

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K07575

研究課題名(和文) カレイ類の無眼側黒化におけるストレス-コルチゾル系の関与

研究課題名(英文) Involvement of stress-cortisol axis in blind-side hypermelanosis of flatfishes

研究代表者

田川 正朋 (TAGAWA, Masatomo)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：20226947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメでは、放流や養殖のための稚魚を生産する際に、天然魚とは異なり眼のない側にも黒い部分が出現する着色型黒化という現象が頻発し問題となっている。本研究により、ストレスによって分泌されるコルチゾルというホルモンが、着色型黒化の直接原因の一つであることが確認された。また着色型黒化の防除方法としては、飼育水槽底面を凹凸にすることが効果的であること、および、種苗生産現場でも設置が容易な凹凸面として考案した、水槽内面を網で覆う方法でも着色型黒化を強力に防除できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで漠然とした悪いイメージでしかなかった「ストレス」を、コルチゾルを介して形態異常を誘起する一要因と確定できたことに水産増殖学的な意義がある。生残率や成長が経済的に見合う程度に改善された現状においても、形態異常については普遍的な原因が明らかにされていないが、今後、ストレス軽減を形態異常防除の基本的な方針として位置づける事ができたことは大きい。さらに網敷飼育という、現時点で唯一、種苗生産現場で応用可能な着色型黒化の防除方法を提案できたことは、水産養殖業者の経済的なメリットに寄与できるため、社会的な意義もある。

研究成果の概要(英文)：In Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, staining-type hypermelanosis frequently occurs on the blind side of artificially reared juveniles produced for stock enhancement and aquaculture. By the present study, it is clarified that cortisol, a stress responsive hormone, is a direct enhancer of the hypermelanosis. For the prevention, effectiveness of undulated flooring of the rearing tank was found. As easy-installing undulated bottom for aquaculture companies, utilization of net-lined tanks was proposed.

研究分野：魚類生理学

キーワード：ヒラメ・カレイ類 ストレス コルチゾル 無眼側黒化 着色型黒化 網敷き飼育 形態異常

1. 研究開始当初の背景

多くの魚類で養殖や放流のために卵から稚魚までの人工飼育が盛んに行われている。現在では死亡率こそ天然を上回ったものの、改良された餌料を十分与えられているにも関わらず、体色や骨格が天然魚とは異なる形態異常魚がしばしば高頻度で発生する。

ヒラメやカレイ等の異体類では、本来眼のある表側(有眼側)に白色部分が出現した「白化魚」や、逆に本来眼のない裏側(無眼側)にも黒い体表の出現する「両面有色魚」が変態期に高い頻度で出現する(右図)。これらは仔魚から稚魚への変態期に発現する「変態の異常」である。一方、正常に変態を終えても、その後の稚魚期に無眼側に黒い部分が二次的に出現する「着色型黒化」と呼ばれる現象も頻発する。着色型黒化は飼育水槽に砂を敷くこと(砂敷水槽)で防除できるが、排泄物や残餌の除去が困難なため大規模水槽では実施が困難とされる。

我々の研究グループでは15年間にわたり、これらの問題に取り組んできた。その結果、変態の異常を甲状腺ホルモンの分泌と感受性のタイミングのずれで説明する仮説(タイミング説)を提唱した。このタイミング説で決まる変態時の形態に別要因によって黒化が付加的に起こると考えると、着色型黒化だけでなく図に載せていない様々な低頻度の体色異常についてもほぼ全てが説明できると考え始めた。

これらの過程で着目したのがストレスの影響である。高密度などストレスが強い環境では無眼側の黒化が増加する傾向があった。一方、ストレスはコルチゾルの分泌を促進する。コルチゾルは変態初期にも多く分泌され、幼型形質であるオタマジャクシの尾やヒラメ仔魚の伸長鰭条の吸収を促進させる。我々はカレイ類の白い無眼側体表が仔魚的(幼型的)であり黒い有眼側体表が成魚的であることを明らかにしている。興味深いことにホシガレイではコルチゾル投与が両面有色個体(即ち、仔魚的な白い体表を欠失した個体)を増加させる。ここで変態におけるコルチゾルの本質的な役割は「幼型形質の破壊」であると考え、ホシガレイでは無眼側体表を維持する幼型機構をコルチゾルが破壊した結果、成魚的な有眼側体表が発現したと説明できる。そこで、ストレスによって分泌されるコルチゾルは異常な時期に過度に幼型形質を破壊しかねないため、形態異常の直接原因となる可能性が高いと推測している。

