

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2019～2023
課題番号：19K06237
研究課題名(和文) ヒラメ・カレイ類の裏側黒化とストレス - 網敷き飼育と卵の最適化による総合的な正常化

研究課題名(英文) Blind side hypermelanosis and stress in heterosomata, by net-lined rearing and optimization of eggs

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：養殖されたヒラメでは、無眼側に黒色部分が出現する黒化が知られている。本研究では、この黒化は、水槽底面の50%程度を覆う大きさのザラザラした底質を敷くことで、ほぼ防除できることを明らかにした。その一方で、きわめて強い遺伝的影響により発現する黒化の存在も明らかとなり、黒化の原因遺伝子、すなわち正常な白い無眼側の維持に必須の遺伝子の特定に道が開かれた。ヒラメに限らず飼育魚では、他にも天然魚にはない好ましくない現象が知られる。マツカワやキンギョの体表の黒化、シロギスの短軀症、マツカワにおける性比の雄への偏りなどでは、いずれも飼育下で想定されるストレスがこれらの原因となっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖ヒラメは裏側にも黒色部分があるため、皮をひいた状態で消費者に届くルートで流通していると考えられる。本研究で開発した黒化の防除法は、養殖現場の大水槽に容易に応用できる。今後、裏側のきれいな養殖ヒラメが生産できるようになると、供給量や品質の安定している養殖ヒラメの価格競争力がさらに高まると期待できる。また、本研究によってヒラメの非対称性のカギとなる遺伝子の特定に道を開くことができた。さらに、飼育魚だけに見られる様々な好ましくない現象には、飼育自身によるストレスが原因となっている例が複数明らかとなった。このことは、ストレス軽減こそが、より良い飼育魚を育てるための基本戦略となりうることを示せた。

研究成果の概要(英文)：Most of the farmed Japanese flounder has hypermelanosis on the blind side. In this study, we found that the darkening area can be largely reduced by setting a rough substrate (net, grazing, wire netting, for example) that covers about 50% of the tank bottom. On the other hand, presence of a hypermelanosis which strongly caused by genetic background was clarified. From this finding, the gate was opened to identify the gene crucial for the hypermelanosis, in other word, crucial for the normal process to maintain the white blind side. In addition to flounders, there are other undesirable phenomena in farmed fish of other species; the phenomena not found in wild fish. By examining the hypermelanosis of the body surface in barfin flounder and goldfish, body shortening in white whiting, and a male biased sex-ratio in barfin flounder, the stress expected in rearing tanks was suggested as a common possible factor for these undesirable phenomena.

研究分野：魚類生理学

キーワード：ヒラメ カレイ類 無眼側黒化 網敷飼育 ストレス コルチゾル 短軀症 性比の偏り

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒラメやカレイ類では、養殖や放流のための稚魚が人工飼育によって生産されている。しかし、本来白いはずの裏側にも表側と同じような黒色部分の出現してくる黒化個体が、時には8割以上も出現する。見た目が悪く約3割も安く取引されるため、様々な観点から防除が検討されてきたが、実用に至ったものはない。我々は、飼育水槽の底に網を敷くと黒化を防除できること、およびストレスによって分泌されるホルモンであるコルチゾルが黒化を促進することを示した。

さらに、他の魚類の飼育魚にも見られる以下の2つの困った現象が知られている。性比がオスに偏る現象(性比のオス化)と、天然魚と比較すると体型が寸詰まりになる現象(短軀症)である。性比のオス化については、高水温がストレスとなってコルチゾルが分泌され、このコルチゾルが性比のオス化を起こすことがヒラメで明らかにされている。しかし、マツカワというカレイの一種では、適水温で飼育してもオス比率が高く、原因の解明と対策が求められている。一方短軀症については、特定のタイプを除けば原因は解明されていない。しかし、哺乳類ではコルチゾルは骨形成を抑制するため、魚類でも同じ機構が存在し、短軀症の原因となっている可能性が高い。天然魚では血中コルチゾル濃度が一般に低いことから、これまでは意識されてこなかったが、通常の飼育自身がストレスとなっている可能性がある。これまで黒化、性比のオスへの偏り、短軀症は、別々のテーマとして研究されてきたため、共通原因や関連性を検討されることは無かったが、この3者の出現機構をストレスで分泌されるコルチゾルだけで説明できる可能性が高い。

もう一つの未解明な問題として、大きな個体差がある。無眼側黒化の個体差について、我々はヒラメを用いて予備的な検討をおこなっていた。それによると、正常魚には、現地で飼育されていた母親魚の子供と、別の県の母親魚の子供が混在していた。一方、黒化魚には、別の県の母親魚の子供のみであった。すなわち本事例では、ある稚魚が黒化するかどうかは、黒化しやすい卵を産む親魚の子供であったか、受精卵の時期に輸送されたか、のいずれかで決まっていた可能性が高い。さらに、ストレスに反応したコルチゾル濃度の上昇傾向は遺伝し、受精卵にストレスをかけると稚魚のストレス反応性が異常となるという先行研究がある。そのため、黒化した原因が親魚が輸送かいずれの場合であっても、黒化の個体差は最終的にはストレス-コルチゾル系の個体差で説明できる可能性が高い。

