

## 黒酵母由来β-グルカンの経口投与が魚類の生理活性に及ぼす影響

角田 出\*・高瀬 清美\*

### Estimation of Physiological Ability of Fish administered β-1,3-1,6-Glucan from Black Yeast *Aureobasidium pullulans*

Izuru KAKUTA\* and Kiyomi TAKASE\*

\*Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki 986-8580, Japan

Key words : Goldfish, Rainbow trout, Stone moroko, Black yeast-derived-β-glucan, Physiological ability

#### Abstract

β-glucans represent part of a group of chemically heterogeneous polysaccharides. And they are well-known as physiologically active compounds (natural immunomodulators). In this experiment, changes in physiological ability of goldfish *Carassius auratus auratus* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* orally treated with β-1,3-1,6-glucan from Black Yeast *Aureobasidium pullulans* were examined. Oral administration of β-1,3-1,6-glucan at 4.0 and 10 mg/kg body weight/day for 3 and 5 weeks enhanced the non-specific biodefense ability of these fish. The effect of this glucan administered orally at 10 and 40 mg/kg body weight/day for 3 weeks on the proteolytic enzyme activity in the anterior part of intestine from Stone moroko *Pseudorasbora parva* was also measured. In the group administered this β-glucan, body growth and the proteolytic enzyme activity in the intestine were not effected. These results suggest that β-1,3-1,6-glucan derived from Black Yeast may enhance defensive effects against various infectious diseases through enhancing the non-specific immune systems. It also found to improve the physiological condition of the fish.

#### 1. 緒言

魚類養殖で特に留意すべきことは、成長不良や感染症の発生である。これらを防ぐためには、魚の摂餌・消化・吸収活性を高く維持することに加えて、生体防御活性（抗病性）やストレス耐性を高めておく必要がある。魚類の生体防御は第一次から第三次までである。第一次生体防御は体表や消化管内での防御である。体表では、皮膚の多重構造に加え、体表粘液による洗い流し、粘液中に存在する溶菌酵素や凝集素、分泌型抗体等による殺菌や不活化が主な働きを担っている。消化管では、粘膜構造に加え、胃酸、各種消化酵素や粘液、分泌型抗体、消化管内の腸内細菌叢等が防御に関わっている。第二次生体防御には、体内に侵入し

た異物や細菌等を素早く攻撃するために、非特異的な細胞性および液性防御因子、すなわち、白血球の細胞障害性や食作用、血漿中の溶菌酵素や補体等が関与している。第三次生体防御は、特定の抗原の刺激によって特異的に反応する抗体が主役となる。ただし、種々の感染源が漂っている養殖環境では、広範囲の抗原に対する（非特異的）防御が重要であるため、第一次および第二次生体防御機構の賦活化が有効と考えられている。また、高ストレス状態が続くと、魚類の生体防御活性、特に、第二次生体防御に含まれる細胞性防御活性が著しく低下することが知られている<sup>1)</sup>。そのため、養殖対象魚のストレス軽減も重要となる。

魚類の第一次および第二次生体防御を高めるた

\*：高瀬清美、角田 出（2018）黒酵母由来β-グルカンの経口投与が魚類の生理活性に及ぼす影響。日本海水学会若手会主催 第5回海水・生活・化学連携シンポジウム発表要旨集（開催地：石巻専修大学）：49。

め、現状では、β-グルカンを含む多糖類、乳タンパク質であるラクトフェリン、EPAやDHAのような不飽和脂肪酸等が用いられている<sup>2-4)</sup>。しかしながら、前述の生体防御賦活化剤にも、分子量や側鎖の違い、構造的な揺らぎ等が効果に影響することに加え、高価である、弱熱性物質である、漏出・拡散に伴う水質汚濁も考慮すべきである等の使用に際した課題も残されている。

グルカンは、D-グルコースがグリコシド結合で繋がったポリマーであり、天然に最も多く存在する多糖である。β-グリコシド結合で繋がった重合体(β型のグルカン)はβ-グルカンと総称される。天然の免疫調節物質としてのグルカン研究の歴史は古く、18世紀の初め頃には感染症の治療効果を有すること、19世紀中頃からはその免疫特性に注目して、様々な病気の治療に用いられてきたこと等が知られている<sup>5)</sup>。その後、紆余曲折を経て、β-グルカンは糖鎖結合状態が異なるとその投与効果に大きな差が生じること、*Ganoderma lucidum* (霊芝; ネンタケ科のキノコ)や*Sparassis crispa* (ハナビラタケ)等に由来するβ-グルカン(β-1,3分岐をもつもの)が強力な免疫賦活作用や制癌作用を持つと言われるようになってきた<sup>6)</sup>。