哺乳類ではコルチゾルが骨芽細胞の分化抑制などの作用を有するため、魚類の骨格異常との直接的な関連も予想できる。形態異常の防除のためには仔稚魚期においてこそコルチゾルの作用を調べる必要があるが殆ど知見がない。経験的にストレスは種苗生産に良くない。しかし形態異常の本質を理解するためには、なぜストレスが良くないかを実験的に明らかにする必要があった。

2. 研究の目的

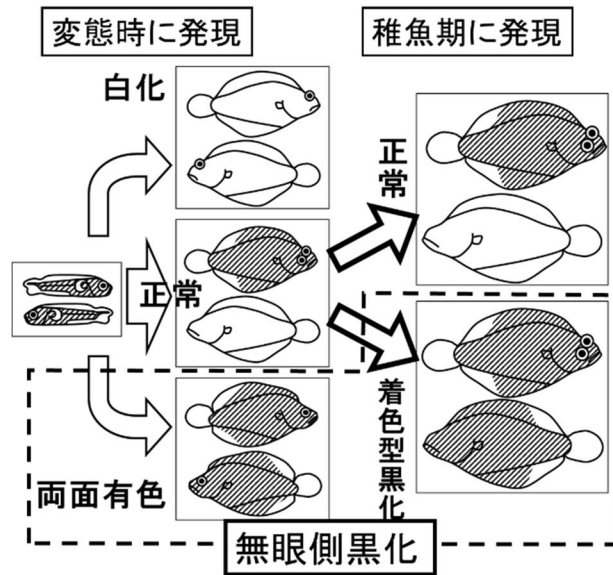
カレイ類では、放流や養殖のための稚魚を生産する際(種苗生産)に、天然魚とは異なる色や形になってしまう形態異常個体が、時には80%を越える頻度で出現し、効率的な栽培漁業や養殖のための重大な障害となっている。本研究は、ストレスによって分泌が促進されるホルモンであるコルチゾルが、飼育環境下のカレイ類に見られる形態異常の直接原因の一つであるとする新たな仮説を提唱し、それを検証することを目的とする。あわせて、砂敷飼育が着色型黒化の防除に有効である原因を明らかにし、飼育現場で応用可能な代替策を提案する。

(1) 着色型黒化の発現機構 - コルチゾルによる幼型形質破壊のモデル -

我々はコルチゾルの注射がヒラメの着色型黒化を促進するという予備的な結果を既に得ている。これを本研究において、異なった濃度や拮抗剤との組み合わせを試すことにより個体レベルで確認する。また、サンプリング時のハンドリングでは変動しにくそうな間質腺の組織像で、コルチゾル産生能の評価が可能か検討する。さらに、有眼側と無眼側の鱗移植実験によって、黒化部位の拡大機構やコルチゾルの作用機構を組織レベルで明らかにする。

(2) 砂敷飼育の有効性の原因解明と、飼育現場で応用可能な代替策の提案

以前より着色型黒化の防除には砂敷飼育が有効であることは明らかにされていたが、砂敷のどのような特質が効果を有するか不明であった。我々は凹凸面こそが有効であるという予備的な結果を得ているため、この点を再確認するとともに、種苗生産現場で応用可能な代替策の提案を行う。



3. 研究の方法

(1) 着色型黒化の発現機構 - コルチゾルによる幼型形質破壊のモデル -

ヒラメ個体へのコルチゾル投与による着色型黒化の誘起

コルチゾルが着色型黒化を促進させることを予備的に確認してある方法に従って、体全体のレベルで厳密な再確認実験を行う。具体的には、ヒラメ稚魚に様々な濃度のコルチゾルを、あるいはコルチゾルの合成阻害剤であるメチラポンを、それぞれ植物性油脂に溶解し腹腔内に注入する。あるいは餌に混和して経口投与する。通常の飼育を継続し定期的に無眼側の写真を撮影し、着色型黒化の面積を比較する。

間腎腺組織像によるコルチゾル産生能の評価

マツカワを受精卵から着底完了まで様々な密度で飼育し、高いストレスのかかった高密度区と低いストレスのかかった低密度区、およびその中間区を作成する。コルチゾル産生に關与する酵素の特異抗体で間腎腺を検出し、細胞核の大きさを試験区間で比較する。

