

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05814

研究課題名(和文) 魚類の健全性に及ぼす酸化的環境ストレスの作用機序解明と科学的根拠に基づくその制御

研究課題名(英文) Mechanism of action of oxidative environmental stress on fish health and its control based on scientific evidence

研究代表者

中野 俊樹 (Nakano, Toshiki)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：10217797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：魚類は環境ストレスを受け成長などが影響される。本研究では絶食または抗生物質オキシテトラサイクリン(OTC)投与をギンザケに施し、生化学的パラメーターに及ぼす影響を調べた。絶食とOTC投与により肝臓のHSP70の発現量は増加した。組織グルタチオンレベルは絶食で変化なく、一方OTC投与により肝臓で増加した。血漿成分は、絶食とOTC投与によりグルコースは増加し、脂質成分も若干変化した。以上より環境ストレスは体内で酸化ストレスを誘発するが、絶食が個体に及ぼす影響はあまり大きくないと推察される。また、ストレスの緩和や防止のためには、抗酸化物質の投与が有効であることも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、天然水産資源の減少により、世界的に養殖魚に対する需要が高まっている。既に水産物由来のタンパク質源の約半分は養殖生産に依存しており、間もなく天然物との比率は逆転すると言われている。従って、養殖魚のストレスを軽減し健康を維持することは、生産性の向上と生産量の維持を可能とし、世界的な食料供給に大きく貢献すると考えられる。本研究で得られたストレスに関する研究結果は、魚類のストレス反応に関する基礎的な学術知見の提供だけでなく、前述の問題を解決するためにも重要と思われる。すなわち、今後の人類の食料供給と福祉に貢献しうる成果ととらえられ、今後のさらなる展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fish are often subjected to environmental stress. This stress can affect their growth. In this study, coho salmon were fasted or given the antibiotic oxytetracycline (OTC) to investigate the effects on biochemical parameters.

The expression level of HSP 70 in the liver was increased by fasting and OTC administration. Tissue glutathione levels were unchanged by fasting, whereas OTC treatment increased them in the liver. As for plasma components, fasting and OTC administration increased glucose level and slightly changed lipid components.

These findings suggest that fasting and OTC administration induces stress, however the effect of fasting on the individual is not so large. It was also suggested that antioxidative substances would be useful to reduce the stress in fish body due to environmental stress such as chemical stress.

研究分野：水産化学

キーワード：環境ストレス 酸化ストレス 魚類 バイオマーカー 水産化学 養殖魚

1. 研究開始当初の背景

近年、天然資源の減少に伴い養殖に対する需要が向上しており、両者の生産量は拮抗している。そして、FAO によるといずれは水産物由来のタンパク質源は養殖が中心となると予想され、養殖法に関する研究はさらに重要になるとされる。

地球温暖化、化学物質、感染などグローバルとローカルな要因に由来するストレスが関わる環境ストレスは、天然、養殖に限らず魚類の生産性や健康などに影響を及ぼす。そして、魚類における主なストレスは前述の環境ストレスと生命活動で生じる内因性のストレスであろう。

本課題の研究代表者(以下、代表者と称す)は、養魚育成のためにストレスや健康の維持増進のための養魚用サプリメント、さらに遺伝子組み換え魚に関する研究を推進してきた。その業績は、国際会議における招待講演や学会賞の受賞という形で高く評価され現在に至っている。

種々のストレスに対する魚類の生体反応を明らかにすることは、ストレスが及ぼす影響の軽減や防止に繋がると考えられる。しかし哺乳類と比べて魚類では、ストレスに対する反応や防御そして予防に関する総合的な知見は十分とは言えないのが現状であった。

2. 研究の目的

代表者らは、主に熱ストレスやハンドリングに対する魚類のストレス反応について解析してきた。しかし、養殖環境や自然界で魚類が受けるストレスは様々であるが、それに対する反応を総合的に検討した例は少ない。

本研究では、魚類において感染症や化学物質による環境ストレスや生理状態による内因性のストレスに対する反応を調べ総合的に解析することで、今後の魚類の生産性の向上に資することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ストレスの負荷

感染ストレス

Edwardsiella tarda による細菌感染症(エドワジエラ症)は国内の養殖、特にヒラメ(*Paralichthys olivaceus*) 養殖に大きな被害を与える著名な魚病の一つである。ヒラメは商品価値が高い養殖対象種で、発症すれば被害は甚大である。この病原菌に注目し、*E. tarda* を PBS に懸濁し、これをヒラメに接種した。その後、48 時間まで経時的に組織と血液を採

