている（Viyakarn et al. 1992, 高木ら 2000b, 2000c）。これらのことから，本研究の低魚粉 EP 飼料に配合した魚粉代替原料の種類と配合割合は，飼料の栄養価を市販 EP 飼料と同等以上に高めるのに適していたと評価された。

マダイに対して SBM を主原料とした低魚粉飼料を長期間給餌すると，成長の阻害や肝臓が緑色を呈する緑肝症を発症すること（Takagi et al. 2006），また肝臓の組織変性が生じること（天野ら 2012）が報告されている。マダイの緑肝症が発症する機構として，Takagi et al. (2011) は，タウリン欠乏に伴い赤血球浸透圧耐性が低下してもたらされる溶血増加により

発症するとし、これらの生理的な異常はタウリンの補足添加で改善されることを報告している。本研究では、マダイ稚魚のタウリン要求量を踏まえて、低魚粉 EP 飼料中に 0.5% のタウリンを添加した (Matsunari et al. 2008)。その結果、低魚粉区のマダイに緑肝症はみられなかった。また、緑肝症の発症と関係する胆汁色素のビリバージンの還元生成物であるビリルビン含量を測定したところ、低魚粉区で異常は認められなかった。これらのことから、0.5% 程度のタウリンを添加した魚粉含量 25% の低魚粉 EP 飼料は、マダイ 1 才魚に対してタウリンの不足による悪影響を及ぼさないことが推察された。

血液ヘマトクリット値および血漿化学成分の分析を行った結果、ほとんど全ての項目で市販飼料区と低魚粉区の間に有意な差はなかったものの、脂質代謝系を示す TCHO 値は低魚粉区の方が低い値を示した。血中の TCHO 量は、摂取した飼料由来または肝臓で生合成される胆汁酸と複合体を形成して排泄された後に腸管から吸収される外因性コレステロールと、主に肝臓においてアセチル CoA を材料に生合成される内因性コレステロールに大別される。内因性コレステロールの合成量は外因性コレステロール量の変動により調節されており、血中での外因性、内因性を合わせたコレステロール量は通常一定量に維持されることから、その測定値は肝機能の指標になりえる。これまで Aoki et al. (1997, 2000) が実施した研究では、低魚粉・無魚粉飼料を給餌したマダイの血漿 TCHO 量は、本研究と同様に魚粉主体の飼料区と比べて低くなる傾向であることが報告されている。同様の傾向はブリでも確認されており、Maita et al. (2006) は無魚粉飼料を給餌したブリでは低 TCHO 血症が起こるとともに、タウリン不足による貧血が誘因となり抗病性が低下することを報告している。現在のところマダイにおける TCHO と抗病性との関係を示す明確な知見はない。しかしながら、ブリとマダイは、無魚粉飼料の給餌によって緑肝症を発症するとともに

血漿 TCHO 量が低下するといった類似した生理的反応を示している。また田中・井上 (2005) によると、高密度でマダイを飼育すると血漿 TCHO 量と抗病性はともに低下することから、TCHO と抗病性には関係性が認められる。これらのことから、TCHO はブリと同様にマダイでも抗病性に関係していると考えられる。本研究では、低魚粉区のマダイにおいて血漿 TCHO 量の低下が認められたものの、死亡率は低く、市販飼料区との間に有意差はなかった。したがって、低魚粉区のマダイは相対的には市販飼料区と比べて肝機能の低下の可能性がうかがわれたものの、健康状態に支障をきたし、抗病性が低下したような異常な状態ではないと評価された。以上のことから、本研究の条件では低魚粉 EP 飼料の給餌によるマダイの生理状態への悪影響は認められず、実用的な問題はないと考えられた。低魚粉飼料で飼育することによって引き起こされるマダイの血漿 TCHO 量の低下の機構については、今後の検討課題としたい。一方で、マダイの抗病性は、飼料の魚粉含量が少ないほど低下するという報告 (山下 2013) もあり、両者の関係についてはさらに検討することが望まれる。