有眼側 - 無眼側間の鱗移植実験による着色型黒化の拡大機構の検討

我々は、1個体のヒラメの有眼側と無眼側とで鱗を移植する実験系を既に確立している。それを用いて有眼側鱗を無眼側に移植し2週間後に除去すると、その位置に再生してきた鱗は有眼側様の黒色素胞を有していた。このことから有眼側鱗には無眼側体表を有眼側化させる「幼型形質破壊因子」が存在すると推察している。この鱗移植系を用い、着色型黒化の拡大方向や拡大時期を幼型形質破壊因子の拡散によって説明することが可能か検討する。

(2) 砂敷飼育の有効性の原因解明と、飼育現場で応用可能な代替策の提案

ヒラメの無眼側黒化について、砂敷水槽のどのような特質が着色型黒化に抑制効果を有するのかを、例えば、砂の画像や隠れ家、ザラザラした触感、などの要因ごとに検討し、コルチゾルとの関連性を検討する。その特質を有し、容易に設置できる底質をもちいて長期飼育実験を実施し、出荷サイズの養殖魚に実質的な防除効果を有するかを明らかにする。これらにより、砂敷水槽を用いずに着色型黒化を防除できる新たな飼育法を提言する。

4. 研究成果

(1) 着色型黒化の発現機構 - コルチゾルによる幼型形質破壊のモデル -

ヒラメ稚魚へのコルチゾル投与による着色型黒化の誘起：

ヒラメ稚魚に低濃度・高濃度のコルチゾルを添加した配合飼料を与えて飼育した。無眼側の黒化面積は右図に示したように、コルチゾルの濃度に応じて有意に増加したことから、コルチゾルには着色型黒化を誘起する作用があることが確実となった。

コルチゾルの効果は再現性良く確認できたが、コルチゾルの合成阻害剤であるメチラポンについては有意な抑制効果は見られず、自然に発現してくる黒化への内因性コルチゾルの関与は不明であった。

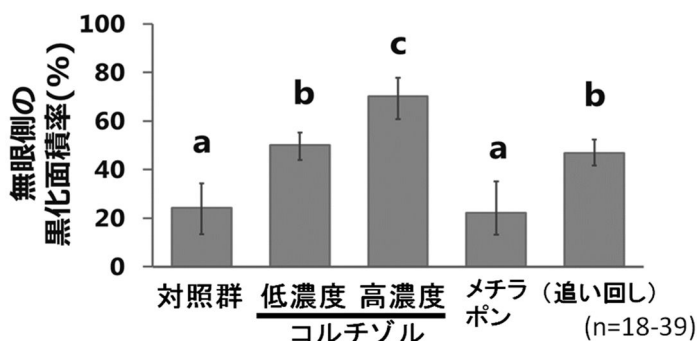
また、着色型黒化の部域差を起す要因についても検討を行った。他の異体類における先行研究より、脊椎動物の背腹方向の体色差に中心的な役割を果たすアグチタンパクが、異体類の有眼側・無眼側の体色差に重要と考えられていた。しかし、ヒラメの着色型黒化においては、アグチタンパクではなく色素胞の調節ホルモンである MSH や MCH の受容体の発現量が、黒化発現の部域差に重要であることが明らかとなった。

間腎腺組織像によるコルチゾル産生能の評価：

様々な飼育密度で飼育したマツカワ稚魚について核の大きさを測定したところ、飼育密度が高く強いストレスがかかっている群ほど、核の大きさは大きくなっていった。このことから、間腎腺核の大きさは恒常的なストレス指標として用いることができると考えられた。

有眼側 - 無眼側間の鱗自家移植による着色型黒化の拡大機構の検討：

有眼側から無眼側へ鱗を移植する実験系を用い、着色型黒化の起こりやすさと移植鱗からの黒化拡大面積の関係を検討した。その結果、移植鱗からの黒化拡大面積は、飼育環境や無眼側上の位置など着色型黒化の起こりやすさと完全に一致し、本実験系によって着色型黒化拡大の機構が再現できる可能性が強く示された。



