

平成 26 年度

博士論文

アユ消化管の構造と機能の部位間比較

石巻専修大学 大学院 理工学研究科

博士後期課程 生命環境科学専攻

DL22-0003F 小松 仁

指導教員：坂田 隆

平成 27 年 1 月 14 日提出

要旨	1
第1章 序論	4
第2章 供試魚	9
第3章 アユの腸の比較解剖学的区分	11
第4章 アユの腸各部位の形態学的な比較	15
第5章 消化管各部位の重量および長さ、ならびに相対成長	21
第6章 消化管内容物の部位間比較	27
第7章 藻類および消化管内の細菌	32
第8章 内容物の成分	35
第9章 栄養素の消化率の推定	41
第10章 アユ消化管からの栄養素エネルギーの吸収量	45
第11章 アユの栄養素消化の部位間比較	60
第12章 摂取エネルギーからの増体重見積もり	65
第13章 結論	69
謝辞	71
引用文献	72

要旨

アユ (*Plecoglossus altivelis*) は秋に河川で孵化して海へ下り、動物性プランクトンを食べる。その後川へ遡上してくる際に植物食に変わり、主に川底の石に付着する藻類を摂食する。その後4ヶ月ほどで、体重5g程度から100gほどに成長する。しかし、アユが体長の0.7倍ほどの短い腸を用いて、どの栄養素からどれほどエネルギーを得ているかは不明である。また、アユのエネルギー代謝への自家酵素消化と細菌消化の貢献割合も不明である。

そこで、本研究ではアユの腸を解剖学的に区分し、天然成アユがどの栄養素をどのくらいエネルギー源にしているか、自家酵素消化と細菌消化のエネルギー貢献割合はどれだけか、各栄養素の消化吸収に腸の部位ごとの差があるか、について明らかにすることを目的とした。また、これらに基づいて、アユの成長を支えるエネルギーの獲得の仕方を考察した。なお、本研究は、天然魚でのエサの消化率を明らかにした、知る限りではじめてのものである。

山形県小国川産の成アユの内臓を肉眼観察した結果に基づいて、血管走行を目印にして腸を3部位（胃側から肛門側に向かって腸1、腸2、腸3）に区分した。腸の部位間で粘膜上皮の細胞構成には大差がなかった。

体成長に対する消化管各部位の相対的な成長速度を検討するために、天然の海産稚アユ、遡上アユ、成アユについて、消化管各部位の組織重量と体重との対数回帰式を最小二乗法によって求めた。この式の勾配（相対成長係数）は食道で0.6、胃が0.8、腸は0.9から1.2であったので、海にいる稚アユから遡上中の個体、成魚にいたるまで、アユの消化管は体全体の成長とほぼ同様の速度で成長していることが明らかになった。

天然成アユ消化管内容物の pH は胃で約 4、腸の 3 部位はいずれも約 7 であった。天然成アユが食物としている藻類と内容物の細菌構成をメタゲノム解析したところ、胃と腸の内容物では違いがあったが、腸の各部位間には大差がなく、Rhizobiales 目が最優占であった。また、有機酸の濃度は胃から腸 3 まで大差がなく、ほとんどが乳酸で、腸 3 にのみ酢酸が若干存在した。このことから、胃から腸の終末に到るまで微生物による炭水化物分解が行われていることが明らかになった。なお、内容物に分岐鎖脂肪酸が検出されなかったことから微生物によるタンパク分解はないことも明らかになった。

魚類をはじめとする脊椎動物の消化率測定で広く用いられている酸不溶性灰分を非吸収性標識として、藻類および胃から腸 3 までの各部位の内容物の標識あたりの栄養素量を求めた。標識あたりの栄養素量の部位差から、栄養素の消化率はタンパク 69%、脂質 78%、炭水化物 88%であり、胃でタンパクと炭水化物が消化されることも明らかになった。また、腸 1 でタンパクと脂質が分泌されることも明らかになった。つぎに、消化管内容物中の有機酸濃度から推測した結果、細菌は消化管に流入する炭水化物の約 7%を消費したと推定した。しかし、アユの消化管内細菌の炭水化物分解の主産物が乳酸などの非吸収性の酸であり、腸 3 で生産された吸収性の酢酸によるエネルギー貢献度は消化炭水化物の 0.6%程度であったことから、細菌が分解した炭水化物は宿主のエネルギー収支には貢献しないと考えた。このような細菌による炭水化物の消費を考慮した栄養素ごとの消化・吸収率は、タンパク 69%、脂質 78%、炭水化物 81%と推定された。

養殖アユの藻類摂餌量の既報値と本研究での栄養素ごとの消化・吸収率とから、摂取エネルギーと消化エネルギーを見積もると、小国川産体重 50 g の天然

アユは 10.2～15.3 kcal のエネルギーを含む藻類を毎日摂食していると考えられ、このうち消化エネルギーは 7.6～11.4 kcal/日と推測された。これと、消化エネルギーあたりの体重増加量の既報値とから、体重 50 g の小国川天然アユは 1 日に藻類を 40 から 60 g/日摂取し、0.27 から 0.41 g/日体重増加すると推算した。これは養殖アユ増体重の既報値と矛盾しない。また、本研究での天然成アユのエネルギー消化率は 78%であり養殖魚の一般的な範囲内であった。

これまで述べてきたことから、灰分が乾物重量の約 4 割を占め、有機物含量が少ないが川底に大量に繁茂する藻類を一般的な養殖魚の摂食量の約 1.5 倍天然成アユたべて成長に必要なエネルギーを消化・吸収する能力があることが明らかになった。

つまり、アユは腸が短い植物食魚ではあるが、消化管内の細菌代謝にはほとんど依存せず、自家酵素消化のみで成長できる魚であることを本研究は明らかにした。

第1章 序論

1-1 背景

アユ (*Plecoglossus altivelis*) は秋に河川で孵化して海へ下り、動物性プランクトンを食べる (Nakagawa *et al.* 2002)。その後5月ごろに川へ遡上してくる際に植物食へと変わり、主に川底の石に付着する藻類を摂食する (Nakagawa *et al.* 2002)。藻類を食べはじめてから4ヶ月ほどで、体重5gほどの個体が100gほどに成長する (小松 未発表)。

アユのエサ摂取量と増体重の関係が明らかになっている。茂木がプラスチック板に藻類を繁殖させてアユに食べさせる実験をしたところ、アユは毎日体重の約80%の湿重量の藻類を食べて1日0.38g体重が増加した (茂木 1985)。また、田中は最大で体重の120%の湿重量の藻類を1日に食べるという報告をしている (田中 1980)。

藻類には、昆虫などと違って、炭水化物が多く含まれている (荻野 1963)。つまり、藻類を食べるということは、タンパクと脂質以外に炭水化物も食べることである。したがって、藻類に含まれる炭水化物をアユがどれだけ利用できるかを明らかにすることはアユのエネルギー獲得のしかたを理解するうえで重要である。しかし、アユが体長の0.7倍ほどの短い腸 (小松 未発表) を用いて、藻類のどの栄養素からどれほどエネルギーを得ているかは不明である。

また、天然アユでは消化管内微生物が炭水化物を分解して有機酸を生産することを明らかにしたが (小松 2009)、アユのエネルギー代謝への自家酵素消化と細菌消化の貢献割合は不明である。

さらに、アユも含めたこれまでの研究 (Paris *et al.* 1977, Kihara and Sakata 1997) では硬骨魚の腸を単一のコンパートメントとして扱っているため、腸の部位ごとの機能分化は明らかになっていない。単胃の植物食ほ乳類では、デンプンやタンパク、中性脂肪などの消化しやすい成分を小腸までで消化・吸収し、セルロースやペクチンのような難消化性の炭水化物を大腸内の細菌に分解させ、短鎖脂肪酸として吸収している (Stevens and Hume 1995)。ところが、アユの腸は体長の約 70% と短く盲腸のような滞留部位がないので (Nakagawa *et al.* 2002) 微生物消化のための十分な滞留時間を確保することは困難である。また、遡上したアユが生息する河川の水温は 10-20 °C 程度で十分な細菌消化活性を期待するには低すぎる (Kihara and Sakata 2001)。

細菌が炭水化物を短鎖脂肪酸などの有機酸に変換する際の収率は、発酵熱や細菌菌体生産にエネルギーを消費するので、約 6 割である (Livesey and Elia 1995)。したがって、仮にデンプンのように消化しやすい栄養素が細菌によって分解されて有機酸に変換されると、宿主が有機酸を吸収して得られるエネルギーは自家酵素消化による消化の場合の 6 割以下となる。さらに細菌が、宿主が吸収できない乳酸やコハク酸、ギ酸を炭水化物から作った場合には、そのぶんのエネルギーを吸収することなく失う事になる。しかし、アユでは細菌消化によるエネルギー供給がどれほどかも不明である。

単胃の植物食ほ乳類では、まず小腸終末までの自家酵素消化によって消化しやすい栄養素を消化・吸収し、そのあとで難消化性の糖質を細菌によって消化をするといった、腸の部位別の機能分化によって効率の良いエネルギー獲得を行っている。はたして、植物食魚であるアユの腸がこのように機能分化を行っ

ているのか、すなわち自家酵素消化が細菌消化に先行するのかは不明である。

上述のような腸の部位別の機能分化を明らかにするためには、腸の部位別の成長速度が異なる可能性があることや、異なる大きさのアユの間での比較などを考えると、腸の部位を長さの等分点などで単純に区分 (Mountfort *et al.* 2002) するのではなく、解剖学的な指標に基づいて区分する必要がある。

一方で、消化管上皮細胞の脱落や消化液の分泌による窒素や脂質の消化管への内因性の分泌の可能性あることを考えると、部位ごとに内容物のタンパク、脂質、炭水化物量を測定する必要がある。つまり、食べたものと糞の測定だけでは消化吸収の評価ができないことになる。したがって、アユの腸の部位を解剖学的な指標にもとづいて明確に区分する必要がある。

川に遡上したアユはほぼ藻類のみを食べて暮らしている (宮地 1960)。1 日で体重の 80% から 120% にあたる湿重量の藻類を食べることが報告されている (田中 1980, 茂木 1985)。また、日中は常に藻類を食べていることもわかっている (Amano *et al.* 2006)。すなわち、日中のアユの腸内では藻類に由来する内容物が安定して通過し続けていることになる。つまり雑食魚などの、いつどのような餌をたべたかわからないような魚と異なって、アユでは摂食時によるエサの違いを無視できるので消化管の部位ごとの栄養の消化・吸収を評価しやすいと考えられる。いっぽうで、アユのエサである藻類には、消化率を計算する際に非消化性指標として利用可能な、灰分が多く入っていると想定されることや、大きさが揃ったアユを必要な頭数だけ採取することが可能なことや、分析できるだけの量の消化管内容物が入っていることは、植物食魚の栄養生理学的な研究をすすめるうえで有利な点といえる。

様々な魚でエサの消化率を測定した研究が行われてきたが（表 1）、天然魚について消化率を評価した研究は筆者の知る限りない。天然魚において消化率を調べるには、エサの全量採取や全糞採取、あるいは消化率を評価するための非吸収性指標がエサの中に含まれていること、魚が食べたエサと同じ組成のエサが採取できることなどの条件が必要である。これらの条件を満たすことのできる天然魚が天然成アユであった。以上のような理由から天然アユの消化管各部の消化・吸収を比較し、栄養素ごとの消化率を明らかにすることにした。

1-2 目的

1-1 で述べた状況をふまえて、本研究では腸が短いという植物食魚として制約の大きいアユのエネルギー獲得の実態を量的に明らかにすることによって、植物食魚、特に水温が低いために微生物消化が期待しにくい河川上流域の植物食魚が生存や成長に必要なエネルギーを獲得する基本的な仕組みを明らかにすることを目的とした。これは植物食動物の栄養生理学的観点から非常に興味深い問題であることから、本研究においてはエサとなる藻類に含まれるタンパク、脂質、炭水化物をアユが消化管のどの部位でどれだけ消化・吸収するのか、またエネルギー源を自家酵素消化と消化管内微生物代謝にどれだけ依存するのかを量的に明らかにすることを目的とした。

なお、これらの目的を達成するために、本研究ではアユの腸を解剖学的な指標に基づいて区分する方法を開発した。また、本研究で得られた各栄養素の消化率が妥当であったかどうかを検討するために、摂餌量と増体重に関する既報値と本研究で得られた消化率をもとに、小国川の天然アユの体重増加を推算し、実際の天然アユの体重と一致するかどうかを検討した。

第2章 供試魚

天然成アユ (*Plecoglossus altivelis*)

2011年8-9月、2012年8-9月、2013年8月に山形県舟形町内の最上小国川にて天然成アユを友釣りで採取した。友釣りとは、アユが川底の藻類を食べる際に縄張りをつくる習性を利用し、生きたアユに掛け針のついた仕掛けをつけて泳がせ、野生のアユに追わせて針を野生アユに掛けて釣るものである。したがって、友釣りをを用いると、縄張りをもち、川底の藻類を選択的に食べているアユを採取することが可能である。なお、最上小国川は最上川の支流なので、本研究では最上小国川で採取したアユは最上川水系原産のアユと判断した。

友釣りで採取したアユには成魚放流のアユが混ざっている可能性がある。しかし、この研究で採取した時期は、成魚放流が行われてから最低でも60日以上経過していることから成魚放流のアユは野生化していると考えられ、実際に消化管内容物はほぼ藻類が占めていたことを確認している(小松 未発表)。したがって、友釣りで採取したアユは全てほぼ純粋な植物食であると判断できる。そのため、本研究では友釣りで採取したアユをすべて「天然成アユ」とした。

天然稚アユ

2013年5月に山形県酒田市の北港にて海にいる稚アユを疑似餌を用いた釣りにて採取した。山形県酒田北港は最上川河口から北に5 kmほどの場所であることから、採取した稚アユは最上川水系原産のアユと判断した。

天然遡上中アユ

遡上中のアユは2013年6月に宮城県登米市津山の旧北上川と新北上川との合流地点にある堰の魚道で北上川漁協員により網で採取されたものを現地で譲り受けた。なお、この遡上中のアユが魚道の底に生えた藻類を食べていることを確認した。さらに譲り受けたアユの消化管内容物を目視で確かめたところ、藻類で満たされていた。このことから、今回の実験に使用した天然遡上中アユは、食性が植物食に変化したあとのものであると判断した。

第3章 アユの腸の比較解剖学的区分

3-1 目的

腸の各部の消化・吸収能力を客観的に比較するために、解剖学的な指標に基づいた腸の区分方法を開発することを目的とした。

3-2 方法

ほ乳類では小腸と大腸の境界に盲腸や回盲弁があり、縦走筋も小腸と大腸の境界で途切れているので、両者の間の区分は容易である(坂田 2007)。しかし、アユにはこうした指標が無いので、別の指標を考える必要がある。そこで、血管と腸間膜を指標にしてラットの大腸部位を区分した先行研究(坂田 2007)に習って、アユの腸の比較解剖学的区分を行った。

小国川産の成アユ 20 尾を用いた。これらの頭を強打することによって不動化したあと、エラ付近から肛門付近まで腹正中線を切り開いて、消化器官を露出させ、消化管の配置や消化管の血管支配を肉眼観察した。

3-3 結果

背大動脈からでた腹腔腸間膜動脈(伊東 1987)は腸の幽門垂がある部分の肛門端で枝を發して腸に至った。本研究ではこの枝を近位枝と呼ぶ(図 1)。腸のさらに肛門側の部分で腹腔腸間膜動脈からもう一本の枝を發していた。この研究では、この枝を遠位枝と呼ぶ(図 2)。これらの 2 本の枝の進入位置を境界として、腸を 3 部位に分けることとした。すなわち、腸のもっとも口側の部分か

