広島工業大学紀要研究編
第59巻（2025）39-43
論　　文

魚類未利用残渣に含まれる魚類成長促進因子の解析

村瀬　優忠*・中野　慎太郎**・田邉　匠太朗***・三浦　智恵美****

（令和6年10月31日受付）

Analysis of growth factors contained in unused fish residues.

Masanori MURASE. Shintaro NAKANO. Shotaro TANABE. Chiemi MIURA

（Received October 31, 2024）

Abstract

In order to search for new growth-related factors in fish, we focused on unused fish residues. When fish soluble, one of the unused fish residues, was fed to medaka, the growth of the medaka was promoted. After that, fish soluble (FS) was purified and a feeding experiment was conducted, and the growth was also promoted. To identify the growth-promoting substances, metabolome analysis was performed and three candidate substances contained in FS, terephthalic acid, glycerol, and harman, were selected. To analyze the mechanism of action of these candidate substances on growth, the candidate substances were administered to zebrafish at two doses, 1μM and 100μM. As a result, all of the candidate substances promoted growth. Real-time PCR analysis revealed that terephthalic acid, especially 1μM and 100μM, activated the secretion of digestive enzymes secreted from the small intestine, respectively. These results suggested that terephthalic acid is involved in growth promotion.

Key Words: fish residues　cholecystokinin (cck)　terephthalic acid

1　はじめに

近年，ブリやタイやカンパチなどの養殖魚の餌となっている魚粉の価格高騰が大きな問題となっている．給餌養殖の支出は，飼料代が6～7割を占めている．また魚粉は輸入に頼っていることから，円安の影響なども大きく受けており，魚粉平均価格も大きく上昇している[(4)]．そのため，魚粉の代わりになる国産かつ，安価で，持続可能に供給することのできる代替品として魚類の未利用残渣が注目を集めている．先行研究により，魚類未利用残渣であるイカの内臓を添加した飼料を与えることにより，メダカの体重が増加し成長率が向上することが明らかになっている[(1)]．本研究では，同様に魚類未利用残渣であるフィッシュソルブルに着目した．しかし，魚類の未利用残渣には様々な物質が含まれており，具体的にどの物質が成長を促したのかは明らかになっていないため，成長を促している物質がどの物質なのか解析を行い，実際に添加し給餌することで効果の有無を調べた．

脊椎動物の成長には，脳から分泌される成長促進因子である成長ホルモン（growth hormone）が，肝臓から分泌されるインスリン様成長因子（insulin-like growth factor, IGF-1）の分泌を促進させ，血中に分泌された，IGF-1は骨や筋肉の成長を促進させる．また，食欲関連因子である，コレシストキニン（CCK）は，脊椎動物の腸から分泌さ

* 広島工業大学大学院工学系研究科環境学専攻
** 広島工業大学環境学部地球環境学科2023年度卒業
*** 広島工業大学環境学部地球環境学科2020年度卒業
**** 広島工業大学環境学部元教授

れる酵素であり，消化を促進する働きや胃の排出を抑制することで，成長に大きく作用する．

本研究では，メダカ（*Oryzas latipes*），グッピー（*Poecilia reticulate*），ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）の小型魚類を用い候補物質による成長促進因子や食欲関連因子の発現誘導を調べ魚類未利用残渣の有効性を解析した．

2　材料と方法

2.1　フィッシュソルブル

フィッシュソルブルとは魚類から得られる新鮮な液状物を濃縮した家畜飼料で，魚粉製造時の煮汁，練製品・缶詰工場などで廃棄物となる魚の頭やヒレ，内臓を蒸し煮した煮汁などが主原料となる．フィッシュソルブルの組成は，原料の魚種や雄雌の違い，成熟の程度，魚体成分の季節的変動など種々の条件によって異なる．製品は，原料となる魚の鮮度，細菌による分解の程度，加工処理装置の種類などによっても品質が大きく影響される[(5)]．本研究で用いたフィッシュソルブルは，実際に水産業者が餌に添加しているものと同じものを使用した．フィッシュソルブルの濃度は0.1%，1.0%，10% になるように餌に添加した．

2.2　試験魚

本研究の試験魚はメダカ（*Oryzias*），グッピー（*Poecilia reticulata*），ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）を使用して行った．試験期間はメダカ 2 週間，グッピーとゼブラフィッシュは 4 週間行い，1 週間ごとに体長，体重を測定した．実験終了後に，解剖を行い脳，肝臓，小腸を抽出した．