そこで、今回、効果を検討するβ-グルカンとして、哺乳類に対して、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞等の免疫細胞の活性化、細菌やウイルス感染防止等の作用を有すること<sup>7)</sup>や、経口投与によりピブリオ病原菌を接種したマダイの生残率を高めた<sup>8)</sup>との報告がなされている黒酵母由来のβ-グルカン(アウレオバシジウム *Aureobasidium pullulans* 由来のβ-1,3-1,6-グルカン)を取り上げ、コイ科とサケ科魚類に対する投与効果、すなわち、成長、消化活性および生体防御活性に及ぼす影響を調べた。

## 2. 材料および方法

### 2.1 供試魚および飼育条件

供試魚として、キンギョ *Caraccius auratus* (体重約6.6g)、モツゴ *Pseudorasbora parva* (体重約4.0g)、および、ニジマス *Oncorhynchus mykiss* (体重約185g)を用いた。各魚種とも、市販の飼料を与えて飼育する対照群に加え、市販飼料に黒酵

母由来 *Aureobasidium pullulans* のβ-1,3-1,6-グルカン(ソフィー社製)を2段階の濃度になるように添加した餌を投与しつつ、キンギョは20℃、ニジマスは14℃で、恒温式循環ろ過式タンク内に設置した容量60Lの水槽内において5週間、モツゴは20℃、容量60Lの上面濾過式水槽内において3週間飼育した。β-グルカンの投与量(kg体重/日)は、キンギョとニジマスで4.0と10mg、モツゴでは10と40mg/kg体重/日であった。

### 2.2 成長、健康度、生体防御活性の調査

キンギョとニジマスについては、飼育試験終了後に魚を取り上げ、体重、体長の測定に加え、ヘパリン処理注射器を用いて心臓または尾部血管より採血し、その血液を用いて、健康度や生体防御活性の各種指標を調べた。また、体表における生体防御活性を調べた。すなわち、常法に準じて赤血球数、リンパ球や顆粒球の数、顆粒球の貪食活性、血漿中溶菌活性、体表粘液の分泌量と溶菌活性、血漿のアンモニア濃度(和光純薬社製アンモニア-テストワコー)、アルカリ性フォスファターゼ活性(肝臓や小腸の機能異常で上昇、亜鉛欠乏で低下等; 4-NPP基質法)を測定した<sup>9,10)</sup>。

### 2.3 腸部のタンパク質分解酵素活性への影響調査

雑食性のモツゴについては、同β-グルカンを含んだ餌の摂取が魚の前腸部位におけるタンパク質分解酵素活性に及ぼす影響を調べた。すなわち、3週間の飼育期間が終了した翌日、取り上げの3および6時間前に給餌した個体から取り出した前腸に3mMのTris-HCl緩衝液(pH7.4)を加えて氷冷しながらホモジナイズし、4℃、8,000gで20分間遠心し、上清を粗酵素試料とした。この粗酵素液に牛腸由来エンテロキナーゼ(Sigma社製: 2,000μg/mL)および100mM CaCl<sub>2</sub>を含む10mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)を等量加えて18時間、4℃で反応させることでトリプシノーゲンの活性化を行った後に、カゼイン-フォーリン法<sup>11)</sup>により同試料のタンパク質分解酵素活性を測定した。タンパク質分解酵素活性のpHプロファイル作成および活性実測用には以下の緩衝液(100mM)を用いた: pH7.0~7.9; リン酸緩衝液、

