

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 細谷 将

人工種苗の放流による沿岸資源の涵養が、水産業による陸域・海域間の物質循環の保全にとって重要であることが、近年世界的に注目されている。種苗放流の成否は、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は未だ確立されていない。そこで本研究では、健全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。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、ストレス応答下としての FC に関する報告はみられない。

以上を述べた序章 (第 I 章) に続く第 II 章では、実験手法の確立に至るまでを述べている。

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 応答を調べた。その結果、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 2 魚種では認められないこと、また Atlantic cod には、水温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、hsp70 の発現は認められなかった。Haddock も同様であったが、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、長期的ストレスに対する応答を評価するため、毎日 15 秒間の空中曝露を 4 週間与え続け、1 週間毎に血漿中の TC・FC・グルコース、および鰓組織の hsp70 の発現を調べた。Haddock では TC・FC とともに 2 週目に 10 倍の上昇が見られたが、3 週目には元のレベルに戻った。一方、TC に対する FC の割合 (Free%) は 1 週目から対照群に対して有意に高く、3 週目に差はなくなった。この結果、haddock ではコルチゾールは 2 週間程度しかストレス指標にならないこと、しかし、Free% を求めることでストレス応答の変化を精査出来る可能性が示された。一方、Atlantic salmon では、TC・FC・Free% に変化は見られなかったが、1 週目にグルコースの上昇が見られ、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、上記の長期的ストレス下にある個体と対照群に 1 回のハンドリング

ストレスを与え、ストレス応答系に対する長期的ストレスの影響を調べた。その結果、対照群ではハンドリングでTCは上昇したが、生理活性をもつFCはほとんど変化せず、Free%もほとんど上昇せず、TCがストレス指標として適当ではないことが示された。しかし6時間後のFCは有意に高い値を示し、指標としてのFCの有効性が示唆された。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、CBP (cortisol binding protein) の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も検討すべきであると考えられた。

第V章では、CBPの単離とアミノ酸配列の決定を試みた。しかし、ポリクローナル抗ヒトCBP抗体を用いた免疫沈降の抽出分画からはCBPを得られなかった。また、コルチゾール類似化合物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からは、特異的に現れるタンパクが確認されたが、CBPと断定し得るものを得られなかった。

第VI章では、ストレス応答と行動との関係を検討するため、トラフグ (*Takifugu rubripes*) を用い、活発な群と不活発な群を抽出し、急性ストレスがTC、FC、グルコース濃度に与える影響を比較した。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TC・FCともに群間の差はなく、いっぽう、Free%では、活発群の定常時の値が非活発群より有意に高く、種苗の質評価に展開できる可能性があった。

第VII章では、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。

以上本研究は、未だ例のない種苗期のストレス応答を、巧みな魚種選択により生理学的な側面から精査したものであり、とくにcortisol binding proteinの挙動に注目すべきという、基礎科学上の成果のみならず種苗生産への応用上も有益となる多くの成果を挙げている。よって審査委員一同は、本研究を博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。