

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07562

研究課題名(和文) 魚類の麻酔にともなうストレス因子の動態-苦痛を軽減する魚類麻酔の探索-

研究課題名(英文) The fish anesthetic-to reduce pain-

研究代表者

松原 創 (Matsubara, Hajime)

東京農業大学・生物産業学部・教授

研究者番号：50459715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、魚類への苦痛を抑える麻酔の探索をおこなうとともに、得られた成果を魚類生産現場に普及させることをめざしておこなわれた。ティラピアとトラフグにタブレット型炭酸ガス発泡剤と市販麻酔であるオイゲノールをもちいたところ、ストレス指標は高濃度タブレット型炭酸ガス発泡剤にて低値を示した。通し回遊魚をもちいて麻酔実験をしたところ、タブレット型固形炭酸ガス発泡剤は淡水産卵回遊魚では淡水、海水産卵回遊魚では海水で麻酔に罹りやすいことが示された。以上の結果、タブレット型炭酸ガス発泡剤はオイゲノールよりストレスを低減させる可能性が推察され、通し回遊魚は産卵域の水で炭酸ガス麻酔に懸りやすいことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated the fish anesthetic to reduce pain, to establish the efficient aquaculture. As the anesthetic effect of published complete genome sequences species, Tilapia and Fugu, using the solid carbon dioxide blowing tablet and the over the counter eugenol, the level of stress marker, glucose etc, are low in the high density of solid carbon dioxide blowing tablet. The high density of solution of carbon dioxide in water using solid carbon dioxide blowing tablet is dependent on its volume, the water temperature and salinity. The anesthetic effect of anadromous fish using solid carbon dioxide blowing tablet are earlier working in fresh water, in contrast these of catadromous fish are earlier working in sea water. These findings suggest that the solid carbon dioxide blowing tablet might be one of suitable anesthetic for fish to reduce stress, and the anesthetic effect of diadromous fish is dependent upon the water conditions of spawning area.

研究分野：水圏生産科学

キーワード：魚類麻酔 炭酸ガス オイゲノール ストレス 苦痛

1. 研究開始当初の背景

魚類の生産および実験現場にて、麻酔は、投ワクチン・投薬・標識装着・測定・手術・安楽死などで必要不可欠である。麻酔の作用機序は、ヒトにおいても未だ不明な点が多いが、一般的に、中枢神経あるいは末梢神経を抑制させることによるとされている。ほ乳類では麻酔に関する知見は豊富であるが、変温動物である魚類は代謝や呼吸中枢の酸素圧低下に対する耐性などがそれと異なるため、ほ乳類の麻酔が使えないことも多い。

魚類では、投ワクチン・投薬・標識装着・測定・手術など回復が不可欠な場合は生理作用の面から化学的麻酔が、安楽死には薬理作用の面から物理的麻酔が一般的にもちいられている。現在、我が国において、承認されている水産用麻酔はオイゲノールしかない。しかしながら、魚類においてオイゲノールひいて他の麻酔が、ストレスを与えていないかを調べた例はほとんどない。

申請者は、回復が可能な化学的麻酔に焦点をあて、研究をおこなっている。これまで、申請者らは入浴剤に類似したタブレット型炭酸ガス発泡剤を開発し、それが、ゲノム情報が公開されている魚種(淡水魚ではティラピア・イトヨ・ゼブラフィッシュ・プラティメダカ、海産魚ではトラフグ)などに麻酔効果を示し、麻酔に罹る時間などの薬理作用、各種水温の適合性・覚醒するまでの時間などの生理作用において水産承認麻酔であるオイゲノールより優れていること、麻酔死がないことを見いだした(渡邊・松原、特許第6202570号)。これらのことより、炭酸ガスの利便性が向上し、タブレット型炭酸ガス発泡剤はオイゲノールに変わる麻酔となることが期待される。しかしながら、炭酸ガスを含め既存の魚類麻酔はその作用発現メカニズムについては不明な点が多く、生体内の様々な組織・器官に影響を与えている可能性がある。この疑問を解決することにより、安心・安全・安価な次世代の麻酔が提唱できるとともに、動物福祉を考慮した麻酔として、水圏生物生産の効率を向上させることができると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、申請者らが開発したタブレット型炭酸ガス発泡剤と既存の市販麻酔をもちい、さまざまな魚種に麻酔作用を示すか、そして淡水魚(ティラピア)と海水魚(トラフグ)にそれらがどの程度苦痛を与えるのかをストレス因子を指標として調べ、現時点での魚類の苦痛を軽減させる麻酔を見いだすことをめざし、水圏生物の生産効率の増大に寄与することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、さまざまな魚種をもちいて、タブレット型炭酸ガス発泡剤とオイゲノールが麻酔効果を示すか否かを調べた。また、ス