2.3　飼育環境

7 つの水槽（幅31.5cm × 奥行18.5cm × 高さ24.4cm）を用意し，それぞれフィルター付きのエアレーションを入れ水温は25度に固定し飼育した．1 日 1 回，メダカのみ 1 日 2 回給餌を行った．グッピーとメダカは各水槽に10匹，ゼブラフィッシュは各水槽に 5 匹ずつ入れ実験を行った．

2.4　フィッシュソルブルの精製

フィッシュソルブルは精製し，餌に添加させ，成長促進効果を確認した．

精製方法はフィッシュソルブルを 5 ml 採取し，5 倍量の溶媒混合物（メタノール25ml/DDW 1 ml/ クロロホルム 1 ml）を添加，24時間穏やかに混合し，10000 × g 30分遠心した．フィッシュソルブルの上清を25ml 採取し，等量の DDW25ml に加え計50ml の溶液を作製し，よく混合し，遠心分離機で10000 × g 30分遠心した．その後上清を採取し50℃のウォーターバスで蒸発させ，残留物を DDW に溶解した．溶解したフィッシュソルブルは，10倍に希釈しさらに，Sep-PakC18カートリッジ（Water Associate）により 0 %，50%，100% のメタノールで溶出して精製した．

この精製したフィッシュソルブルで給餌実験を行った．給餌実験に関しては 2 週間で行った．また，逆相クロマトグラフィー（HPLC）による分析を行った．

2.5　メタボローム解析

魚類未利用残渣であるフィッシュソルブルとイカの内臓にどのような物質が含まれているかを調べるためにメタボローム解析を行った．メタボローム解析では物質の濃度や種類などを網羅的に分析することができる．この分析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社に分析を委託した．

2.6　飼料添加物の選定と作成

本研究ではコントロールの餌を作成し（表 1），それに選定した物質であるハルマン，テレフタル酸，グリセリンの 1 μM, 100 μM を添加した．グリセリンは蒸留水（DW）を用い，ハルマンは N,N- ジメチルホルムアミド（DMF），テレフタル酸はジメチルスルホキシド（DMSO）を使い溶解した．

コントロールの餌 1 g に対し，濃度別の溶液と DW を 1 ： 1 の割合で加え，餌に馴染ませた．そしてアルミホイルで作成した容器に移し，60℃で 3 時間乾燥後，乳鉢で細かく砕き給餌した．

表 1　コントロール餌の配合表

原料	配合量(g)/1kg
オキアミミール	100
魚粉	600
大豆粕	50
小麦粉	93
増粘剤	60
魚油	50
大豆レシチン	10
ビタミンMIX	8
ミネラルMIX	6
塩化コリン	1
リン酸二水素ナトリウム	6
リン酸二水素カリウム	6
乳酸カルシウム	10
合計	1000
水	360cc

2.7　成長度の測定

成長度 =（計測した時の平均値）−（0 週目の平均値）で表した．メダカは実測値，グッピーは稚魚を用いて行ったため，写真撮影後 imagej による測定を行った．

2.8　cDNA の合成

解析に使用する臓器は，RNA later solution（Thermo

Fisher SCIENTIFIC）に入れ保存後，ISOGEN Ⅱ（株式会社ニッポン・ジーン）を使用し total RNA を抽出した．cDNA の合成は，High Capacity cDNA Reverse Trance cription Kit（Thermo Fisher SCIENTIFIC）を使用して行った．

2. 9　アガロースゲル電気泳動

本研究では，遺伝子発現の確認のため，まずアガロースゲル電気泳動を行った．アガロースゲルの濃度は0.5% を使用し，左から順に，マーカー，アクチン，*gh*, *IGF-1*, *cck* を入れ，泳動後撮影を行った．

2. 10　リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

抽出したゼブラフィッシュの腸の total RNA を使用してリアルタイム PCR（BioRad）により，成長ホルモン（*gh*），インスリン様成長因子（*IGF-1*），コレシストキニン（*cck*）の遺伝子発現の測定を行った．

3　結果と考察

3. 1　フィッシュソルブル

フィッシュソルブルを与えた際のメダカの体重の成長度は図１に示した．

最も体重が増加したものはフィッシュソルブル10%であることが分かった．これによりフィッシュソルブルは，魚類の成長を促進していることが明らかになった．

また，粗精製したフィッシュソルブルを給餌した際の体重増加率は図２に示した．この結果から，コントロールに比べ50%メタノールで溶出したフィッシュソルブルが魚類の成長を促進していた．

