コルチゾルおよび RU486 の投与がヒラメの 無眼側着色に及ぼす影響

亀山 貴一, 角田 出*

(2006 年 11 月 29 日受付, 2007 年 4 月 6 日受理)

石巻専修大学大学院理工学研究科

Effects of cortisol and RU486 on blind side pigmentation
in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

TAKAKAZU KAMEYAMA AND IZURU KAKUTA*

Graduate School of Science and Engineering, Senshu University of Ishinomaki, Miyagi 986-8580, Japan

Effects of cortisol and RU486 on the blind side pigmentation in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (total length: 80–200 mm), were investigated. Two intraperitoneal injections of cortisol (100 mg/kg body weight) suppressed the blind side pigmentation. Plasma cortisol level was significantly increased in cortisol-treated fish. On the other hand, RU486 (Mifepristone) treatment, oral administration (100 mg/kg body weight/day) for 6 weeks or two intraperitoneal injections (100 mg/kg body weight), promoted the pigmentation. Plasma cortisol was increased by the treatment. These results suggest that the increases in plasma ACTH and α MSH caused by activation of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis induce the blind side pigmentation in juvenile and young Japanese flounder.

キーワード : HPI 系, RU486, コルチゾル, ヒラメ, 無眼側着色

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の種苗生産過程において、黒化と呼ばれる体色異常が起こり問題となっている。黒化とは異体類特有のもので、本来白色であるはずの無眼側に着色が生じる現象である。¹⁾ 黒化には、変態完了時にすでに発現している真の両面有色（浮遊期型異常）と、着底後に徐々に着色してくる着色型黒化（着底期型異常）の2型が存在し、それぞれの発現要因とメカニズムは異なるとされている。¹⁾ 真の両面有色の発現には、摂餌量、飼餌料中のビタミン A や DHA 量、配合飼料の給餌開始時期、照度、飼育密度などが影響するとされており、そのメカニズムについての研究が進んできた。²⁻⁴⁾ 一方、着色型黒化の発現については、飼料中のビタミン D 量や、潜砂が可能か否か、背地の色などが影響するという報告がある^{5,6)}ものの、そのメカニズムに関する研究は極めて少ない。従って、着色型黒化を防除するためには、まず、その発現要因を明らかにする必要がある。

黒化の発現には、黒色素胞刺激ホルモン（melanophore-stimulating hormone: MSH）が深く関わってい

る。⁷⁾ MSH は、暗背地への適応時に分泌されるホルモンであり、メラニン顆粒を拡散し、体色を暗化させる働きをもつ。長期間 MSH の分泌が続くと、黒色素胞の新たな分化や、形態的な変化が起こり、体色は暗化したままになる。⁷⁾ そのため、ヒラメを長期間黒い水槽で飼育すると、MSH が絶えず分泌されている状態となり、黒化が進行する可能性が高い。

MSH は、環境への適応だけでなく、ストレス負荷によっても分泌される。一般的にストレスが来ると、視床下部—脳下垂体—間腎（hypothalamus-pituitary-interrenal: HPI）系を介して、最終的に間腎（哺乳類の副腎皮質に相当）からコルチゾルやコルチゾンなどのコルチコイドが分泌される。⁸⁾ 上記の反応系では、脳下垂体前葉から副腎皮質刺激ホルモン（adenocorticotrophic hormone: ACTH）が、中葉からは α -MSH が分泌される。⁹⁾ ACTH の一部は、 α -MSH と類似の構造をしているため、メラノコルチン受容体に高い親和性を示す。そのため、ACTH を投与しても体色が暗化する。¹⁰⁾

ヒラメの増養殖場は、高密度飼育による水質悪化や狭

* Tel : 81-225-22-7716. Fax : 81-225-22-7746. Email : kakuta@isenshu-u.ac.jp

い環境, 急激な温度変化, 潜砂することができないなどの自然とはかけ離れた環境にある。¹¹⁾ これらの要因はヒラメにとってストレッサーとなり得る。それゆえに, 増養殖されているヒラメでは, ストレス負荷にともなって分泌される ACTH や α -MSH によって, 着色型黒化が引き起こされている可能性が高い (青海ら, 未発表)。