トレス因子を指標として、ティラピアとトラフグにタブレット型炭酸ガス発泡剤と既存の市販麻酔であるオイゲノールがどの程度苦痛を与えているのかを比較した。

4. 研究成果

本研究では、まず、動物福祉をふまえ、魚類に最適な麻酔を探索すべく、Ensembl Genome Browserにてゲノム情報が公開されている魚類に、タブレット型炭酸ガス発泡剤と既存の市販麻酔であるオイゲノールが、麻酔作用を示すか調べた。これまでシーラカンス・アマゾンモーリー・大西洋タラ・ブラインドケープフィッシュ・スポッテッドガー以外のゲノム情報が公開されている魚類は両麻酔が作用することを確認している。そこで、本邦においても生体の入手可能であるブラインドケープフィッシュおよびスポッテッドガーの麻酔実験を試みた。前者は研究期間中、入手できなかったが、空気呼吸をおこない現生の硬骨魚類で原始的な一群とされるガー目のスポッテッドガーをもちいて実験をおこなったところ、スポッテッドガーは両麻酔で作用を示した。とくに、タブレット型炭酸ガス発泡剤では、その濃度と温度依存的に麻酔に懸る時間が短縮された。これまでの研究と本研究により、タブレット型炭酸ガス発泡剤とオイゲノールは、ゲノム情報が公開され、我が国で入手できる原始的硬骨魚類から派生的硬骨魚類まで広く麻酔作用を示すことがあきらかとなった。

つぎに、淡水と海水を行き来する通し回遊魚類に着目し、タブレット型炭酸ガス発泡剤とオイゲノールの麻酔作用に差異が認められるか調べた。実験には、淡水で産卵する遡河回遊魚であるシロザケ・ギンザケおよび海水で産卵する両側回遊魚であるヌマガレイ・メナダをもちいた。これらの魚類は、両麻酔ともに作用したが、興味深いことに、タブレット型炭酸ガス発泡剤では淡水で産卵する遡河回遊魚では海水より淡水、海水で産卵する両側回遊魚では淡水より海水のほうが麻酔に罹る時間が短かった。これまで、淡水で産卵する遡河回遊魚であるニジマス・ウグイでも同様の効果が観察されており、魚類の炭酸ガスによる麻酔は産卵する場所の水質により罹りやすいことが推察された。また、タブレット型炭酸ガス発泡剤が水温および塩分を変化させた水に炭酸ガスをどの程度溶け込ませるかを調べた。その結果、水中に溶け込む炭酸濃度は、添加するタブレット型炭酸ガス発泡剤量、水温および塩分依存的に高くなることがわかった。以上のことから、通し回遊魚は産卵する場所の水質では、各種チャネルを活性化させ、炭酸ガスの取り込みを積極的に起こしている可能性が推察され、その結果、炭酸ガスの麻酔作用を早く受けると考えられた。

淡水魚(ティラピア)および海水魚(トラフグ)のストレスに関わる因子として、副腎

皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、4種のヒートショックプロテイン(HSP)に着目し、ゲノム情報をもとにリアルタイム定量PCRによる遺伝子発現解析系を構築した。