pH 7.9~8.9; トリス-HCl 緩衝液、pH 8.9~9.7; 炭酸系緩衝液。

### 3. 結果

#### 3.1 供試魚の成長、健康度、生体防御活性変化

各魚種とも、飼育期間内において、摂餌量、成長、肥満度、行動に、 $\beta$ -グルカン投与の影響は認められなかった。

Fig. 1 に、モツゴ前腸由来粗酵素液中のタンパク質分解酵素活性における pH 特性を示す。同活性は pH 8.5 および pH 9.4 にピークを示した。

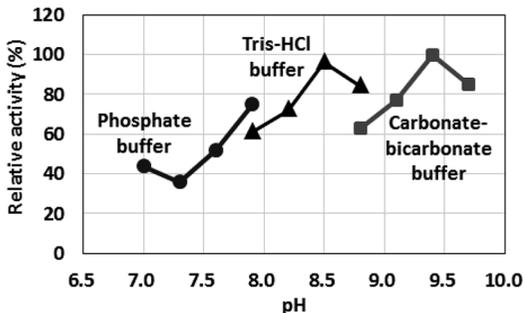


Fig. 1 モツゴ前腸におけるタンパク質分解酵素活性の pH プロファイル

The effect of pH on the proteolytic enzyme activities in the anterior part of intestine from Stone moroko *Pseudorasbora parva*

Fig. 2 に、飼育 3 週間後のモツゴを用いた、摂餌前、摂餌 3 および 6 時間後における前腸部位のタンパク質分解酵素活性 (pH 8.5 と 9.4 で測定)

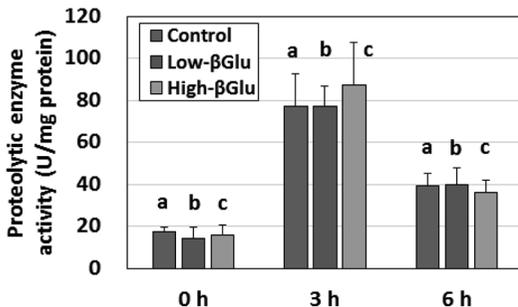


Fig. 2  $\beta$ -グルカンの経口投与ともなうモツゴ前腸部のタンパク質分解酵素活性 (pH 9.4) の経時変化

The time-dependent activity change of proteolytic enzyme in the anterior part of intestine from Stone moroko *Pseudorasbora parva* mean  $\pm$  S.D., n=5.

The same superscript in each group indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ).

を示す。前腸のタンパク質分解酵素活性は、摂餌に伴い著しく上昇し、摂餌 3 時間後には摂餌前の 5 倍程度の値となった後、急速に低下した。ただし、対照群と  $\beta$ -グルカン (他魚種の 4~10 倍量) 投与群の前腸のタンパク質分解酵素活性の間に有意な差は認められなかった。

キンギョを対象とした試験では、健康指標の一つである血液中の赤血球数は全ての群で  $1.00 \sim 1.50 \times 10^6$  個/ $\mu$ L 程度であり、 $\beta$ -グルカン投与の影響はみられなかった。また、血漿のアンモニア濃度およびアルカリ性フォスファターゼ活性も、全群ともに、それぞれ、 $0.98 \sim 1.69 \mu$ g/mL および  $70 \sim 130$  IU/L の値を示し、 $\beta$ -グルカン投与の影響はみられなかった。ニジマスを対象とした場合でも、全群ともに、赤血球数は  $1.12 \sim 1.84 \times 10^6$  個/ $\mu$ L、アンモニア濃度は  $0.68 \sim 1.32 \mu$ g/mL、アルカリ性フォスファターゼ活性は  $65 \sim 143$  IU/L の範囲にあり、各測定項目に  $\beta$ -グルカン投与の影響はみられなかった。

生体防御活性では、キンギョ (Figs. 3-6) とニジマス (Figs. 7-9) に対する  $\beta$ -グルカン投与は、ともに関連指標項目の数値を高めたが、その様相は多少異なった。すなわち、キンギョ (体表粘液の溶菌活性は未測定) では、飼育 3 および 5 週間後の  $\beta$ -グルカン低濃度群において、体表粘液分泌細胞数の増加、血液中の顆粒球数、顆粒球の貪食活性 (3 週間後のみ有意)、血漿中溶菌活性に値の上昇がみられた。一方、 $\beta$ -グルカン高濃度群

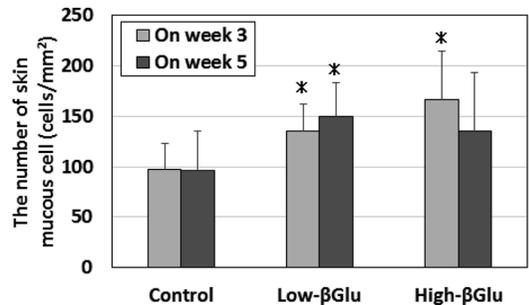


Fig. 3  $\beta$ -グルカンの経口投与がキンギョの体表粘液細胞数に及ぼす影響

The effect of  $\beta$ -glucan administrated orally on the number of skin mucous cells per unit body surface area from goldfish.

mean  $\pm$  S.D., n=5. \* ; Significant difference of the control ( $p < 0.05$ ).