以上のことから, 本研究では, ヒラメの着色型黒化に及ぼすストレスの影響を調査するために, (1) HPI 系の活性を抑制する目的で, コルチゾル投与試験, および (2) HPI 系の活性を促進する目的で, 末端組織のコルチコイドレセプターの働きを阻害するとともに HPI 系のネガティブフィードバックを抑制する作用を有する RU486¹²⁾ の投与試験を行った。

材料および方法

本実験では, 原則として全く黒化の認められない個体を用いた。ただし, 実験 3 では, 実験開始時にわずかに黒化のみられる個体もあった。

実験 1: コルチゾル腹腔内投与試験

1. 供試魚 本試験には, 宮城県水産高等学校で種苗生産された 2 歳のヒラメ (全長約 200 mm) 10 尾を用いた。ヒラメ幼魚を 2 つの 60 L 水槽 (306×608×364 mm) に 5 尾ずつ収容し, コルチゾル投与区および対照区とした。

2. 飼育条件 1 週間予備飼育した後, コルチゾル投与実験を行った。実験期間は, 2 週間とした。実験中の水温は平均 22℃ であり, 換水は, ヒラメにストレスを与えないように, 2 日毎に 3 分の 1 ずつ行った。また, 給餌は 1 日当たり魚体重の 2% となるように, 市販の配合飼料 (科学飼料研究所製) を与えた。

3. 薬剤投与 ヒラメに, 酢酸ヒドロコルチゾン (和光社製) をオリーブオイルに溶解し, 試験開始時と 1 週間目の計 2 回, 腹腔内に注射した。対照区には, オリーブオイルのみを腹腔内に注射した。酢酸ヒドロコルチゾンの量は, 100 mg/kg 体重となるようにした。オリーブオイルの投与量は 100 μ L/kg 体重である。

4. 黒化指標の測定および統計 ヒラメを実験開始から, 2 週間目に取り上げ, その後, 無眼側の写真を撮影した。黒化の指標として, 黒化個体出現率および黒化面積増加率を用いた。黒化個体出現率は, 黒化部が肉眼で確認できるものを黒化個体として求めた。黒化面積率は, 無眼側の鰭を除く部分に対する黒化部の面積の割合を, 画像処理ソフト Scion Image (SCION 社) を使って求めた。サンプリング時に求めた黒化面積率から, 実験開始時に求めた黒化面積率を引いた値を黒化面積増加率とした。

実験で得られた測定結果のうち黒化個体出現率については χ^2 乗検定を, 黒化面積増加率については *Aspin-*

Welch の検定を用いて統計処理を行った。有意水準は 5% とした。なお, 対照区の個体数は, 飼育中における魚の飛び出しにより, 飼育開始時に比べ, 一尾少なくなった。

実験 2: RU486 経口投与試験

1. 供試魚 本試験には, ㈱日清マリンテックより購入した, 当歳のヒラメ (全長約 80 mm) 40 尾を用いた。ヒラメ稚魚を, 2 つの 60 L 水槽 (306×608×364 mm) に 20 尾ずつ収容し, RU486 投与区および対照区とした。

2. 飼育条件 1 週間予備飼育した後, RU486 投与実験を行った。実験期間は, 6 週間とした。実験中の飼育条件は実験 1 と同様である。

3. 薬剤投与 RU486 (ミフェプリストン: LKT Laboratories 社製) を餌表面に添着し, 経口投与した。RU486 の量は, 100 mg/kg 体重/日となるようにした。

4. 黒化指標の測定および統計 ヒラメを実験開始から, 6 週間目に取り上げ, その後, 無眼側の写真を撮影した。実験 1 と同様に, 黒化個体出現率および黒化面積増加率を測定し, 黒化個体出現率については χ^2 乗検定を, 黒化面積増加率については *Aspin-Welch* の検定を用いて統計処理を行った。なお, 有意水準は 5% とした。

