

## マダイのストレス反応に関する生理生化学的研究

石岡宏子

### Physiological and Biochemical Studies on the Stress Responses of the Red Sea Bream, *Pagrus major* (TEMMINCK et SCHLEGEL)

Hiroko ISHIOKA

As the red sea bream is usually cultured in the net pen of the coastal area where environmental factors such as salinity, water temperature and pollutants are more variable than their natural habitats and the life of the fish in the net pen is very different from the natural one, environmental changes, rearing system including high density, handling and transportation may cause severe stresses to the cultured fish. So, the study of the adaptability to the biological and non-biological environment in physiological sense, i.e., stress responses, is a very important subject not only for the fundamental understanding of fish physiology but also for the development of the management of the red sea bream culture.

The present study was carried out to clarify the physiological responses of the red sea bream to various kinds of stressors hematologically and to analyze stress phases by cluster analysis. Hormonal control of the metabolism in the liver, muscle and adipose tissue during stress responses was also studied in vitro utilizing radio-labelled substances.

(1) Hematological changes were determined on the fish stressed by temperature changes.

Thermal stress produced the increases of hemoglobin content, hematocrit value, serum cortisol level and serum glucose level, whereas cold stress decreased hemoglobin content and hematocrit value, and increased serum cortisol and serum glucose levels.

To clarify the phases of stress responses in the fish, the cluster analysis was applied by means of the Euclidean distances calculated by 3 variables: hematocrit value, serum glucose level and serum sodium level. Four phases were analyzed and these four phases were named as non-reactive, pre-reactive, reactive and exhaustive phase, respectively. Serum sodium level decreased slightly in the pre-reactive phase and serum glucose level and hematocrit value increased significantly in the reactive phase. In the exhaustive phase, a significant increase in serum sodium level was characteristic.

(2) Hematological changes were determined on the fish stressed by salinity changes. A rapid elevation of environmental salinity induced hyperglycemia, increases of serum sodium, chloride and cortisol levels of the fish. The fish exposed to a rapid lowering of salinity showed hyperglycemia, increases in serum cortisol level, and high hematocrit values and decreases in serum sodium and chloride levels. Above mentioned hematological changes depended on the magnitude and the rate of salinity changes.

The phases of stress responses were determined by means of the Euclidean distances.

Three phases were identified as non-reactive, reactive and exhaustive phases. Hyperglycemia was characteristically observed in the reactive phase while in the exhaustive phase, serum sodium level was observed to be remarkably influenced by environmental salinity.

- (3) The red sea bream showed changes of various hematological parameters by the rapid decrease of oxygen levels of the water (3.75ml/l for half an hour and 3.5ml/l for 4 hours). The most typical changes were hyperglycemia and the elevation of serum cortisol level. Increases of hematocrit values and hemoglobin contents were also observed. These hematological changes were not observed by the slow reduction of oxygen levels (1.72ml/l and 1.29ml/l for 4 hours), though serum glucose levels increased slightly.

Three phases were identified by the cluster analysis. In addition to the non-reactive phase and the reactive phase characterized by hyperglycemia and high hematocrit value, the non-specified phase which was characterized by remarkably low levels of three variables was observed.

- (4) The effects of handling and anesthetization with MS222 (ethyl-m-aminobenzoate methane sulfonate) on the red sea bream were investigated with reference to selected hematological parameters. The exposure of the fish to the air for 1 min. in a hand net (mild handling) produced no significant changes in hemoglobin content, hematocrit value, serum glucose, sodium and chloride levels, except serum potassium level. On the otherhand, the forced insertion of fish flesh (1g) through a polyvinyl tube into the stomach (severe handling that the procedure had taken about 5-7 minutes) caused an elevation of serum glucose level immediately after the treatment. These changes in serum glucose and serum potassium levels persisted for several hours after the handling.

Anesthetization of the fish with 100 ppm MS222 did not affect hematological parameters at least within 10 minutes after treatment. Prolonged exposure (15-30 min.) to 50 ppm MS222 extremely elevated serum glucose and serum sodium levels. These changes in serum constituents suggested that osmoregulatory and metabolic dysfunctions had occurred by handling and anesthetization.

- (5) Red sea breams were transported experimentally by the living wells (1×1×1 m) of a boat and in the polyvinyl container on the truck. The container contained 20 l of sea water and was tightly closed after blowing pure oxygen gas for 30 seconds. Changes in hematological parameters of the fish were studied during transportations. Two hour transportation of the fish immediately after loading in the boat living well produced hyperglycemia on the fish and some individuals also showed high hematocrit values and high serum sodium levels. However, transportation after 24 hours recovery from transferring did not produce any signs of stress responses. When the fish had been transferred one day before, transportation in the container produced remarkable hyperglycemia, comparatively constant serum sodium level and lower hematocrit value. It was suggested that these changes resulted from severe confinement and too high dissolved oxygen tensions in closed transporting system.
- (6) Effects of angling on hematological parameters of the red sea bream were studied using wild red sea breams fished by a hook and line in the Seto Inland Sea. Hematocrit value, serum glucose level and serum sodium level of the fish after angling were  $34.8 \pm 4.87$  (mean  $\pm$  s.e.,  $n=31$ ),  $63.5 \pm 25.14$  ( $n=47$ ) and  $181.7 \pm 20.00$  ( $n=71$ ), respectively. Serum sodium levels were fluctuated in each sampling season.
- (7) Discriminant function analysis was carried out to distinguish stressed conditions of the red sea bream. From the cluster analysis on stress responses of the fish exposed to changes of water temperature and salinity and ambient oxygen reduction, non-stressed and stressed phase

were defined by 3 parameters that were  $10 \times$  (hematocrit value),  $100 \times \log$  (serum glucose level) and serum sodium level. According to MAP (Multivariate Analysis Program Package) introduced by Computing Centre for Research in Agriculture, Forestry and Fishery, the discriminant function between non-stressed and stressed groups was defined. By applying 3 parameters of the fish stressed by handling, anesthesia, transportation and angling, the condition at blood sampling time in each fish was discriminated as non-stressed or as stressed phase. The results were shown in Table 18.

(8) In order to clarify the energy metabolism of tissues under stresses, in vitro experiments were conducted mainly using isotope techniques. Isolated tissue samples were prepared as follows. The liver was sliced by the Stadie-Rigg's slicer into 50-100mg pieces and the adipose tissue was cut into small pieces (ca. 20mg) by scissors. Muscle tissues were prepared by peeling off the pectoral fin muscles composed of musculus abductor superior, musculus abductor profundus and musculus arrector ventralis.

(9) Effect of starvation on the energy metabolism of isolated tissue samples was studied. After 2-month-starvation, tissue samples of the red sea bream were isolated and incubated in Krebs's bicarbonate ringer contained  $U^{14}C$ -glucose as a substrate and the glucose incorporation was determined in sliced liver, sliced trunk muscle and adipose tissue pieces.

In fasted fish, condition factor,  $100 \times (\text{body weight}/\text{fork length}^3)$ , declined and relative liver weight decreased profoundly to a half value of that in fed fish in early summer time. In vitro experiment, incorporation of labelled glucose into  $CO_2$  in fasted fish was significantly larger in liver and in adipose tissue on the basis of a gram of wet tissue. There was no difference in the amount of  $U^{14}C$ -glucose incorporation into tissue and glycogen on the basis of a wet weight gram also. It was suspected that the rapid utilization of glucose and the depletion of stock material in the fasted fish would produce different patterns of stress responses hematologically.

(10) In order to clarify the relationship between hormones and the tissue metabolism, in vitro studies were conducted on the metabolic effects of epinephrine, glucagon of mammals, cortisol and bovine insulin to the isolated liver, adipose tissue and fin muscles of the red sea bream.

Liver slices incubated for one hour in Krebs's bicarbonate ringer blown with 95%  $O_2$  and 5%  $CO_2$  gas at 25°C released some amount of glucose. Epinephrine (10 $\mu$ g/ml) and glucagon (17 $\mu$ g/ml) enhanced the release of glucose from liver slices. On the other hand cortisol (10 $\mu$ g/ml) and insulin (10 $\mu$ g/ml) partially suppressed the glucose output.

Epinephrine, glucagon and insulin had no effect on the release of free fatty acid from slices of liver, fin muscle and adipose tissue during 3-hour incubation in Krebs's phosphate ringer. Cortisol slightly stimulated free fatty acid release from liver slices. Thus, epinephrine, glucagon and insulin induced similar effects on carbohydrate metabolism of the red sea bream in vitro to those of warm blooded animals.

(11) Effects of epinephrine on the glucose utilization by isolated tissues was studied in vitro using isotope technique. The experiment was duplicated. Among three kinds of isolated tissue, fin muscle was most active on the tissue incorporation and glycogen synthesis from the  $U^{14}C$ -glucose in the incubation medium. In the experiment I, epinephrine inhibited the incorporation of  $U^{14}C$ -glucose into glycogen in the liver and fin muscle and stimulated the production of  $CO_2$  from  $U^{14}C$ -glucose in the adipose tissue. On the other hand, only the suppression of labelled glucose incorporation into glycogen in the fin muscle was observed in the experiment II.

(12) Effects of cortisol on glucose, lactic acid and glycine utilization were studied in vitro.

Each substrate examined showed different behavior in respective tissues. Glucose was utilized effectively in all tissues for respiration and was incorporated into glycogen in the liver and fin muscle. Lactic acid was easily metabolized for respiration and converted to lipid and glucose in the liver, though it was scarcely incorporated into glycogen in liver and fin muscle. Glycine was effectively utilized for respiration and for glucose production in the liver slices though the incorporation into glycogen and lipid was relatively small. This amino acid was poorly utilized for respiration or for synthesis of glycogen and lipid in the fin muscle and adipose tissue.

Addition of cortisol into the incubation medium caused the inhibition of glucose incorporation into the fin muscle and stimulated glucose incorporation into lipid in the adipose tissue. Cortisol markedly decreased the incorporation of U-<sup>14</sup>C-glycine into glycogen in the liver and moderately decreased glycine incorporation into the fin muscle. No effect of cortisol was observed on lactic acid utilization during one-hour incubation.

The actions of epinephrine and cortisol, which increased in circulatory blood when the fish was exposed to various stressors, were discussed in relation to hyperglycemia. The results obtained by in vitro studies suggested that the increase of blood glucose in the initial stage of stress responses were combined result of glucose production by glycogenolysis in the liver and muscle, inhibition of glucose utilization by peripheral tissues (i.e., fin muscle) and increased gluconeogenesis from substrates such as lactic acid and amino acid and so on. Especially, lactic acid was considered to be a major precursor to contribute to gluconeogenesis in the liver because it was easily produced in the muscle during tissue hypoxia in the stressed condition. Epinephrine seemed to play a leading role in the early stage of metabolism of stress responses.

## 目 次

緒 言	8
第 I 章 血液性状にみられるストレス反応	10
第 1 節 材料と方法	10
1. 材料	10
2. 実験装置	10
3. 採血方法と分析方法	10
第 2 節 温度変化と血液性状変化	11
1. 実験条件	11
2. 実験結果	12
1) 一般的観察	12
2) 血液性状	13
3. 考察	18
1) 温度順応の影響	18
2) 温度変動の影響	19

3) クラスタ分析	20
第3節 塩分変化と血液性状変化	22
1. 実験条件	23
2. 実験結果	24
1) 一般的観察	24
2) 血液性状	24
3. 考察	28
1) 塩分上昇の影響	29
2) 塩分低下の影響	30
3) クラスタ分析	31
第4節 環境水の酸素分圧低下と血液性状変化	33
1. 実験条件	33
2. 実験結果	34
1) 一般的観察	34
2) 血液性状	35
3. 考察	36
1) ヘモグロビン量とヘマトクリット値	37
2) グルコース量	39
3) コーチゾール量	39
4) 血液中無機成分量	40
5) クラスタ分析	40
第5節 麻酔、取り扱い時の血液性状変化	42
1. 実験方法	42
2. 実験結果	42
3. 考察	43
1) 取り扱いのストレスサーとしての意義	43
2) グルコース量	44
3) 血液中無機成分量	45
4) ヘモグロビン量とヘマトクリット値	45
5) ホルモン	46
6) 反応の時間的経過	46
第6節 輸送時の血液性状変化	47
1. 実験方法	48
2. 実験結果	48
3. 考察	51
1) コーチゾール量	52

2) グルコース量	52
3) 乳酸	52
4) 無機分量	53
5) ヘマトクリット値とヘモグロビン量	53
6) 輸送時のストレス反応の特徴	53
第7節 釣り上げた天然魚の血液性状	54
1. 実験方法	54
2. 実験結果と考察	55
第8節 小括	57
第Ⅱ章 ストレス反応時の物質代謝	64
第1節 実験方法の検討	64
1. 組織標本の調製	65
1) 組織標本の作製方法	65
2) 組織切片の厚さ	65
3) 摘出組織標本の反応の個体差と反応時間	65
2. 培養実験系の検討	66
1) 組織代謝量の測定方法	66
2) 摘出組織の生存性	67
3) 同一個体組織の反応の定量性	68
3. 分析方法の検討	68
4. 実験マニュアル	70
第2節 飢餓魚の摘出組織標本におけるグルコースの代謝	72
1. 実験条件	72
2. 実験結果	72
3. 考察	73
1) 飢餓時の計測学的変動	73
2) 飢餓時の化学成分の変動	74
3) 飢餓時のグルコース利用	75
第3節 摘出組織標本からのグルコースおよび 脂肪酸遊離におよぼす各種ホルモンの影響	76
1. 実験条件	77
2. 実験結果	77
3. 考察	78
1) エピネフリン	79
2) グルカゴン	80
3) コーチゾール	80

マダいのストレス反応

4) インスリン	83
5) ストレス時の物質代謝に関与するホルモン	84
第4節 エピネフリンの物質代謝に及ぼす影響	85
1. 実験条件	85
2. 実験結果	85
3. 考察	87
1) 組織における炭水化物代謝	87
2) エピネフリンの効果	88
第5節 コーチゾールの物質代謝に及ぼす影響	89
1. 実験条件	89
2. 実験結果	90
3. 考察	92
1) グルコースの代謝とコーチゾール	92
2) 乳酸の代謝とコーチゾール	93
3) アミノ酸の代謝とコーチゾール	93
4) ストレス時の血糖上昇とコーチゾール	95
第6節 小括	96
1. ストレス時の血糖上昇機構	96
2. グリコーゲン分解による血糖上昇	97
1) 肝臓グリコーゲン分解	97
2) 肝臓からのグルコース遊離	97
3) 筋肉グリコーゲンからのグルコース生成とその放出	99
3. 糖新生	99
1) 乳酸からの糖新生	99
2) アミノ酸からの糖新生	99
3) 脂肪酸・グリセロールからの糖新生	100
4. 血糖利用組織への取り込み・利用の抑制	100
第Ⅲ章 総括	101
1. ストレス反応の定義	101
2. ストレッサーとストレス反応	102
3. ストレス関与ホルモンとストレス反応	107
4. 環境要因のストレッサー強度と生存限界値	110
要約	112
謝辞	115
文献	116

## 緒 言

最近の世界的な200海里漁業水域体制への移行とともに、日本における漁業生産の維持増大は一層の重要性を叫ばれるようになり、特に需要に応じた中高級魚の選択的生産と、それを支える漁業経営の安定が望まれている。その基盤としての増養殖技術の発展は著しいものがあり、特に、海産魚の増養殖は国民の需要に沿って養殖対象魚種を拡げ、かつ生産量を増大させる技術的基盤が整備されてきた。

マダイは典型的な養殖対象魚種であり、その養殖生産量は著しく増大し、昭和56年度には17,953トンに達した。これは需要と本種の持つ環境条件の変化に強いという生物学的条件および種苗量産技術とその体制の確立という条件が整ったためと考えられている。

しかし、一方、これら種苗生産や増養殖技術に内在する各種の問題点も明確に浮かび上がってくるようになった。

元来、養殖技術の基本的成立条件は種苗、餌料、場所（環境）にあるとされる。マダイの増養殖技術の発展を考える時に、どの条件にも共通に浮き上がってくる問題がある。それは“魚の健全性”である。

現在、マダイの種苗生産技術の中で解決を迫られている問題に奇形魚の出現と生産の不安定性がある（北島1978、九州・山口ブロック水産試験場マダイ種苗生産研究会1977）。これらに関しては形態や生残率を指標として試行錯誤的に問題解決の試みが行われており、部分的には若干の原因の抽出を行うに至っているが、根本的な解決までの道程はなお遠い。マダイの生理生態に基づいた“魚の健全さ”の概念の混乱と、複合的要因解析の不充分さが残っていると考えられる。

マダイ種苗生産期の餌料は生物餌料（ワムシ、橈脚類等）に限られていたが、大量生産規模ではこれら餌料を十分に確保することが困難なため、酵母類を餌料としたワムシの生産方式が考えられた。しかし、この酵母培養ワムシで飼育したマダイは虚弱であり（伏見1975）、生残率が低下することが報告され、この原因が高度不飽和脂肪酸の欠乏によることが指摘された（米・藤井1975a, 米・藤井1975b）。マダイの場合、摂餌性や消化能力等（池田1977）から従来より配合飼料使用の可能性が言われており、稚仔魚期から成魚に至るまでの配合飼料研究が集中的に行われている（米ら 1971a, b, 竹田・米 1971, 古市ら 1971a, b, c）。これら飼料研究の場合にも、飼料効果の判定はマダイの成長量および“健全性”によって行わざるを得ない。

また、マダイの増養殖技術は沿岸浅海域を利用しているため、生息環境要因の変動が大きく、同時に集約的飼育方法を採ることに由来する水質環境汚染問題や疾病問題が起ってくることが多い。人為管理下におけるマダイが外部環境要因の変動や異常にどのように反応し適応しているかを知ることは、魚の“健全さ”を知ることと同質の問題と考えられ、これらの知見は増養殖技術の基礎として欠くことができない。

また、養殖魚の疾病に関しては、近年特に各種の問題が多発している。マダイもその例外ではなく、各種の細菌性疾病、ウィルス性疾病、飼料性疾病等による被害が増加している（南西海区ブ



ロック会議魚貝類研究会魚病班1980)。この養殖魚の疾病被害の軽減のためには、多大の努力が払われているが、共通した認識としては、魚病対策としては治療よりも予防に重点を置く必要があること、そのためには健全な魚を作る養殖技術の確立と病魚の早期発見が重要であることが指摘されている。そして、これら疾病の予防と診断のために、血液性状や成分の分析結果を、診断指標として用いようという研究も進められるようになった(池田1976, WEDEMEYER and YASUTAKE 1977, SMITH and RAMOS 1980)。

これら増養殖の現場や研究の場で直面する各種問題の根底にある魚の“健全性”をどのように規定するかは難しい問題であるが、「各種生物学的、非生物学的環境条件変化に幅広く適応できる能力」と考えることも出来る。

“適応”という概念は時間的経過で考えると大きく3区分できる。まず、数秒から数日にわたる急激な調節作用を必要とする適応、数時間から数カ月におよぶ順応を含む反応、数世代を超える進化の概念も含める適応といった概念である。マダイの増養殖生産に関連して魚の“健全性”を考える時に問題となるのは前二者の“適応”であり、特に、「生物は個体の維持、防護のために動員できるエネルギー量は種毎に一定の限度がある」(SELYE, 1950)という考え方を明確に含んでいる短時間の調節反応は、ストレス反応と呼ばれ、最近、水産分野でも注目されるようになった。それは、種苗放流や移殖される生物の“健全性”が直接、その後の効果を大きく左右することが明らかになってきたためである(WEDEMEYER et al. 1980)。このために、いわゆる負荷試験を行い、その反応性によって対象グループの“健全性”、いかえれば適応能力を判断しようという試みが行われるようになった(WEDEMEYER and MCLEAY 1981, 藤谷ら1972)。

このように技術として魚の臨床診断の体系化の研究が行われ、その中で魚の反応性が問われるに至っているにもかかわらず、魚についての明確なストレス反応に関する研究は少ない。魚に与えられる各種の刺激(ストレッサー)とそれに対する生物の生理学的反応を把握しようとする研究は多いが、ストレス反応として明確に位置づけ考察している例は少ない。

本研究では、マダイを用いて、魚におけるストレッサー・ストレス反応の一端を明らかにするための実験を行った。

まず、第Ⅰ章では、魚におけるストレス反応を血液性状、成分ではどのような症状として把握できるかを知るために、一連の環境要因の急激な変化をストレッサーとした時の血液性状の変動を明らかにし、それらを総合した生理学的状態を分類した。第Ⅱ章では、ストレス反応時の物質代謝系の機構を明らかにするために、摘出組織標本を用いてホルモンによる物質代謝制御に関する実験を行った。第Ⅲ章では、第Ⅰ章、第Ⅱ章の結果をふまえ魚類のストレッサーとストレス反応の関係を考察した。本研究が、種々な条件下の魚の生理学的状態を考える時の一助ともなれば幸である。

## 第 I 章 血液性状にみられるストレス反応

## 第 1 節 材料と方法

## 1. 材 料

供試マダイ *Pagrus major* (TEMMINCK et SCHLEGEL) は原則として広島県沖美町の種苗生産業者によって種苗生産され、その後同養殖場で生鮮魚（イカナゴ、イワシ等）と粉末配合飼料との混合練餌やマダイ用配合飼料（ペレット）を与えられ飼育された一年魚を用いた。養殖場から船で輸送された供試魚は、屋外の 2 トンコンクリート水槽に収容し、飼料として、マダイ用配合飼料、カキ、イカナゴ等を 1 日に 2 回与え、実験開始までストックした。この期間は実験群毎に異なったが、1 週間から 1 カ月の範囲であった。

実験に先立って必要尾数を水槽室内に設置した実験水槽に収容し、少なくとも 5 日間はこの実験系に慣らした。

## 2. 実験装置

この実験系は原則として Fig. 1 に示したものをを用いた。Fig. 1 中、A, B, D, E 水槽は 0.3

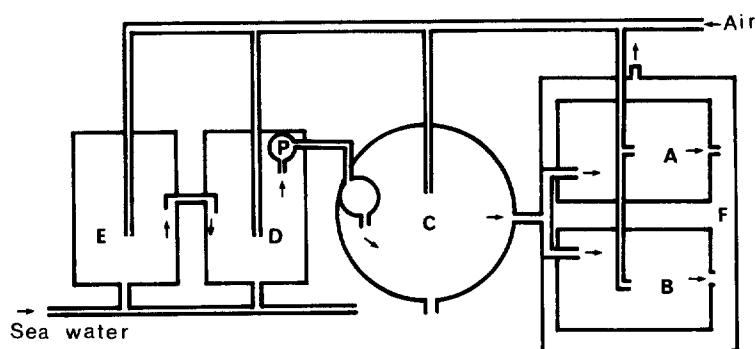


Fig. 1. Diagram of apparatus system used to study stress responses in the marine fish.

P; pump A, B; Experimental tank D, E; Control tank

C; Tank for preparing stressor sea water ↑; Rout of sea water flow.

トン (0.5×0.95×0.65m) のポリカーボネイト角型タンクで、A, B は実験水槽（ストレスを与えるための水槽）、E, D は対照水槽（同一水系でストレスを与えない対照魚を収容する水槽）とした。C は 0.5 トンの円型タンクで、この水槽でストレスとなる海水の条件、水温、塩分、酸素濃度を調整し、この条件の水がサイフォンで実験水槽 A, B に流入する。目的とする実験条件以外の要因の混入はさけるように努めた。この水はさらに外側の水槽 F に導びかれこれよりオーバーフローで排出した。それぞれの実験条件は各実験項目で述べる。

実験水槽には 15 尾以上の魚の収容をさけ、サンプリングは可能な限り静かに行った。

## 3. 採血方法と分析方法

実験開始後は、適当な時間毎にマダイをとり上げ、麻酔をせずに直接キュービエ氏管より、1/2

針付シリンジで採血し、一部は直ちに抗凝固剤の粉末ヘパリン酸ソーダを加え、ヘマトクリット、ヘモグロビン、血漿屈折率等の測定に供した。他は直ちにプラスチック遠沈管にとり、すぐに冷蔵庫内に放置し、1時間後に遠心分離により血清を得た。この血清は分析に供するまで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。

ヘモグロビン量は A. O. 社製のヘモメーターにより (松里, 北島1972)、一部はシアノメトヘモグロビン法による試薬キットを用いて測定した。一つの実験には同一方法を用いた。

ヘマトクリット値はマイクロヘマトクリット法により、全血を12,000r.p.m. で5分間遠心分離して求めた。

血清について蛋白質量はマイクロビュレット法により、グルコース量は酵素法 (丹羽他1966) により、クロライド量は シャールス・シャールス変法 (馬場, 奥田1973) により、それぞれ SPINCO の超微量分析装置を用いて分析した。ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム量は原子吸光法により、またコーチゾール量は、マダイの血清中の主要コルチコステロイドがコーチゾールであることを薄層クロマトグラフで確認した後、Amersham 社 RIA キットを用い RIA 法 (RUDER et al. 1972) によって求めた。その結果は石岡・石岡 (1978) の方法により計算し血清中含有量を算出した。

## 第2節 温度変化と血液性状変化

マダイの棲息域は北海道南部から本州全体にかけて分布し、さらに南支那海に至っており、温度適応範囲はかなり広いものと考えられている。しかし温度要因とマダイの生理・生態学的諸性質との関係についての報告例は少なく、梶山・西岡 (1930)、APOSTOLOPOULOS (1976) の稚仔魚飼育時の実験例がみられるのみであった。最近、マダイ養殖が広く行われるようになると、冬期の温度条件が生残、成長に大きな影響を持つことが知られるようになった。山口 (1978) はマダイ養殖適地条件として冬期の水温低下状況が重要であることを指摘しており、坂口・浜口 (1979) はマダイで冬期から春期にかけてみられる緑肝症が冬期の低水温と関係が深いことを報告している。

ここでは、温度の上昇、下降をストレッサーとした時のマダイの血液性状の変化を明らかにすることとした。

マダイは通常の養魚飼育条件下で起こっている程度の水温変動には容易に順応できると考えられるので、設定温度と温度変化速度はマダイの生理学的恒常性を乱す大きさのものとし、温度上昇刺激実験を4回、温度低下刺激実験を2回それぞれ行った。

### 1. 実験条件

実験条件の概要を Table 1 に示した。この温度変化刺激実験では実験系への順化期間には生カキ等を1日に2回程度投与したが、実験開始2日前から実験中は投餌を行わなかった。

Fig. 1 に示したストレッサー調整水槽 C で、所定の水温の海水を用意した。温度を上昇させる場合はチタン製 1kw 投込みヒーター2本と 1kw および 500w のプレートヒーターを組み合わせて C 水槽に設置した。温度調節のセンサー部分を実験水槽 (A, B) に設置した。温度分布

Table 1. Summary of experiments on the hematological changes in the red sea bream stressed by temperature changes (mean±s. d.).

Experiment number	I	II	III	IV	V	VI
Date of experiment	May 1977	May 1977	June 1977	July 1978	June 1977	July 1978
No. of the fish	25	20	20	40	30	40
Body length(cm)	12.3±0.75	12.5±0.63	11.9±0.55	14.2±0.85	11.3±0.86	14.7±0.89
Body weight(g)	59.7±9.61	61.1±9.66	53.3±5.80	98.7±14.4	49.8±12.5	108.9±17.8
Experimental tank	A,B	C	A,B	A,B	A,B	A,B
Water flow system	Running	Still	Still	Running	Running	Running
Acclimation period (day)	7	7	7	10	7	7
Acclimation temperature(°C)	16.5-18.0	18.0-18.5	18.0-19.0	22.5-26.5	18.0-19.5	24.0-26.0
Attained temperature(°C)	25.8	30.2	30.1	30.9	7.8	11.1

を均一にするためにエアレーションによる攪拌を十分に行った。温度を低下させる場合には、あらかじめ凍結しておいた海水を調整水槽 C に投入することによって達成した。予備実験で、実験水槽 A, B にサリノメーターを設置しモニターした例では、氷投入時の塩分変化は0.5‰程度であった。この場合にも温度均一化と酸素補給のためエアレーションは調整水槽 C と実験水槽のサイフォン管設置部分で十分に行った。水温の測定は A, B, 水槽の排水口で行った。

これら実験の温度変化状況を Fig. 2 に示した。

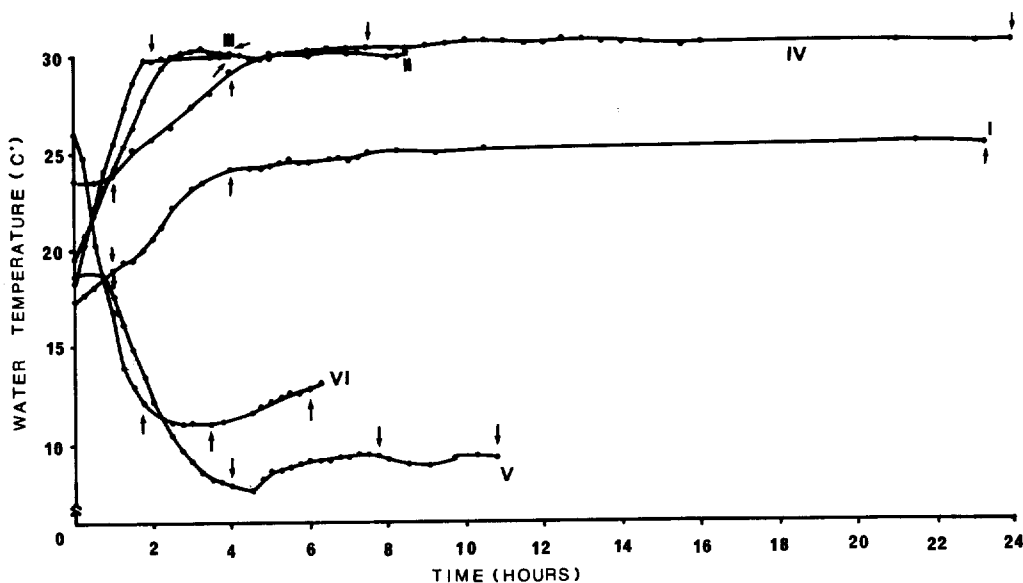


Fig. 2. The changes of water temperature during experiments.  
I-VI; Experiment number    Arrows; Sampling time.