ら腹腔腸間膜動脈の近位枝の進入部までを腸 1（幽門垂を含む）、近位枝の進入部から遠位枝の進入部までを腸2、遠位枝の進入部から肛門までを腸3とした(図3)。

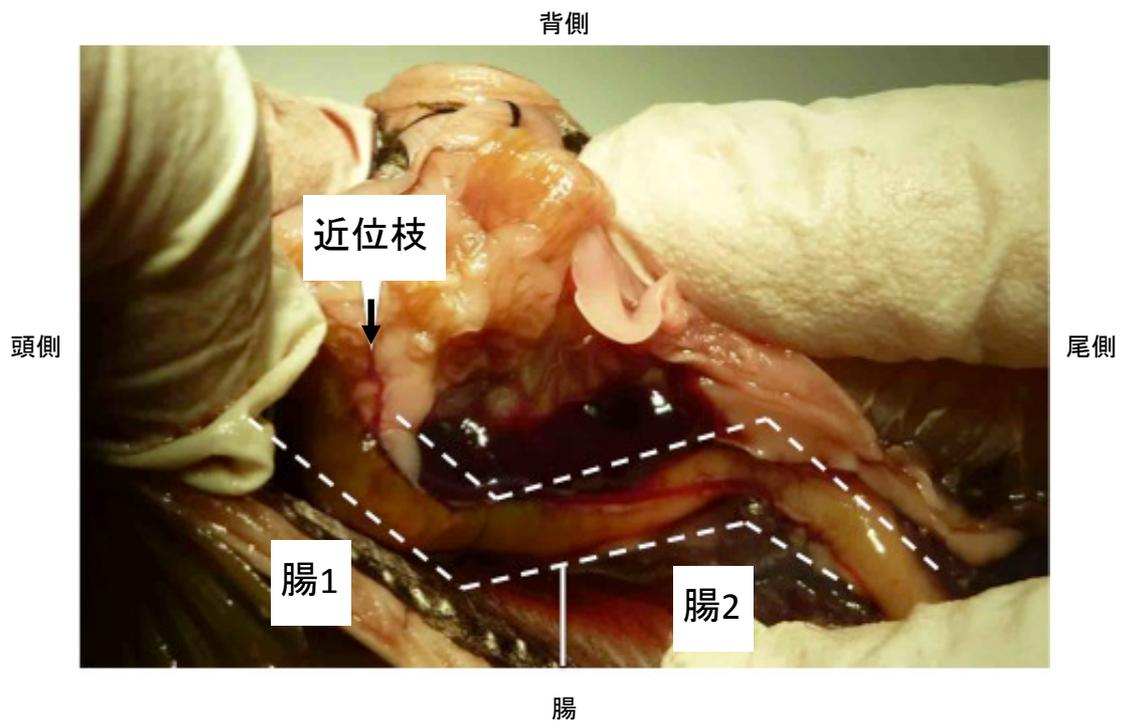


図1 アユ腸への腹腔腸間膜動脈近位枝の進入部位（下向き矢印の頂点）

アユの腹腔を開くと腸（二本の破線の間）に白く見える部分が見える。腸の背側で腸と並走する腹腔腸間膜動脈から枝(近位枝)を発生し、下向き矢印の頂点の位置で腸に到る。この研究では、この位置から口側を腸1（幽門垂を含む）、肛門側を腸2と呼ぶ。

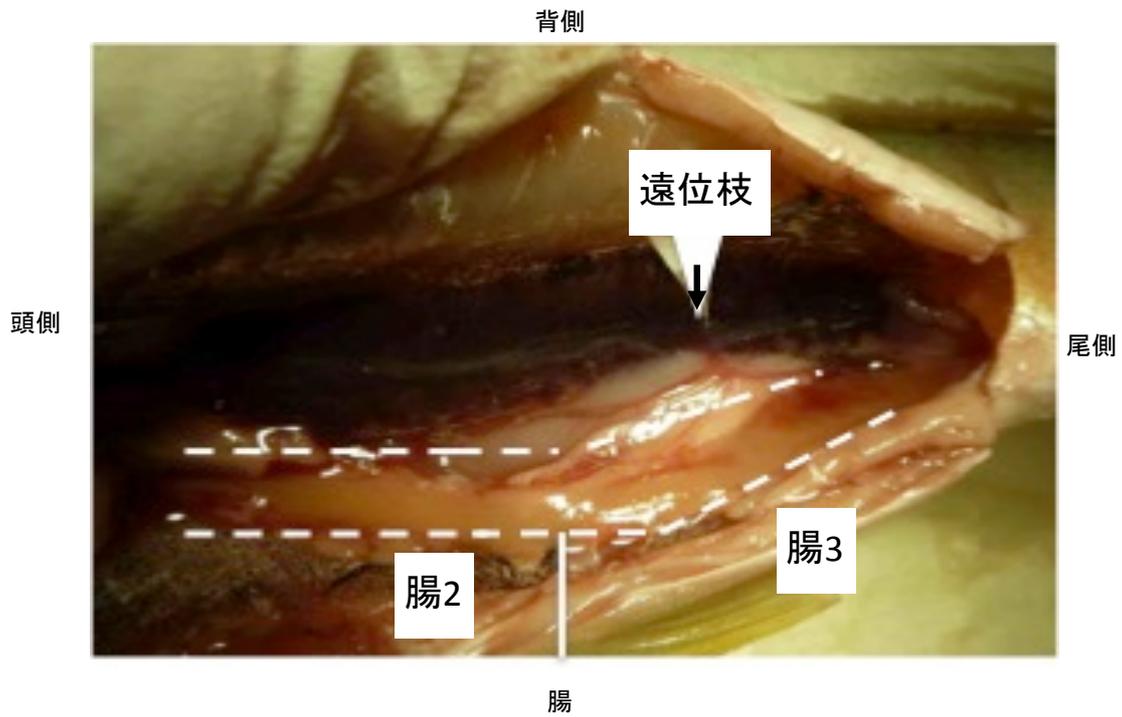


図2 アユ腸への腹腔腸間膜動脈遠位枝の進入部位（下向き矢印の頂点）

アユの腹腔を開くと腸（二本の破線の間に見え部分）が見える。図1よりも肛門側でも、腹腔腸間膜動脈から枝（遠位枝）を発生し、下向き矢印の頂点の位置で腸に到る。この研究では、この位置から口側を腸2、肛門側を腸3と呼ぶ。

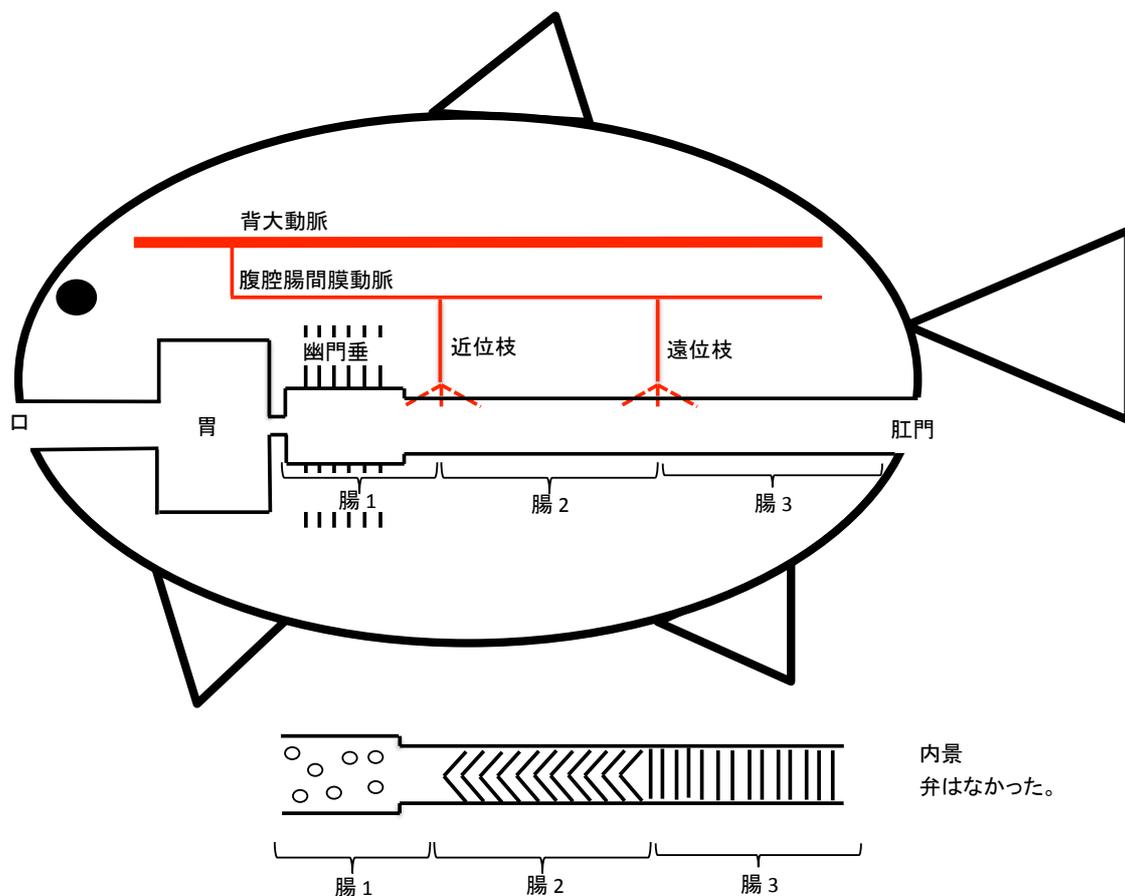


図3 アユ腸の血管支配と、これに基づく部位の区分および各部の内景 (模式図)

アユの腸の最も口側の部分からは幽門垂とよばれる突起がでている。この部分を含めて、腹腔腸間膜動脈近位枝の進入部位までをこの研究では腸1 (幽門垂を含む)と呼ぶ。幽門垂が出ている部分の内面には、幽門垂の開口が見える。腹腔腸間膜動脈近位枝の進入部位から腹腔腸間膜動脈遠位枝の進入部位までの腸2の内面には、腸間膜付着側から反腸間膜側に走る左右対称の斜走ヒダがある。

第 4 章 アユの腸各部位の形態学的な比較

4-1 目的

腸の 3 部位の機能の差を比較する基礎として、各部の内景や組織構造を比較することを目的とした。

4-2 内景の比較

腸の血管支配を観察したあとの腸を腸間膜付着に沿って、あるいは反腸間膜側で、長軸方向に切りひらいて、内景を確認した。その結果、腸 2 には腸間膜付着側から反腸間膜側に走る、ラットの近位結腸で見られるような左右対称の斜走ヒダ（坂田 2007）を確認した（図 4）。既報によればアユの腸のヒダは長軸と平行に走る横走ヒダといわれていたが（Smith 1989）今回の結果は異なっていた。

さらに、腸には弁やふくらみがないことを確認した。ただし、これらの 3 部位がほ乳類のどの部位に対応するのかは不明である。

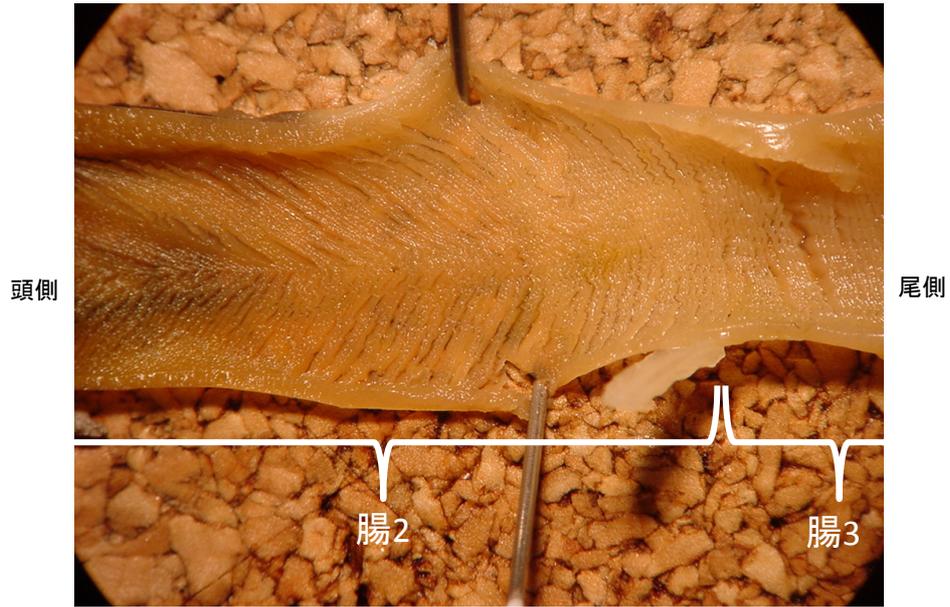


図4 反腸間膜側で長軸方向に切開したアユ腸2および腸3の内景。
腸2の内面には斜走ヒダが観察された。



図5 反腸間膜側で長軸方向に切開したアユ腸3の内景。
図4よりも肛門側の腸3の内景。

4-3 光学顕微鏡による組織構造の観察

小国川で採取した成アユの頭を強打することによって不動化したあと、食道、胃、腸 1、腸 2、腸 3 を 10%緩衝ホルマリン溶液で固定し、常法に従ってパラフィン包埋し、3 μm 厚の横断切片を作った。一般構造の観察のためにヘマトキシリンエオジン染色、中性ムチンを染色するための過ヨウ素酸シッフ (PAS) 反応、酸性ムチンを染色するための pH 2.5 でのアルシアン青染色をおこなった (Sakata and Engelhardt 1981)。

アユの消化管の横断切片を観察したところ、成アユの消化管は単層上皮に覆われていた (図 6-10)。腸の各部位にヒダが観察された。ヒダの長さは食道と胃が腸の各部位にくらべて短かった。腸の部位間では腸 1、腸 3 にくらべて腸 2 では短かった。ヒダの幅は食道と胃が腸の各部位に比べて太かった (図 6, 7)。腸の部位間では腸 2 や腸 3 にくらべて腸 1 で細かった (図 8-10)。筋層の厚さは食道と胃が腸の各部位に比べて厚く、腸の部位間には大差がなかった (図 6-10)。

粘膜上皮の酸性ムチンを含む細胞は腸の各部位にくらべて食道に多かった (図 11-15)。腸の部位間では腸 1 にくらべて腸 2 で多く、胃と腸 3 にはほとんど存在しなかった。中性ムチンを含む細胞は腸の各部位にくらべて胃と食道に多かった (図 16-20)。腸の部位間では腸 1 と腸 2 に多く、腸 3 には中性ムチンを含む細胞が少なかった。食道には酸性ムチンを含む細胞、中性ムチンを含む細胞ともに多く存在した。

このように、食道から胃までと腸ではヒダや筋層の厚さ、粘液細胞の数に違いがあるが、腸の部位間には筋層の厚さや粘膜上皮の基本的な細胞構成に大差がなかった。

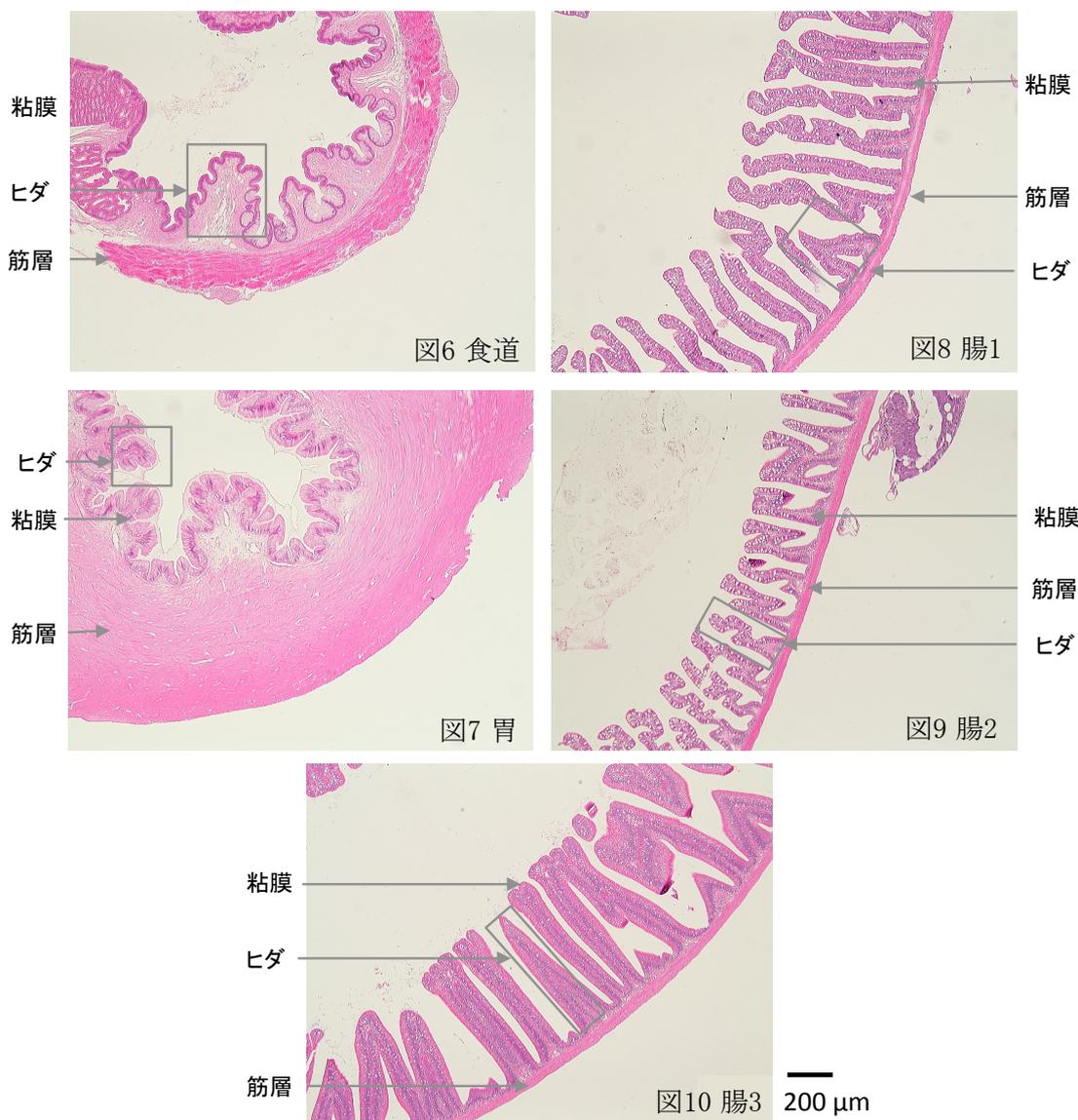


図 6-10 成アユの食道 (図 6)、胃 (図 7)、腸 1 (図 8)、腸 2 (図 9)、腸 3 (図 10) のヘマトキシリンエオジン染色横断切片 (3 μm 厚)

