ニジマスのリノレン酸要求量におよぼす ラウリン酸添加量の影響

竹内 俊郎・渡辺 武

(1977 年 2 月 16 日受理)

Dietary Levels of Methyl Laurate and Essential Fatty Acid Requirement of Rainbow Trout^{*1}

Toshio TAKEUCHI^{*2} and Takeshi WATANABE^{*2}

The present study was conducted to investigate whether in trout there is an increased requirement for dietary methyl linolenate as the lipid levels in the diet are increased. Feeding a diet containing 1% linolenate with 4% laurate resulted in a good growth rate, while the same diet containing 1% linolenate with 9% or 14% laurate resulted in reduced growth. With such elevated lipid levels, more than 2% linolenate was required for maximum growth. This result indicates that the elevated dietary laurate levels increase the requirement of rainbow trout for linolenate. On the other hand, dietary laurate levels exerted no significant effects on fatty acid composition, while there were marked changes in fatty acid distribution attributable to the presence of increasing levels of linolenate in the diet. The linolenate-free diet produced high percentages of 16:1, 18:1 and 20:3 ω 9, and these levels were lowered by the addition of 1% linolenate, regardless of the amounts of laurate in the diets. Consequently, the EFA index, 20:3 ω 9/22:6 ω 3, showed low values even in the low-growth groups receiving diets containing 1% linolenate along with 9% or 14% laurate. This suggests that it is impossible to judge from the EFA index whether or not fish are receiving a sufficient amount of EFA to maximize growth. The requirement of rainbow trout for linolenate and ω 3-HUFA can be postulated to be around 20% and 10% of the dietary lipids, respectively.

ニジマスは必須脂肪酸 (EFA) として ω 3 系列の不飽和脂肪酸を要求し、リノレン酸の場合には飼料中 1%⁽¹⁻³⁾で、ドコサヘキサエン酸あるいは ω 3 高度不飽和脂肪酸混合物 (ω 3-HUFA: 20:5 ω 3 および 22:6 ω 3) の場合には 0.5%⁽⁴⁾で要求量が満足されることが明らかにされている。EFA の摂取が要求量を満たしているか否かの判定の指標としては、体組織極性脂質の 20:3 ω 9 と 22:6 ω 3 の比が用いられ、ニジマスの場合には飼料中 0.7% 以上のリノレン酸を含む餌を与えた魚ではこの値が 0.4 以下となり、これより低い値を与える飼料は EFA 要求量を充足しているとされている^(3,5)。

しかし、これらの要求量は脂質含量が比較的低い飼料を用いて求められたものであり、EFA 要求量が脂質添加量によつてどのように変化するかについては明らかでない。本実験は脂質としてラウリン酸メチルのみを用いたとき、ラウリン酸の添加量によつてニジマスのリノレン酸要求量がどのように変化するかを明らかにする目的で行なつた。

実験方法

飼育方法および試験飼料の組成は既報⁽⁶⁾に準じた。用いたラウリン酸メチル (12:0) およびリノレン酸メ

^{*1} Studies on Nutritive Value of Dietary Lipids in Fish-IX.

^{*2} 東京水産大学増殖学科 (Laboratory of Fish Nutrition, Tokyo University of Fisheries, Konan 4, Minato-ku, Tokyo).

Table 1. Compositions of the experimental diets and percentages of 18:3 ω 3 in dietary lipids

Ingredient	Diet no.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Casein	54	54	54	54	54	54	54	54
α -Starch	15	15	15	15	15	15	15	15
Dextrin	16	16	16	16	11	11	6	6
Cellulose	5	5	5	5	5	5	5	5
Mineral mixture	4	4	4	4	4	4	4	4
Vitamin mixture	1	1	1	1	1	1	1	1
Methyl esters	12:0	4.5	4	3	9	8	14	13
	18:3 ω 3	0.5	1	2	1	2	1	2
18:3 ω 3/Dietary lipid (%)	0	10	20	40	10	20	7	13

