

クロマグロのストレス反応とその発育変化^a

石橋泰典,^{1*} 森川真理,¹ 宮下 盛,² 澤田好史,² 岡田貴彦,² 倉田道雄²

(種苗生産・養殖グループ)

¹近畿大学大学院農学研究科, ²近畿大学水産研究所

* isibasi@nara.kindai.ac.jp

近年、養殖技術の急速な発展とともに、ヒラメやマダイを中心とした多くの海産種苗が大量生産されるようになった。しかし、日本人が最も嗜好するクロマグロ *Thunnus thynnus orientalis* の完全養殖は困難を極め、近畿大学水産研究所が2002年、ようやく世界に先駆けて成し遂げた事は記憶に新しい。¹⁾ 現在、クロマグロ養殖は、食資源としての需要の増大と天然資源枯渇の危機から世界的に注目を浴び、大量生産への期待は高まるばかりである。しかし、その量産化には様々な問題が存在し、特に種苗生産過程に起こる衝突死の発生防止がクロマグロ量産における最大の難関とされている。

衝突死は、従来、陸上水槽で頻繁に発生し、稚魚の99%以上がへい死する重大な問題であった。しかし、30mを超える大型イケスの使用が、衝突死によるへい死を50~90%程度にまで引き下げることに成功した。²⁾ 現在では陸上水槽で稚魚を保持することを避け、できるだけ早くに海上イケスへ沖出しするため、この問題は解決されたかのように思われた。しかし、沖出し直後のわずか数日間で、全体の40~70%に達する大量死の発生することが、新たな問題として浮上した。現在、クロマグロの量産化を阻む極めて重要な課題として、その解決が切望されている。

この問題の背景には、飼育環境の変化に対するクロマグロ特有の反応が関与すると考えられる。特に網生簀養殖では、環境変化に対して魚が逃避できないため、様々なストレス作用因子が負荷されることになるが、これまでのところ、クロマグロ

のストレス反応に関する研究は全く見当たらない。クロマグロは他魚種に比べて酸素消費量が極めて高い³⁾ことから、養殖場の低酸素化は、生残率等に大きな被害を及ぼす要因になるが、クロマグロの低酸素耐性や適応に関する研究もほとんど見受けられない。そこで本研究は、まず、クロマグロにおけるストレス反応の特徴を明らかにするため、仔稚魚および若魚を用いて、低酸素負荷に対するストレス反応の様相とその発育変化を検討した。

試料および方法

実験 I 低酸素状況下のストレス反応 クロマグロが低酸素状況下でどのような適応反応を示すかを明らかにするため、80日令の若魚を用いてストレス反応の様相を調べた。低酸素ストレスの負荷方法は、魚を1t水槽に収容し、窒素ガスの送気によって溶存酸素量(DO)を6.5から1.7mg/Lまで約4時間かけて徐々に低下させるものとした。実験開始時、DO 3.2, 2.3mg/L および死亡直前の魚を採取し、血液性状、血漿コルチゾル含量および各種組織の化学成分を測定した。

実験 II 低酸素ストレス負荷後の影響 クロマグロがストレス後に回復する能力やその際の生理的反応を明らかにするため、80日令の若魚を用いて低酸素ストレス負荷後の影響を検討した。低酸素ストレスの負荷方法は、実験Iとほぼ同様にDOを約2時間かけて6.2から2.2 mg/Lまで徐々に低下させるものとし、その後直ぐに開始時のDOに戻して魚の回復の程度を調べた。すなわち、実験開始時、死亡直前、DO回復後の0.75、

^a クロマグロの衝突死とその発生防止法 - I

1.5, 3, 6 および 12 時間目に魚を採取し、血液性状、血漿および各種組織の化学成分を測定した。

実験 III 発育に伴うストレス反応の変化
クロマグロのストレス反応が、どの発育段階から顕著に現れるかを明らかにするため、様々な日令の魚を用いて発育に伴うストレス反応の変化を検討した。供試魚は、1, 9, 18, 27, 36, 50 および 80 日令の仔稚魚および若魚とし、実験 I で示した低酸素ストレスを負荷して、平均致死 DO を測定した。ストレス負荷前後には魚を採取し、全魚体のコルチゾル、ATP、エネルギー充足率および乳酸含量をそれぞれ測定した。

