エクストルーデッドペレット飼料が養殖クロマグロの 消化と成長に与える影響

近藤史崇,¹ 岩井俊治,¹ 三浦智恵美,^{1,3*} 坂田潤弥,¹ 太田 史,¹
井戸篤史,¹ 入江 奨,² 岡松一樹,² 角正浩一,² 三浦 猛¹

(2016年3月30日受付, 2016年8月18日受理, 2016年11月1日J-STAGE 早期公開)

¹愛媛大学南予水産研究センター, ²フィード・ワン(株)水産研究室水産開発センター,

³広島工業大学環境学部地球環境学科

Analysis of feeding effects of EP on growth and digestion in cultured bluefin tuna

FUMITAKA KONDO,¹ TOSHIHARU IWAI,¹ CHIEMI MIURA,^{1,3*} JYUNYA SAKATA,¹
TAKASHI OHTA,¹ ATUSHI IDO,¹ SUSUMU IRIE,² KAZUKI OKAMATSU,²
KOICHI KAKUMASA² AND TAKESHI MIURA¹

¹South Ehime Fisheries Research Center (SEFREC), Ainan-town, Ehime 798-4292, ²Marine Farming R & D Center Laboratory of Feed One. Co. Ltd., Johen, Ehime 798-4349, ³Hiroshima Institute of Technology, Saeki-ku, Hiroshima 731-5193, Japan

To develop an extruded pellet (EP) appropriate for the cultured bluefin tuna *Thunnus orientalis*, we compared the feeding effects of EP and raw fish feed on their growth and digestion. EP-fed tuna had slower growth compared to raw fish-fed tuna after a decrease in pepsin activity, and growth was restored to the same level as that of the control when protease activity increased resulting from a bloated pyloric caeca. EP feeding delayed the intestinal arrival time of food compared to raw fish feeding, because food is retained for longer in the stomach. This corresponded with the time of expression of digestive-related factors in both groups, resulting in delayed expression of digestive enhancer (*cck*) and digestive suppressor (*pyy*) in the EP group compared with the control group. The expression levels of Ghrelin, a growth related factor expressed when nutrients are absorbed into the intestine, were also significantly higher in the EP group than in the control group. Moreover, expression levels and times of growth hormone (*gh*) were not significantly different between EP and raw fish feed. Therefore, bluefin tuna has the capacity to adapt their digestive physiology in response to EP in order to grow efficiently.

キーワード : *cck*, *ghrelin*, *pyy*, クロマグロ, 消化管, 消化酵素活性, 成長ホルモン

太平洋クロマグロ *Thunnus orientalis* は世界的に重要な漁獲対象魚であり, 日本, メキシコおよびアメリカなどを中心に古くから漁獲されてきた。しかし, 乱獲による太平洋クロマグロの資源減少が危惧されている。太平洋クロマグロの漁獲量は「中西部太平洋まぐろ類委員会 (WCPFC)」, 「全米熱帯まぐろ類委員会 (IATTC)」および「北太平洋まぐろ類科学委員会 (ISC)」等の国際漁業管理機関によって管理されているが, クロマグロ資源の減少は続いている。そのため, 2014年にはISCが漁業規制をさらに強化する必要性があることを勧告して

いる。¹⁾ このように, 世界的な漁業規制の強化が謳われるなか, クロマグロ養殖に対しての関心が高まっている。一口にクロマグロ養殖と言ってもその形態により大きく2つに分けられる。天然のクロマグロ稚魚を捕獲し, 海上に敷設した生簀に収容して商業サイズに達するまで飼育する蓄養養殖と, 十分に成熟したクロマグロを飼育し, そのクロマグロから得られた受精卵を人工的に孵化, 育成を行う完全養殖である。特に, 完全養殖は天然資源から独立した養殖であり, 天然資源に負荷を掛けないため養殖の理想形と言えるが, 様々な問題が存在す

るため実際に養殖がなされているクロマグロのうち、5割程度は天然より採捕されたクロマグロが種苗として用いられている(水産庁: http://www.jfa.maff.go.jp/j/press/saibai/150331_1.html)。

クロマグロ養殖、特に完全養殖においての最も大きな問題の1つに稚魚期における成長の遅延がある。海上生簀におけるクロマグロの飼育では、冬場の水温低下によって摂餌量が減少し、クロマグロの成長遅滞や斃死が引き起こされる。²⁾ この成長遅滞は、温帯地帯では低水温となる12月までにクロマグロの魚体重が3 kgを超えることで回避することができ、斃死率も大幅に減少することが知られている。完全養殖においては、初夏以降に孵化した仔魚を実際の海上の生簀に沖出しすることが可能となるサイズまで、陸上の施設で育成するが、沖出されるクロマグロの稚魚は、自然界で同時期に捕獲されるクロマグロ稚魚に比べて体サイズが小さいことが知られている。³⁾ 沖出し時に体サイズが小さいことから、12月までに3 kgという越冬させるために必要な魚体重まで成長させることは困難であり、養殖業者にとって重要な問題となっている。

成長遅滞を回避するために最も効果的な方法は、成長のよりよい飼料を与えることである。一般的に養殖飼料は餌料形態により生餌と固形配合飼料に大別される。生餌による給餌とは天然で採捕したカタクチイワシ *Engraulis japonicus* やイカナゴ *Ammodytes personatus* などをそのまま与えることである。しかし、用いる魚の種類や季節によって栄養価が安定しないほか、生餌を保存するための冷凍設備にコストがかかることや解凍した際に生じるドリップによって養殖環境を汚すなどの欠点も多く指摘されている。⁴⁻⁶⁾ 固形配合飼料には、その作製過程などによって様々な種類が存在するが、中でも本研究において着目したエクストルーデッドペレット(EP)飼料は、各種原材料を任意に配合して製造することが可能であり養殖魚に適した栄養を持った飼料の作製が可能である。さらに、高温高圧下で造粒するため、水中で形が崩れにくく、保存性も高い。そのため、漁場への負担が軽減されるなど、生餌給餌に比べて多くのメリットが存在する。しかしながら、EP飼料を給餌して養殖を行うと生餌給餌による養殖に比べて成長が悪いため、現状のクロマグロ養殖においては生餌給餌による養殖が主流である。そのため、効率的なクロマグロ養殖を実現するために、クロマグロの成長に対して優れた効果を持つEPの開発が急務となっている。