実験 3: コルチゾルおよび RU486 腹腔内投与試験

1. 供試魚 コルチゾル, RU486 投与試験ともに, 供試魚として, ㈱日清マリンテックより購入したヒラメ幼魚 (全長約 150 mm) 60 尾を用いた。

2. 飼育条件 60 L 水槽 (306×608×364 mm) にヒラメをそれぞれ 10 尾ずつ収容し, 各 2 水槽をコルチゾル投与区, RU486 投与区および対照区とした。1 週間予備飼育した後, コルチゾルおよび RU486 投与実験を行った。その際 60 L 水槽を, 温度および水質を一定にするために, 水温を 23℃ に設定した, 循環濾過式の 2,000 L 水槽内に配置し, 各 60 L 水槽には, 同濾過海水が, 勢いよく供給されるようにした。60 L 水槽への流入量は, 12 L/min である。なお, 2,000 L 水槽の換水は, 1 週間毎に 4 分の 1 ずつ行った。給餌は 1 日当たり魚体重の 2% となるように, 前述の配合飼料を与えた。実験期間は 2 週間とした。

3. 薬剤投与 コルチゾル, RU486 投与試験ともに, ヒラメに, 酢酸ヒドロコルチゾン, あるいは RU486 をオリーブオイルに溶解し, 実験開始時と 1 週間目の計 2 回, 腹腔内に注射した。対照区には, オリーブオイルのみを腹腔内に注射した。薬剤の投与量は, 100 mg/kg 体重となるようにした。オリーブオイルの投与量は 100 μ L/kg 体重である。

4. サンプリング ヒラメを実験開始から, コルチゾル投与試験, RU486 投与試験ともに 2 週間目に取り上げ, ヘパリンリチウム処理した注射器を用いて, 心臓か

ら採血を行った。その後、無眼側の写真を撮影した。血液は 20℃, 800 g で 15 分間遠心分離後、血漿分画をコルチゾール測定まで -80℃ で冷凍保存した。

5. 黒化指標の測定 実験 1 では、黒化個体出現率と黒化面積増加率の両方を用いたが、実験 2 では購入したヒラメが既に黒化していたため、黒化面積増加率のみを用いた。黒化面積増加率の求め方は、実験 1 と同様の方法で行った。

6. 血中コルチゾール濃度 血中コルチゾール濃度の測定には、コルチゾール EIA キット (OXFORD BIOMEDICAL RESEARCH 社製 No. EA65) を用いた。採血した血液を、20℃, 800 g で 15 分間遠心分離し、血漿分画を得た。得られた血漿 50 μ L にジエチルエーテル (和光社製) 500 μ L を加え、30 秒間ヴォルテックスで攪拌した後、上清 (ジエチルエーテル分画) を得た。この操作を 2 回繰り返した。回収した上清からジエチルエーテルを揮発させた後、キット付属の抽出バッファー 100 μ L で再溶解し、それをコルチゾール測定用試料とした。

7. 統計 実験で得られた測定結果は、等分散性を確認した後、Dunnett の多重比較検定によって統計処理した。有意水準は 5 % とした。なお、各測定項目における個体数は、飼育中における魚の逃亡や採血時の失敗等により、飼育開始時に比べ、少なくなった。

結 果

実験 1：コルチゾール腹腔内投与試験 2 週間の飼育によって、対照区で 4 尾中 3 尾が、コルチゾール投与区では 5 尾中 1 尾が黒化した。すなわち、黒化個体出現率は、対照区で 75 % であったのに対し、コルチゾール投与区では 20 % と有意に低かった。

本試験の黒化面積増加率を Fig. 1 に示す。コルチゾール投与試験では、対照区の黒化面積増加率が 4.0 ± 1.1 (平均値 $\pm$ 標準誤差：以下同様に表記) % であったのに対し、コルチゾール投与区では 0.3 ± 0.1 % となった。個体差が大きいため、対照区と試験区間に統計的な有意

Fig. 1 Increased coverage of pigmented blind side in Japanese flounder treated with cortisol. Data are given as mean $\pm$ SE (Control group $n=4$, Cortisol group $n=5$).