黒酵母由来β-グルカンの経口投与が魚類の生理活性に及ぼす影響

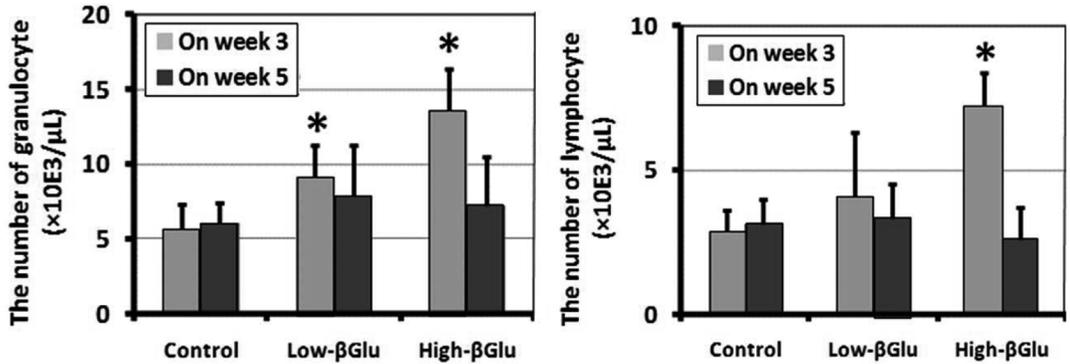


Fig. 4 β-グルカンの経口投与がキンギョ血中の顆粒球数 (左) とリンパ球数 (右) に及ぼす影響  
The effect of β-glucan administrated orally on the number of granulocytes (left) and lymphocytes (right) from goldfish. mean ± S.D., n=5. \* ; Significant difference of the control ( $p < 0.05$ ).

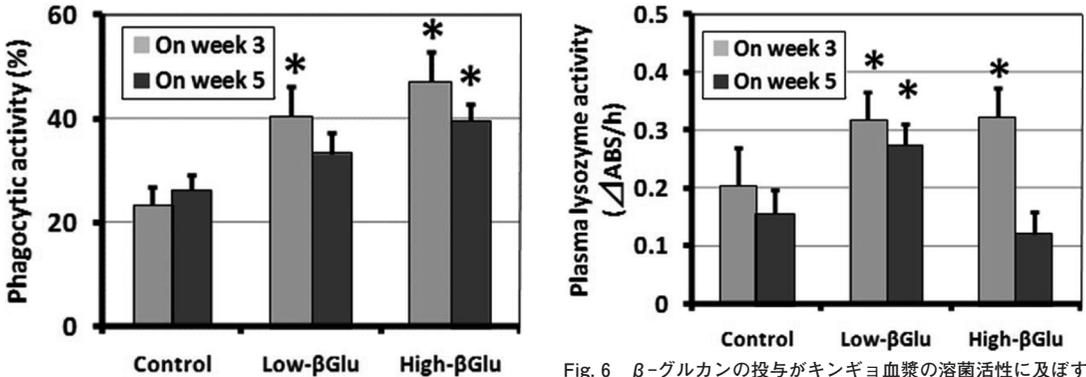


Fig. 5 β-グルカンの投与がキンギョの顆粒球貪食活性に及ぼす影響  
The effect of β-glucan administrated orally on the phagocytic activity of granulocytes from goldfish. mean ± S.D., n=5. \* ; Significant difference of the control ( $p < 0.05$ ).

Fig. 6 β-グルカンの投与がキンギョ血漿の溶菌活性に及ぼす影響  
The effect of β-glucan administrated orally on the plasma lysozyme activity from goldfish. mean ± S.D., n=5. \* ; Significant difference of the control ( $p < 0.05$ ).