また，逆相クロマトグラフィー（HPLC）による分析を行ったところ，１個の大ピークと数個の小ピークが得られた（図３）．この結果からフィッシュソルブルには何らかの物質が含まれていることが明らかになった．

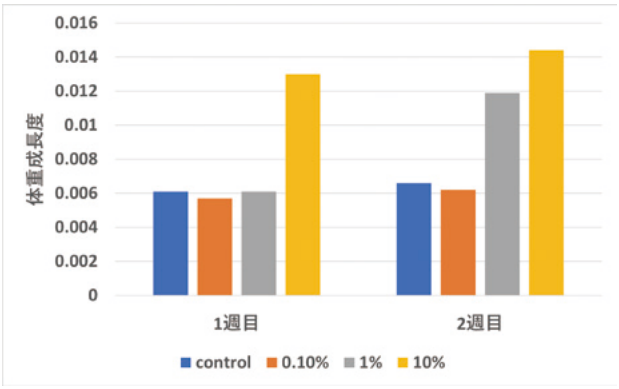


図１　フィッシュソルブル給餌時の体重成長度

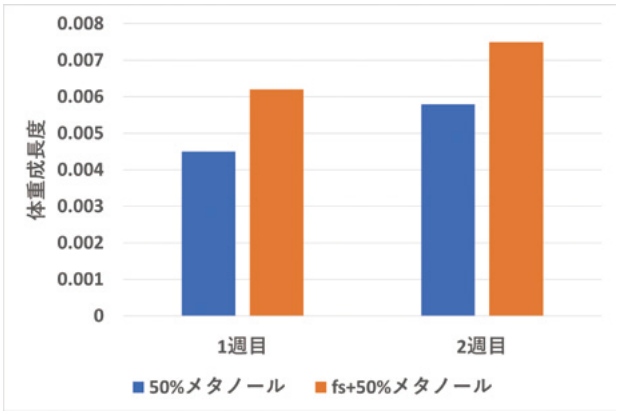


図２　精製フィッシュソルブル給餌時の体重成長度

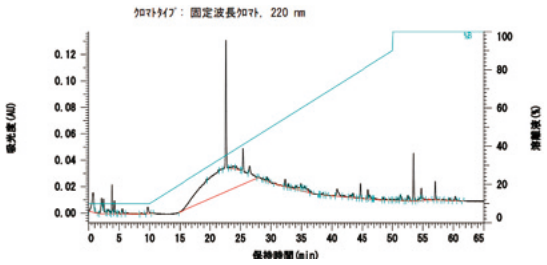


図３　逆相クロマトグラフィー結果

3. 2　メタボローム解析

フィッシュソルブルに成長を促進する物質が存在する可能性が示唆されたため，メタボローム解析を行った．メタボローム解析の結果は，図４に示した．メタボローム解析は，その他の未利用残渣として，イカの内臓とマダイ残渣からの抽出物も行った．図４は左から，青はフィッシュソルブル，緑はイカの内臓，赤はタイの煮汁を表している．メタボローム解析の結果からジエタノールアミン，ヘキサミン，グリセリン，ハルマン，テレフタル酸などが候補に挙げられた．その中からイカの内臓とフィッシュソルブルに多く含まれていたテレフタル酸，３種すべてに含まれていたグリセリン，イカの内臓に多く含まれていたハルマンの３種を選定し，コントロール飼料に添加し給餌した．

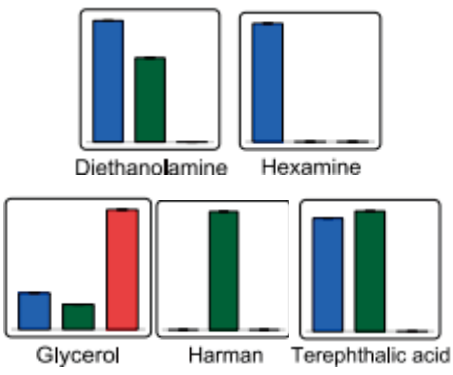


図４　メタボローム解析結果（１部抜粋）

3. 3　候補物質での成長度

上記の物質を添加した餌をグッピーに給餌し，１週ごとの成長度を求めた結果を図５と６に示した．

コントロールに比べいずれの候補物質も体重，体長増加が促進した．その中で飼育４週目には，テレフタル酸100μM が最も体長が伸長し，次にテレフタル酸１μM であった．また，体重はテレフタル酸１μM が最も増加した．この結果から最も成長を促したのはテレフタル酸となった．