以上の結果をまとめると、低魚粉区の死亡率は市販飼料区と同程度で、成長および増肉係数は低魚粉区の方がやや優れていた。サンプリングした試験魚の肥満度、比肝重値、血漿化学成分等から判断した健康状態は、両区とも良好であると評価された。このことから、本研究で用いた低魚粉 EP 飼料はマダイ 1 才魚に対する飼料として市販 EP 飼料と同等以上の性能を有し、実用飼料として現場で使用できると評価された。

要 約

マダイ 1 才魚に対して、大豆油粕とコーングルテンミールを配合して魚粉含量を 25% とし、市販 EP 飼料よりも粗タンパク質含量を高めた

低魚粉 EP 飼料の利用性を調査した。対照飼料には、魚粉含量が 40% のマダイ用市販 EP 飼料を用いた。飼育試験は、長崎県五島市の養殖業者が所有する大型生簀（10 m×10 m×10 m）にて実施された。平均体重 543 g のマダイ 1 才魚を試験魚とし、市販飼料区と低魚粉区を設定して約 7 ヶ月間飼育した。その結果、低魚粉区の死亡率は市販飼料区と同程度で、終了時の平均体重、増重率および増肉係数は、低魚粉区の方が優れていた。また試験魚の肥満度、比肝重値、血漿化学成分からみた健康状態は両区とも良好であった。以上のことから、本研究で用いた低魚粉 EP 飼料は、マダイ 1 才魚に対して市販 EP 飼料に比べて同等以上の性能を有すると評価された。

謝 辞

本研究の遂行にあたり有益なご助言を賜った水産研究・教育機構中央水産研究所の石田典子主任研究員、三重県水産研究所尾鷲水産研究室の青木秀夫室長、愛媛県農林水産研究所水産研究センターの山下主任研究員、農林水産・食品産業技術振興協会の秋山敏男氏、日清丸紅飼料株式会社水産研究所の輿石友彦所長、東北大学大学院の片山知史教授に深く感謝申し上げます。本研究において、養殖現場でマダイの飼育管理および魚体測定作業等にご協力いただいた五島漁業協同組合の職員の皆様、恵理丸水産の皆様、日清丸紅飼料株式会社九州営業部の米田直弘氏に厚く御礼申し上げます。また本論文をまとめるにあたり有益なご助言を賜った東京海洋大学大学院の舞田正志教授に深く感謝申し上げます。本研究は、農林水産省の「農林水産業の革新的技術緊急展開事業」（うち産学の英知を結集した革新的な技術体系の確立）による研究資金の支援を受けて実施した。

文 献

- Aoki, H., T. Watanabe, M. Furuichi and H. Tsuda (1997) Use of alternative protein sources as substitutes for fish meal in red sea bream diets. *Suisanzoshoku*, 45, 131-139.
- Aoki, H., M. Furuichi, V. Viyakarn, Y. Yamagata and T. Watanabe (1998) Feed protein ingredients for red sea bream. *Suisanzoshoku*, 46, 121-127.
- Aoki, H., M. Furuichi, K. Watanabe, S. Satoh, Y. Yamagata and T. Watanabe (2000) Use of low or non-fish meal diets for red sea bream. *Suisanzoshoku*, 48, 65-72.
- 青木秀夫 (2009) 新しい養魚飼料. 魚類の栄養と飼料 (渡邊 武編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 358-389.
- 秋元淳志 (2009) 飼料原料. 魚類の栄養と飼料 (渡邊 武編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 284-326.
- 天野俊二・鈴木伸洋・松成宏之・岩下恭朗・山本剛史 (2012) マダイにおける大豆油粕主体無魚粉飼料へのタウリン添加効果の組織学的検討. *水産増殖*, 60, 459-467.
- Maita, M., J. Maekawa, K. Satoh, K. Futami and S. Satoh (2006) Disease resistance and hypocholesterolemia in yellowtail *Seriola quinqueradiata* fed a non-fishmeal diet. *Fish Sci.*, 72, 513-519.
- Matsunari, H., T. Yamamoto, S. Kim, T. Goto and T. Takeuchi (2008) Optimum dietary taurine level in casein-based diet for juvenile red sea bream *Pagrus major*. *Fish Sci.*, 74, 347-353.
- 高木修作・細田秀毅・示野貞夫・宇川正治 (2000a) マダイ飼料におけるチキンミールの利用. *日水誌*, 66, 428-438.
- 高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治 (2000b) マダイ稚魚飼料における代替タンパク質源併用による魚粉の削減. *水産増殖*, 48, 523-530.
- 高木修作・示野貞夫・細川秀毅・宇川正治 (2000c) マダイ 1 歳魚飼料における代替タンパク質源併用による魚粉の削減. *水産増殖*, 48, 545-552.
- Takagi, S., H. Murata, T. Goto, T. Ichiki, M. Endo,