においては、3週間後に体表粘液分泌量、血液中のリンパ球と顆粒球の数に、5週間後には顆粒球の貪食活性に有意な値上昇がみられたのみであった。

ニジマス（体表粘液の分泌量と溶菌活性は未測定）では、飼育開始3と5週間後のβ-グルカン低濃度群の血液中リンパ球数、顆粒球の貪食活性、血漿中の溶菌活性に値の有意な上昇がみられた。しかし、β-グルカン高濃度群においては、3週間後に血漿の溶菌活性が有意に上昇したのみであった。

#### 4. 考察

本研究で使用した黒酵母由来のβ-1,3-1,6-グル

カンは、哺乳類のマクロファージ、ナチュラルキラー細胞等の免疫細胞を活性化し、細菌やウイルス感染防止に有効である<sup>7)</sup>ことに加え、魚類であるマダイでも、ビブリオ病原菌の人工感染試験下での生残率が高まる<sup>8)</sup>ことが報告されている。本実験では、キンギョやニジマスに対する投与効果を調べたところ、両魚種ともに、黒酵母由来のβ-1,3-1,6-グルカンの経口投与がその生体防御活性を高めることが明らかとなった。また、少なくとも1日当たり、魚体重1kgあたりに4.0あるいは10mgを経口投与した場合、その効果はキンギョで高く、ニジマスでは低い（種差がある）こと、投与量が4.0mgの方が10mgがより高く、かつ、連続した効果が期待できることが示唆された。本結果のみでは、ニジマス（サケ科魚類）の

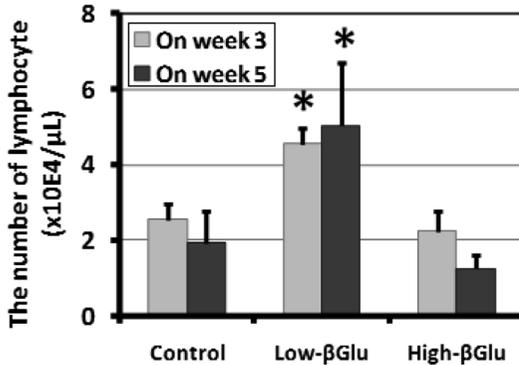


Fig. 7 β-グルカンの経口投与がニジマスのリンパ球数に及ぼす影響  
The effect of β-glucan administrated orally on the number of granulocytes from rainbow trout. mean ± S.D., n=5. \* ; Significant difference of the control ( $p < 0.05$ ).

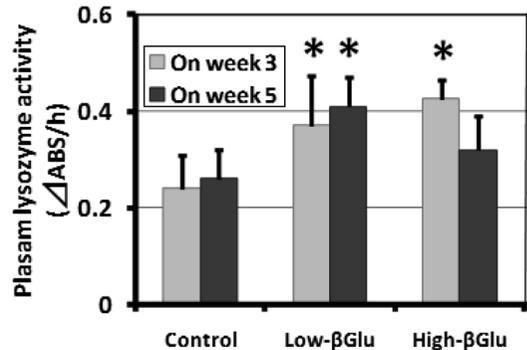


Fig. 9 β-グルカンの経口投与がニジマス血漿の溶菌活性に及ぼす影響  
The effect of β-glucan administrated orally on the plasma lysozyme activity from rainbow trout. mean ± S.D., n=5. \* ; Significant difference of the control ( $p < 0.05$ ).

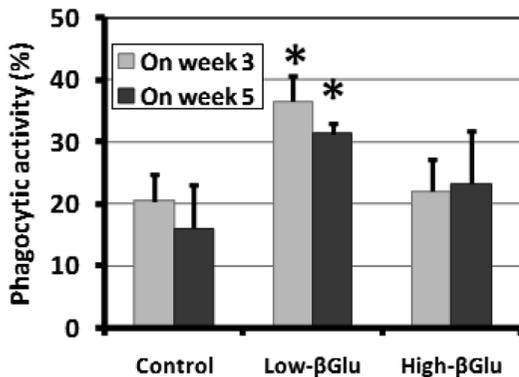


Fig. 8 β-グルカンの経口投与がニジマスの顆粒球貪食活性に及ぼす影響  
The effect of β-glucan administrated orally on the phagocytic activity of granulocytes from rainbow trout. mean ± S.D., n=5. \* ; Significant difference of the control ( $p < 0.05$ ).