コントロールに比べいずれの候補物質も成長を促したことから，候補物質は成長促進物質である可能性が高いと考えられた．

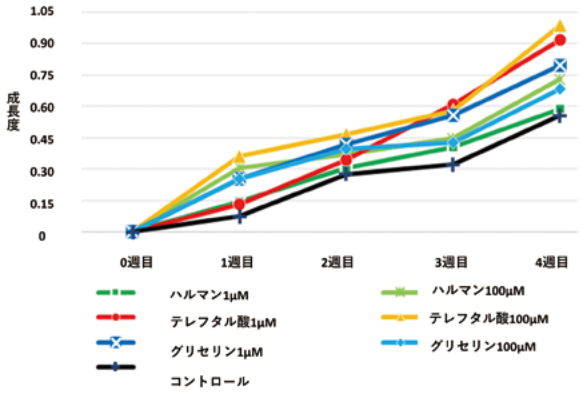


図５　グッピー体長成長度

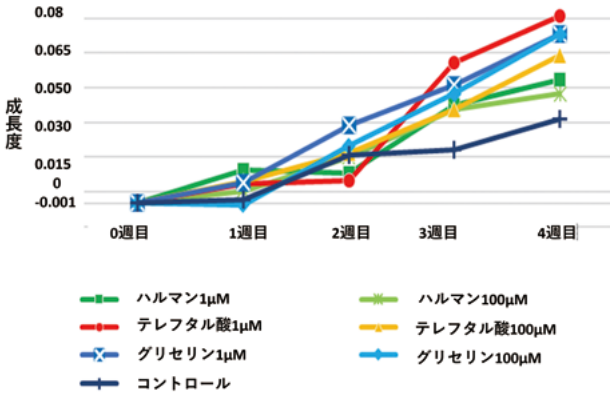
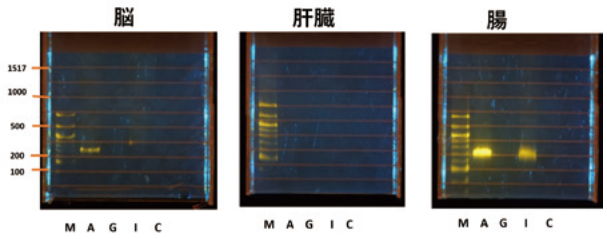


図６　グッピー体重成長度

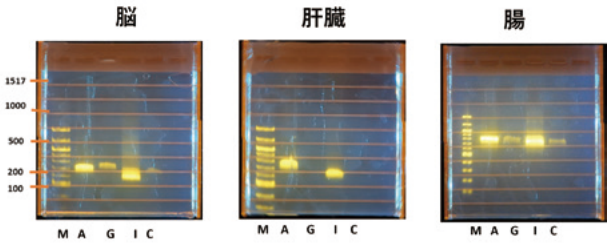
3. 4　アガロースゲル電気泳動

給餌実験を行ったグッピーを解剖し，脳，肝臓，小腸を使用して，成長促進因子 *gh*, *IGF-1*食欲消化促進因子 *cck* の発現の確認するためにアガロースゲル電気泳動を行った．*gh* は脳，*IFG-1*は肝臓，*cck* は小腸から発現の確認を行った．ハルマンやコントロール（図７）では，*gh* 及び *cck* の発現が確認できなかった．テレフタル酸１μM では，脳で *gh* と *IGF-1*，肝臓で *IGF-1*，腸で *gh*, *IGF-1*, *cck* が発現していた．



