ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の発育初期における 環境ストレスに対する耐性の変化

嶋田 幸典,¹ 鹿野 隆人,² 青海 忠久^{1*}

(2005 年 4 月 8 日受付, 2005 年 9 月 15 日受理)

¹福井県立大学生物資源学研究所, ²ウィンザー大学グレートレイクス研究所

Ontogenetic changes in tolerance for environmental stress in Japanese
flounder *Paralichthys olivaceus* during early development

YUKINORI SHIMADA,¹ TAKAHITO SHIKANO,² AND TADAHISA SEIKAI^{1*}

¹Graduate School of Biosciences and Biotechnology, Fukui Prefectural University, Obama, Fukui 917-0003, Japan, ²Great Lakes Institute for Environmental Research, University of Windsor, 401 Sunset Avenue, Windsor, Ontario, N9B 3P4, Canada

Ontogenetic changes in physiological tolerance during larval development of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were examined relative to a variety of environmental stresses as follows: freshwater, high salinity (salinity range: 30–55), high water temperature (temperature range: 20–36°C) and formalin (concentration range: 0–0.6 %). Highest stress tolerance was shown by newly hatched larvae (1 day after hatching), and then decreased drastically until 10 days after hatching. We considered that the high sensitivity to external environmental stresses at 10 days after hatching was caused by the development of the mouth and opercula. Patterns of tolerance change during the early life stages differed depending on the environmental stresses.

キーワード：耐性, 発育過程, 半数致死条件

一般に, 生物は成長発育に伴って外部環境要因に対する適応能力が変化する。このことは, 魚類においても同様であり, 成長発育に伴って塩分や水温などの環境や水中に溶存する農薬などの毒性物質に対する耐性が変化する。

魚類の外部環境に対する耐性は, 発育過程において変化する生理的要因と, 水温や餌条件などの個体が経験した環境要因との両方の要因により決定される。¹⁾ 成長発育に伴って環境要因に対する耐性能力が変化する現象については, イシダイ *Oplegnathus fasciatus*,²⁾ グッピー *Poecilia reticulata*,³⁾ サケ *Oncorhynchus keta*⁴⁾ およびマダイ *Pagrus major*⁵⁾ などにおいて報告されており, ヒラメにおいても淡水耐性の変化が報告されている。⁶⁾

ヒラメは日本各地に広範囲に生息し, 漁業資源として重要であり, 近年栽培漁業対象種として日本各地で多くの人工種苗放流が行われている。ヒラメは, 発育初期の浮遊仔魚期にはやや沖合に分布するが, 稚魚期になると

沿岸の砂浜域に着底して成長し, 生息域や生活様式の変化に伴って形態も顕著に変化する。このように生活様式を激変させる種では, 環境負荷に対する耐性も大きく変化していることが推察されるので, 発育に伴う生理的な特性の変化を正しく評価するための方法を確立することが必要であると考えた。

本研究では発育初期における淡水, 高塩分, 高温およびホルマリンに対する耐性能力を半数致死時間, 半数致死濃度および半数致死温度によって評価し, 生存能力と深く関係する環境ストレスに対する耐性の変化について検討した。

材料および方法

供試魚 ヒラメ受精卵は, 独立行政法人水産総合研究センター宮津栽培漁業センター(京都府宮津市)で2002年4月11日に自然産卵されたものを福井県立大学海洋生物資源臨海研究センター(福井県小浜市)に輸

* Tel : 81-770-52-6300. Fax : 81-770-52-6003. Email : seikai@fpu.ac.jp

送した。下記に示す耐性試験のために、受精卵から孵化後 30 日齢までヒラメを飼育し、成長にしたがっていくつかの発育段階の仔魚を実験に供した。受精卵は、濾過海水を満たした 200 L パンライト水槽におよそ 2 万粒収容し、孵化後 10 日齢時で 2000 尾に調節した。飼育条件は水温を投げ込み式のヒーターとサーモスタットにより 17.1 ± 0.2 (平均値 $\pm$ SE, 以下同様) $^{\circ}\text{C}$ に保ち、その時の塩分は実用塩分単位 (PSU) で 31.7 ± 0.1 および pH は 8.2 ± 0.1 であった。餌料は、栄養強化剤 (ドコサユグレナ, 秋田十條化成) で二次培養した S 型ワムシ *Brachionus rotundiformis* およびアルテミア *Artemia* sp. (Brine shrimp eggs 90, 北村) を用いた。1 日に 1 度残餌を測定した後に、S 型ワムシは孵化後 2 日齢から 20 日齢まで 10 個体/ml, アルテミアは孵化後 12 日齢の 8 個体/個体 (ヒラメ仔魚) から孵化後 30 日齢まで飼育日数の経過にしたがって前日の 1.2 倍量を給餌した (Fig. 1)。なお日齢は、孵化日を 0 日齢として表した。