## 2. 実験結果

### 1) 一般的観察

実験 I では約17°Cから4時間かけて約24°Cにまで水温上昇を行い、その後25°C前後に、水温を

20時間にわたって維持したが、全実験期間中、魚の異常行動は認められなかった。

実験Ⅱでは19℃から約2時間で30℃に水温を上昇させたが、温度上昇開始後15分ころから魚の遊泳速度はやや早くなり、25分後には水面に浮上してきて、鼻上げ状態を示す魚が数尾認められた。4時間後には衰弱したようにみえる魚が多く、5尾は横転しており3尾生残した。7時間後にはその3尾中の1尾が飛び出し、8時間後には2尾のみ生残していたのでこれから採血した。

実験Ⅲの場合には水温変化は実験Ⅱとほぼ同様であり、魚にも実験Ⅱの場合と同様な行動異常が認められ、実験開始後2時間して、1尾、4時間後にはさらに1尾が斃死した。

実験Ⅳの場合には24℃から5時間で30℃にまで水温を上昇させたが、魚には特別な異常行動は認められなかった。

実験Ⅰ、Ⅳの場合は最終温度は異なるが、温度上昇速度は類似しており、その温度上昇速度(℃/h)は実験Ⅱ、Ⅲの場合よりも緩やかであった。実験Ⅱ、Ⅲの温度条件はよく似ており、魚の行動や斃死状況からみると、温度上昇速度が急激で順応できない状態に魚がおかれたものと考えられた。

実験Ⅴでは19℃から4時間で約8℃まで水温を低下させた。実験開始1時間後にはいわゆる鼻上げ症状を示す個体が認められ、4時間後には1尾が斃死した。その後、魚の動きはにぶくなり、7時間目以後(約9℃)は、ほとんどの魚は底面に静止して動かない状態であったが、横転した個体はみられなかった。

実験Ⅵでは25℃から約2時間で11℃まで水温低下させたが、実験開始後30分頃から行動異常魚が認められ、1時間後には、実験Ⅴの場合と同様、鼻上げ症状を示す個体が認められた。2時間後からは横転する個体がみられ、3時間半後にはほとんどの魚が横転していた。この実験ⅤとⅥの温度低下条件は上述の行動から、マダイにとって十分には順応しきれない温度降下速度であると判断された。

## 2) 血液性状

血液性状分析結果を Table 2, Table 3 に示した。ヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量の経時的变化を Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 に示した。

ヘモグロビン量：水温上昇はマダイの血液ヘモグロビン量を一過性に増加させる傾向があった (Table 2)。全体的にみるとヘモグロビン量は実験開始後徐々に増加し始め、4時間から7時間の間に最高値に達し、その後は減少するという共通の傾向がみられた。実験Ⅰでは温度上昇がゆるやかであり温度差は約8℃で到達温度を25℃前後としたため、統計的有意な変化は現われなかったと考えられる。実験Ⅲではヘモグロビン量の増加の傾向が認められたが、個体差が大きく統計的有意差を示さなかった。実験Ⅳの結果とも考えあわせると、もう少し長時間観察すればヘモグロビン量の増加が認められたかもしれない。

温度低下刺激の場合 (Table 3) には、ヘモグロビン量は一時的に減少する傾向があった。実験Ⅴの7.5～8時間後と実験Ⅵの6.25時間後に有意差のある値が認められた。

ヘマトクリット値：温度上昇 (Fig. 3) に対して、実験ⅡとⅣで実験開始後4時間で有意に高い値が認められた。ヘマトクリット値の変化の時間的経過はヘモグロビンのそれとほとんど同様

Table 2. Variations in hematological and serum characteristics of the red sea bream under thermal stress (mean  $\pm$  s.e. with number of fish in parenthesis). Experiment number is corresponding to that of Table 1.

Experiment Time (h)	Hemoglobin (g/dl)	Protein (g/dl)	Chloride (mEq)	Potassium (mEq)	Magnesium (mEq)	Calcium (mEq)	Cortisol (ng/ml)	Cluster**
<b>I</b>								
0 (Control)	6.3 $\pm$ 0.39 (5)	2.89 $\pm$ 0.07 (5)	170.9 $\pm$ 1.25 (5)	7.78 $\pm$ 0.73 (5)	1.40 $\pm$ 0.10 (4)	7.01 $\pm$ 0.17 (4)	27.3 $\pm$ 23.67 (5)	
1	5.9 $\pm$ 0.37 (5)	3.04 $\pm$ 0.15 (5)	175.2 $\pm$ 2.07 (5)	8.12 $\pm$ 0.78 (5)	1.36 $\pm$ 0.05 (5)	6.66 $\pm$ 0.12 (5)	22.1 $\pm$ 21.76 (5)	1
4	6.6 $\pm$ 0.21 (5)	3.27 $\pm$ 0.17 (5)	179.6 $\pm$ 2.81* (4)	7.70 $\pm$ 0.76 (5)	1.47 $\pm$ 0.09 (2)	7.02 $\pm$ 0.13 (2)	2.80 $\pm$ 2.80 (5)	2
24	6.0 $\pm$ 0.45 (7)	3.60 $\pm$ 0.13* (7)	178.4 $\pm$ 1.60* (7)	5.51 $\pm$ 1.16 (7)	1.80 $\pm$ 0.15 (4)	7.92 $\pm$ 0.40 (4)	11.8 $\pm$ 8.73 (6)	3
<b>II</b>								
0 (Control)	4.7 $\pm$ 0.46 (5)	2.48 $\pm$ 0.19 (4)	170.2 $\pm$ 3.74 (5)	6.25 $\pm$ 0.58 (3)	1.74 $\pm$ 0.37 (3)	6.13 $\pm$ 0.29 (3)	91.6 $\pm$ 45.57 (4)	
1	5.9 $\pm$ 0.39 (5)	3.12 $\pm$ 0.09* (5)	170.2 $\pm$ 1.43 (5)	7.16 $\pm$ 0.69 (5)	1.36 $\pm$ 0.07 (4)	7.13 $\pm$ 0.18* (4)	65.9 $\pm$ 26.30 (5)	4
4	7.9 $\pm$ 0.49* (6)	3.83 $\pm$ 0.19* (6)	184.8 $\pm$ 3.10* (6)	12.72 $\pm$ 2.53 (5)	3.43 $\pm$ 0.24* (2)	8.13 $\pm$ 0.30* (2)	46.8 $\pm$ 16.68 (6)	5
8.5	5.3 $\pm$ 1.25 (2)	2.68 (1)	178.0 $\pm$ 1.07 (2)	4.96 (1)	1.73 (1)	6.98 (1)	53.5 $\pm$ 1.30 (2)	6
<b>III</b>								
0 (Control)	6.2 $\pm$ 0.45 (5)	3.28 $\pm$ 0.19 (5)	167.7 $\pm$ 1.89 (5)	5.15 $\pm$ 0.94 (5)	1.79 (1)	7.65 (1)	2.0 $\pm$ 1.38 (5)	
2	6.4 (1)	2.74 (1)	173.7 (1)	2.87 (1)	—	—	47.5 (1)	
4	6.9 $\pm$ 0.20 (3)	3.45 $\pm$ 0.08 (9)	171.3 $\pm$ 1.14 (9)	4.03 $\pm$ 0.28 (8)	1.61 $\pm$ 0.01 (2)	7.41 $\pm$ 0.15 (2)	26.4 $\pm$ 5.10* (8)	7
<b>IV</b>								
0 (Control)	6.3 $\pm$ 0.44 (10)	3.05 $\pm$ 0.11 (10)	158.2 $\pm$ 3.56 (10)	4.81 $\pm$ 0.46 (10)	1.72 $\pm$ 0.07 (8)	6.87 $\pm$ 0.28 (8)	3.2 $\pm$ 1.97 (5)	
4	7.6 $\pm$ 0.25* (10)	3.24 $\pm$ 0.15* (10)	169.2 $\pm$ 3.94 (10)	4.49 $\pm$ 0.35 (10)	1.98 $\pm$ 0.11 (8)	7.46 $\pm$ 0.15 (8)	20.5 $\pm$ 7.09* (5)	8
7.5	7.8 $\pm$ 0.35* (10)	3.37 $\pm$ 0.17 (10)	162.4 $\pm$ 5.83 (9)	4.41 $\pm$ 0.70 (8)	2.18 $\pm$ 0.12 (4)	7.81 $\pm$ 0.18 (4)	23.4 $\pm$ 11.58 (5)	9
24	7.1 $\pm$ 0.26 (10)	3.16 $\pm$ 0.05 (9)	156.9 $\pm$ 5.46 (9)	3.76 $\pm$ 0.58 (8)	2.03 $\pm$ 0.04 (6)	6.77 $\pm$ 0.17 (6)	24.3 $\pm$ 7.03* (5)	10

\*; significantly different from control values ( $p \leq 0.05$ ).

\*\*; Cluster number (See Fig. 6).

であった。実験Ⅳの結果から30℃前後になってもマダイが温度に順応し生残しえた場合には時間と共に対照の値に復帰する傾向がみられた。

温度低下に対して、実験Ⅴでは特に顕著な変動は認められなかったが、実験Ⅵでは1.75時間と6.25時間にヘマトクリット値の有意な減少が認められた。この実験Ⅵで興味深いのはヘマトクリット値の増加と減少が交互に大きく起こっている点で、この傾向もヘモグロビン量の変動と並行していた。

蛋白質量：温度上昇による値の変動は小さいが、有意な増加が認められた。その変化は、多少のズレはあるものの、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の増加と同じ時間に起った。実験Ⅰの24時間後の蛋白質量は有意な増加を示した。

温度低下に対しては血清蛋白質量の減少の傾向があり、実験Ⅴ、Ⅵで有意差が認められた。全

マダイのストレス反応

Table 3. Variations in hematological and serum characteristics of the red sea bream under cold stress (mean±s.e. with number of fish in parenthesis).

Experiment Time(h)	Hemoglobin (g/dl)	Protein (g/dl)	Chloride (mEq)	Potassium (mEq)	Magnesium (mEq)	Calcium (mEq)	Cortisol (ng/ml)	Cluster number
<b>V</b> 0 (Control)	6.5±0.28 (5)	2.86±0.12 (5)	161.0±0.80 (5)	8.28±0.40 (5)	1.47 (1)	6.94 (1)	16.4±7.78 (5)	
1	5.6±0.64 (5)	3.04±0.27 (5)	160.6±7.06 (5)	5.82±0.56* (5)	1.52 (1)	6.77 (1)	43.4±23.15 (5)	11
4	5.9±0.45 (5)	2.88±0.12 (5)	158.2±0.75* (5)	1.20±0.27* (5)	2.02 (1)	6.88 (1)	203.8±45.60* (5)	12
8	5.0±0.40* (5)	2.46±0.10* (5)	157.0±1.02* (5)	4.71±0.41* (5)	1.66±0.19 (2)	6.75±0.30 (2)	97.6±42.59 (5)	13
11	5.4±0.57 (4)	2.97±0.14 (4)	161.3±1.89 (4)	3.36±0.53* (3)	3.55±1.44 (2)	7.52±0.49 (2)	51.3±15.97 (4)	14
<b>VI</b> 0 (Control)	7.0±0.51 (5)	3.03±0.09 (5)	178.0±5.22 (5)	4.50±0.29 (5)	1.81±0.06 (3)	5.99±0.09 (3)	t** (2)	
1.75	6.1±0.24 (10)	2.52±0.09* (10)	171.2±2.59 (10)	3.90±0.21 (10)	1.83±0.03 (8)	5.56±0.15 (8)	62.4±19.06* (5)	15
3.5	6.0±0.55 (7)	3.39±0.25 (6)	185.7±3.10 (7)	5.38±0.50 (4)	2.72±0.01* (2)	5.87±0.35 (2)	129.9±35.68* (4)	16
6.25	5.7±0.31* (9)	2.43±0.11* (9)	176.0±2.98 (9)	3.07±0.42* (7)	3.15±0.22* (6)	6.18±0.36 (6)	111.5±39.20* (4)	17

Cluster number ; See Fig. 6.

\* ; Significantly different from control values ( $p \leq 0.05$ ).

\*\* ; undetectable.

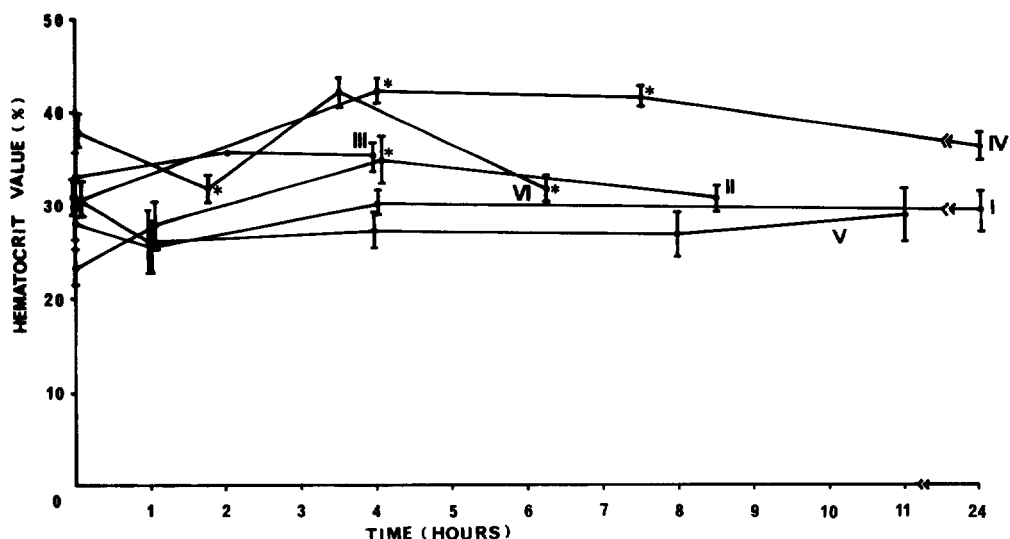


Fig. 3. Variations of hematocrit values in red sea breams under the experiments on water temperature changes (mean±s.e.).

I - VI ; Experiment number.

\* ; Significantly different from O-hour control level at the 95% level by analysis of variance.

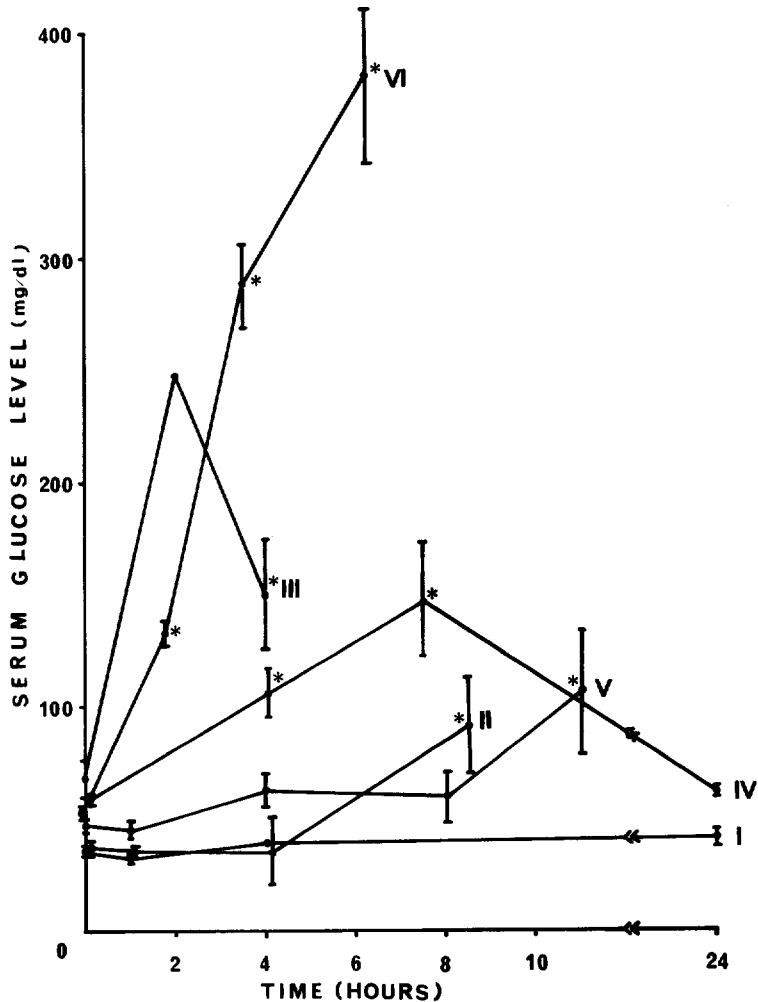


Fig. 4. Variations of serum glucose levels in red sea breams stressed by changes of water temperature. Symbols and the number are the same as those in Fig. 3.

般的にみるとヘモグロビン量やヘマトクリット値の変動と類似していた。

グルコース量：温度上昇の場合 (Fig. 4), グルコース量の増加が認められた。実験 I のような最終温度や温度上昇速度では, グルコース量の増加はみられなかった。実験 II の 4 時間目のグルコース量の平均は対照値と変らない値を示したが, 標準誤差の大きさからも推察できるように, 低値と高値の混合から成っていることからみて有意な高血糖は 4 時間頃から起きていることがわかる。温度上昇速度の大きい実験 III, VI では速かで著しい血糖増加が認められた。

温度低下の場合 (Fig. 4) にもグルコース量は明らかに増加した。実験 V では 11 時間でピークを示した。

実験 VI では 6 時間までの観察なので, この後どのような経過をとるかはわからないが, ピークに達した後低下するであろう。温度変化によって血糖値は増加するが, 温度変化の条件や魚の状



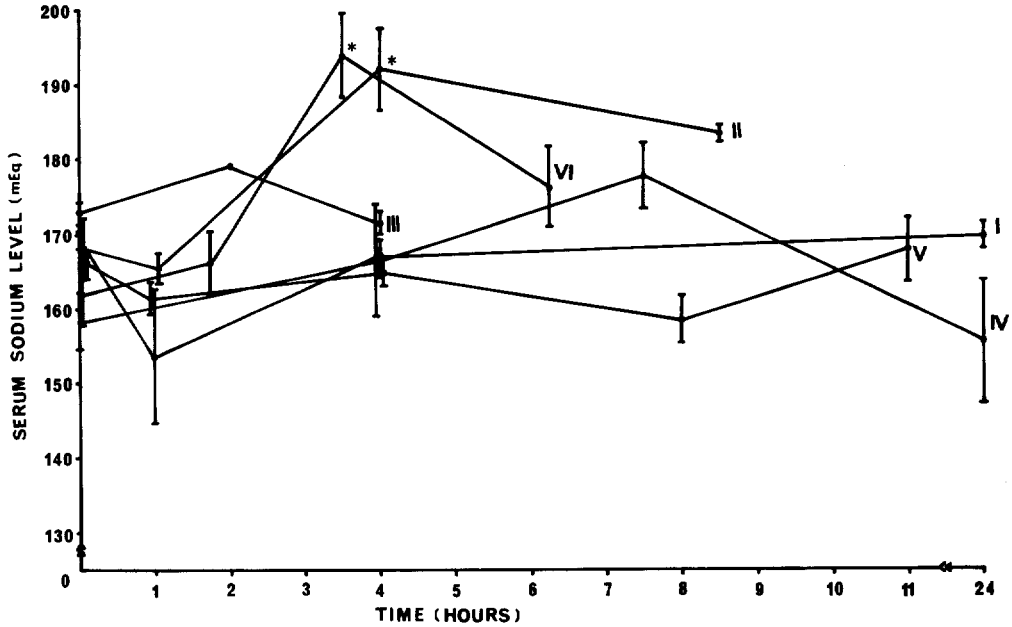


Fig. 5. Variations of serum sodium levels in red sea breams stressed by changes of water temperature. Symbols and the number are the same as those in Fig. 3.

態によってグルコース量増加速度や変化の大きさに差がみられた。

クロライド量：温度上昇の場合には (Table 2) クロライド量は増加する傾向がみられた。この変化は比較的ゆるやかで、実験 I と II で 4 時間目に有意差を示した。温度低下 (Table 3) に対してはクロライド量の減少が認められる場合 (実験 V) と有意な変動が認められない場合 (実験 VI) とがあった。

ナトリウム量：温度上昇に対してはナトリウム量の増加が認められる時点があり (Fig. 5), クロライド量とほぼ同様な傾向を示した。増加時期が実験開始後 4 時間目から 7~8 時間目にあることもクロライド量の変化の場合と同様であった。実験 I では 1 時間後に平均値は低下したが個体差が大きく有意な変動は認められなかった。

温度低下に対して、実験 V ではナトリウム量の変動は小さく、有意な変動は認められなかったが、実験 VI では 3.5 時間目に有意の増加が認められた。

クロライド量とナトリウム量の変動の傾向は基本的にはほぼ同じであり、温度上昇刺激に対しては一過性の増加の方向が顕著であるが、温度低下刺激に対しては一過性の減少がみられる場合と一過性の増加が認められる場合があり現象は複雑であった。

カリウム量：温度上昇に対しては個体差が非常に大きく、カリウム量の変動傾向は明らかでなかった。温度低下刺激に対しては、実験 V と VI でカリウム量の有意な減少が認められた。

マグネシウム量とカルシウム量：これら二価のイオンは個体差は比較的少なく、安定しており、大きな変動を示さなかった。温度上昇に対しては実験 II でマグネシウムとカルシウム量の増加が、温度低下に対しては実験 VI でマグネシウム量の増加が認められた。

コーチゾール量：温度上昇に対して実験ⅢとⅣで対照値に対して有意な増加が認められた。実験ⅠとⅡでは、対照値が相対的に高かったためか有意差は認められなかった。温度上昇に対してコーチゾール量は増加する傾向はあるが、増加量そのものはそれほど大きくはなかった。

温度低下に対しては、実験ⅤとⅥともに実験開始後3.5時間から4時間で極端に高い値が認められた。

### 3. 考 察

温度の血液学的影響に関する報告例は比較的多い。中でも、種々な温度に十分に順応させた場合の血液性状についての報告が多く、温度変化直後からの、動的な過渡現象、更にいえばストレス反応としてのとらえ方での実験例は決して多くはない。

#### 1) 温度順応の影響

種々な温度に十分に順化させたとする魚の血液性状に関する研究のうち、特に高温順応時には酸素利用能との関連での報告がみられる。NEAL et al. (1977) は低温生息魚の horn shark を25℃に順化した時にヘモグロビン量、ヘマトクリット値、MCV、MCHが増加すると報告し、HOUSTON and DEWILDE (1969) はカワマス的高温順化で赤血球数、ヘマトクリット値が増加するとし、キンギョやニジマスでもヘモグロビン量は増加するとしている (HOUSTON and CYR 1974)。また CAMERON (1970) は pinfish (*Lagodon rhomboides*) や striped mullet (*Mugil cephalus*) でヘモグロビン量、ヘマトクリット値の増加を、Farghaly et al. (1973) はティラピアで赤血球数とヘモグロビン量の増加を報告している。

血中電解質についての報告もみられ、UMMINGER and GIST (1973) はキンギョを高水温(32℃)に順応させた時の取り扱い、コーチゾールやアルドステロン注射の影響をみたが、対照値との比較で血中クロライド、ナトリウム、グルコース量や体水分量には差がみられないとしている。一方、STANLEY and COLBY (1971) は海水、淡水それぞれに順化した *Alosa pseudoharengus* で血中ナトリウムは30℃以上の場合に増加し、淡水順化魚では特に血中カルシウム量が増加したと報告している。HOUSTON and MADDEN (1968) はコイを33℃に順化した場合、血中ナトリウム量は減少し、クロライド量は増加するとしている。

これら高温順応後の魚の血液性状や血中電解質量の変動に関しては結果は一致しておらずその理由は魚種、実験方法、分析方法等の相違のためと考えられるが、本研究の実験結果にもみられるように経時的な変動が大きいのでサンプリング時期の相違もこれら結果の不一致の要因となっていると考えられる。

これに対して低温度条件に順応した場合の魚の血液性状は比較的まとまっている。ヘモグロビン量やヘマトクリット値についての報告は少ないが血清グルコース量の増加を NACE and SCHUH (1961)、UMMINGER (1969b) が海産魚 *Opsanus tau* や海水順化した *Fundulus heteroclitus* について報告しており、総コレステロール値や総脂質量の増加等も報告されている。また血清無機成分の変動については、HOUSTON and MADDEN (1968) がコイで、UMMINGER (1969a, 1970, 1971) は海水順化した *Fundulus heteroclitus* や *Ictalurus nebulosus* や *Pseudopleuronectes americanus* で、また ALLANSON et al. (1971) はティラピアで、STANLEY and COLBY (1971) は *Alosa*

*pseudoharengus* で、PROSSER et al. (1970) はキンギョで、それぞれナトリウム、カリウム、カルシウム、クロライド、磷酸塩等の量の変動についての記載をしている。このように、血中無機塩量が低水温順応で変動することは報告が多いが、その変動の方向は減少するという結果と増加するという結果の相反するものが出されている。これは LOVE (1980) が総括しているように主に淡水性か海水性かによるらしい。

## 2) 温度変動の影響

温度刺激対応反応としてストレス反応を血液学的レベルでとらえた例もいくらかみられる。HEINICKE and HOUSTON (1965) は20℃に順化したキンギョを36~38℃のタンクに移しその後経時的に採血し血中クロライド量を測定し、10分後のその顕著な減少を報告している。WEDEMEYER (1973) は、10℃に順化した steelhead trout や coho salmon で、飼育水を3分以内に20℃に上昇させ、その後の血液性状を測定しており、魚種によって若干の差はあるとしても、1時間から5時間の間のグルコース量の増加と1時間後からのヘモグロビン量の増加を認め、しかもこれらは一過性の反応であることを示している。FRYER (1975) はキンギョで特に血中コーチゾール値に注目し、20℃から35℃の飼育水に10分間入れるという温度ストレスで血中コーチゾール量が顕著に増加することを報告している。この時のコーチゾール値は本実験で得られた値に近いことは興味深い。

温度低下に対してのストレス反応は比較的研究が多い。BALL and SLICHER (1962) や SLICHER et al. (1962) は *Mollienesia latipinna* で25℃の水槽からとり上げ、これを0~1℃の氷水中に移した後の白血球の変動を測定しており、1時間後に急激に減少した後に上昇するという結果を報告している。PICKFORD et al. (1974) も20℃海水へ順化した *Fundulus heteroclitus* を0℃の海水に3分間浸漬するという低温ショックを与えた後の赤血球数と白血球数を測定し、赤血球数はほとんど変動しないが、白血球数は分単位で変動することを報告している。これらの実験は実験条件から考えて、寒冷刺激と魚の取り扱いと空中曝露などの種々な刺激が混合しているようであり温度のみの影響ではないと思われる。しかし、いずれにしても白血球数が短時間内で増減両方向へ大きく変動している点はストレス反応と考えるとよいものと思える。しかし、血液性状の中のヘマトクリット値やヘモグロビン量に対して温度低下がどのように影響するかについての報告はない。

PICKFORD et al. (1974) は上記血球数の変動と同時に、2時間後にグルコース量の増加をも報告している。グルコース量に関しては、海産魚でも淡水魚でもストレス反応と極低温順化の場合で増加が認められている点は興味深い。HOUSTON (1962) は20~22℃に順化したキンギョを2.5~3.5℃の温度に急激に移行させた後の血中クロライド濃度を約17時間後まで経時的に追跡して測定し、直線的に減少したと報告している。

本実験結果から血液学的性状の全体の変化を整理すると、温度上昇刺激に対して共通して現われる変化はヘモグロビン量とヘマトクリット値の一過性の増加と、グルコース量やコーチゾール量の増加である。無機塩の変動に関しては個体差が大きいですが、大まかにみると増加傾向を示す。他方、温度低下刺激はヘモグロビン量やヘマトクリット値を低下させる方向に働く。グルコースと

コーチゾール量に関しては、温度上昇刺激と同様に、増加反応を惹き起こす。無機塩の変動は複雑でこれらの変動は一方向に向かうだけでなく、ドリフトするらしい。これは、温度低下刺激そのものは測定した血中成分を減少させる作用を持っているが、刺激の大きさに対応して起ったストレス反応が血球成分を増加させる方向に働くので結果として血液性状の流動的な変化として現われるためと考えられる。

これらの結果や諸報告から考えると、温度変化刺激は上昇の場合にも下降の場合にも、グルコース量増加とコーチゾール量の一過性の増加の共通の変化を起こしている。しかし、血清中無機塩の変動に関しては解釈はかなり難しい。無機塩類は血液と組織の間を移動し易いし、鰓を介して出入ししやすい。また水分についても同様である。血清中無機塩類は濃度の単位で測定されるから、水分の出入は濃度の変動を起こさせる。温度変化が体重の増減を起こすことから明らかなように、浸透圧調節の変調を起こすことは明らかである (RAFFY 1952)。したがって、温度上昇・下降の刺激はその変化の方向は異なっても血中無機塩の調節を乱す状態を作り出しているという点は共通している。

### 3) クラスタ分析

これら諸報告にあるそれぞれ単一の特性についての論議とは別に、マダイの生理学的変動を総合的に把握したいという観点から、各実験の時間毎のグループの血液性状の平均値の類似関係を明らかにすることとし、クラスタ分析を行った。

変数としては、本実験結果の変化の大きさや上述の諸報告の結果を参考として代謝系の変化指標としてグルコース量を、血球動態の指標としてヘマトクリット値を、浸透圧平衡動態の指標と

Table 4. Euclidean distances between clusters. The cluster number is shown in Tables 2 and 3. Euclidean distance =  $(1/10000) \cdot (\sum \alpha_i - \sum \beta_i)^2$

Cluster number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
2	225																
3	271	10															
4	141	21	23														
5	1476	582	498	709													
6	972	337	264	424	295												
7	1008	424	429	584	720	214											
8	1348	661	738	911	930	677	217										
9	1772	850	866	1121	706	473	170	123									
10	487	264	363	382	1134	741	359	266	626								
11	72	84	92	36	1004	523	628	1045	1288	414							
12	185	71	69	60	848	330	393	818	972	351	32						
13	91	121	147	92	1153	554	530	919	1186	318	23	30					
14	459	189	178	231	821	199	166	610	647	367	196	71	146				
15	614	276	291	369	912	268	70	383	444	261	341	177	244	41			
16	3130	1802	1737	2135	1020	796	643	791	296	1735	2356	1876	2261	1330	1116		
17	1654	1029	987	1181	1311	430	220	760	504	1023	1125	785	969	384	294	646	
18	227	15	35	49	679	329	323	556	752	186	83	47	83	122	176	1695	866

してナトリウム量を用いた。この3変数のうち、グルコース量は経験的に対数正規分布を示すことから(石岡・乾 1980)、この値を対数変換し、各変数とも全体の平均値と標準偏差により標準化した値を、有効数字が収まるように整数化した変換値を元データとし、ユークリッド距離を算出した。ユークリッド距離の二乗 ( $d_{\alpha\beta}^2$ ) の定義式は次の通りである(奥野・芳賀・久米・吉澤, 1972)。

$$d_{\alpha\beta}^2 = \sum_{i=1}^p (x_{\alpha i} - x_{\beta i})^2$$

n 個の個体の各々について p 種の特性が測定されている時、これを  $\{x_{\alpha i}\}$  ( $\alpha = 1, 2, \dots, n; i = 1, 2, \dots, p$ ) とする。 $\alpha$  番の個体と  $\beta$  番の個体の距離の定義の基本として各変数ごとの

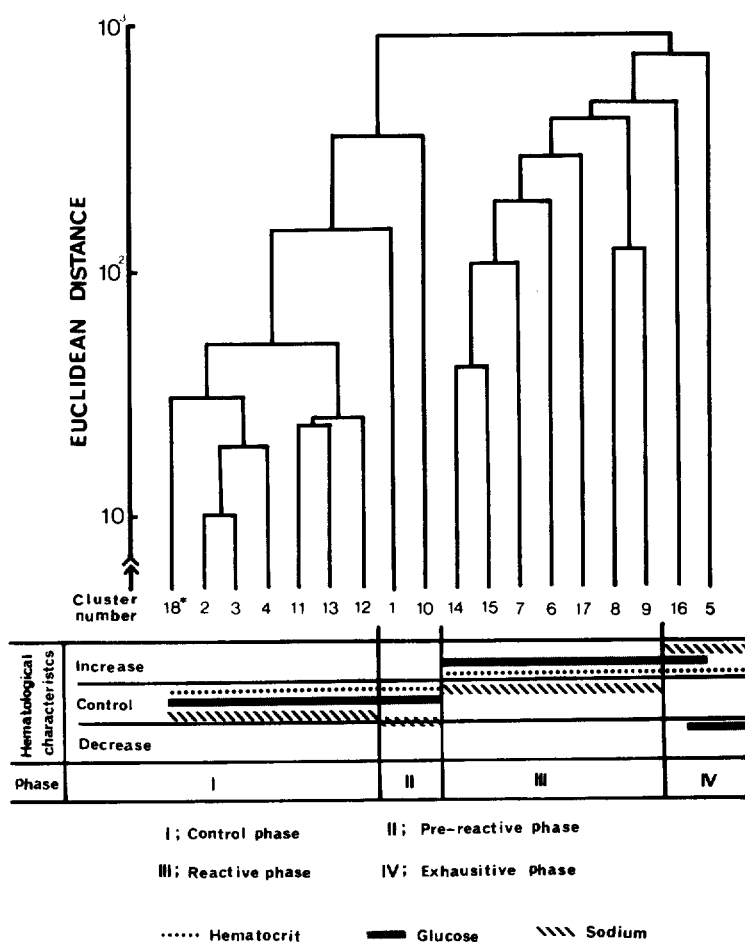


Fig. 6. Differentiation of hematological phases on stress responses of the fish under temperature changes by cluster analysis. Euclidean distance in each cluster was calculated from mean hematocrit value, serum glucose and sodium levels. The cluster number is shown in Tables 2 and 3. \*; Cluster number for mean values calculated from controls through all experiments.