いずれの部位も単層上皮に覆われていた。腸の各部位にヒダが観察された。ヒダの長さは食道と胃が腸の各部位にくらべて短かった。筋層の厚さは食道と胃が腸の各部位に比べて厚く、腸の部位間には大差がなかった。

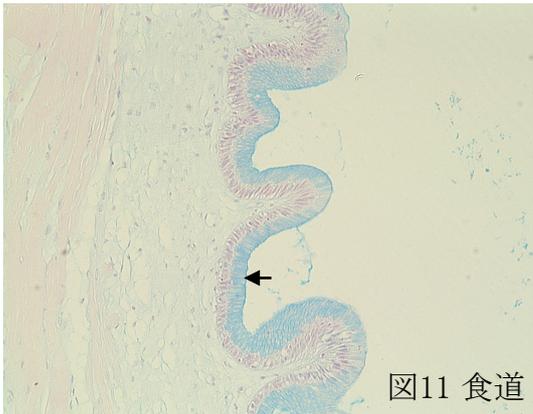


図11 食道



図13 腸1

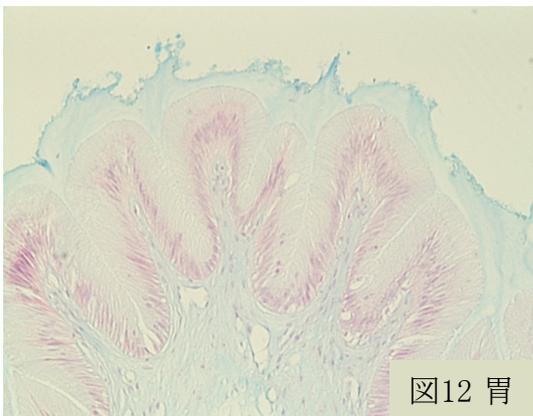


図12 胃

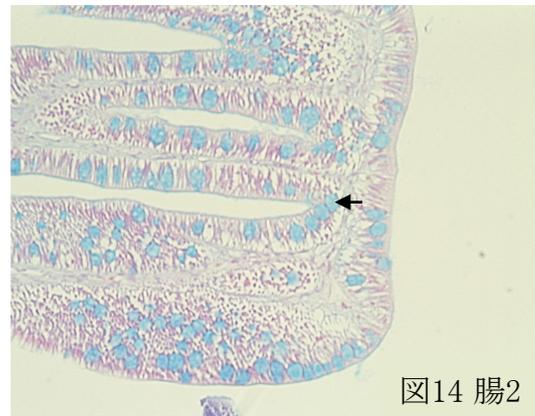


図14 腸2

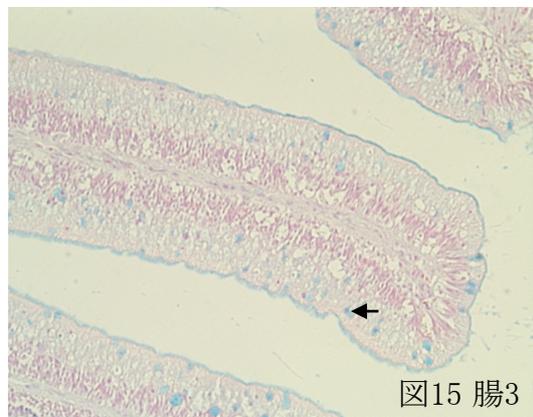


図15 腸3

50 μ m

図 11-15 成アユの食道 (図 11)、胃 (図 12)、腸 1 (図 13)、腸 2 (図 14)、腸 3 (図 15) のアルシアン青・ケルンエヒトロート (pH 2.5) 染色横断切片 (3 μ m 厚)

酸性ムチンが青色、核が赤色に染色されている。粘膜上皮の酸性ムチンを含む細胞 (図 13-15 黒矢印) は腸の各部にくらべて胃と食道に多い。腸の部位間で比べると、腸 2 で多かった。食道の粘膜表面には分泌された酸性ムチンの層 (図 11 矢印) が見える。



図16 食道



図18 腸1



図17 胃



図19 腸2



図20 腸3

50 μm

図 16-20 成アユの食道 (図 16)、胃 (図 17)、腸 1 (図 18)、腸 2 (図 19)、腸 3 (図 20) の過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色横断切片 (3 μm 厚)。

中性ムチンが赤色に染色されている。中性ムチンを含む細胞 (矢印) は腸の各部位にくらべて胃と食道に多い。腸の部位間では腸 1 と腸 2 に多く、腸 3 には中性ムチンを含む細胞は少なかった。

第5章 消化管各部位の重量および長さ、ならびに相対成長

5-1 目的

消化管各部位の相対的なサイズを比較するとともに、各部位の成長速度が均等なのかどうかを検討するために、成長の各段階において体重や体長、消化管各部の重量や長さを計測した。

5-2 方法

稚アユは山形県酒田市北港で2013年5月に採取した。遡上中のアユは宮城県北上川漁協から2013年6月に北上川を遡上中の個体の提供を受けた。成魚は小国川において友釣りで採取した。

アユの頭を強打することによって不動化したあと体重や体長、尾叉長、体高を計測した。その後開腹し、上述の区分法（第3章）にしたがって、食道、胃、腸1、腸2、腸3、肝臓を取り出し、長さを測り、内容物をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗い流したあとで水分を吸い取り、組織湿重量を秤量した。組織重量の体重に対する相対成長速度を求めるために、組織重量と体重から以下の対数回帰式を最小二乗法によって求めた。

$$\log_{10}(\text{組織重量 } g) = a + b \times \log_{10}(\text{体重 } g)$$

この回帰式の勾配(b)を相対成長係数といい、相対成長係数が1より大であれば臓器の成長速度が体重の増加速度よりも速い(優成長)ことを示し、1以下であれば体重の増加速度よりも遅い(劣成長)であることを示す(Sakata and Setoyama 1997)。

得られた測定値の平均値を分散分析と Tukey の HSD 検定で解析して p 値（危険率） < 0.05 で有意と判定した。

5-3 結果と考察

体重あたりの消化管重量は食道と胃で稚アユが遡上中の魚や成魚よりも有意に重かった（図 21, 22）。逆に腸 1 と肝臓では成魚のほうが稚アユよりも有意に重かった（図 23, 26）。腸 2 と腸 3 では成長段階の間で重さに有意差がなかった（図 24, 25）。一方で、相対成長係数は食道、胃、腸 2、腸 3 で 0.9 以下であり、腸 1 と肝臓では 1.1 以上であった（図 27-32）。

相対成長係数から判断すると、食道と胃は劣成長、腸 1 と肝臓は優成長といえる。このことは、アユの消化管各部位の体重あたりの重量が、食道と胃では稚アユのほうが成魚より大であり、腸 1 と肝臓ではその逆であったことと矛盾しない。また、図 27-32 に見られるように消化管各部の相対成長には変曲点が見とめられないので成長速度の変化はない。アユの消化管は海にいる稚アユから遡上中の個体、成魚にいたるまで、ほぼ同様の速度で成長しているといえる。体全体の中で腹腔内臓器が占める割合もさほど変化しないことになる。

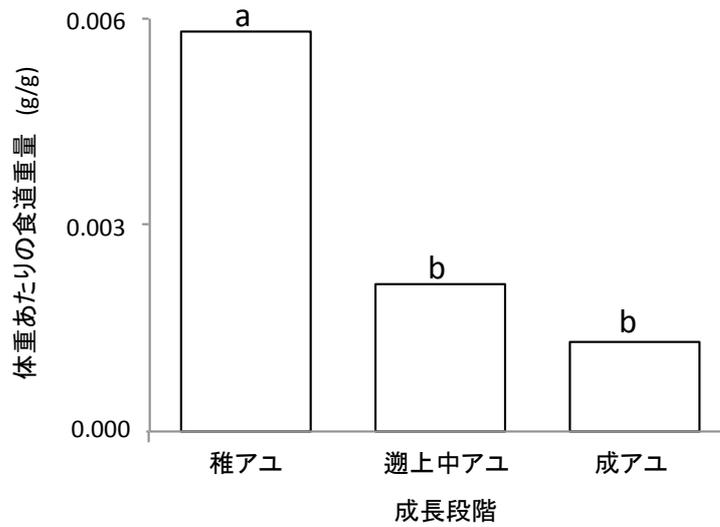


図 21 成長段階ごとのアユ体重あたりの食道の重量（平均値, $n=4$, Pooled SD=0.001, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。）

稚アユのほうが、遡上中の魚や成魚よりも有意に重かった ($p < 0.0001$)。遡上中アユと成アユの間には有意差が無かった。

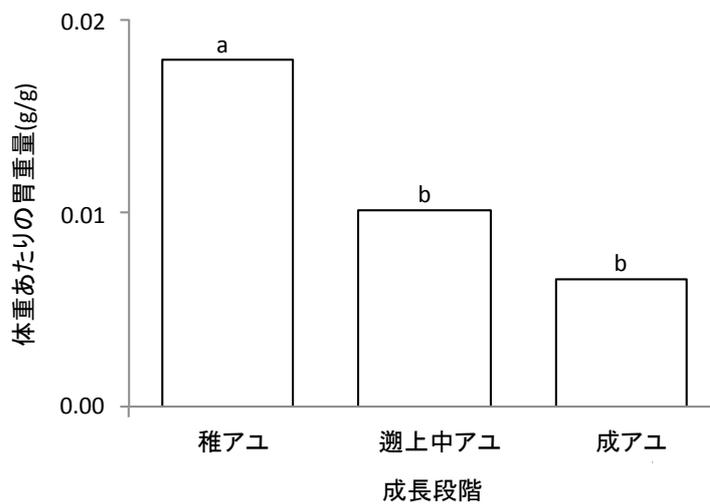


図 22 成長段階ごとのアユ体重あたりの胃の重量（平均値, $n=4$, Pooled SD=0.004, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。）

稚アユのほうが、遡上中の魚や成魚よりも有意に重かった ($p < 0.0001$)。遡上中アユと成アユの間には有意差が無かった。

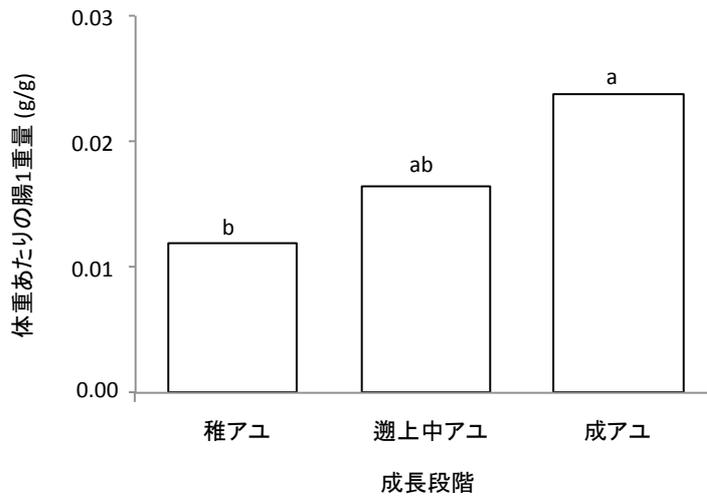


図 23 成長段階ごとのアユ体重あたりの腸1の重量（平均値, $n=4$, Pooled SD=0.007, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。）

成魚のほうが稚アユよりも有意に重かった ($p < 0.0001$)。稚アユと遡上中アユの間、遡上中アユと成アユの間には有意差が無かった。

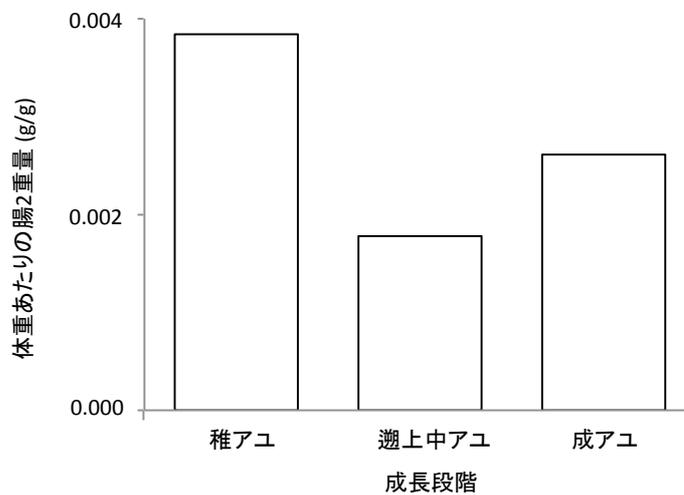


図 24 成長段階ごとのアユ体重あたりの腸2の重量（平均値, $n=4$, Pooled SD=0.002）

稚アユ、遡上中アユ、成アユのいずれの間にも有意差が無かった。

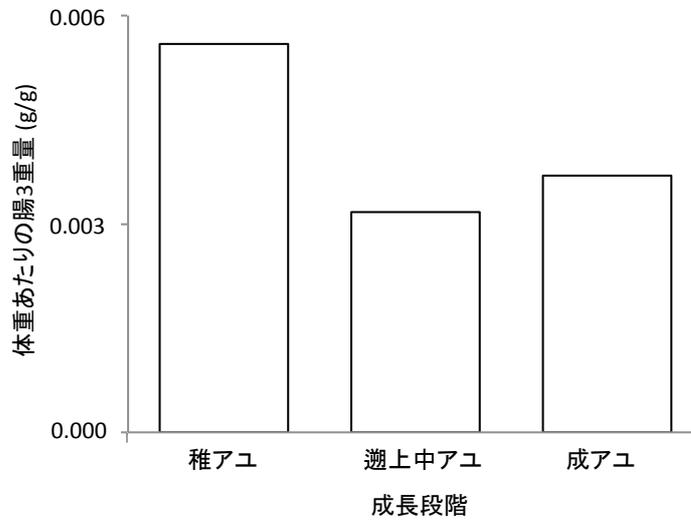


図 25 成長段階ごとのアユ体重あたりの腸3重量（平均値, $n=4$, Pooled SD=0.003）
稚アユ、遡上中の魚、成魚のいずれの間にも有意差が無かった。

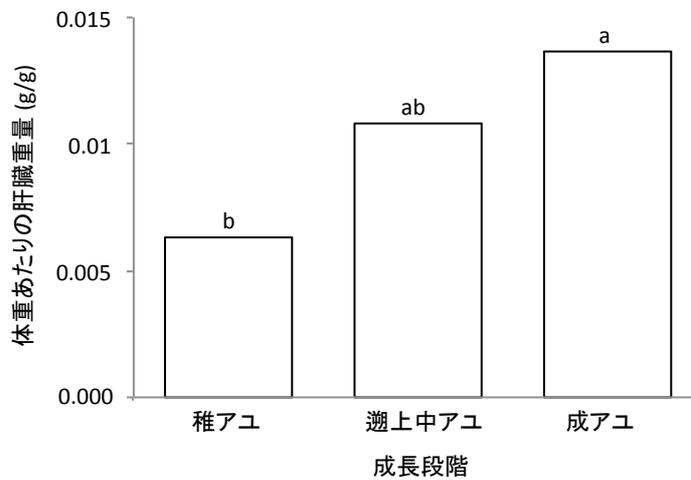


図 26 成長段階ごとのアユ体重あたりの肝臓の重量（平均値, $n=4$, Pooled SD=0.005, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。）