一般的に、魚類の成長は飼料の性状や組成などに大きく影響をうける。これは、その飼料の性状や組成が摂餌した魚の消化作用に影響を与え、エネルギーや栄養の吸収量などを変化させるためである。⁷⁾ 飼料の成分組成に加えて、飼料の物性が消化速度や消化酵素活性に影響を

及ぼし、さらには消化管の形態自体も変化させることが知られている。⁸⁻¹⁰⁾ これらの変化には、主に消化管で産生される消化促進因子コレシストキニン(CCK)、消化抑制因子ペプチドYY(PYY)および消化と成長に大きな役割を果たすGhrelinなどの様々な内分泌因子が関与している。

本研究では、生餌摂餌とEP摂餌によるクロマグロの成長および消化能力に対する影響を調べるとともに、分子生物学的手法を用いて摂餌による消化関連遺伝子の発現解析を行った。これらの研究から、EP摂餌による成長の遅滞などの原因を究明することを目的とした。

材料と方法

供試魚 本研究では愛媛県南宇和郡愛南町久良で実施されているクロマグロ養殖のために、釣り上げられた天然のクロマグロ *Thunnus orientalis* の稚魚(0歳魚)を同町柏崎の海上に設置した2つの直径20 m深さ10 mの円形化繊網生簀に100尾ずつ収容し、以下の各試験を行った。試験開始までは、一般的にクロマグロ養殖で行われる手法と同様にイカナゴを主体とした生餌給餌を行った。1区はそのまま生餌給餌による飼育を継続し、もう1区は今回の試験のために作製したEP飼料(粗たんぱく質57.1%, 粗脂肪12.2%; 日本配合飼料製)を飽食給餌することで試験区(EP給餌区)とした。イカナゴを主体とした生餌の一般成分は、粗たんぱく質66.0%, 粗脂肪17.6%であった。飼育期間中は各区で魚体測定と給餌量の計測を行い、増重量と給餌量から日間摂餌率と増肉係数を算出した。2012年には、詳細な解析を行うため同様の方法で、同年に捕獲したクロマグロを用いて飼育を行い、各種解析に用いた。

サンプリング 2011年に実施した成長試験の際には、個体数3から5の魚体重および尾叉長の測定を行った。取り上げたクロマグロは、プロテアーゼ活性を測定するために、胃を摘出し、リンガー液(170 mM NaCl, 3.0 mM KCl, 2.3 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3.0 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.0 mM HEPES, 5.0 mM D-glucose, pH 7.4)で内容物などを洗浄した後に、酵素活性を測定するまで -80°C で保存した。サンプリングには、給餌後2時間経過したクロマグロを用いた。

2012年に実施した試験では、魚体重および尾叉長の計測に加えて、胃、幽門垂および腸などの消化器官を摘出し、その重量および長さ(腸のみ)を計測した。酵素活性測定のため摘出した臓器をリンガー液で洗浄した後、酵素活性を測定するまで -80°C で保存した。幽門垂の重量および腸の長さから、魚体に占める各臓器の割合を幽門垂体指数($\text{PSI} = \text{幽門垂湿重量} / \text{魚体重} \times 100$)および腸長比($\text{ILI} = \text{腸の長さ} / \text{尾叉長} \times 100$)として算出した。

給餌後の消化の程度を確かめるために、各飼料を飽食給餌した後、2, 10, 15, 20 時間経過したクロマグロから脳下垂体と消化管（胃、幽門垂および腸）を摘出した。各消化管からは、内容物を回収しそれぞれの湿重量の測定および pH の測定を行い、胃の内容物については体重に占める内容物の割合を胃内容物体指数（SCSI = 胃内容物重量/体重 × 100）として算出した。各消化管は内容物をリンガー液で洗浄した後、RNA 抽出まで -80 °C で保存した。脳下垂体も同様に、-80 °C で保存した。EP 給餌区と生餌給餌区のそれぞれで各飼料を 1 ヶ月以上給餌したクロマグロを用い、給餌試験期間中の水温は 15.0–20.7 °C であった。

消化酵素活性の測定 保存した胃と幽門垂は、それぞれ重量の 3 倍量の冷蒸留水を加えホモジナイズし、遠心分離後（10,000 × g, 15 分, 4 °C）の上清を粗酵素液とした。胃および幽門垂のプロテアーゼ活性は Anson 法^{11,12)}に従い、0.5% ウシ血清ヘモグロビンを基質として、分解によって生じるチロシンの量を吸光光度計によって測定した。幽門垂のリパーゼ活性は Albo 法¹³⁾に従い *p*-nitrophenylmiristate を基質として、分解によって生じる *p*-nitrophenyl を吸光光度計により測定した。それぞれの粗酵素液と基質は 37 °C で 2 時間反応させた。各酵素活性は、1 分間に 1 μmol の生成物を生じるために必要な酵素量を 1 U と定義し、算出した。また、魚体重当たりの活性は、得られた酵素活性に幽門垂体指数を乗じることで算出した (U/mg of tissue × PSI)。

組織学的観察 2013 年 2 月に、生餌給餌区、EP 飼料給餌区のクロマグロから採取した幽門垂と腸をダビッ

ドソン氏液により固定した後、常法にしたがって厚さ 5 μm のパラフィン切片を作製した。組織切片は、Delafield のヘマトキシリン・エオシン染色（HE 染色）およびアルシアンブルー染色を施し、光学顕微鏡により観察を行った。

クロマグロ *cck* および *pyy* のクローニング クロマグロ 2 才魚の幽門垂および腸から、Sepazol-RNA I super（ナカライテスク）を用いて Total RNA を抽出し、DNase I（Thermo Fisher Scientific）を用いて DNA を除去した RNA を cDNA 合成用の鋳型として用いた。調整した RNA を用いて、Super Script II reverse transcriptase system（Thermo Fisher Scientific）による cDNA の合成を行った。クロマグロの CCK と PYY の部分断片を単離するために、近縁種であるブリ *Seriola quinqueradiata* の *cck* と *pyy* の配列（*cck*, Accession No. AB205406; *pyy*, Accession No. AB205407）を元にそれぞれに対応する縮合プライマーを設計した（Table 1）。それぞれのプライマーを用いて、*cck* は腸、*pyy* は幽門垂の cDNA を鋳型として PCR 反応を行い、予想される大きさの PCR 産物を得た。得られた PCR 産物を pGEM-T-easy vector System（Promega）を用いて、ベクターに挿入した。得られた PCR 産物が挿入されたベクターはシーケンス解析を行い、その配列を解析した。