取した。

化学的ストレス

オキシテトラサイクリン (OTC) は代表的抗生物質であるが、それより誘導される化学的ストレスが魚類に及ぼす影響は不明であった。OTC による明確な影響を観察するため、医薬品として魚類に投与する推奨量の2倍相当、すなわち 10 mg OTC/ 100 g 体重 / 日となるように4日間と8日間ギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) に経口投与し、組織と血液を採取した。

生理学的ストレス

魚類は哺乳類に比べ絶食に強いことが知られているが、その耐性メカニズムについては不明な点が多かった。ギンザケを馴致後、対照区と絶食区に分け2週間飼育した。その後、組織と血液を採取した。

(2) 測定項目

代表的ストレスタンパク質であるヒートショックプロテイン (HSP) 70、活性酸素消去酵素系の第一ステップに働く重要な酵素スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) などについてそれぞれの抗体を用いてウエスタンブロッティング - 化学発光法により測定した。その他、細胞の主要な抗酸化物質グルタチオン (GSH) 濃度を酵素リサイクリング法により、またグルコースなどの血漿成分を酵素法によりそれぞれ測定した。

4. 研究成果

(1) 感染ストレスの影響について

細菌感染の所見について：供試したヒラメ肝臓において *E. tarda* 感染に典型的な症状が認められた。その生菌数を計測したところ、感染後に生菌数は徐々に増加した。肝臓の HSP70 および SOD の発現レベルについて：図1に示すように HSP70 の発現レベルは感染後初期では変化がなかったが、24 時間後に増大し、48 時間後には対照区に比べ有意に増加した。また、Cu, Zn-SOD の発現動態も HSP70 に類似していた。しかしながら、Mn-SOD の発現は感染後徐々に増加していき、48 時間後には最大となった。

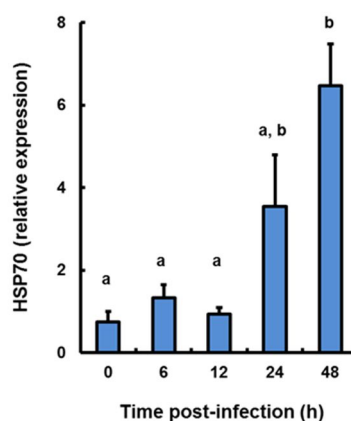


図1 ヒラメ肝臓の HSP70 発現におけるエドワジエラ感染の影響

(2) 化学的ストレスの影響について

HSP70 の発現について：OTC の投与により肝臓における HSP70 の発現量は増加し、8 日後には有意に増大した。一方、筋肉では 4 日後に一度減少し、その後対照区レベルに戻った。この肝臓における HSP70 発現量の増加は熱ストレス時の挙動と似ており、すなわち、OTC とヒートショックによるいずれのストレスでも肝臓における HSP70 の発現が影響を受けることが分かった。GSH レベルについて：細胞内の代表的抗酸化物質 GSH は、OTC 投与により血漿と肝臓において増加する傾向にあった。グルコースレベルについて：OTC 投与により血漿のグルコースレベルは増加した。

(3) 生理学的ストレスの影響について

HSP70 の発現について：絶食により肝臓における HSP70 の発現量は有意に増加した。GSH レベルについて：複数の組織、すなわち肝臓、筋肉、腸および血漿のいずれについても変化は認められなかった。血漿成分について：グルコースは絶食することで有意に増加した。一方、トリグリセリドは絶食区で有意に減少した。