Table 2. Results of the feeding experiment after 12 weeks*

Diet no.	Av. body wt (g)		Percent gain	Feed conversion	Hepatosomatic index	Mortality
	Initial	Final				
1	0.9	3.0 $\pm$ 1.00	233	0.80	2.44	13.3
2	0.9	5.4 $\pm$ 1.05	500	1.02	1.70	0
3	0.9	6.3 $\pm$ 1.63	600	1.05	1.37	0
4	0.9	6.2 $\pm$ 0.91	589	0.94	1.37	2
5	0.9	5.6 $\pm$ 0.78	522	0.96	1.41	4
6	0.9	6.3 $\pm$ 1.79	600	1.00	1.25	4
7	0.9	4.5 $\pm$ 1.15	400	0.91	1.48	2
8	0.9	4.9 $\pm$ 1.28	444	0.89	1.41	4

* The growth rate was extremely low in fish on diet 1, lacking methyl linolenate. Addition of 1% linolenate (diet 3) remarkably improved the growth rate and feed conversion. Elevation of the linolenate level from 1 to 2% at the 5% lipid level did not result in any further increase in growth and feed conversion (diet 4). On the other hand, the 1% linolenate diet containing 9% or 14% laurate resulted in lower growth rate than the same diet containing 4% laurate, and in the elevated laurate levels a dietary linolenate ratio of more than 2% was required for maximum growth.

チル (18:3 ω 3) の純度はガスクロマトグラフ (GLC) で調べた結果ではそれぞれ 99% および 70% であつた。使用に当つては純度を補正した量を添加した。

試験に用いたニジマス *Salmo gairdneri* は、東京水産大学大泉実習場より入手した発眼卵を当研究室でふ化させ、飼育選別をくりかえした後、試験開始前 3 週間無脂肪飼料で予備飼育したものである。試験区はラウリン酸メチルとリノレン酸メチルの添加量により Table 1 に示す 8 区を設けた。各区 50 尾とし、飼育は 12 週間行なつた。

飼育試験終了後、各区より 10 尾あてを一般分析に供し、残りの魚は肝臓を摘出し Folch らの方法⁷⁾により脂質を抽出した。抽出油は Bio-beads を用いるゲルろ過により極性脂質と非極性脂質に分画し⁸⁾、極性脂質はけん化後、メチル化し GLC で脂肪酸組成を分析した。脂肪酸組成の分析には島津ガスクロマトグラフ GC-6A 型 (水素炎イオン化検出器付) を使用をした。充てん剤には 15% DEGS を用い、分析条件は前報⁹⁾に準じた。

実験結果および考察

成長とリノレン酸要求量 飼育試験終了後に測定した各区の魚の平均体重、増重率、飼料効率、比肝重値および死亡率の結果を Table 2 に、飼育期間中の平均体重の変化を Fig. 1 に示した。

今まで報告されている実験結果と同様に、EFA 欠乏区 (diet 1) では増重率および飼料効率が低く、比肝重値、死亡率が高かった。EFA 欠乏飼料にリノレン酸を 0.5% 添加 (diet 2) すると成長および飼料効率が著しく改善され、比肝重値が低下した。さらに、添加量を 1% (diet 3) にすると Fig. 1 にみられるようにニジマスは最大の成長を示した。しかし、添加量を 2% に増加しても 1% 添加以上の増重効果は認められず、すでに報告した結果とよく一致した^{8,9)}。一方、ラウリン酸添加量を 4% から 9% あるいは 14% に増加するとリノレン酸 1% 添加 (diet 5 および 7) ではラウリン酸 4% 添加 (diet 3) の場合に比べ、増重率、飼料効率等が劣り、ラウリン酸 4.5% に対してリノレン酸を 0.5% 添加した区 (diet 2) と同等的か、それ以下の添加効果しか得られなかった。しかし、ラウリン酸 8% に対してリノレン酸を 2% 添加した区 (diet 6) ではラウリン酸 4% にリノレン酸 1% 添加した区と同様に最大成長が得られた。また、ラウリン酸 13% に対してリノレン酸を 2% 添加した区 (diet 8) では成長が 2 および 6 区より劣り、リノレン酸添加量が不足していることを示していた。すなわち、ラウリン酸の添加量を増すとそれにともなつて最大成長に要するリノレン酸の量も増加し、飼料中 4% のラウリン酸の場合は 1%, 8% では 2%, 13% では 2% 以上のリノレン酸の添加が必要であることが明らかとなった。

