

ニジマスのウロコ中に含まれているストレスホルモン抽出の試み

鳥取大学 学生会員 ○河崎 大志
鳥取大学 正会員 増田 貴則
鳥取大学 正会員 高部 祐剛
鳥取大学 正会員 星川 淑子

1. 序論

近年, 先進国における健康志向や, 途上国における食生活水準向上により, 世界の水産物消費量は増加し続けている。その一方, 漁獲漁業による水産物供給量はここ 20 年間横ばいである。これは海洋資源量の限界であると考えられ, これ以上の増加は期待できない。そのため世界的な需要増加には養殖生産量の増加によってこたえてきた¹⁾。

その中でも, 閉鎖循環式養殖は少ない面積に対し, 高生産性が期待できるため将来の種苗生産・養殖事業の主流として期待されている²⁾のにも関わらず, 産業的普及が進んでいない。その原因として, 閉鎖循環飼育に関する情報が少ないということが挙げられる。閉鎖循環飼育において水質管理がきわめて重要であるとされている。その中でも最も重要である管理項目は, 酸素供給と残餌や排泄物の処理である。また, 水質管理の目的は飼育水を清潔に保つことではなく, 飼育対象種の成長にマイナスの影響を与えない飼育環境を維持することである³⁾とされているが, 魚種によりその範囲は異なっており, 成長率などを指標とした飼育試験で評価されているのが現状である。

そこで本研究では, 閉鎖循環式養殖を行う際, 飼育環境の評価指標としてストレスに着目した。慢性的なストレスは, 生殖や成長の抑制として起こることが判明している⁴⁾。飼育している魚が環境中要因によりダメージを受ける状態は, 慢性的なストレスにさらされている状態であると考えた。血液中のストレスホルモンの濃度上昇は一過性であるがウロコへのストレスホルモンの蓄積は血液中のストレスホルモン濃度上昇の頻度に対応して生じるため, 長期的なストレス指標として有効であるという報告がある。そのため, 魚の成育に適切な飼育環境をストレスホルモン濃度測定することによって検討する方法が有効である可能性を示すことが, 本研究の目的と設定した。その前段階として, 既存研究で行われていたストレスホルモン測定は LC/MS/MS によるコルチゾル量の質量分析によって行われていたが, 本研究では, Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA 法) による定量分析が可能であるかの検討を行った。

2. 研究方法

本研究では, ニジマスのウロコを用いて実験を行った。体表面からウロコを採取し, 洗浄した。抽出方法は既存研究に従い, ウロコに対し溶媒を加え, 一定時間振とうした。冷却遠心機を用いて短時間遠心し, ウロコと上澄みに分けた。その上澄みを蒸発させ, 残った抽出物を測定キットに付属していたバッファに溶解し, サンプルとした。サンプルは, Cortisol ELISA Kit (Enzo 社) を使用しコルチゾル濃度を測定した。

3. 実験結果

3.1 ウロコのコルチゾル濃度測定結果

ELISA 法で測定できるか不明であったため, 飼育環境の異なる環境にいた, 2 個体のウロコ 0.1g を使用しコルチゾル濃度測定を行った。コルチゾル測定結果を図 3-1 に示す。

今回の測定ではサンプルのコルチゾルの値が個体 1 では 60.93pg/ml, 個体 2 では 38.66pg/ml であった。Enzo Life Sciences HP(2016)によると, Cortisol ELISA Kit の測定範囲は 156-10000pg/ml, 検出限界 56.72pg/ml である⁵⁾。そのため, 測定値は正確であるといえない結果になった。理由としては, ウロコに含まれている, コルチゾル量が少ない, 抽出時間が短いなどが挙げられる。

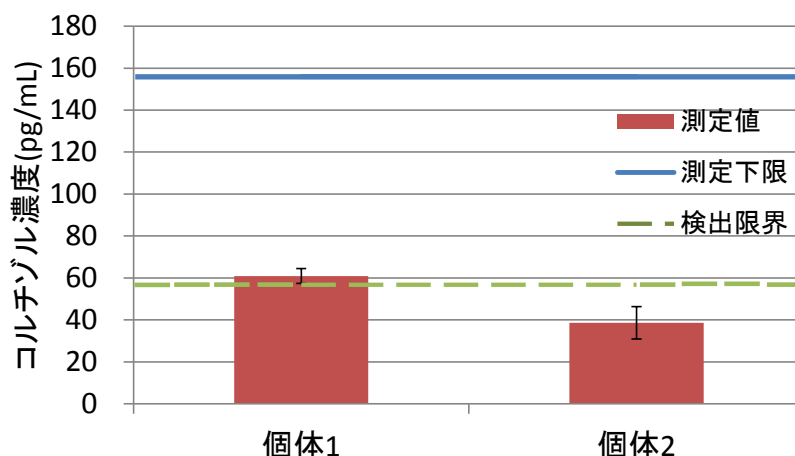


図 3-1 ニジマスのウロコ中のコルチゾル測定結果
(n=2 エラーバー:標準誤差)

キーワード 水質環境, ストレスホルモン, ニジマス

連絡先 〒680-8550 鳥取県鳥取市湖山町南 4 丁目 101 鳥取大学工学部社会開発システム工学科環境計画研究室

3.2 繰り返し抽出結果

ウロコ中のコルチゾル量が少ないことが考えられたため、ウロコの量を1.0gに変更した。また、抽出時間が短いことが考えられたため、ウロコからコルチゾルを抽出したものを2回繰り返し抽出した結果を図3-2に示す。