H. Hatate, T. Yoshida, T. Sasaki, H. Yamashita and M. Ukawa (2006) Efficacy of taurine supplementation for preventing green liver syndrome and improving growth performance in yearling red sea bream *Pagrus major* fed low-fishmeal diet. *Fish. Sci.*, 72, 1191-1199.

Takagi, S., H. Murata, T. Goto, H. Hatate, M. Endo, H. Yamashita, H. Miyatake and M. Ukawa (2011) Role of taurine deficiency in inducing green liver symptom and effect of dietary taurine supplementation in improving growth in juvenile red sea bream *Pagrus major* fed non-fishmeal diets based on soy protein concentrate. *Fish. Sci.*, 77, 235-244.

田中真二・井上美佐 (2005) マダイのマダイイリドウイルス病に対する低密度飼育の有効性. 魚病研究, 40, 181-186.

Viyakarn, V., T. Watanabe, H. Aoki, H. Tsuda, H. Sakamoto, N. Okamoto, N. Iso, S. Satoh and T. Takeuchi (1992) Use of soybean meal as a substitute for fish meal in a newly developed soft-dry pellet for yellowtail. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58, 1991-2000.

山下浩史 (2013) マダイの抗病性. 日水誌, 79, 456.

Table 1. Ingredients and proximate composition of the experimental diets

	Commercial diet	Low fish meal diet	
<i>Ingredients (g/ 100 g wet matter)</i>			
Fish meal	40.0	25.0	
Soybean meal		20.0	
Corn gluten meal		25.0	
Wheat flour		5.0	
Starch	Commercial diet for red sea bream	}	
Vitamine mixture ¹			9.3
Mineral mixture ²			
Fish oil		8.0	
Palm oil		4.0	
Calcium phosphate		1.5	
Amino acid mixture ³		1.0	
Taurine		0.5	
Skipjack peptide		0.5	
Enzyme complex ⁴		0.2	
Astaxanthin		40 ppm	
<i>Proximate composition</i>			
Protein (% Dry matter)	41.9	46.2	
Lipid (% Dry matter)	16.5	16.1	
Moisture (%)	7.6	7.6	
Ash (%/ g Dry matter)	10.8	8.1	

1 Marubeni Nisshin Feed Co., Ltd.

2 Marubeni Nisshin Feed Co., Ltd.

3 Lys 1.0%, Met 0.5%, Thr 0.5%, Trp 0.2%

4 Alltech (SSF)

Table 2. Daily feed intake and growth performance of red sea bream in the experiment

	Commercial diet	Low fish meal diet
Initial weight (g)*	567 ^a	519 ^b
Final weight (g)*	1251 ^b	1326 ^a
Feed conversion ratio ¹	2.38	2.02
Growth rate (%/day) ²	120.1	155.1
Daily feed intake (%/day) ³	0.87	0.85
Protein efficiency ratio ⁴	1.00	1.18
Mortality (%) ⁵	0.3	0.2

*Values (means of 50 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

¹ Feed intake (dry matter)/weight gain.

² $100 \times (\text{weight gain}/\text{initial body weight})$.