今回の結果は飼料脂質として飽和脂肪酸であるラウリン酸のみを用いた場合であり、魚の EFA 要求量は添加油脂の脂肪酸組成によつても異なることが知られている。例えば、リノール酸を多量に含む植物油を用いたときには、YU^{10),11)} が報告しているようにリノレン酸に対するリノール酸の拮抗阻害が起こり、また、渡辺⁹⁾ が報告しているように ω 3-HUFA を比較的多量に含む魚油の場合には EFA は少量で足りる。こ

Fig. 1. Effect of dietary lipids on growth rate and feed conversion (g gain/g feed). Curve 1, the EFA-deficient diet containing 5% methyl laurate. Curve 2, 4.5% methyl laurate diet containing 0.5% methyl linolenate. Curves 3, 5 and 7, 1% methyl linolenate diets, containing 4, 9 and 14% methyl laurate. Curves 4, 6 and 8, 2% methyl linolenate diets, containing 3, 8 and 13% methyl laurate. Curves with marks of ○, ● and ◐ in the right indicate those obtained from the fish fed diets containing 5, 10 and 15% lipid, respectively.

Table 3. Fatty acid compositions of soybean oil and pollock liver oil (%)

Fatty acid	Soybean oil	Pollock liver oil	3% Soybean oil 2% Pollock liver oil	Fatty acid	Soybean oil	Pollock liver oil	3% Soybean oil 2% Pollock liver oil
14 : 0	0.1	4.1	1.7	20 : 1		15.5	6.2
16 : 0	11.1	11.9	11.4	20 : 5 ω 3		11.9	4.8
16 : 1		9.2	3.7	22 : 1		10.7	4.3
18 : 0	4.7	1.7	3.5	22 : 4 ω 6		0.6	0.2
18 : 1 ω 9	23.6	19.2	21.8	22 : 5 ω 3		1.1	0.4
18 : 2 ω 6	52.8	0.8	32.0	22 : 6 ω 3		5.6	2.2
18 : 3 ω 3	7.7	0.4	4.8	$\Sigma\omega$ 6	52.8	1.7	32.4
18 : 4 ω 3		2.0	0.8	$\Sigma\omega$ 3	7.7	21.0	13.0

のように添加油脂の種類によっても EFA 要求量は異なるので、飼料に油脂を添加する場合には使用する油脂の量的、質的な吟味を行う必要があると考えられる。

CASTELL ら¹²⁾はニジマスのリノレン酸要求量を飼料の全カロリーに対するリノレン酸のカロリーで表わしている。しかし、今回の実験で明らかになったようにリノレン酸の要求量は飼料中の脂質含量によつて変化するので、カロリーを基準としてリノレン酸の要求量を表わすより、飼料脂質の必須脂肪酸含量を基準とした方が妥当と考えられる。すなわち、Table 1 に示したようにニジマスが最大成長を得るためには添加脂質に少なくとも 20% 以上のリノレン酸を含むことが必要である。リノレン酸よりも高い EFA 力価を有する ω 3-HUFA の場合は 10% 以上となる。いま、Table 3 に示したような脂肪酸組成を有する大豆油と肝油を 3 : 2 で混合した場合を例にとつて、大豆油および肝油中の $\Sigma \omega$ 3 脂肪酸を $C_{18} \omega$ 3 脂肪酸と ω 3-HUFA に分けて計算すると、3 g の大豆油に 18 : 3 ω 3 が 0.23 g、2 g の肝油に 18 : 3 ω 3 と 18 : 4 ω 3 が 0.05 g、 ω 3-HUFA が 0.37 g となる。従つて添加油の EFA の含量は、 ω 3-HUFA の EFA 力価を $C_{18} \omega$ 3 脂肪酸の 2 倍と考えてリノレン酸に換算すると、 $(0.23+0.05)+0.37 \times 2=1.02$ 、 $1.02/5 \times 100=20.4\%$ となりニジマスの EFA 要求量を満足していることになる。しかし、混合油 10% 添加の場合には飼料に対する肝油の添加量を 4% ないし 5% (大豆油 : 肝油=6 : 4 あるいは 5 : 5) にする必要があると考えられる。