つづいて、タブレット型炭酸ガス発泡剤とオイゲノールによる麻酔が同一条件で飼育したテラピアおよびトラフグのストレス因子にどの程度作用するか調べた。その結果、高濃度タブレット型炭酸ガス発泡剤区の血中グルコースおよびラクトース量は、テラピアおよびトラフグともに、低濃度区およびオイゲノール区のそれに比べ、低値であった。また、高濃度タブレット型炭酸ガス発泡剤区の脳におけるCRH、ACTHそして4種のHSP mRNA量もテラピアおよびトラフグともに、低濃度区およびオイゲノール区のそれに比べ、低い傾向を示した。

以上の結果、タブレット型炭酸ガス発泡剤はどの魚種にも麻酔死が認められず、高濃度では麻酔に罹るまでの時間が短く、ストレス因子も低い値を示したことから、オイゲノールよりストレスを軽減している可能性が示唆された。しかし、実験にもちいた個体の体サイズ、雌雄でストレス因子量にばらつきがあったため、今後、遺伝的全雌あるいは全雄群、ひいてクローン個体群をもちいるなど、個体の条件を統一して実験する必要性がある。

本研究により、硬骨魚類全般においてタブレット型炭酸ガス発泡剤の作用が示され、動物福祉をふまえた苦痛を軽減する魚類麻酔としての有用性が示唆された。

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7件)

1. 渡邊研一・松原創: 魚類の麻酔. 月刊養殖ビジネス臨時増刊号:107-111, 2018. (査読無)
2. Muller, T*., Matsubara, H*., Kubara, Y., Horvath, A., Kolics, B., Taller, J., Steger, V., Kovacs, B., Horvath, L., Asturiano, J. F., Penaranda, D.S. and Urbanyi, B.: Testing cryopreserved European eel sperm for hybridization (*Anguilla japonica* × *A. anguilla*). *Theriogenology*: in press, 2018. * Equally contribute (査読有)
3. Yanagimachi, R., Harumi, T., Matsubara, H., Yan, W., Yuan, S., Yamaha, E., Arai, K., Hirohashi, N., Iida, T., Matsubara, T., Andoh, T., Vines, C. and Cherr, G.: Chemical and physical guidance of fish spermatozoa into egg through the Micropyle. *Biology of reproduction*: iox015 doi: 10.1093/biolre/iox015, 2017. (査読

有)

4. Muller, T*., Matsubara, H*., Kubara, Y., Horvath, A., Asturiano, J. F. and Urbanyi, B.: Japanese eel (*Anguilla japonica* Temminck & Schlegel, 1846) propagation using cryopreserved sperm samples. *Journal of Applied Ichthyology* DOI: 10.1111/jai.13316, 2017. * Equally contribute (査読有)
5. Wylie, M., Ou, Z., Matsubara, H. and Lokman, M.: Blue cod on the menu?. *NZ Aquaculture 2016 Mar/Apr*: 6-7, 2016. (査読無)
6. 松原創・永見新・高橋潤・高田彩・渡邊研一: 安全安心安価簡便な魚類麻酔薬の開発. 月刊養殖ビジネス 2016年4月号:36-38, 2016. (査読無)
7. Ogino, Y., Kuraku, S., Ishibashi, H., Miyakawa, H., Sumiya, E., Miyagawa, S., Matsubara, H., Yamada, G., Baker, M. E. and Iguchi, T.: The synthesis and role of taurine in the Japanese eel testis. *Molecular biology and evolution* 33:228 - 244, 2016. (査読有)

[学会発表](計22件)

