

3 倍体アマゴの酸素消費量と血液性状*

中村聡一**・今井直人**・大家正太郎***・小林 博**

Oxygen Uptake Rate and Hematological Characteristics
in Triploid Amago Salmon, *Oncorhynchus masou macrostomus**Soichi NAKAMURA**, Naoto IMAI**, Shotaro OIYA***
and Hiroshi KOBAYASHI**

Synopsis

Oxygen uptake rates of triploid amago salmon, *Oncorhynchus masou macrostomus*, induced by heat shock of the fertilized eggs and of normal diploid fish were measured under resting and normoxic conditions. The hematology of the fish was also studied. The fish had the same parents, and were reared under the same conditions with the same feed. During the experiments, each fish was placed into a tube-like respiration chamber and two separate but neighboring chambers were used at a time, one for triploid and the other for diploid fish. When the flow rate of the water irrigating the respiration chamber was 200 ml/min, there was no significant difference between the oxygen uptake by the triploid and diploid fish. The higher the water temperature was, the greater the oxygen uptake of both kinds of fish. Triploid fish had a larger mean erythrocyte volume (MCV), but lower erythrocyte count (RBC) than the diploid fish; hematocrit (Ht), total blood hemoglobin content (Hb), and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) were about the same. Calculations from these results by use of a simplified model for erythrocyte shape showed that the total surface area of erythrocytes in 1 mm³ of blood of the triploid fish was 13% smaller than that of the diploid fish. The morphological differences in erythrocyte between the triploid and diploid fish did not directly affect their oxygen uptake rate.

I 緒 言

倍数性魚類は、発生学上の特徴から魚種によって程度の差はあるが生殖腺の発達が不完全となり、一般に不妊性を呈する¹⁻³⁾。したがって、それに起因する成長量の増加に伴う生産性の向上、あるいは単性養殖と同等の飼育管理の可能性などにより、近年、倍数性魚類は水産養殖上注目されている。倍数性魚類の研究において、誘導方法に関するものは数多いが、作出された魚類の生理的特性についての研究は

少なく、わずかにアユ *Plecoglossus altivelis*、ニジマス *Salmo gairdneri* 等について酸素消費量や活動性をみたものがあるに過ぎない⁴⁻⁶⁾。倍数性魚類、たとえば3倍体魚では赤血球細胞が2倍体魚のそれより大きいということは多くの研究者の指摘するところであり⁷⁻¹³⁾、このことと呼吸機能との関係を研究することは生物学上興味があるばかりでなく、水産学上にも重要な意義を持っている。本研究はアマゴ *Oncorhynchus masou macrostomus* の3倍体魚を用

* 本報告の概要は、昭和63年3月、日本水産学会春季大会(東京)において発表した。

** 水産学水産生物学研究室 (Lab. of Fish Biology, Dept. of Fisheries, Kinki Univ., Higashi-Osaka, Osaka, 577, Japan)

*** 水産研究所新宮実験場 (Fisheries Laboratory of Kinki Univ., Shingu, Takata, Shingu, Wakayama, 674-11, Japan)

いて安静時の酸素消費量を求め、また血液性状、とくに赤血球恒数との関連において正常魚(2倍体魚)との差異を明らかにするために行われたものである。

II 材料および方法

供試魚は近畿大学水産研究所新宮実験場で、1985年11月に養殖アマゴ親魚から実験用に採卵・受精して得たものである。3倍体魚の作出は温度処理、すなわち受精後5分より6分間30°Cに保つことにより行い、処理を行わなかったものを対照魚(2倍体魚)として、それぞれを同一条件で飼育した。なお、温度処理を施した魚が3倍体であることの判定は赤血球の長径を2倍体魚のそれと比較することにより行った。その結果、今回実験に用いた温度処理魚はすべて3倍体であることを確認した。