成魚のほうが稚アユよりも有意に重かった ($p < 0.0001$)。稚アユと遡上中アユの間、遡上中アユと成アユの間には有意差が無かった。

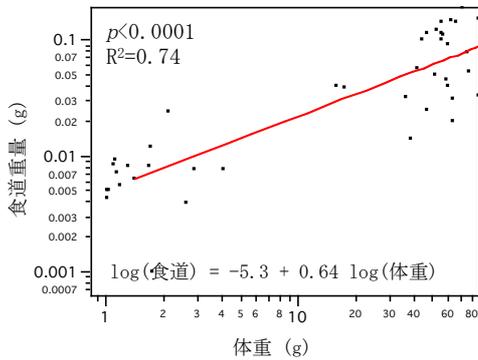


図 27 アユ食道の成長

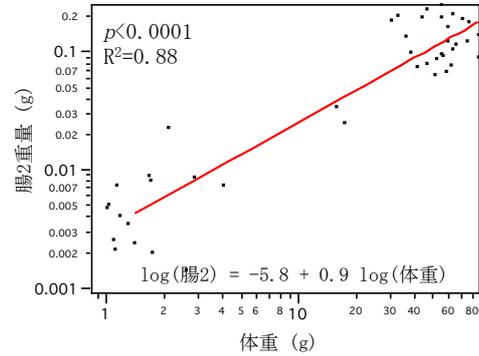


図 30 アユ腸2の成長

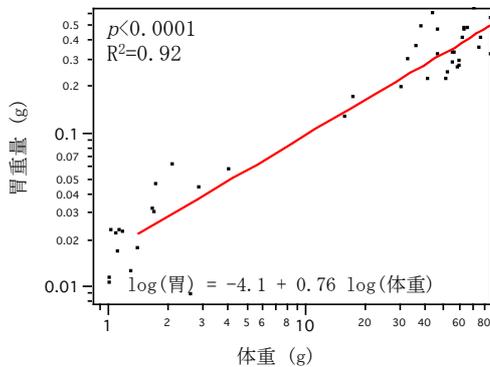


図 28 アユ胃の成長

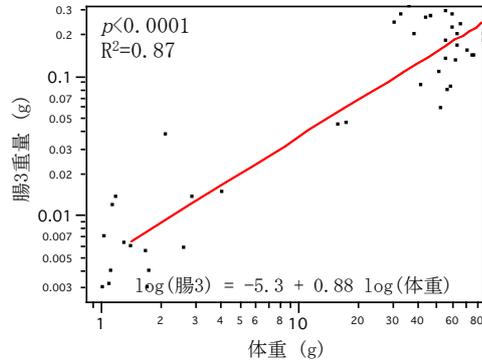


図 31 アユ腸3の成長

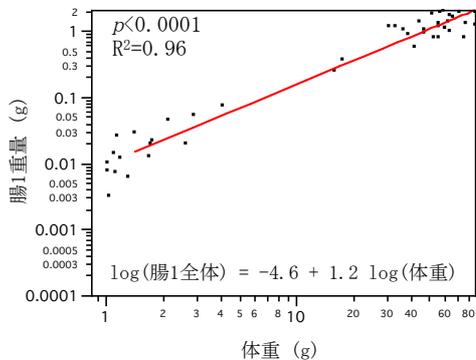


図 29 アユ腸1の成長

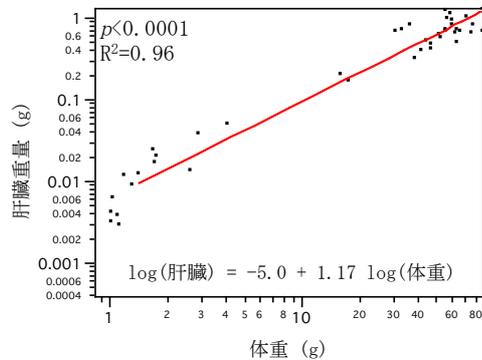


図 32 アユ肝臓の成長

図 27-32 稚アユ、遡上中のアユ、成アユの食道 (図 27)、胃 (図 28)、腸 1 (図 29)、腸 2 (図 30)、腸 3 (図 31)、肝臓 (図 32) の重量と体重との関係 (両対数プロット) および両者の対数回帰式。

いずれも有意な対数回帰式が得られたが、バラツキが大きかった。この対数回帰式の勾配を相対成長係数と呼ぶ。相対成長係数が 1 より大であれば臓器の成長速度が体重の成長速度より大であることを示す。

第6章 消化管内容物の部位間比較

6-1 目的

各部位の内容物の pH と有機酸濃度を調べて、消化管各部の管腔内環境と細菌の代謝活性を比較することを目的とした。

6-2 方法

内容物の pH は電極(HORIBA 京都)を用いて計測した。

内容物中の各種有機酸を高速液体クロマトグラフィーによるイオン排除クロマトグラフィーで分画し、ポストカラム電気伝導度検出法により後述の分析条件で定量した。定量法には内部標準法を使い、既知の標準試料を使った 3 点検量線法で補正係数を求めた (Hoshi *et al.* 1994)。

消化管各部の内容物を 4 °C, 18500×g で 5 分間遠心分離し上清 50 μL と 10 mmol/L クロトン酸溶液(内部標準)50 μL を 1.5 mL 容マイクロテストチューブに入れ、ボルテックスミキサーで攪拌した。この溶液にクロロホルム 100 μL を加えて、ボルテックスミキサーで攪拌した。これを 4 °C, 18500×g で 5 分間遠心分離した上清 100 μL をメンブレンフィルター(ADVANTECH, 0.45 μm)でろ過したものを分析にもちいた。

分析条件

機器：高速液体クロマトグラフィー有機酸分析システム（島津製作所）

検出法：ポストカラム電気伝導度検出法

カラム：Shim-pack SCR-102H+同用ガードカラム

移動相：5 mM p-トルエンスルホン酸

緩衝液：5 mM p-トルエンスルホン酸+100 μ M EDTA+20 mM Bis-Tris

流速：移動相、緩衝液ともに 0.8 mL/min

注入試料量：10 μ L

カラム温度：45 $^{\circ}$ C

セル温度：45 $^{\circ}$ C

計算法：内部標準法（内標 クロトン酸）

リテンション時間：32 分

標準試料：マレイン酸、クエン酸、DL-リンゴ酸、コハク酸、L(+)-乳酸、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸、n-酪酸、イソ吉草酸、n-吉草酸

6-3 結果と考察

胃の pH は 4 付近で他の部位では 7 に近い値を示した (図 33)。胃の pH はほ乳類の胃(Siga *et al.* 1987) と比べると高く、胃の中でも微生物代謝は可能であると考えられた。一方、腸の pH は 7 付近で部位差はなかった。つまり、ほ乳類の十二指腸や空腸ほど高い pH(Siga *et al.* 1987)は観察されなかった。

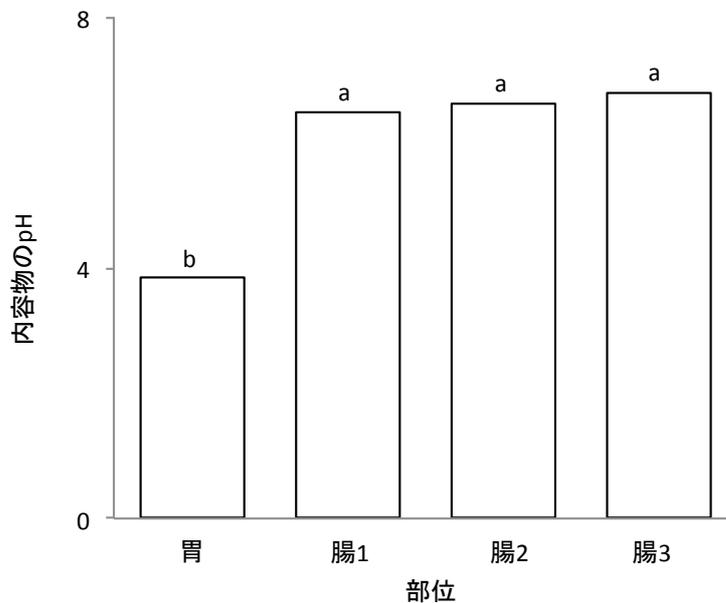


図 33 アユ消化管各部位の内容物の pH (平均値, $n=4$, Pooled SD=0.3, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。)

胃内容物の pH は 4 付近で、腸の各部位の内容物の pH は 7 に近い値を示した ($p < 0.0001$)。

アユが生息している場所で採取した藻類の有機酸を同様に分析したが、有機酸は検出されなかった（データ省略）。消化管内容物には有機酸が検出され、大部分が乳酸であった（図 34）。このことから、細菌が糖質を分解して乳酸に変換していることがわかった。ただし、乳酸の吸収速度は短鎖脂肪酸にくらべて極端に遅いため（Umesaki and Yajima 1979）、アユは乳酸を吸収できないと考えられる。このため、乳酸はアユのエネルギー源にはならないと考えられる。また、有機酸の濃度は胃から腸 3 までで大差がなかった（図 34）。したがって、細菌代謝の様子は胃から腸 3 まで大差ないが、酢酸が腸 3 でつくられたことが特徴的であった。滞留時間が腸 1 と腸 2 にくらべて腸 3 のほうが長いため、乳酸が細菌により代謝され酢酸に変換されたことで腸 3 でのみ酢酸が検出されたと考えられる。酢酸はアユにとって吸収可能な酸（Buddington and Diamond 1986）で、吸収されれば酢酸 1 g あたりの代謝エネルギーは 3.4 kcal になる（Livesey and Elia 1995）。

一方、細菌によるタンパク分解の指標であるイソ酪酸やイソ吉草酸のような分岐脂肪酸（Livesey and Elia 1995）がなかったことから、細菌によるタンパク分解はおこっていないと考えた。

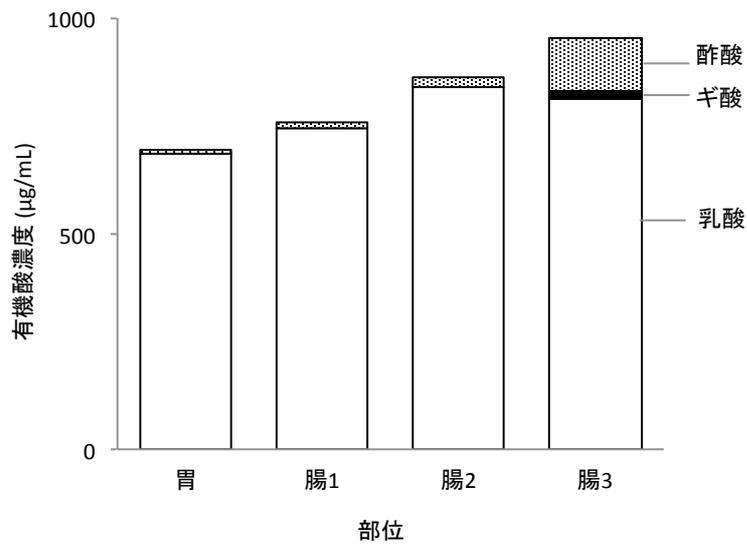


図 34 アユ消化管各部位の内容物の有機酸濃度

藻類に有機酸は検出されなかった。消化管内容物には有機酸が検出され、大部分が乳酸であった。腸3では酢酸も検出された。タンパク分解の指標であるイソ酪酸やイソ吉草酸のような分岐脂肪酸は検出されなかった。有機酸の総濃度は胃から腸3までで大差がなかった。

第7章 藻類および消化管内の細菌

7-1 目的

アユが食べている6月の小国川の藻類および消化管各部の内容物中の細菌構成を概観する目的で、これらの試料について培養出来ない細菌も検出可能な方法である次世代シーケンサをもちいたメタゲノム解析を行った (Petrosino *et al.* 2009)。

7-2 方法

6月に採取した藻類および消化管各部の内容物から(繰り返し1)からのDNAを抽出(KURABO QuickGene DNA tissue kit 使用)した後、16S rRNA 遺伝子を Polymerase chain reaction (PCR)で増幅した(Takara Extaq, プライマー: 357F-926R)。増幅後、アガロースゲルから対象の PCR 産物のバンドを回収して精製した。これらについて、北海道システムサイエンス社(札幌)にメタゲノム解析(454 FLX: Roche)を依頼した。解析データを QIIME で解析した。

7-2 結果と考察

6月の藻類では細菌の18目、胃では9目、腸1では9目、腸2では9目、腸3では19目を検出した(図35)。

6月の藻類では Burkholderiales 目と Cyanobacteria 門が優占であった。胃では Pseudanabaenale 目と Rhodospirillales 目が優占であった。腸1から腸3では圧倒的に Rhizobiales 目が優占であった。藻類と胃では細菌構成に若干の共通性があった。また、Rhizobiales 目は藻類、胃、腸1から腸3のすべてで検出した。

藻類と胃の細菌構成がだいぶ異なるように見えた。この細菌構成の違いは滞留時間と基質の供給の違いによると考えられる。

また、藻類に存在する Rhizobiales 目が消化管全体に存在したことから、腸内の細菌も藻類に由来する可能性がある。胃と腸では細菌構成が異なり、腸の 3 部位の間では類似しているので、胃と腸とでは管腔内環境が違うが、腸 1、2、3 の間の管腔内環境は大差ないと考えた。

腸の優占目である Rhizobiales 目は、コハク酸、酢酸、ギ酸、乳酸を生産する事がわかっている (Gokarn *et al.* 2001)。これは内容物中の有機酸組成 (図 34) と一致するので、優占細菌である Rhizobiales 目が腸内での有機酸生産のかなりの部分を担っている可能性がある。

ここまでの消化管各部の構造や管腔内環境の部位間比較をまとめて考えると、胃と腸では構造も管腔内環境も違うが、腸 1 から腸 3 の間ではあまり違いがないと考えられる。

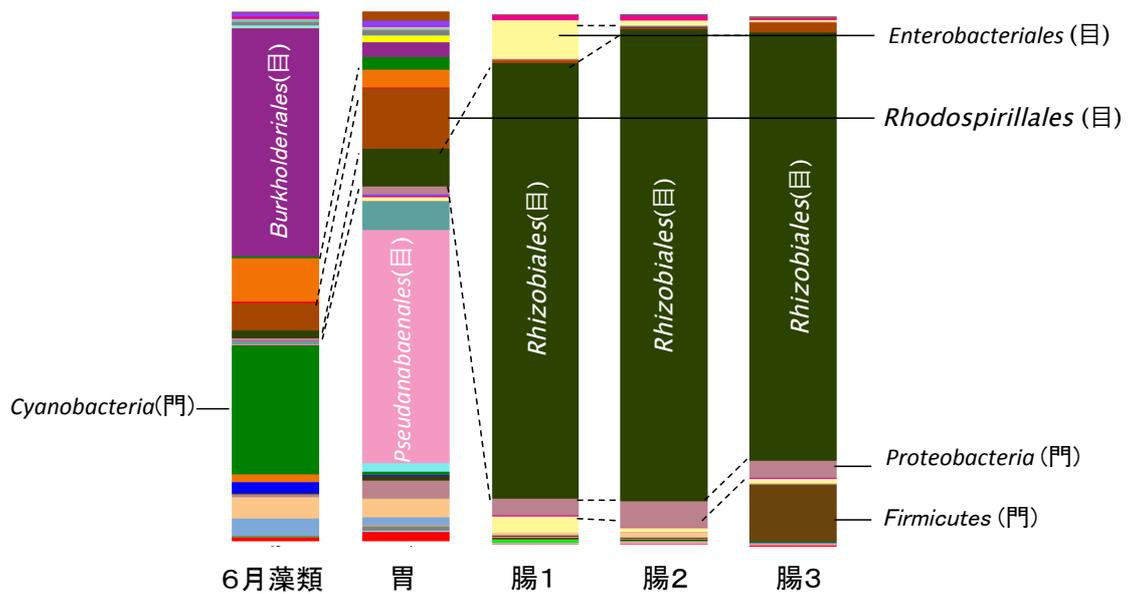


図 35 藻類に付着した細菌および消化管各部の内容物の細菌分類群割合

藻類および消化管各部の内容物中の細菌構成を次世代シーケンサをもちいたメタゲノム解析で調べた。優占分類群のみを凡例に示した。藻類では Burkholderiales と Cyanobacteria が優占した。胃では Pseudanabaenale と Rhodospirillales が優占した。腸 1 から腸 3 では Rhizobiales が圧倒的に優占した。藻類と胃では細菌の分類群に若干の共通性があった。腸の 3 部位の細菌構成は類似していた。また、Rhizobiales が藻類、胃、腸 1 から腸 3 のすべてで検出した。

第 8 章 内容物の成分

8-1 目的

消化管各部位の内容物の成分分析を行って、タンパク、炭水化物、脂質の消化・吸収率を求めることを目的とした。

8-2 方法 (図 36)

8-2-1 消化管各部の内容物の湿重量および乾燥重量

毎回 5 尾の小国川産供試天然成アユ (体重 47.2 ± 11.9 g, $n=15$) の胃、腸 1、腸 2、腸 3 の消化管内容物をそれぞれ 1.5 mL 容フタ付きプラスチックチューブにプールしてから薬匙でよく攪拌した。薬包紙を 110 °C で 1 時間乾熱乾燥し、デシケータ内で 30 分間放冷後に秤量し、前後の重量差が 0.1 % 以下となるまで繰り返し秤量して薬包紙の恒量を求めた。恒量を求めた薬包紙に攪拌した消化管内容物をそれぞれのせて秤量し、湿重量を求めた (大西 1969)。湿重量を測定した内容物を 110 °C で 1 時間乾熱し、デシケータ内で 30 分間放冷後秤量した。上記と同様に加熱、放冷、秤量を繰り返して恒量を求め、これから薬包紙の恒量を引いて、内容物の乾燥重量を求めた。内容物の湿重量と乾燥重量とから水分率と乾物含量とを以下のように求めた (大西 1969)。こうした測定を別々の日に 3 回繰り返した。

$$\text{水分率 (\%)} = \{(\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿重量}\} \times 100$$

$$\text{乾物含量 (\%)} = 100 - \text{水分率}$$

8-2-2 消化管各部の内容物中の灰分の定量

5 mL 容磁製るつぼを酸洗いして乾燥させたあと、電気マッフル炉（Yamato FM36 東京）内で 600 °C、4 時間灼熱処理した。デシケータ内で放冷後、るつぼを秤量した。これを恒量に達するまで繰り返して恒量を求めた。恒量を求めたるつぼに、消化管各部の内容物をいれて湿重量を測定した。さらに 110 °C で 1 時間乾燥後、デシケータ内で 30 分間放冷したのち秤量した。乾燥、放冷、秤量を繰り返してるつぼ + 乾燥内容物の恒量を求め、これからるつぼの恒量を引いて、内容物の乾燥重量を求めた。さらに、乾燥内容物をいれたるつぼを電気マッフル炉（Yamato FM36）で 600 °C、2 時間灼熱処理して、内容物を乾式灰化した。灼熱処理後にデシケータ内で放冷して秤量する操作を繰り返して（るつぼ + 灰分の恒量）を求め、これからるつぼの恒量を引いて、灰分重量を求めた（大西 1969）。