差  $x_{ai} - x_{\beta i}$  が考えられる。なお、使用した計算機の記憶容量の関係から、 $da_{\beta}^2$  を 1/10,000 倍した値を用いて後の計算を行った。

各クラスターの融合は、各クラスターの中点をとる方式を採用した。計算はデスクトップ型コンピュータ (YHP30) を用いて行った。結果を Table 4, Fig. 6 に示した。

Fig. 6 に明らかなように、全体は大きく 2 区分に分かれ、さらにそれぞれを 2 区分するように分画した。この I, II, III, IV の相を元データで読みかえると、I は対照とほとんど差の認められないグループ、II は対照に近いが、ナトリウム量がやや低い点が共通しているグループ、III はヘマトクリット値とグルコース量が有意に高く、ナトリウム量もやや高いグループ、IV はナトリウム量が有意に高く、ヘマトクリット値もやや高いグループとなっている。これらから、I を対照相、II を前反応相、III を反応相、IV を疲弊相と仮に名付けた。時間的経過や刺激の強さとの対応でこれらの相をみると、前反応相は典型的な III の反応を起こす前の時間帯や回復時にみられ、反応相は刺激が非常に強い場合に典型的にみられ、疲弊相は魚の浸透圧平衡が乱され、外海水の影響を大きく受けている場合と考えられた。また、この疲弊相のクラスターでは斃死魚が出現している場合がある。

このクラスター分析の結果から、温度上昇、下降の急激な変化をストレスターとした時の血液性状の相を生理学的に無理のない妥当な範囲で大まかに分けることが可能のように思える。そして温度変化刺激によるストレス反応の進行につれてアマダイの血清ナトリウム量は増加の方向が著しくなり、これは海産魚の浸透圧失調状態の典型を示すものと考えられる。これにたいして、グルコース値は一旦上昇した後、疲弊状態に至って逆に低血糖になる点が興味深い。

### 第 3 節 塩分変化と血液性状変化

魚が飼育環境の塩分変化にどのように適応しているかは昔から重要な研究課題の 1 つであった。鰓、腎、消化管等の形態、機能変化 (板沢・早川 1972, JOZUKA 1966, OGURI 1960a, b)、イオンの能動輸送 (神谷 1975, POTTS et al 1967)、内分泌による適応機構 (内田 1974) 等広い範囲で研究されており、血液性状変化に関する報告も多い。

マダイは日本沿岸海域に広く棲息し、古くから、塩分耐性の強い魚であるとして知られているが生理学的観点からの研究は意外に少ない。

マダイと環境水の塩分との関係についての報告はいくつか公表されているが、塩分上昇時の知見はほとんどみられず、塩分低下に対する反応についての諸報告が多い。梶山ら (1928) は最初にマダイの種苗生産を試みた時にすでに比重で 1.0220~1.0261 の範囲であれば成長速度には差がないと報告し、マダイの塩分耐性能の大きいことを強調している。また APOSTOLOPOULOS (1976) もマダイふ化実験で温度と塩分の組合せの影響をみており、水温 19~25°C、塩分 17~35% (sal.) 範囲ではふ化率に異常は認められないとしている。板沢・早川 (1972) はマダイの浸透圧調節に関する実験を行い、稀釈海水へ移すと血清浸透圧は一時的に低下するが、数日すると回復し、この経過は腎機能の適応的变化と深い関係を持つとしている。

ここでは環境要因の一つである塩分の変化をストレスターとして与えた時のマダイの血液性状

に現われる変化の特徴を把握し、そのストレス状態についての解析を行うこととした。

1. 実験条件

実験条件の概要は Table 5 に示した。実験 I, II は塩分上昇実験であり、実験 III~VI は塩分低下実験である。Table 5 に示したように塩分上昇刺激を流水系で設定することは困難であったので止水系とし、粗製塩化ナトリウムを実験水槽に直接投入した。酸素補給と攪拌のためエアレーションは十分に行った。しかし実験 I と II は共に水槽底部には食塩が薄く堆積した状態で実験終了まで経過した。実験 II では対照区水槽 (D, E) に高塩分水が逆流し、塩分がやや上昇した

Table 5. Summary of experiments on the hematological changes in the red sea bream stressed by changes of environmental chlorinity (mean  $\pm$  s.d.).

Experiment number	I	II	III	IV	V	VI
Date of experiment	Oct. 1976	May 1978	July 1976	June 1978	Oct. 1976	July 1975
No. of the fish	10	40	28	40	10	30
Body length(cm)	16.3 $\pm$ 0.70	12.0 $\pm$ 0.17	14.6 $\pm$ 1.19	12.6 $\pm$ 1.09	16.6 $\pm$ 1.06	14.5 $\pm$ 0.54
Body weight(g)	157.3 $\pm$ 20.83	54.5 $\pm$ 10.82	108.4 $\pm$ 23.49	64.2 $\pm$ 16.13	166.0 $\pm$ 28.10	100.0 $\pm$ 20.90
Water flow system	Still	Still	Running	Running	Running	Still
Acclimation period (days)	4	7	30	10	14	0
Temperature( $^{\circ}$ C)	22	15.5-16.5	20.0-23.5	17.8-19.8	22.5	25.0
Acclimation chlorinity(‰)	16.5	17.5	16.5	17.8	16.5	—
Attained chlorinity(‰)	33.5	39.8	5.06	5.6	0.9	3.33

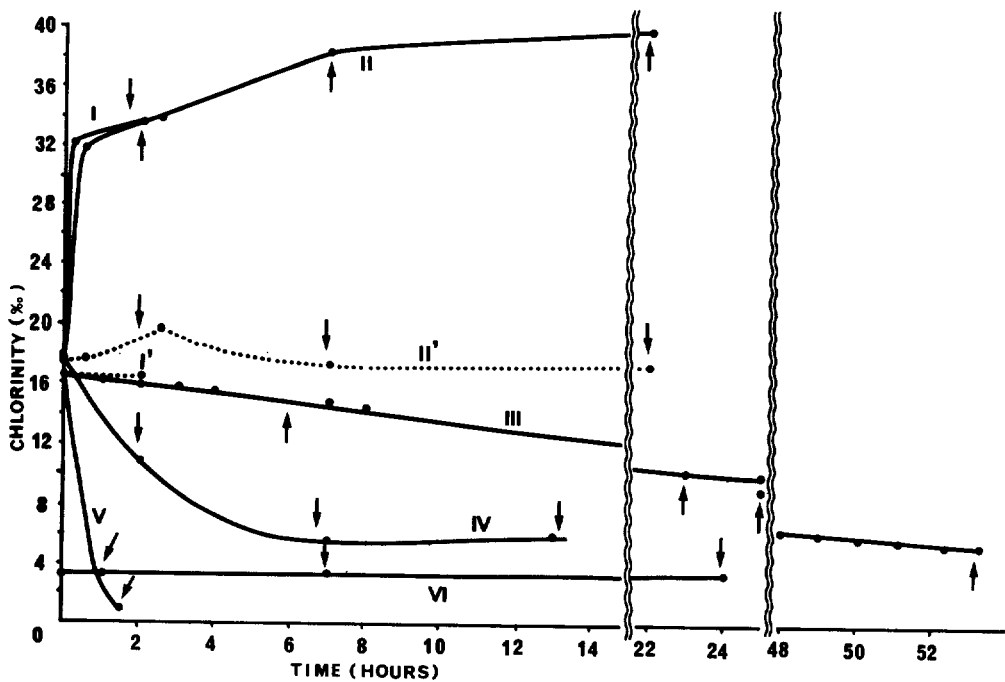


Fig. 7. Changes of water chlorinity during experiments. I-VI; Experiment number. I' and II'; Controls for experiment number I and II respectively. Arrows; Sampling time.

ので2時間後から約2時間流水系とした。その後塩分が対照値と同じ値になったことを確認した後に止水とした。このため Fig. 7 では特にこの実験の対照区水槽 (D, E) の塩分を示した。塩分低下刺激はストレッサー調整水槽 (C) に水道水を導入することによって達成したが、急激な条件変化設定の場合には水道水を直接実験水槽に導入した。

塩分変化の状況は水槽内に前もって設置したサイフォン管より経時的に採水し、通常の塩素量検定法により求めた。一方、実験水槽 (A, B) 内にはサリノメーター (オートラボ, ポータブル S—T 計602型) を沈めておき、塩分の変化状況をモニターした。塩分変化の状況は Fig. 7 に示した。

## 2. 実験結果

### 1) 一般的観察

実験Ⅰは急激な塩分上昇変化を与えた時のごく初期の反応をみるための実験として設定した。この時間範囲内では異常行動魚や斃死魚は認められなかった。

実験Ⅱは実験Ⅰと同じ条件で22時間後まで観察した。ここでは10時間以後20時間までの間に4尾が斃死した。

実験Ⅲでは塩分低下は極めてゆるやかに行われ、異常行動魚も斃死魚も全く認められなかった。

実験Ⅳでは塩分低下をより急速に行ったもので、実験開始後30分で水槽上層部を急速に遊泳する異常行動魚が3尾認められ、約5時間後には体色が黒っぽくなり底層でじっとしている個体が数尾観察された。9.5時間後には横転魚が認められ、10時間後には1尾が斃死した。13時間後に残存魚全部をとり上げた。

実験Ⅴではさらに急激な塩分低下の場合の初期の反応をとらえようとしたものであり、異常行動魚や斃死魚は認められなかった。採集した血液は著しく溶血していたので、測定値は溶血の影響を大きくうけていると考えられた。

実験Ⅵは極端に稀釈された飼育水中に置いた魚の状態をみるために設定したもので、順応海水から直接稀釈水中に移した。1時間後には遊泳がやや早い程度であったが、7時間後には斃死魚が出はじめ、明らかな異常遊泳魚が認められた。24時間後に辛うじて生残した個体3尾は横転しており、眼球は、水晶体中心部を除いて白濁していた。

これらの観察から実験Ⅲ以外は塩分の変化速度と最終塩分はマダイにとって致命的な条件であると判断された。

### 2) 血液性状

血液性状変化を Tables 6, 7, Figs. 8~10 に示した。

ヘモグロビン量：塩分上昇を行った実験ⅠとⅡで異なる結果を得た。実験Ⅰでは1.5時間後にヘモグロビン量の有意な減少を実験Ⅱでは2時間後に有意な増加を示した。塩分低下時には、全実験で初期にはヘモグロビン量の変動は認められなかったが、実験Ⅳで13.3時間後に対照区より有意な増加が認められた。ヘモグロビン量は各実験とも個体差が大きく、本実験からは塩分変動とヘモグロビン量の変動の間に一定の傾向を得ることはできなかった。

ヘマトクリット値：Fig. 8 に示したように、塩分上昇時には減少 (実験Ⅰ) と一時的な増加



マダイのストレス反応

Table 6. Variations of hematological and serum characteristics in the red sea bream under the increase of environmental chlorinity (mean±s.e.). Numbers and symbols are the same as those in Fig. 8.

Experiment Time (h)	Hemoglobin (g/dl)	Protein (g/dl)	Chloride (mEq)	Potassium (mEq)	Magnesium (mEq)	Calcium (mEq)	Cortisol (ng/ml)	Cluster number
I 0 (Control)	8.5±0.45 (6)	5.32±0.17 (6)	161.1±4.62 (6)	5.01±0.62 (6)	2.05±0.10 (5)	8.97±0.11 (5)	24.6±10.38 (2)	
1.5	6.9±0.32* (4)	3.71±0.13* (4)	179.0±1.18* (4)	4.02±0.28 (4)	2.09±0.03 (4)	7.61±0.13 (4)	142.5 (1)	1
II 0 (Control)	5.2±0.27 (9)	2.23±0.06 (8)	166.1±2.41 (8)	7.53±0.75 (10)	1.48±0.01 (5)	5.84±0.03 (5)	99.9±42.56 (5)	
2	6.0±0.27* (10)	2.30±0.05 (10)	182.7±8.35 (10)	8.15±0.87 (8)	1.54±0.06 (7)	6.15±0.15 (7)	7.6±4.97 (5)	2
7	4.8±0.31 (10)	2.08±0.07 (9)	184.7±3.18* (9)	5.12±0.50* (8)	1.87±0.15 (8)	6.12±0.33 (8)	171.5±20.28 (5)	3
24	6.2±0.59 (6)	2.14±0.09 (5)	233.7±4.54* (5)	9.29±1.43 (6)	3.28±0.40* (3)	5.97±0.13 (3)	444.5±17.53* (3)	4

\*; Significantly different from control values ( $p \leq 0.05$ ).

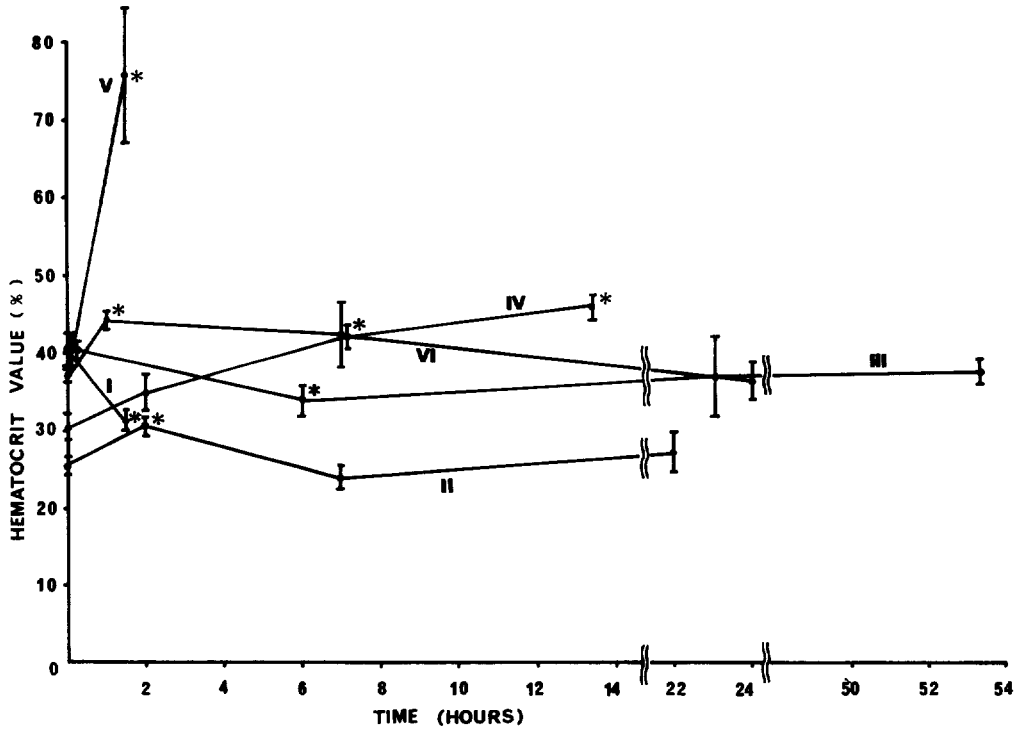


Fig. 8. Variations of hematocrit values in the red sea bream stressed by changes of chlorinity (mean±s.e.). I - VI; Experiment number. \*; significantly different from 0-hour control values ( $p \leq 0.05$ ).

Table 7. Variations of hematological and serum characteristics in the red sea bream under the decrease of environmental chlorinity (mean±s.e.). Numbers and symbols are the same as those in Fig. 8.

Experiment Time(h)	Hemoglobin (g/dl)	Protein (g/dl)	Chloride (mEq)	Potassium (mEq)	Magnesium (mEq)	Calcium (mEq)	Cortisol (ng/ml)	Cluster number
III 0 (Control)	8.1±0.25 (7)	4.36±0.19 (7)	168.3±2.46 (7)	5.33±0.85 (7)	1.63±0.10 (6)	8.20±0.16 (6)	76.5" (1)	
6	7.7±0.17 (5)	4.16±0.17 (5)	167.2±2.93 (5)	3.60±0.45 (5)	1.80±0.03 (5)	3.47±0.34 (5)	39.0" (1)	5
23	8.9±0.67 (4)	5.15±0.26* (5)	161.4±2.38 (5)	4.82±0.57 (5)	1.31±0.02 (5)	3.44±0.36 (5)	61.0" (1)	6
30	7.9±0.34 (4)	4.10±0.14 (5)	171.5±1.03 (3)	5.41±0.55 (5)	1.76±0.15 (3)	8.97±0.09* (3)	—	7
53.3	8.3±0.47 (4)	4.89±0.24 (5)	142.5±3.29* (5)	4.97±1.03 (4)	1.76±0.11 (3)	9.03±0.32* (3)	32.0" (1)	8
IV 0 (Control)	6.0±0.45 (11)	2.46±0.08 (10)	164.5±2.07 (12)	6.38±0.66 (11)	1.49±0.03 (7)	5.88±0.12 (7)	6.5±2.69 (6)	
2	6.9±0.33 (9)	2.82±0.14* (8)	154.1±3.90* (9)	8.37±0.47* (8)	1.56±0.04 (4)	5.79±0.26 (4)	223.9±94.72* (5)	9
7	6.9±0.40 (8)	3.11±0.14* (5)	147.5±5.85* (8)	9.80±0.36* (4)	3.22±0.43* (2)	5.99±0.19 (2)	196.6±55.70* (5)	10
13.3	7.2±0.30* (9)	3.90±0.41* (5)	136.2±10.29* (9)	8.67±0.36* (5)	7.87±0.83* (2)	7.98±0.69* (2)	245.5±160.57 (4)	11
V 0 (Control)	8.5±0.45 (6)	5.32±0.17 (6)	161.1±4.62 (6)	5.01±0.62 (6)	2.05±0.10 (5)	8.97±0.11 (5)	24.6±10.38 (2)	
1.5	9.5±0.33 (5)	14.16±0.49* (5)	114.2±3.10* (5)	7.71" (1)	5.52" (1)	14.83" (1)	197.5" (1)	12
VI 0 (Control)	7.9±0.16 (5)	4.36±0.19 (5)	169.3±2.59 (5)	8.24±0.95 (5)				
1	7.9±0.12 (10)	4.9±0.13* (10)	150.3±1.12* (10)	5.25±0.32* (10)				13
7	8.3±0.54 (3)	4.27±0.05 (2)	111.7±0.90* (2)	3.92 (1)				14
24	7.5±0.15 (3)	3.83±0.15 (3)	86.1±2.19* (3)	5.40±0.56 (3)				

\*; Significantly different from control values ( $p \leq 0.05$ ).

"; Serum was analyzed in a lump.

(実験Ⅱ)が認められ、ここでも両実験の結果は一致しなかった。塩分低下時には実験Ⅲを除いて、すべて一時的な上昇が認められた。すなわち、実験Ⅲのようにゆるやかな塩分低下時にはヘマトクリット値はわずかに低下する時期はあるが、全体的にみてほとんど変動がない状態である。しかし、実験Ⅳ、Ⅴ、Ⅵのように急激な塩分変化時にはヘマトクリット値の有意な増加が認められた。

蛋白質量：塩分上昇時は、実験Ⅰでは蛋白質量の減少が認められたが、実験Ⅱでは有意な変動は認められなかった (Table 6)。塩分低下の場合 (Table 7)には、対照値は4実験で異なっていたが、増加の傾向が認められた。特に実験Ⅳは非常に低い蛋白質量を示す魚群であったが、実験Ⅲ、Ⅴ、Ⅵと同様に一時的な増加傾向が認められた。実験Ⅴの14.2g/100mlという値は明らかに異常であり、溶血の影響と考えられた。

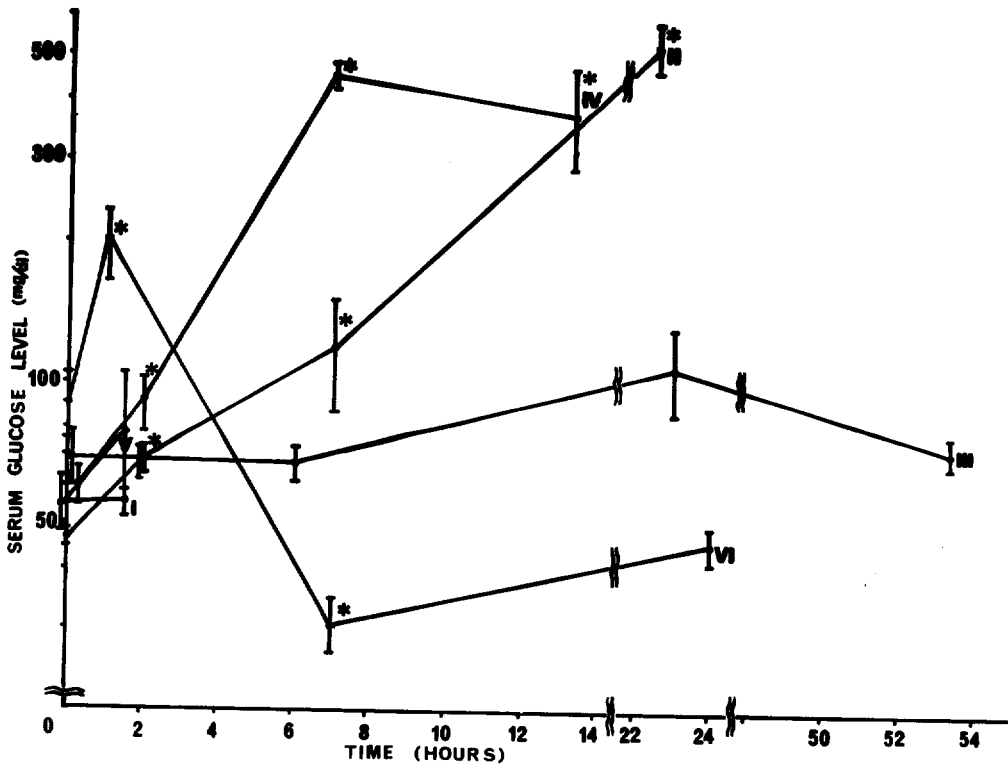


Fig. 9. Variations of serum glucose levels in the red sea bream stressed by changes of chlorinity (mean±s.e.). I-VI; Experiment number.  
\*; Significantly different from 0-hour control value ( $p \leq 0.05$ ).

グルコース量：塩分の上昇と下降時にはいずれもグルコース量の増加が認められた。(Fig. 9)。実験Ⅰの1.5時間までの時間範囲ではグルコース量の増加は認められていないが、実験Ⅱでは2時間以降次第に増加する傾向が認められた。実験Ⅲでは塩分低下速度が小さくグルコース量の個体差も大きいので、有意な増加は認められなかった。実験Ⅴの1.5時間までの時間範囲では増加は認められなかった。実験Ⅵでは1時間後のグルコース量の有意な増加の後、7時間目に有意な減少を示した。

クロライド量：この成分は塩分上昇時には増加の傾向を示した。しかし急激な塩分上昇の場合でも最初にはあまり高い値を示さず、斃死魚が出る時期になると高い値を示した。塩分低下時には明らかにクロライド量は減少の傾向を示した。塩分低下速度が急激な場合(実験Ⅴ, Ⅵ)にはクロライド量は減少したが、速度がゆるやかな場合(実験Ⅲ, Ⅵ)には減少も軽度であった。

ナトリウム量：塩分上昇時には増加を示し、塩分低下時には減少が認められ、変動傾向はクロライド量の変動と並行していた (Fig. 10)。

カリウム量：塩分上昇の場合には (Table 6), 実験Ⅱで7時間後に一時的な有意なカリウム量の減少が認められた。塩分低下時には (Table 7) 実験Ⅲでは有意差を生じるような変動は認められなかったが、これは塩分低下速度が小さい実験であったためとみられる。実験Ⅳではカリウ

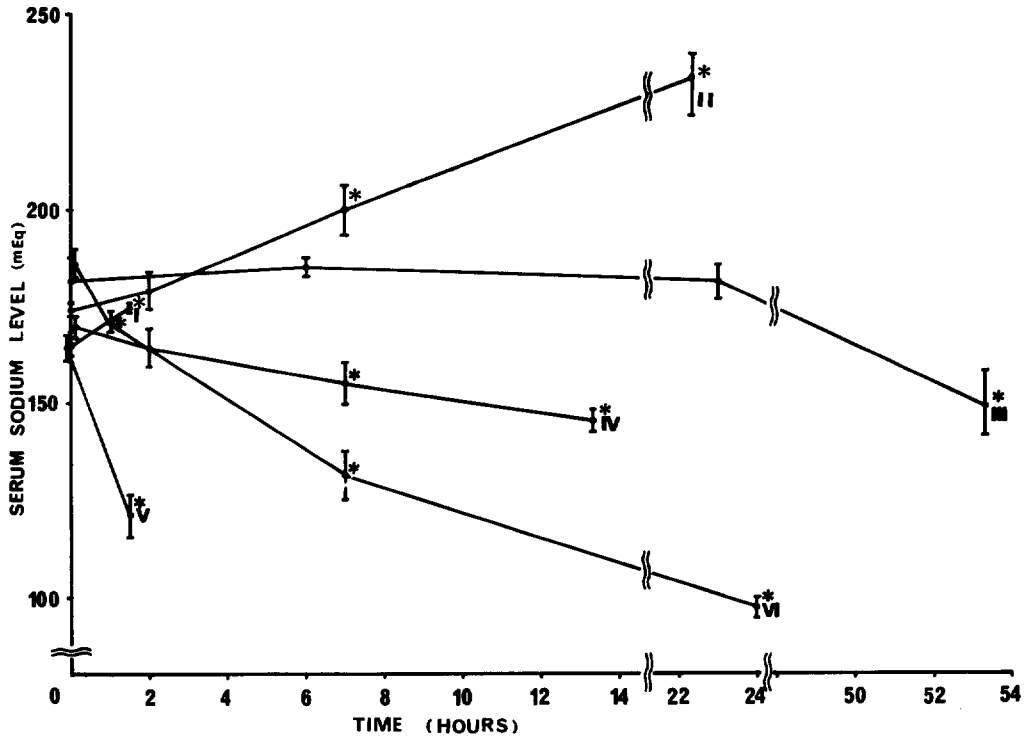


Fig. 10. Variations of serum sodium levels in the red sea bream stressed by the environmental chlorinity changes (mean  $\pm$  s. e.).