実験は1987年4、6、10、11月に2倍体魚・3倍体魚各52尾ずつ計104尾について行った。実験魚の平均体重は2倍体魚129g、3倍体魚128gであった。

酸素消費量の測定は流水式呼吸測定装置を用いて行った。その概要をFig. 1に示した。呼吸室はアク

リルパイプ(長さ30cm 内径7cm、または長さ25cm 内径5cm)で、同じ大きさのものを同時に2本用いてそれぞれに2倍体魚と3倍体魚を1尾ずつ収容した。水温の急変を避けるために呼吸室をウォーターバスに入れ、さらに、魚を呼吸室に収容後黒ビニールで覆い、できるだけ安静にするよう努めた。呼吸室への流水量は200 ml/min または300 ml/min を用い、溶存酸素量はウインクラ法によって求めた。酸素消費量の測定は収容後の時間経過による影響をみるために、次の4タイプの時間スケジュールで行った。すなわち、1)魚を収容して30分あるいは1時間おきに4時間後まで8または4回の測定、2)魚を収容して1時間おきに8時間後まで8回の測定、3)魚を収容して3~5時間後から30分あるいは1時間おきに8または4回の測定、4)魚を収容して一夜おきに(9~14時間後)から30分あるいは1時間おきに8または4回の測定、である。

酸素消費量測定実験終了後、魚に電気ショックを与えて不動化させ、体長・体重を測定後、開腹して心臓より採血を行い、赤血球数(トーマ法)、ヘマトクリット値(毛細管法)およびヘモグロビン量(シ

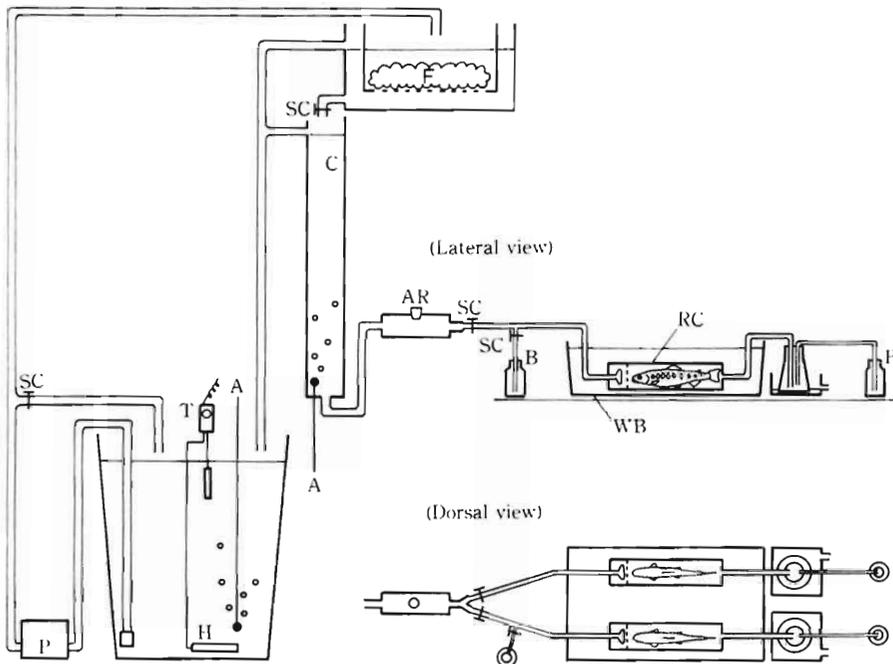


Fig. 1. Experimental system. A, aeration; AR, air-release hole; B, oxygen bottle; C, equilibrium column; F, filter; H, heater; P, pump; RC, respiration chamber; SC, screw-cock; T, thermostat; WB, water bath.

アンメトヘモグロビン法)を測定した。なお、1尾につき少なくとも2枚の血液塗抹染色標本を作成し、赤血球の長径・短径を計測して、それらの平均値とプライス・ジョンス曲線を求めた。

III 結 果

呼吸室収容後の経過時間に伴う酸素消費量の変化

呼吸室における流量200 ml/minの場合、アマゴの酸素消費量の経時的变化の一例を Fig. 2 (A)に示した。2倍体魚、3倍体魚とも呼吸室収容後の時間経過とともに酸素消費量は減少し、3.5時間後に