コルチゾル濃度は、ウロコ1.0gからは、461.45pg/ml、抽出を再び行ったものは、154.20pg/mlという結果になった。このことから、ウロコの量が1.0gからであれば、測定に十分な量のコルチゾルが抽出できることが判明した。また、2回目からもコルチゾルが検出されたことから、今回行った抽出時間では、ウロコ中のコルチゾルを全て抽出することができず、不十分である可能性が示唆された。

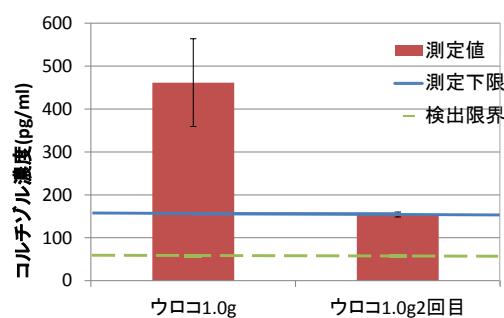


図3-2 繰り返し抽出結果
(n=2 エラーバー:標準誤差)

3.4 飼育環境を変更したウロコ中のコルチゾル濃度測定結果

抽出時間を変更すれば、少量のウロコでも測定可能と考え、飼育環境を、サケマス類への毒性が認められているアンモニア⁶⁾を添加することによって変更し3週間飼育したニジマスのウロコを、抽出効率を上げるため凍結粉碎し、抽出処理を行った結果を、図3-3に示す。

それぞれのコルチゾル濃度は、水槽1 38.79pg/ml、水槽2 41.05pg/ml、水槽3 41.20pg/mlという結果になり、測定範囲に収まらず正確な値ではないという結果が得られた。

今回の実験は、十分なコルチゾル濃度は得られなかったため、正確な測定結果が得られなかった。原因は、保存方法、溶媒の蒸発時間などが考えられるが不明である。何らかの原因によってコルチゾル濃度の抽出がうまくいかなくなる可能性が考えられる。

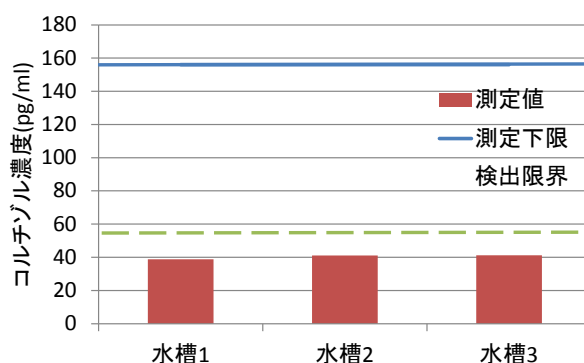


図3-3 水槽ごとのコルチゾル濃度
水槽1 アンモニア添加なし n=4,
水槽2 アンモニア0.2mg-N/L添加 n=2,
水槽3 アンモニア6.0mg-N/L添加 n=6,
エラーバー:標準誤差

4. 考察

本研究で、ELISA法によるウロコから抽出したコルチゾル濃度を測定した結果、ウロコ中のストレスホルモンの測定は、既存研究で行われている抽出処理方法で行った場合だと、測定可能量のコルチゾル量が抽出できずうまく測定できなかった。そこでウロコ量を0.1gから、1.0gに変更することで、測定に十分な量のコルチゾルが抽出できることが確認できた。しかし、1個体からとれるウロコの量は少量であるため、今回の方法では十分な個体数が得られなかった場合測定が難しいという結果になった。より少量なウロコからでもコルチゾルを抽出する方法を検討する必要がある。

今後の課題としては、ストレス測定による飼育環境評価を行うために、今回の実験では不十分であった保存期間、保存容器の材質、抽出時間などの検討を行い、抽出方法を確立する必要があると考える。また、魚の成育に対して影響を与える条件下で飼育した個体を比較することで、本当にストレスホルモンによる飼育環境評価が有用であるかの検討をする必要がある。

参考文献

1)水産庁 HP(2012):世界の水産物消費

費, http://www.jfa.maff.go.jp/j/kikaku/wpaper/h23_h/trend/1/t1_2_4_2.html 2017年4月時点

2)山本義久(2011):閉鎖循環飼育の未来と可能性第1回閉鎖循環飼育を取り巻く環境, アクアネット, 湊文社, 14(4), pp57-59

3)島一雄, 関文威, 前田昌調, 木村伸吾, 佐伯宏樹, 桜本和美, 末永義美, 長野章, 森永勤, 八木信行, 山中英明 (2012):最新 水産ハンドブック, 講談社 pp213-215

4)中野俊樹(2016):魚類におけるストレスとその防御に関する研究, 日本水産学会誌, 82(3), pp278-281

5) Enzo(2016), Cortisol ELISA Kit, <http://www.enzolifesciences.com/ADI-900-071/cortisol-elisa-kit/> 2017年4月現在

6) 野川秀樹・八木沢 巧(2011):さけマス類の人工ふ化放流に関する技術小史(飼育管理編), 水産技術, 第3巻, 第2号, pp67-89