I-VI; Experiment number \*; Significantly different from 0-hour control value ( $p \leq 0.05$ ).

ム量の増加が、実験VIでは減少が認められた。この成分の変動傾向ははっきりしなかった。

マグネシウム量とカルシウム量：塩分上昇時にはマグネシウム量は実験IIの22時間後の斃死魚がみられた時点で増加が認められたただけであった。カルシウム量には有意な変化はみられなかった。

塩分低下時には、実験IIIではマグネシウム量の変化はないが、カルシウム量は30時間以後に増加を示した。これが塩分変化によるのかどうかは解らない。実験IVではマグネシウム量の有意な増加が認められ、この実験ではカルシウム量も増加している時期がある。2価イオンの変動は塩分変動に鋭敏に反応するようにはみえず、その動態は塩分変動に伴なり変動とは考えにくい。

コーチゾール量：塩分上昇時にはコーチゾール量は増加した。実験Iでは1.5時間後には1尾しか測定できなかったが対照値の6倍の値を示した。実験IIでは7時間後には同じく2倍に増加し24時間後には4.5倍に達した。塩分低下時 (Table 7) にはゆるやかな塩分低下の時以外は、顕著に高い値を示した。コーチゾール量は対照区の値の変動が大きいが、それにもかかわらず同じような増加傾向を示した。

### 3. 考 察

海産魚でも淡水魚でも、環境水の塩分変化に伴なり生理学的性状の変動についての研究は比較

的多い。

飼育水の塩分上昇による魚の生理学的変動の研究は主に淡水魚や溯河性および降海性魚類で行われており、海産魚を対象にした研究はほとんどない。飼育水の塩分低下の影響については主に海産魚で研究されている。

#### 1) 塩分上昇の影響

飼育水の塩分上昇に伴う魚の反応は、飲水量、血液学的諸性状の変動、鰓、腎、腸等の組織学的諸性状の変化、各種組織の酵素活性の変化など、種々な面で研究されており、その主たる研究目的は外部環境の塩分変動に対して内部環境を一定に保とうとする浸透圧調節機能の解明にあった。

血液性状に関しては1950年代に竹村(1950)が電位差計を試作し、淡水魚のドジョウやコイやフナを数%の食塩水中に入れた時の組織液や血液のクロライド量を測定し、実験開始後数時間は次第に増加したと報告している。STANLEY and FLEMING (1965)は *Fundulus kansae* を海水に移した後の血中ナトリウム量を測定し、海水移行後数時間は血中ナトリウム量は増加し数日後に始めの値にもどるとしている。OIDE and UTIDA (1967)は日本ウナギを淡水から海水に移した後の血中ナトリウム量は次第に増加し、その後淡水値へ復することを述べている。CHAN et al. (1967)はウナギを海水に適応させて4~5週間後の血中無機塩を定量し、ナトリウムとカリウム量の有意な増加を報告している。BALL et al. (1971)は淡水順化した *Anguilla anguilla* を海水に移した後の体重の減少、ヘマトクリット値の増加、血中ナトリウム量、血中クロライド量、血中コーチゾール量の増加を報告しているが、この海水移行の影響はどの測定項目も2日後に最大の変動を示した。HIRANO and UTIDA (1971)は淡水順化した日本ウナギについて血中コーチゾール量と腸よりの水分吸収を測定し、海水移行後は血中コーチゾール量は増加し2時間後にピークに達し24~48時間後には始めの値に復するとしている。SINGLEY and CHAVIN (1975)はキンギョで血中コーチゾール量を測定しており、飼育水に食塩結晶を加え0.09%にした時コーチゾール濃度は秒、分の単位で増加したとしている。FORREST et al. (1973)はアメリカウナギを海水に移すと、コーチゾール量は増加し2日後にはピークに達し数日後始めの値に復し、血中ナトリウム量は移行後数日間は増加しているとしている。また、HAYWOOD (1975)は striped dogfish, *Paroderma africanum*, で鰓を通してのナトリウム、クロライド、水の交換に関する研究を行い、外部環境水の浸透圧を上昇させた時、ヘマトクリット値は数日間にわたる増加時期があって10日目頃には始めの値に復するという結果を報告している。栗倉(1964)はコイを稀釈海水に移行して24時間後に測定した実験ではヘマトクリット値、ヘモグロビン量の増加を、またニジマス稀釈海水に移行した後では血清中ナトリウム量の一過性増加を報告している。DAVIS and SIMCO (1976)は淡水魚 *Ictalurus punctatus* を食塩水へ移した後の血中無機塩量を定量し、ナトリウムとクロライド量の日単位で起こる一時的増加を報告している。また、最近、OGURI and OOSHIMA (1977)は淡水魚ニジマスとキンギョを海水移行させその後60分までの血漿電解質(ナトリウム、クロライド)の変化を観察し、その急激な増加を記録している。MACEINA (1980)は淡水性 grass carp (*Ctenopharyngodon idella val.*)の飼育水に食塩を加え、塩分を10.9% (sal.)

まであげると10日後にも血漿ナトリウム、クロライド量は増加していたと報告している。さらに、BATH and EDDY (1979) と EDDY and BATH (1979) はニジマスを $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{2}{3}$ 海水へ移行した後の血漿、筋肉の細胞内、外のイオン ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ) を測定・計算し、移行後数日間の血漿、筋肉のイオンの一過性増加を報告し、特に塩素イオンの処理にエネルギーを消費しているとしている。

これら諸報告はすべて淡水魚と淡水順応魚における実験結果であるが、魚種の違い、塩分変化後のサンプリング時間、温度、取り扱い等設定条件の差があるにもかかわらずよく一致している。すなわち、ヘマトクリット値は時間、日の単位での一過性の増加が認められており、血中ナトリウム量やクロライド量は実験開始後すぐ増加しはじめ、やがて数日後にもとの値かあるいはそれよりやや高い値で安定する。コーチゾールに関しては秒、分、時間、日の単位での一過性の上昇が認められている。しかし、これらの報告は主に塩分上昇の影響をストレス反応としてとらえるより、塩分耐性や塩分順応の影響を把握するという点に焦点があてられている。これらの反応は、基本的には本実験においても認められているが、ヘマトクリット値の変動が実験条件によって異なることや、コーチゾールの初期の上昇が認められなかった点等細部では相違がみられる。

## 2) 塩分低下の影響

環境水の塩分を低下させた時の魚の生理学的反応に関しては主に海産魚や海水順化した淡水魚での研究が多い。マダイでは板沢・早川 (1972) らが稀釈海水中における血清浸透圧の変化、腎機能の変化を観察している。その結果、稀釈海水に移した後3日間は血清浸透圧が低下しその後回復するが、その回復までの経過は腎機能の適応と深い関係があるとしている。山下 (1967) はカサゴで人為的に環境水の塩素量を低下させた時には、血液比重は環境水の低下条件に対応して減少すると報告している。HANE et al. (1966) は *pacific salmon* や *steelhead trout* で、取り扱いや反復採血等の影響が血漿17-OHCS 量の増加として現われ、特に河川回帰初期の魚で著しかったと報告している。CHAN et al. (1967) はウナギを蒸溜水で飼育すると数週間後には血中ナトリウム量の明らかな減少と血中カリウム量の増加が起ったとしている。PARRY et al. (1961) は *pacific salmon* を海水から淡水に移行すると血液浸透圧は低下するとしている。FAGERLUND (1967) は *sockeye salmon* でストレスと血漿コーチゾール量の関係を研究し、魚の回遊の過程で河川に入った初期には血中コーチゾール量の増加は認められないが、瀕死状態に近づくと急激に増加するとしている。また、平野 (1969) は2か月間海水に順応させた日本ウナギを淡水に移した後2時間の試料では、血中コーチゾール量の増加はみられなかったとしている。BALL et al. (1971) は海水に適応したウナギを淡水に移した時の血中ナトリウム量とコーチゾール量を測定しており、どちらの成分に関しても数日間後の調査で変動が認められなかったとしている。NISHIMURA et al. (1976) は、海産魚 *Opsanus tau* を淡水で稀釈した海水に移し4週間後に採血しレニン活性、アンジオテンシン活性、ナトリウム量、コーチゾール量、ヘマトクリット値を測定し、血中ナトリウム量減少は認めたもののコーチゾール量、ヘマトクリット値の変化は認められなかったという。HENDERSON et al. (1976) もウナギの内分泌機能に関する研究の中で、海水順応した魚の環境水の塩分を低下させると血中ナトリウム量は減少するがコーチゾール量には変化がないとしている。HAYWOOD (1975) は先に述べた *striped dog fish* による

鰓を通してのイオン交換に関する実験で、環境水の浸透圧を低下させるとヘマトクリット値が減少するとしている。

これら外部環境水の塩分を低下させた時の反応は、その主たる目的を浸透圧調整機能解明にしているため、とりあげている血液成分項目には偏りがみられ、血中ナトリウム量、コーチゾール量、血液比重、浸透圧、ヘマトクリット値等のデータが多い。これらの諸報告に共通した事実は、海産魚あるいは海水に適応させた淡水魚を淡水に移行した後は血漿ナトリウム量は減少し、適応が完了した場合でもその値は海水値よりやや低い所で安定することである。

最近報告の多いコーチゾール量に関しては、淡水に移行して1日以上経過した後の測定値は対照値と差が認められないというものが多い。本実験でも実験Ⅲの塩分低下がゆるやかな場合にはこの値の増加は認められていないが、実験ⅣとⅤのように斃死魚がみられるような塩分の急激な低下条件では増加しており、これは FAGERLUND (1967) のいう moribund (瀕死) 状態と同じ現象であろう。

ヘマトクリット値に関しては日の単位で低下するという報告と変化しないという報告がみられるのみで、これを今回の初期の反応の結果と比較するのは困難である。ヘマトクリット値増加の原因は貯蔵赤血球の放出、血液の濃縮、赤血球の膨潤等が考えられるが、実験Ⅳ、Ⅴ、Ⅵにみられるヘマトクリット値増加時には、ヘモグロビン量のヘマトクリット値に対する比率(MCHC)が極端に低下していること、実験Ⅴでは著しい溶血が認められたこと等からヘマトクリット値増加は赤血球の膨潤によるのではないかと考えられる。また、このヘマトクリット値の増加は、血清ナトリウム量の減少やコーチゾール量の増加と同時に起こっている点などからも、浸透圧調整機能が乱された時の特徴と考えることも出来る。

本実験は環境水の塩分変化によって、どのようにマダイの生理学的恒常性が乱され、どのよう

Table 8. Euclidean distances between clusters. The cluster number is shown in Tables 6 and 7.

Cluster Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	10														
3	190	118													
4	1116	918	448												
5	354	301	415	755											
6	315	416	968	2388	652										
7	588	690	1260	2759	880	154									
8	1730	1821	2589	3540	1097	953	1236								
9	21	11	138	899	269	423	767	1696							
10	93	60	158	720	99	492	785	1469	44						
11	19	15	175	995	236	327	532	1608	33	51					
12	92	114	404	1345	222	160	298	1173	130	117	51				
13	55	47	223	985	154	312	497	1402	58	36	11	30			
14	746	655	684	784	124	1080	1096	1385	658	378	534	492	409		
15	769	703	839	1063	129	927	932	1060	698	409	557	448	416	26	
16	16	24	229	1088	241	276	566	1443	18	50	18	57	28	613	615

な変化として把握することが出来るかという観点で行ったものである。第2節(石岡 1980a)の温度変化の場合と異なり、塩分変化によるマダイの血液性状変化には血中ナトリウム量、クロライド量の変動のように特有のストレス対応変化がはっきりと認められる。塩分上昇時と下降時に共通にみられる反応はグルコース量とコーチゾール量の変動のみであった。また、この共通の反応は刺激の絶対値(塩分差)そのものと同時にその変化速度によって影響されるようである。

3) クラスタ分析

第2節に述べたのと同様に本節実験結果についても3種類の血液性状の組み合わせによってクラスタ分析を行った。変数の元データは、Tables 6, 7, Figs 8, 9, 10に示した各実験のサン

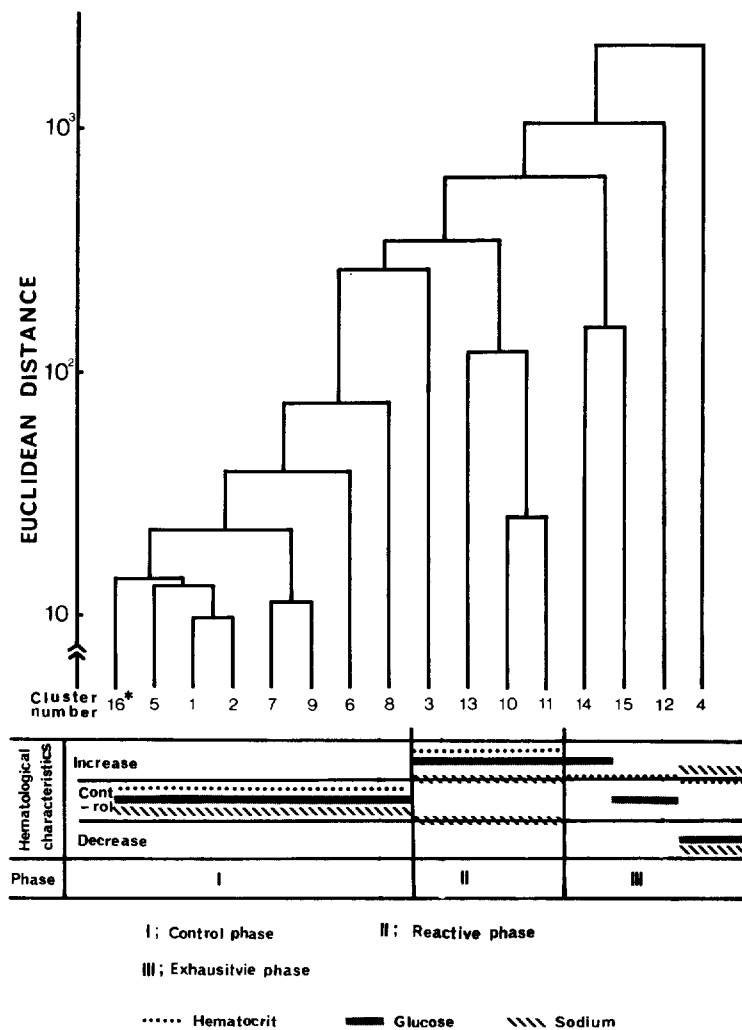


Fig. 11. Differentiations of hematological phases on stress responses in the red sea bream under environmental chlorinity changes by cluster analysis. \*: Cluster number for mean values calculated from controls through all experiments.



プリング時間毎の平均値を整数化し、グルコースは対数変換した値を用いた。この結果を Table 8, Fig. 11に示した。このクラスター分析結果のみからグループを分類することは難しいが、斃死魚出現状況や、第2節のクラスター分析時に基準として用いたユークリット距離やそれぞれのグループの3変数の平均値の特性を総合的に考えて大別してみると、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲの3グループとして考えることができる。Ⅰは対照群を含み、3変数が対照値から大きくはずれないグループ、Ⅱはグルコース値が有意に増加し、環境水の影響がヘマトクリット値、ナトリウム値にわずかに現われているグループ、Ⅲは斃死魚が認められたグループで、ナトリウム値が対照値から大きくはずれており、グルコース値も極端に高い値から低い値にまで分布しているグループである。第2節にならい、それぞれのグループは対照相、反応相、疲弊相と考えることができる。対照相では鰓、消化管を通じて浸透圧変化に由来する反応が起こり始める初期の反応や、塩分変化速度があまり大きくないために浸透圧調節が十分に機能している状態のグループが含まれている。反応相は負荷がさらに大きくなり、負荷を中和する機能を持つ組織器官へ速やかにエネルギー補充をしなければならないため、グルコースの血中への遊離が著しく増強された反応を示すグループが入る。疲弊相は負荷が大きすぎるために浸透圧調節機能を失調し外界水塩分変動の影響を強くうけて斃死に至る前の状態にあるグループと考えることができる。

この各相の考え方も各相の血液性状も、温度変化をストレッサーとした場合と基本的には同一である。但し、塩分変動というストレッサーはストレス反応としての浸透圧変化を起こすと同時にストレッサー特有の作用としても同じ効果を示すものであるため、血液性状にみられる変化も浸透圧に関与するものが強く現われる。

#### 第4節 環境水酸素分圧低下と血液性状変化

魚をとりまく環境要因のうち、溶存酸素量は魚の生存にかかわる基本的要因の一つである。しかし、この溶存酸素は常に安定した状態に維持されているものではない。特に限られた水量内での飼育時には、魚の密度、温度、餌料や排泄物の影響、プランクトン量などの条件で大きく変化することはよく知られている。飼育水の酸素欠乏の魚に対する影響に関しての研究は古くから行われ、魚の呼吸数、行動、血液性状等の報告は多く、魚の低酸素状態への適応機構解明の研究が行われている。生理学的あるいは生化学的実験に際しては、捕獲、輸送、取り扱い、空中露出の処理が行われるが、この時魚を酸素欠乏状態に追い込まざるを得ないことが多いので、窒息の生理については一層の理解を深めることが必要である。

本節では、低酸素状態に対して比較的、耐性があるとみられているマダイについて、溶存酸素量の低下をストレッサーとした時に血液性状に現われるストレス反応を観察するために行った実験の結果を報告する。

##### 1. 実験条件

マダイは1976年にふ化し養殖された1年魚を種苗生産業者より購入して用いた。実験開始までの飼育方法や実験系は前述の通りである。実験魚の尾又長、体重（平均値±標準偏差）はそれぞれ $12.4 \pm 1.01$ cm,  $61.8 \pm 13.85$ gであった。

溶存酸素量減少速度を変えた時にみられる共通な反応をみるために4種類の実験を行った。この実験の詳細は Table 9 に示した。溶存酸素量を変えるのには窒素ガスを海水中に吹き込む方法を用い、前述のストレッサー調整水槽 (C) に窒素ガスを吹き込んで低酸素海水を作製し、これをサイフォンで実験水槽 (A, B) へ移した。実験水槽水の攪拌は魚の遊泳によるものにかまかせ、特別な装置は用いなかった。実験 I の場合のように急激に溶存酸素量を変える時は、バルブの切り換えによりエアレーションパイプを通して直接窒素ガスを実験水槽中へ吹き込んだ。

Table 9. Summary of the experimental conditions in the study of the stress responses induced by ambient oxygen reduction on the red sea bream.  
Fork length;  $12.4 \pm 1.01$  cm. Body weight;  $61.8 \pm 13.85$  g (mean  $\pm$  s.d.).

Experiment	I	II	III	IV
Date of experiment	July 7	June 30	June 24	July 12
No. of the fish	20	25	25	25
Acclimation period (days)	5	5	5	5
Water flow system	Still*	Running*	Running	Running*
Temperature during the experiment (°C)	21.1	19.1-21.0	18.3-18.8	20.7-23.6
Initial acclimation oxygen level (ml/l)	$4.64 \pm 0.43$	$4.86 \pm 0.03$	$5.17 \pm 0.02$	$4.67 \pm 0.40$
Attained oxygen level (ml/l)	$0.91 \pm 0.06$	$1.31 \pm 0.06$	$2.89 \pm 0.01$	$2.98 \pm 0.01$

\*; The surface of the experimental trough was closely covered with polyethylene film to prevent the oxygen diffusion from the surrounding air.

溶存酸素量の測定は水槽内に固定したサイフォン管より10分毎に採水し、ウインクラー法により行った。予備実験で水槽内の溶存酸素量の低下の状況を見るために水槽内の17点に固定したサイフォン管より採水し、溶存酸素量を測定した。その結果、採水位置による溶存酸素量には有意

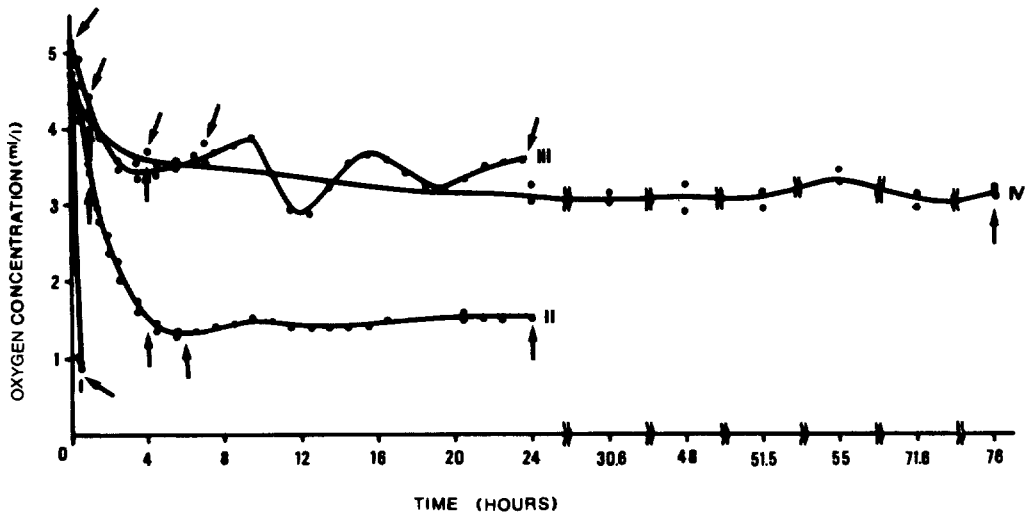


Fig. 12. Changes of water oxygen levels in the experiment on the stress responses of the red sea bream to water oxygen level reduction. I-IV; Experiment number. Arrows; Sampling time.

差は認められなかった。なお、実験Ⅱ、Ⅲ、Ⅳの場合には、水槽底部に溶存酸素計（EIL 1510型）の受感部を沈めモニターしながら実験した。Fig. 12 に4実験の溶存酸素量の経時的变化を示した。

実験の経過に従って適当な時間間隔でマダイをサンプリングした。

## 2. 実験結果

### 1) 一般的観察

実験Ⅰは30分間で溶存酸素量が4.64ml/l から0.91ml/l へと急激に低下（Fig. 12）し、実験開始後15分すると異常行動魚が認められた。魚は激しく遊泳し、鼻上げ行動が観察された。実験開始後30分にもこの状態がつづいた。この時に全尾数を取り上げ採血したので斃死魚はなかった。

実験Ⅱでは4時間で1.31ml/l まで溶存酸素量を低下させたが、4時間までは異常行動魚は観察されなかった。5時間目には異常遊泳魚が2尾と横転魚が3尾認められた。6時間後にはほとんどの個体が水槽底で静止し動かなくなり、10時間後には体色が白っぽくなった魚が水槽全体をゆっくりと泳ぎまわる状態にあるのが観察された。この実験でも斃死魚はなかった。

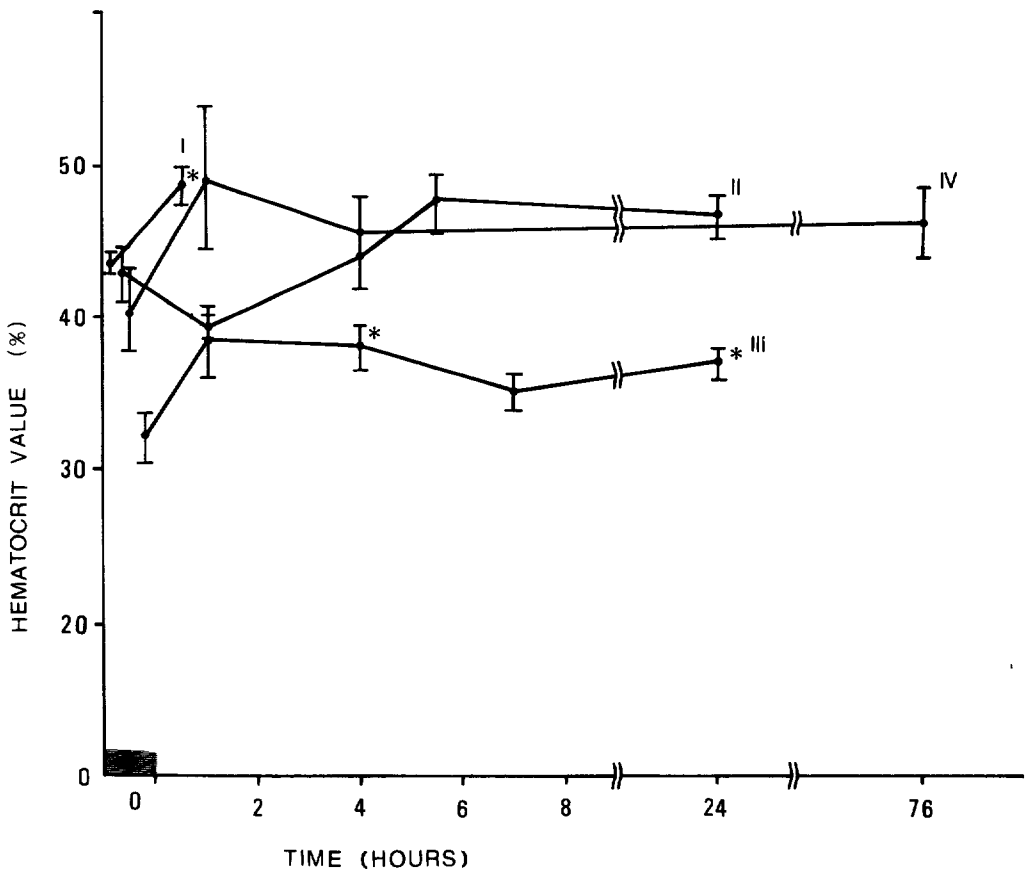


Fig. 13. Changes of hematocrit value in the red sea bream stressed by changes of water oxygen level (mean  $\pm$  s. e.). I - IV; Experiment number. \*; Significantly different from 0-hour control level ( $p \leq 0.05$ ).

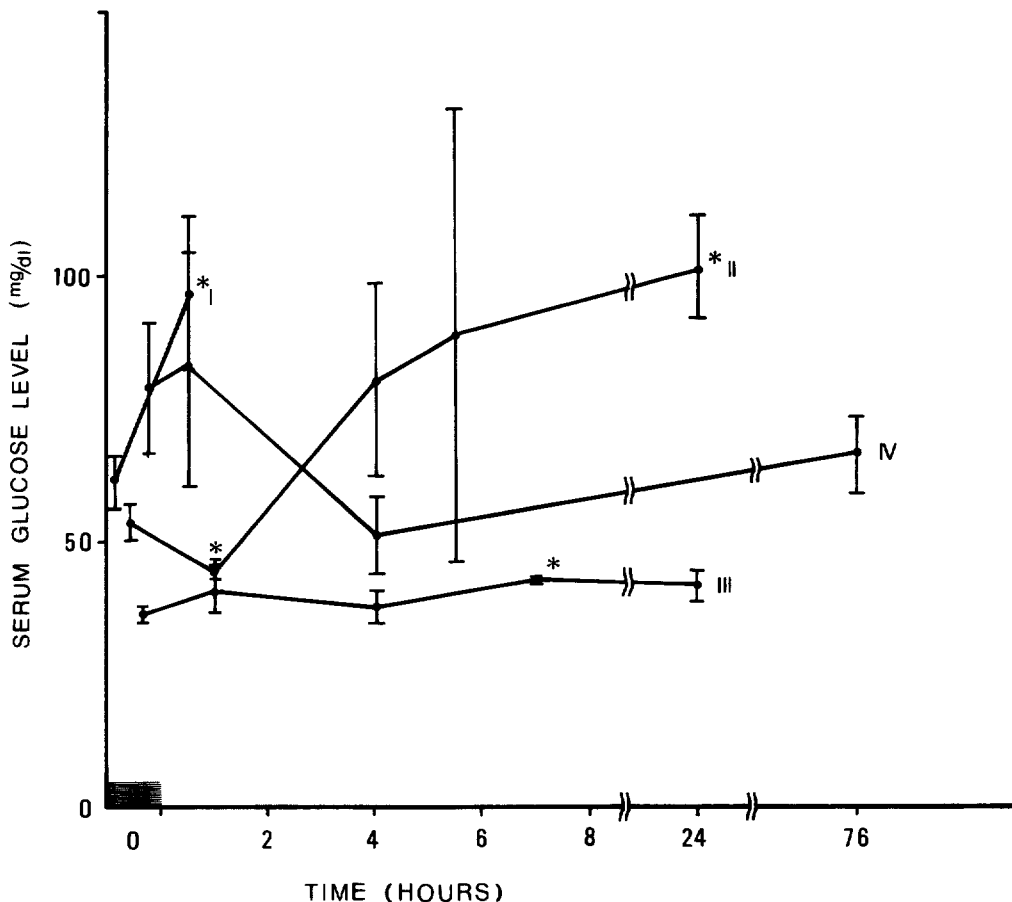


Fig. 14. Variations of serum glucose levels in the red sea bream stressed by changes of water oxygen level (mean  $\pm$  s. e.). I-IV; Experiment number. \*; Significantly different from 0-hour control value ( $p \leq 0.05$ ).

実験Ⅲでは12時間で2.89ml/lまで溶存酸素量を低下させたもので特に全体的な行動異常は認められなかったが、実験開始後4時間目に表層を泳ぎまわる個体1尾と21.5時間後に鼻上げ症状を示す個体1尾が観察された。斃死魚はなかった。

実験Ⅳではゆっくりと溶存酸素量を2.98ml/lまで低下させたもので、行動異常魚も斃死魚も全く認められなかった。

## 2) 血液性状

これらの実験より得られた血液性状の変化は Fig. 13, Fig. 14, Table 10 に示した。

ヘモグロビン量：溶存酸素量の減少ではマダイのヘモグロビン量を増加させる傾向が認められたが、平均値での有意差が認められたのは実験ⅡとⅣであり、それも5.5時間以後であり、ヘモグロビン量増加の経過は緩慢であった。

ヘマトクリット値：この成分も増加傾向が認められたが、平均値で有意差を生じたのは実験Ⅰと実験Ⅲであった。

Table 10. Variations of hematological and serum characteristics in the red sea bream stressed by changes of water oxygen level. (mean±s.e. with number of the fish in the parenthesis.)