1. 林田貴雄・川原玲香・松原創・林誠・矢澤良輔・Xu Dongdong・竹内裕:ニベ科不稔雑種生殖腺のトランスクリプトーム解析による生殖細胞欠損機構の探索. 平成30年度日本水産学会春季大会, 東京都, 3月27日, 講演要旨集, 130 (2018).
2. 佐々木瑞希・中尾稔・松原創:北海道の食用海産魚におけるコリノソーマ属鉤頭虫シスタカンス寄生状況. 第87回日本寄生虫学会大会, 東京都, 3月18日 (2018).
3. 春見達郎・松原創・市村政樹・林要喜知・柳町隆造:深海魚キチジの受精. 日本動物学会第88回大会, 富山, 9月23日 (2017).
4. 松原創・春見達郎・永見新・西澤和也・黒沼優・小林寛・鈴木文弥・永沢旬平・高橋潤・園田武・近藤昌和・横田高士・中野美和・市村政樹・柳町隆造:魚類精子の卵門侵入について. 2017年度日本魚類学会年会, 北海道, 9月17日, 講演要旨集, 44 (2017).
5. 永見新・松原創・西澤和也・黒沼優・荒井大輔・大倉駿介・尾形太一・加部太一郎・桑原匡基・高橋優太・山仲舞・園田武・近藤昌和・渡邊研一:固形炭酸ガス発泡剤の魚類に対する麻酔作用. 2017年度日本魚類学会年会, 北海道, 9月17日, 講演要旨集, 44 (2017).
6. Matsubara, H., Harumi, T., Nagami, A., Kondo, M., Takahashi, M., Nishizawa, K., Kuronuma, Y., Ishii, K., Tamura, S., Tochimoto, J., Yamazaki, K., Watanabe,