8-2-3 消化管各部の内容物中の酸不溶性灰分の定量

恒量を求めておいた 1.5 mL 容蓋付きプラスチックチューブ（Eppendorf 東京）に上述の灰分をいれて秤量した。ここに 6 mol/L 塩酸を 1 mL 加えてよく攪拌した。100 °C で 1 時間加熱してから 10000×g で 5 分間遠心分離したあと上清を捨て、脱イオン水 1 mL を加えて攪拌した。さらに、10000×g で 5 分間遠心分離したあと上清を捨てた。これを 110 °C で 1 時間乾燥後、デシケータ内で 30 分間放冷したのち秤量した。こうした乾燥、放冷、秤量を繰り返して（1.5 mL 容プラスチックチューブ + 酸不溶性灰分）の恒量を求めた。これから 1.5 mL 容プラスチックチューブの恒量を引いて、酸不溶性灰分の重量を求めた（Van and

Young 1977)。

8-2-4 消化管各部位の有機物重量

乾物重量（乾燥重量）から灰分重量を差し引いて有機物重量を求めた。

8-2-5 消化管各部の内容物中の粗タンパク

粗タンパクをケルダール法で定量した（大西 1969）。

まず、粗脂肪抽出後の沈殿をケルダール用試験管に全て移した。これに濃硫酸 15 mL を加えて、450 °C で 2 時間分解した。そこに 4 mol/L 水酸化ナトリウムを 100 mL 加えて中和した。この溶液中のアンモニアを水蒸気蒸留にてホウ酸水に捕捉した。ホウ酸水中のアンモニアを 10 mol/L 硫酸で中和滴定した。こうして求めたアンモニア濃度から全窒素量を求めた。すなわち、全窒素量にタンパク換算係数 6.25 を乗じて粗タンパク量とした。ただし、この中には核酸などの非タンパク態窒素も含まれている。藻類の核酸含量は乾物量の 1-4 % ほどなので（Becker 1994）、その分タンパク量を多めに見積もっている可能性があるが、この研究ではこのようにもとめた粗タンパクをタンパクとした。

8-2-6 消化管各部の内容物中の粗脂肪の定量

クロロホルム・メタノール抽出法で粗脂肪を定量した(高木, 青山 1984)。

1.5 mL 容フタ付きプラスチックチューブを 110 °C で 1 時間乾燥後デシケータ内で 30 分間放冷して秤量する操作を繰り返して恒量を求めた。この 1.5 mL 容プラスチックチューブに消化管各部の内容物を約 100 mg 入れて、同様に乾燥、放熱、秤量を繰り返して恒量をもとめた。これにクロロホルム:メタノール (1:2, v:v) を 1 mL 添加して攪拌した。1000×g で 5 分間遠心分離した上清を、恒量を求めておいた直径 60 mm のプラスチックシャーレ(IWAKI 東京)に移した。こうしたクロロホルム・メタノールによる抽出を 4 回繰り返した。抽出物を含む上清を移したシャーレを減圧デシケータ内で乾燥させた。乾燥させた(抽出物+シャーレの重量)から、シャーレの重量を差し引いて、粗脂肪の重量を求めた。この研究では、このようにもとめた粗脂肪量を脂質量とした。

8-2-7 可溶性無窒素物の測定

有機物重量(8章2節4項)から粗タンパク重量(8章2節5項)と粗脂質重量(8章2節6項)を差し引いて、可溶性無窒素物量を求めた(大西 1969)。これは主に炭水化物であると考えられ、本研究では可溶性無窒素物量を炭水化物量とした(8章2節4項、5項、6項)。

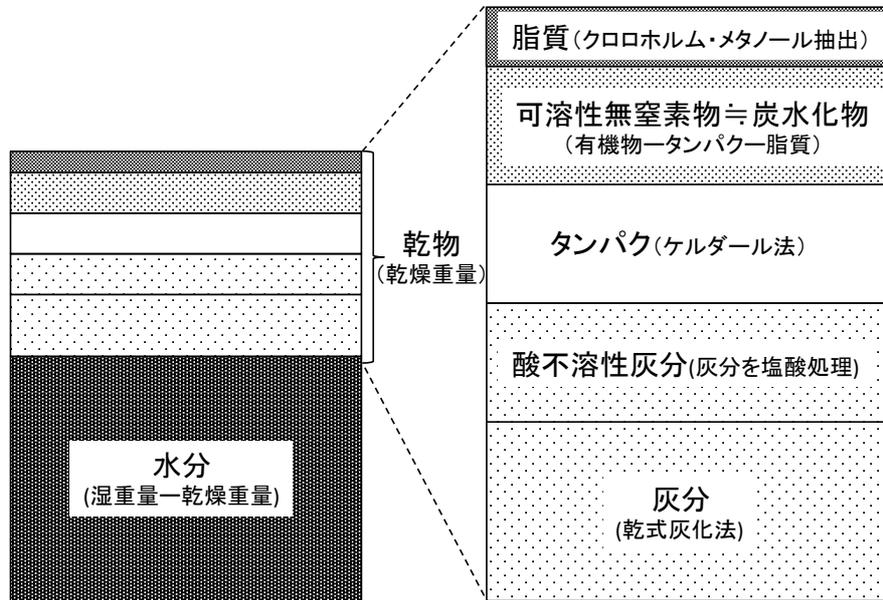


図 36 藻類および消化管内容物の成分分析法の概要

内容物の湿重量から乾燥重量を引いて水分量を求めた。乾燥後の試料の 600 °C、4 時間灼熱処理前後の重量差として灰分量を求めた。灰分を塩酸処理したあと乾燥重量から酸不溶性灰分をもとめた。乾燥重量と灰分重量の差として有機物重量をもとめた。粗タンパクをケルダール法で、粗脂肪をクロロホルム・メタノール抽出法で求めた。有機物重量から粗タンパク重量と粗脂質重量を差し引いて主に炭水化物と考えられる可溶性無窒素物量を求めた。

8-3 結果と考察

水分含量は藻類では 90%、消化管内容物では 75%であった (図 37)。藻類および内容物ともに乾物の過半が灰分であった。腸の各部位の有機物の内容には藻類や胃内容物にくらべて脂質が多かった (図 37)。これから、胆汁酸などに含まれる脂質が腸へ流入している可能性が考えられた。

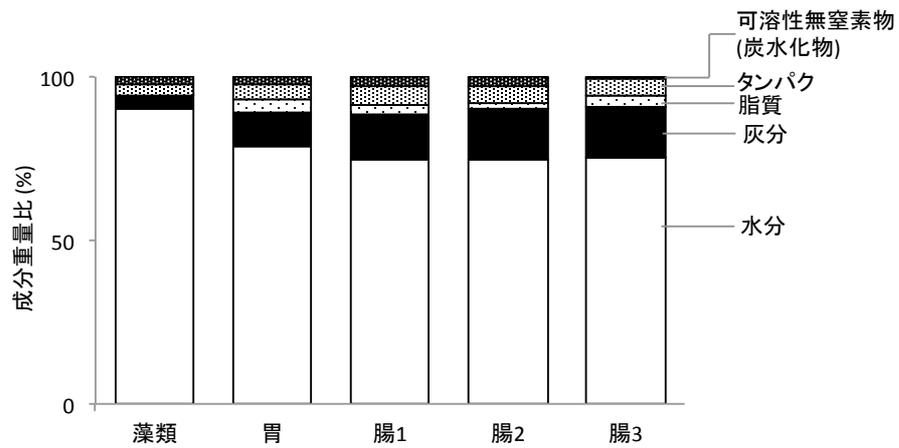


図 37 藻類および天然成アユ消化管各部位内容物の成分重量比（平均値、 $n=3$ ）

水分含量は藻類では90%、消化管内容物では75%であった。藻類では乾物の約40%、内容物では乾物の過半が灰分であった。藻類と腸の各部位の有機物の内容には違いがあった。

第9章 栄養素の消化率の推定

9-1 目的

アユの栄養素ごとのエネルギー貢献を考察するために、各栄養素の消化管内での消化率を推定することを目的とした。

9-2 方法

1日あたりで、摂取したエサの量と成分、排出した糞の量と成分から栄養素ごとの見かけの消化率を求めるのが直接的な方法であるが、天然魚では摂餌量の測定や糞の回収がむずかしいので、本研究では非吸収性標識をつかう方法 (Van and Young 1977, Titgemeyer 1997) を採用した。この方法では、消化管内で消化・吸収されず、対象動物の消化・吸収能力にも影響を与えない標識物質物質あたりの栄養素量を餌や消化管内容物、糞について測定し、餌から糞にかけての標識あたり栄養素量の減少から栄養素の消化率を求める。この方法で、摂餌量が不明でも栄養素ごとの消化率を求めることが可能で、消化管内容物の測定ができれば、内因性の栄養素の分泌量を見積もることができる可能性もある。

本研究では、魚類をはじめとする各種脊椎動物の消化率測定に広く標識として用いられている酸不溶性灰分 (Acid-insoluble ash, AIA) を非吸収性標識として用いる方法 (Block *et al.* 1981, Atkinson *et al.* 1984, Goddard and Mclean 2001) によって、アユ消化管各部位での栄養素消化率を計測する事にした。

すなわち、餌である藻類や消化管各部の内容物中の栄養素濃度とAIA濃度を測定し、これらからAIA重量あたりの栄養素重量をもとめ、藻類と消化管各部位間、

あるいは消化管各部位同士の間でのAIA重量あたりの栄養素重量の差から栄養素の消化率を求めた。得られた測定値の平均値を分散分析とTukeyのHSD検定で解析して p 値（危険率） < 0.05 で有意と判定した。

なお、ここでいう消化とは、アユ自身の酵素あるいは消化管内細菌の酵素によって栄養素が消化され、その結果栄養素の量が減少する事をいう。自家酵素消化の場合には、減少した栄養素のほぼすべてがアユに吸収されて利用される。炭水化物を細菌が消化する場合には、減少した分の一部は細菌のエネルギー基質などとして用いられたり、アユが吸収できない乳酸に変換されたりするので、消化された炭水化物のすべてがアユに吸収されるわけではない。

9-3 結果と考察

標識あたりの栄養素量から求めた栄養素の消化率

標識にもとづいて計算した藻類と消化管各部位間、あるいは消化管部位同士の標識あたりの栄養素量をみると、タンパクは川底の石に付着した藻類に比べて胃で有意な減少がみられ、藻類から腸3にかけて69%消化していた（図38）。炭水化物は藻類と胃の間に有意な減少がみられ藻類から腸3の間で88%消化した

（図39）。脂質は腸1から腸3の間で78%消化していた（図40）。一方で、脂質が胃から腸1にかけて大量に分泌されているようにみえた（図40）。これは胆汁の分泌によるものと考えているが詳細は不明である。なお、小国川の成アユの胆のうち胆汁の脂質量を測定したところ、乾物の半分以上が脂質であった。これから推算すると胆汁が毎日1.5 mL管腔にながれこんでいることになるが、実際に胆汁の流入だけで上記の脂質の流入を説明できるかどうか不明である。

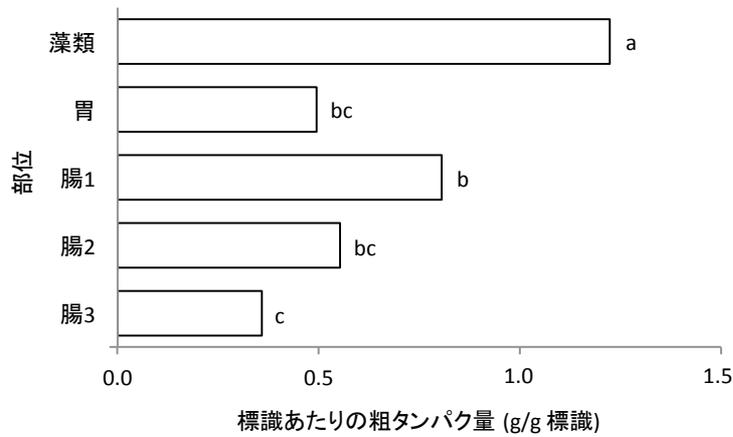


図 38 藻類と天然成アユ消化管各部位の標識あたりのタンパク量（平均値, $n=3$, Pooled SD=0.1, a, b, c: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。）

標識（酸不溶性灰分）あたりのタンパク（粗タンパク）量を計算した。標識あたりの粗タンパク量は、藻類から腸3にかけて69%減少した($p<0.001$)。

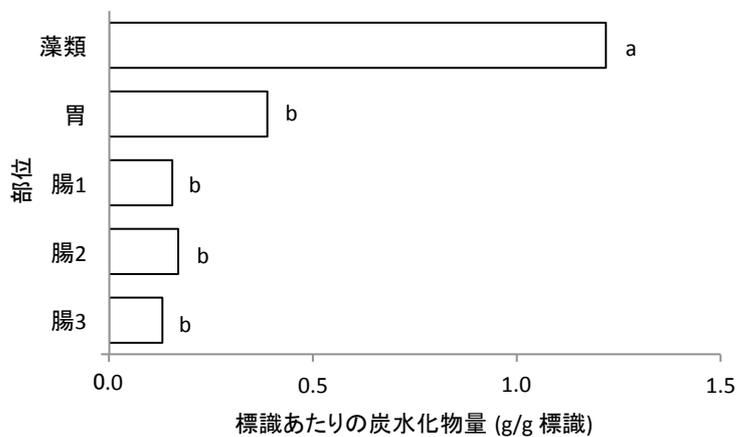


図 39 藻類と天然成アユ消化管各部位の標識あたりの炭水化物量（平均値, $n=3$, Pooled SD=0.2, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。）

標識（酸不溶性灰分）あたりの炭水化物（可溶性無窒素物）量を計算した。標識あたりの炭水化物量は藻類から腸3にかけて88%減少した($p<0.001$)。

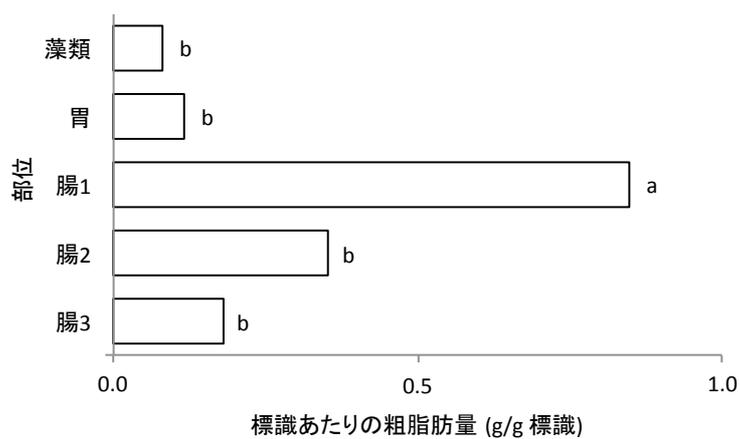


図 40 藻類と天然成アユ消化管各部位の標識あたりの脂質量 (平均値, $n=3$, Pooled SD=0.2, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。)

標識 (酸不溶性灰分) あたりの脂質 (粗脂肪) 量を計算した。脂質が胃から腸 1 にかけて大量に分泌されているようにみえた。これは胆汁の分泌によるものとする。標識あたりの脂質量は腸 1 から腸 3 にかけて 78%減少した ($p<0.01$)。

第 10 章 アユ消化管からの栄養素エネルギーの吸収量

ここからは、第 9 章で求めた栄養素ごとの消化率と、既報のアユ摂餌量とから、アユ消化管の内容物から各栄養素のエネルギーがどのくらい吸収されるかを考察する。

10-1 乾物摂取量の推測

文献によると、アユは体重の 0.8 (茂木 1985) から 1.2 倍 (田中 1980) の湿重量の藻類を毎日食べる。今回求めた藻類の乾物含量(10 g/100 g) (図 37) から以下の式によって計算すると、今回の実験に用いた体重 50 g のアユは乾物として毎日 4~6 g 藻類を食べることになる。

$$50 \text{ g} \times (0.8 \sim 1.2) \times 0.10 = 4 \sim 6 \text{ g 乾物/日}$$

10-2 栄養素からのエネルギー消化量

藻類や消化管内容物に含まれる栄養素の含量 (図 37)、エネルギー価 (炭水化物 4、タンパク 4、脂質 9 (kcal/g))、消化率 (第 9 章) から栄養素ごとの消化エネルギー量を下式によって計算した。

$$\begin{aligned} & \text{消化管内で消化するエサ乾物のエネルギー (kcal/日)} \\ & = \text{エサ乾物重量 (g)} \times \{ (\text{炭水化物含有率} \times \text{エネルギー価} \times \text{消化率}) + (\text{タンパク含有率} \times \text{エネルギー価} \times \text{消化率}) + (\text{脂質含有率} \times \text{エネルギー価} \times \text{消化率}) \} \end{aligned}$$