Experiment	Time (h)	Hemoglobin (g/dl)	Protein (g/dl)	Chloride (mEq)	Sodium (mEq)	Cortisol (ng/ml)	Cluster number
I	0 (control)	6.7±0.15 (10)	3.47±0.11 (10)	168.2±1.80 (10)	177.1±2.37 (10)	24.2±5.35 (10)	
	0.5	7.0±0.23 (9)	3.40±0.13 (9)	176.6±2.37* (9)	178.8±1.62 (9)	91.3±20.55* (9)	2
II	0 (control)	6.4±0.22 (4)	3.19±0.26 (4)	164.8±2.19 (4)	170.6±3.06 (4)	8.8±0.85 (4)	
	1	6.0±0.10 (5)	2.67±0.08 (5)	161.9±0.50 (5)	166.6±0.33 (5)	19.9±7.19 (5)	3
	4	6.7±0.34 (5)	3.34±0.10 (5)	169.2±2.82 (5)	172.0±3.08 (5)	140.8±29.69* (5)	4
	5.5	7.3±0.22* (5)	3.42±0.09 (3)	174.1±3.11 (5)	182.3±2.89* (5)	62.6±23.13 (5)	5
	24	7.3±0.06* (5)	2.54±0.07* (5)	163.6±1.76 (5)	165.4±1.70 (5)	92.3±12.74* (5)	6
III	0 (control)	5.2±0.42 (5)	2.73±0.05 (5)	157.9±0.81 (5)	164.6±3.13 (5)	—	
	1	6.1±0.47 (4)	2.75±0.11 (4)	160.7±0* (4)	166.1±1.96 (4)	—	10
	4	5.8±0.41 (5)	2.78±0.09 (5)	160.2±1.34 (5)	162.6±0.79 (5)	—	11
	7	5.6±0.55 (5)	2.78±0.21 (5)	159.5±1.88 (5)	166.3±1.86 (5)	—	12
	24	5.5±0.17 (5)	2.54±0.09 (5)	159.5±1.03 (5)	166.0±3.03 (5)	—	13
IV	0 (control)	5.7±0.63 (5)	3.42±0.48 (5)	166.1±4.10 (5)	174.1±1.53 (5)	9.0"	
	1	8.0±0.88 (5)	2.73±0.40 (5)	162.1±1.48 (5)	174.9±3.05 (5)	30.0"	7
	4	7.0±0.41 (4)	3.65±0.43 (4)	165.0±0.97 (4)	169.7±2.65 (4)	41.0"	8
	76	7.8±0.30* (9)	2.80±0.16 (8)	165.6±1.81 (9)	168.8±1.30* (9)	39.0"	9

\*; Significantly different from 0-hour control value ( $p \leq 0.05$ ).

"; serums were analyzed in a lump.

平均値に有意差を示した実験区とその時間はヘモグロビン量変化とは一致しないが、酸素量減少実験の全個体のヘモグロビン量とヘマトクリット値の間には正の相関関係が認められた。

蛋白質量：全実験を通して、蛋白質量の変動はほとんど認められなかったが、実験Ⅱで実験開始後24時間目に有意な減少がみられた。

グルコース量：実験ⅠとⅡでは増加が顕著であった。実験Ⅲでは実験開始後7時間目に増加が認められた。この実験区の対照値（実験開始0時間）は低く、溶存酸素量低下により増加の傾向がみられるが、高血糖と判断することは困難である。実験Ⅳではグルコース量の有意な増加は認められなかった。

クロライド量：実験ⅠとⅢでクロライド量の有意な増加が認められた。実験Ⅱの5.5時間目には非常に高い値を示す個体がみられたが、平均値としては有意差を示さなかった。実験Ⅳではクロ

ライド量の変動はほとんどみられなかった。

ナトリウム量：実験Ⅰでは対照値と0.5時間の値に有意差は認められなかった。実験Ⅱでは5.5時間目に有意な増加がみられた。実験Ⅲではどの時刻でも有意な変化はみられなかった。実験Ⅳの76時間目に有意な減少が得られた。全体としてははっきりした変動の傾向はみられなかった。

コーチゾール量：実験ⅠとⅡのような急激な溶存酸素量減少時には有意な増加がみられたが、個体差が非常に大きかった。

### 3. 考 察

海産魚マダイの酸素消費量に関しては種々な発育段階の個体で測定されている（山口1978）にもかかわらず、酸素欠乏症に関する報告例は少ない。梶山（1933）、田村（1950）、磯野・中村（1929）らは呼吸数の変化、酸素消費量の変化、呼吸停止時の溶存酸素量等を調べている。実験温度や取扱い条件等によって異なるが、2.0ml/lの溶存酸素量でマダイは窒息を示す場合もありうるようである。

これらの数値からみると今回の実験条件は、マダイにとっては致死的な溶存酸素量に近いところまで、種々な酸素減少速度で変化させたということになり、この状態におかれたマダイの初期の生理学的反応をみたことになる。

#### 1) ヘマトクリット値とヘモグロビン量

マダイ以外の魚の酸素欠乏の影響や窒息については古くからよく研究されているが、その中心主題は酸素欠乏に対する特異的適応反応の研究にあったと考えられ、その対象となった症状は主に血液性状変化であった。狩谷（1950）は密閉コンテナにコイを入れ溶存酸素量の経時的な減少と血中ヘモグロビン量増加と赤血球抵抗力減少の関係を観察し、HALL et al.（1926）は海産魚で同様の実験を行った時の赤血球数、ヘモグロビン含量、血糖、非蛋白態窒素、血中塩素量、全窒素、乾物量を測定した。彼はヘモグロビン量と赤血球数は増加したがヘマトクリット値は減少したとしている。狩谷、HALL et al. の観察は2時間程度の短い期間の反応であった。他方、PROSSER et al.（1957）はキンギョの飼育水の酸素量を低下させて数日後のヘモグロビン量と赤血球数の増加を報告している。WOOD and JOHANSEN（1972）は1～2週間低酸素状態に置いたウナギで、血液の酸素容量、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、赤血球中高エネルギーリン酸や血中乳酸量等を測定したが、ヘモグロビン量とヘマトクリット値の増加を認めている。また、SWIFT and LLOYD（1974）はカニューレーションを施したニジマスで溶存酸素量低下を起した時のヘマトクリット値や尿量の経時変化を観察し、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の増加を認めている。KIRK（1974）は淡水魚 catfish を止水に入れ、酸素量を0 mg/l にまで下げ、10分間放置した後の経過を時間単位で追跡しているが、この時には血中乳酸量、浸透圧、ヘマトクリット値増加、血液 pH の低下を報告している。

一方、HATTINGH（1976）は9～90%の酸素飽和水中に *Labeo capensis* を24時間置いた後、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値には変化が認められず、低酸素条件下でグルコース量増加が

認められたとしている。SCOTT and ROGERS (1981) も channel catfish で 1.5 ppm の低酸素下に置かれた時の血液性状を報告しており、ヘモグロビン量、乳酸、グルコース量の増加を報告しているが、ヘマトクリット値、赤血球数には変動が認められなかったとしている。また、WEBER et al. (1979) は空気呼吸の出来るアマゾン河の淡水魚を低溶存酸素量状態で飼育した時の行動変化や血液性状変化が魚種によって異なることを報告した。

これらの諸報告にみられるヘモグロビン量の増加は低酸素環境に対する適応的反応として考えられてきた。すなわち、溶存酸素量低下による鰓からの酸素とり込み量の低下が起こす組織供給酸素量の不足をヘモグロビン量増加によって緩和させるための代償的機能と考えられてきた。しかし、HATTINGH (1976) や WEBER et al. (1979) の報告は低酸素状態への適応は全ての魚種でヘモグロビン量、ヘマトクリット値、赤血球数増加の形で同じように起るわけではないことを示している。魚の低酸素状態への適応は赤血球の酸素結合能力や血液の酸素運搬量だけを考えるのではなく、行動、器官、組織、細胞の機能変化等も含めて総合的に考えねばならない。

ヘマトクリット値上昇の理由として、脾臓からの血球放出、稀釈尿排泄に伴う血液濃縮 (SWIFT and LLOYD, 1974)、赤血球の膨潤等が考えられている。今回の実験結果では蛋白質質量の変動があまりみられない点や、ヘモグロビン量とヘマトクリット値が共に上昇の傾向を示すことなどから赤血球の膨潤によるものとは考えられない。SWIFT and LLOYD (1974) が考えているように、刺激によって時間経過につれて血液濃縮と貯蔵器官からの血球放出が同時に起こっているのであろう。

魚は低酸素状態への適応を赤血球酸素結合能の増加と組織の酸素利用率の低下によって行っているというが (PROSSER et al. 1957)、今回の実験の範囲では、急激な酸素量低下条件に対応してヘモグロビン濃度の増加が認められている場合もある (実験Ⅳ)。しかし他の実験例では認められない場合もあり、ヘモグロビン濃度増加の機構が長期にわたる適応的な反応の場合と短期のストレス反応の場合とで同一であるか否かは明らかではない。

## 2) グルコース量

低酸素環境下の魚での高血糖についての記載例は多く、本実験の場合のように、比較的短時間に溶存酸素量の大きな減少がみられる場合にはグルコース量の増加が認められている。しかも、この酸素量減少の負荷が数日間続いた場合にもグルコース値は高い場合が多い。HATTINGH (1976) は *Labeo capensis* で酸素飽和度40%以下で顕著な高血糖を認めており、HARMAN and JOHNSON (1980) はカニューレシオンを施した魚を低酸素下で強制運動させた時に顕著な高血糖を報告した。WALKER and JOHANSEN (1977) はキンギョで、低温順応魚を低酸素状態においた時に著しい高血糖を示すことを報告し、SCOTT and ROGERS (1981) は channel catfish を 1.5 ppm 酸素下においた時に著しい高血糖を観察している。これらは主に淡水魚での報告例であるが、LOVE (1970) は急激な窒息はストレス反応を起し血糖値を増加させると結論している。本実験でも同様の現象が認められており、溶存酸素量の減少速度が大きいほど、血糖値増加は短時間以内に現われる傾向がある。

## 3) コーチゾール量

コーチゾールは炭水化物代謝にも深い関係があるとされているが溶存酸素量低下時にはコーチゾール量 (Table 10) の増加が認められている。本実験範囲では溶存酸素量低下が継続している間はコーチゾール分泌亢進が持続していることがうかがえる。環境水の酸素量低下時の魚の血中コーチゾール量の変動についての報告例は少ない。DEMAËL and GARIN (1978) は低酸素下の *Tinca tinca* で高い値を示すとしている。これは本実験の結果と同じで魚の嫌氣的代謝への切り換え時にコーチゾールが何らかの役割を果していることを予想させる。

#### 4) 血液中無機成分量

低酸素条件下の魚の血中無機成分量の変動に関してはいくつかの報告例はあるが、その結果はかなり混乱している。KIRK (1974) は *catfish* で一時的な低酸素による血中無機成分の変動は季節によって異なるという結果を得ており、HALL et al. (1926) は短時間の窒息で海産魚の血中塩素量はほとんど変化しなかったとしている。LLOYD and WHITE (1967) は炭酸ガスを吹き込んで飼育水の炭酸ガス濃度を上げた時のニジマスのナトリウム、クロライドイオン量の変化を調べ、クロライドイオンの著しい減少を報告した。

本実験結果ではナトリウム量とクロライド量の経時的な変化が認められているものの一定の変動傾向を認めることはむづかしい。溶存酸素量の減少条件下においたマダイは、それに対して適応的に特異な生理学的変化を示すと同時に一般的なストレス反応を起こしていると考えられるから、一時的な塩類平衡失調が起こることはあり得ると推測される。

#### 5) クラスタ分析

これら血液性状分析結果から、魚の状態の判定を行うためにクラスタ分析を行った。

各実験の各時間のヘマトクリット値、グルコース量の対数変換値、血清ナトリウム量の平均値を元データとしこれらの組み合わせによる相分別を行った。ユークリッド距離の算出や融合方法は前述した。この結果を Table 11, Fig. 15に示した。Fig. 15にみられるように、それぞれの平均値は3群に分けることが出来る。第1グループは対照群を含み、3要素の組合せの点で対照

Table 11. Euclidean distances between clusters. The cluster number is shown in Table 10.

Cluster number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	525											
3	204	1233										
4	136	261	423									
5	518	37	1306	359								
6	621	605	735	216	881							
7	401	67	892	146	164	361						
8	162	591	211	188	684	444	311					
9	216	431	330	82	580	190	184	57				
10	310	1506	14	591	1577	917	1123	310	468			
11	534	1907	79	828	2018	1063	1439	469	639	32		
12	398	1769	79	740	1815	1121	1418	545	699	48	71	
13	335	1604	31	640	1665	988	1237	403	556	10	39	14



マダイのストレス反応

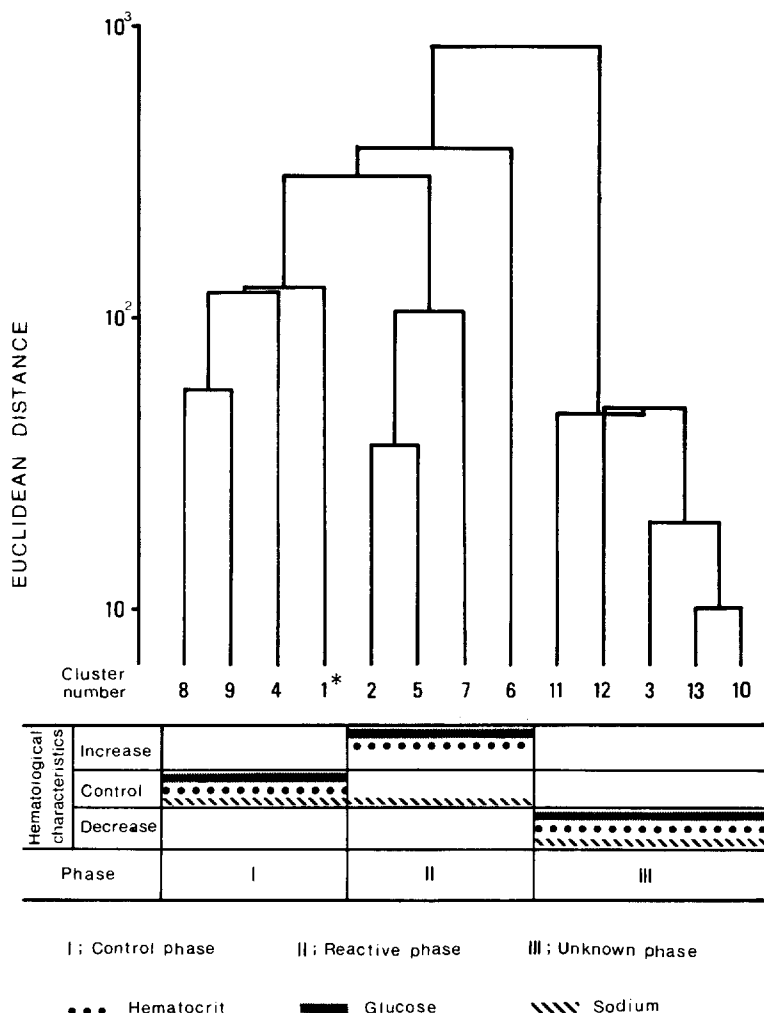


Fig. 15. Differentiations of hematological phases on stress responses of the fish under water oxygen reduction by cluster analysis. Cluster numbers are listed in Table 10.

\*; Cluster number based on mean values calculated from controls through all experiments.

値と差がないと考えられるグループ、第Ⅱグループはヘマトクリット値とグルコース値が有意に高いグループ、第Ⅲグループは3要素が全て対照と比較して低い値を示すグループとして分けられている。このⅢグループは主に実験Ⅳの各時間帯の平均値で占められているが、実験Ⅳの対照値も低い値であるところから、この実験Ⅳの魚群は生理学的に何らかの問題を含んでいたのかもしれない。

酸素分圧低下時の反応から魚のストレスの程度を分類しようとした試みでは、温度や塩分変化の時の反応の分類時（第2節、第3節）のように、浸透圧失調を起したと考えられる相(疲弊相)を欠いているが、個体毎のデータでみるとこの相に属すると考えられる個体も認められる。この疲弊相の欠如は、実験条件がグループとしての疲弊相を生ずるのに十分でなかったためであろう。

## 第5節 麻酔、取り扱い時の血液状変化

活魚の輸送、採卵、採精、仕分け、標識づけ、体重測定などにあたっては、魚を取り上げて作業せざるをえない。この時、魚は暴れるので作業が円滑に行われないと同時に、魚は生理学的に大きな変動を経験し、その後の摂餌、成長、生残等に影響を与えることはよく知られている。これらの問題を解決するために、作業時には麻酔剤が使用されることも多い。取り扱いや麻酔時の魚の生理学的変動に関しては主にニジマス、コイ、ティラピア等の淡水魚で、ホルモン、血液性状、血液成分、心拍数等についての報告がみられる。

ここではマダイを麻酔した時や各種の取り扱い時に血液性状や成分に現われる変化を知るための実験を行い、この時のストレス反応の特徴を明らかにしようとした。

### 1. 実験方法

実験Ⅰ：緩やかな取り扱いの影響をみるため、300l 水槽 2 個に マダイ 1 年魚（平均値±標準偏差：体長 $13.0 \pm 0.29$ cm，体重 $66.1 \pm 4.28$ g）を 5 尾ずつ収容した。対照群の魚は 1 尾ずつネットで取り上げ直ちに採血を行った。5 尾の採血には約 10 分間を要した。実験群は、1 尾ずつ手網で取り上げた後、その手網の中で 1 分間空中に放置した後採血を行った。実験水温は $16.2^{\circ}\text{C}$ であった。

実験Ⅱ：通常の魚の生理学的実験のための手術程度の取り扱いの影響をみるために、胃中に餌を強制投与する方法を用いた。供試マダイの尾叉長、体重はそれぞれ $12.8 \pm 0.87$ cm， $58.7 \pm 12.25$ g（平均値±標準偏差）であった。餌料は細切したマダイ筋肉を用いた。マダイは 1 尾ずつ取り上げ、MS 222 100 ppm で約 2 分間かけて麻酔し、塩化ビニールチューブを胃中に挿入し、ガラス棒で餌料約 1 g を胃中に押し込んだ。この間 1 尾あたり 5～7 分を要した。25 尾についてこの取り扱いを行い、その後 1 トンのコンクリート水槽に収容した後、経時的に 5 尾ずつ取り上げ採血を行った。対照としては餌料を挿入しないほかは全く同じ取り扱いをしたマダイ 5 尾について実験開始後 24 時間を経て採血したものをを用いた。水温は $18.0^{\circ}\text{C}$ ～ $19.0^{\circ}\text{C}$ であった。

実験Ⅲ：供試魚の尾叉長と体重はそれぞれ $15.9 \pm 0.23$ cm， $88.6 \pm 3.94$ g（平均値±標準偏差）のものをを用いた。麻酔剤 MS 222 (Ethyl m-aminobenzoate methanesulfonate) 濃度を 100 ppm と 50 ppm とした海水 30 l に 5 尾の魚を収容した。麻酔剤を中和することはしなかった。100 ppm の場合には麻酔液に収容後 2～10 分間ですべての魚が横転したが、50 ppm の場合には約 15～30 分間を要した。両濃度で横転した魚は直ちに取り上げ採血した。この実験の間それぞれの水槽では十分にエアレーションを行った。水温は $26.4^{\circ}\text{C}$ であった。

### 2. 実験結果

実験結果はまとめて Table 12 に示した。

実験Ⅰのネット内で 1 分間空中放置という条件では、測定項目中ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、グルコース量、ナトリウム量、塩素量、コーチゾール量では有意な変動は認められなかったがカリウム量のみ有意な減少が検出された。

実験Ⅱはより苛酷な条件として設定されたが、24 時間後の対照区と比較すると、グルコース量は取り扱い直後（0 時間）から有意に高い値を示し、2 時間後に最高値を示した。ヘマトクリッ

Table 12. Hematological characteristics and serum constituents of the red sea bream exposed to handling and to anesthetics (mean±s.e. n=5).

Experimental conditions	Hemoglobin (g/dl)	Hematocrit (%)	Serum constituents				
			Glucose (mg/dl)	Sodium (mEq)	Chloride (mEq)	Potassium (mEq)	Cortisol (ng/ml)
<b>Handling I</b>							
Control	5.3±0.51	25.5±2.73	47.6±1.50	168.6±2.53	176.5±2.39	7.40±0.77	t
Hanging in the air within net for 1 min.	5.4±0.13	29.7±0.62	51.1±3.95	166.8±2.63	176.5±0.80	4.78±0.34 <sup>3)</sup>	7.0
<b>Handling II<sup>2)</sup></b>							
Time elapsed (h)							
0	6.9±0.32	35.4±1.35	117.8±12.16 <sup>3)</sup>	211.7±8.21	197.6±7.63	8.17±0.42 <sup>3)</sup>	—
1	5.9±0.67	32.4±3.86	187.2±24.84 <sup>3)</sup>	203.5±9.01	181.6±2.99	8.05±0.90	—
2	5.7±0.63	33.0±1.89	209.5±51.70 <sup>3)</sup>	222.4±5.62	175.5±6.22	7.53±0.36 <sup>3)</sup>	—
4	4.7±0.31 <sup>3)</sup>	26.4±1.09	157.5±34.11	214.5±10.55	178.4±3.68	6.11±0.39	—
8	6.3±0.27	28.9±2.77	100.2±28.38	216.9±9.98	184.2±3.44	7.41±0.46	—
24(Control) <sup>2)</sup>	6.4±0.34	30.1±1.61	77.7±5.92	200.9±7.45	187.8±4.88	5.9±0.46	—
<b>Anesthetics</b>							
Control	5.9±0.62	35.3±4.32	67.4±6.74	194.4±3.18			
MS 222 100ppm <sup>4)</sup> (2-10 min)	6.11±0.55	43.9±3.29	76.5±4.32	204.3±5.53			
MS 222 50ppm <sup>4)</sup> (15-30 min)	4.0 <sup>3)</sup>	36.9±2.07	245.1±29.88 <sup>3)</sup>	217.6±3.86 <sup>3)</sup>			

1); The fish were netted, anesthetized and inserted red sea bream flesh through the polyvinyl tube into the stomach. Those handling necessitated about 5 minutes.

2); Control fishes were handled as same as others without food insertion by polyvinyl tube into the stomach.

3); Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

4); Immediately after loss of equilibrium.

t; undetectable.

ト値は取り扱い直後にやや高い値が認められるものの有意差を生ずるには至らなかった。ヘモグロビン量は4時間後に有意に低い値を示し、この時にはヘマトクリット値もやや低い平均値を示した。カリウム量は実験Ⅰの場合とは異なって、取り扱いによって有意に高い値が得られた。ナトリウムとクロライド量では有意な変動は検出されなかった。

麻酔剤に魚を浸漬した実験の中(実験Ⅲ)、100ppmで短時間で横転した場合の魚のヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血清グルコース、ナトリウム量はやや増加する傾向は認められたが対照区と比較して有意差を生ずるには至らなかった。一方、50ppmで横転までに15分以上かかった魚ではヘモグロビン量の有意な低下、血清グルコース量の著しい増加と血清ナトリウム量の増加が認められた。

### 3. 考 察

#### 1) 取扱いのストレスサーとしての意義

最近、取り扱い(handling)に関する生理生化学的研究は多く、特に魚のストレス反応に関して報告されているストレスサーの過半数は“取り扱いストレス”である。細かく条件を調べれば多くの相違は認められるものの“取り扱い”の内容は何らかの方法で魚を捕獲し、魚を空中に取り出し処置し、あるいは放置し、さらに水槽にかえずといった操作を含んでいる点では一致している。魚にとっては不本意な強制運動を課せられ、鰓を環境水が灌流することを妨げられること

により急激な窒息状態に陥とし入れられるという負荷をかけられたことになる。

さらに広い意味での“取り扱い”という場合には麻酔での処理もその過程の中に含まれる場合がある。“麻酔する”ということは、狭義の“取り扱い”に加えて、吸収された麻酔剤の作用により呼吸運動も含めて運動機能を低下させるという側面がある。魚が生きている限り自律神経系はなお機能を継続しているがその変調があることは考えられる。これらの“取り扱い”や麻酔による魚の生理学的攪乱 (physiological disturbance) は種々な角度から研究の対象とされている。最も多いのは血液性状、血漿、血清成分の変化であるが、他に酸素消費量 (BEGGS et al. 1980, 田村ら1967)、行動 (McFARLAND 1960)、心拍数 (LEIVESTAD et al. 1957, RANDALL 1962, HOUSTON et al. 1973)、体温変化 (KONAGAYA 1977)、体表粘液細胞の大きさ (PICKERING and MACKEY 1977)、粘液中のヘモグロビン様物質 (SMITH 1976)、血液酵素活性 (BOUCK et al. 1978)、体重変化 (STEVENS 1972) 等が、淡水魚と海産魚で調べられている。

## 2) グルコース量

血液性状や血漿、血清成分のうち、“取り扱い”や麻酔時の変化で最も報告例の多いのは血糖値の変化である。いずれも今回のマダイ実験結果と同様、“取り扱い”時にはその増加が報告されている。古く NAKANO and TOMLINSON (1967) はニジマスの尾部をつかんでふりまわした後の血中アドレナリン、ノルアドレナリン、グルコース量の増加を認めているし、CHAVIN and YOUNG (1970) はキンギョの水槽移し換えで著しい高血糖をみている。WARDLE (1972) はヒラメの一種、*Pleuronectes platessa* をひき網あるいはトロールで捕獲した後の血中グルコース量の経時的变化を追跡し、数時間から数日にわたって高血糖が続くことを報告している。

WEDEMEYER (1972) は coho salmon や steelhead trout の幼魚を10尾づつネットに入れ25m離れた水槽に移す操作で高血糖が顕著であったとし、UMMINGER (1973) はキンギョに生理的食塩水を注射するという操作で高血糖を観察した。池田 (1976) は酷い取り扱いでハマチの血糖値が有意に増加すると報告し、SOIVIO and OIKARI (1976) はカニューレーションを施した *Esox lucius* を円筒に入れ、これを円筒毎20秒間持ち上げる操作をくり返した時の血中乳酸、グルコース、無機塩類、ヘモグロビン、ヘマトクリット値を経時的に測定し、高血糖をみており、CASILLAS and SMITH (1977) もニジマスを釣でつり下げた後の高血糖を観察している。

PASANEN et al. (1979) は野外で捕獲した魚を麻酔し標識をつけ30分後再び取り上げた時の血中グルコース、乳酸の動態を報告し、STRANGE (1980) は channel catfish (*Ictalurus punctatus*) 40尾をネットに入れ、28×28×10cmの中に数分から3日にわたって保持し、血中コーチゾール、グルコース量の時間的変化を調べ、いずれも高血糖を報告している。PICKERING et al. (1982) は brown trout (*Salmo trutta*) をハンド・ネットで取り上げ、小さな水槽に2分間閉じ込めておくという操作が血中コーチゾール、グルコース、乳酸値を高くすると報告している。本研究のマダイの取り扱い実験Ⅰではグルコース値は特に変化しておらず実験Ⅱでの値(0時間)は大きく増加している。これは、取り扱いの“強度”がグルコースの増加速度に影響するものと考えてよいであろう。取り扱いの“強度”を量的に表示することは大変難しいが逆に血中グルコースやコーチゾール濃度の変動で評価することはできる。

“取り扱い”の影響を極力少なくし麻酔をかけた時、麻酔剤の効果を、魚のストレス反応の程度によって判定しようとする考え方の報告には、血糖値の測定が多い。SOIVIO et al. (1977) のニジマスで行った MS222, 中和 MS222, Benzocaine の血液性状に与える影響実験では、麻酔中の低血糖とそれに引き続く覚醒期の高血糖が報告されている。麻酔直後の血糖値が大きく変動しないことは WEDEMEYER (1970) がニジマスにおける MS222, 中和 MS222, Benzocaine の影響の実験で、HOUSTON et al. (1971) が brook trout (*Salvelinus fontinalis*) に対する tricaine methanesulfonate の影響実験で、SMIT et al. (1979 a, b, c) のコイ、ティラピア、ニジマスに対する MS222, 中和 MS222 の影響の実験結果ですべて一致している。これらは本実験で得られた 100ppm MS222 麻酔の場合と類似した結果となっている。しかし、50ppm の麻酔では麻酔に要する時間が長く、有意な高血糖値は“取り扱い”および麻酔のための呼吸機能低下による低酸素症等二次的複合的ストレスの影響が遅延して発現する時点を把握したためと考えられる。この濃度による血液性状の変化については FERREIRA et al. (1981) も淡水魚で同様の傾向を得ている。

### 3) 血中無機成分量

取り扱いストレス時の血中無機イオンの変動については、魚種や条件等によってその在り方が異なっている。WEDEMEYER (1972) は前述の取り扱い条件で coho salmon と steelhead trout で血中クロライド量は低下したと述べており、SOIVIO et al. (1977) は汽水中の northern pike では“取り扱い”により血漿ナトリウム量はほとんど変動せず、血漿カリウム量が一時的な増加や数時間後の減少を示すと述べている。池田 (1976) もハマチで苛酷な取り扱いが血中カリウム、ナトリウム、クロライド量を増加させるとしている。BEGGS et al. (1980) は *Esox masquinongy* で“取り扱い”後血中ナトリウム量の変化はないが、弱った魚ではカリウム量が高かったとしている。