Table 4. Proximate compositions of the experimental fish after 12 weeks (%) *

Diet no.	Whole body			Muscle			Liver
	Moisture	Protein	Fat	Moisture	Protein	Fat	Fat
Initial	80.9	14.1	3.1	—	—	—	11.6
1	79.0	14.4	4.2	78.9	18.0	2.8	8.5
2	76.4	14.8	6.6	77.7	18.5	3.3	5.1
3	75.6	15.6	6.9	77.4	19.3	2.9	4.7
4	75.5	15.1	7.4	77.5	19.4	3.0	3.5
5	74.8	15.3	8.7	76.8	18.9	4.3	5.3
6	73.6	15.0	9.4	76.5	19.0	3.8	4.1
7	75.2	14.4	7.8	76.6	18.8	5.1	4.6
8	74.9	14.9	8.6	76.4	19.3	4.4	4.0

* In the fish receiving the EFA-deficient diet (diet 1), the high water content reflected the low protein and low lipid levels in both the whole bodies and muscle. Addition of linolenate to the diet lowered the water content and increased protein content in the muscle and lipid content in the whole bodies. Increasing levels of the dietary laurate (diets 5, 6, 7 and 8) elevated lipid contents in the whole bodies and muscle.

Table 5. Fatty acid compositions of the liver polar lipids (area %)*

Fatty acid	Initial	1	2	3	4	5	6	7	8
12:0	tr	0.1	0.2	0.2	0.3	0.3	0.4	0.5	0.5
14:0	1.8	1.9	2.2	2.0	2.5	2.7	3.4	3.6	3.5
16:0	17.8	13.9	16.2	16.8	20.2	20.9	21.5	19.9	20.5
16:1	12.9	11.9	8.6	6.6	5.0	5.9	4.6	5.4	4.2
18:0	5.2	4.6	6.3	6.8	8.8	9.0	9.4	8.1	9.5
18:1	30.0	41.4	30.8	24.5	17.3	19.9	15.3	19.6	14.6
18:2 ω 6	2.6	4.7	2.1	1.0	2.3	2.1	2.2	1.9	2.1
18:3 ω 6	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1
18:3 ω 3	0.1	0.1	0.3	0.8	1.9	0.8	1.9	1.0	1.9
18:4 ω 3	0.2	0.2	0.2	0.3	0.3	tr	0.3	0.3	0.2
20:1	1.6	5.1	6.4	3.9	2.1	3.4	2.1	3.6	2.0
20:2 ω 9	2.6	3.2	3.0	2.3	1.0	1.7	0.9	1.9	0.9
20:2 ω 6/ 20:3 ω 9	8.9	8.4	6.2	4.3	2.4	4.2	2.3	3.9	2.3
20:3 ω 6	1.3	0.8	1.5	2.6	2.5	2.1	3.1	2.7	2.7
20:4 ω 6	1.4	0.6	1.1	2.1	3.7	2.6	3.4	2.3	4.0
20:5 ω 3	0.6	tr	0.4	0.8	1.5	1.2	1.1	1.0	1.7
22:4 ω 6	0.3	0.3	tr	tr	tr	—	—	tr	—
22:5 ω 6	0.7	0.3	1.0	1.6	1.1	1.5	1.3	1.3	1.6
22:5 ω 3	0.4	tr	0.8	1.3	1.0	1.0	1.1	1.2	1.4
22:6 ω 3	9.2	2.6	9.6	19.1	24.0	19.2	24.4	19.4	23.8
$\Sigma\omega$ 6	6.5	3.8	5.9	7.4	10.2	8.5	10.6	8.3	10.5
$\Sigma\omega$ 3	10.7	3.2	12.1	23.8	29.7	23.7	30.2	23.9	30.5
20:3 ω 9/ 22:6 ω 3	0.97	3.18	0.65	0.22	0.08	0.22	0.07	0.20	0.10