孵化後 1 から 10, 15 および 20 日齢時に 50 個体を無作為に抽出して供試魚の全長を測定した。全ての供試魚をビデオカメラ (COLOR CAMERA CS900, オリパス) よりビデオキャプチャーボード (FDM-PCI2, フォトロン) を介してパーソナルコンピュータ (Prosignia, コンパック) に画像を取り込み、その後、画像解析ソフト (Win ROOF, 三谷コンピュータ) により全長を測定するとともに、南⁷⁾に卵黄仔魚 (PL 期) を加えて発育段階を決定した。さらに、半数致死条件の変動要因を検討するために、日齢の異なる個体に対し、トリパンブルーを用いて簡易染色を行い、口

および鰓蓋形成の有無を観察した。さらに半数致死条件が大きく変動した発育段階については、ほぼ同様の飼育条件で別途飼育したヒラメ仔魚を、常法にしたがって HE 染色を施した組織切片を作成し、鰓組織の発達状態を確認した。

耐性試験 ヒラメ仔魚の淡水、高塩分、高温およびホルマリンに対する耐性試験を行った。淡水、高塩分およびホルマリン耐性試験には 6 穴マイクロプレート、高温耐性試験には 20 mL のスクリー管瓶を使用し、試験水はそれぞれ 10 mL とした。各耐性試験はそれぞれの試験区あたり 3 区を設け、各区の供試魚数は、淡水耐性で 9~25 個体、高塩分耐性で 8~30 個体、高温耐性で 12~38 個体、およびホルマリン耐性で 6~25 個体とした。淡水耐性は、孵化後 1, 5, 10 および 25 日齢に行い、試験開始後 1, 6, 24 および 48 時間後に生死判定を行った。高塩分およびホルマリン耐性は、孵化後 1, 3, 5, 10 および 20 日齢に行った。高塩分耐性は、塩分 30, 40, 45, 50 および 55 の 5 段階の濃度に調節し、ホルマリン (37% ホルムアルデヒド溶液) 耐性は、ホルマリン原液の 0%, 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5% および 0.6% の 6 段階の濃度に調節し、生死判定は 24 時間後に行った。淡水、高塩分およびホルマリン耐性試験は、全ての日齢でインキュベータ (低温恒温槽, 日立製作所) を用いて水温を 16°C に調節した。高温耐性は、上記のインキュベータにより試験開始時の水温を全て 16°C に調節し、ウォーターバス (BW100, ヤマト科学) を用いて 30 分に 1°C の割合で上昇させ、その都度、生死判定を行った。全ての耐性試験における仔稚魚の生死は、万能投影機 (V-16E, ニコン) を用いて、心臓の拍動の有無で判断した。淡水耐性は、40 mL の供試魚を含んだ飼育水に蒸留水を 500 mL 入れ合計 540 mL とし、さらに、この供試魚を含んだ試験水の一部 20 mL に同様の操作を繰り返し、塩分が 0.1 以下になるように希釈した。高塩分耐性の試験水の塩分は、塩分 80 の人工海水と供試魚を含んだ飼育水との混合比により各濃度を調整した。淡水および高塩分耐性では各濃度に調節した後、供試魚を含んだ試験水をマイクロプレートに移した。ホルマリン耐性試験では、先に供試魚を含む 10 mL の飼育水をマイクロプレートに収容し、ホルマリンを添加して規定の濃度に調節した。

半数致死条件の推定 各日齢におけるそれぞれの耐性試験の半数致死条件は、淡水耐性で半数致死時間 ($L_{\text{time}50}$), 高塩分およびホルマリン耐性で半数致死濃度 (LC_{50}) および高水温耐性で半数致死温度 ($L_{\text{temp}50}$) を用いた。各耐性試験の半数致死条件は、それぞれの生残率において 50% をはさむ 2 点の直線から算出した。なお、生残率で 50% を示した実験区については、その値を半数致死条件とした。

Fig. 1 Total length, developmental stages (PL, A-E) and feeding schedule (top) of larval Japanese flounder in 20 days after hatching. Developmental stages A-E were determined by Minami (1982). PL means yolk sac larva stage. Mean and standard deviation of total length at each age are shown.