麻酔中や回復期の血中無機塩の変動はナトリウム量に認められ、HOUSTON et al. (1971) FERREIRA et al. (1981) が淡水魚で報告している。本研究のマダイでも MS222 50ppm 麻酔で血清ナトリウム量の有意な増加が認められており、報告例と一致している。海水魚でのナトリウム量の増加は魚体の脱水による濃縮と海水ナトリウムの流入で説明されるが、淡水魚での増加の理由は明らかでない。

### 4) ヘモグロビン量とヘマトクリット値

ヘモグロビン・ヘマトクリット値の変動は魚種に関係なく一定の傾向がみられる。本研究のマダイの実験条件では、ヘマトクリット値は取り扱い直後にやや高い値を示す傾向がみられたのみであったが、BOUCK and BALL (1966) はニジマスで種々な捕獲方法を行った時にヘモグロビン量、赤血球の大きさ、蛋白質濃度が変化するとしており、さらに別の実験でヘマトクリット値が大きく変動することを報告している。CASILLAS and SMITH (1977) はニジマスで取り扱い時に血液凝固時間は減少し、栓球数、ヘマトクリット値は増加したとし、PICKERING et al. (1982) は *Salmo trutta* で血漿中 lymphocyte 数が増減するとした。

麻酔後のマダイの血液性状変化ではヘマトクリット値の増加傾向がわずかにみられる程度であ

るが、この値の増加は HOUSTON et al. (1971) FERRIRA et al. (1981), SOIVIO et al. (1977) が淡水魚で報告し、その理由として HATTINGH (1977) は MS222 が直接血球の膨潤を起すとしており、SOIVIO et al. (1974, 1978) は MS222 による鰓血管中の血液稀釈や腎血管中の赤血球凝集を報告している。

#### 5) ホルモン

ストレス反応をホルモンの動態で把握しようという観点から、血中カテコラミン、コーチゾール等の測定も行われている。マダイの取り扱い時のコーチゾール量変化は明確でないが、種々なストレスでのその変化は明らかである(石岡1980a, 1980b, 1982)。SPIELER (1974) はキンギョで、PICKERING et al. (1982) は brown trout で、STRANGE (1980) は channel catfish で取り扱いストレスでいずれも増加すると報告している。麻酔時のこのホルモンの増加に関しては STRANGE and SCHRECK (1987) が Chinook salmon で、WEDEMEYER (1970) がニジマスで観察している。

#### 6) 反応の時間的経過

血液性状の“取り扱い”や麻酔後の変化については、魚種、取り扱い条件等の違いはあるものの、最も興味をひく点は反応の時間経過である。本研究のマダイの実験では処理直後よりも、その後の時間経過の中で反応が極大に達する時点が認められている。特に血糖値の変動については、最高血糖値に至るまでの時間が長いことが明らかであり、これに関与する要因はストレスの強さと水温にあると考えられる。実験Ⅰと実験Ⅱの取り扱い直後の反応の相違は刺激量の大きさの差によると考えられるが、さらに実験Ⅰのような取り扱い条件で対照区との有意差が生じなかったのは、十分な反応を起こす時間が不足した可能性もある。類似した現象は CHAVIN and YOUNG (1970) も報告しており、変温動物での time lag は極めて大きい。STRANGE (1980) は反応の大きさと起こり方が温度に依存することを明らかにした。

本研究の結果や文献から、取り扱いや麻酔実験で時間経過の明らかなものを選び出し Fig. 16 に示した。全体の傾向をみると、ヘモグロビン量やヘマトクリット値の増加反応は分の単位で起こっているが、グルコース量やコーチゾール量の増加反応は数10分後から数時間にわたって認められる。乳酸増加の反応はこれらに先行するようである。血中無機塩ではナトリウムやクロライド量等の変動はあまり大きくなく、変動する場合にもその方向は一定しない。むしろ、早い時期に起こるカリウム量の変化が興味深い。環境要因が起こすマダイのストレス反応をみた実験(第2, 3, 4節)では、ヘマトクリット値上昇とグルコース量増加の反応は比較的遅い同一時期に起こっており、反応期の特徴となっていたが、麻酔や“取り扱い”時には血液性状変化の反応が早い時期に進行しているという特徴がある。しかも、血液性状や血中無機塩の動態の方向は報告により必ずしも一致していない。大きな変化を示すものは医学的にはショックといわれる症状を伴う反応が進行していると判断した方がよいようにも思える。ショックとは毛細血管透過性の増加による循環血液量の進行性減少を特徴とした臨床上的の状態と定義されている。SOIVIO et al. (1974) は麻酔時のニジマスの腎臓で組織の浮腫、毛細血管や類洞での血球凝集、血流停滞や鰓血管中の血液稀釈等を報告しているが、これはショック症状を裏付けるものであろう。血液濃縮

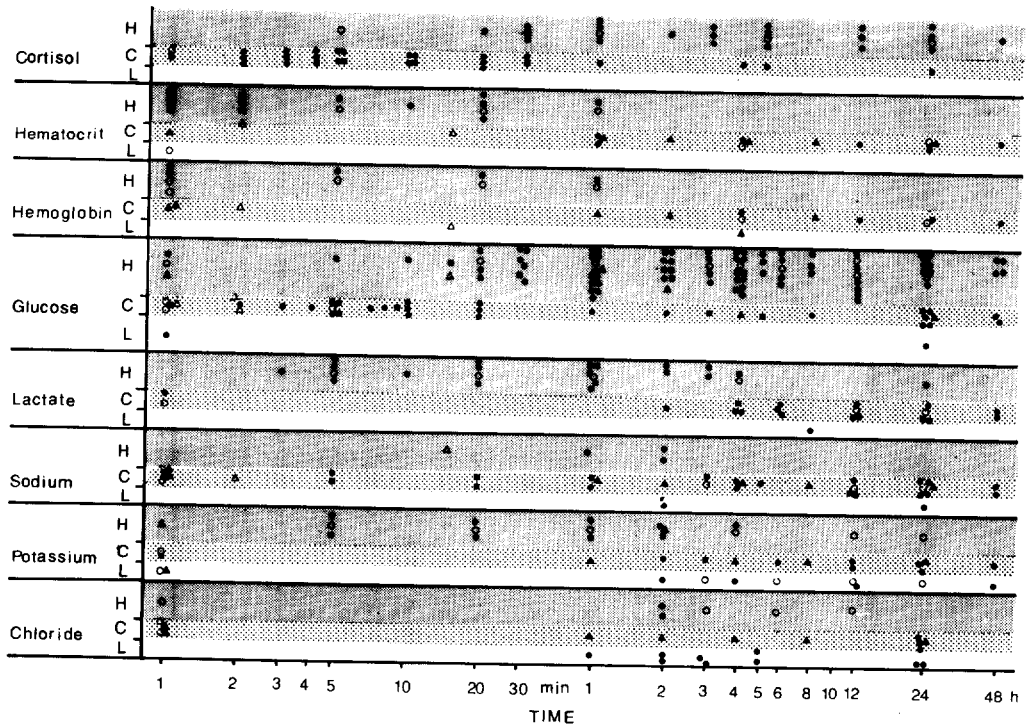


Fig. 16. Review from the references on the effects of handling and anesthetization on hematological parameters and on the blood chemistry. The fishes include rainbow trout, goldfish, carp, plaice, and others (see references).

Open circles; data from the fish treated with MS222.

Closed circles; data from the fish under handling.

Open triangle; data from red sea breams treated with MS222 (present results).

Closed triangle; data from red sea breams under handling (present results).

H; higher levels than controls.

C; control level.

L; lower levels than controls.

や血中無機塩の変動の大きさと反応の速さ等からきたショック症状とみられる報告例を総合すると、魚種やストレスの在り方によって反応の大きさや起こり方が異なるとはいえ、魚が棲息する環境の中で与えられるストレスに比べ“取り扱い”や麻酔のストレスとしての強度は極めて大きいものと考えざるをえない。

“取り扱い”の時に不可避で無理な筋肉運動を麻酔剤の使用は鎮静させる効果や、反射を抑制する効果はあるが、MS222のように中枢作用性を示す薬剤(関沢, 1987)では、それによるストレス反応が遅延して起こることは当然予想されることである。

## 第6節 輸送時の血液性状変化

マダイはほとんど周年にわたり日本沿岸で捕獲され、刺身材料としての需要も多く、活魚の商品価値はきわめて高い。さらに近年はマダイ資源量増加を目的とした種苗放流も盛んに行われる

ようになった。これらの情勢はマダイの活魚輸送の重要性を増し、ひいてはその研究の必要性を増大させている。

魚類輸送時の魚の生理学的性状の変化に関しては古くから興味を持たれ、生理学的観点からのみならず実用的観点からの研究も多い。特に魚の呼吸と排泄の生理学は活魚輸送の基本であるところから重点的に研究された。しかしその基本となる物質代謝面からの研究は局部的には深められているが必ずしも十分ではない。

本節では輸送時のマダイの血液性状に現われる変化をストレス反応の観点からみるために、輸送経過中のマダイの血液のヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量を測定した。

### 1. 実験方法

輸送条件の概要を Table 13 に示した。

実験 I から実験 III までは活魚倉 (1 × 1 × 1 m) を持った小型船舶による輸送実験であり、船底の一部は開口しており、海水交換を行いながらの輸送である。船の速度は 18.5km/h 程度であった。

実験 I は広島県音戸町の広島県水産試験場の生簀網より、同所で種苗生産されたマダイを手網で取り上げ、船に収容し、2 時間かけて水産研究所まで輸送した。

実験 II は広島県沖美町で種苗生産され飼育されていたマダイを取り上げ船で 1 時間輸送した。

Table 13. The experimental conditions during transportations.

Experiment number	Date	No. of fish	Fish size (mean ± s.d.)		Experimental conditions
			Length (cm)	Weight (g)	
<b>Live well transportation by the ship</b>					
I	'76, May. 17	20	12.8 ± 1.18	74.4 ± 19.00	The fish was transported for 2 hrs soon after being transferred from the stock nets to living well with influent sea water.
II	'76, Jul. 22	10	15.2 ± 1.06	122.5 ± 27.91	The same as above but the fish was transported for 1hr. soon after being transferred.
III	'77, May. 30	20	11.6 ± 0.64	51.6 ± 7.46	The same as above but the fish was allowed to recover in the living well for a day before transportation.
<b>Container transportation by truck</b>					
IV	'81, Jun. 11	15	11.1 ± 0.80	30.7 ± 6.78	Five fish were confined in each polyvinyl bag (20 l sea water) with the oxygen gas filled and transported at once.
V	'81, Jun. 12	20	11.5 ± 0.80	32.7 ± 7.54	The same as above but the fish were allowed to recover in the bag for a day before transportation.

water temperature 20.5-21.5°C



実験Ⅲは輸送に入る前段階での取り扱いの影響がかなり大きいと考えられたので、輸送24時間前に船の活魚倉へ魚を収容し放置した後、輸送し、経時的にマダイを取り上げ採血を行った。

実験ⅣとⅤはコンテナによる輸送実験である。二重大型ビニール袋に濾過海水20lを入れ、これに5尾宛マダイを収容し、直後に酸素ガス(99%)を30秒間吹き込んで密閉し、ダンボール箱に入れトラックに積み込んで輸送した。酸素吹き込み直後の溶存酸素量はウインクラー法により14.3ml/lであり、この間の水温は20.5~21.5℃であった。

この際次の2つの取り扱い法を用いた。実験Ⅳはストック水槽から取り上げて直ちにコンテナに移し輸送を行った。実験Ⅴは取り扱いの影響を除くために、輸送の24時間前にマダイを輸送コンテナに収容し、その容器内でエアレーションを行った。

コンテナ輸送中の溶存酸素量は酸素吹き込み直後よりやや多く、1時間輸送以後全実験期間を通じて $16.1 \pm 1.60 \text{ ml/l}$  ( $n=12$ )であった。

輸送直前コンテナに酸素を吹き込む前に5尾より採血しこれを対照区とした。

輸送中、および輸送後の適当な時期に5尾づつ収容のコンテナを1個毎開封しマダイのキュービエ氏管より採血し、これらよりヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量の分析を行った。

## 2. 実験結果

ヘマトクリット値の推移を Fig. 17 に示した。全体的に個体差が大きい、船舶輸送とコンテナ輸送では様相が異なっている。活魚倉輸送の場合、実験ⅠとⅡでは1時間、2時間の輸送直後

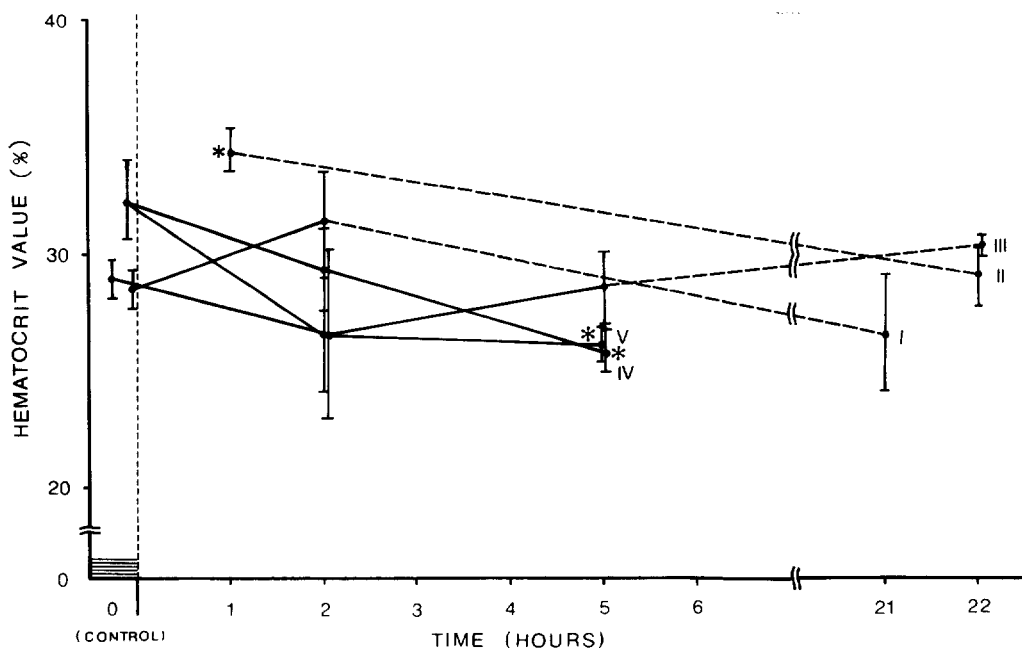


Fig. 17. Hematocrit values of the red sea bream during (solid line) and after (dotted line) transportation (mean  $\pm$  s. e.). I-V; Experiment number. \*; Significantly different from 0-hour control value ( $p \leq 0.05$ ).

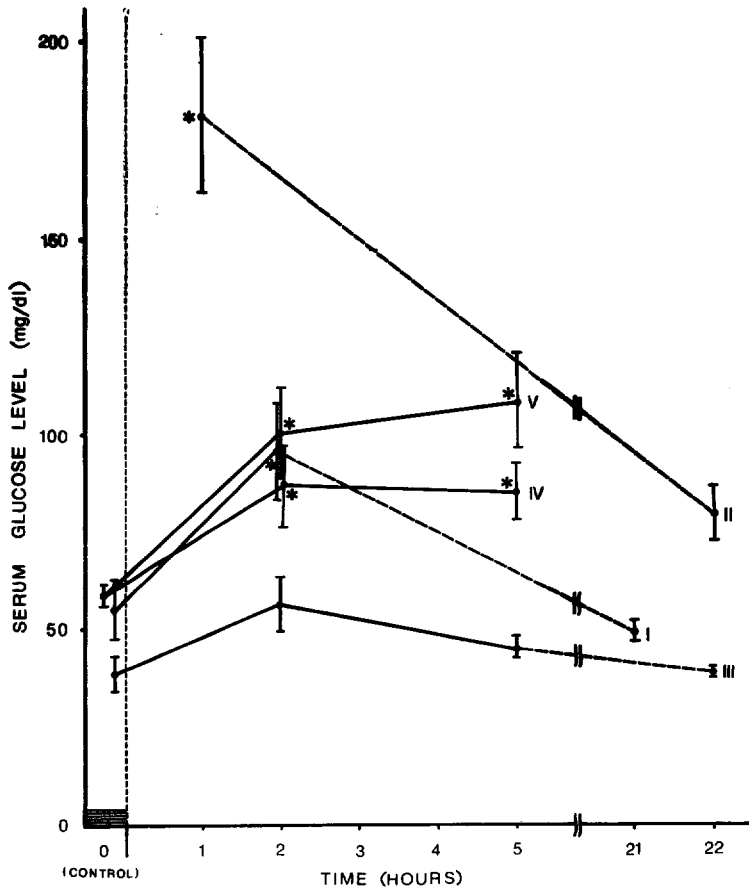


Fig. 18. Serum glucose level of the red sea bream during (solid line) and after (dotted line) the transportation (mean  $\pm$  s. e.).  
I-V; Experiment number.  
\*; Significantly different from control levels ( $p \leq 0.05$ ).

の値は対照値や回復後の値に比べて高い傾向が認められるが、実験Ⅲのように輸送直前の“取り扱い”の影響を避けた実験ではほとんど変化が認められなかった。コンテナ輸送の場合には輸送終了時には有意に低いヘマトクリット値が得られた。

血清グルコース量の変化を Fig. 18 に示した。この値は大きく変化するが、輸送方法によって変化の様相や変化の程度が異なった。活魚倉輸送Ⅰ、Ⅱでは輸送終了後のグルコース量は極めて多いが、実験Ⅲではわずかな上昇の傾向は認められたものの対照区との間に有意差は生じなかった。コンテナ輸送では、実験Ⅳ、Ⅴ共に同程度のグルコース量増加が認められ、有意に高い値を示した。

血清ナトリウム量は対照区の値をみても実験の時期や年度によって値が大きく異なっている (Fig. 19)。船舶輸送の場合には、実験Ⅰ、Ⅲでいずれもゆっくりとした増加の傾向が認められたが、実験Ⅱの1時間輸送直後には24時間後の値と比べるとその傾向はみられなかった。トラック

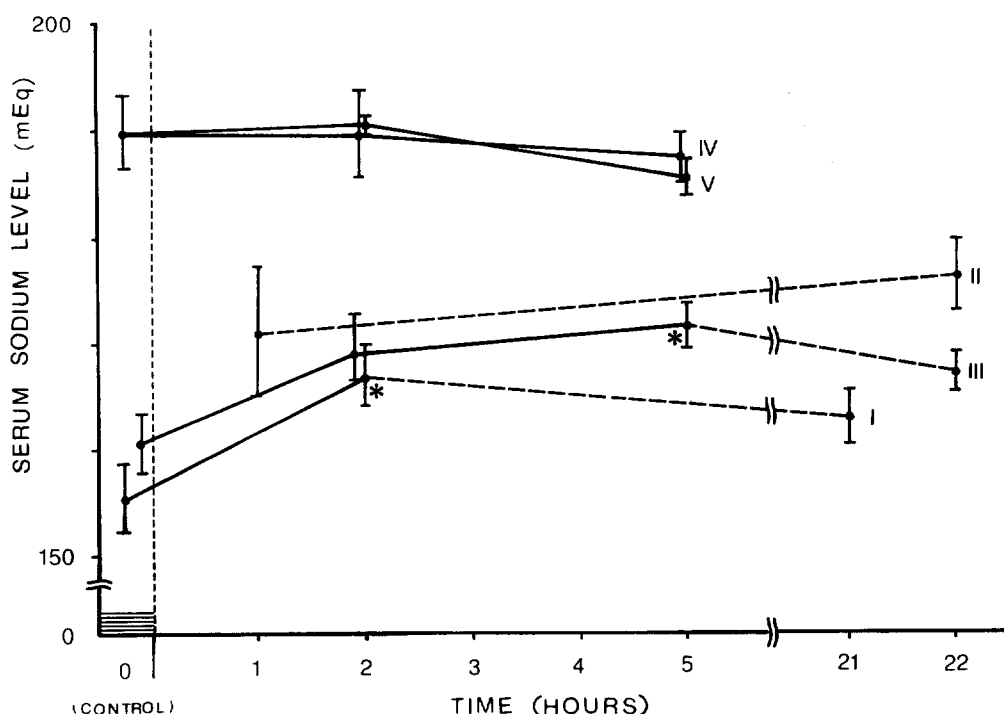


Fig. 19. Serum sodium level of the red sea bream during (solid line) and after (dotted line) transportation (mean  $\pm$  s. e.). I-V; Experiment number. \*; Significantly different from control levels ( $p \leq 0.05$ ).

輸送の実験では輸送期間中いつでも非常に高い血清ナトリウム量を示すが、経時的に増加あるいは減少の傾向は認められなかった。

### 3. 考 察

輸送される魚はその過程で、ネットによる移しかえ、強制運動、強制収容、環境要因（温度、酸素量等）の変化、振動、高密度収容、水質悪化、高溶存酸素量等のストレスに複合的にかつ連続的に曝露されることになる。これら個々のストレスに対する魚の反応は生理学的観点から研究されたが、輸送が魚に与える総合的な影響についても実用的な必要性から古くから研究されている。その内容は大きく分けると、輸送方法の技術的問題を中心課題としたものと、輸送が魚類の生理におよぼす影響を中心としたものとの二つに分けられる。後者についてはストレス反応の概念を根底に含んでいるものも多い。

輸送が魚の生理に与える影響としては、輸送中の魚の酸素消費量が多く測定された（林, 1977）。この時の魚の血液酸素結合能等も測定され、板沢（1982）は水無し輸送、タンク輸送、プラスチック袋輸送時の酸素収支をまとめており、水中の炭酸ガス、pH、アンモニア、懸濁物、温度、魚の興奮等が、輸送中の魚の酸素収支に影響を与えている。

マダイに関して諸岡（1967）によると、活魚輸送の実際では、水温15~20℃で酸素消費量120 ml O<sub>2</sub>/kg·h を概算の基礎とすればよいとしている。田中（1965）も小ダイでこれに近い値を示

し、輸送前の“取り扱い”の影響が数時間にわたって残ることを報告している。

興奮や“取り扱い”に関する魚のストレス反応の報告は第5節に述べたように最近多くなってきているが、輸送時の反応もこの観点からの研究がみられるようになった。

### 1) コーチゾール量

輸送時の内分泌系反応としては血中コーチゾール量が定量されている。SPECKER and SCHRECK (1980) はギンザケ (*Oncorhynchus kisutch*) 稚魚を 200l のプラスチック容器に入れ陸上輸送し、収容密度、海水、淡水の種類等にかかわらず、輸送直後には極めて高い値を得ている。また、BARTON et al. (1980) もニジマス稚魚で捕獲からトラック輸送を経て再収容までの経過中の血漿コーチゾール量の変動をみており、この影響は数日間残るとしている。さらに、この傾向は通気方法や食塩添加、麻酔、低温輸送等輸送条件を変えても変わらず、現在の技術水準ではストレス反応を阻止することはできないと結論した。

### 2) グルコース量

内分泌系反応以外で最も顕著な変化は本実験で明らかにされたように血糖値の上昇である。しかし、輸送中に血糖値を測定した例は少なく、また、本実験にもみられたようにその測定値のばらつきは大きい。TANDON and JOSHI (1973) はナマズ (*Heteropneustes fossilis*) を河から取り上げ、水槽に入れ、実験室まで運ぶ過程を経た後の魚の血糖値の変化を追跡しており、一過性の著しい増加を報告している。FLETCHER (1975) もヒラメ類 (*Pseudopleuronectes americanus*) を野外で捕獲し、研究室まで輸送した時の血液成分を調べ、血中グルコース量は増加したとしている。PASANEN et al. (1979) も *Coregonus albula* で捕獲、輸送、標識付け等の後の血中グルコース量と血中乳酸量を測定し、数時間を経ても非常に高い値が継続することを報告している。ALDRIN et al. (1979) はギンザケを輸送した時、平均値で有意差は生じなかったが、輸送後数時間は高い値がみられるとしている。

今回の実験で、船舶による輸送では“取り扱い”の影響を除くために24時間後に輸送した時にはグルコース量の変化は大きくないという点とコンテナ輸送時の高い溶存酸素分圧と狭い容器への収容の場合には事前の“取り扱い”条件の有無にかかわらずグルコース量が有意に増加したという事実は、輸送時の“取り扱い”と環境条件の変化が血糖値を大きく左右する条件となっていることを教えてくれる。

### 3) 乳 酸

輸送中の魚の乳酸生成については、輸送時の酸素供給量の不足と魚の嫌氣的代謝の関係の観点から注目され、比較的早くから研究が進められた。HAYASHI et al. (1964) はニジマスについて輸送時の血液と筋肉中の乳酸量は輸送開始数分で増加するが、時間が経つにつれて減少する傾向を示し、乳酸生成量は絶食魚で少なかったとしている。TANDON and JOSHI (1973) はナマズで輸送後数時間に血中乳酸量が最大になることを報告し、PASANEN et al. (1979) は乳酸量の一時的増加では季節によってその程度が異なることを報告している。これら血中乳酸量の増加は筋肉中に生成された乳酸に由来すると考えられており、HAYASHI et al. (1964)、井上・古市 (1979) によるニジマスやマダイの例にみられるように、輸送中の筋肉中乳酸含量は血中乳酸量に比べて高い

値を示した。最近、WARDLE (1978) は筋肉組織から血中への乳酸の放出はアドレナリンによって制御されると報告している。

#### 4) 無機成分量

輸送による浸透圧変化や血中無機塩量の変動についての報告もいくつかみられる。HATTINGH and PLETZEN (1974) は淡水魚ナマズ (*Labeo umbratus*) を空気の吹き込みと酸素95%炭酸ガス5%の混合ガス吹き込みを行いながらタンクで輸送した時の1, 2日後の血液性状は2週間以上経過した後の血液性状と比べて浸透圧が低下していると述べており、FLETCHER (1974) は海産魚ヒラメ類で捕獲して輸送した後に血漿浸透圧, 血漿ナトリウム量, クロライド量, カリウム量が増加しているとしている。ALDRIN et al. (1979) はギンザケの血中ナトリウム量は淡水での輸送により増加し, 塩素量とカリウム量は減少したと報告している。本研究のマダイでは船舶輸送の場合に血清ナトリウム量の一時的増加が認められる場合があったが, コンテナ輸送時には特に大きな変化は認められなかった。この実験結果や諸報告から判断する限りでは血中無機塩の変動様式は必ずしも一定ではない。淡水と海水の違い, 経時的な条件変化などにより複雑に変動するのであろう。

#### 5) ヘマトクリット値とヘモグロビン量

ヘマトクリット値等の血液性状については, ALDRIN et al. (1979) はギンザケで, FLETCHER (1974) はヒラメ類で輸送後数時間のヘマトクリット値が極めて大きくなるとしている。しかし, HATTINGH and PLETZEN (1974) は輸送後1~2日にはヘマトクリット値は低下すると報告しており両者は一致していない。これは淡水と海水の違いや対照との比較の基準や時間的経過に相違があるので, 同一の傾向を得ることができなかったのはむしろ当然であるかもしれない。詳細な経時的变化を追跡する必要があるであろう。

今回のマダイ実験結果でも, 明瞭な一定の傾向は認め難かった。船舶輸送実験Ⅱで輸送直後に有意に高いヘマトクリット値が認められているが, 実験Ⅲの“取り扱い”を除いた条件では有意差のある値を得ていない点から, ヘマトクリット値の増加は“取り扱い”の影響が大きいと考えた方がよい。実験ⅣとⅤのコンテナ輸送の場合には5時間輸送後にヘマトクリット値の有意な低下を得ているが, 時間経過と値からみて, 酸素ガス通気により溶存酸素量が過飽和になった影響と考えざるをえない。

ヘモグロビン量に関しては, 増加を示す報告 (ALDRIN et al. 1979) もみられるが, HAYASHI et al. (1964), HATTINGH and PLETCHEN (1974) の変化なし, あるいは輸送2日後には低下したという報告もあり, 一致しない。

#### 6) 輸送時のストレス反応の特徴

環境要因変化, 麻酔, 取り扱い時にみられたストレス反応が, 輸送という複合的ストレスに曝される場合でも同様に起こるか否かを検討し, ヘマトクリット値, グルコース量, 血清ナトリウム量に変化が認められる場合があることは今回の実験で確認された。しかしすべての実験例で同一の反応形式がみられなかったことは, 他の諸報告と同様に一つの大きな特徴である。すな

わち反応の大きさや反応が最大に達する時間が実験毎に異なっている。これは輸送条件の中でストレスとして作用する複数の要因のそれぞれの強度と作用時間が異なることに由来すると考えざるをえない。すなわち、捕獲の方法、取り扱い、収容密度、収容水の状態、輸送条件、魚の慣れ等が個々の実験で異なっていたため、同じような様式の反応としては現われにくいものと考えられる。ただし、今回の船舶輸送実験結果や諸報告の反応時間と反応の大きさ等からみると、捕獲や輸送前の“取り扱い”の影響が極めて大きいことは予想される。船舶輸送とコンテナ輸送ではストレスの種類と強度が異なることは当然予想される。どちらの場合も輸送直前の“取り扱い”によるストレスを避けることはできないが、その後の輸送中の水質などの環境要因変化によるストレスの在り方は輸送方法により大きく異なっている。ストレスの点からみれば密閉系のコンテナ輸送よりも活魚倉輸送の方が危険が少ないといえる。

海産魚成魚の輸送は活魚倉のある船によることが多いが、放流等のために卵、稚仔魚、成魚のトラック、航空機によるコンテナ輸送が行われる場合もみられる(橋本1982, 武田ら1972, 村井ら1982)。短時間で遠距離輸送が可能になったので、長時間輸送による高い斃死率などの危険(BOGDAN AND WALUGA 1980)を避けることができるようになったためである。BARTON et al. (1980)が述べているように、生理学的負荷軽減の絶対的条件を探し出すことは困難であるとしても、“取り扱い”方法の工夫や輸送条件の改善によって活魚を疲弊させないように輸送することは可能であろう。新しい輸送方法を確立するために魚の立場からみた新しい考え方や技術が期待される。

## 第7節 釣り上げた天然魚の血液性状

養殖魚と天然魚については、形態、化学的成分、生理・生態学的特性の相違が種々な観点から

報告されている。マダイについても形態学、体成分の比較等が行われているが、捕獲や飼育による生理学的影響を受けていない天然魚の入手が困難なため血液性状に関する報告はみられない。そこで本節では天然のマダイを釣り上げた時の血液性状と成分を測定し、その結果を養殖魚のストレス時の結果と比較することで天然マダイの釣り上げ時ストレス反応の特性を明らかにすることを試みた。

### 1. 実験方法

天然マダイの釣調査は1975年から1979年の5月、6月、7月に行った。魚は広島県豊島周辺海域において釣り上げたものより採血した。豊島周辺の地図を Fig. 20 に示

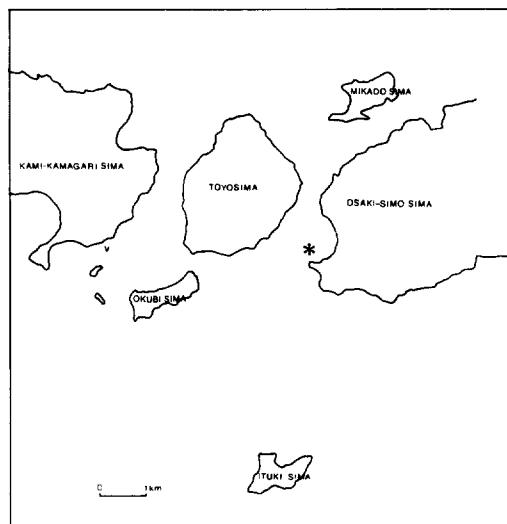


Fig. 20. The area where wild red sea breams were angled. \*; Fishing ground.