（M: マーカー，A: アクチン，G:*gh*，I:*IGF-1*，C:*cck*）

図７　コントロール電気泳動



（M: マーカー，A: アクチン，G:*gh*，I:*IGF-1*，C:*cck*）

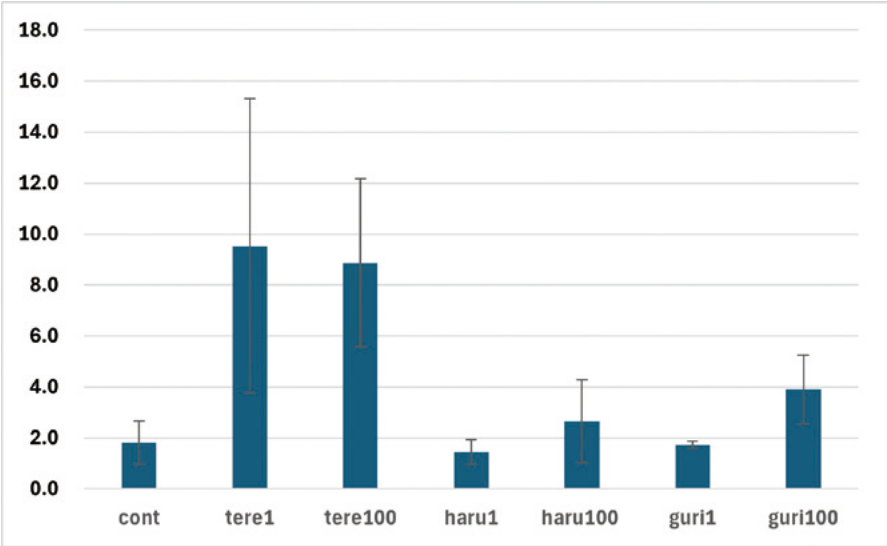
図８　テレフタル酸１μM 電気泳動結果

3. 5　リアルタイム PCR による遺伝子発現の定量

アガロース電気泳動でテレフタル酸により，コントロールに比べ多くの遺伝子が発現していたことから，給餌実験を行ったゼブラフィッシュを用いて，遺伝子の発現量を定量した．*cck* のリアルタイム PCR では，テレフタル酸の１μM と100μM，グリセリン100μM がコントロールに比べ *cck* が多く発現されることが明らかになった．特にテレフタル酸の１μM, 100μM はコントロールに比べ約４倍の *cck* の発現が確認されたことから，テレフタル酸は魚類の成長を促していることが示唆された（図９）．また，同様に *gh*, *IGF-1*の定量化も試みたが，脳と肝臓が採取できていなかったために測定ができなかった．

4　まとめ

本研究では，魚類未利用残渣であるフィッシュソルブルが成長に対して効果があることが明らかになった．また，フィッシュソルブルやイカの内臓に対してメタボローム解析を行い，その中から，ハルマン，グリセリン，テレフタル酸の３種類を選定した，グリセリンは医薬品，化粧品，食料品などに用いられている[6]．テレフタル酸は，飲料容器のペットボトルやフィルム・磁気テープの基材，衣料品の繊維に用いられている[7]．ハルマンは主にコーヒー，ソース，焼かれた肉などに含まれている物質である．コントロール餌に選定した物質を添加し，給餌実験を行った．この結果からテレフタル酸の添加飼料が最も成長し，最も成長しなかったものがコントロールであった．添加物質がコントロールの餌に比べ成長率が向上したことから，餌に



（cont: コントロール，tere: テレフタル酸，haru; ハルマン，guri: グリセリン）

図 9　PCR によるコレシストキニンの発現

候補物質を添加する意義があったことが示された.

リアルタイム PCR の結果からもコントロールに比べテレフタル酸 1 μM と100μM から多くのコレシストキニン（*cck*）の発現が確認された．テレフタル酸を飼料に添加することにより，消化を促進させ，魚類の成長を促進させる働きがあることが示唆された．この結果により魚類未利用残渣に含まれている物質の中で特にテレフタル酸が魚類の成長に対して大きな効果があることが示唆された.

以上より，魚類未利用残渣を利用し餌に添加することにより，効率よく魚類の成長を促進する出来る可能性が示された.

謝辞

本研究の実施にあたり愛媛大学の三浦猛教授からゼブラフィッシュを提供していただき，リアルタイム PCR 解析を大津有稀氏にご協力いただきましたことをここに記して謝意を表します.

本研究は JSPS 科研費 JP20K06233の助成を受けたものです.

文献

1）梶本恭平：イカの内臓に含まれる魚類成長促進因子の作用機構広島工業大学地球環境学科　平成30年度　卒業論文

2）中野慎太郎：魚類の未利用残渣に含まれる成長因子広島工業大学地球環境学科　令和 4 年度　卒業論文（2023）

3）田辺　匠太朗：魚の未利用残渣に含まれる魚類成長促進因子の作用機構
広島工業大学地球環境学科　令和 2 年度卒業論文（2021）

4）魚粉価格の推移 - 世界経済のネタ帳（https://ecodb.net/commodity/fish_meal.html）

5）崎元道男 亀岡俊則 森達摩 日高悦久 鳥島明 : 食品副産物を用いた養魚用飼料の品質と飼料価値水産増殖39巻 3 号235－240（1991）

6）水島義和 : グリセリンの最新研究開発動向と世界展望オレオサイエンス第 8 巻第 8 号337-343（2008）

7）伊藤輝雄 : テレフタル酸ケミカルス覚え書き364-365（1976）