(4) 総合考察

養殖現場で被害を及ぼすエドワジエラ症は、ヒラメ体内で活性酸素の産生を亢進することが示唆された。さらに、OTC の短期間の投与も生化学的バイオマーカーのレベルに影響し、特に組織のレドックス状態を変化させることが分かった。すなわち、エドワジエラ症と OTC は、体内で酸化ストレスを誘発すると推察される。従って、これらのストレスには、抗酸化物質の投与が有効と推察される。一方で、2 週間の絶食はストレスを誘発するが、個体に及ぼす影響は小さいと推察され、ギンザケは絶食に対する耐性が強いことが窺われる。今後はよりシビアなストレス処理を施しストレスの負荷を明確化し、それがバイオマーカーの動態に与える影響を調べ魚類におけるストレス反応の解明がさらに進めば、ストレスの軽減や予防、そしてストレスに対する有効なサプリメントの開発に繋がるものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano, T., Osatomi, K., Miura, N., Aikawa-Fukuda, Y., Kanai, K., Yoshida, A., Shirakawa, H., Yamauchi, A., Yamaguchi, T., and Ochiai, Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of bacterial infection on the expression of stress proteins and antioxidative enzymes in Japanese flounder.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evolution of Marine Coastal Ecosystems under the Pressure of Global Changes	6. 最初と最後の頁 111-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nakano, T.	4. 巻 -
2. 論文標題 Stress in fish and application of carotenoid for aquafeed as an anti-stress supplement	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Marine Biotechnology	6. 最初と最後の頁 2999-3019
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Nakano, T. and Wiegertjes, G.	4. 巻 18
2. 論文標題 Properties of carotenoids in fish fitness: A review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Marine Drugs	6. 最初と最後の頁 0568-1-0568-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/md18110568	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 該当する
1. 著者名 T. Nakano, H. Shirakawa, G. Yeo, R.H. Devlin, T. Soga	4. 巻 -
2. 論文標題 Quantitative metabolome profiling of growth hormone transgenic coho salmon by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Sea Under Human and Natural Impacts	6. 最初と最後の頁 223-234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-00138-4_18	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 該当する

1. 著者名 Wu, H., Fujii, Y., Nakano, T., Arimoto, T., Murata, M., Matsumoto, H., Yoshiura, Y., Ohnuki, H., Endo, H	4. 巻 19
2. 論文標題 Development of a novel enhanced biosensor system for real-time monitoring of fish stress using a self-assembled monolayer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 1518-1 ~ 1518-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 T. Nakano, K. Osatomi, N. Miura, Y. Aikawa-Fukuda, K. Kanai, A. Yoshida, H. Shirakawa, A. Yamauchi, T. Yamaguchi, Y. Ochiai	4. 巻 -
2. 論文標題 Effect of bacterial infection on the expression of stress proteins and antioxidative enzymes in Japanese flounder	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Evolution of Marine Coastal Ecosystems under the Pressure of Global Changes	6. 最初と最後の頁 111-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 T. Nakano*, H. Shirakawa, G. Yeo, R.H. Devlin, and T. Soga	4. 巻 -
2. 論文標題 Quantitative metabolome profiling of growth hormone transgenic coho salmon by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oceanography Challenges to Future Earth	6. 最初と最後の頁 223-234
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 中野俊樹	4. 巻 55
2. 論文標題 カロテノイドの種類と生物活性	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 養殖ビジネス	6. 最初と最後の頁 36-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野俊樹・山内晶子・山口利康・落合芳博
2. 発表標題 ギンザケにおける多環芳香族炭化水素によるストレスの影響
3. 学会等名 2019 年度日仏海洋学会学術研究発表会（日仏会館、東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野俊樹・白川 仁・山口敏康・落合芳博
2. 発表標題 ギンザケの抗酸化的バイオマーカーに及ぼすオキシテトラサイクリンの影響
3. 学会等名 令和元年度日本水産学会秋季大会（福井県立大学永平寺キャンパス）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野俊樹・白川 仁・山口敏康・落合芳博
2. 発表標題 ギンザケの生化学的バイオマーカーに及ぼす化学物質の影響
3. 学会等名 令和2年度日本水産学会春季大会（東京海洋大学品川キャンパス）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野俊樹、岡本円香、佐々木春佳、齋藤茉希、山内晶子、山口敏康、落合芳博
2. 発表標題 多環芳香族炭化水素がギンザケのレドックス状態に及ぼす影響について
3. 学会等名 平成30年度日本水産学会秋季大会（広島大学東広島キャンパス）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野俊樹、齋藤茉希、山口敏康、落合芳博
2. 発表標題 オキシテトラサイクリンがギンザケの生化学的性状に及ぼす影響について
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会（東京海洋大学品川キャンパス）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中野俊樹	4. 発行年 2019年
2. 出版社 アグネ技術センター	5. 総ページ数 332
3. 書名 放射光利用の手引き	

〔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
研究 分担 者	白川 仁 (SHIRAKAWA HITOSHI) (40206280)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	

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			
オランダ	ワージェニンゲン大学			
カナダ	Fisheries and Oceans Canada			