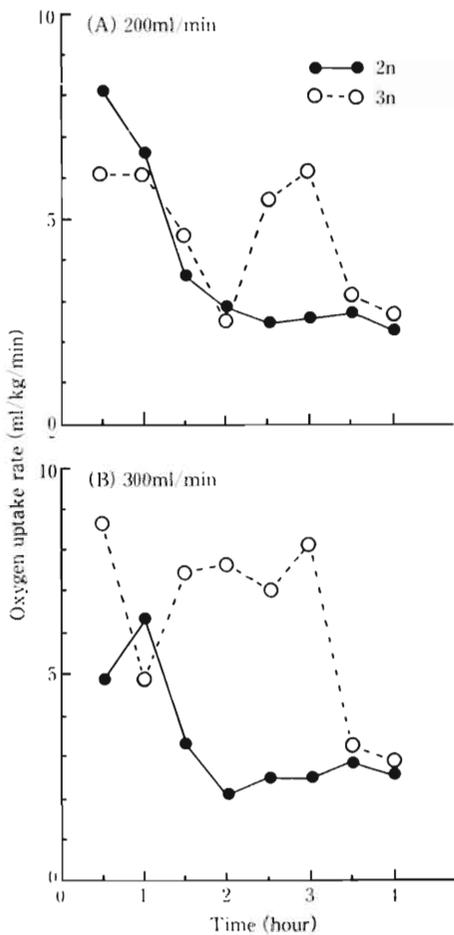


Fig. 2. Changes over time in the oxygen uptake rate after placement of fish in the respiration chambers. Flow rate of water irrigating the respiration chamber, 200 ml/min in A and 300 ml/min in B. Open circles, triploid (3n); closed circles, diploid (2n).

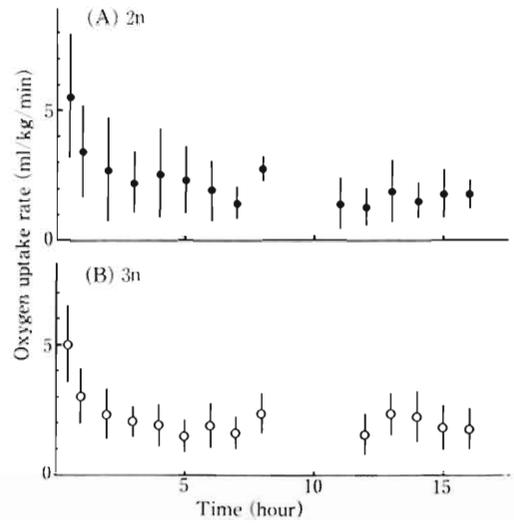


Fig. 3. Changes over time in the oxygen uptake rate after placement of fish in respiration chambers. Flow rate, 200 ml/min. Vertical bars through the points are means \pm standard error. Symbols are the same as in the legend of Fig. 2.

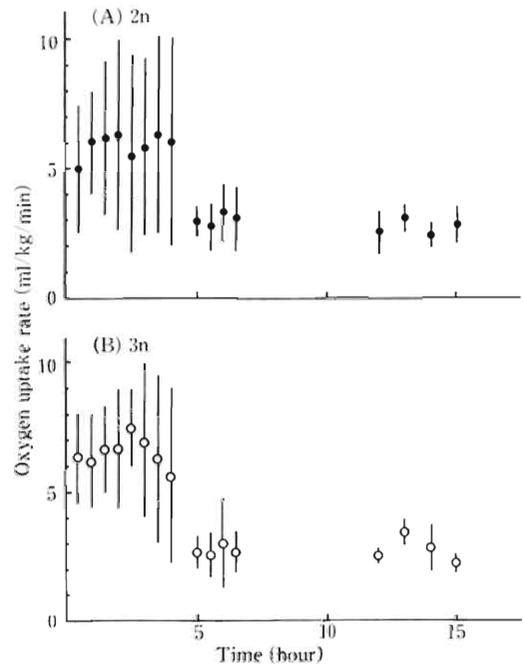


Fig. 4. Changes over time in the oxygen uptake rate with a flow rate of 300 ml/min. Symbols are the same as in the legend of Fig. 3.