2. 研究の目的

これまで、意識的な過密状態や不適切な水温、疾病などのない限り、普通は飼育魚の受けているストレスは低いと漠然と考えられてきた。しかし、現在普通に用いられている飼育水槽や飼育条件(密度や水質)でも、天然魚に比べると飼育魚には高いストレスがかかっている可能性がある。特に仔稚魚は体が小さいためストレスを感じやすいはずであるが、ストレスが黒化などの異常に及ぼす影響を検討した研究は殆ど無い。そこで、飼育魚にみられる様々な異常のうち、ストレス-コルチゾル系で説明の出来るものがどの程度あるか明らかにすることを目的の一つとする。

また我々が提唱している網敷き飼育は、実験室規模ではヒラメの黒化をほぼ完全に防除できる。この方法の大規模化や他のカレイ類への応用が実現すれば、増養殖現場で広く利用できる初めての黒化防除方法となる。さらに網敷き飼育ではストレスを下げることで性比のオス化や短軀症などの異常も防除できる可能性が高い。この点が検証できれば、ヒラメやカレイ類にみられる各種の異常に関して、ストレスの低減という新たな防除方針を提案できるはずである。そこで、網敷き飼育の実用化にむけた知見の集積もあわせて行う。

さらに通常飼育では黒化の程度は個体毎に大きくばらつく。この個体差の検討から、もともと黒化の出にくい卵を作出できれば、黒化を非常に簡単に防除できる。さらに我々は、黒化の出やすい卵では稚魚のストレス反応が過敏であり、性比のオス化や短軀症も起こりやすいと予想している。この予想が正しければ、卵の由来を最適化すれば稚魚のストレス反応が正常になるような卵を作出できるはずである。網敷き飼育は、ヒラメのように海底にいる魚にしか効果が期待できない。一方、卵の由来を最適化する方法ならば、他の多くの魚についても性比のオス化や短軀症の防除が将来可能になると考えた。そのため、黒化の個体差そのものの原因についても検討の対象とした。

3. 研究の方法

ヒラメを用いた研究は、おもに長崎県総合水産研究所、千葉県水産総合研究センター、和歌山県水産試験場、和歌山県南部栽培漁業センター、との共同研究として実施した。マツカワを用いた研究は北海道立総合研究機構栽培水産試験場との、また、シロギスを用いた研究は、福山大学内海生物資源研究所との共同研究である。なお、本研究では複数の研究を行っているため、それぞれの研究成果の項目で研究の方法の概略を記述することとした。

4. 研究成果

(1) ヒラメで成功した網敷き飼育を、増養殖現場の大水槽と他のカレイ類に応用する試み

大水槽への応用

ヒラメ等では、白いはずの体の裏側が黒くなる黒化という現象が高頻度で起こってしまうが、我々は飼育水槽の内側全面を網で覆う(袋網)と黒化を防げることを見出している。この点について、養殖現場の大規模水槽に応用することを考えて、効果的・効率的な網の設置方法を検討した。網の設置法については、水槽壁面を含む内面全体を覆わずとも、底面だけをゆるく張った網で覆うことで、黒化面積を対照区の1/5以下に下げることができた。また、底面50%程度をゆるく張った網で覆うだけでも対照区の1/3以下に抑えることができた。これにより、目的とする黒化低減レベルに応じて、簡便な網の設置方法や面積の提案が可能となった。なお、袋網区と対照区とで血中のコルチゾール濃度を比較したところ、有意差は認められなかった。このことは網や砂は、ストレスの軽減を介さずに着色型黒化の軽減に作用していることを示唆している。

飼育現場への導入をより簡便にするため、容易に購入できる底質による黒化抑制効果を検討した。底面積の50%を覆う大きさの樹脂製グレージングや金網でも、ゆるく張った網とほぼ同等の効果のみとめられ、大規模水槽への実用も十分に可能である感触を得た。また、袋網の効果を5トン水槽で検討したところ、小型水槽で見られたような顕著な着色型黒化の防除効果が確認でき、養殖業者が用いるさらに大きな水槽における実用化も十分に可能という感触を得た。