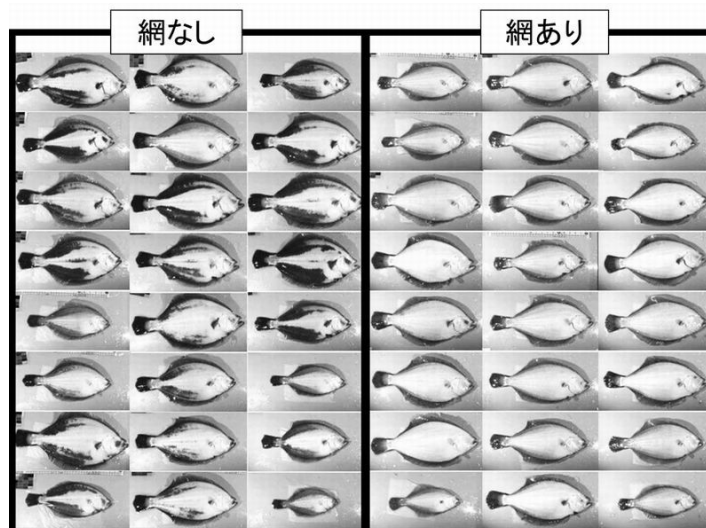
(2) 砂敷飼育の有効性の原因解明と、飼育現場で応用可能な代替策の提案

砂の有する様々な特質を分離して検討した結果、砂を敷かなくても底面を凹凸にすることで、ヒラメの着色型黒化を防除できる可能が見いだされた。そこで、凹凸面として建築用波板を用いたところ、色とは独立して凹凸面が無眼側黒化の抑制効果を持つことが示された。また、水槽底面に接していない無眼側体表部位に着色型黒化が発現している傾向が観察され、神経系が着色型黒化の抑制に関与していると推測された。容易に設置可能な凹凸面として飼育水槽内面を網で覆うことで、非常に効率的に着色型黒化の抑制されることが明らかになった。

そこで、長崎県の協力を得て、無選別のヒラメを用いた1トンの水槽による6ヶ月にわたる飼育実験を実施した。右図に示したように、網敷き水槽においては着色型黒化の面積は約1/40にまで減少し、一見天然魚と区別できないほどきれいな稚魚を生産することが実験水槽レベルで確認できた。この稚魚では無眼側胸鰭周辺部にのみ黒化部位が発現していたが、胸鰭の切除や目合いの大きな網の使用によって胸鰭周辺の黒化についても軽減できた。

また、ヒラメを含む様々な魚種の人工生産魚では、「寸詰まり」と表現される胴尾部の短い個体となる現象が広く知られている。網敷き飼育では成長はやや遅れるものの、体のプロポーションが天然魚に近づくことも明らかとなった。