この式を1日乾物4gあるいは6g摂取する場合にあてはめた結果、以下のよ
うに消化管内で1日7.8~11.8 kcal消化していると考えられた。

乾物を4g/日摂取した場合

$$\begin{aligned} & \text{消化管内で消化するエサ乾物のエネルギー (kcal/日)} \\ & =4(\text{g}) \times \{(0.23 \times 4 \times 0.88) + (0.34 \times 4 \times 0.69) + (0.03 \times 9 \times 0.78)\} \\ & =7.8 (\text{kcal/日}) \end{aligned}$$

乾物を6g/日摂取した場合

$$\begin{aligned} & \text{消化管内で消化するエサ乾物のエネルギー (kcal/日)} \\ & =6(\text{g}) \times \{(0.23 \times 4 \times 0.88) + (0.34 \times 4 \times 0.69) + (0.03 \times 9 \times 0.78)\} \\ & =11.8 (\text{kcal/日}) \end{aligned}$$

10-3 腸内細菌による炭水化物の分解の見積もり

タンパクと脂質は細菌が分解しない(第6章)ことがわかっているので、タン
パクと脂質の消化量はアユへの吸収量と等しいと考えた。ただし、炭水化物に
関しては腸内細菌による分解が考えられるので、腸内細菌による炭水化物分解
を見積もった。

10-3-1 アユ消化管内細菌のバッチ培養

まず、消化管内容物のバッチ培養によって消化管内細菌による炭水化物からの有機酸生産速度の評価を試みた。バッチ培養とは密閉された系でおこなう培養である。反応基質などが系外から入ってくることもなければ反応産物が系外へ出て行くこともない。この点では反応基質が上流から供給され、反応産物（消化によって生じる単糖やアミノ酸等）が吸収されて消化管内から体内へと出てゆく消化管内の状況とは違っている。

一方で、消化管内細菌が生産する有機酸のうちで、酢酸などの短鎖脂肪酸は、ほとんどが宿主に吸収される (Livesey and Elia 1995)。したがって、内容物中の短鎖脂肪酸濃度から単純にこれらの生産速度を計算することはできない。これを克服するためにバッチ培養による評価を試みたのである。

バッチ培養の欠点としては、培養の進行に伴って基質が消費され、代謝産物が蓄積されることがある。したがって、あまり長時間の培養実験は意味が無い。また、攪拌が出来ない規模での培養では、腸内細菌の有機酸生産反応が生体位よりも遅いことが考えられ、有機酸生産を過小評価する可能性がある。

修士課程では、バッチ培養を用いて、天然アユと天然ヤマメの腸内細菌は養殖アユよりも有機酸を多く生産することを明らかにした。ただし主産物は乳酸などの、アユが吸収出来ない酸 (Buddington and Diamond 1986) であった。また、養殖アユでは腸内で有機酸がつかられないが (小松 2009)、市販可能なサイズにまで育つ。したがって、有機酸の生産がアユのエネルギー収支に貢献していない可能性も考えられた。

そこで、小国川産の天然アユの消化管各部の内容物を用いてバッチ培養を行

い、有機酸の生産速度の測定を試みた。まず、血管進入部を指標として分けた（第3章）小国川産の天然アユ10尾分の胃、腸部位1~3の内容物を採取して、氷冷し、1時間以内にリン酸緩衝液(PBS)と1:3(v:v)の割合で混合し、その各100 μ LをPCRチューブに入れて二酸化炭素を充満させ、密栓して、24 $^{\circ}$ Cにて2, 4, 6時間静置培養した。その後、第6章と同様に培養物の有機酸濃度をHPLCで測定した。培養後から培養前の有機酸濃度を差し引き、有機酸生産速度を求めた。

その結果、腸のほとんどの部位の内容物では乳酸の正味の消費が観察された(図41)。これは、上述の内容物中での乳酸の蓄積(図34)と矛盾する。また、腸3の内容物でのみ酢酸の正味の生産が観察されたが、バッチ培養での生産速度で腸3での酢酸濃度を説明するためには平均滞留時間が20時間以上なければ説明できない。バッチ培養の結果と有機酸の管腔内濃度が一致しない理由はいまのところ不明である。

これらのことから、本研究でのバッチ培養の結果によって腸内細菌による炭水化物の消費や、腸内細菌の代謝産物のエネルギー貢献を考察することは不適當であると判断した。そこで、消化管内容物中の有機酸濃度から腸内細菌による炭水化物の消費や、腸内細菌の代謝産物のエネルギー貢献を考察することにした。

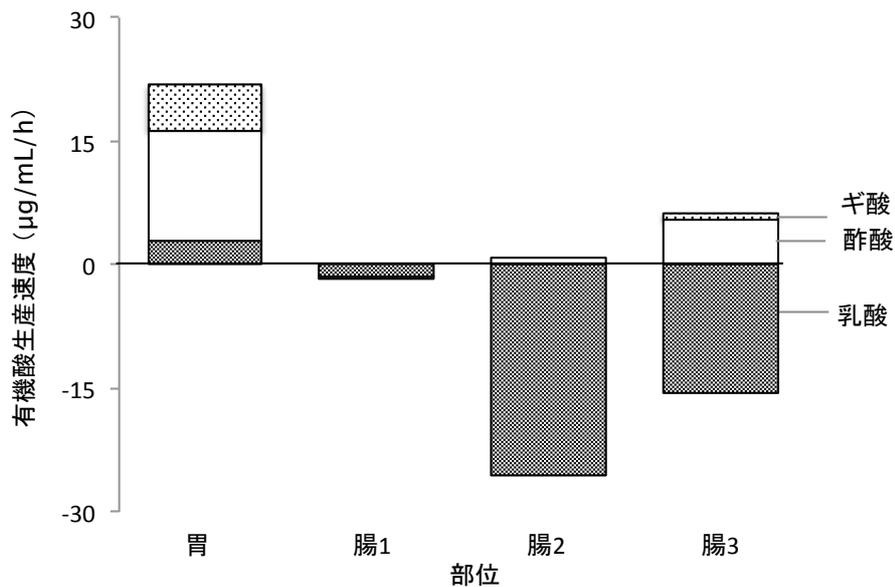


図 41 アユ消化管各部位の内容物のバッチ培養による培養 4 時間から 6 時間までの間の有機酸正味生産速度

胃の内容物ではギ酸、酢酸、乳酸の生産が観察された。腸の各部位の内容物で乳酸の消費が観察された。また、腸 3 の内容物では酢酸の正味の生産が観察された。

10-3-2 内容物中の有機酸濃度に基づく腸内細菌による炭水化物の消費や、腸内細菌の代謝産物のエネルギー貢献の見積もり

アユの消化管内で消化した炭水化物のゆくえを考えると、アユ自身の酵素による分解（自家酵素分解あるいは自家酵素消化）をうけるものと消化管内に存在する細菌を中心とする微生物の酵素による分解をうけるものがある（図 42）。自家酵素消化によってデンプンなどの炭水化物がグルコースなどの単糖になってアユに吸収される場合には、もとの炭水化物 1 g あたり 4 kcal のエネルギーをアユに供給する。炭水化物が細菌による分解を受けて有機酸になった場合には、炭水化物から有機酸への収率が約 6 割なので (Livesey and Elia, 1995)、1

g の炭水化物から 0.6 g の有機酸ができることになる。このようにしてできる有機酸の一種である酢酸がアユの体内に吸収されると、酢酸 1 g あたり 3.4 kcal のエネルギーをアユに供給する (Livesey and Elia 1995)。したがって、もとの炭水化物 1 g あたり $3.4 \times 0.6 = 2.0$ kcal をアユに供給することになる。しかし、消化管内容物中の有機酸の大部分を占めていた乳酸 (第 6 章、図 34) はアユに吸収されない (Umesaki and Yajima 1979)、消化管内細菌が炭水化物を分解して乳酸を生産した場合のアユへのエネルギー供給は 0 kcal である。これらをふまえたうえで、腸内細菌による炭水化物分解とそれにともなうアユへのエネルギー貢献を見積もった。

まず、腸 3 に存在した有機酸の濃度と文献値から体重 50 g のアユで炭水化物が腸内細菌にどれだけ消費されるかを見積もった。

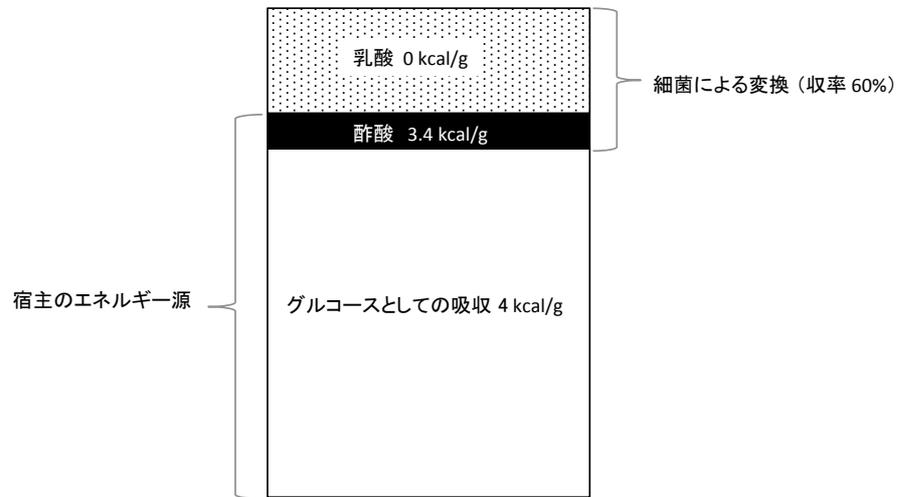


図 42 自家酵素消化と微生物消化によって炭水化物から宿主が得るエネルギー（概念図）

炭水化物が自家酵素消化により単糖になってアユに吸収された場合には、炭水化物 1 g あたり 4 kcal のエネルギーをアユに供給することになる。細菌による炭水化物から有機酸への変換収率は 6 割である。酢酸が吸収されると酢酸 1 g あたり 3.4 kcal のエネルギーをアユに供給する。乳酸は吸収されないのでアユへのエネルギー供給は 0 kcal である。

腸3に存在した乳酸濃度から乳酸に変換された炭水化物量を見積もると、腸3に存在した乳酸濃度は810 μg/g (図34)であったから、乳酸の日生産量は、

乳酸生産量/日=摂餌量(湿重量)/日×810(μg/g)となり、

摂餌量40 wet g/日の場合には

$$\text{乳酸生産量}=40 \times 810 (\mu\text{g/g})=32.4 \text{ mg/日}$$

摂餌量60 wet g/日の場合には

$$\text{乳酸生産量}=60 \times 810 (\mu\text{g/g})=48.6 \text{ mg/日}$$

となる。

炭水化物から乳酸への変換効率は60%なので、

乳酸に変換された炭水化物量 = 乳酸生産量/0.6 となり、

摂餌量40 wet g/日の場合には

$$32.4/0.6=54 \text{ mg/日}$$

摂餌量60 wet g/日の場合には

$$48.6/0.6=81 \text{ mg/日}$$

となる。

酢酸に変換された炭水化物量を見積もると、腸3の内容物中の酢酸濃度は123 μg/g (図34)であったから、

酢酸生産量/日=摂餌量(湿重量)/日×123 μg にあてはめると、

摂餌量40 wet g/日の場合には

$$\text{酢酸生産量}=40 \times 123 (\mu\text{g/g})=4.9 \text{ mg/日}$$

摂餌量 60 wet g/日の場合には

$$\text{酢酸生産量} = 60 \times 123 \text{ (}\mu\text{g/g)} = 7.4 \text{ mg/日}$$

となる。

炭水化物から酢酸への変換効率は60%なので、

$$\text{酢酸に変換された炭水化物量} = \text{酢酸生産量}/0.6 \text{ となり、}$$

摂餌量 40 wet g/日の場合には

$$4.9/0.6 = 8.2 \text{ mg/日}$$

摂餌量 60 wet g/日の場合には

$$7.4/0.6 = 12.3 \text{ mg/日}$$

となる。

このようにして、1日に生産される乳酸の量は32.4～48.6 mg、乳酸に変換された炭水化物量は54～81 mg/日と推測された。つまり、毎日54～81 mgの炭水化物が細菌に消費されて、乳酸へと変換され、そのまま肛門から排出されて、アユのエネルギー源にはならないことになる。酢酸についても同様に計算すると、1日に生産される酢酸の量が4.9～7.4 mg、酢酸に変換された炭水化物量は8.2～12.3 mgと考えられた。

乳酸はアユが吸収しないので、上述の推測でそれほどの誤りは無いと考えるが、酢酸については吸収による管腔内容物中濃度の減少を評価していないので、酢酸に変換された炭水化物量を過小評価している可能性がある。

このようにして求めた乳酸と酢酸へ変換された炭水化物を炭水化物の全消化量(図 39)から差し引いて計算すると、アユが自家酵素消化により消化して吸収

する炭水化物の量は 0.60～0.91 g/日であると考えられる。

10-3-3 腸内細菌が生産した有機酸のエネルギー貢献

上述のように腸内細菌によって生産され、アユに吸収された酢酸のエネルギーは、生産された酢酸の全量が吸収されたとすると、酢酸のエネルギー価(3.4 kcal/g)から 0.017～0.025 kcal となる。これと、前述の自家酵素消化により炭水化物を消化し、単糖として消化・吸収する分とを合計すると、消化管内で消化した炭水化物からアユが吸収したエネルギーは 3.0～4.5 kcal/日と考えられる。この吸収エネルギーのうち、酢酸としての吸収エネルギーの割合は 0.6%となる。また、全消化炭水化物エネルギーの約 3.3%が細菌の発酵熱などの発酵エネルギーとして消費され、約 4.3%が乳酸に変換されたことになる。すなわち、消化された炭水化物エネルギーの $3.3 + 4.3 - 0.6 = 7.0\%$ が細菌消化によって失われたことになる。

このように見ると、アユの腸内細菌による炭水化物消化はアユのエネルギー収支に貢献していないといえる。

様々な魚でエサの炭水化物消化率が測定されてきたが(表 1)、微生物代謝による炭水化物分解を考慮にいれた研究は知る限りない。本研究で微生物代謝による炭水化物の消化分を考慮にいれた炭水化物消化率を求めたところ、天然成アユでは全消化炭水化物の約 7%が微生物による分解によるものであった。この7%のほとんどがアユのエネルギーにならない乳酸と発酵熱となった。しかし、これまでの魚の炭水化物利用に関する研究では(表 1)微生物消化が考慮されていなかったため、エサに含まれる炭水化物のエネルギー貢献割合が過大評価さ

れている可能性が考えられる。いっぽうで、養殖魚の炭水化物を基質にした微生物代謝は活発でなかったことから（小松 2009）、養殖魚では微生物代謝の影響は少ない可能性も考えられる。

10-4 体重 50 g の天然アユが吸収できるエネルギー

それぞれの栄養素について、含有率とエネルギー価、消化率を掛け合わせたものを合計し、これから微生物代謝による炭水化物エネルギーの損失を差し引いて、乾物として 4~6 g/日摂餌する体重 50 g のアユが 1 日に吸収できるエネルギーを下式によって計算した。

体重 50 g の天然アユが吸収できるエネルギー

$$=4\sim6 \times \{0.23 (\text{炭水化物含有率}) \times 4 (\text{kcal}) \times 0.81(\text{吸収率}) + 0.34 (\text{タンパク含有率}) \times 4 \times 0.69(\text{吸収率}) + 0.03 (\text{脂質含有率}) \times 9 \times 0.78(\text{吸収率})\}$$

その結果、50 g のアユが 4~6 g/日のエサ乾物を摂取して、これから吸収出来るエネルギーは 7.6~11.4 kcal/日と推算された(図 43)。すなわち、エネルギーベースで考えると、アユによる藻類有機物の消化・吸収率は約 75%ということになる。

