

## 論文の内容の要旨

生圏システム学専攻  
平成15年度博士課程 進学  
氏名 細谷 将  
指導教官 日野明德

論文題目: Investigation of the free cortisol dynamics under stress and its availability as a quality index of marine finfish seedlings

(訳: 海産魚種苗における free cortisol のストレス応答と健苗性指標としての可能性)

沿岸環境の悪化や資源の乱獲を原因とした世界的な水産資源の縮小が続くなか、水産養殖による資源補完や、種苗放流と環境の保全・管理を軸とした栽培漁業による資源涵養の取り組みがなされている。理論上これらの成否は、健苗性とよばれる種苗の健全性に左右されると考えられるが、種苗の質を評価する有効な手法と指標は未だ確立されていない。そこで本研究では、健苗性の新しい評価法として、cortisol の血中濃度変化によって示されるストレス応答に注目した。cortisol は代謝・免疫などに関与し、その異常は個体の成長・成熟・耐病性などを抑制し行動にも反映されるため、これまで cortisol 応答に関して多くの知見が蓄積されてきたが、飼育環境下で種苗が受ける長期的ストレスへの応答に関する情報は少ない。また、血中で cortisol はタンパク質と結合した生理的活性を持たない画分 (bound cortisol: BC) と遊離した生理的活性を持つ画分 (free cortisol: FC) とに分けられるが、魚類では総 cortisol (total cortisol: TC) 濃度のみが測定されており、FC に関する知見は乏しいばかりか、ストレス応答下での FC の変化に関する報告は未だみられない。現在、種苗放流では、種苗の質は放流直後の生残と再捕に直ちに影響するため、これらに最も関係が深いとされる稚魚期の行動による評価が行われているが、定量性に乏しいという欠点がある。いっぽう哺乳類では、ストレスを受けた直後の行動パターンがストレス応答系の活性に起因することが示唆されており、魚類においても cortisol 応答が行動特性と関連していれば、定量性の高い強力な指標になると考えられる。本研究では、これらの背景のもと、「飼育環境下で魚類のストレス応答が種苗の質を評価する指標となりうるか」を、血

中の TC と FC の変動を精査することで検討した。なお、本研究のうち、第 III 章および第 IV・V 章の実験は、カナダの National Research Council, Institute for Marine Biosciences にて、また第 VI 章の実験は、東京大学附属水産実験所にて行った。

第 I 章では研究の背景・序論として、縮小傾向にある魚類資源の保全に対し、養殖業と栽培漁業が担う役割、種苗生産過程における問題点、研究課題としてのストレス応答の必要性について説明した。

第 II 章では、基本的な実験手法として、実験魚の飼育とサンプリング方法、ストレス指標の測定方法、血漿からの FC の分離法 (ultrafiltration) について説明した。ストレスの指標 (括弧内は測定方法) としては、血漿中 TC&FC (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、血漿中グルコース (glucose oxidase/peroxidase を用いた Trinder の変法)、組織中の 70kDa 熱ショックタンパク質 (hsp70, Western blotting and chemiluminescent) を用いた。

第 III 章では、急性のハンドリングストレスに対する Atlantic cod (*Gadus morhua*) と haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) の TC 応答の概要を調べ、これらタラ科の魚種 (gadoid) が長期的なストレスに対するストレス応答を評価するのに適した魚種であるかを検討した。その結果、Atlantic cod は TC の値に個体間でのばらつきが大きい (CV=175%)、ストレス応答の研究には適していないことが示された。また、脊椎動物一般で見られる血漿グルコースのストレス応答がこれらの魚種では認められなかった。いっぽう 15°C に馴致した Atlantic cod を用いた実験では、ストレスを与えなかった対照群で cortisol 濃度が高い値 (> 100 ng/mL) を示していたことから、Atlantic cod にとって 15°C の水温環境は非常に強いストレスとなることが明らかになった。しかし、熱ストレスによる hsp70 の発現は認められなかった。Atlantic cod に関しては、致死水温以下では hsp70 の発現が見られないという報告もあり、また、共同研究者の追試でも同様の結果が出ている。Haddock も同様に hsp70 の発現は認められなかったが、これは本魚種の hsp70 の発現に関する初めての報告である。