感受性がコイ科魚類より高いことによる可能性を無視することはできないが、その後のギンザケ幼魚を対象とし、本β-グルカンの1日当たりの経口投与量を魚体重1kgあたりに1.6あるいは4.0mgに設定して行った試験では、生体防御活性は両群ともに上昇するものの4.0mgの方が同1.6mg投与時に比べてその活性賦活化率は高くなった(3週間にわたり、本β-グルカンを4.0mg/kg体重/日の割合で投与した群では顆粒球貪食活性の有意な上昇がみられたが、1.6mg/kg体重/日量を投与した群では同数値に有意な上昇は認められなかった\*1)。それ故、本β-グルカンの投与効

果には魚種差があり、同活性賦活化の程度(力)はキンギョで高く、ニジマスでは低いものと推察された。この考えは、雑食性魚は肉食性魚と比較して消化管中のβ-グルカン分解酵素の活性が高いという報告<sup>12,13</sup>)と矛盾するものではない。なお、現状では、キンギョとニジマスの消化管におけるβ-グルカン分解に係る酵素の活性を測定したり、β-グルカン分解物の量や当該量と生体防御系の賦活化の関係についての調査を行ったりしていないことから、摂取したβ-グルカンによる生体防御賦活化率に種差がどの程度の関係の有しているか、また、β-グルカンの連続的長期間投与による効果の減衰の理由はいかなるものか等については不明である。

一方、モツゴを用いた投与試験では、本β-グルカンを10あるいは40mg/kg体重/日の割合で3週間連続的に経口投与しても、無胃魚であるモツゴのトリプシン様活性に有意な変動は生じなかった。魚類はタンパク質要求性が極めて高い<sup>14</sup>)ため、タンパク質の主要分解酵素であるトリプシン(様)酵素活性が阻害されると、タンパク質の利用効率が著しく低下し、成長遅延や筋肉含量の減少が起こるのみならず、通常の生命活動自体も大きく制限されることは想像に難くない。逆に、同活性に影響が出ていないことは、魚の消化機能に大きな障害が生じていない可能性を示す。ただし、β-グルカンの投与期間が長期化した場合、特にニジマスを含む肉食性の高い有胃魚への長期間投

与の影響や生体防御等の消化機能以外の生理機能に対する影響を本試験の結果から云々することはできない。従って現状では、投与コストの面からも、本β-グルカンの投与量は4.0 mg/kg 体重/日、継続投与期間は3週間程度（最長でも5週間を超えないもの）とし、必要に応じて断続的投与を繰り返すことが最善の投与方法であると考えられる。

ところで、モツゴ前腸におけるトリプシン様酵素活性のpHプロファイルは等しい高さの2峰（pH 8.5 および 9.4 に最大活性）を示した。有胃魚では、胃液中のタンパク質分解酵素がアルカリ側でも高い活性を示すことや、幽門垂にも高いタンパク質分解酵素活性の有ること（至適pH 8.3）が報告<sup>15)</sup>されている。しかし、コイ科には胃が無く、幽門垂もないことから、モツゴでみられたpHプロファイル上の2つの峰は、腸部において強アルカリ性域に至適pHを持つタンパク質分解酵素活性としてのトリプシン様酵素とキモトリプシン様酵素の2種類に対応する可能性が高い。谷口<sup>16)</sup>は、魚類の腸部位から、カゼインを基質としてpH 9.0 と pH 8.5 にそれぞれ至適を持つ2種類のタンパク質分解酵素を精製しており、それぞれをプロテアーゼI（キモトリプシンに類似したタンパク質分解酵素）とプロテアーゼII（トリプシン様のタンパク質分解酵素）として記載している。トリプシンは、エンテロキナーゼによって活性化され、塩基性アミノ酸（リシン、アルギニン）のカルボキシ基側のペプチド結合を加水分解するのに対し、キモトリプシンは、トリプシンやエンテロキナーゼによって活性化され、芳香族アミノ酸のカルボキシル基側のペプチド結合を加水分解する酵素である。カゼインを構成するアミノ酸の11%強はリシンやアルギニン等のトリプシンが作用する塩基性アミノ酸、約10%は芳香族アミノ酸である<sup>17)</sup>ため、Fig. 1 に示すように、両酵素の活性がほぼ同レベルで検出されても不思議はない。なお、本研究ではモツゴ前腸部位の粗酵素液中タンパク質分解酵素を調べたことから、今回の2峰は、谷口<sup>16)</sup>の報告した至適pHとは多少異なるが、pH 8.5 がプロテアーゼIIに、pH 9.4 がプロテアーゼIに対応するものと考えられた。