測定項目および方法 実験 I および II では、採取した血液の一部を分取し、赤血球数(RBC)、ヘマトクリット(Ht)値およびヘモグロビン(Hb)濃度を定法により測定した。また、RBC、Ht 値および Hb 濃度から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)の平均赤血球指数をそれぞれ算出した。残りの血液は、遠心分離後に血漿を分取し、各種化学成分の測定に供するまで -80°C で凍結保存した。

血漿および全魚体のコルチゾル含量は、エーテル抽出した後に、エンザイムイムノアッセイでそれぞれ測定した。抗体は、魚類のコルチゾルと高い反応を示す抗ウサギコルチゾル抗体 (FKA404-E, Cosmo Bio 製)、標識コルチゾルはホースラディッシュペルオキシターゼで標識したコルチゾル-3-CMO-HRP (FKA403, Cosmo Bio 製)をそれぞれ用い、POD (ELISA POD 基質 OPD キット, ナカライテスク製) を基質として発色させて、450nm の吸光度を測定した。血漿の遊離グルコース含量は、ムタロターゼ・GOD 法を用いて測定した。

全魚体および各種組織の一部は、10% 過塩素酸で抽出し、アデニンヌクレオチドおよびクレアチンリン酸含量をそれぞれ測定した。すなわち、0.2M NaH_2PO_4 、0.025M tetrabutyleammonium hydroxide, pH 6.0, 12%(v/v) methanol を移動相とし、COSMOSIL PACKED COLUMN (4.6 ×

250mm, ナカライテスク株式会社)を用いて流速 1.0mL/min, 測定波長 254nm および 210nm の条件でそれぞれ測定した。ATP, ADP, AMP 含量より Energy Charge(EC) = $(\text{ATP} + 1/2 \text{ADP}) / (\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP})$ を算出した。また、乳酸含量は酸抽出した後に酵素法で測定した。

統計処理 各測定値は Bartlett's test で分散の検定を行ない、有意差のない場合には ($p > 0.05$)、一元配置分散分析の後に Duncan の多範囲検定法で有意差を調べた。また、Bartlett's test で分散に差がみられた場合には、Kruskal-Wallis test の後に Mann-Whitney U-test を行ない、統計的有意差を検定した。

結果および考察

実験 I 低酸素状況下のストレス反応 クロマグロ若魚の平均致死 DO は 1.8 mg/L と他魚種に比べて顕著に高く、低酸素に極めて弱いことが観察された。魚の赤血球数およびヘマトクリット値は死亡直前に有意に増加したが、平均赤血球指数に顕著な変化はみられなかった。また、各種組織の ATP 含量に顕著な差異はなく、エネルギー充足率も普通筋で死亡直前に減少したものの、その他の組織に大きな変化はみられなかった。一方、血漿コルチゾル含量は死亡直前に顕著に増加した。また、乳酸含量は調べた全組織で有意に増加し、普通筋のクレアチンリン酸含量は、DO 3.2mg/L より顕著に減少した。これより、クロマグロ若魚は、低酸素状況下で赤血球や代謝抑制による適応反応を十分に示さず、コルチゾル分泌と普通筋のクレアチンリン酸や各種組織における嫌氣的解糖の亢進によってエネルギー生産を行うことが示された。

これまでに報告されたイシダイ¹⁾、マダイ⁵⁾、ティラピア⁶⁾、トラフグなどは、低酸素が負荷されると、まず呼吸数の増加や血球の膨潤により獲得酸素量の増大を図る。(図 1) 次にコルチゾル-ストレス反応によってグルコースの放出を行うとともに、各