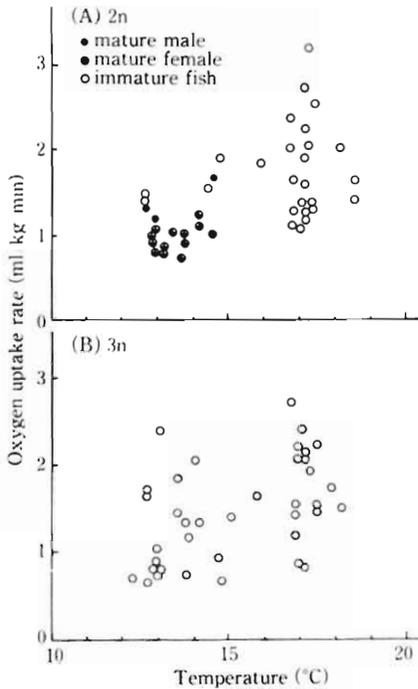


Fig. 5. Relationship between oxygen uptake rate and the water temperature. A, Diploid; B, triploid. ●, mature males; ⊕, mature females; ○, immature fish of either sex.

Table 1. Oxygen uptake rate in diploid and triploid amago salmon in relation to temperature and ploidy.

Temperature (°C)*	Ploidy	Oxygen uptake rate (ml/kg/min)*
13.5 ± 0.8	2n	1.16 ± 0.31 (20)
	3n	1.21 ± 0.51 (20)
17.0 ± 0.5	2n	1.99 ± 0.68 (12)
	3n	1.91 ± 0.44 (14)

*Mean ± standard error

Figures in parentheses are number of samples examined.

は一定の値、約 2 ml/kg/min に落ち着く傾向がみられた。また、Fig. 2 (B)では 300 ml/min の流量の場合における同様の実験結果の一例を示した。この場合も、両者ともに酸素消費量は経時的に減少し、3.5 時間後には流量 200 ml/min の場合とほぼ同じ値を示した。そこで、流量 200 ml/min において得られたすべてのデータを測定の経過時間ごとにとまとめて

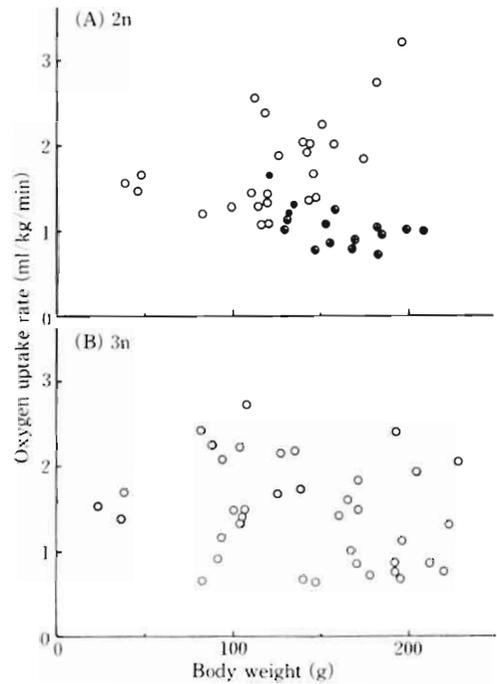


Fig. 6. Relationship of oxygen uptake rate to body weight. Symbols are the same as in the legend of Fig. 5.

Fig. 3 に示した。これによると、アマゴの酸素消費量は魚を呼吸室に収容後約 3 時間から一定の値を示すことがわかり、それを安静時酸素消費量とした。同様に、流量 300 ml/min の場合における実験結果を Fig. 4 に示した。この図から、流量 300 ml/min になると酸素消費量が一定の値をとるまでの時間が流量 200 ml/min の時より長くかかり (約 5 時間)、各時間での測定値の変異も大きいことがわかる。そこで、以下の実験は流量 200 ml/min のもとで行った。

水温による酸素消費量の変化

実験期間が水温の異なる季節にわたったので、その水温変化と酸素消費量の関係を見た。各実験において酸素消費量が低い値を示したところの、少なくとも 2 つ以上の測定値の平均をその個体の安静時酸素消費量とし、その値を実験時の水温に対してプロットした (Fig. 5)。2 倍体魚、3 倍体魚とも水温が高くなると酸素消費量は増加する傾向がみられた。3 倍体魚では同じ温度に対する酸素消費量に変動が大きかったが、Table 1 に示したように平均値は同温度における 2 倍体魚の値との間に統計上有意差は