以上の結果は、黒酵母由来β-1.3-1.6-グルカンの経口投与が、魚類消化管におけるタンパク質分

解過程に負の影響を及ぼすことなく、養殖魚の生残率向上に貢献する可能性のあることを強く示唆するものである。

## 引用文献

- 1) Harris J, Bird DJ (2000) Modulation of the fish immune system by hormones, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 77 : 163-176.
- 2) Meena DK (2013) Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review), *Fish Physiology and Biochemistry*, 39(3) : 431-457.
- 3) Kakuta I. (2000) Lactoferrin improves physiological conditions of fish held under deteriorating states, *Lactoferrin: Structure, Function and Applications* (Eds. by K. Shimazaki et al.), ELSEVIER, Amsterdam : 429-441.
- 4) Houguo Xu, Jun Wang, Kangsen Mai, Wei Xu, Wenbing Zhang, Yanjiao Zhang, Qinghui Ai (2016) Dietary docosahexaenoic acid to eicosapentaenoic acid (DHA/EPA) ratio influenced growth performance, immune response, stress resistance and tissue fatty acid composition of juvenile Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus* (Cuvier), *Aquaculture research*, 47 (3) : 741-757.
- 5) Novak M, Vetvicka V (2008) β-Glucans, History, and the Present: Immunomodulatory Aspects and Mechanisms of Action, *Journal of Immunotoxicology* (Online) DOI: 10.1080/15476910802019045, 5 (1) : 47-57.
- 6) 宿前利郎 (2000) βグルカンの魅力 (オルタナティブ選書), 東洋医学舎, 東京, pp.18-99.
- 7) Akramienė D, Kondrotas A, Didžiapetrienė J, Kėvelaitis E (2007) Effect of β-glucans on the immune system *Medicina* (Kaunas), 43(8) : 597-606.
- 8) 石丸克也, 鈴木利雄, 古川喜朗, 村田修, 熊井英水 (2005) “黒酵母” *Aureobasidium pullulans* 1A1 株産生β-グルカンのマダイ抗病性に対する効果, 2005年度日本水産学会要旨集 : 230.
- 9) 角田 出 (2004) 海藻多糖フコイタン投与による魚類生体防御活性の増強および生理状態改善, *水産増殖*, 52(4) : 413-420.
- 10) 角田 出 (2008) 米糠由来物質の投与による魚類の非特異的生体防御能の増強, *水産増殖*, 56(1) : 105-111.

- 11) 平田恵子, 広門雅子, 植松洋子, 中島和雄, 風間成孔 (1994) 食品製造用プロテアーゼ及びパバイン製剤のタンパク消化力測定法の検討, 食衛誌, 35(4): 380-384.
- 12) 池田静徳 (1979) 魚類生理, 蛋白質・核酸・酵素, 24: 292~300.
- 13) Taniguchi YA, Takano K (2004) Purification and properties of  $\beta$ -galactosidase from *Tilapia* intestine: Digestive enzyme of *Tilapia*-X, *Fisheries Science*, 70: 688~694.
- 14) 池田静徳 (1967) 魚類栄養の特質 - これからの養魚餌料を考えるために-, *化学と生物*, 5(10): 600-607.
- 15) 藤井 実 (1961) 魚類内臓プロテアーゼに関する研究, *農水講研報*, 11(1): 1-66.
- 16) 谷口 (山田) 亜樹子 (2005) 魚類消化管中の各種消化酵素の精製と作用機作に関する研究, *日本食品保蔵科学会誌*, 31(4): 189-197.
- 17) 乳類/ (その他) /カゼイン-アミノ酸-可食部 100 g - 食品成分データベース, [https://fooddb.mext.go.jp/details/details.pl?ITEM\\_NO=13\\_13048\\_7&MODE=4](https://fooddb.mext.go.jp/details/details.pl?ITEM_NO=13_13048_7&MODE=4)