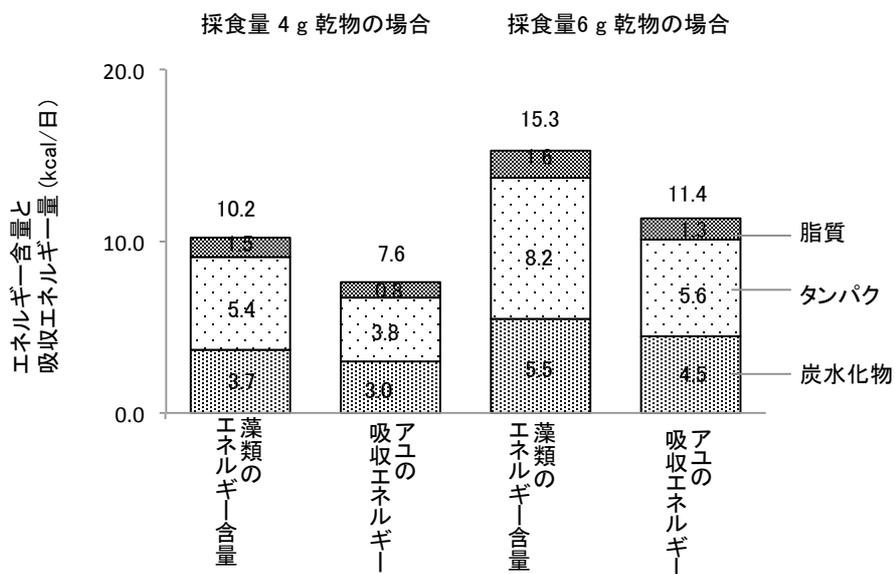


図 43 摂餌量 4 g 乾物/日あるいは 6 g 乾物/日の場合の藻類の栄養素ごとのエネルギー含量およびアユの栄養素ごとの吸収エネルギー量の推測値

アユの摂餌量の文献値の上限と下限をとって、50 g のアユが 4 ~6 g/日のエサ乾物を摂取すると仮定した。それぞれの栄養素について、含有率とエネルギー価、消化率を掛け合わせたものを合計し、これから微生物代謝による炭水化物エネルギーの損失を差し引いて、体重 50 g のアユが 1 日に吸収できるエネルギーを計算したところ、7.6~11.4 kcal/日となった。

10-5 藻類の組成とアユの吸収エネルギー

本研究で明らかにした藻類の成分 (図 37) から計算すると、藻類のエネルギー比はタンパク 53%、炭水化物 36%、脂質 11% となる (図 44)。一方で、アユが摂取したエネルギーはタンパクからが 49%、炭水化物 39%、脂質からが 11% ずつということがわかった (図 45)。藻類の脂質含量は少ないが、アユにとってはエネルギーの 1 割を占めることになり、無視できない重要なエネルギー源であることになる。

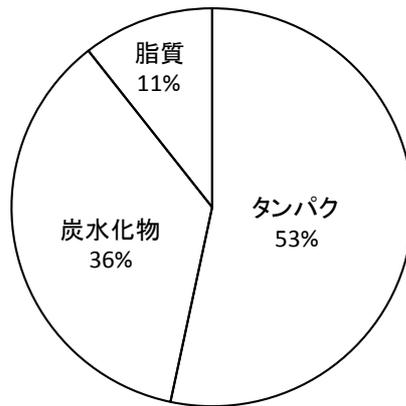


図 44 藻類の栄養素ごとのエネルギー含有割合

本研究で明らかにした藻類のタンパク、脂質、炭水化物の含有量と、それぞれのエネルギー価とを乗じて、藻類に含まれるそれぞれの栄養素のエネルギー比を計算した。その結果、タンパク 53%、炭水化物 36%、脂質 11 %となった。

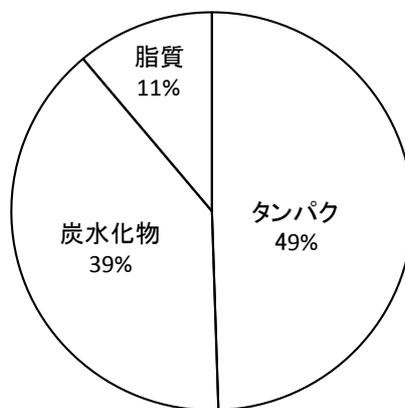


図 45 天然成アユの栄養素ごとの吸収エネルギー割合

アユの栄養素ごとの吸収エネルギー量（図 44）の比率を計算すると、アユが摂取したエネルギーはタンパク 49%、炭水化物 39%、脂質 11%となる。

10-6 アユと他の養殖魚との比較

ここまでで明らかになったアユの栄養素の消化・吸収能力を客観的に評価するために、他魚種の文献値との比較をおこなった(表)。まず、乾物消化率($(\text{エサ乾物}-\text{糞乾物})/\text{エサ乾物}\times 100(\%)$)では天然成アユが他の魚種にくらべて約 6割低かった。これは天然成アユが食べている藻類の乾物重量の約 4割を消化できない灰分が占めたのにたいして、養殖魚のエサの灰分含量は乾物重量の 10%程度(表 1)であることが大きな原因であると考えられる。

次に、乾物重量の灰分以外の成分、すなわち有機物をどれだけ消化できるかを、各養殖魚のエサの栄養素割合とそれらの消化率とから有機物消化率($(\text{エサ有機物}-\text{糞有機物})/\text{エサ有機物}\times 100(\%)$)を求めて比較した。その結果、他魚種が 80-91%であったのにくらべてアユの有機物消化率は 75%で、他魚種よりも低かった。

さらに、有機物に含まれるエネルギーのどれだけを消化できるかを天然成アユと他魚種の間で比べた。エネルギー消化率($(\text{エサ中エネルギー}-\text{糞中エネルギー})/\text{エサ中エネルギー}\times 100(\%)$)は養殖魚で 73%から 98%であった(表 1)。本研究で明らかになった天然成アユのエネルギー消化率は 78%であり、天然成アユのエネルギー消化率は養殖魚の一般的な範囲内にあるといえる。

これまで述べてきたことから、灰分が乾物重量の約 4割を占め、有機物含量が少ないが川底に大量に繁茂し、常に食べられる藻類を乾物あたりで一般的な養殖魚のエサの 1.5 倍ほどの量をたべて、天然成アユは短い腸でも成長に必要なエネルギーを消化・吸収する能力があることが明らかになった。

表1 アユと各養殖魚の消化率の比較

種	食性	天然/養殖	環境	体重 (g)	腸/体長	エサの組成 (g/100g 乾物)			消化率 (%)			文献				
						タンパク	脂質	灰分	タンパク	脂質	炭水化物					
アユ <i>Plecoglossus altivelis</i>	植物	天然	淡水	50	0.7	32	7	22	40	45	70	80	88	78	本研究	
アトランティックサーモン <i>Salmo salar</i>	動物	養殖	海水	128	0.4	46	32	15	8	80	74	85	92	86	Mundhim <i>et al.</i> , 2004	
アトランティックサーモン <i>Salmo salar</i>	動物	養殖	海水	107	0.4	43	25	22	10	66	85	85	82	73	Refste <i>et al.</i> , 1998, Peruzzi <i>et al.</i> , 2014	
ニジマス <i>Oncorhynchus mykiss</i>	動物	養殖	海水	100	1	76	13	0	12					90	Aksnes and Opstvedt 1998	
ニジマス <i>Oncorhynchus mykiss</i>	動物	養殖	淡水	100	1	76	13	0	12	87	77	86	96	97	Aksnes and Opstvedt 1998	
タラ <i>Gadus morhua</i>	動物	養殖	海水	800	1.8	59	8	5	13	91	70-83	81-87	99-100	70-97	88	Peruzzi <i>et al.</i> , 2013
テンチ <i>Tinca tinca</i>	雑食	養殖	淡水	36	1	29	15	47	13	86	78	89	94	78	85	Arlinghaus <i>et al.</i> , 2003

第 11 章 アユの栄養素消化の部位間比較

この章では、アユの消化管の部位ごとの栄養素の消化について考察する。

標識（酸不溶性灰分）をつかって消化管部位ごとの栄養素消化率を以下のよ
うに計算した（図 46-48）。

タンパクおよび炭水化物の部位ごとの消化率

胃での消化率 (%) = (藻類中の AIA あたりタンパク量 - 胃内容物中の AIA
あたりタンパク量) / 藻類中の AIA あたりタンパク量 × 100

腸 1 での消化率 (%) = (胃内容物中の AIA あたりタンパク量 - 腸 1 内容
物中の AIA あたりタンパク量) / 藻類中の AIA あたりタンパク量 × 100

腸 2 での消化率 (%) = (腸 1 内容物中の AIA あたりタンパク量 - 腸 2 内
容物中の AIA あたりタンパク量) / 藻類中の AIA あたりタンパク量 ×
100

腸 3 での消化率 (%) = (腸 2 内容物中の AIA あたりタンパク量 - 腸 3 内
容物中の AIA あたりタンパク量) / 藻類中の AIA あたりタンパク量 ×
100

脂質の部位ごとの消化率の計算式

腸 2 での消化率 (%) = (腸 1 内容物中の AIA あたり脂質量 - 腸 2 内容物中の AIA あたり脂質量) / 腸 1 内容物中の AIA あたり脂質量 × 100

腸 3 での消化率 (%) = (腸 2 内容物中の AIA あたり脂質量 - 腸 3 内容物中の AIA あたり脂質量) / 腸 1 内容物中の AIA あたり脂質量 × 100

藻類中のタンパクの 58%が胃で消化され、最終的に腸 3 まででタンパクの 69%が消化されたことになる。しかし、腸 1 での、おそらく脱落上皮細胞や分泌された消化酵素と思われる、内因性の窒素分泌を上述の方法では評価出来ていないので、タンパクの消化を過小評価している可能性がある。また、粗タンパクとして評価したタンパクの吸収のなかにどれだけ核酸の消化が含まれていたかも不明であるが、一般的な藻類の核酸含量 (Becker 1994) から考えるとあまり大きな影響は無いと推測される。

一方、藻類の炭水化物は消化管全体で 88%消化されていて、胃で 67%、腸 1 で 20%消化されていた。さらに、腸 2 以降では炭水化物の消化がほとんどなかった。これは、藻類に含まれる大部分の炭水化物を胃と腸 1 で消化し消化したものと考えられる。これは、腸 2 や腸 3 に炭水化物消化の能力が無いというよりは、自家酵素消化可能な炭水化物が腸 1 までで消化し尽くされたためであると考えられる。言い換えれば、腸 2 および腸 3 の内容物や糞には自家酵素消化可能な炭水化物がほとんど残存せず、自家酵素消化が出来ない難消化性の糖質しか残って

いないと考えられる。

脂質については、胃から腸 1 にかけて多量に分泌されていたために腸 1 での消化率は評価出来なかったが、脂質の消化率は腸 2 が腸 3 よりも有意に高く、腸 1 から腸 3 にかけて 78%消化されていた。

細菌代謝の指標である有機酸は胃から腸 3 まで全ての部位で観察された (図 34)。したがって、胃から腸の終末まで微生物消化がおこなわれていることになる。すなわち、自家酵素消化が微生物消化に先行する単胃ほ乳類の場合 (Stevens and Hume 1995) とちがって、アユでは腸全体にわたって微生物消化と自家酵素消化が平行して行われていた。

これらのことから、腸 1 から腸 3 までの各部の消化・吸収機能に質的な違いはないが、量的な違いはあるといえる。

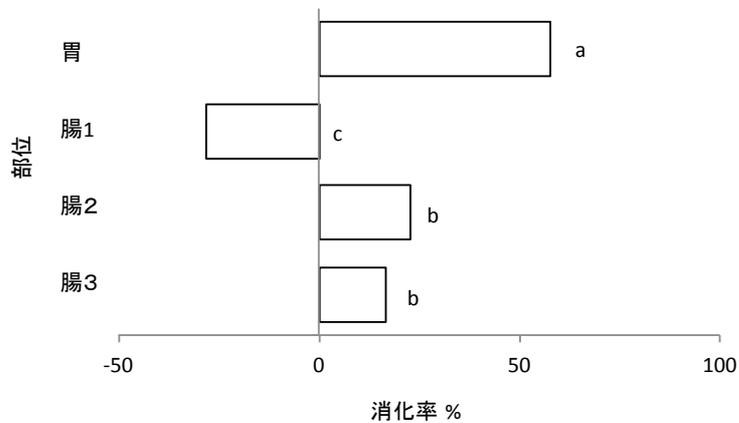


図 46 天然成アユ消化管各部でのタンパク吸収率（負の値は分泌を表す。）（平均値, $n=3$, Pooled SD=13.2, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。 $p<0.05$ ）

分母を標識あたりの藻類中のタンパク量、分子を上流側の部位の標識あたりのタンパク量から下流側の消化管ごとの標識あたりのタンパク量（図 38）を差し引いた値として計算したタンパク消化率。藻類のタンパクは胃で最も吸収され、胃から腸 3 までに 69%消化された。

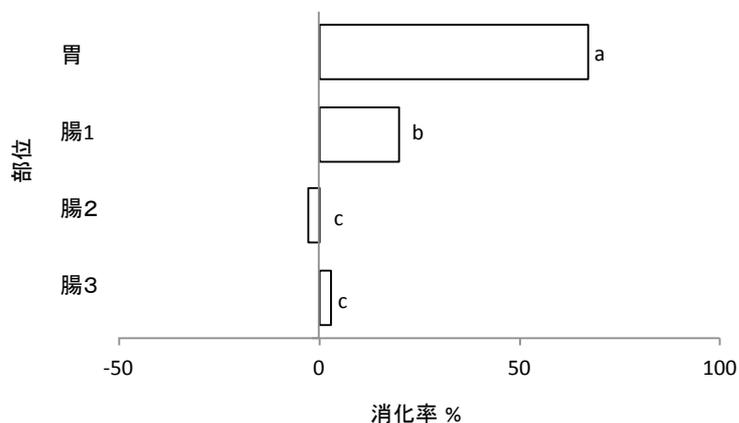


図 47 天然成アユ消化管各部での炭水化物吸収率（負の値は分泌を表す。）（平均値, $n=3$, Pooled SD=4.5, a, b, c: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。 $p<0.05$ ）

分母を標識あたりの藻類中の炭水化物量、分子を上流側の部位の標識あたりの炭水化物量から下流側の消化管ごとの標識あたりの炭水化物量（図 39）を差し引いた値として計算した炭水化物消化率。胃での吸収率が最も高く、胃から腸 1 にかけて藻類の炭水化物の 88%が消化された。

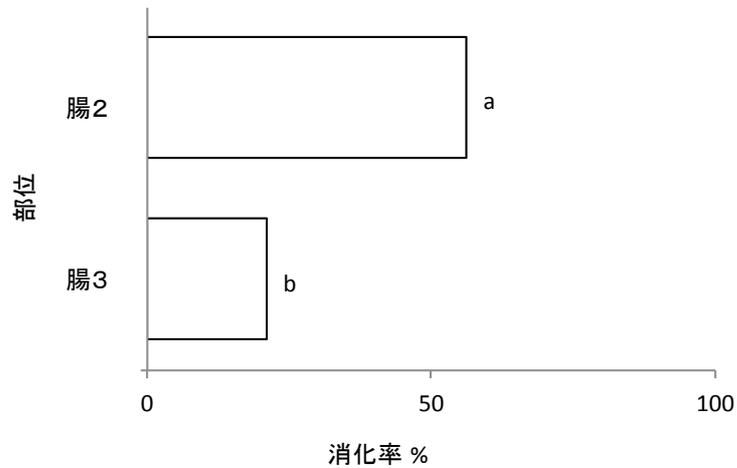


図 48 天然成アユ消化管各部での脂質吸収率（負の値は分泌を表す。）（平均値, $n=3$, Pooled SD=8.0, a, b: 異文字間に Tukey の HSD 検定で有意差あり。 $p<0.05$ ）

分母を標識あたりの腸 1 内容物中の脂質量、分子を腸 1 または腸 2 の標識あたりの脂質量から腸 2 または腸 3 の標識あたりの脂質量（図 40）を差し引いた値として計算した部位ごとの脂質消化率。脂質は腸 1 から腸 3 にかけて 78% 消化された。脂質の消化率は腸 2 のほうが腸 3 よりも有意に高かった。いっぽう、胃から腸 1 にかけて、多量の脂質が分泌されていたことから胃から腸 1 までの脂質消化率は評価できなかった。

第 12 章 摂取エネルギーからの増体重見積もり

第 11 章のようにして求めた天然アユのエネルギー吸収量が、既報の体重増加データと一致するかどうかを検討することによって本研究で求めた栄養素の消化率の妥当性を検証する。

ここまで述べてきたように、体重 50 g の小国川の天然アユは毎日 7.6～11.4 kcal のエネルギーを吸収する（第 10 章）。毎日乾物を 13.1 g を食べて 1 g 体重が増えるという報告（茂木 1985）や純粋培養した珪藻の成分（タンパク 31%、炭水化物 24%、脂質 7%）（荻野 1963）と、本研究で求めた栄養素の消化率（第 11 章）とから以下の式を用いて、藻類からなる餌乾物摂取重量あたりの増体重および各栄養素の吸収エネルギーを計算した。

栄養素の吸収エネルギー (kcal)=摂取餌乾物重量×栄養素含有率×エネルギー価×
吸収率

これに各栄養素の値をあてはめると、

タンパクからの吸収エネルギー=13.1×0.31×4×0.69=11.2 kcal/日

炭水化物からの吸収エネルギー=13.1×0.24×4×0.81=10.2 kcal/日

脂質からの吸収エネルギー=13.1×0.07×9×0.78=6.4 kcal/日

となる。

これらから、各栄養素の吸収エネルギーの合計は

$$11.2+10.2+6.4=27.8 \text{ kcal/日}$$

となり、アユは 27.8 kcal 吸収すると、体重が 1 g 増えると考えられる。

さらに、これと先に計算した体重 50 g のアユが吸収できるエネルギー、7.6 ~11.4 kcal/日（第 10 章 10-4）から以下の式によって計算すると、日摂餌量を 40 g ないし 60 g（乾物 4 g から 6 g に相当する）と仮定した小国川の体重 50 g のアユは、1 日に 0.27 から 0.41 g 体重が増えると考えられる。

