

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12614

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580249

研究課題名(和文)動物の福祉を指向したメタボロミクスアプローチによるストレス評価手法の開発

研究課題名(英文)Development of stress response by metabolomics approach in Nile tilapia

研究代表者

舞田 正志(MAITA, MASASHI)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：60238839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：動物の福祉に配慮した養殖を実現するために、高密度飼育による養殖への影響を血漿成分を中心とする網羅的な解析を通して明らかにし、適切なモニタリング指標を確立するための基礎的検討を行った。水質条件を一定にした条件下での高密度飼育による影響は、血漿化学成分の多変量解析による検討の結果、コルチゾール等ストレス指標による検出ではなく、エネルギー代謝の変動に着目したモニタリングが有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a aquaculture system considering animal welfare, I carried out comprehensive analysis of biochemical components. It is suggested that the effects of high density rearing under the fixed water quality were able to detect by the changes of energy metabolisms even if the typical stress indicator such as plasma cortisol levels in fish.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：動物福祉 高密度ストレス メタボロミクス 血漿化学成分 アミノ酸組成 エネルギー代謝 評価指標

## 1. 研究開始当初の背景

1) 今後予測される世界的な食糧不足に対して十分な食糧を確保することは、第一次産業に関わる機関にとって重要な課題となっている。水産物の消費は健康志向とも相まって世界的には増加傾向にある。養殖魚の生産量は、我国のみならず世界各国で年々増加して来ており、水産物の総生産量の5割近くに至っている。このように水産養殖業は動物タンパク源の供給に重要な役割を果たし、FAOは養殖魚の増産が重要な課題であることを指摘している。その一方で、欧米では、“食糧動物の福祉 (Farm animal welfare)” という概念が浸透しつつある。イギリスでは、食糧動物の福祉に配慮して生産された製品を購入するという意識を持つ消費者が50%を超えているという調査結果がある。米国や欧州連合では、と殺の段階だけではなく、生産段階から食糧動物の福祉に配慮した生産方法をとることが法制化されてきている。しかしながら、主要な養殖生産国である日本を含む東アジア、東南アジア各国では食糧動物への福祉の概念は普及しておらず、生産物の輸出相手国である欧米各国が、今後、食糧動物の福祉への対応を生産国に要求することが予測され、その対策を早急に確立しておくことが必要である。

2) 食糧動物の福祉への配慮は、食糧動物の自然な行動を保証し、疾病、苦痛、ストレスから解放することを意味している。養殖魚においては、放養密度が疾病の発生及びストレスに影響を及ぼす大きな要因であることは古くから指摘されており、養殖魚の福祉という観点から養殖生産を考えると、適正な養殖密度を維持することが必要であるが、生産性・経済性を維持するために、放養密度を高くして集約的な養殖を行っているのが現状である。

養殖魚の福祉という概念は、多分に哲学的要素を含んだものであり、養殖業が経済活動であることや養殖業の食糧産業としての使命を考えると、単純に放養密度を低くすればよいというものではない。科学的に養殖魚のストレス状態を評価し、養殖魚がストレスを受けない範囲で最大の放養密度を決定することが、生産性を維持・改善しながら、養殖魚の福祉に配慮することにつながると考えられる。

3) 欧州連合では、持続的な水産資源利用の一貫として、養殖場での魚類のストレス評価に関するプロジェクトが2006年から、養殖魚の福祉の有用性とコストに関するプロジェクトが2007年から始まっている。養殖魚の福祉あるいはストレスに関する研究は、主として、飼育密度をストレスサーとして、行動学的解析、血中コルチゾールや血漿浸透圧によるストレス反応のモニタリング、免疫指標や抗病性評価、成長パラメータによる評価が主として行われてきた。また、最近の研究では、腸管の物質透過性を評価する手法も報告されている。これまでに得られた知見を整理すると、ティラピアを高密度 (EUの適正推奨飼育密度の約10倍) で飼育すると、血漿コルチゾールレベルに有意差は見られないものの、短期間の飼育では血糖値が上昇し、飼育期間が長くなると逆に血糖値が低下する。これは、一般的なストレス反応とは異なる現象である。養殖魚にかかる高密度飼育ストレスは慢性的かつ長期にわたるものであり、また、養殖場の置かれている環境 (溶存酸素量や水温、アンモニア濃度など) が影響を及ぼしうることを念頭に置かなければならない。