差は認められなかったが、コルチゾール投与区で低くなる傾向がみられた。

実験 2：RU486 経口投与試験 6 週間の飼育によって、対照区で 17 尾中 3 尾が、RU486 投与区では 18 尾中 13 尾が黒化した。すなわち、対照区の黒化個体出現率が 18 % であったのに対し、RU486 投与区では 72 % と有意に高くなった。

本試験の黒化面積増加率を Fig. 2 に示す。RU486 投与試験では、対照区の黒化面積増加率が 0.8 ± 0.1 % だったのに対し、RU486 投与試験で 2.6 ± 0.2 % となり、RU486 投与区で高くなる傾向がみられた。ただし、個体差が大きいため、対照区と試験区間に統計的な有意差は認められなかった。

実験 3：コルチゾールおよび RU486 腹腔内投与試験 黒化面積増加率を Fig. 3 に示す。対照区の黒化面積増加率は 2.6 ± 0.2 % であったのに対し、コルチゾール投与区では 1.6 ± 0.2 %、RU486 投与区では 3.1 ± 0.1 % となった。黒化面積増加率には、コルチゾールを投与すると低くなる傾向がみられ、RU486 を投与すると高くなる傾向がみられた。ただし、個体差が大きいため、対照区と試験区間に有意な差は認められなかった。

血中コルチゾール濃度を Fig. 4 に示す。対照区の血中

Fig. 2 Increased coverage of pigmented blind side in Japanese flounder treated with RU486. Data are given as mean $\pm$ SE (Control group $n=17$, RU486 group $n=18$).

Fig. 3 Increased coverage of pigmented blind side in Japanese flounder treated with cortisol or RU486. Data are given as mean $\pm$ SE ($n=20$).

Fig. 4 Changes in plasma cortisol level of Japanese flounder treated with cortisol or RU486. Data are given as mean $\pm$ SE ($n=15$). *Significant difference from the control ($p<0.05$).

コルチゾル濃度は 39 ± 4 ng/mL であったのに対し、コルチゾル投与区では $1,713 \pm 34$ ng/mL, RU486 投与区では 405 ± 23 ng/mL となり、両試験区とも対照区に対して値は有意に上昇した。

考 察

コルチゾルは、HPI 系を介して分泌されるストレスホルモンであり、ストレス反応において特に重要なホルモンである。⁸⁾ コルチゾルの分泌に至る過程において、脳下垂体前葉から ACTH、中葉から α -MSH などの体色を暗化させるホルモンが分泌される。⁹⁾

今回の実験における、コルチゾル及び RU486 の投与量は、1 段階しか設定しなかったが、コイでは、両者とも 100 mg/kg 体重で投与すれば、HPI 系の抑制および促進効果が得られることがわかっている。^{14,15)} コルチゾルを投与して 2 週間飼育したヒラメでは、黒化個体出現率は著しく抑制され (実験 1)、黒化面積増加率も低くなる傾向がみられた (実験 1, 3)。また、コルチゾル投与区では、血中コルチゾル濃度は有意に高くなった (実験 3)。これらの結果は、コルチゾルの投与によって、HPI 系内で、ネガティブフィードバックが生じ、ACTH や α -MSH の分泌が抑制されたために、黒化個体出現率と黒化面積増加率が低くなったことを示唆する。

一方、RU486 を投与して飼育したヒラメでは、コルチゾル投与とは逆に、黒化個体出現率は著しく高くなり (実験 2)、黒化面積増加率も高くなる傾向がみられた (実験 2, 3)。血中コルチゾル濃度は、RU486 を投与することによって有意に上昇した (実験 3)。RU486 は、末端組織のコルチコイドレセプターの働きを阻害するだけでなく、HPI 系のネガティブフィードバックも抑制するために、血中の ACTH、 α -MSH およびコルチゾル濃度の上昇を引き起こす。¹³⁾ その結果、黒化の促進と血中コルチゾル濃度の上昇が起こったことが考えられる。

以上のことから、ストレス状態への生理的反応である HPI 系の活性化に伴って生じる ACTH や α -MSH の分

泌亢進がヒラメの黒化に関与していることが強く示唆された。Yamanome ら¹⁵⁾ は、ヒラメと同じ異体類であるマツカワを用いた実験において、水槽の色を白くすることによって黒色素凝集ホルモン (melanin-concentrating hormone: MCH) が分泌され、黒化がかなり抑制されると報告している。しかし、ヒラメの種苗生産を行う際に、白い水槽を用いても黒化を完全に抑制することはできない。従って、黒化の抑制には、養殖時のストレス負荷を軽減することが肝要である。