- M., Takamichi, A., Ichimura, M. and Yanagimachi, R: Sperm entry into the micropyle of fish eggs. The 32th International Symposium on Okhotsk sea and ice, Hokkaido, Japan, 21th Feb. Proceeding book, 142-144 (2017).
7. 春見達郎・松原創・市村政樹・林要喜知・柳町隆造: オホーツク海域の海産魚の精子の卵門進入の比較. 日本動物学会第 87 回大会, 沖縄, 11 月 17 日(2016).
 8. Lokman, P.M., Matsubara, H., Divers, S.L., Damsteegt, E.L., Di Biase, A., Setiawan, A.N., Wylie, M.J., Thomson Laing, G., Mordenti, O., Todo, T., Ijiri, S., Adachi, S.: Tinkering with induced spawning protocols - can sustained-release androgen implants enhance the outcomes of fertility treatment in female eels? Symposium of Towards reproduction of eel in captivity to support sustainable aquaculture (part of the EELRIC workshop), Wageningen, Netherlands, 20th Oct. Abstract book, 9-10 (2016).
 9. 稲葉倫子・石山尚樹・松原創・藤本貴史・荒井克俊: 北海道網走地方及び石川県能登島地方におけるクロードジョウの出現とその野生集団との遺伝的關係. 平成 28 年度日本水産学会北海道支部大会, 北海道, 10 月 23 日(2016).
 10. 松原創・高田彩・永見新・高橋潤・近藤昌和・町田善康・西澤和也・園田武・渡邊研一: カワヤツメ種苗生産の試み. 2016 年度日本魚類学会年会, 岐阜, 9 月 25 日, 講演要旨集, 61 (2016).
 11. 萩原聖士・須山喜市・東典子・堤尚信・市村政樹・三坂尚行・古市明文・市川卓・松原創・川崎琢真・宗原弘幸・山羽悦郎・井尻成保・足立伸次: 北海道沿岸における 2015 年のチョウザメ科魚類の異常漁獲および生殖腺の特徴. 平成 28 年度日本水産学会春季大会, 東京都, 3 月 27 日, 講演要旨集, 16 (2016).
 12. Matsubara, H., Takada, A., Takahashi, M., Kondoh, M., Nagami, A., Naka, Y., Yanagida, R., Asai, K., Tsunoda, K., Shiga, Y. and Watanabe, K.: Effect of carbon dioxide gas as fish anesthetic. The 31th International Symposium on Okhotsk sea and ice, Hokkaido, Japan, 23th Feb. Proceeding book, 213-214 (2016).
 13. Matsubara, H. and Takada, A.: Clarification of Japanese lamprey parasitic mechanisms. The 31th International Symposium on Okhotsk sea and ice, Hokkaido, Japan, 23th Feb. Proceeding book, 215-216 (2016). Aota Masaaki Award.
 14. 高田彩・松原創・高橋潤・園田武・永見新・中裕次郎・角田健太・浅井健太・志賀喜典・柳田稜平・渡邊研一: カワヤツメの寄生条件は限定される. 平成 27 年度日本水産学会北海道支部大会, 北海道, 12 月 19 日(2015). 最優秀学生講演賞.
 15. 松原創・渡邊研一: タラバガニ属の増養殖. 平成 27 年度日本水産学会北海道支部大会, 北海道, 12 月 18 日(2015).
 16. 松原創: 北海道東部における海洋資源の付加価値向上をめざして. 平成 27 年度日本水産学会北海道支部大会, 北海道, 12 月 18 日(2015).
 17. 松原創・高田彩・高橋潤・柳田稜平・永見新・中裕次郎・角田健太・志賀喜典・浅井健太・渡邊研一: 固形炭酸ガス発泡剤の麻酔効果. 日本水産増殖学会第 14 回大会, 千葉, 11 月 14 日, 講演要旨集, 495 (2015).
 18. 松原創・高田彩・高橋潤・浅井健太・志賀喜典・角田健太・中裕次郎・永見新・柳田稜平・渡邊研一: オーガニック技術によるオホーツク産水産物の付加価値向上. 日本水産増殖学会第 14 回大会, 千葉, 11 月 14 日, 講演要旨集, 496 (2015).
 19. Matsubara, H.: Aquaculture in Japan. Can anesthesia by carbon dioxide be useful to aquaculture?. New Zealand Aquaculture research symposium 2015. Dunedin, New Zealand, 10th Nov. (2015). 招待講演
 20. 松原創・高田彩・高橋潤・岡本新太郎・渡邊研一: タラバガニ卵の同調孵化誘発技術の開発. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 宮城, 9 月 23 日, 講演要旨集, 31 (2015).
 21. 松原創・高田彩・高橋潤: オーガニック技術を用いた未利用貝の生鮮利用. 平成 27 年度日本水産学会秋季大会, 宮城, 9 月 23 日, 講演要旨集, 33 (2015).
 22. 春見達郎・松原創・林要喜知・柳町隆造: 淡水魚と海水魚の精子の卵門進入の比較. 日本動物学会第 86 回大会, 新潟, 9 月 19 日(2015).
- 〔図書〕(計 3 件)
1. 松原創: オホーツク海域における海洋資源の付加価値向上をめざして. アクアバイオ学概論(松原創・塩本明弘編) 生物研究社: 140-155, 2016.
 2. 松原創: 第 5 章生物生産 / 5.5 種類別主要魚介類生産法 / 5.5.2 海水魚類 / キチジ. 水産海洋ハンドブック第 3 版 生物研究社: 344-345, 2016.
 3. 松原創・渡邊研一: 第 5 章生物生産 / 5.5 種類別主要魚介類生産法 / 5.5.2 海水魚類 / ニシン. 水産海洋ハンドブック第 3 版 生物研究社: 344, 2016.
- 〔産業財産権〕
取得状況(計 1 件)

名称：魚類用麻醉剤及びその製造方法並びに
該魚類用麻醉剤の使用期限を判別する方法
発明者：渡邊研一・松原創
権利者：学校法人東京農業大学
種類：特許
番号：第 6202570 号
取得年月日：2017 年 9 月 8 日
国内外の別：国内

〔その他〕

1. 松原創：魚は炭酸で眠る？魚の麻醉を作
ってみよう！！日本学術振興機構ひ
らめきときめきサイエンス．2016 年 8
月 7 日,8 月 8 日．

6．研究組織

(1)研究代表者

松原 創 (MATSUBARA HAJIME)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号：50459715

(2)研究分担者

渡邊 研一 (WATANABE KENICHI)
東京農業大学・生物産業学部・教授
研究者番号：20426315