各消化管ホルモン RNA の組織分布 クロマグロ 2 才魚の脳、脳下垂体、胃、幽門垂、腸の前部、腸の後部、肝臓および筋肉から RNA 抽出および cDNA 合成を前述の方法で行った。本研究で得られたクロマグロ *cck* と *pyy* の部分配列、クロマグロ *ghrelin* (Accession No. AB694739),

Table 1 Name, nucleotide sequence, direction, and use of primers in the present study

	Primer sequence (5'-3')	Primer direction	Use	Amplicon length (bp)	PCR efficiency (%)
CCK F	CTCAMGATGRCTGCMGGGYTG	Sense	CCK cloning		
CCK R	GAGTAYTCRTAYTCCTCKGCRCT	Antisense	CCK cloning		
PY F	CATGYTGAGATCGTGGATGATG	Sense	PYY cloning		
PY R	AGAGTCACAAAGTCCAGTGCA	Antisense	PYY cloning		
CCK sp F	AGGAGGATGCAGACTCCCG	Sense	CCK qPCR and tissue distribution	99	98.1
CCK sp R	GTTCACCGTGGAGTTTCTA	Antisense	CCK qPCR and tissue distribution		
PYY sp F	CAACGCCTCGCCGAGGAGTGGGC	Sense	PYY qPCR and tissue distribution	148	98.0
PYY sp R	GGTTTGAATCAGCTCCAAAC	Antisense	PYY qPCR and tissue distribution		
Ghrelin sp F	TGAGGACGACCACATC	Sense	Ghrelin qPCR and tissue distribution		
Ghrelin sp R	GGCATTGAGACTGCAAATTTG	Antisense	Ghrelin qPCR and tissue distribution		
GH sp F	AGCAGCGTCAGCTCAACAAA	Sense	GH qPCR and tissue distribution		
GH sp R	AACTCCACGATTTCCACCAA	Antisense	GH qPCR and tissue distribution		
actin sp F	ACAGAGCGTGGCTACTCCTTC	Sense	β-actin qPCR and tissue distribution		
(Suda <i>et al.</i> , 2012)					
actin sp R	AGGCAGCTCGTAGCTCTTCTC	Antisense	β-actin qPCR and tissue distribution		
(Suda <i>et al.</i> , 2012)					

M, A or C; R, A or G; Y, C or T; K, G or T.

クロマグロ *growth hormone*¹⁴⁾ の各配列を基にして特異的プライマーを設計した (Table 1)。クロマグロ β -actin 遺伝子を内部標準遺伝子として用い, その増幅のために既報のプライマーを用いた。¹⁵⁾ PCR 反応は, KOD-FX polymerase (TOYOBO) を用いて行った。反応条件は, 94°C で 2 分の熱処理を行った後に, 98°C で 10 秒間, 55°C で 30 秒間の, 68°C で 1 分間の処理を 1 サイクルとして, それぞれのプライマーについてサイクル数を変化させて行った。

リアルタイム PCR (qPCR) 法による消化管ホルモン mRNA の定量 クロマグロの各臓器からの RNA 抽出, cDNA の合成は前述の方法で行った。各遺伝子に対応するプライマーは, 遺伝子発現の組織分布を調査するために用いたプライマーと同様のものを用いた (Table 1)。作製した cDNA を鋳型として, SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) のマニュアルに従ってリアルタイム PCR 反応を行った。蛍光強度の測定および Ct 値の算出には, Bio-Rad CFX96 (Bio-Rad) を用いて行った。得られた Ct 値を使って, $\Delta\Delta Ct$ 法¹⁶⁾により, 各遺伝子の発現量を内部標準遺伝子である β -actin 遺伝子に対する相対的発現量として算出した。

統計処理 本研究で行った全ての試験における統計処理は KaleidaGraph (Synergy Software) を用いて行った。得られた測定値などを一元分散分析に供した後, post-hoc テストとして Bonferoni 多重比較検定に供し, $p < 0.05$ を統計的有意差とした。相関解析は無相関検定に供し, $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

結 果

EP 摂餌がクロマグロの成長と消化能力に及ぼす影響 EP 飼料を摂餌することがクロマグロの成長に及ぼす影響を調べるために, 生餌給餌区と EP 給餌区の飼育期間における魚体重の変化を比較した (Fig. 1)。天然から捕獲し, 生簀にクロマグロを収容後 1 ヶ月目から EP 給餌を開始すると, 継続して生餌を給餌した区に比べて成長速度が低下した。しかし, EP 給餌区においても EP 給餌開始 1 ヶ月後からはほぼ生餌給餌区と変わらない体重増加量を示した。しかし, EP 給餌開始 2 ヶ月後, 4 ヶ月後では, EP 給餌区のクロマグロの魚体重は生餌給餌区のクロマグロの魚体重に比べて低かった。また本実験で用いたサンプル数は 3 から 5 個体と少ないため, 成長曲線は生餌給餌と EP 飼料給餌の成長差の比較のために用いた。

EP 給餌区と生餌給餌区の間で見られた成長差の原因を探るために, 飼育期間中の給餌量, 日間摂餌率および増肉係数 (FCR) を比較した (Table 2)。EP 給餌を開始した直後 1 ヶ月間の EP 給餌区のクロマグロは, 摂餌量および日間摂餌率ともに, 生餌給餌区に比べて明らか

Fig. 1 Sequential changes in body weights of bluefin tuna fed experimental diets. Bluefin tuna were reared by feeding either frozen raw fish feed or EP for 4 months. *Significance was compared with that in fish fed raw fish feed at each sampling point ($p < 0.05$). Error bars represent standard error of the mean ($n = 3-5$)