³ $\text{Feed intake (dry matter)} \times 100 / [(\text{initial fish weight} + \text{final fish weight} + \text{dead fish weight}) \times \text{feeding days} \times 2]$.

⁴ $\text{Weight gain}/\text{protein intake (dry matter)}$.

⁵ $100 \times \text{dead fish number}/\text{initial fish number}$

Table 3. Condition factor and relative weights of internal organs to body weights (%) in red sea bream fed the commercial and low fish meal diets in the experiment.

	Commercial diet	Low fish meal diet
Condition factor	24.5 \pm 1.5 ^a	24.4 \pm 1.6 ^a
Viscerosomatic index*	10.6 \pm 1.6 ^a	9.3 \pm 0.8 ^b
Hepatosomatic index	1.08 \pm 0.28 ^a	1.12 \pm 0.19 ^a

*Values (means \pm S.D. of 10 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4. Hematocrit value and content of plasma components of red sea bream in the experiment

	Commercial diet	Low fish meal diet
Hematocrit value (%)	39.5 ± 4.7 ^a	37.2 ± 4.5 ^a
Plasma components		
Total cholesterol (mg/dl)	157 ± 29 ^a	128 ± 23 ^b
Total protein (g/dl)	3.7 ± 0.4 ^a	3.7 ± 0.4 ^a
Triglyceride (mg/dl)	116 ± 28 ^a	131 ± 40 ^a
Glucose (mg/dl)	47 ± 8.7 ^a	47 ± 7.2 ^a
GOT (AST) (U/l)	32 ± 26 ^a	32 ± 17 ^a
GPT (ALT) (U/l)	1 ± 0 ^a	1 ± 0 ^a
Total bilirubin (mg/dl)	0.1 ± 0.0 ^a	0.1 ± 0.1 ^a
Urea nitrogen (mg/dl)	3.5 ± 0.5 ^a	3.1 ± 0.4 ^a

*Values (means±S.D. of 10 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

Table 5. Results of proximate composition analysis of dorsal muscle (%) from red sea bream fed the control and low-fish meal diets in the experiment.

Diet	Commercial diet	Low fish meal diet
Moisture	73.0 ± 0.2 ^a	72.6 ± 0.8 ^a
Crude protein	21.9 ± 0.2 ^a	22.0 ± 0.4 ^a
Crude lipid	4.6 ± 0.2 ^a	4.9 ± 1.1 ^a

*Values (means±S.D. of 5 fish) in a column not sharing the same superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

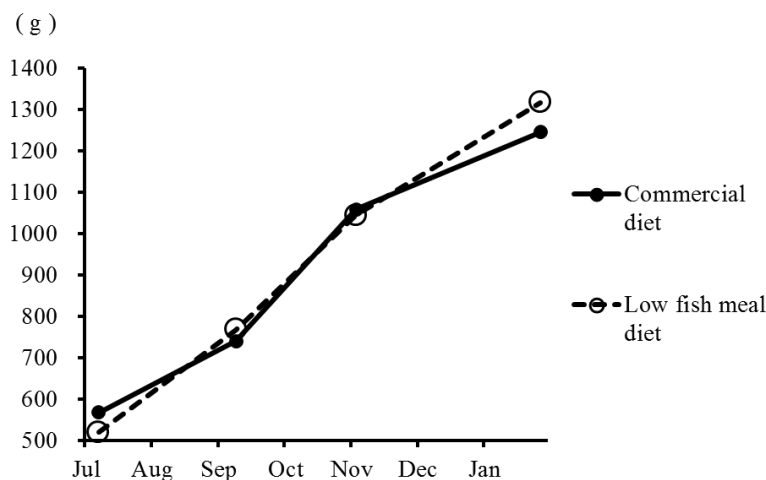


Fig. 1 Growth curves of red sea bream fed the control and low fish meal diets in the experiment.