今回の実験では、ヒラメのサイズ (全長 80 mm, 150 mm, 200 mm) 及びロットが異なったものを用いたが、黒化個体出現率および黒化面積増加率は、いずれも同じような傾向を示した。また、全く黒化の認められない個体と、一部に黒化が認められる個体の間でも、黒化個体出現率および黒化面積増加率には大きな違いはみられなかった。RU486 投与試験では、経口投与 (実験 2)、腹腔内注射 (実験 3) と投与方法が異なっていたが、RU486 は経口避妊薬としても使用されているため、どちらの投与方法でも同様の効果が認められた。ただし、実験 1 および実験 2 の対照区の黒化個体出現率は 75% と 18% と大きく異なった。これは、実験 1 で用いた投与方法が腹腔内注射であったために、対照区の魚にもストレス負荷が加わった結果であると考えられる。

本実験では、人為的に多量のコルチゾルや RU486 を投与したため、2 週間で黒化個体出現率や黒化面積増加率に差がみられた。しかし、自然条件下では、血中のコルチゾル濃度にこのような高い値はみられない。そのため、密度や温度、底質など、自然に起こり得るストレス負荷条件下で、より長期的な実験を行う必要があると思われる。

謝 辞

本研究を進めるに際し、快く飼育施設をお貸し頂きました、宮城県水産高等学校の座間彰先生、ヒラメの飼育技術指導ならびに供試魚の提供等に関し、様々な便宜を御図り頂きました同校の亀山千代志先生ならびに畠山智宏先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Norman JR. A Systematic Monograph of the Flatfishes (Heterosomata). Psettoidea, Bothidae, Pleuronectidae. Johnson Reprint Corporation, New York. 1934; 1: 459.
- 2) 青森県栽培漁業振興協会. ヒラメの無眼側体色異常の出現防除対策への取り組みについて. 平成 6 年度太平洋北区栽培漁業協議会技術部会資料 1994; 1-5.
- 3) 高橋庸一. ヒラメ稚魚の無眼側の体色異常におよぼす飼育密度と飼餌料の影響. 日本水産学会誌 1994; 60: 593-598.
- 4) 山田 浩. ヒラメ黒化防除技術開発の取り組みと成果—茨城方式の種苗生産—. 水産総合研究センター委託事業

- 報告書 2004; 1-17.
- 5) 長谷川靖之, 竹内俊郎, 板垣恵美子, 福永辰廣. ヒラメ無眼側体色異常出現に及ぼす飼料中の脂溶性ビタミン強化の影響. 水産増殖 1988; **46**: 279-286.
 - 6) 岡村正裕. ヒラメ種苗の敷砂と流速を用いた無眼側体色異常防除. 新潟県沿岸漁業振興協会日裁協, ヒラメ黒化防除に関する情報交換会資料 1997; 1-2.
 - 7) Burton D. The effects of background colouration and α -MSH treatment on melanophore frequency in winter flounder. J Comp Physiol A 1993; **173**: 329-333.
 - 8) Bernier NJ, Peter RE. The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. Comp Biochem Physiol B 2001; **129**: 639-644.
 - 9) 川内浩司. 魚類の脳下垂体ホルモン. 化学増刊 1987; **111**: 107-115.
 - 10) Haitina T, Klovins J, Schioeth HB. Pharmacological characterization of melanocortin receptors in fish suggests an important role for ACTH. Ann N Y Acad Sci 2005; **1040**: 337-339.
 - 11) 福永辰廣. 総説 ヒラメ種苗生産の現状. 水産増殖 1990; **34**: 391-394.
 - 12) Philibert D, Costerousse G, Gaillard-moguilewsky M. From RU486 towards dissociated antiglucocorticosteroid and antiprogesterone. In Antihormones in Health and Disease. MK. Agarwal, Ed 1991; **19**: 1-17.
 - 13) Dziewulska-Szwajkowska D. The effect of high dose of cortisol on glucose-6-phosphate and fructose-1,6-bisphosphatase activity, and glucose and fructose-2,6-bisphosphate concentration in carp tissues. Comp Biochem Physiol B 2003; **135**: 485-491.
 - 14) Gorenberg D. Dose response of RU486 in a novel rabbit model of noninfectious preterm birth: comparative efficacy of 3 routes of administration. Am J Obstet Gynecol 2005; **192**: 924-31.
 - 15) Yamanome T, Amano M, Takahashi A. White background reduces the occurrence of staining, activates melanin-concentrating hormone and promotes somatic growth in barfin flounder. Aquaculture 2005; **244**: 323-329.