統計処理 各日齢におけるそれぞれの耐性試験の半数致死条件の比較は、Kolmogorov-Smirnov 検定および F-max 検定により分布の正規性および等分散性を確認した後、等分散性が得られていた場合は一元配置の分散分析 (ANOVA)、等分散性が得られなかった場合は Kruskal-Wallis 検定を行った。その後、日齢に伴う半数致死条件の変化を検討するために、Tukey-Kramer の多重比較を行った。

結 果

供試魚の成長 飼育期間中には、孵化後 1 日齢の 3.2 ± 0.3 mm (平均全長 $\pm$ SD, 以下同様) から 20 日齢の

Table 1 Mean survival rates of larvae at 1, 6, 24 and 48 hours after the transfer to freshwater (<0.1 psu) at ages 1, 5, 10 and 25 days after hatching

Age (Day)	Mean survival rate (%)			
	1 h	6 h	24 h	48 h
1	95.0(2.1)	90.9(3.2)	29.2(2.8)	0
5	90.8(4.2)	43.5(8.3)	0	0
10	30.9(5.7)	0	0	0
25	11.2(4.6)	0	0	0

Standard errors are shown in parentheses. Triplication was conducted in each treatment.

Table 2 Mean survival rates of larvae at 24 hours after transfer to serial salinity at ages 1, 3, 5, 10 and 20 days after hatching

Age (Day)	Mean survival rate (%)				
	30	40	45	50	55
1	81.4(5.0)	82.8(4.3)	72.8(1.2)	63.2(4.1)	6.5(3.1)
3	79.8(3.5)	64.9(0.8)	55.3(3.1)	32.3(5.2)	0
5	72.1(2.3)	61.3(5.8)	49.5(2.5)	2.0(1.6)	0
10	90.6(4.3)	77.3(6.6)	35.7(11.9)	0	0
20	97.6(1.9)	94.4(2.3)	0	0	0

Standard errors are shown in parentheses. Triplication was conducted in each treatment.

Table 3 Mean survival rates of larvae under increasing temperature conditions (1°C/30 min) at ages 1, 3, 5, 10 and 21 days after hatching

Age (Day)	Mean survival rate (%) at								
	20°C	22°C	24°C	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	36°C
1	100	100	100	96.8(2.6)	94.9(2.3)	90.4(2.9)	70.9(4.9)	26.4(6.4)	3.7(1.5)
3	96.8(4.5)	89.7(1.2)	89.7(1.2)	89.7(1.2)	84.9(2.9)	52.2(19.7)	9.5(7.8)	0	—
5	87.5(3.5)	85.5(4.9)	72.7(7.6)	69.8(5.2)	66.9(2.9)	46.7(4.4)	4.3(3.6)	0	—
10	100	97.4(2.1)	81.0(2.5)	40.6(84.0)	13.2(4.0)	5.3(2.2)	0	0	—
22	100	100	100	34.4(7.1)	1.9(1.5)	1.9(1.5)	0	0	—

Standard errors are shown in parentheses. Triplication was conducted in each treatment.

7.2 ± 0.6 mm まで成長し、発育段階は PL から E 期まで進んだ (Fig. 1)。すべての仔魚の卵黄は、孵化後 5 日齢までに消失して A 期となった。また、トリパンブルー染色により供試魚を観察した結果、成長の速い個体では目の黒化と同調して、孵化後 2 日齢に開口し始め、孵化後 4 日齢までに全ての個体が開口した。鰓蓋は孵化後 4 日齢から観察され、孵化後 10 日齢までに鰓弁が確認された。

淡水耐性の変化 淡水耐性試験の 1 時間後の生残率は、孵化後 1 および 5 日齢ではおよそ 90% を示したのに対し、孵化後 10 および 20 日齢では、およそ 30 および 10% まで低下した (Table 1)。L_{time50} $\pm$ SE は、孵化後 1 日齢の 21.0 ± 1.1 時間から孵化後 10 日齢の 1.8 ± 0.2 時間まで有意な減少を示し ($p < 0.05$)、孵化後 25 日齢でも 1.2 ± 0.2 時間であった (Fig. 2A)。

高塩分耐性の変化 高塩分耐性試験の塩分 45 の生残率は、日齢の経過に伴いおよそ 70% から 0% まで低下した (Table 2)。LC₅₀ $\pm$ SE は、孵化後 1 日齢の 48.5 ± 0.9 から 3 日齢の 43.7 ± 0.1 まで急激な減少を示したが ($p < 0.05$)、孵化後 5 日齢から 20 日齢までは、ほぼ同様の値で推移した (Fig. 2B)。