なかった(1%有意水準)。また、11月に供試魚のうち2倍体魚全個体は生殖腺が発達しており、Fig. 5においてこれら成熟個体を区別して示した。2倍体魚の雄の成熟個体は、雌の成熟個体より大きな酸素消費量を示した。また、同じ水温において成熟個体は、他の季節の未成熟個体より小さい酸素消費量を示した。

魚体重の違いによる酸素消費量の変化

実験に用いたアマゴ2倍体魚の体重は39~208 g(平均129 g)、3倍体魚では36~226 g(平均128 g)であった。小型魚は少数ではあったが2倍体魚、3倍体魚ともに大小約4倍の差があったので体重に対する酸素消費量をプロットした(Fig. 6)。ここでもFig. 5と同様に成熟個体を区別した。実験時の水温が異なるため各月間のデータの比較はできないが、3倍体魚においては同じ測定条件にもかかわらず体重に対する酸素消費量は大きな変動を示した。

アマゴの血液性状

呼吸量を測定した魚のうち2倍体魚25尾、3倍体

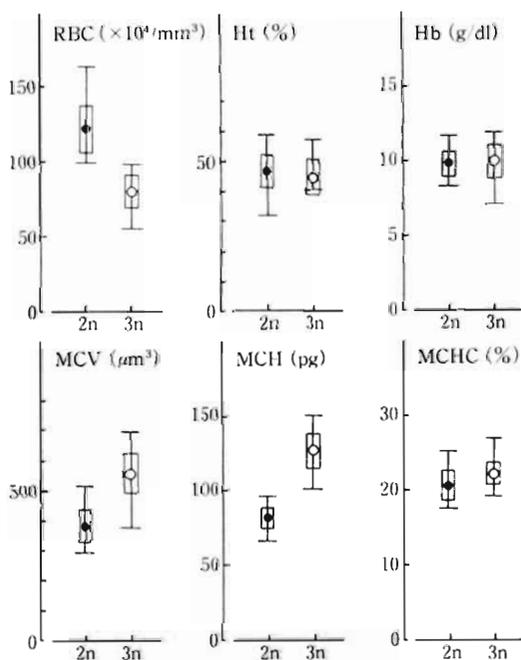


Fig. 7. Hematological characteristics in diploid (closed circles; $n=25$) and triploid (open circles; $n=35$) fish. Vertical bars through the circles show the range of measurements and squares surrounding the circles show the mean \pm standard error.

魚35尾について血液の一般性状として赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量を調べ、その結果をFig. 7に示した。これによると赤血球数は2倍体魚が平均 $1.20 \times 10^6/\text{mm}^3$ 、3倍体魚は $0.79 \times 10^6/\text{mm}^3$ で両者間には1%有意水準で有意差があった。ヘマトクリット値、ヘモグロビン量においては2倍体魚と3倍体魚の値の間に有意差はなかった。また、これら3つの値から赤血球恒数、すなわち平均赤血球容積(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)を算出し、Fig. 7に併せて示した。MCVにおいては個々の値の変動が大きいものの3倍体魚の平均値は2倍体魚のそれより有意に大きく(1%有意水準)、MCHにおいても3倍体魚の平均値は2倍体魚のそれより明らかに大きかった。MCHCにおいては、両者間に有意差はみられなかった。

赤血球の形態の比較

前記の魚について、各魚2~3枚の血液塗抹標本を作成し、1尾あたり約100個の赤血球の長径・短径を計測し、平均値を求めた。2倍体魚3倍体魚各4尾の平均値のみみるといずれも3倍体魚の方が大きく、赤血球の長径は $19.94 \mu\text{m}$ 、短径は $11.02 \mu\text{m}$ であった。一方、2倍体魚の赤血球の長径は $16.24 \mu\text{m}$ 、短径は $10.17 \mu\text{m}$ であった。さらにプライス・ジョンズ曲線(Fig. 8)を見るとピークの位置が明らかに異なっており、両者が明瞭に区別できることを示している。

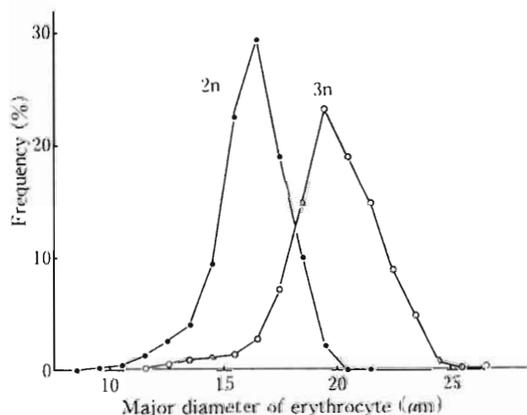


Fig. 8. Price-Jones curves of major axis of erythrocytes in diploid (closed circles; $n=4$) and triploid (open circles; $n=4$) fish.