第 IV 章では、haddock の長期的ストレスに対する応答を評価することを目的とし、15 秒間の空中曝露によるストレスを 4 週間毎日与え続け、1 週間毎に定常時の血漿中の TC・FC・グルコース、および鰓組織の hsp70 の発現を、ストレスを受けなかった対照群と比較した。また、北米で魚類のモデル生物として見なされている Atlantic salmon (海水適応後) を対照種として、同様の実験を行った。Haddock ではストレス群で TC・FC とともに 2 週目サンプリング時に 10 倍の上昇が見られたが、3 週目には元のレベルに戻っていた。一方、TC に対する FC の割合 (Free%) は 1 週目のサンプリング時から対照群に対して有意に高く (対照群 17%, ストレス群 55%), 3 週目に差はなくなった。この結果、長期的ストレスに対する haddock のストレス指標としてコルチゾールは 2 週間程度なら使用に耐えるが、それ以上の期間では適していないこと、また FC を測

定し, Free%を求めることで, 個体のストレス応答の変化をさらに精査出来る可能性が示された. また, グルコースは第 III 章と同様に上昇しなかった. 一方, Atlantic salmon では, TC・FC・Free%に変化は見られなかったが, 1 週目のサンプリング時にグルコースの上昇が見られた. したがって, cortisol を指標とする場合は種毎に評価基準を設定する必要があると考えられた.

つぎに haddock について, ストレス応答系に対する長期的ストレスの影響を調べるため, 対照群・ストレス群ともに1回のハンドリングストレスを与え, 応答を経時的に比較した. その結果. 対照群では, ハンドリングの1時間後に TC は有意に上昇したが, 生理活性のある FC の量はほとんど変化せず, Free%もほとんど上昇しなかった. このことは, haddock の場合1回のハンドリングによる生理的影響が実際には小さいこと, また TC がストレス指標として適当ではないことを示している. 一方, ストレス群で TC・FC・Free%の全てが上昇したが, 統計的に有意ではなかった. また, 6時間後の FC は, 対照群に対してストレス群が有意に高い値を示した (対照群 7.21ng/mL, ストレス群 24.7ng/mL). このことから, 飼育環境にある種苗のストレス応答系を評価するには, 急性ストレス応答時の FC を指標とすることが有効と考えられた. いっぽう Free%の増加は, FC の増加速度が TC のそれよりも大きいことを示している. このことは, 長期的ストレスによって CBP の cortisol 結合容量が低下したことを意味し, CBP を用いたストレスの評価法を検討する価値があると思われる.

第 V 章では, Atlantic salmon からの CBP の単離とアミノ酸配列の決定を試みた. まず, 肝臓組織のホモジネートとポリクローナル抗ヒト CBP 抗体を用いた免疫沈降を行い, 抽出分画を LC-MS/MS に供した. しかし, CBP と思われるタンパク質を得られなかった. つぎに血漿を用い, コルチゾールの構造を保持した類似化合物 [Cortisol 3-(0-carboxymethyl)oxime] をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによる単離を試みたところ, Cortisol を過剰に含む緩衝液を用いて抽出した分画に特異的に現れるタンパク質が確認されたが, CBP と思われるタンパク質を得られなかった. ヒトについて, 血中 CBP 濃度は 50ng/ml 程度と非常に低いという報告があり, 極めて高い抽出効率を持つ方法の検討が必要と考えられた.

第 VI 章では, 急性ストレスを受けた直後の行動とストレス応答との関係を検討するため, トラフグ (*Takifugu rubripes*) を用いた実験を行った. 水槽の移し替え直後から6分間の行動が活発な群 (活発さで上位 10%程度) と不活発な群 (不活発さで上位 10%程度) を3回の行動実験によって抽出し, 急性ストレスを与える前 (0時間), 与えた後 1, 3, 6時間後の TC, FC, グルコース濃度からストレス応答を群間で比較した. その結果, いずれの項目でも活発群は不活発群より長時間にわたって高い値をとる傾向にあったものの, 2 要因分散分析では TC・FC とともに群間の差はなく, 行動とストレス応答を関係づけるには至らなかった. 一方, Free%では, ストレスを受ける以前, 定常時の値で活発群が不活発群より有意に高かった. これは Free%の差異が移槽直後の行動に反映されている事を示唆し, Free%から種苗の質を評価できる可能性が示された.

第 VII 章では、資源増大といった産業的効果のみならず、放流事業を通じた資源管理や環境保全に対する社会への意識付けといった効果をも併せ持っている栽培漁業に関連して、放流効果に直接影響する健全な種苗の生産と健苗性の評価方の確立について、ストレス応答の研究から得られた知見をもとに考察した。