## 2. 研究目的

本研究において、養殖魚のストレス状態は、

エネルギー代謝に影響を及ぼし、それらが浸透圧調節や腸管の物質透過、魚類の行動、成長に影響を及ぼす根本的な原因ではないか、また、エネルギー代謝の変化を捉える適切な指標をモニタリングすることで、よりの確に養殖魚のストレス状態を評価し得るものとの作業仮説に基づいて、本研究では、養殖魚の福祉に配慮した適正放養密度の決定に資するため、メタボロミクスアプローチによる魚類のストレス評価手法の確立を目的とする。

具体的には、既知の研究で行われている行動学的解析、血中コルチゾールや血漿浸透圧によるストレス反応のモニタリング、免疫指標や抗病性評価、成長パラメータによる評価を検証するとともに、血漿中のエネルギー代謝関連物質の定量、エネルギー代謝の中間代謝物の定量を行い、既知の知見との相関を検討することで、エネルギー代謝の変化が、飼育密度ストレスの影響で起こる様々な生体反応と関連性が強いことを確認し、養殖魚の飼育密度ストレスがエネルギー代謝に及ぼす影響を把握したうえで、養殖魚のストレス状態をよりの確に把握しうる指標を決定することを研究期間中に達成する目標に設定した。

### 3. 本研究の実施において用いた研究手法

飼育水槽で飼育密度条件を変えようとすると、アンモニアの蓄積や溶存酸素量の低下など水質条件の変化を伴う。水質条件をそろえようとすると注水量の調整が難しい。また、網生け養殖では、飼育密度条件による水質の変化はそれほど大きくはなく、単位空間あたりの飼育量が大きな要因となることが考えられる。本研究においては、水質条件を一定にし、単位空間あたりの飼育密度が魚のエネルギー代謝に及ぼす影響を明らかにするため、

以下の飼育方法を各小課題の実験に共通して採用した。

すなわち、ティラピアを 60 L 水槽に、欧州連合で適正飼育密度として推奨されている  $3.7 \pm 0.1 \text{ Kg m}^{-3}$  となるように収容し、これを対照区とする。同様に設置した水槽で、単位水量当たりの収容密度が  $40.1 \pm 4.9 \text{ Kg m}^{-3}$  となるように穴の開いたアクリル板で仕切りを設け、高密度ストレスを負荷する。60 L 水槽への注水量やエアレーション等の条件は同一とすることで、高密度飼育による水質悪化や溶存酸素量への影響を排除した。

試験群として、対照群(欧州連合推奨密度；以下 CTRL 群)、プロバイオティクス投与群(市販飼料にプロバイオティクスを添加し給与した群で飼育密度は対照群と同じ；以下 CTRLP)、高密度飼育群(欧州連合推奨密度の 10 倍；以下 STRESS 群)および STRESS 群をプロバイオティクス添加飼料で飼育した群(以下 STRESSP 群)の 4 試験群を設定した。プロバイオティクス投与試験群の設定は、プロバイオティクスに高密度飼育ストレスの軽減効果が認められたためである。飼育中の給餌率は収容魚体重の 3% に統一した。飼育試験に用いた供試魚の体重は約 12 g であった。試験時の水温は  $26 \pm 1.5$ 、pH は  $7.4 \pm 0.2$ 、溶存酸素量は  $9.9 \pm 1.7 \text{ mg/l}$  であった。

### 4. 研究成果

#### 1) 高密度飼育ストレスによる成長、血液生化学指標への影響およびプロバイオティクス投与による軽減効果

本研究では、高密度飼育開始 1 週間後および 2 週間後の影響を調べた。長期の飼育では密度以外の飼育条件の影響が強く表れることが懸念されたためである。まず、高密度飼育

ストレスの成長に及ぼす影響を調べたところ、STRESS 群が他の 3 群に比べて有意に低い成長率を示し、筋肉中の RNA/DNA 比も有意に低かった。CTRL と STRESS 群間の比較および CTRLP と STRESSP 群間の比較では、成長率および RNA/DNA 比ともに高密度飼育で有意に低下することが確認できる。このことは、高密度飼育によるストレスは、短期間であってもその成長に影響を及ぼすこと、プロバイテイクスの投与が高密度飼育ストレスによる成長停滞を改善する効果を有することが明らかとなった。SGR に比べて、RNA/DNA 比はバラツキが少なく、有意な変動を検出しやすいこと、魚類においても RNA/DNA 比は栄養状態を反映することの報告が多いことなどから、高密度飼育の影響を評価する指標として有用であると考えられた。