IV 考 察

サケ・マス類の酸素消費量については数多くの測定例があるが^{14,15)}、研究者によって測定条件が異なっているのが一様には比較できない。アマゴについては、高橋¹⁶⁾が体重8.2 g、水温15.0°Cの条件下で密閉止水式方法を用いて1.95 ml/kg/min という値を出している。本実験における同温度での値は、約1.6 ml/kg/min であったが、体重が平均約130 g と大きいこと、また大きい個体ほど単位体重当りの酸素消費量が少なくなること^{14,15)}から高橋の測定値と矛盾しない値だと思われる。

一方、2倍体魚と3倍体魚の酸素消費量の比較については、いくつかの報告がある。たとえば、SWARUP¹⁷⁾がイトヨ *Gasterosteus aculeatus* で、また、BENFEY and SUTTERLIN¹⁸⁾が陸封型大西洋サケ *Salmo salar* について、両者間に有意差がなかったことを報告している。ニジマスについては、興奮時から安静時に至るまで常に3倍体魚の酸素消費量が多く、しかも興奮から安静に至るまでに要する時間が長いという傾向がみられている⁹⁾。アユについても3倍体魚の酸素消費量の方が2倍体魚よりも大きいという結果が出ている⁹⁾。後二者はいずれも、本実験と同じ流水式呼吸測定装置を用いたものであるが、呼吸室が0.6~10 l と大きく、一度に魚を数尾収容し自由に泳げる状態であり、呼吸室における流量が本実験より少ないとはいえず(84~100 ml/min)、これらの測定値は安静時の酸素消費量とはいえない。一方、本実験の結果は、呼吸室には一度に1尾の魚しか収容しなかったことと、Fig. 3, 4 でみられたように呼吸室における流量が300 ml/min の場合での酸素消費量が、変動は大きいながらも流量200 ml/min の場合とほぼ同じ値に落ち着くことから、正常な状態における安静時酸素消費量が求められていると考える。

アマゴの血液性状について池田ら¹⁹⁾は赤血球数 $65 \pm 5 (\times 10^4/\text{mm}^3)$ 、ヘマトクリット値 $42.9 \pm 4.1 (\%)$ 、ヘモグロビン量 $9.8 \pm 0.7 (\text{mg/dl})$ 、赤血球の大きさについて長径 $15.38 \pm 0.65 (\mu\text{m})$ 、短径 $10.62 \pm 0.37 (\mu\text{m})$ の値を示している。本実験の2倍体魚での平均値は、赤血球数 $120.0 \pm 15.4 (\times 10^4/\text{mm}^3)$ 、ヘマトクリット値 $45.8 \pm 5.5 (\%)$ 、ヘモグロビン量 $9.78 \pm 0.88 (\text{mg/dl})$ 、赤血球長径 $16.24 \pm 0.53 (\mu\text{m})$ 、短径 $10.17 \pm 0.51 (\mu\text{m})$ であって、赤血球数にかなりの相違があるが、他の血液特性値に著しい差はみられなかった。血液性状は採血時の魚体の取扱によって著しく変化することが知られてお

り¹⁹⁾、また採集地や季節が違っても変化の要因であると思われる。しかし、本実験では、2倍体魚も3倍体魚もすべて同一の手順で実験を行ったので、2倍体魚と3倍体魚の比較には差し支えないものと考えられる。