摂餌量 40 wet g/日とすると

$$7.6/27.8=0.27 \text{ (g 増体重/日)}$$

摂餌量 60 wet g/日とすると

$$11.4/27.8=0.41 \text{ (g 増体重/日)}$$

これは体重約 30 g のアユの 1 日の増体重が 0.38 g だった茂木の実験（茂木 1985）よりも多い見積もりとなるが、茂木の実験では「食べさせたエサの量が本来食べる量よりも少なかった可能性がある」と記述していることから（茂木 1985）、茂木の結果と本研究の 0.27~0.41 g という結果とは矛盾しないと考えられる。

つぎに、2013 年 6 月末の小国川漁協が計測した体重あるいは、この研究にあたって 2013 年 8 月 11 日に実際に測定したアユの体重を初期値にして、消化エネルギーあたりの増体重が変化しないと仮定して、日摂餌量が体重の 0.8 および 1.2 倍であった場合のその後の体重増加を以下のように推定した。

体重_{n日}

=アユ体重_{(n-1)日}+[アユ_{(n-1)日}吸収エネルギー量 (kcal)] /27.8 (kcal 消化・吸収/g
増体重)

まず、6月末に小国川漁協が計測した 32.5 g を初期値として計算した。すると、8月11日のアユの体重の推定値は 44.8 g~52.6 g、9月末の推定値は 66.3 g~95.5 g となった。これらは8月11日に計測したアユの実測体重(平均 42.7 g)や9月末の天然アユの実測体重 (50 g から 90 g) (図 49) とほぼ一致していた。また、8月11日の実測体重平均 42.7 g を初期値として計算した9月末の体重の推定値は 56.6 g~65.1 g となり、9月末の天然のアユの実測体重 (50 g から 90 g) とほぼ一致していた (図 49)。

以上のことから、本研究で明らかにした天然成アユの栄養素の消化率や、吸収エネルギーあたりの増体重の値は妥当であったと判断した。

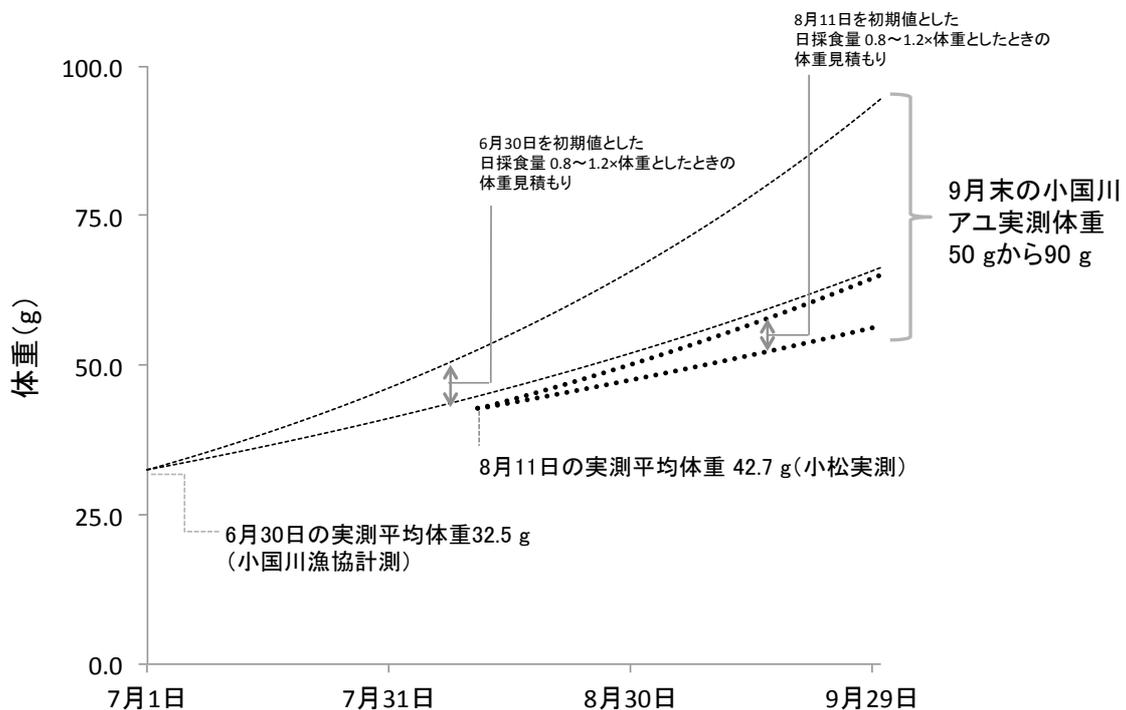


図 49 小国川での6月末および8月11日のアユ体重実測値を初期値として、藻類の日摂餌量を体重の0.8倍(茂木 1985)から1.2倍(田中 1980)と仮定し、文献値(茂木 1985)から推算した吸収エネルギーあたりの増体重と本研究で求めた体重あたりのエネルギー吸収量(10章)から推算した体重の見積もりと実測値の比較(見積もり体重_{n日} = アユ体重_{(n-1)日} + アユ_{(n-1)日} 吸収エネルギー量 [(kcal 消化・吸収) / 27.8 (kcal 消化・吸収/g 増体重)])

体重 50 g のアユが 4 g ~ 6 g / 日のエサ乾物を摂取すると、7.6 ~ 11.4 kcal / 日吸収するという本研究の結果(図 43)、既報のアユの乾物摂取量あたりの増体重(13.1 g 乾物/g 増体重)(茂木 1985)、純粋培養した藻類の成分比(荻野 1963)から、アユの体重増加の見積もりをした。小国川での6月末および8月11日のアユ体重実測値を初期値とし、日摂食量(湿重量)を体重の0.8倍から1.2倍の範囲で見積もった(破線内の範囲)。すると、6月末の体重実測値をもとにした結果では、8月11日の実測値や9月末の実測値と大きな矛盾はなかった。また、8月11日のアユ体重実測値を初期値とした結果も9月末に実測した体重の振れ幅の中に収まっていた。

第 13 章 結論

これまでに述べた結果から、以下のことが明らかになった。

藻類を食べるアユのエネルギーは炭水化物から約 5 割、タンパクから約 4 割、脂質から約 1 割得ていることが明らかとなった(第 10 章 3 節 2 項)。また、炭水化物、タンパク、脂質の自家酵素消化が胃から腸の終末にかけておこなわれていること(第 9 章 図 38-40)が明らかになった。このうち、炭水化物は胃から腸 1 にかけてよく消化・吸収され、タンパクと脂質は腸 1 から腸 3 まで均等に消化・吸収されることが明らかになった(図 46-48)。

胃から腸 3 まで、微生物による炭水化物の分解が自家酵素消化に平行して進行することを確認した。(第 6 章 図 34)。ただし、消化管内細菌による栄養素の分解はアユのエネルギー収支に貢献しないことも明らかになった(第 10 章 3 節 3 項)。本研究で明らかになった天然成アユのエネルギー消化率は 78%であり、天然成アユの吸収可能なエネルギーは養殖魚の一般的な範囲内にあるといえる。

本研究では、消化管の部位ごとの栄養素の消化率をしらべることにより、窒素や脂質の内因性の分泌の影響を評価した(第 11 章 図 46-48)。エサと糞だけの測定では窒素や脂質内因性分泌が評価できないので消化・吸収の正確な評価はできない。今後は養殖魚を含む他の魚種でもこのような研究が進むことを期待したい。

このように、アユは灰分が乾物重量の約 4 割を占める藻類を大量に食べても、藻類有機物のエネルギーの約 75%を自家酵素消化によって消化・吸収して繁殖サイズにまで成長できることが明らかとなった。つまり、アユは植物食魚であるが、エネルギー源を消化管内の細菌代謝に依存することなく、自家酵素消化の

みで成長することが明らかになった。

本研究の結果は、アユのような体長の 70%程度という短い腸を持つ魚でも餌に含まれる栄養素を効率よく消化・吸収できる事を示している。どのような機構がこのような効率の良い消化・吸収を可能にしているのかは今後の課題である。例えば、胃や腸の口側に生存する細菌が藻類の細胞壁に穴をあけることによって、魚自身の消化酵素の藻類細胞質への侵入を助けている可能性が考えられる (Cheng *et al.* 1991)。すなわち、細菌による消化自体のエネルギー貢献はほとんど無いが、細菌による藻類細胞壁の部分的な消化が自家酵素消化を助けていることも考えられ、このような機構は植物食動物における消化管内細菌の直接的なエネルギー供給以外の役割として無視できないと考える。

アユのような短い腸をもつ植物食魚でも自家酵素消化のみで生存や成長に必要なエネルギーを得ることができることから、アユよりも腸の長い植物食魚では自家酵素のみによる消化でもエネルギーを得ることは難しくないことが推測できる。そうであれば、微生物消化を期待しにくい水温の低いところに生息する植物食魚のエネルギー獲得機構も理解しやすくなると考える。

謝辞

本研究を進めるにあたり、副査として様々なご指導をしていただきました土屋剛先生、松谷武成先生、角田出先生、木原稔先生、成分分析のアドバイスを頂いた福島美智子先生、細菌の解析に協力して下さった塚原隆充先生、井上亮先生、様々なアドバイスをくださいました専攻の先生方、試料魚を提供して頂きました北上川漁協の方々、最後にご指導を頂いた指導教員の坂田隆先生に感謝申し上げます。

引用文献

- Aksnes, A., Opstvedt, J. 1998. Content of digestible energy in fish feed ingredients determined by the ingredient-substitution method. *Aquaculture* 161, 45-53.
- Amano, M., Iigo, M., Furukawa, K., Tabata, M., Yamamori, K. 2006. Photic and circadian regulation of self-feeding activity in ayu. *Fisheries Science* 72, 250-255.
- Arlinghaus, R., Wirth, M., Rennert, B. 2003. Digestibility measurements in juvenile tench *Tinca tinca* by using a continuous filtration device for fish faeces. *Journal of Applied Ichthyology* 19, 152-156.
- Atkinson, J. L., Hilton, J. W., Slinger, S. J. 1984. Evaluation of acid-insoluble ash as an indicator of feed digestibility in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 41, 1384-1386.
- Becker, W. 1994. Culture media. In: *Microalgae: Biotechnology and Microbiology*. Eds. Baddiley, S. J., Carey, N. H., Higgins, I. J. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 9-42.
- Block, E., Kilmer, L. H., Muller, L. D. 1981. Acid insoluble ash as a marker of digestibility for sheep fed corn plants or hay and for lactating dairy cattle fed hay. *Journal of animal science* 52, 1164-1169.
- Buddington, R. K., Diamond, J. M. 1986. The function of pyloric caeca in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 8012-8014.
- Cheng, K., Forsberg, C., Minato, H. 1991. Microbial degradation within the rumen. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*. Eds. Tsuda, T., Sakaki, Y., Kawashima, R. Academic Press, Inc., San Diego, pp. 595-624.
- Goddard, J. S., McLean, E. 2001. Acid-insoluble ash as an inert reference material for

digestibility studies in tilapia, *Oreochromis aureus*. *Aquaculture* 194, 93-98.

Gokarn, R., Evans, J., Walker, J., Martin, S., Eiteman, M., Altman, E. 2001. The physiological effects and metabolic alterations caused by the expression of *Rhizobium etli* pyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 188-195.

Hoshi, S., Sakata, T., Mikuni, K., Hashimoto, H., Kimura, S. 1994. Galactosylsucrose and xylosylfructoside alter digestive tract size and concentrations of cecal organic acids in rats fed diets containing cholesterol and cholic acid. *The Journal of Nutrition* 124, 52-60.

Kihara, M., Sakata, T. 1997. Fermentation of dietary carbohydrates to short-chain fatty acids by gut microbes and its influence on intestinal morphology of a detritivorous teleost tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 118, 1201-1207.

Kihara, M., Sakata, T. 2001. Influences of incubation temperature and various saccharides on the production of organic acids and gases by gut microbes of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in a micro-scale batch culture. *Journal of Comparative Physiology B* 171, 441-447.

Livesey, G. Elia, M. 1995. Short-chain fatty acids as an energy source in the colon: metabolism and clinical implications. In: *Physiological and Clinical Aspects of Short-Chain Fatty Acids*. Eds. Cummings, J. H., Rombeau, J. L., Sakata, T. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 427-481.

Mountfort, D. O., Campbell, J., Clements, K. D. 2002. Hindgut fermentation in three species of marine herbivorous fish. *Applied Environmental Microbiology* 68, 1374-1380.

Nakagawa, H., Umino, T., Sekimoto, T., Ambas, I. Montgomery, W. L., Nakano, T. 2002. Characterization of the digestive tract of wild ayu. *Fisheries Science* 68, 341-346.

Paris, H., Murat, J.C., Castilla, C. 1977. Etude des acides gras volatiles dans l'intestin de trois especes de poissons teleosteens. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*. 171, 1297-1301.

Peruzzi, S., Hagen, Ø., Jobling, M. 2014. Gut morphology of diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture International*, DOI 10.1007/s10499-014-9867-2

Peruzzi, S., Jobling, M., Falk-Petersen, I. B., Lein, I., Puvanendran, V. 2013. Gut morphology of diploid and triploid Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Journal of Applied Ichthyology* 29, 1104-1108.

Petrosino, J., Highlander, S., Luna, R., Gibbs, R., Versalovic, J. 2009. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clinical Chemistry* 55, 856-866.

Refstie, S., Storebakken, T., Roem, A. J. 1998. Feed consumption and conversion in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed diets with fish meal, extracted soybean meal or soybean meal with reduced content of oligosaccharides, trypsin inhibitors, lectins and soya antigens. *Aquaculture* 162, 301-312.

Sakata, T., Engelhardt, W. 1981. Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs. *Cell and Tissue Research* 219, 629-635.

Sakata, T., Setoyama, H. 1997. Bi-phasic allometric growth of the small intestine, cecum and the proximal, middle, and distal colon of rats before and after weaning. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 118, 897-902.

Satoh, S., Cho, C. Y., Watanabe, T. 1992. Effect of fecal retrieval timing on digestibility of nutrients in rainbow trout diet with the Guelph and TUF feces collection systems. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. 58, 1123-1127.

Shiga, A., Sasaki, T., Horii, N. 1987. Correlations among pH and Mg, Ca, P, Na, K, Cl-and HCO₃-contents of digesta in the gastro-intestinal tract of rats. *The Japanese journal of veterinary science* 49, 973-979.

Smith, S. 1989. Digestive functions in teleost fish. In: *Fish Nutrition*, Ed. Halver E. San Diego Academic Press, San Diego, pp. 331-421.

Stevens, C., Hume, I. D. 1995. Energy and nutrient requirements. In: Comparative physiology of the vertebrate digestive system. 2nd edition. Eds. Stevens, C., Hume, I. D. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 1-10.

Stevens, C., Hume, I. D. 1995. Microbial fermentation and synthesis of nutrients and the absorption of end products. In: Comparative physiology of the vertebrate digestive system. 2nd edition. Eds. Stevens, C., Hume, I. D. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 188-228.

Titgemeyer, E. C. 1997. Design and interpretation of nutrient digestion studies. *Journal of Animal Science* 75, 2235-2247.

Umesaki, Y., Yajima, T., Yokokura, T., Mutai, M. 1979. Effect of organic acid absorption on bicarbonate transport in rat colon. *Pflüger Archiv European Journal of Physiology* 379, 43-47.

Van Keulen, J., & Young, B. A. 1977. Evaluation of acid-insoluble ash as a natural marker in ruminant digestibility studies. *Journal of Animal Science* 44, 282-287.

伊東登 (1987) 硬骨魚類の血管系について. *日本獣医師会雑誌* 40, 673-678.

大西正三 (1969) 「要説栄養・食品学実験-50」, 医歯薬出版株式会社, 東京.

荻野珍吉 (1963) 数種天然飼料の科学的組成について. *日本水産学会誌* 29, 459-462.

小松仁 (2009) アユとヤマメの腸内細菌による有機酸生産能力の比較. 修士論文, 石巻専修大学. (未公刊)

坂田隆 (2007) ラット大腸の比較解剖. *食品・食品添加物研究誌* 212, 53-56.

高木徹, 青山倫也 (1984) アナアオサの脂肪酸組成 : 抽出法の検討. 北海道大學水産學部研究彙報 35, 50-54.

田中洋介 (1980) 「農林水産業における自然エネルギーの効率的利用技術に関する総合研究」, 農林水産技術会議事務局, pp. 103-117.

宮地伝三郎 (1960) 「アユの話」 岩波書店, 東京, p. 92.

茂木実 (1985) アユの藻類摂取量試験-1. 群馬農業研究 E 水産 1 号, 21-26.