同実験における高密度飼育の影響をストレス反応として評価するため、血液生化学的検査をおこなった。一般的にストレス指標として用いられているのは血漿コルチゾール値であるが、血漿コルチゾール値には試験群間で有意な差は認められなかった。淡水魚がストレスを受けたときには、血漿浸透圧、血漿ナトリウム、血漿塩化物がそれぞれ低下を示す。1 週間の高密度飼育では、これらの指標にストレス反応を示す有意な変動は見られなかった。高密度飼育を 2 週間続けると、STRESS 群の血漿浸透圧、血漿ナトリウム及び塩化物量は他の 3 群と比較して有意な低下を示した。ストレス負荷時の血糖値はコルチゾールによる解糖促進によって上昇するが、本実験において、1 週間の高密度飼育では、STRESS および STRESSP 群で血糖値が有意に上昇した。しかし、高密度飼育を 2 週間続けると、STRESS 群は他の 3 群よりも低い値を示した。

この血糖値の変動は RNA/DNA 比と同様の変動傾向であった。

本研究においては、淡水魚がストレスに暴露された場合に示す一般的なストレス反応を示さなかった。ストレス反応はストレスの強度とストレス負荷の時間に依存すると考えられるが、2 週間の高密度飼育による影響はテラピアにおいては、血漿コルチゾールの上昇や浸透圧攪乱などの所見は見られなかった。このことは、酸素を十分供給する条件下で実施したブリの高密度飼育実験による結果と一致するものであった。それにも関わらず、高密度飼育による成長停滞は明確に認められた。この成長停滞は給餌率を魚体重の 3% に固定したことから摂取エネルギーと消費エネルギーのギャップにより生じたものと考えられる。実際に血漿値は RNA/DNA 比と連動した変化を示しており、本研究で認められた血糖値の変化は摂取エネルギーと消費エネルギーのギャップにより生じた栄養状態の低下を示した変動とみられる。STRESS 群と STRESSP 群の比較では、STRESS 群で見られた RNA/DNA 比、血漿浸透圧、血糖値が STRESSP 群で改善され、対照群と同程度の値を示していたことから、本研究で投与したプロバイテイクスは高密度飼育による摂取エネルギーと消費エネルギーのギャップを予防または改善する効果を有することが示唆された。

## 2) 多変量解析による高密度飼育魚における生理状態の解析

前実験において、高密度飼育が明瞭なストレス反応を惹起しない段階で摂取エネルギーと消費エネルギーのギャップが生じ、それによる二次的影響を含めた生理状態の変化が

RNA/DNA 比や血液生化学所見に反映されることが示唆されたことから、それを検証することを目的として、血漿総コレステロール (TCHO)、中性脂肪(TG) 及び総タンパク(TP) を新たに追加測定し、多変量解析による高密度飼育魚における生理状態の解析を試みた。

はじめに、各測定値のデータを元に Student-Newman-Keuls (SNK) test により、多重比較を行い、プロバイオティクスの投与効果 (CTRL 群と CTRLP 群、STRESS 群と STRESSP 群の比較)、ストレス効果 (CTRL 群と STRESS 群、CTRLP 群と STRESSP 群の比較) および相互作用による効果 (Two-Factor ANOVA) を検討した。高密度飼育群では GLU、TCHO および TG が有意に高く、RNA/DNA 比が有意に低かった (表-1)。本実験の結果から、栄養状態を反映する測定項目および代謝関連項目に有意な変動が見られることが示唆された。

そこで、因子分析を行い、高密度飼育による生理状態に及ぼす因子の特定を行うこととした。この結果から、第一因子として TCHO、TG および TP (エネルギー物質)、第二因子として OSM および CORT (ストレス関連指標)、第三因子として GLU および RNA:DNA 比 (栄養状態関連指標) が高密度飼育による影響を反映するものと考えられた。

### 3) 高密度飼育の影響を検出するためのモニタリング法の検討

血漿中成分 17 項目の個別の比較では、個体差が大きいことが影響し、有意差を検出することが難しい。そこで、血漿中成分 17 項目を判別分析により解析し、高密度飼育の影響を検出することが可能かどうかを検討した。

高密度飼育群の判別スコアの頻度分布は対

象群とは異なり、判別スコアによって両群を識別可能であることが示唆された。この両群間のマハラノビス距離は 3.81 であった。しかし、判別感度としてはあまり高くないものと考えられたため、無機成分 4 項目を用い、以下の判別式を適用することで、判別感度は 87% に上昇した。

$$\text{NORMAL} : 0 > -142.6 - 31.9 \times \text{IP} - 1.5 \times \text{Mg} + 1.7 \times \text{Na} + 5.1 \times \text{K}$$