した。特に豊島と大崎下島間の保育魚礁を中心として釣りをを行った。3艘の活魚倉を備えた舟を流れに沿って流しながら釣り上げ、ただちにキュビエ氏管から注射器により採血を行った。血液は氷冷しておき2時間後に陸上で血清分離を行った。可能な場合には一部はヘパリンソーダを加えた注射器で採血し、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量の測定に供した。なお、海上で3艘に分乗しての採血のため、釣り上げから採血までの時間は、1分から10分くらいまでであった。

## 2. 実験結果と考察

釣り上げた魚は0歳魚から4歳魚程度まで種々な年齢組成で、種々な釣り上げ場所と時期のものが含まれているがこれを釣り上げ日ごとの平均値で Table 14 に示した。ヘマトクリット値は0歳魚の試料のみ測定できた。ヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量の値の頻度分布を Fig. 21, Fig. 22, Fig. 23 に示した。ヘマトクリット値は32%以上を示し、第一章の各種実験で用いた対照群の値 ( $31.6 \pm 6.81\%$ ) と比べてやや高い傾向がみられる。血糖値は、釣り上げ日ごとに差がみられるが、対照群の値 ( $60.5 \pm 24.02 \text{mg/dl}$ ) とは大差がない。血清ナトリウム量は、釣り上げ日毎の変動が極めて大きいという特徴がみられる。血清クロライド量はやはりサンプリング日毎に変動はするものの血清ナトリウムほど大きく変化しない。カリウム、カルシウム、マグネシウム量は変動が大きい。

血糖と血清ナトリウム量について、体長との関係をみたが、特に相関は認められなかった。

養殖魚と天然魚では、同一種類であっても種々な差のあることがよく知られている。マダイについても、形態学的な差 (北島1978, 石岡・国行未発表, 松宮ら1982) や体成分の差 (大島ら1983) が報告されている。このことは、マダイの天然海域での生活が生態学のおよび生理学的観点からみても養殖魚のそれとは大きく異なっていることを予想させる。

Table 14. Serum constituents of angled wild red sea breams (mean  $\pm$  s.e., with fish number in the parenthesis).

Item	Date of angling							
	May '75	May '75	May '76	June '76	July '76	July '77	Sept. '77	July '79
Body length (cm)	34.7 $\pm$ 7.80 (12)	24.9 $\pm$ 2.10 (5)	11.0 $\pm$ 2.22 (8)	34.1 $\pm$ 5.38 (12)	13.7 $\pm$ 2.58 (8)	13.8 $\pm$ 3.60 (14)	13.2 $\pm$ 2.99 (10)	13.9 $\pm$ 0.73 (20)
Body weight (g)	1458 $\pm$ 1138 (12)	496 $\pm$ 158 (5)	44.3 $\pm$ 38.2 (8)	1136 $\pm$ 477 (12)	119 $\pm$ 69.2 (8)	106 $\pm$ 103 (14)	98.7 $\pm$ 55.1 (10)	66.3 $\pm$ 10.5 (20)
Hematocrit value (%)	—	—	—	—	—	32.6 $\pm$ 3.65 (7)	38.2 $\pm$ 9.11 (6)	34.6 $\pm$ 2.60 (18)
Glucose (mg/dl)	74.3 $\pm$ 40.53 (11)	48.8 $\pm$ 33.23 (5)	—	—	—	58.3 $\pm$ 19.15 (14)	—	65.2 $\pm$ 6.49 (17)
Sodium (mEq)	187.7 $\pm$ 31.0 (12)	184.0 $\pm$ 7.3 (5)	163.2 $\pm$ 6.7 (7)	170.7 $\pm$ 12.7 (11)	161.6 $\pm$ 7.2 (8)	176.7 $\pm$ 9.3 (13)	—	203.8 $\pm$ 17.2 (15)
Chloride (mEq)	166.2 $\pm$ 20.6 (12)	171.6 $\pm$ 10.4 (5)	161.8 $\pm$ 10.7 (7)	160.6 $\pm$ 6.0 (11)	159.1 $\pm$ 5.1 (8)	169.1 $\pm$ 7.6 (12)	—	—
Potassium (mEq)	2.66 $\pm$ 0.51 (12)	—	7.86 $\pm$ 2.89 (6)	2.42 $\pm$ 0.97 (11)	2.19 $\pm$ 0.90 (5)	5.52 $\pm$ 2.35 (12)	—	—
Calcium (mEq)	—	—	6.43 $\pm$ 0.61 (6)	10.76 $\pm$ 3.08 (11)	7.94 (3)	7.03 $\pm$ 0.57 (10)	—	—
Magnesium (mEq)	0.60 $\pm$ 0.15 (12)	0.39 $\pm$ 0.13 (5)	1.48 $\pm$ 0.38 (6)	3.48 $\pm$ 0.86 (11)	1.94 (3)	2.28 $\pm$ 0.45 (10)	—	—

石 岡

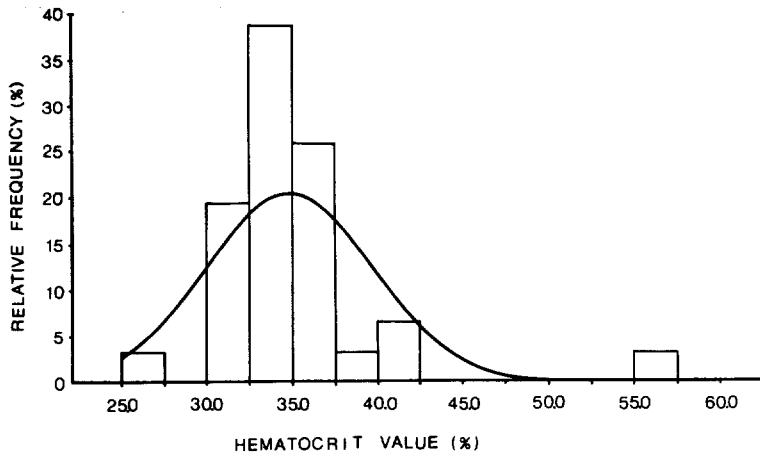


Fig. 21. Histogram of hematocrit values of angled wild red sea breams.

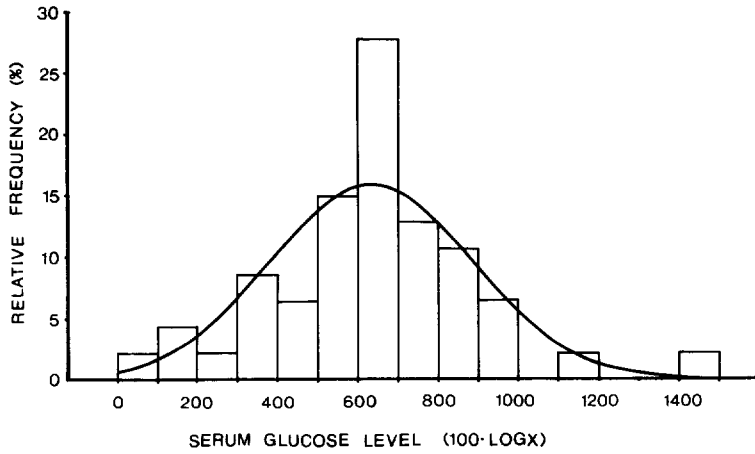


Fig. 22. Histogram of serum glucose levels of angled wild red sea breams.

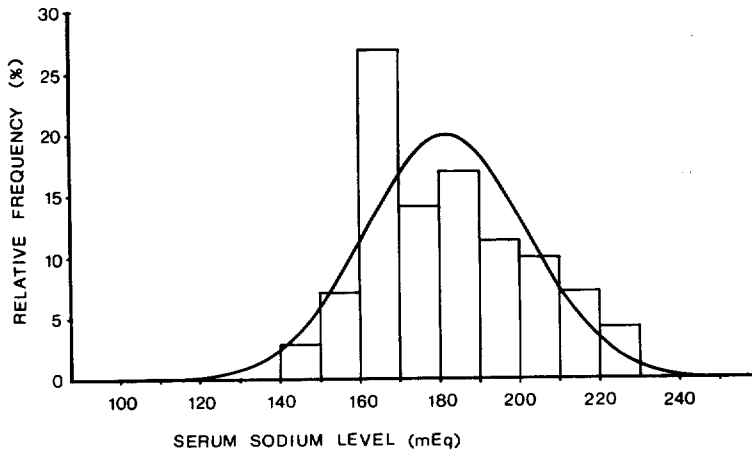


Fig. 23. Histogram of serum sodium levels of angled wild red sea breams.



近年、魚類の血液性状は、養殖魚の健康状態を判定する目的でさかんに測定されるようになった。特に淡水魚のニジマス、カワマス、コイ、ウナギ、アユなどでは赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量などについておおよその正常値が知られている（川津，1980）。しかし、経験的に魚では哺乳類のような標準値の設定は困難であることが指摘されている。

本研究では、天然魚を釣り上げ、その場で採血して、天然棲息時の血液性状成分を推測しようと試みた。しかし、Table 14, Fig. 21, Fig. 22, Fig. 23 に示されているように、値のばらつきが非常に大きく、サンプリング日毎の平均の値が大きく異なるという結果を得た。この海域ではマダイ稚魚の放流が数多く行われた（広島県水試ほか1982）ため、釣り上げた魚群の組成が本当の天然魚と放流魚の混合となっている可能性もあるが、それよりも“釣り上げる”という取り扱いの影響が加わるためとも考えられる。釣り（angling）の影響に関して池田（1976）は、養殖ハマチを対象として、釣り上げ直後の可及的速やかな採血では、血液性状、成分の個体差が小さいが、運搬等の条件が加わると個体差が大きくなるとしている。また、BOUCK and BALL（1966）はルーアーによるニジマスの釣り上げでは、捕獲後の斃死は80%にも達し、ヘモグロビン量と血漿蛋白量がネット捕獲個体とは異なる値を示したとしている。さらに、BOUCK et al.（1978）はニジマスを水槽から釣り上げて血液性状を測定し、ヘマトクリット値が、釣りの場合のように捕獲後あばれる状態では非常に高い値を示したという。さらに、BEGGS and HOLETON（1980）は天然で釣り上げた後輸送し、カニューレを施した *Esox masquinongy* で著しい血中乳酸の増加やカリウム血症を認めており、この場合には30%が斃死している。これらの報告は水中で釣にかかっているから釣り上げて空中で釣を外すまでの時間での魚の激しい苦悶行動が血液性状に大きな影響を与えることを意味しているものと思われる。本実験のマダイの釣り上げ時のストレス状態については第8節で検討したい。

## 第8節 小 括

第2節，第3節，第4節では、それぞれ、環境水の温度、塩分、酸素分圧の変化の幅と変化速度を変えて、これがストレスとなり得ることを報告し、さらに第5節，第6節，第7節では取り扱い、麻酔、輸送、釣り等、魚を扱う一般的作業の中で魚がストレス反応を起こすことを明らかにした。これらストレスの種類が異なっても血液中のグルコースやコーチゾール量の増加、一価無機塩の変動、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値の変動が顕著に認められた。

温度、塩分、酸素分圧については、ストレスとしての強度を物理的尺度で表示できるが、取り扱い、麻酔、輸送、釣り等の場合には極めて困難である。ストレスの物理的強度が明らかな場合にヘマトクリット値、グルコース量、血清ナトリウム量を組み合わせるとストレス反応を相に分けるクラスター分析はそれぞれ各節で行った。各実験の対照群（ストレスを与えていない状態）に対してグルコース量、ヘマトクリット値増加を伴う相（反応相）は3種類のストレスに共通して存在した。温度実験で認められた第Ⅳ期、塩分実験で認められた第Ⅲ期には斃死魚が出ているので疲弊相とした。ストレスの物理的強度が不明な場合や複合している場合にも、前述の各相の特徴から魚に惹き起こされたストレス状態を判定することができると考え

られる。それでストレス強度とストレス反応相が明らかな実験結果をすべてまとめてストレス反応相判定のための資料とした。具体的にいえば、温度、塩分、溶存酸素量変化の3実験の対照相すべての個体のデータを対照群とし、反応相のクラスターに含まれる個体のデータを反応群とし、疲弊相に含まれる個体データを疲弊群とし統合して取り扱った。また、酸素分圧低下実験時の未同定相 (unknown) は別に1群として取り扱った。各ストレス反応相のヘマトクリット値、グルコース量、血清ナトリウム量のヒストグラムを Fig. 24, Fig. 25, Fig. 26 に示した。

ヘマトクリット値では、対照相はきれいな正規分布を示し (Fig. 24)、反応相でも正規性は高く、分布は対照相に比べて高い値の方へ平均値で約16%移動している。しかし疲弊相では分散が大きくなり、正規分布を示さない。グルコース量は対照相を構成しているデータで正規分布を示さず、むしろ対数正規分布に近い。そのため横軸は対数値で示した (Fig. 25)。反応相、疲弊相となるにしたがって分散は大きくなり、対数正規分布からも大きくはずれる。平均値では反応相では対照相の2倍以上を示し、分布の重なりも少ない。血清ナトリウム量は変動がそれほど小さくなく、その分布は正規分布に近いが、やや尖りの鋭い分布となる (Fig. 26)。反応相、疲弊相と移動するにつれて分散は大きくなる傾向はここでもみられる。

個体群にストレスが加えられた時、末梢の血液性状に現われる反応は次のように考えられる。ヘマトクリット値の場合には血液濃縮や貯蔵血球放出などの現象が個体毎の反応速度に応じ

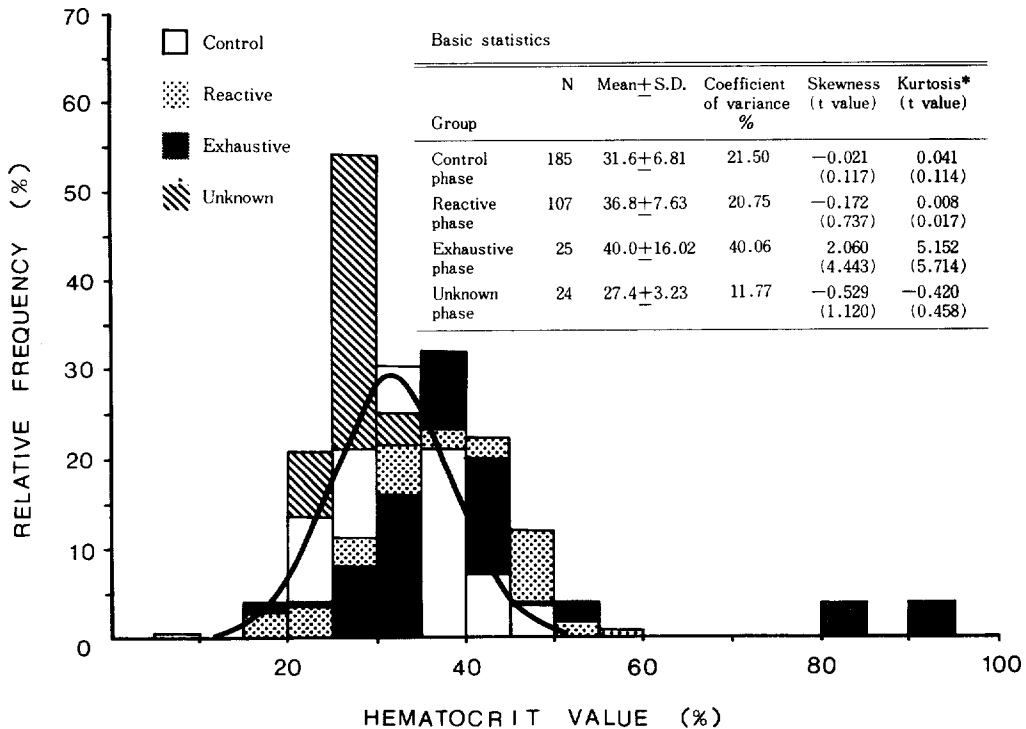


Fig. 24. Histogram of hematocrit values of red sea breams under control, reactive, exhaustive and unknown phases.

\*: calculated by Statistical Methods (5th edition) by G. W. Snedecor 1956.

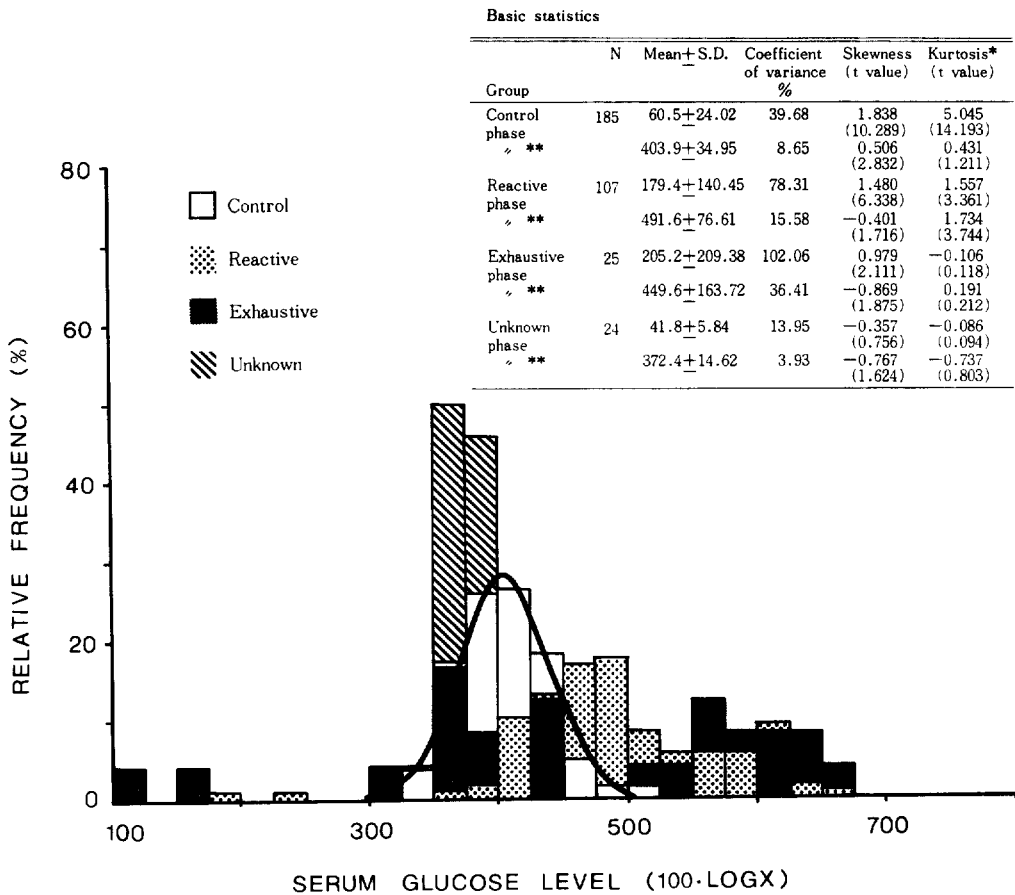


Fig. 25. Histogram of serum glucose levels transformed of the red sea breams under control, reactive, exhaustive and unknown phases.

\*; calculated by Statistical Methods (5th edition) by G. W. Snedecor 1956.  
 \*\*; transformed value (100×log(serum glucose level)).

て起こり、ストレッサー強度が強まるとストレッサーの種類に応じた刺激特有の反応も加わり個体群の分散が大きくなる。グルコース量増加は顕著な共通の反応であるがストレッサーの強度により、また個体の状態により反応速度に差があるため分散を大きくしながら平均値は高い方に移動する。疲弊状態になるとグルコース供給と消費のバランスがくずれ、個体によって低血糖から高血糖に至る広い分布を示す。血清ナトリウム量は浸透圧調節作用の指標となり得る成分であるが、対照相では正規分布を示している。ストレッサーを与えた後には変動し分散が大きくなるが平均値は大きく変動しないのが特徴的である。疲弊相に至るとさらに分散は広がりストレッサーの種類に応じた浸透圧調整機能失調と思われる値がみられる。

これら3変数（ヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量）の実際の測定データは必ずしも正規分布を示すとは限らないが、例数（n）が多い対照相と反応相のデータを基準群として用い、正規分布、または対数正規分布するという仮定の下に種々な条件下の魚個体の

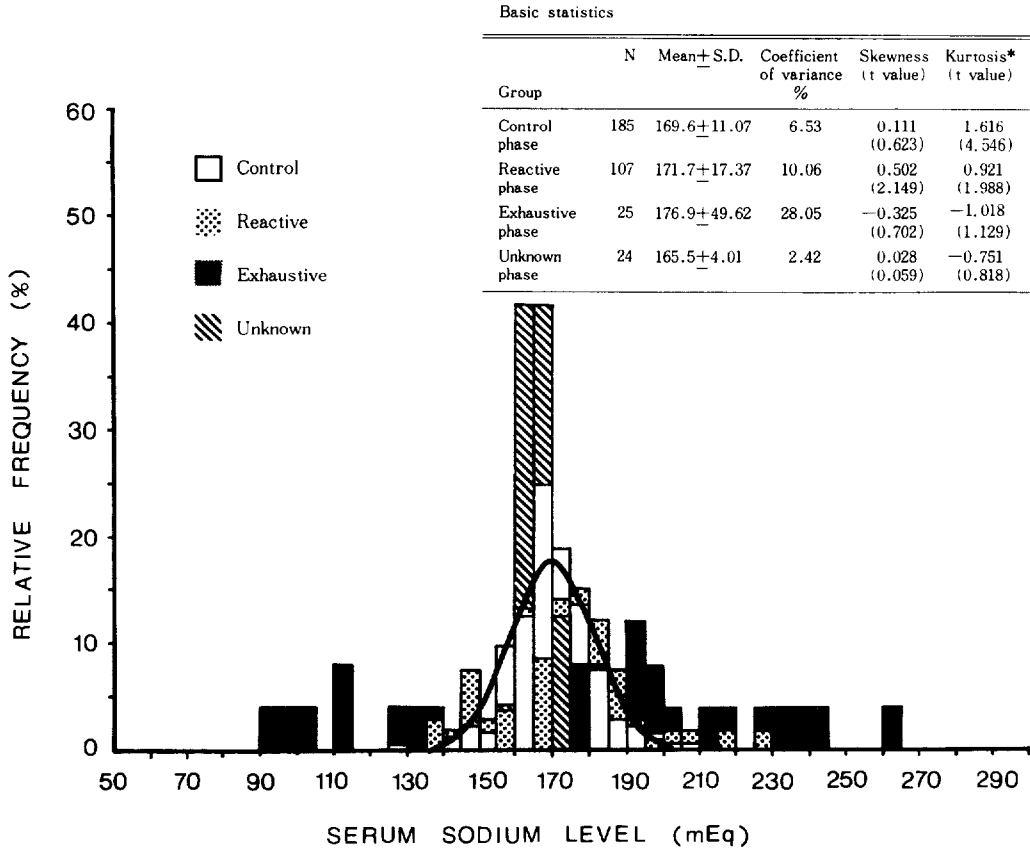


Fig. 26. Histogram of serum sodium levels of the red sea bream under control, reactive, exhaustive and unknown phases discriminated by cluster analysis.

\*; calculated by Statistical Methods (5th edition) by G. W. Snedecor 1956.

ストレス状態を判定するために判別函数分析を行った。なお、3変数の数値は、各実験のクラスター分析の時と同様有効数字3桁の整数としてデータの集計を行った。すなわちヘマトクリット値は10倍し、ナトリウム量は小数点以下の数字を四捨五入し、グルコース値は自然対数に変換した後100倍して小数点以下を四捨五入し、有効数字3桁の整数とした。これを農林水産研究計算センター利用者マニュアル5, MAP にしたがって判別函数分析を行った(奥野ら1972, 奥野ら1977)。

用いた群の統計量を Tables 15, 16 に示した。これから得られた情報と判別結果を Table 17 に示した。この中の相関マトリックスをみるとそれぞれの変数間の相関係数は低い。マハラノビス距離 ( $D^2$ ) を用いて群が分離されているかどうかについて t 検定を行った結果、2群間の平均値には有意差が認められた。しかし、グループ間の誤判別の確率 (Prob. (U. GT. D/2)) (Table 17) は19.8%となり、そう小さくはない。したがって5回に1回は間違っって判別する可能性があることになる。Table 17 の判別函数式 ( $z = 19.268 - 0.004x_1 - 0.029x_2 - 0.027x_3$ ), ( $x_1$ : ヘマトクリット値,  $x_2$ : グルコース量,  $x_3$ : ナトリウム量の各変換値) にみられるように対照相と反応相

マダイのストレス反応

Table 15. Fundamental statistics of the hematological data of control group (GRP-1).  
 VAR-01 :10×(hematocrit value%), VAR-02; 100×log(serum glucose level mg/dl), VAR-3; Serum sodium level mEq.

Group name	GRP-1									
Sample size	185									
..... Fundamental statistics .....										
Variable	Total	Mean	Minimum	Maximum	Variance	S.D.	C.V.	Skewness	Kurtosis	
VAR-01	58564.000	316.562	95.000	472.000	4633.323	68.069	21.502	-0.021	2.991	
VAR-02	74712.000	403.849	330.000	518.000	1221.699	34.953	8.655	0.501	3.369	
VAR-03	31375.000	169.595	129.000	207.000	122.655	11.075	6.530	0.110	4.516	
..... S. S. and S. P. matrix .....										
	VAR-01	VAR-02	VAR-03							
VAR-01	852531.406	199424.883	33209.141							
VAR-02	199424.883	224792.664	18861.622							
VAR-03	33209.141	18861.622	22568.583							
..... Variance-covariance matrix .....										
	VAR-01	VAR-02	VAR-03							
VAR-01	4633.323	1083.831	180.484							
VAR-02	1083.831	1221.699	102.509							
VAR-03	180.484	102.509	122.655							
..... Correlation matrix .....										
	VAR-01	VAR-02	VAR-03							
VAR-01	1.000	0.456	0.239							
VAR-02	0.456	1.000	0.265							
VAR-03	0.239	0.265	1.000							

Table 16. Fundamental statistics of the hematological data of stressed phase (GRP-2).  
 VAR-01; 10×(hematocrit value%), VAR-02; 100×log(serum glucose level mg/dl), VAR-03; Serum sodium level mEq.

Group name	GRP-2									
Sample size	107									
..... Fundamental statistics .....										
Variable	Total	Mean	Minimum	Maximum	Variance	S.D.	C.V.	Skewness	Kurtosis	
VAR-01	39369.000	367.935	180.000	578.000	5827.952	76.341	20.749	-0.169	2.924	
VAR-02	52606.000	491.645	195.000	653.000	5869.247	76.611	15.583	-0.393	4.555	
VAR-03	18480.000	172.710	138.000	225.000	301.717	17.370	10.057	0.493	3.787	
..... S. S. and S. P. matrix .....										
	VAR-01	VAR-02	VAR-03							
VAR-01	617762.898	85685.234	-30082.992							
VAR-02	85685.234	622140.133	-39323.961							
VAR-03	-30082.992	-39323.961	31982.036							
..... Variance-covariance matrix .....										
	VAR-01	VAR-02	VAR-03							
VAR-01	5827.952	808.351	-283.802							
VAR-02	808.351	5869.247	-370.981							
VAR-03	-283.802	-370.981	301.717							
..... Correlation matrix .....										
	VAR-01	VAR-02	VAR-03							
VAR-01	1.000	0.138	-0.214							
VAR-02	0.138	1.000	-0.279							
VAR-03	-0.214	-0.279	1.000							

Table 17. Discriminant analysis on hematological data. GRP-1 ; Control group. GRP-2 ; Stressed phase group. VAR-01, VAR-02, VAR-03 ; Same in Table 15 and Table 16.