* The polar lipid of fish fed the EFA-deficient diet (diet 1) contained a high percentage of 16:1, 18:1 and 20:3 ω 9, and showed a high EFA index (the ratio of 20:3 ω 9 to 22:6 ω 3). Addition of 1% linolenate markedly lowered the levels of these fatty acids, regardless of the amounts of laurate in the diets. Consequently, the ratio becomes less than 0.4, which indicates a normal EFA status, even in the low-growth groups receiving 1% linolenate along with 9% or 14% laurate (diets 5 and 7). This result indicates that it is impossible to judge from the EFA index whether or not fish are receiving a sufficient amount of linolenate for obtaining maximum growth. It is also desirable to include a minimum percentage of EFA in dietary lipid for the evaluation of EFA status together with the EFA index. The requirement of rainbow trout for linolenate is estimated to be around 20% of dietary lipid under the experimental condition.

Yu ら^{10,11)}はリノレン酸とリノール酸の拮抗阻害作用を報告しているが、今回使用したリノレン酸メチルには約 30% のリノール酸が不純物として含まれており、そのため飼料に対し 1% 添加するとリノール酸を 0.43%, 2% 添加で 0.85% 含むことになる。本実験の結果では不純物として含まれているリノール酸の影響は明らかではないが、Yu らの報告より考えるとこの程度の量ではその影響はあまり大きなものではないと考えられる。

魚体の一般分析 各区試験魚の一般分析の結果を Table 4 に示した。EFA 欠乏区 (diet 1) では全魚体および筋肉とも水分含量が高く、粗蛋白質、粗脂肪含量が低く、ニジマスにおける EFA 欠乏の特徴を現わしていた²⁻⁵⁾。リノレン酸添加 (diet 2, 3 および 4) により水分含量は減少し、筋肉の粗蛋白質および全魚体の粗脂肪含量が増加した。飼料中の脂質含量が 10% および 15% 区 (diet 5, 6, 7 および 8) では 5% 添加区 (diet 3 および 4) に比べ、全魚体、筋肉とも粗脂肪含量が高かった。これは飼料中の脂質含量の

増加によるものと考えられる。先に、大豆油と肝油 (3:2) の混合油を 5~20% 添加した飼料をニジマスに与えた実験で、添加油の増加により全魚体、筋肉および内臓の脂質含量および腹腔内脂肪が増加することを報告したが*、今回のように添加油として脂肪酸のメチルエステルを使用した場合でも、組織脂肪が増加することがわかった。一方、コイの場合はリノール酸メチルを 15% 含む飼料を与えても体脂肪の著しい増加は認められなかった¹³⁾。肝臓においても今までの実験結果と同様、EFA 欠乏区 (diet 1) では脂質含量が高かったが、リノレン酸を 0.5% 以上添加した区ではラウリン酸の添加量に関係なく低く抑えられ、ほぼ一定の値を示した。すなわち、添加油を 5% から 15% に増加してもリノレン酸 1% 添加区 (diet 3, 5 および 7) では 4.6~5.3%, 2% 添加区 (diet 4, 6 および 8) では 3.5~4.1% となつた。