### 4) 高密度飼育魚におけるエネルギー代謝状態の解析

肝臓および筋肉中の ATP 含量を測定した。肝臓の ATP 量は 2 週間の高密度飼育では有意な低下は見られなかった。このことはエネルギー物質である ATP 量そのものには高密度飼育による差異は生じないことを示している。1) および 2) の検討では、高密度飼育が摂取エネルギーと消費エネルギーのギャップ生じることが示唆されたが、ATP 量に差異が生じるほどの影響が現れてくるのはエネルギーギャップが大きくなり、適応が不可能な状態に陥った段階で生じると考えられ、本結果とは矛盾しない。

2) での検討においては、エネルギー源としての TG および TP の動員が行われることが示唆されたことから、まず、血漿中のアミノ酸分析により高密度飼育の影響を調べた。血漿中の遊離アミノ酸量は CTRLP 群および STRESS 群が CTRL 群より有意に高い値を示した。このことは、高密度飼育で生じたエネルギーギャップを補うためにエネルギー源としての遊離アミノ酸が動員されたことが示唆している。このとき、末梢組織での遊離アミノ酸消費が十分に行われなければ、血漿中の遊離アミノ酸量が増加することになる。STRESSP 群の血漿遊離アミノ酸量は CTRL

群と同程度であり、CTRLP 群より有意に低かった。これらを考え合わせると、プロバイオティクスの投与によりエネルギーとして使用可能な遊離アミノ酸が増加し（余剰エネルギー）成長促進に寄与していること、消費エネルギー増加をアミノ酸の利用によって補っていることが考えられた。STRESS 群と STRESSP 群の肝臓中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性およびグルコース-6-リン酸でヒドロゲナーゼ活性は STRESSP 群が STRESS 群より有意に高く、プロバイオティクスが高密度飼育時のエネルギー代謝の面から適応反応を促進しているのではないかと推察された。

#### 5) 養殖現場での飼育状況を想定した高密度飼育の影響解析

実際の養殖現場での高密度飼育の影響を解析する目的で、コンクリート水槽での試験を実施した。本試験においては、1 水槽に収容するティラピアの尾数を変えることで所定の飼育密度を維持し、結果として水質条件も異なることを容認した試験設計とした。

溶存酸素量が 100 尾/m<sup>2</sup> 区で高かったほかは水質条件に大きな違いは見られなかった。本試験においては、飼育密度に依存して肥満度および血漿中性脂肪の低下と血漿 AST 活性の上昇が認められた。本試験では、高密度飼育区の溶存酸素量が少なく、実験室レベルでの解析結果と逆の変動を示したものもあった。プリでの試験でも、高密度飼育による影響を調べる場合には、水質の調整を行った場合と行わなかった場合とでは変動が異なることがあり、それに影響を与える最も重要な要因は溶存酸素量であると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件) 査読あり  
Ana Teresa Goncalves, Masashi Maita,  
Kunihiko Futami, Masato Endo, Takayuki  
Katagiri; Effects of a probiotic bacteria  
Lactobacillus rhamnosus dietary  
supplement on the crowding stress  
response of juvenile Nile tilapia  
Oreochromis niloticus. Fisheries Science 77  
633-672 (2011).

〔学会発表〕(計 3 件)  
Ana Teresa Goncalves, Masashi Maita,  
Towards Fish Welfare Assurance - Health  
Condition Diagnosis: A case study. 6th  
World Fisheries Congress (2012年05月07日  
~ 11日, エジンバラ)

Ana Teresa Goncalves, Masashi Maita,  
Makoto Endo, Kunihiko Futami,  
Takayuki Katagiri; Probiotic bacteria  
prophylaxis effects on amino acid  
metabolism of juvenile fish under crowding  
condition. AQUA 2012 Conference (2012年9  
月1日~5日, プラハ)

Ana Teresa Goncalves, Makoto Endo,  
Masashi Maita; Modulatory effects of a  
probiotics enriched diet in the energy  
metabolism of juvenile fish exposed to  
chronic stress. ISFNS 2014 (2014年5月25日  
~ 30日, ケアンズ)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

舞田正志 (MAITA Masashi)  
東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授  
研究者番号: 60238839