Table 4 Mean survival rates of larvae at 24 hours after transfer to serial concentrations of formalin at ages 1, 3, 5, 10 and 20 days after hatching

Age (Day)	Mean survival rate (%)					
	0%	0.1%	0.2%	0.3%	0.4%	0.6%
1	93.2(1.3)	—	85.3(2.6)	—	61.0(5.0)	2.0(1.6)
3	73.5(1.2)	—	62.3(7.5)	—	18.9(1.0)	0
5	100	97.2(2.3)	53.3(6.9)	21.3(7.1)	2.8(2.3)	0
10	92.5(3.6)	84.5(4.8)	72.1(3.9)	28.5(8.0)	0	—
20	93.5(2.8)	97.4(2.1)	88.6(6.0)	0	—	—

Standard errors are shown in parentheses. Triplication was conducted in each treatment.

Fig. 2 Relationship between larval age and 50% lethal conditions. (A) 50% lethal time (h) in fresh water tolerance ability test in 0.1, (B) 50% lethal concentration in salinity (practical salinity unit) in high salinity tolerance ability test at 24 hours, (C) 50% lethal temperature ($^{\circ}C$) in high water temperature tolerance ability test, and (D) 50% lethal concentration in formalin (%) in formalin tolerance ability test at 24 hours. Mean and standard error at each age are shown. Symbols with the same letter are not significantly different at $p < 0.05$. See also Tables 1-4.

高温耐性の変化 高温耐性試験の $30^{\circ}C$ の生残率は、日齢の経過に伴いおよそ 90% から 2% まで低下した (Table 3)。 $L_{temp.50} \pm SE$ は、孵化後 1 日齢の $32.0 \pm 0.4^{\circ}C$ から孵化後 10 日齢の $26.9 \pm 0.3^{\circ}C$ まで徐々に減少し ($p < 0.05$)、孵化後 22 日齢の $27.0 \pm 0.2^{\circ}C$ までほぼ同様の値で推移した (Fig. 2C)。

ホルマリン耐性の変化 ホルマリン耐性試験の 0.4% の生残率は、日齢の経過に伴いおよそ 60% から 0% まで低下した (Table 4)。また、 LC_{50} は、孵化後 1 日齢の $0.37 \pm 0.01\%$ から孵化後 3 日齢の $0.21 \pm 0.02\%$ まで急激な減少を示し ($p < 0.05$)、孵化後 20 日齢の $0.22 \pm 0.01\%$ までほぼ同様の値で推移した (Fig. 2D)。

考 察

ヒラメはおよそ孵化後 30 日齢から 40 日齢までに浮遊生活から底生生活へと生態的に大きな変化が生じ、ま

た、形態的にも左右相称で孵化し、変態期を経て左右非対称を示す稚魚へと劇的な変態を遂げる。⁷⁾ 今回は変態後の発達段階を検討できなかったが、本種を用いて、塩分耐性 (淡水および高塩分耐性)、水温耐性 (高温耐性) および毒物耐性 (ホルマリン耐性) の半数致死時間、半数致死濃度および半数致死温度を算出した。耐性はいずれも卵黄仔魚期の孵化後 1 日齢で最も高い値を示し、およそ孵化後 10 日齢までに最低値を示した。このように孵化直後に様々な環境ストレス要因に対して、高い耐性を示し、その後低下するという現象がヒラメの低塩分耐性,⁶⁾ サケの高塩分耐性,⁴⁾ グッピーの海水耐性³⁾ および高温耐性,⁸⁾ イシダイの有機リン系殺虫剤 (MEP および diadion) 耐性,²⁾ マダイの塩分、水温およびアンモニア耐性⁵⁾ などにおいて報告されている。孵化直後と稚魚期または卵黄吸収後のグッピーやアユ *Plecoglossus altivelis* を海水へ移行したところ、稚魚期または卵黄吸

収後の個体は全てまたはほとんどが死亡するのに対し、孵化直後の個体は海水に適応することが報告されている。^{3,9)}本研究において孵化直後のヒラメ仔魚が種々の環境ストレスに対し耐性が高かったのは、硬骨魚類に一般的な現象と考えられる。