呼吸において赤血球表面積の大小は、ガス交換により単位時間当たりどれだけ酸素を取り込むことが出来るかに深く関係している²⁰⁾。アマゴ3倍体魚の赤血球が2倍体魚のそれより大きく、血液単位容積中の数は減少して、赤血球の相対容積が同じであるという本実験の結果より、3倍体魚の方が血液単位容積中の赤血球の総表面積において小さいことがわかる。そこで、その割合がどの程度になるかを試算してみた。魚類の赤血球は中央が核によって膨らんだ円盤状をしている²¹⁾が、ここでは計算がしやすいように Fig. 9 に示したような楕円柱をモデルとして考えた。ここで、楕円の長径・短径は塗抹標本による測定値の平均値、厚みはMCVの平均値をこの楕円の面積で除したものである。このモデル赤血球1個の表面積は2倍体魚で $384 \mu\text{m}^2$ 、3倍体魚で $507 \mu\text{m}^2$ と計算される。そして血液 1mm^3 中の赤血球

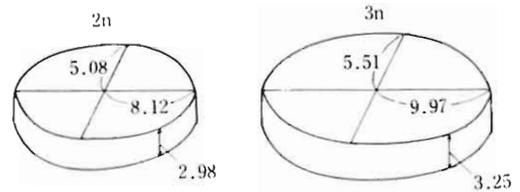


Fig. 9. Simplified model of erythrocyte shape used for calculation of the surface area. Left, diploid; right, triploid. Figures show the length in micrometers.

Table 2. Comparison of total surface area of erythrocytes in 1mm^3 of blood in diploid and triploid amago salmon.

	2n	3n	3n/2n
Number of erythrocytes ($10^4/\text{mm}^3$)	120	79	0.66
Mean corpuscular volume (μm^3)	386	561	1.45
Projectional area of model erythrocyte (μm^2)	130	173	1.33
Surface area of one erythrocyte calculated by use of model (μm^2)	384	507	1.32
Total surface area of model erythrocytes in 1mm^3 of blood (mm^2)	461	401	0.87

の総表面積は赤血球数を乗じて2倍体魚で461 mm²、3倍体魚では401 mm²となり、3倍体魚のそれは2倍体魚に比べて約13%少ない結果となった (Table 2)。

安静時におけるアマゴの酸素消費量は、測定装置の呼吸室における流量200 ml/min という条件のもとでは、得られた測定値の変動がやや大きかったが、2倍体魚と3倍体魚の間に有意差はみられなかった。しかし、上記の赤血球の大小は、酸素の取り込みに何らかの形で影響するに違いない。すなわち、3倍体魚は単位血液中の赤血球表面積において2倍体魚に比べて不利な条件下にある。さらに、血管の太さや他の臓器の大きさに相違がないとすると、赤血球の大きさは赤血球の血管内での流動状態に影響を及ぼし、これがガス交換の速さとその効率に関連してくる。安静時すなわち十分に余裕のある状態において、2倍体魚と3倍体魚の酸素消費量に差が出なかったが、低酸素状態の時や運動時には3倍体魚の酸素摂取能が変化して、酸素消費量において2倍体魚との間で何らかの差が出てくるのが予想される。

ABDEL-HAMEED²²⁾ は3倍体のニワトリで血液のヘモグロビン濃度を2倍体のそれと変えないために恒常性機構が働き、赤血球数が減少したと報告している。本実験でも血液のヘモグロビン量は2倍体魚と3倍体魚の間に差はみられなかったため、このような恒常性機構が働いているものと考えられる。

BENFEY and SUTTERLIN¹⁰⁾ は陸封型大西洋サケにおいて3倍体魚のヘモグロビン量が2倍体魚のそれより有意に低いことから3倍体魚の酸素運搬能は2倍体魚のそれに劣るとの予想をした。しかし、低酸素状態の実験では、両者の酸素消費量に有意な差はなかった¹⁰⁾。彼らは、2倍体魚と3倍体魚の血液学的な差が酸素消費量に影響するほどには大きくないと結論した。また、ニジマスについても、酸素濃度を低下させたときの呼吸停止時刻やそのときの酸素濃度は2倍体魚と3倍体魚の間に差はみられなかった⁶⁾。しかし、これらの報告⁶⁾¹⁰⁾では、低酸素がもたらされる速さについては全く触れられていない。これらの実験は、密閉容器内で魚が酸素を消費することによって低酸素状態をつくったものである。したがって、緩やかな低酸素負荷に対しては3倍体魚の補償機構が働き、呼吸機能における2倍体魚との差は出てこないことが考えられる。したがって、その補償の働く限界はどれ程か、またその機構はどのようなになっているのかを究明することが今後の課題で