Table 2 Growth performance of bluefin tuna during the feeding period

Measurement period	Experimental groups	
	Frozen raw fish	EP
2011 Sep-2011 Oct		
Dry feed intake (g/fish/day)	28.5	28.9
Daily feeding rate (%)	5.8	5.8
FCR	1.33	1.34
2011 Oct-2011 Nov		
Dry feed intake (g/fish/day)	66.9	91.0
Daily feeding rate (%)	4.7	7.5
FCR	1.95	3.88
2011 Nov-2011 Dec		
Dry feed intake (g/fish/day)	81.2	98.4
Daily feeding rate (%)	3.6	5.3
FCR	3.77	2.86
2011 Sep-2012 Feb		
Dry feed intake (g/fish/day)	57.0	95.9
Daily feeding rate (%)	3.5	5.1
FCR	2.14	3.85

Dry feed intake = Total amount of feed intake / (fish number $\times$ days).
 Daily feeding rate = dry feed intake / mean body weight during the experimental period $\times 100$. FCR = dry feed intake per fish/weight gain. Weight gain = average final weight - average initial weight

に上昇した。しかし、同時に FCR も生餌給餌区に比べて約 2 倍程度に増加した。EP 給餌を開始してから 2 ヶ月目以降は、生餌給餌区での FCR が水温低下に伴って増加したが、EP 給餌区は EP 給餌開始 1 ヶ月目に比べて減少した。試験期間を通しての FCR は、生餌給餌区の方が EP 給餌区よりも低く、より効率的な成長が生餌給餌によってなされたことが示された。

両飼料で飼育したクロマグロにおける胃のプロテアーゼの活性を比較した (Fig. 2)。生餌給餌区のクロマグロの胃におけるプロテアーゼの活性は、飼育期間を通して一定であった。しかし、EP 給餌区において、試験開始 1 ヶ月後 (生餌給餌から EP 給餌に切り替わって 1 ヶ月後) には、生餌給餌区に比べて有意にその活性が低下していた。しかし、さらに 1 ヶ月経過した試験開始 2 ヶ月後には生餌給餌区とその活性に違いはなくなっていた。

消化に関わる部位として、胃だけではなく他の器官にも注目して観察を行った (Fig. 3)。消化管は全体的に EP 給餌区のクロマグロの方が大きくなっていた (Fig. 3a, b)。さらに詳細に各臓器の重量や長さを測定したところ、幽門垂体指数 (PSI) および腸長比 (ILI) がと

Fig. 2 Sequential changes of the gastric protease activities of bluefin tuna fed each diet during the experimental period. *Significance was compared with that in fish fed frozen raw fish feed at each sampling point ($p < 0.05$). Error bars represent standard error of the mean ($n = 3-5$).

Fig. 3 Effects of EP feeding on the gastrointestinal morphology in bluefin tuna. The photographs show the digestive tract in bluefin tuna fed frozen raw fish feed (a) and EP (b) at the end of the experimental period. Scale bar: 5 cm. The graphs (c) and (d) indicate sequential changes of the pyloric caeca somatic index (PSI) and intestine length index (ILI), respectively, of bluefin tuna fed frozen raw fish feed and EP during the experimental period. *Significance was compared with that in fish fed frozen raw fish feed at each sampling point ($p < 0.05$). Error bars represent standard error of the mean ($n = 3-5$).

Fig. 4 Sequential changes of activities of lipase (a) and protease (b) from pyloric caeca in bluefin tuna fed each diet. *Significance was compared with that in fish fed frozen raw fish feed at each sampling point ($p < 0.05$). Error bars represent standard error of the mean ($n = 3-5$).

Fig. 5 Micrographs show the intestine (a), and the pyloric caeca of the bluefin tuna fed frozen raw fish (b) and EP (c). Each symbol indicates: MS, muscle layer; EL, epithelium; SC, secretory cell mass. Scale bar = 200 μ m.

もに生餌給餌区のクロマグロに比べて、EP 給餌区のクロマグロの方が有意に大きくなっていた (Fig. 3c, d)。この両臓器の発達は、EP 給餌を開始して1ヶ月後には観察された。この両臓器のEP 給餌区のクロマグロにおける有意な発達は、試験期間内で維持された。

消化器官の発達に加えて、幽門垂が産生する消化に関わる酵素の活性を測定した (Fig. 4)。得られた臓器重量当たりの酵素活性を用いて、クロマグロの魚体重当たりの酵素活性を求めた。幽門垂のプロテアーゼ活性は試験開始から徐々に上昇し、EP 給餌を開始した3ヶ月後には生餌給餌区のクロマグロに比べて有意に高い活性を示した (Fig. 4a)。一方、幽門垂のリパーゼ活性は試験開始1ヶ月後から既に生餌給餌区に比べて有意に増加しており、リパーゼ活性が高い状態は試験期間を通じて保たれた (Fig. 4b)。

試験終了時にクロマグロの幽門垂と腸の組織学的観察を行った (Fig. 5)。腸では観察されない幽門垂特有の分泌細胞の集塊が、EP 給餌区のクロマグロの方が、生餌給餌区のクロマグロに比べて数多く観察された。

Fig. 6 Relationships between the fork length and the pyloric caeca weight of the bluefin tuna fed frozen raw fish feed and EP at the end of the experimental period. Asterisk shows significance level of 5%.

Fig. 7 Postfeeding changes of the pH in stomach (a) and contents somatic index (SCSI) (b) in the bluefin tuna fed frozen raw fish feed and EP.

EP 給餌区のクロマグロで認められた幽門垂の発達と成長との関わりを明らかにするために、生餌給餌区とEP 給餌区におけるクロマグロの幽門垂重量と尾叉長の関係を散布図で表した (Fig. 6)。生餌給餌区においては、尾叉長と幽門垂重量の間に相関は認められなかったが、EP 給餌区においては正の相関が認められた ($r = 0.902$, $p < 0.05$)。

EP 飼料がクロマグロの体内においてどのように消化されるかを調べるため、飽食給餌後に経時的にクロマグロをとりあげ、その胃の内容物の調査を行った (Fig. 7)。生餌給餌、EP 給餌区ともにクロマグロの胃内の pH は給餌 2 時間後に 4.0 付近と酸性を示した。その後、生餌給餌区はすみやかに pH が 7.0 付近 (中性) まで変化した。一方、EP 給餌区のクロマグロ胃内の pH は、給餌 20 時間経過した後に pH が 7.0 付近まで変化した。胃内容物においても同様に、生餌給餌では給餌 2 時間後で少量見られた内容物も 10 時間後には観察されなくなり、EP 給餌区のクロマグロの胃内容物は給餌 15 時間まで観察された。