さらに、網敷き飼育ヒラメ稚魚における血中コルチゾール濃度を測定した。網敷き飼育によって無眼側の黒化面積率がほぼ5%程度に抑制された稚魚と、平底飼育により黒化面積率が50%程度となった個体との間には、血中コルチゾール濃度には有意差は認められなかった。また、両区とも黒化面積率と血中コルチゾール濃度には有意な相関関係は見られなかった。すなわち、網敷き飼育はストレスの緩和によるコルチゾール濃度の低下を介さずに、黒化の拡大を抑制していることを強く示唆する結果となった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nao Matsuda, Ikki Yamamoto, Reiji Masuda, Masatomo Tagawa	4. 巻 497
2. 論文標題 Cortisol promotes staining-type hypermelanosis in juvenile Japanese flounder	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Aquaculture	6. 最初と最後の頁 147-154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.aquaculture.2018.07.055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakata Kuniaki, Yamamoto Ikki, Miyama Yoshifumi, Nakamaru Toru, Masuda Reiji, Tagawa Masatomo	4. 巻 83
2. 論文標題 Undulated flooring in the rearing tank decreases hypermelanosis in Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1035
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-017-1135-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuda Nao, Kasagi Satoshi, Nakamaru Toru, Masuda Reiji, Takahashi Akiyoshi, Tagawa Masatomo	4. 巻 262
2. 論文標題 Left-right pigmentation pattern of Japanese flounder corresponds to expression levels of melanocortin receptors (MC1R and MC5R), but not to agouti signaling protein 1 (ASIP1) expression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 90 ~ 98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2018.03.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koei Mizutani, Toshiyuki Yamada, Keita W. Suzuki, Reiji Masuda, Kuniaki Nakata, Masatomo Tagawa	4. 巻 86
2. 論文標題 Prevention of hypermelanosis by rearing Japanese flounder <i>Paralichthys olivaceus</i> in net-lined tanks.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 127-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-019-01369-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴巻佑介・藤川稔晃・南卓志・有瀧真人・田川正朋
2. 発表標題 大型シロギスの効率的な養殖にむけて（2）～仔稚魚の骨格異常におけるストレス関与の可能性～
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田川正朋
2. 発表標題 ヒラメ・カレイ類の形態異常 - 飼育環境への適応不全と内分泌系
3. 学会等名 長崎大学海洋未来イノベーション機構特別シンポジウム「海洋動物の環境適応」（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田川正朋
2. 発表標題 小さな脊椎動物？ 仔魚の生理生態と変態
3. 学会等名 第88回日本動物学会富山大会・シンポジウム20 小さな動物たちの多様な生き様（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田川正朋
2. 発表標題 魚類の変態からみた甲状腺系の系統進化的な役割
3. 学会等名 第44回日本神経内分泌学会学術集会・シンポジウム3 比較内分泌の視点から神経内分泌を考える（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 十川麻衣・松田直往・田川正朋・横井勇人・鈴木 徹
2. 発表標題 ヒラメの着色型黒化部に現れる黒色素胞の起源について
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水谷昂栄・山田敏之・益田玲爾・中田訓彰・田川正朋
2. 発表標題 網敷き飼育によるヒラメ着色型黒化の防除
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤咲希子・松田泰平・宇治督・風藤行紀・田川正朋
2. 発表標題 マツカワにおいて高密度飼育がコルチゾル産生能と体色異常に与える影響
3. 学会等名 第41回日本比較内分泌学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山田雄太・有瀧真人・田川正朋・征矢野清
2. 発表標題 シロギスの天然魚と飼育環境下におけるコルチゾル濃度の変化
3. 学会等名 平成28年度水産学会九州支部大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松田直往・笠木聡・中丸徹・益田玲爾・高橋明義・田川正朋
2. 発表標題 ヒラメ着色型黒化におけるMCR、ASIPおよびMCHRの関与の可能性
3. 学会等名 平成29年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 田川正朋
2. 発表標題 異体類の体色・眼位異常におけるホルモン系関与の可能性
3. 学会等名 平成28年度日本水産学会春季大会 シンポジウム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松田直往・深山義文・松田玲爾・田川正朋
2. 発表標題 ストレス・コルチゾル系がヒラメ着色型黒化に及ぼす影響
3. 学会等名 平成28年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 渡邊裕太・深山義文・田川正朋
2. 発表標題 鱗の自家移植によるヒラメ無眼側黒化の拡大機構 - 黒化鱗は周辺を黒化させる -
3. 学会等名 平成28年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 中田訓彰・深山義文・益田玲爾・田川正朋
2. 発表標題 飼育水槽底面の凹凸および色がヒラメ着色型黒化に及ぼす影響
3. 学会等名 平成28年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 鶴巻佑介・藤川稔晃・南卓志・有瀧真人・宇治督・風藤行紀・田川正朋
2. 発表標題 大型シロギスの効率的な養殖に向けて(6)～ストレスによるコルチゾルが短軀症を誘起する可能性～
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 田川正朋	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善	5. 総ページ数 718
3. 書名 7章10節 変態の生理 (P348-349). 「魚類学の百科事典」(日本魚類学会編)	

1. 著者名 田川正朋	4. 発行年 2017年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 1-10
3. 書名 1章 魚類の形態異常の概略、In 魚の形は飼育環境で変わる－形態異常はなぜおこるのか？	

1. 著者名 田川正朋	4. 発行年 2017年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 96-104
3. 書名 12章 異体類の体色・眼位異常におけるホルモン系関与の可能性、In 魚の形は飼育環境で変わる一形態異常はなぜおこるのか？	

1. 著者名 天野勝文・田川正朋	4. 発行年 2016年
2. 出版社 裳華房	5. 総ページ数 212
3. 書名 序論 - 時の視点から見た生命現象とホルモン、P1-7. 「ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ2巻 発生・変態・リズム」	

1. 著者名 田川正朋	4. 発行年 2016年
2. 出版社 裳華房	5. 総ページ数 212
3. 書名 魚の変態とホルモン、P64-81. 「ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ2巻 発生・変態・リズム」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----