総 括

世界的な需給バランスの逼迫を背景に、配合飼料の主原料である魚粉の価格は上昇傾向であり、近年では配合飼料価格の値上げがなされている。このような背景から、マダイを対象として魚粉削減飼料の有効性に関する先行研究がなされており、その結果、濃縮大豆タンパク質、大豆油粕、コーングルテンミール、チキンミール、ミートミール等が代替原料として有効と考えられている。さらにマダイ 1 才魚では、それらを配合してリジン、メチオニン等の必須アミノ酸組成を調整することにより、飼料中に含まれる魚粉の 90~100%を代替できる可能性が示唆されている。しかし、国内のマダイ養殖の現場では未だに魚粉が 40~50%量配合された飼料が主に流通し、給餌されているのが現状である。その原因として、魚粉削減飼料を産業規模で長期間給餌した場合の摂餌性や成長および抗病性について、養殖業者等の関係者が不安を抱いていることが挙げられる。

以上の状況をふまえて、本研究では、実用的な魚粉削減飼料の開発および導入促進に必要な知見を得るために、まず第 1 章として、リジン、メチオニン等の必須アミノ酸およびタウリンを配合した低・無魚粉 EP 飼料の有効性を 0 才魚および 1 才魚で検討した。次に第 2 章として、無魚粉飼料の摂餌および成長の向上を期待して、酵素混合物の添加効果を検討した。第 3 章では、低・無魚粉 EP 飼料で飼育したマダイについて、主要な疾病であるエドワジエラ症に対する抗病性の検討を行った。最後に、第 4 章として、第 1~3 章で得られた知見をもとに、従来よりも実用的だと考えられる低魚粉 EP 飼料を試作し、養殖場での実証試験による実用性の検討を行った。

マダイ 0 才魚における低・無魚粉 EP 飼料の有効性

第 1 章の第 1 節では、マダイ 0 才魚における

低・無魚粉飼料の有効性を 12 週間の飼育試験により検討した。その結果、大豆油粕、コーングルテンミールおよび濃縮大豆タンパクを配合し、タウリンおよび数種類の必須アミノ酸を補足した魚粉 20%EP 飼料は、魚粉 50%区と比べて日間給餌率、日間増重率および増肉係数等の飼育成績が遜色ない結果を示し、マダイ 0 才魚を養殖する上で有効であることが示唆された。一方、魚粉 0%EP 飼料は、増肉係数が魚粉 50%区に比べて遜色ない値を示したものの、日間給餌率および日間増重率が劣る傾向を示し、摂餌性の改善が必要であると考えられた。

マダイ 1 才魚における低・無魚粉 EP 飼料の有効性

第 1 章の第 2 節では、マダイ 1 才魚における低・無魚粉飼料の有効性を 16 週間の飼育試験により検討した。その結果、大豆油粕、コーングルテンミールおよび動物性原料（チキンミール、フェザーミール）を配合し、タウリンおよび数種類の必須アミノ酸を補足した魚粉 25%EP 飼料は、魚粉 50%区と比べて日間給餌率、日間増重率および増肉係数等の飼育成績が優れる結果を示し、マダイ 1 才魚を養殖する上で非常に有効であることが示唆された。一方、魚粉 0%EP 飼料は、増肉係数が魚粉 50%区に比べて遜色ない値を示したものの、日間給餌率および日間増重率が劣る傾向を示し、0 才魚同様、摂餌性の改善が必要であると考えられた。

無魚粉 EP 飼料への酵素混合物の添加効果

第 1 章で無魚粉飼料には主に摂餌性の面で課題があることが判明したことから、第 2 章では、無魚粉飼料に対するマダイの摂餌性の改善を図った。無魚粉飼料の摂餌性が劣る原因として、植物性原料中に含まれる抗栄養因子や難消化性物質の存在が考えられたことから、それらの物質の一部を分解することが期待される酵素混合物の添加効果を検討した。第 1 節では、マダイ 0 才魚における無魚粉 EP 飼料に対する酵

素混合物の添加効果について、12週間の飼育試験により検討し、その結果、明確な効果は確認されなかった。

第2節では、マダイ1才魚における無魚粉粉末飼料に対する酵素混合物の添加効果について、12週間の飼育試験により検討した。その結果、酵素混合物の添加により増肉係数が改善する等の効果が認められたものの、魚粉主体飼料の飼育成績には及ばなかった。