EP 飼料の消化に伴う消化関連遺伝子の発現 クロマグロの消化および成長について分子生物学的に明らかにするために、消化に関わるホルモンの遺伝子の単離を行った。縮重プライマーを用いた PCR による部分配列単離の結果、クロマグロ *cck* とクロマグロ *pyy* の部分配列を単離した (DDBJ Accession No. LC137811 for *cck*, No. LC137812 for *pyy*)。それぞれの配列から予想されるアミノ酸配列は、近縁種であるブリ CCK, プリ PYY とそれぞれ、91%, 93% と高い相同性を示した。CCK には様々なサブタイプが存在するが、ブリ CCK が CCK1 というファミリーに分類されることから、今回得られたクロマグロ CCK も同様に CCK1 ファミリーに属すると考えられる。¹⁷⁾ これらの部分配列と、既知であるクロマグロ *ghrelin*, クロマグロ *growth hormone (gh)* の各配列に対する特異的プライマーを作製し、クロマグロの各器官における mRNA の発現を観察した (Fig.

Fig. 8 Tissue distribution of *cck*, *pyy*, *ghrelin* and *gh* mRNA 20 h after feeding in under 2-year-old bluefin tuna. RT-PCR analysis of bluefin tuna *cck*, *pyy*, *ghrelin* and *gh* in various tissues. β -Actin was used as an internal control for RT-PCR. For each gene, PCR reaction was performed the number of shown cycles. B, brain; Pit, pituitary; St, stomach; Pyl, pyloric caeca; AI, anterior intestine; PI, posterior intestine; L, liver; M, muscle.

8)。その結果、クロマグロ *cck* は、脳、脳下垂体および腸の前方 (前腸) で強い発現が観察された。クロマグロ *pyy* は幽門垂のみで発現が観察され、クロマグロ *ghrelin* は脳と胃、クロマグロ *gh* は脳下垂体のみでそれぞれ発現が観察された。

給餌後の経過時間における各消化関連ホルモンの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法により定量化を行った (Fig. 9)。クロマグロ腸における *cck* 遺伝子の発現量は、給餌 2 時間後の段階では生餌給餌区、EP 給餌区ともに低い、生餌給餌区では給餌 10 時間後、EP 給餌区では 15 時間後に上昇が見られた (Fig. 9a)。しかし、生餌給餌区のクロマグロ腸の *cck* の遺伝子発現レベルは常に EP 給餌区のものよりも高い傾向が見られた。クロマグロ幽門垂における *pyy* 遺伝子の発現量は、生餌給餌区において給餌 10 時間で最も高い発現量を示し、EP 給餌区では給餌後 20 時間で最も発現量が高くなった (Fig. 9b)。クロマグロ胃の *ghrelin* 遺伝子の発現量は、両区ともに給餌 10 時間後までは低く保たれていたが、給餌 15 時間から、EP 給餌区のクロマグロ胃の *ghrelin* の発現量が増加し、生餌給餌区のクロマグロ胃における発現量に比べて有意に上昇した (Fig. 9c)。脳下垂体に

Fig. 9 Changes of *cck*, *pyy*, *ghrelin* and *gh* mRNA levels after feeding in the bluefin tuna fed each diet. After standardization by β -actin, the *cck* (a), *pyy* (b), *ghrelin* (c) and *gh* (d) levels were normalized relative to the sample with the highest expression (mRNA levels = 1). *Significance was compared with that in fish fed raw fish feed at each sampling point ($p < 0.05$). Error bars represent standard error of the mean ($n = 3$).

おける *gh* の発現量は、生餌給餌区、EP 給餌区ともに、給餌後に低下し、給餌後 15 時間から上昇した (Fig. 9d)。給餌後の経過時間では、両区の発現に有意な差は観察されなかった。

考 察

生餌給餌による海洋環境に対する影響を考慮すると、クロマグロ養殖において配合飼料をメインとした養殖用飼料の開発は急務である。しかし、配合飼料での養殖では、生餌を用いたものに比べて明らかにクロマグロの成長が悪く、完全養殖において問題になっている水温低下期を迎えるまでに、越冬させるために十分なサイズまでクロマグロを成長させることは困難である。そこで、我々は本研究において、生餌給餌を EP 飼料による給餌に切り替えた場合に引き起こされる成長速度の低下が、クロマグロの生理機構にどのような変化を引き起こしているかを調べた。

一般的に、魚類を含む多くの脊椎動物において、消化管の形態や様々なホルモンの分泌様式などが餌の組成や形状、その物理的特性に対して変化することが知られている。特に、植物性の餌を捕食する魚種の腸の長さは、動物性の餌を捕食する魚種の腸に比べて長くなること、様々な魚種における研究によって知られている。^{18,19)} この現象は、魚類が自ら摂取した餌から最も効率的に栄養分やエネルギーを抽出するために適応した結果であろうと考えられている。¹⁹⁾ 実際に、クロマグロに

においても、配合飼料の給餌によって生餌を給餌するよりも体重当たりの消化管重量が増加することが報告されている。²⁰⁾ 同様の現象は、クロマグロと同じように動物性の餌を捕食する魚種であるブリでも報告されている。²¹⁾ 配合飼料により消化管重量が増加する理由は、配合飼料に含まれている魚粉が動物由来であっても生餌に比較して消化しにくいこと、生餌は餌魚由来の消化酵素により自己消化が進み、消化性が向上していること等が考えられる。本研究で使用した EP 飼料も同様、生餌と比べるとクロマグロにとっては消化性が悪いと考えられ、本研究で観察された腸の伸長は消化性を向上させるためにクロマグロが適応した結果と考えられる。さらに、本研究では、EP 飼料に給餌を切り替えて約 1 ヶ月で、腸の伸長に加えて幽門垂の重量も増加した。クロマグロにおいては、腸と幽門垂は消化に関わる役割が大きく異なっており、幽門垂のプロテアーゼ、リパーゼ等の消化酵素の活性は胃や腸に比べて著しく高いことが報告されている。²²⁾ さらに、EP 給餌を開始して 1 ヶ月で、幽門垂のリパーゼ活性は上昇したが、プロテアーゼ活性の上昇はそれに遅れて観察された。このことは、主に脂質の消化に関わるリパーゼの方が、飼料の変化に速やかに適応でき、タンパク質消化に関わるプロテアーゼは、飼料の変化に適応することが難しいことを示唆している。これらの知見から、生餌給餌から EP 給餌への転換において、その飼料に含まれる成分をより消化性の高いものにするためには、飼料のタンパク質成分をより詳細に検討する