ある。

V 要 約

1. 温度処理により作出したアマゴ3倍体魚の酸素消費量ならびに血液性状を未処理魚(2倍体魚)と比較した。
2. 流水式呼吸測定装置を用いた酸素飽和状態における3倍体魚の安静時酸素消費量は、2倍体魚のものと同値をとり、水温や魚体重による変化にも差がなかった。
3. 血液の一般性状として赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量及び赤血球の長径・短径の測定を行った。その結果、3倍体魚は2倍体魚と比べて赤血球数が少なく個々の赤血球が大きい、ヘマトクリット値とヘモグロビン量については差がなかった。
4. 赤血球の簡単なモデルから、血液単位容積中の赤血球表面積を算出したところ、3倍体魚の値は2倍体魚よりも13%少ないという結果になった。
5. 赤血球の形態から、3倍体魚は2倍体魚に比べて酸素摂取能における差が推定されるが、平常状態では酸素消費量に差がみられなかったことから、何らかの補償機構が働いて、恒常性が保たれているものと考えられる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、始終御教授いただき、貴重な文献を提供して下さい、本学農学部助教授上野紘一博士に深謝する。また、本実験に用いたアマゴの飼育管理をお願いした、清水寿一氏をはじめとする水産研究所新宮実験場場長、職員ならびに学生の皆様に深く感謝する。

引用文献

- 1) J. GERVAI, S. PÉTER, A. NAGY, L. HORVÁTH and V. CSÁNYI: *J. Fish Biol.* 17, 667~671 (1980)
- 2) R.F. LINCOLN: *ibid.* 19, 499~507 (1981)
- 3) 上野紘一: 海洋科学, 13, 60~70 (1981)
- 4) 関伸吾・岸野茂信・谷口順彦: 昭和62年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 117 (1986)
- 5) 谷口順彦・深井淳二・稲田善和: 同上, 117 (1986)
- 6) 沢田守伸・糟谷浩一・野沢貢: 栃木県水試事業報告, 31, 31~38 (1987)
- 7) 瀬崎啓次郎・小林弘・中村守純: 魚類学雑誌,

- 24, 135~140 (1977)
- 8) W.R. WOLTERS, C.L. CHRISMAN and G.S. LIBEY: *J. Fish Biol.*, 20, 253~258 (1982)
- 9) K. SEZAKI, S. WATABE and K. HASHIMOTO: *Nippon Suisan Gakkaishi (Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.)*, 49, 97~101 (1983)
- 10) T.J. BENFEY and A.M. SUTTERLIN: *J. Fish Biol.*, 24, 333~338 (1984)
- 11) T.J. BENFEY, A.M. SUTTERLIN and R.J. THOMPSON: *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 980~984 (1984)
- 12) Y.D. LOU and C.E. PURDOM: *J. Fish Biol.*, 25, 345~351 (1984)
- 13) 白田博: 岐阜水試報告, 31, 15~19 (1986)
- 14) 尾崎久雄: 魚類生理学講座, 2巻 (呼吸), 161~253, 緑書房, 東京 (1970)
- 15) 板沢靖男: 魚類生理(改訂・増補, 川本信之編), 46~91, 恒星社厚生閣, 東京 (1977)
- 16) 高橋仁助: 水雑, 51, 7~24 (1943)
- 17) H. SWARUP: *J. Genet.*, 56, 156~160 (1959)
- 18) T.J. BENFEY and A.M. SUTTERLIN: *Aquaculture*, 42, 69~73 (1984)
- 19) 池田弥生・尾崎久雄・瀬崎啓次郎: 魚類血液図鑑, 256, 265, 304~305, 緑書房, 東京 (1986)
- 20) スワンソン (佐藤七朗訳): 細胞, 93~97, 岩波書店, 東京 (1972)
- 21) 川本信之: 新版魚類生理生態学, 68, 恒星社厚生閣, 東京 (1966)
- 22) F. ABDEL-HAMEED: *Science*, 178, 864~865 (1972)

(昭和63年11月29日受理)