種組織の代謝を抑制してエネルギーの節約を図

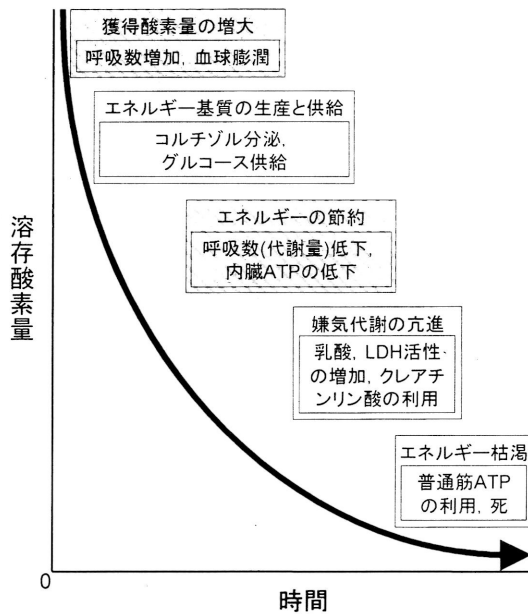


図1. 低酸素負荷に対するティラピア、マダイ、インダイ、トラフグ、クロマグロのストレス反応の比較。クロマグロだけが、低酸素下で斜線表示の機能を明確に示さない。

る。そして最終的にクレアチンリン酸の利用や嫌気代謝亢進を行って死ぬことが報告されている。これに対し、クロマグロ若魚では、低酸素状況下で呼吸数増加、赤血球膨潤による獲得酸素量の増大や代謝抑制による適応反応を示さず、コルチゾル分泌とクレアチンリン酸や嫌気代謝亢進によるエネルギー生成のみを行うことが示された。呼吸数増加、赤血球膨潤、代謝抑制などは、いずれも低酸素時に一定区域にとどまる魚に得意な適応戦略とされ、ティラピア⁶⁾などは無酸素状態で1/10にまで標準代謝量を低下することが報告されている。クロマグロはそのような適応戦略を行わず、低酸素に対して嫌氣的エネルギー生成を中心とする逃避行動的な適応様式を取ることが示唆された。

実験 II 低酸素ストレス負荷後の影響

死亡直前に血液性状の顕著な変化はなかったが、平均赤血球血色素量はDO回復の1.5時間目に増加した。血漿コルチゾル含量は、死亡直前からDO回復1.5時間目までは高い値を維持し、その後低下したが、グルコース含量はDO回復0.75時間目より逆に増加した。ATP含量およびエネルギー

充足率に顕著な変化はなかったが、普通筋のクレアチンリン酸含量は死亡直前に激減し、DO回復0.75時間目には元の値に回復した。また、死亡直前の乳酸含量は、調べた組織で有意に増加し、DO回復6時間目までに開始時の値に戻った。これより、クロマグロ若魚は、DO回復後に速やかにクレアチンをリン酸化状態に戻し、その後は6時間以内に、コルチゾルや乳酸値を低下させることがわかった。すなわち、クロマグロ若魚の致死DOは1.8mg/Lと、低酸素に極めて弱いものの、ストレス後には早期に回復できる特徴を有することが示唆された。

実験 III 発育に伴うストレス反応の変化

低酸素を負荷した魚の平均致死DOは孵化直後に0.7mg/Lと最低値を示したが、発育に伴って顕著に高くなり、18日令の仔魚から稚魚への移行期には3.8mg/L前後の最大値を示した。平均致死DOはその後に低下したが、50日令の稚魚から若魚への移行期に再び上昇し、その後緩やかな低下傾向を示した。これより、クロマグロの低酸素耐性は、発育段階の移行期にそれぞれ低下することがわかった。マダイ、ヒラメおよびトラフグでも、仔魚から稚魚への移行期には変態に伴って基礎代謝が増加するため、低酸素耐性の低下することが明らかにされている。クロマグロでも仔魚から稚魚への移行期に酸素消費量が増加する³⁾ため、低酸素耐性が低下したのであろう。

18日令までの全魚体コルチゾル含量に大きな変化はみられなかったが、27日令におけるストレス区のコルチゾル含量は対照区よりも顕著に増加し、その程度は発育に伴って50日令まで増大した。(図2) また、対照区のATP含量およびエネルギー充足率は50日令まで増大し、その後低下したが、ストレス区では、27日令から対照区のそれよりも著しく低下し、その程度は50日令が最も顕著であった。一方、両試験区の乳酸含量は発育に伴って増大したが、27日令以降におけるストレス区の乳酸含量は、対照区のそれよりも顕著に増大した。すなわち、コルチゾル-ストレス反応と嫌気代謝亢進による適応反応は、稚魚期以降