ことが必要であると考えられる。

タンパク質成分の分解には、幽門垂から分泌されるプロテアーゼが働く腸以外にも、胃における分解機構が重要である。クロマグロでも、他の多くの脊椎動物などと同様に、胃に餌が入ってくると胃液が胃内腔に分泌されて、酸性になり胃における主たるプロテアーゼであるペプシンの活性化がなされる。そのため、胃内腔の pH や胃の内容物の重量を調べることで、与えた飼料の胃における消化性を調べる事が可能である。生餌を摂餌したクロマグロの胃では、摂餌直後の胃の pH の低下が EP 摂餌に比べて速やかに解消し、胃内容物が観察されなくなったことから、本来魚を主に捕食しているクロマグロにおいて、配合飼料は胃における消化性が生餌に比べて悪いことが予想された。EP 給餌区のクロマグロにおいて、胃の組織内ペプシン活性の大きな低下も観察された。これは、胃において生餌に比べて EP を消化するためには多くのペプシンが必要なため、胃の組織内から胃内腔にペプシンが多く分泌されたことを示している。他の魚種でも、胃のペプシンによる消化において、配合飼料に含まれる魚粉由来のタンパク質成分は生餌由来のタンパク質に比べて、その消化性が劣ることが報告されている。^{23,24)} さらに、近縁種であるブリでは、配合飼料は胃よりも腸で活発に消化されていることが知られている。²¹⁾ 魚を主として捕食しているクロマグロにおいて、生餌の消化方法が本来のクロマグロの消化としては自然であるとするならば、EP 飼料は消化性が明らかに悪い飼料であると言える。しかし、クロマグロは胃における消化性の悪さを補うために、さらに下流の消化器官である腸の物理的大きさを大きくすることや幽門垂の大きさやその産出する消化酵素を増やすことで適応している。飼料を難消化性のものに変化させても、1 ヶ月ほどでクロマグロ自体の適応によって、成長に対して十分な消化性を獲得することは可能であり、実際に成長も生餌に比べて遜色はなくなった。それでも、EP 飼料への切り替えによって成長が遅滞することは、冬季の低水温期までに 3 kg まで成長させなければならないクロマグロ養殖にとって克服すべき大きな課題である。本研究では、自然界から採捕したクロマグロ稚魚を用いたため、どちらの飼料を用いた場合でも冬季までに 3 kg を超えるという目標は達成することができたが、完全養殖で得られるクロマグロ稚魚の様に沖出し時のサイズが小さい場合には、さらに効率的に消化することが可能な飼料の開発が必要である。

消化酵素や臓器の発達によるクロマグロの餌に対する適応において、1 ヶ月ほどかかった餌の難消化性の解消は大きな研究課題であるが、餌に対する適応速度をさらに早めることが可能であれば、生餌から EP 給餌に切り替えた際に生じる成長遅滞を少なくすることができる

と考えられる。そこで、これらの変化を制御している消化関連ホルモンの遺伝子を調べることで、餌の成分や性状がクロマグロの内分泌ホルモンに与える影響の研究を行った。例えば、CCK を魚体に腹腔内投与することで、膵臓酵素の分泌を刺激し、胆汁の放出を促すことが様々な魚種で知られている。²⁵⁻²⁷⁾ さらに、腸からの CCK の放出は、腸にタンパク質や脂質が供給されることで促進される。²⁸⁻³⁰⁾ 本研究における *cck* の発現量の定量的結果から、胃の内容物が観察されなくなる前後から腸において *cck* の発現が上昇した。つまり、クロマグロも他の魚種と同様、腸に消化物が到達することで *cck* 遺伝子の発現が上昇すると考えられる。さらに、統計的有意差はなかったが、生餌給餌区の方が EP 給餌区に比べて *cck* 遺伝子の発現が高かったことから、早く胃で消化され、腸に到達することに加えて、生餌に含まれる何らかの成分が腸の *cck* 遺伝子の発現を高めている可能性も考えられる。摂餌によって引き起こされるクロマグロ体内での *cck* 遺伝子の発現亢進は、遺伝子レベルであり、非常に早い反応である。つまり、*cck* 遺伝子の発現をさらに誘引する飼料の開発などによって、クロマグロの適応能力を高めることが出来るのではないかと期待される。CCK とは逆に、PYY は哺乳類では胃酸や膵臓酵素の分泌や胃の内容物の腸への排出の抑制などの消化に対して抑制的に働くことが知られている。³¹⁾ しかし、ブリでは、PYYb の投与によって消化が抑制されることが確認されているが、魚種によりその機能は大きく異なっていることも報告されている。例えばブリでは、給餌後に *pyy* 遺伝子は大きく発現が減少するが、ソウギョ *Ctenopharyngodon idella* では給餌後に増加する。^{28,32)} 本研究では、どちらの飼料を摂餌した場合でも、幽門垂での *pyy* の遺伝子発現は胃での消化が完了した後に起こっていることから、哺乳類と同様に胃に対して消化が完了したシグナルとして利用されている可能性が高いと考えられる。クロマグロ *pyy* の遺伝子発現は、EP 給餌区のクロマグロ幽門垂において、胃から完全に内容物がなくなり pH も中性まで戻ってから発現が上昇している。これは、EP 飼料が難消化性のため、胃における消化完了シグナルが発せられるまでの時間が生餌給餌区よりもかかっていることが原因であると予想される。*pyy* の発現の遅延により、消化管に対しての消化完了シグナルが遅れてしまっているため、消化管に対して負荷を与えていることが消化物の有無だけでなく、内分泌学的にも確かめられた。このことから、胃における消化は、今後の飼料開発において非常に重要な検討課題であるといえる。胃での消化は、消化酵素であるペプシンが主に担っているため、ペプシンの酵素特性に合わない成分を飼料から除去することで、胃での消化効率を高めることが可能になるものと考えられる。