次に、養殖現場で必要とされる黒化抑制の程度を明らかにする目的で、黒化個体の流通上での取り扱いについての聞き取り調査を行った。しかし、養殖現場では、黒化個体が価格上の不利益を受けていないという意外な結果が得られた。これは、そもそも養殖ヒラメは無眼側が黒いものであるという認識があり、養殖されたヒラメは天然海域で漁獲されたヒラメとは異なった流通経路で取引されている可能性があると考えられる。そのため、養殖現場における着色型黒化の抑制は、ブランドヒラメなど、特定の現場での応用を行い、養殖ヒラメであってもきれいなヒラメが生産できることを、まず知ってもらうことが重要と考えた。

他のカレイ類への応用

マツカワにおいて、砂や網を水槽の底に敷くことで無眼側黒化が軽減できるか検討した。2022年度および2023年度の結果からは、マツカワでもこれらの処理によって着色型黒化を抑制できることが示され、異体類に広く応用できる可能性が明らかとなった。一方、効果の強さは一定せず、まだ制御できていない要因の存在も示唆された。

そこで、変態前である浮遊期の飼育密度が、変態し着底したのちの無眼側黒化に及ぼす影響を検討した。これまで確認できていたように、着底期に底砂を導入した水槽では、無眼側黒化がほぼ防除されることが再確認された。一方、経験的に予想していたような、浮遊期に高密度で飼育していた場合には底砂を導入しても無眼側黒化が発現するという現象は、実験的には確認できなかった。本種では飼育年度が異なると、同じ飼育条件であっても成長に違いが生じる。このことが再現性を得にくい原因かもしれない。

(2) ヒラメにおける黒化の個体差の解析から、より黒化しにくい卵を作出する試み

卵輸送の影響

我々のこれまでの研究から、激しい無眼側黒化には受精卵の輸送の影響が懸念されていた。この可能性を検討するため、受精卵を6時間にわたり自動車で輸送したのちに、輸送を経験していない卵と同一条件で飼育を行い、黒化への影響を検討した。しかし、激しい無眼側黒化および通常の着色型黒化、いずれについても影響はみられなかった。すなわち、通常行われている受精卵の輸送はヒラメの無眼側黒化に影響を及ぼさないため、今後も変更する必要はないことが明らかとなった。

親魚の影響

一方、黒化に影響を及ぼす可能性が考えられていたもう一つの要因が、親魚の遺伝的影響であった。これについては、単一の親魚群由来の受精卵から育てられていた稚魚から、無眼側全域が黒化していた個体が約7%出現した飼育事例について検討を行った。黒化個体と正常個体を選別し、マイクロサテライトDNAの解析を行った。親子判別の結果からは黒化個体が特定父母の組み合わせのみから出現していた。さらに、黒化個体が出現していた全同胞群からは正常個体3:黒化個体1の比で黒化個体が出現していた。すなわち、当飼育事例のヒラメの無眼側黒化については、直接的な親の遺伝的影響による出現の可能性が極めて高く、この黒化は潜性遺伝子のホモ化により発現すると推測された。現在、かねてより協力関係にある研究者に依頼し、原因遺伝子の特定を試みているところである。従って、特定の親魚群由来の稚魚に黒化個体の出現頻度が高い場合には、親魚を入れ替えることで防除できる可能性が明らかとなった。

(3) 天然魚とは異なる望ましくない形質へのストレス関与の可能性の予備的検討

形態異常や性比の偏りにストレスが関与することを示唆する現象

過去に採取してあったヒラメ個体を分析したところ、黒化の激しかった群のほうが短躯傾向は強かった。また、ある事業所で出現した黒化程度の激しい個体では、コルチゾル濃度と黒化程度には弱いながらも有意な相関関係が見られた。これらは、ストレスがコルチゾルを介して、短躯症と黒化の両方の原因となっている可能性を示唆する。

カレイの1種であるマツカワでは、無眼側黒化と性比の雄への偏りの両方が問題になっている。そこで、飼育密度がこれらに及ぼす影響を検討したところ、両者とも変態後の着底期の飼育密度が高いと悪影響を受けることが明らかとなった。すなわち、高密度がストレスとなり、性比の雄への偏りと黒化の両方の原因となっていることを強く示唆する結果となった。

黒化とは逆の現象である白化についても、ストレスの関与を示唆する現象が見つかった。2021～2023年の3年度にわたり、変態直前のマツカワ仔魚をALCに浸漬して耳石を標識した。仔魚が変態を完了したのちに耳石を摘出し、蛍光標識径から変態直前の体長を逆算した。白化となった稚魚は正常となった稚魚よりも、変態直前の体サイズが小さい傾向がみられた。なお、両面有色と逆位については年度間で異なる傾向がみられ、再現性が低かった。従って、少なくとも白化については、ストレスによっても影響を受ける成長速度の低下に関連した発現機構の存在が示唆された。