様々な外部環境ストレスに対して、ヒラメ仔魚の耐性が孵化直後に高かったのには、孵化後1日齢のヒラメ仔魚が口および鰓蓋が未発達で内部栄養に依存していること、およそ10日齢までに最低値を示した要因は、この間に口および鰓蓋が形成され消化器系および鰓が機能化し、内部栄養から外部栄養への転換したことに関係していると考えられた。卵黄仔魚期は内部栄養である卵黄にエネルギー源を依存するために、体外との物質交換量が多くない。仔魚の組織観察により、孵化後5日齢より鰓弓が観察され、孵化後10日齢には、ガス交換や浸透圧調節を行う組織である鰓弁の形成も認められた。その結果、物質の取り込み量が多くなっていることが示唆され、外部環境に対する感受性が増加し、耐性能力が低下したと考えられた。また、孵化後10日齢から20日齢までのヒラメ仔魚は、変態開始前であるC期から変態初期のE期に相当する。したがってこの時期には、形態変化に対応して体内で大きな生理的变化も生じはじめると考えられるために、外部の環境ストレスに対して高い感受性を示したことが推察された。

一方、各種環境ストレスに対する耐性は、日齢の経過に伴い異なる変化パターンを示した。淡水や高塩分耐性は孵化後1日齢から10日齢まで徐々に減少したが、高温耐性は孵化後5日齢と10日齢、ホルマリン耐性では孵化後1日齢と3日齢の間で大きく減少した。これらは、それぞれの環境ストレス要因が、異なった作用機作を示すためと考えられる。例えば塩分は、鰓や体表に存在する塩類細胞により行われる浸透圧調節と密接な関係がある。^{10,11)} 高水温は呼吸器系への障害¹⁾や膜機能の失調を招く。¹²⁾ ホルマリンは、タンパク質を架橋結合させるため、外部の体表、呼吸器系および消化器系や内部の中枢神経にも作用することが報告されている。¹³⁾ さらに、発育初期では、対応する器官や組織の分化や機能化の時期とも関連するために、各種環境ストレスに対する耐性が異なる変化パターンを示したと推察された。しかし、それらの具体的な作用機作は不明であるので、初期発育過程における器官形成の動態を詳細に把握すること

により、環境ストレスに対する生理的応答機構を解明することが必要である。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり実験に協力いただいた独立行政法人水産総合研究センター宮津栽培漁業センター場長 津崎龍雄氏ならびに職員諸氏に深謝する。

文 献

- 1) 藤尾芳久. 水温適応性. 「水産育種に関わる形質の発現と評価」(藤尾芳久・谷口順彦編) 恒星社厚生閣, 東京. 1998; 67-75.
- 2) 青海忠久. イシダイ卵仔稚に対する有機リン系殺虫剤の急性毒性. 日水誌 1982; **48**: 599-603.
- 3) Shikano T, Fujio Y. Successful propagation in seawater of the guppy *Poecilia reticulata* with reference to high salinity tolerance at birth. *Fish. Sci.* 1997; **63**: 573-575.
- 4) Shikano T, Fujio Y. Decline in salinity tolerance during larval stage of chum salmon *Oncorhynchus keta*. *Fish. Sci.* 1999; **65**: 661-662.
- 5) 石橋泰典, 小澤 勝, 平田八郎, 熊井英水. マダイ *Pagrus major* 仔稚魚の発育に伴う各種環境ストレス耐性の変化. 日水誌 2003; **69**: 36-43.
- 6) Hiroi J, Sakakura Y, Tagawa M, Seikai T, Tanaka M. Developmental changes in low-salinity tolerance and responses of prolactin, cortisol and thyroid hormones to low-salinity environment in larvae and juveniles of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool. Sci.* 1997; **14**: 987-992.
- 7) 南 卓志. ヒラメの初期生活史. 日水誌 1982; **48**: 1581-1588.
- 8) Kanda N, Nakajima M, Fujio Y. Genetic variation for thermal resistance of the guppy, *Poecilia reticulata*. *Tohoku J. Agr. Res.* 1992; **42**: 67-72.
- 9) Hwang PP, Hirano R. Effects of environmental salinity on intercellular organization and junctional structure of chloride cells in early stages teleost development. *J. Exp. Zool.* 1985; **236**: 115-126.
- 10) Foskett JK, Scheffey C. The chloride cell: Definitive identification as the salt-secretory cell in teleosts. *Science* 1982; **215**: 164-166.
- 11) Shikano T, Arai E, Fujio Y. Seawater adaptability, osmoregulatory function, and branchial chloride cells in the strain selected for high salinity tolerance of the guppy *Poecilia reticulata*. *Fish. Sci.* 1998; **64**: 240-244.
- 12) 板沢靖男. 温度. 「新版 魚類生理学概論」(田村 保編) 恒星社厚生閣, 東京. 1991; 81-82.
- 13) Heck H d'A, Casanova M, Starr TB. Formaldehyde toxicity-new understanding. *Crit. Rev. Toxicol.* 1990; **20**: 397-426.