に顕著になることがわかった。

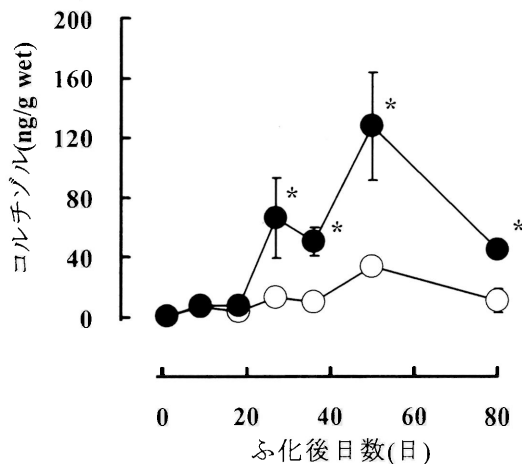


図2. クロマグロの全魚体コルチゾル含量に及ぼす低酸素ストレス負荷の影響とその発育変化. ○, 対照区; ●, ストレス区. * 対照区の値に対する有意差あり($p < 0.05$).

衝突死とストレス反応 クロマグロの衝突死は稚魚期になってから発生することが報告されている。²⁾ また、陸上水槽から海上イケスへの沖出し作業は、ハンドリングに対応できる稚魚でないと行えない。本研究の結果、クロマグロは、低酸素などの環境変化に対して逃避的な行動を取ること、稚魚期には顕著なコルチゾル-ストレス反応の起こることが明らかになった。必ずしも低酸素がクロマグロの衝突死を引き起す原因になっている訳ではないが、陸上水槽や沖出し後の衝突死発生にはストレス反応の関与する可能性が強く示唆された。

謝 辞

本研究の実施にあたり、ご協力を頂きました近畿大学水産研究所大島実験場、近畿大学養殖種苗センター白浜事業場、並びに水産増殖学研究室の教職員、学生諸氏に心より感謝致します。

文 献

1) 澤田好史. クロマグロの完全養殖. 海洋理工学

会誌 (印刷中).

- 2) 宮下 盛. クロマグロの種苗生産に関する研究. 近畿大学水産研究所報告, 2002; 8: 1-171.
- 3) Miyashita S, Hattori N, Sawada Y, Ishibashi Y, Nakatsukasa H, Okada T, Murata O, Kumai H. Ontogenetic change in oxygen consumption of Bluefin tuna, *Thunnus thynnus*. *Suisanzoshoku* 1999; 47: 269-275.
- 4) 石橋泰典. 海水養殖魚のアスコルビン酸要求に関する研究. 近畿大学水産研究所報告, 1994; 4: 1-100.
- 5) Ishibashi Y, Hirata H, Kumai H. Stress response and energy status in various tissues of red sea bream, *Pagrus major*, subjected to hypoxic exposure. *Suisanzoshoku* 2002; 50: 315-323.
- 6) Ishibashi Y, Yonezawa H, Miyashita S, Kato K, Murata O, Hirata H, Kumai H. Response of enzyme activities and metabolite concentrations in various tissues of red sea bream, *Pagrus major*, subjected to hypoxic exposure. *Suisanzoshoku* 2002; 50: 325-331.
- 7) Ishibashi Y, Ekawa H, Hirata H, Kumai H. Stress response and energy metabolism in various tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to hypoxic conditions. *Fish. Sci.* 2002; 68: 1374-1383.
- 8) Ishibashi Y, Inoue K, Nakatsukasa H, Ishitani Y, Miyashita S and Murata O. Ontogeny of tolerance to hypoxia and oxygen consumption of larval and juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture* 2005; 244: 331-340.
- 9) Ishibashi Y, Kotaki T, Kataoka M, Yamada Y. Ontogeny of hypoxic tolerance and energy metabolism of larvae and juvenile in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *European Aquaculture Society, Special Publication* 2004; 34: 436-437.