消化と成長を直接結びつける物質は少なく, その中でも消化によって成長に直接影響を与えるホルモンとして Ghrelin が知られている。³³⁾ ラット *Rattus norvegicus* において, Ghrelin は胃で分泌され, 成長ホルモンの放出を促すホルモンとして同定され, その後多くの研究によって, 魚類においても同様に, 成長ホルモンの分泌刺激, 食欲の亢進, 胃での消化促進など多くの機能が確かめられてきた。³⁴⁻³⁶⁾ 胃における ghrelin の発現調節は, その個体の栄養状態に大きく影響を受け, 絶食時に発現が上昇し, 給餌後に減少することから, 少ない栄養を効率的に成長へと利用するための適応の 1 種であると考えられている。³⁷⁾ クロマグロにおいては, 胃の ghrelin の発現が, EP 給餌区の方が生餌給餌区よりも有意に高く, その発現上昇も生餌区よりも長く保たれていた。これは, EP 摂餌によって, 体内に吸収される栄養やエネルギーが生餌摂餌に比べて少ないため, その少ない栄養を使って体の成長を促進するために, ghrelin の発現が上昇したと考えられる。しかし, Ghrelin によって引き起こされると言われている成長ホルモン (gh) の発現は, 胃における ghrelin の発現上昇と無関係に, 増減が認められた。これは, 成長ホルモン自体の発現調節には, Ghrelin 以外の要因が数多く存在していることが原因であることが考えられる。クロマグロにおいては, gh mRNA の発現には日周リズムがあることが知られている。¹⁴⁾ 本研究では, サンプリング時間は, 給餌後の時間は違うものの全て日中になるように調節したため, 日周リズムには gh mRNA 発現はそれほど依存していないと考えられる。しかし, 生餌給餌区と EP 給餌区で同じような発現変動パターンを示したことは, 日中であっても gh mRNA 発現においては細かなリズムが存在している可能性を示しており, 給餌からの経過時間も含めて今後の研究が必要である。しかし, ghrelin の発現量は明らかに EP 給餌区が増加していたのに対して, gh の発現量は有意差こそないものの生餌給餌区の方が給餌後の時間に関わらず高めに推移していた。これは, 胃に餌が無いことによって引き起こされる ghrelin の発現に加えて, 脳下垂体における gh の発現調節に摂餌した餌の性状などが影響を与える可能性が示唆される。末梢器官から gh の発現を亢進するホルモンは現在までのところ, Ghrelin しか知られていないが, 反対に gh 発現を抑制する物質は数多く存在しており, 例えばインスリン様成長因子 (IGFs) などの影響も考えなければならない。IGFs は, 成長ホルモンの刺激により肝臓から主に放出され, 体のほとんどの器官や細胞の成長を促すが,^{38,39)} IGFs による Gh 放出の負のフィードバック効果も知られていることから,^{40,41)} 何らかの餌の成分によって影響を受けている可能性も考えられる。今後は, 成長という単純な言葉で説明されてしまう現象について, 関わる

多くの要素をそれぞれ調査し, クロマグロが摂取する飼料が成長に与える影響を詳細に研究していく必要がある。

以上, 本研究によって, クロマグロは飼料の性質, 特に消化性に適応するために, 自らの消化管の形態に加えて, 産出する酵素を変化させて, より適切な餌料の消化能を獲得し成長していくことが明らかになった。さらに, その変化は飼料を切り替えて 1 ヶ月と非常に短期間に起こるが, 実際の養殖においてはこの 1 ヶ月が非常に重要であり, 克服すべき課題である。さらに, この適応能力の獲得には, 消化関連遺伝子が深く関わっていることが示唆された。本研究で得られた, クロマグロの飼料の違いにおける消化, 成長に関わる生物学的な基礎的知見は今後の実際の養殖に役立つ EP 飼料の効率的な開発に大いに貢献出来るものであると考える。

謝 辞

本研究は水産庁, 海面養殖業振興対策費のうち資源・環境に優しいクロマグロ増養殖技術開発事業の一環として行なわれた。

文 献

- 1) ISC. Stock assessment of bluefin tuna in the Pacific Ocean in 2014, Federated States of Micronesia. 2014: 52-53.
- 2) Tsuda Y, Sakamoto W, Yamamoto S, Murata O. Effect of environmental fluctuations on mortality of juvenile Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, in closed life-cycle aquaculture. *Aquaculture* 2012; **17**: 142-147.
- 3) 宮下 盛. 種苗供給能力と製品出荷までの生残率. 養殖ビジネス, 緑書房, 東京. 2014; 7-9
- 4) Miyashita S. Studies on the seedling production of the Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis*. *Bull. Fish. Lab. Kinki Univ.* 2002; **8**: 1-171.
- 5) Sawada Y, Miyashita S, Aoyama M, Kurata M, Mukai Y, Okada T, Murata O, Kumai H. Rotifer size selectivity and optimal feeding density of bluefin tuna, *Thunnus orientalis*, larvae. *Suisanzoshoku* 2000; **48**: 169-177.
- 6) Seoka M, Kurata M, Tamagawa R, Biswas AK, Biswas BK, Yong ASK, Kim YS, Ji SC, Takii K, Kumai H. Dietary supplementation of salmon roe phospholipid enhances the growth and survival of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* larvae and juveniles. *Aquaculture* 2008; **275**: 225-234.
- 7) National Research Council. Nutrient Requirements of Fish. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC. 1993; 114.
- 8) Klein S, Cohn SM, Alpers DH. The alimentary tract in nutrition. In: Shils ME, Olson AJ, Shike M, Ross AC (eds). *Modern Nutrition in Health and Disease*, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD. 1998; 605-630.
- 9) Jobling M. Influences of food particle size and dietary energy content on patterns of gastric evacuation in fish: test of a physiological model of gastric emptying. *J. Fish Biol.* 1987; **30**: 299-314.
- 10) Cheng Z, Buentello A, Gatlin DM. Dietary nucleotides influence immune responses and intestinal morphology of red drum *Sciaenops ocellatus*. *Fish Shellfish Immunol.*