短躯症におけるストレスの関与の検討

飼育シロギスにおける短躯症や顎骨などの異常に及ぼすコルチゾル投与の影響を調べた。予備実験および本実験の2回の飼育実験の結果を総合して考察したところ、いずれの実験においてもコルチゾル投与区では対照区よりも有意に短躯傾向が強かった。一方、その原因となりうる脊椎骨の癒合は、実験により発症傾向が異なっており、コルチゾルによる短躯症誘起機構については明らかにすることはできなかった。また、顎骨の異常はコルチゾル投与とは無関係であり、ストレス以外の要因の影響が大きいと推測された。

シロギスの骨格異常は小さな個体に多い傾向がみられていた。シロギスは飼育下では共喰いが頻発するが、特に小型個体がより被食されて減耗しやすいことが確認できた。すなわち、小型個体のほうが強いストレスを受けていると推測された。そこで、骨格異常の発生頻度と発育初期の体サイズとの関連性を検討した。しかし、予想とは異なり骨格異常の発生には体サイズによる多寡はみられなかった。なお、本研究では被食された個体はサンプリングできない。そのため、骨格異常を有する小型個体がより多く捕食されている場合は、体サイズによる骨格異常の発生頻度の違いが検出できなかった可能性もある。

他魚種の黒化現象におけるストレスの関与の検討

キンギョにおいては黒ソブと呼ばれる体表の黒化現象が知られている。まず、黒化部分の形態的特徴を検討したところ、黒化部の深度、発現場所のランダムさ、および出現場所が凸部であるなど、異体類の着色型黒化とは異なる特徴が明らかとなった。さらに、黒ソブは冬季に出現し、夏季に消失することが明らかとなった。これらのことは、同じ体表の異常黒化であってもヒラメの着色型黒化とは根本的に異なる現象である可能性が示された。黒ソブの出現の季節性と発現部位の特徴から、低水温と体表面の傷が原因である可能性が考えられていたが、これらは実験的にも確認することができた。さらに、夏季に黒ソブ個体が減少することから高水温によって黒ソブが消失する可能性があったが、この点も実験的に確認できた。一方、実験的に傷をつけた場所が黒ソブ出現部位とは一致していなかったため、傷が局所的な直接要因とは考えにくい。従って、傷や冬季の低水温はともにキンギョにとってストレス要因と考えられる。ストレスは、異体類の着色型黒化だけでなく、キンギョの黒ソブにも関与している可能性がある。

また別の異常な黒化現象として、体内の血管が黒化する現象について検討を行った。神経棘や血管棘に沿った血管、および縁辺部の鱗付近の筋肉を通っている血管に黒化がみられることが、多くの魚種で確認できた。また、異体類では有眼側、他の魚種では背側において血管の黒化が激しかった。ヒラメでは、筋肉層の薄い標準体長50mm程度の稚魚で最も黒化が激しかった。以上より、血管の黒化は異常な現象ではなく、おそらく太陽光から血管を保護する役割のある正常な現象と推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuyoshi Onoyama, Toshiyuki Yamada, and Masatomo Tagawa	4. 巻 88
2. 論文標題 An effective and practical method of net settings in rearing tank to suppress hypermelanosis in Japanese flounder	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fisheries Science	6. 最初と最後の頁 419-427
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12562-022-01595-0	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田川正朋
2. 発表標題 海洋生物学へようこそ、魚の赤ちゃんからの招待状
3. 学会等名 第45回日本比較内分泌学会大会記念公開フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鶴巻佑介・藤川稔晃・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(10)～耳石標識から調べた種苗生産における共食いの影響～
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤航大・松田泰平・田川正朋
2. 発表標題 マツカワ仔稚魚期の飼育密度が性比と体色異常に与える影響
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野山剛・山田敏之・田川正朋
2. 発表標題 網敷き飼育によるヒラメの着色型黒化の防除 - 効果的・効率的な網敷き方法の検討 -
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴巻佑介・藤川稔晃・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(9)～コルチゾルは短軀症の原因となりうる～
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後藤千佳・中山耕至・加藤文仁・村田照之・田川正朋
2. 発表標題 遺伝的要因によると思われるヒラメ稚魚の無眼側黒化
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横井勇人・安齋賢・田川正朋
2. 発表標題 ヒラメの無眼側黒化変異体の原因遺伝子の探索
3. 学会等名 令和5年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横井勇人・安齋賢・田川正朋
2. 発表標題 ヒラメの無眼側黒化突然変異体のゲノム・遺伝学的解析
3. 学会等名 第56回 日本発生生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小野山剛・山田敏之・田川正朋
2. 発表標題 ヒラメ着色型黒化の簡便な防除法の検討と生産流通過程における調査
3. 学会等名 令和6年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 田川正朋（分担執筆）、水澤 寛太・中村 修（編）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 恒星社厚生閣	5. 総ページ数 200
3. 書名 光が彩るヒラメ・カレイ類養殖	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------