第3節では、マダイ1才魚における無魚粉EP飼料に対する酵素混合物の添加効果について、16週間の飼育試験、給餌後における胃内容物量および血漿成分の変化の調査により検討した。その結果、無魚粉EP飼料への酵素混合物の添加により、マダイ1才魚の体内における消化速度が速くなり、摂餌性および成長が改善する効果が認められた。また、酵素混合物を添加した無魚粉EP飼料は、魚粉主体飼料と遜色ないマダイ1才魚の飼育成績につながることを示唆された。

低・無魚粉EP飼料を給餌したマダイのエドワジエラ症に対する抵抗性の検討

魚類養殖の現場では、低・無魚粉飼料が魚の抗病性に負の影響を及ぼす可能性を懸念する声が強根強い。第3章では、マダイ養殖で主の問題となるエドワジエラ症への抵抗性が低・無魚粉飼料を長期給餌したマダイで低下する可能性について、1才魚に対する2回の細菌攻撃試験により検討した。その結果、細菌攻撃後における死亡率、脾臓の保菌率および生菌数は、全ての試験区で同等の値を示し、低・無魚粉飼料の長期給餌によるマダイ1才魚の抗病性の明確な低下は確認されなかった。

マダイ1才魚に対する低魚粉EP飼料の実用性

第1章～第3章の結果をふまえて、大豆油粕およびコーングルテンミールを配合し、タウリン、数種の必須アミノ酸および酵素混合物を補足し、粗タンパク質量を高めた魚粉25%EP飼

料を試作し、マダイ1才魚に対する有効性を7ヶ月間の実証試験により検討した。実証試験は、長崎県五島市に所在するマダイ養殖場で行った。その結果、魚粉含量40%の市販EP飼料と比較して成長および増肉係数が優れる傾向を示し、魚病の発生は認められなかった。このことから、本研究で用いた低魚粉EP飼料は、マダイ養殖における増肉コストを削減する上で有効であることが実証された。

本研究で得られた知見をもとに、2016年は更に魚粉量を削減した魚粉25%EP飼料を試作し、マダイ1才魚に対する実証試験を愛媛県と長崎県の2ヶ所で実施している。今後は、本研究で得られた知見等を養殖関係者への情報提供を積極的に行ない、飼育コストの削減につながる魚粉削減飼料およびその効果的な給餌方法等の普及に努めたい。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜った東京海洋大学水族栄養学研究室の佐藤秀一教授に深甚なる謝意を表します。また、ご多忙のところ、本稿について御校閲していただきました水族薬理学研究室の舞田正志教授、ゲノム科学研究室の廣野育生教授、水族栄養学研究室の芳賀穰准教授に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり有益なご助言を賜った水産研究・教育機構中央水産研究所の石田典子主任研究員、三重県水産研究所尾鷲水産研究室の青木秀夫室長、愛媛県農林水産研究所水産研究センターの山下主任研究員、農林水産・食品産業技術振興協会の秋山敏男氏、日清丸紅飼料株式会社水産研究所の興石友彦所長、中部飼料株式会社の中尾貴尋氏、オルテック・ジャパン合同会社の北島レナト栄治氏、東北大学大学院の片山知史教授、五島漁業協同組合の皆様へ深く感謝申し上げます。

飼育実験用供試魚の入手に御協力頂いた長崎

県漁業公社の皆様，有馬屋水産株式会社の皆様，
供試魚の飼育管理および魚体測定作業に御協
力いただきました多くの関係者の皆様に深く
感謝申し上げます。

本研究を進めるにあたり，多くのご支援を頂

きました長崎県総合水産試験場の柳村智彦場
長，長嶋寛治次長，一丸俊雄部長，平野慶二所
長，宮木廉夫科長，宮原治郎氏，杉原志貴氏，
元長崎県総合水産試験場長の藤井明彦氏に厚
く御礼申し上げます。