- 2011; **30**: 143–147.
- 11) Anson ML. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 1938; **22**: 79–89.
 - 12) Caruso G, Pasqualea FD, Mitab DG, Micalea V. Show more Digestive enzymatic patterns as possible biomarkers of endocrine disruption in the red mullet (*Mullus barbatus*): A preliminary investigation. *Mar. Pollut. Bull.* 2016; **105**: 37–42.
 - 13) Albo PW, Hall RD, Corbett JT, Schroder J. Activation of nonspecific lipase (EC 3.1.1.–) by bile salts. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; **835** (3): 477–490.
 - 14) Adachi K, Kato K, Yamamoto M, Ishimaru K, Kobayashi T. Pulsed expression of growth hormone mRNA in the pituitary of juvenile Pacific bluefin tuna under aquacultured conditions. *Aquaculture* 2008; **281**: 158–161.
 - 15) Suda A, Kaiya H, Nikaido H, Shiozawa S, Mishiro K, Ando H. Identification and gene expression analyses of ghrelin in the stomach of Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012; **178**: 89–97.
 - 16) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.
 - 17) Murashita K, Fukada H, Hosokawa H, Masumoto T. Cholecystokinin and peptide Y in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): Molecular cloning, real-time quantitative RT-PCR, and response to feeding and fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006; **145**: 287–297.
 - 18) Horn MH. Biology of marine herbivorous fishes. *Oceanogr. Mar. Biol.* 1989; **27**: 162–272.
 - 19) Sibly RM. Strategies of digestion and defecation. In: Townsend CR, Calow P (eds). *Physiological Ecology: An Evolutionary Approach to Resource Use*. Blackwell Scientific, Oxford. 1981: 109–139.
 - 20) Biswas BK, Ji S, Biswas AK, Seoka M, Kim Y, Kawasak KI, Takii K. Dietary protein and lipid requirements for the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* juvenile. *Aquaculture* 2009; **288**: 114–119.
 - 21) 示野貞夫, 美馬孝好, 益本俊郎, 細川秀毅, 松島 至, 渡辺浩一. ブリ幼魚における大豆粕配合モイストベレット飼料の消化と血清成分の経時変化. 水産増殖 1994; **43**: 185–190.
 - 22) Matus-de-la-parra A, Rosas A, Lazzo JP, Viana MT. Partial characterization of the digestive enzymes of pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* under culture conditions. *Fish Physiol. Biochem.* 2007; **33**: 223–231.
 - 23) 北御門学, 立野新光. ニジマス消化酵素研究—II, Protease. 日本水産学会誌 1960; **26**: 685–690.
 - 24) 示野貞夫, 竹田正彦, 滝井健二, 小野俊和. ブリ幼魚における生餌および配合飼料の消化と血漿成分の経時変化. 日本水産学会誌 1993; **59**: 507–513.
 - 25) Einarsson S, Davies PS, Talbot C. Effect of exogenous cholecystokinin on the discharge of the gallbladder and the secretion of trypsin and chymotrypsin from the pancreas of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Comp. Biochem. Physiol.* 1997; **117C**: 63–67.
 - 26) Kofuji PY, Murashita K, Hosokawa H, Masumoto T. Effects of exogenous cholecystokinin and gastrin on the secretion of trypsin and chymotrypsin from yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) isolated pyloric caeca. *Comp. Biochem. Physiol.* 2007; **146A**: 124–130.
 - 27) Aldman G, Grove D, Holmgren S. Duodenal acidification and intra-arterial injection of CCK8 increase gallbladder motility in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 1992; **86**: 20–25.
 - 28) Murashita K, Fukada H, Rønnestad I, Kurokawa T, Masumoto T. Nutrient control of release of pancreatic enzymes in yellowtail (*Seriola quinqueradiata*): Involvement of CCK and PY in the regulatory loop. *Comp. Biochem. Physiol.* 2008; **150A**: 438–443.
 - 29) Jonsson E, Forsman A, Einarsdottir IE, Egner B, Ruohonen K, Björnsson B T. Circulating levels of cholecystokinin and gastrin releasing peptide in rainbow trout fed different diets. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006; **148**: 187–194.
 - 30) Koven W, Rojas-Garcia C, Finn R, Tandler A, Rønnestad I. Stimulatory effect of ingested protein and/or free amino acids on the secretion of the gastro-endocrine hormone cholecystokinin and on tryptic activity, in early-feeding herring larvae, *Clupea harengus*. *Mar. Biol.* 2002; **140**: 1241–1247.
 - 31) Bottcher G, Sjöberg J, Ekman R, Hakanson R, Sundler F. Peptide YY in the mammalian pancreas: immunocytochemical localization and immunochemical characterization. *Regul. Pept.* 1993; **43**: 11–130.
 - 32) Chen Y, Shen YB, Pandit NP, Fu JJ, Li D, Li JL. Molecular cloning, expression analysis, and potential food intake attenuation effect of peptide YY in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013; **187**: 66–73.
 - 33) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 1999; **402** (6762): 656–660.
 - 34) Kaiya H, Miyazato K, Kangawa K, Peter RE, Unniappan S. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 2008; **149A**: 201–210.
 - 35) Kaiya H, Miyazato K, Kangawa K. Recent advances in the phylogenetic study of ghrelin. *Peptides* 2011; **32**: 2155–2174.
 - 36) Kang KS, Yahashi S, Matsuda K. Central and peripheral effects of ghrelin on energy balance, food intake and lipid metabolism in teleost fish. *Peptides* 2011; **32**: 2242–2247.
 - 37) Won ET, Borski RJ. Endocrine regulation of compensatory growth in fish. *Front. Exp. Endocrinol.* 2013; **4**: 74.
 - 38) Schwander JC, Hauri C, Zapf J, Froesch ER. Synthesis and secretion of insulin-like growth factor and its binding protein by the perfused rat liver: dependence on growth hormone status. *Endocrinology* 1983; **113**: 297–305.
 - 39) Tannenbaum GS, Guyda HJ, Posner BI. Insulin-like growth factors: a role in growth hormone negative feedback and body weight regulation via brain. *Science* 1983; **220**: 77–79.
 - 40) Fruchtman S, Jackson L, Borski RJ. Insulin-like growth factor I disparately regulates prolactin and growth hormone synthesis and secretion: Studies utilizing the teleost pituitary model. *Endocrinology* 2000; **141**: 2886–2894.
 - 41) Wood AW, Duan CM, Bern HA. Insulin-like growth factor signaling in fish. *Int. Rev. Cytol.* 2005; **243**: 215–285.