肝臓極性脂質の脂肪酸組成 各区試験魚の肝臓極性脂質の脂肪酸組成を Table 5 に示した。ラウリン酸 5% 添加区 (diet 1) では今までの結果と同様脂肪酸組成に EFA 欠乏魚の特徴が認められ、16:1, 18:1 および 20:3 ω 9 が著しく増加した。リノレン酸添加 (diet 2, 3 および 4) によりこれら脂肪酸の含量は低下し、22:6 ω 3 が著しく増加した。さらに 20:3 ω 9/22:6 ω 3 の値もリノレン酸 1% 添加 (diet 3) で 0.4 以下となつた。しかし、飼料中のラウリン酸添加量を 9% あるいは 14% に増加してもリノレン酸が 1% あれば、16:1, 18:1 および 20:3 ω 9 の含量は低く抑えられ、その他の脂肪酸もほぼ同じ組成割合を示すことがわかった。すなわち、飼料中のラウリン酸自身は添加量が増加しても肝臓極性脂質の脂肪酸組成にはほとんど影響を与えず⁴⁾、脂肪酸組成は飼料中のリノレン酸量によつて大きく左右される。従つて 1% 以上のリノレン酸を含む飼料では、20:3 ω 9/22:6 ω 3 の値は常に 0.4 以下となり、この値からだけでは最大成長に必要なリノレン酸の量を知ることはできない。また、ニジマスの EFA ではないリノール酸の添加によつても 20:3 ω 9 の含量が低下することが報告^{2,3,6)} されているため、20:3 ω 9/22:6 ω 3 は EFA の充足度を判定する重要な意味をもつてはいるが、この値のみでは不十分な面もあると考えることができる。

以上の実験結果より、ニジマスの EFA 要求量は、EFA 指数のほか成長、飼料効率などを総合して判断することが必要であると考えられる。

終りに、本研究を行うにあたり終始御指導を賜つた東京水産大学教授荻野珍吉博士および御校閤を賜つたカナダ政府環境省水産研究庁ハリファックス研究所の R. G. ACKMAN 博士に厚くお礼申し上げる。

文 献

- 1) T. WATANABE, F. TAKASHIMA, and C. OGINO: This Bull., **40**, 181-188 (1974).
- 2) T. WATANABE, I. KOBAYASHI, O. UTSUE, and C. OGINO: *ibid.*, **40**, 387-392 (1974).
- 3) T. WATANABE, C. OGINO, Y. KOSHIISHI, and M. MATSUNAGA: *ibid.*, **40**, 493-499 (1974).
- 4) T. TAKEUCHI and T. WATANABE: *ibid.*, **42**, 907-919 (1976).
- 5) J.D. CASTELL, D.J. LEE, and R.O. SHINNHUBER: *J. Nutrition*, **102**, 93-100 (1972).
- 6) T. WATANABE, F. TAKASHIMA, C. OGINO, and T. HIBIYA: This Bull., **36**, 623-630 (1970).
- 7) J. FOLCH, M. LEES, and G.H.S. STANLEY: *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-507 (1957).
- 8) J.C. SIPOS and R.G. ACKMAN: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **25**, 1561-1569 (1968).
- 9) T. WATANABE and T. TAKEUCHI: This Bull., **42**, 893-906 (1976).
- 10) T.C. YU and R.O. SHINNHUBER: *Lipids*, **10**, 63-66 (1974).
- 11) T.C. YU and R.O. SHINNHUBER: *Aquaculture*, **8**, 309-317 (1976).
- 12) J.D. CASTELL, R.O. SHINNHUBER, J.H. WALES, and D.J. LEE: *J. Nutrition*, **102**, 77-85 (1972).
- 13) T. WATANABE, T. TAKEUCHI, M. MATSUI, C. OGINO, and T. KAWABATA: This Bull., **43**, 印刷中 (1977).

* 竹内俊郎・渡辺 武・荻野珍吉：昭和 50 年度日本水産学会秋季大会（長崎）講演。