Selected groups					
Group name		GRP-1	GRP-2		
Analysis group		1	2		
Sample size		185	107		
Selected variables					
Variable name		VAR-01	VAR-02	VAR-03	
..... Means and standard deviations .....					
Anal. group		VAR-01	VAR-02	VAR-03	
1		316.562	403.849	169.595	
2		367.935	491.645	172.710	
Sigma		71.204	54.041	13.715	
..... Variance-covariance matrix .....					
		VAR-01	VAR-02	VAR-03	
VAR-01		5069.980	983.135	10.778	
VAR-02		983.139	2920.456	-70.561	
VAR-03		10.778	-70.562	188.105	
..... Correlation matrix .....					
		VAR-01	VAR-02	VAR-03	
VAR-01		1.000	0.255	0.011	
VAR-02		0.255	1.000	-0.095	
VAR-03		0.011	-0.095	1.000	
..... Mahalanobis' distances between groups .....					
Group		D	D**2	Prob.(U. GT. D/2)	
1 2		1.697	2.878	0.198	
..... Discriminant functions between groups .....					
Group		Constant	L(1)	L(2)	L(3)
1 2		19.268	-0.004	-0.029	-0.027
..... Coefficients for each group .....					
Croup		Constant	C(1)	C(2)	C(3)
1		233.006	-0.062	-0.302	-1.913
2		271.542	-0.071	-0.360	-1.967

の分離には、グルコース値と血清ナトリウム量の値が大きく関与しているのが明らかである。

次にこれら2群を母集団とした時、第5節、第6節、第7節で扱ったストレスの強度を数量化できないストレス反応のデータのうちから、ヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量が一個体で同時に測定された試料について、どの群(相)に属するかの判別を試みた。この結果を Table 18 に示した。対照群では185検体のうち約88% (163検体) が対照相に含まれる個体として同定された。反応群では79%が反応相個体として同定された。一方、取り扱い、麻酔、輸送、釣り上げの各ストレス別に判別結果を検討してみると、Table 12 に述べた酷い取り扱い直後の検体は100%が反応相と分類されたが、24時間後には40%が対照相へと回復してい

る。船舶輸送では、Table 13 に示したような取り扱い直後に輸送した場合(1)では2時間の輸送直後には40%が反応相とされ、19~20時間の回復後には100%が対照相にもどっていると判断された。トラック輸送では輸送後2時間と5時間では約63%の個体が何らかのストレス反応を起こしていると判別された。この点のみから判断すれば活魚倉輸送が魚にとっては良いと思われる。麻酔剤 MS222 の使用はストレス反応を起こしており、天然魚の釣り上げでは30~50%がストレス反応を起こしていると判別された。

結果を詳細にみると、これらの限られた実験結果を基にしての判別函数分析にはいくつかの問題点がある。考え方の出発点はストレス反応は汎適応的反応であるから、ストレスの種類にかかわらず、ストレスを受けているか否かの判定を少数の血液性状変数の変化で判定し得るで



これら多くの基本的な問題を含んでいるにもかかわらず、あえて本研究で反応状態の判別を試みたのは、原理としては妥当であろうという点とストレス反応の性質を利用した魚のモニタリングの必要性からである。WEDEMEYER and McLEAY (1981) が総述しているように、魚に惹き起こされたストレス反応の程度を知りたいという考え方はかなり古くからみられる。温度耐性テスト、低酸素耐性テスト、遊泳能力テスト、scope performance、感染感受度テスト、薬物耐性テスト、海水淡水耐性テスト、密度ストレステスト、血糖ストレステスト、白血球ストレステスト等によって魚の全身状態を判定しようとしている。これらを SELYE (1950, 1973) の提唱したストレス学説に従って解釈すれば、生物が個体の防御のために必要な移動させるエネルギー量には一定の限度があるという概念内での試みである。あるストレス状態にある魚体に、別の負荷をかければ、その時のストレス耐性は低下するという考え方である。上記の血糖ストレステスト、白血球ストレステストはむしろ汎適応反応を確認するという考え方で行っている。本研究の中でも明らかにされたように、血糖値は変数として非常に大きな意味を持つようにみえる。McLEAY (1973 b, 1977) は血糖値が刺激量一反応量の確実な反応を示すことと測定が比較的容易であることから、これによってパルプ工場排水による魚のストレスの程度の判定を行った。本研究はこの考え方の延長上にあり、変数を増加することにより精度を上げると同時に、1変数だけでは判別できない状態の分別をねらいとした。今後この種の反応状態判定を行うには、前述の統計的取り扱い上の問題点の解決とともに、基準群となるデータのより一層の積み重ねと検討が必要であると考える。

最近、日本では種苗生産され放流される種苗の健苗性が大きな問題となっている。この健苗性の指標として遊泳能力テスト、取り扱い (handling) テスト、麻酔剤耐性テスト等が考えられている。これらは生理学的にみれば、ストレス反応を応用した種苗のモニタリングである。特に種苗の全身状態の判定を手網によって行う Handling テストは手軽にできるので広範に利用されている。すなわち、種苗を手網ですくって5秒間放置し、その後水槽に戻しその時の魚の横転率、24時間後の斃死率を指標として用いる方法である。

また、中川ら (1982 a, b, c) は餌料試験の結果の魚の生理学的状態の判定にストレス反応を用いる試みを行っている。

これら生物のモニタリングの必要性は、養殖の現場では疾病防除、生残率向上、最適環境維持の観点から強く求められており、今後さらに検討を加え、現場で適用できる技術としてゆく必要がある。

## 第 II 章 ストレス反応時の物質代謝

### 第 1 節 実験方法の検討

マダイのストレス反応時の物質代謝機構を明らかにするためには摘出した組織を対象とするのが取り扱いや操作も容易であり、結果の解析や考察も行い易い。本節では組織標本を作成し、これによるストレス反応に対応する物質代謝の様相を明らかにするのに必要な実験系および分析方



法の検討を行った結果について述べる。

## 1. 組織標本の調製

### 1) 組織標本の作製方法

マダイを飼育水槽から取り上げ、ただちに尾叉長と体重を測定し、キュビエ氏管より十分に採血を行い可能な限り血液を除いた。その後直ちに開腹し肝臓を取り出し、スタディ・リグス型スライサーを用いて常法(細谷, 町谷1971)により肝スライス標本を作製した。腹腔内脂肪組織は腸管に附着しているものを、血管系や腸間膜組織が入らないよう注意して採取した。筋肉組織の白筋は背部の縁側筋肉(背鰭基部筋肉)を2cm角程度に切り出し筋肉繊維に沿ってスライスした。赤筋は胸鰭骨上体表側筋肉を剝離して用いた(石岡, 1983)。切り出した組織は氷冷したカルシウム不含クレブス氏重炭酸緩衝液で洗い、クレブス氏重炭酸緩衝液0.5mlを入れてあらかじめ秤量しておいた秤量瓶に入れ、手早く秤量し、2.5mlのクレブス氏重炭酸緩衝液を入れた反応フラスコに緩衝液ごと入れた。用いたクレブス氏重炭酸緩衝液(pH 7.4)の組成をTable 19に示した。

Table 19. Composition of Kreb's bicarbonate ringer solution.

Chemicals	g/l	Chemicals	g/l
NaCl	6.92	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.16
KCl	0.35	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.29
CaCl <sub>2</sub>	0.28	NaHCO <sub>3</sub>	2.1

Table 20. Thickness of tissue slices in mm (mean ± s.d.).

Fish No.	Liver	Muscle
1	0.454 ± 0.057 (n=9)	0.301 ± 0.062 (n=9)
2	0.441 ± 0.085 (n=5)	0.477 ± 0.059 (n=5)

実際の実験にあたっては95% O<sub>2</sub>と5% CO<sub>2</sub>から成る混合ガスをフラスコに吹き込み緩衝液を飽和して用いた。

### 2) 組織切片の厚さ

スタディ・リグス型スライサーで組織を切り出し、これをクレブス氏重炭酸緩衝液で洗滌し、1mmのグラフ用紙上にひろげ、その輪廓をなぞり面積を算出した。組織切片は附着液を除き、あらかじめ恒量にした秤量瓶に入れ重量を測定した。面積と重量から組織の比重を1と仮定した時の厚さを計算により求めた。結果をTable 20に示した。切る時の刃の角度、組織の抑え方、組織の状態(飢餓状態あるいは肥満状態)によって厚さは変わるが、同一組織はほぼ同一厚さで切ることがで

きた。

### 3) 摘出組織標本の反応の個体差と反応時間

組織切片の反応の個体差と条件差を検討するために、Table 19に示した組成の培養液3mlに100~300mgの肝臓組織標本を入れ、95% O<sub>2</sub>と5% CO<sub>2</sub>混合ガスを吹き込み振盪培養し、経時的に培養液をサンプリングし、遊離グルコース量を測定した。同一条件の組織標本よりの遊離グルコース量はほぼ同一であった(Fig. 27)。実験条件のうち特に実験魚の飢餓は遊離グルコース量を著しく低下させることが明らかとなった。肝臓切片では実験開始後1時間までのグルコース遊離量は大きい、1時間以後は遊離グルコース量は減少した。本研究ではストレス時の比較的短時間内に起こる代謝反応をみることを目的としているので、反応時間は数時間以内とする必要

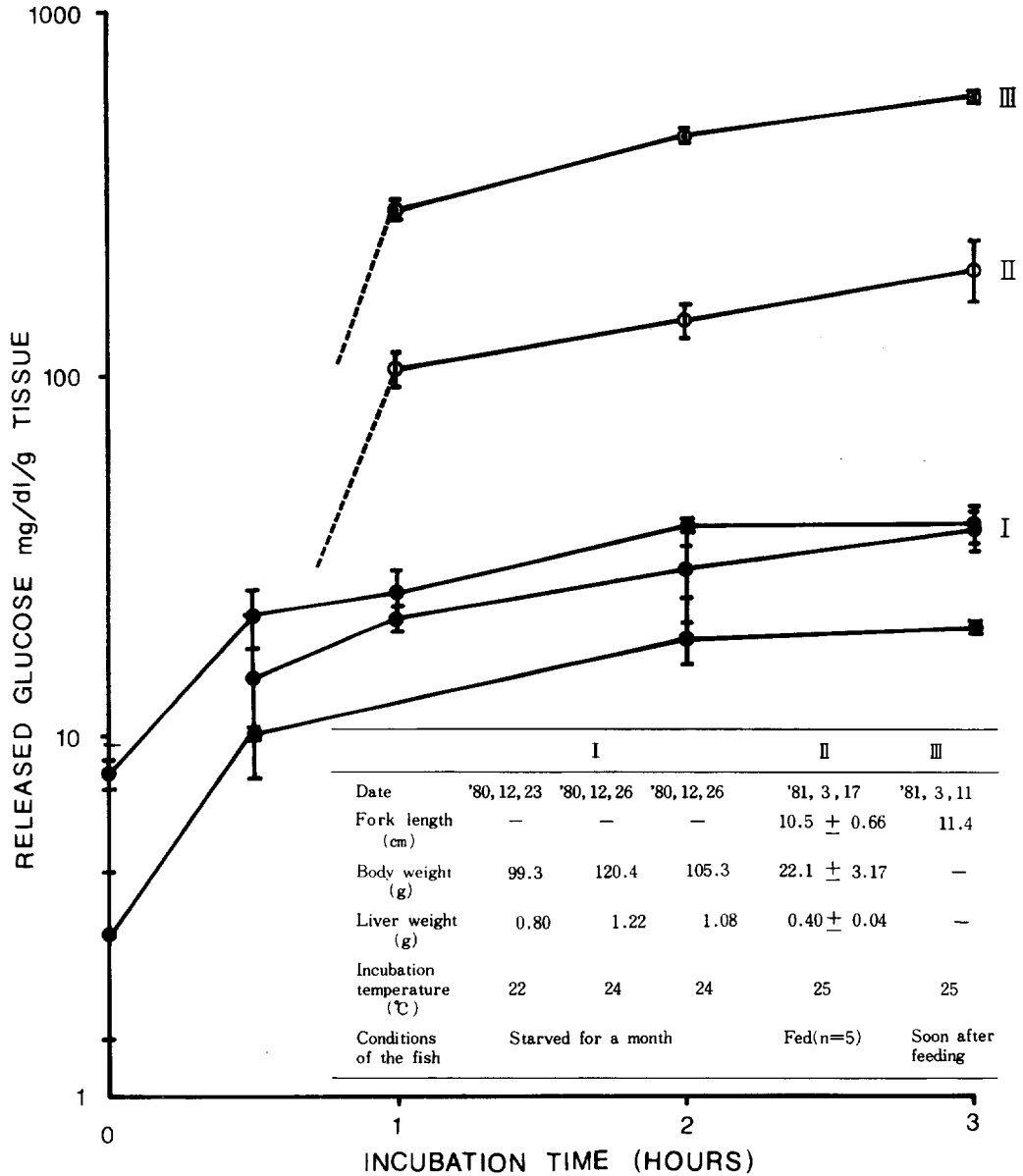


Fig. 27. Released glucose levels into the incubation medium from isolated liver slices of the red sea bream.

があり、本検討結果から反応時間としては1時間以上をとるのが望ましいと判断された。

## 2. 培養実験系の検討

### 1) 組織代謝量の測定方法

組織培養フラスコを Fig. 28 に示した。このフラスコの内室には折りたたんだ濾紙を挿入し、外室には2.5mlのクレブス氏重炭酸緩衝液を入れた。秤量瓶には同じ緩衝液0.5mlを入れた。器具は培養液と共に氷で冷却しておき、組織標本を秤量した後、培養液と共に外室に流し入れた。

組織を入れて25℃15分間予備培養を行った。O<sub>2</sub> 95%と CO<sub>2</sub> 5%の混合ガスで空気を置換し、100 $\mu$ mol のグルコース (50 $\mu$ l) と、1 $\mu$ Ci/ml ユニフォームラベルグルコース (100 $\mu$ l) を添加した。この<sup>14</sup>C-グルコース添加時を反応開始時とし、1時間振盪培養した。正確に1時間経過後カテラン針を用い、内室に炭酸ガス吸収剤として Hyamine 10X (RAPKIN, 1961) を1.0ml, 外室に 2N 塩酸 0.5ml を添加し反応を停止させた。この後3時間振盪培養を継続し、生成した炭酸ガスを完全に Hyamine10X に吸着させた。別に準備したガラスバイアルにインスタゲル (液体シンチレーションカウンター用カクテル) 10ml を入れ、培養フラスコ中の Hyamine10X を溶かし、液体シンチレーションカウンターで測定した。用いた機種はバックカード社製3255型 TRI-CARB 液体シンチレーションスペクトロメーターである。

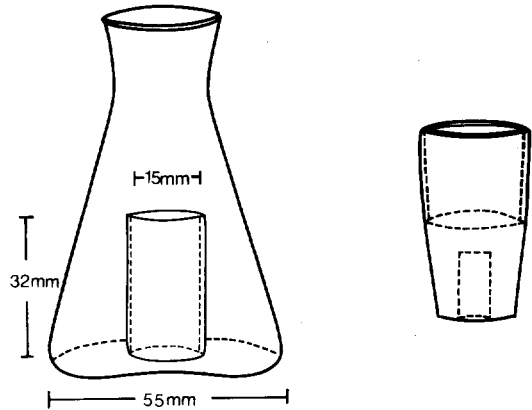


Fig. 28. Incubation flask and serum seal stopper.

2) 摘出組織の生存性

実験に使用する摘出組織標本の呼吸量を知るために、前述の培養条件で培養緩衝液中の<sup>14</sup>C-グルコースからの<sup>14</sup>C-炭酸ガス生成量を測定した。これらの条件と結果を Table 21 に示した。この結果によると肝臓スライス標本は用いた培養条件 (1時間, 25℃ 培養, 100 $\mu$ mol グルコー

Table 21. Viability of isolated tissues expressed as <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from substrate glucose in the incubation medium.

No. of fish	Fork length (cm)	Body weight (g)	Incubation medium			Incorporation into <sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (dpm/g/h)			
			Buffer (ml)	Glucose ( $\mu$ mol)	Labeled glucose ( $\mu$ Ci)	Liver slices	Adipose tissue	Muscle slices	Fin muscle tissues
1	13.6	46	3.0	0	0.5	6339	7899	149	—
2	15.0	73	3.0	100	1.0	7319	1198	26	—
3	13.1	47	3.0	100	1.0	4096	623	8	—
4	14.1	63	3.0	100	1.0	6489	4369	48	—
5	15.6	82	3.0	100	1.0	3698	1301	43	—
6	34.6	797	3.0	100	2.0	—	—	—	3811(R) 3676(L)
7	30.7	626	3.0	100	2.0	—	—	—	4131(R) 4848(L)
8	29.4	511	3.5	100	1.0	10150	1720	—	2501
9	26.0	354	3.5	100	1.0	9507	1259	—	3178
10	29.0	527	3.5	100	1.0	13087	1711	—	2792
11	27.3	372	3.5	100	1.0	8135	1573	—	3475
12	26.5	421	3.5	100	1.0	7814	760	—	2425

R; right pectoral fin muscle. L; left pectoral fin muscle.

ス、 $1\mu\text{Ci}$  標識グルコース添加) で測定に十分な炭酸ガス生成がみられること、および腹腔内脂肪も活発に炭酸ガスを生成していること、すなわち呼吸をしていることが明らかとなった。筋肉組織の体側白筋スライス標本では組織繊維に沿ってスライスしても、用いた実験条件では呼吸量が非常に少なく、正確な測定可能な値は得られなかった。一方、胸鰭筋肉は主として赤筋で筋繊維を切断することなく層状に剥離することができ、その呼吸量は比較的大きく、しかも左右胸鰭一對の筋肉の値はほぼ同じであった (Table 21)。石岡 (1983) が推察したように、この筋肉は赤筋が大部分を占めているためと考えられる。ストレス反応のように緊急にエネルギーを動員し、利用する条件下での呼吸量を知るには、胸鰭骨上筋肉の方が有利であると判断された。個体差はいづれの組織標本の場合にも大きいので、実験系の中では同一個体の組織を対照標本として用いる必要があると考えられた。

### 3) 同一個体組織の反応の定量性

魚類の肝臓スライス標本を用いた代謝研究はウナギ (HAYASHI and OOSHIRO 1975a), (INUI and ISHIOKA, 1983a, 1983b), その他の魚類で行われているが、筋肉組織の *in vitro* 実験への応用例は少ない。そこで組織の反応の定量性を知るために、胸鰭骨上剥離筋肉標本について炭酸ガス生成量と培養時間の関係を前述の方法 (第 II 章第 1 節 2. 1)) で調べ、その結果を Fig. 29 に示した。炭酸ガス生成は培養開始後 4 時間までは直線的に行われた。

同一個体からの組織標本が多数得られる肝臓スライス標本を用いて、組織量と炭酸ガス生成量の関係を調べ、結果を Fig. 30 に示した。組織重量と炭酸ガス生成量の間には直線関係が認められた。組織重量 700mg 程度までは基質量は  $1\mu\text{Ci}/100\mu\text{mol}$  で十分であることも確認された。

同じ個体からの肝臓スライス標本を用いて、基質グルコース濃度と炭酸ガス生成量、肝臓グリコーゲンへの取り込み量を調べ、その結果を Fig. 31 に示した。これらでは比放射能は  $1\mu\text{Ci}/$

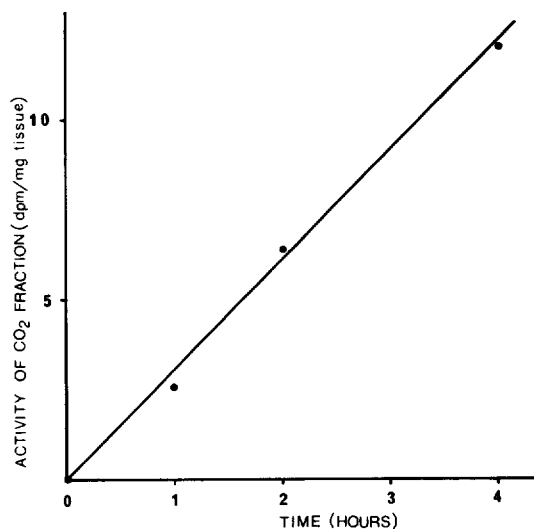


Fig. 29. Incorporation of U- $^{14}\text{C}$ -glucose in the medium into  $^{14}\text{CO}_2$  in isolated fin muscles of the red sea bream.

$100\mu\text{mol}$  としている。この図にみられるように  $60\mu\text{mol}/\text{ml}$  濃度までは、グルコース濃度と炭酸ガス生成量、グリコーゲンへの取り込み量は直線関係にあるが、 $133\mu\text{mol}/\text{ml}$  ではこの直線からややはずれた。測定値の大きさと直線関係から  $32\mu\text{mol}/\text{ml}$  程度のグルコース濃度で十分に測定可能であることが明らかとなった。

### 3. 分析方法の検討

摘出組織標本を培養した後、組織のグリコーゲンと脂肪に取り込まれたグルコースの炭素骨格は、細谷・町谷 (1971) の方法の一部変法で測定した。

$^{14}\text{C}$ -グルコースの組織標本への総取り

込み量は、培養終了後の組織を蒸留水で5秒間洗い付着した培養液を濾紙で取り除いた後、重量測定し、ついで組織融解剤 **Protozol** を加えて55°Cで組織を溶解し、これに10mlのインスタゲルを加えて測定した。この時の組織量と組織の種類によるクエンチングを検討した。シンチレーション用バイアルに **Protozol** 1 ml を加え、重量測定した組織標本を入れ、55°Cの恒温器で数時間かけて溶解した。その後バイアルに  $U-^{14}C$ -グリシン0.1ml ( $50\mu Ci/50ml$ ) を添加し、攪拌後インスタゲル10mlを加え、液体シンチレーションカウンターで測定し、結果を Table 22 に示した。**Protozol** 1 ml を用いた時は組織湿重量で100mgを越える試料では溶解が十分に行われないこと、着色程度は組織の種類によって異なり、数時間の反応では肝臓>脂肪組織>脳>筋肉の順であり、クエンチングの大きさもそれに従うこと、ESR (外部線源比) を用いて補正することによって20%のクエンチングであれば補正が可能であることが明らかとなった。

液体シンチレーションカウンターで  $^{14}C$ -100,000dpm 標準試料による計数効率を求め、ESR (外部線源比) と cpm より dpm 算出のための3次式を求めた。年に1回はこのチェックを行い3次式の定数を決定した。

基質に乳酸やアミノ酸を用いた時の肝臓スライス標本による糖新生量は次のように測定した。陰イオン交換樹脂 **Dowex 1-X4**, 100~200mesh, 陽イオン交換樹脂 **Dowex50W-X8**, 200~400mesh を準備した。陰イオン交換樹脂は 1M ギ酸ソ

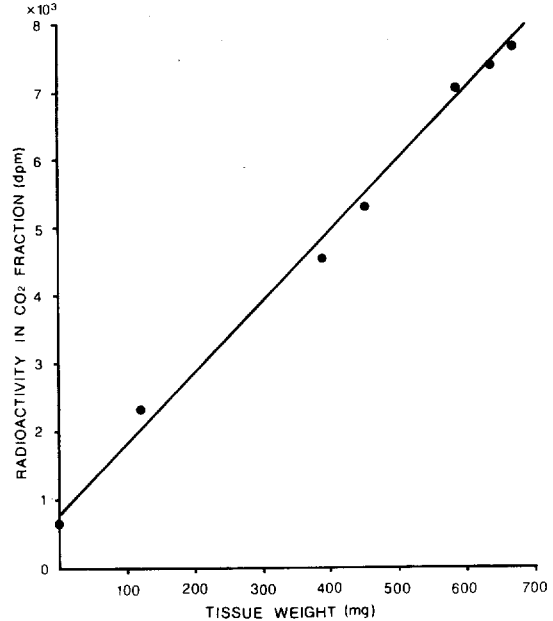


Fig. 30. The relationship between tissue weight and incorporation of  $U-^{14}C$ -glucose in the incubation medium into  $^{14}CO_2$  in the isolated liver slices.

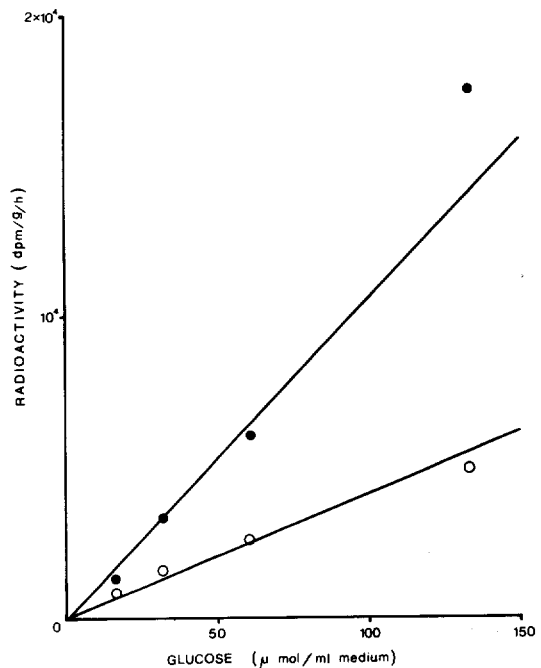


Fig. 31. The relationship between glucose concentration in the medium and  $U-^{14}C$ -glucose incorporation into  $^{14}CO_2$  (●) and into glycogen (○) of liver slices of the red sea bream.

Table 22. Tissue digestion by Protozol.

Sample No.	Tissue	Weight (mg)	Incubation time (h)	Digestibility*	Coloring**	Rate of recovery cpm	(%)*** dpm
1	Liver	150.3	21	—	+++	81.7	98.1
2	"	121.8	"	+	+++	85.4	98.7
3	"	171.8	"	—	++++	83.4	97.8
4	"	29.9	"	+	++++	90.0	98.4
5	"	31.3	"	+	++++	90.9	98.4
6	Muscle	32.1	3	+	+	97.3	97.8
7	"	133.0	"	+	+	96.8	97.8
8	"	160.6	"	+	+	97.9	98.2
9	"	351.1	21	—	+++	96.5	98.3
10	"	67.9	3	+	+	97.0	97.9
11	Brain	24.7	3	+	+	97.0	98.4
12	"	96.5	5	+	+	96.6	98.2
13	"	167.2	5	+	++	93.8	98.3
14	"	379.3	21	—	+++	93.5	98.5
15	"	197.2	"	+	+++	93.0	98.2
16	Adipose tissue	23.7	5	+	++	92.1	98.5
17	"	24.1	3	+	+	95.7	97.4
18	"	81.4	5	+	++	94.0	97.9
19	Blank		21			100.0	100.0

\*; +: Completely digested. —: Partially digested.

\*\*; Coloring increases with the number of "+".

\*\*\*; The rate of recovery was calculated as (cpm of measured samples/cpm of added U-<sup>14</sup>C-glycine) × 100 and as (dpm of measured samples/dpm of added <sup>14</sup>C-glycine) × 100.

ーダ溶液を流し Cl<sup>-</sup>型を HCHO<sup>-</sup>型に変換し、陽イオン交換樹脂は 2N 食塩水で洗滌した後、2N 塩酸を流し H<sup>+</sup>型とした。乳酸基質の場合には上層 4 cm の Dowex1-X4, 下層 2 cm の Dowex 50W-X8, 経 0.8 cm の二重カラム, アミノ酸基質の場合には下層 2 cm Dowex1-X4, 上層 4 cm の Dowex50W-X8, 経 0.8 cm の 2 重カラムとする。これに一定量の培養緩衝液を加え、蒸留水で洗滌し流出したものを 5 ml の定容とし、その 1 ml をバイアルに入れ液体シンチレーションカウンターで測定し、グルコース区分とした。カラムは、セバコール・ミニ (生化学工業 KK) を用いた。

#### 4. 実験マニュアル

上述の検討結果より下記の実験マニュアルを作製した。ここではグルコースを基質とした場合を示したが乳酸やアミノ酸を基質とした場合もこの原則に準じて行った。

(a) ゴム栓付き三角フラスコ (20ml~30ml) と内室付き三角フラスコ (Fig. 28) にそれぞれ 3 ml の クレブス氏重炭酸緩衝液を入れ、内室付きフラスコの外室には、100 μmol グルコース 50 μl と 1 μCi の U-<sup>14</sup>C-グルコース (100 μl) を添加する。これらに O<sub>2</sub> 95% と CO<sub>2</sub> 5% 混合ガスを吹き込んで 25°C で予備加温をする。内室付き三角フラスコの内室には折りたたんだ濾紙を入れ秤量ビンには同一緩衝液を 0.5 ml とり、重量を測定し氷で冷却しておく。

## マダイのストレス反応

- (b) 生鮮組織標本を作製し、緩衝液入り秤量瓶に入れておく。全部の組織標本作製の完了後、これを緩衝液共々三角フラスコに流し入れ、1試料毎に時間を測定しながら15分間の予備振盪培養を行う。
- (c) 組織標本は沓紙で付着水分を除いた後、これを内室付き三角フラスコの外室に入れ、 $O_2$  95%、 $CO_2$  5% 混合ガスを吹き込み、直ちに培養を開始する。正確に2分間毎にフラスコ1本づつを処理する。
- (d) 25℃で1時間の振盪培養を行う。
- (e) 1時間後あらかじめ準備した1mlの Hyamine 10X 液をカテラン針付きの注射筒で内室に、0.5mlの 2N 塩酸を外室に入れ、反応を停止させる。2N 塩酸添加時は正確に1時間後とする。
- (f) さらに振盪培養を3時間続け生成した炭酸ガスを Hyamine 10X に完全に吸着させる。
- (g) インスタゲル（シンチレーター）10ml を入れた測定バイアルに、内室の Hyamine 10X と沓紙をインスタゲルで洗い入れ、液体シンチレーションカウンター（パッカー社3255型 TRI-CARB）で測定する（ $CO_2$  区分）。
- (h) 蒸留水で5秒間洗った培養組織片を3片に分け、沓紙で水分を除いた後それぞれ化学天秤で重量を測定する。
- (i) 秤量した組織片は20倍量の FOLCH の液（FOLCH et al. 1957）を入れたホモジナイザーに入れ、ホモジナイズする。
- (j) ホモジナイズした組織は Folch液 0.5ml × 2回で遠沈管に洗い入れ、3,000rpm × 10分間遠沈を行う。上澄液はガラスウールで沓過し目盛付遠沈管に入れ残査洗液（Folch 液）と共に定量的に5mlとする。これに1/5容の蒸留水を加え洗浄し3,000rpm × 10分間の遠沈を行う。上層を除去した後、下層に theoretical-upper layer 1/5容を加えて洗浄し、3,000rpm × 10分間の遠沈を行う。この操作を2回くりかえす。最後の上澄液除去の前に下層の容量を読み取り、上澄液を十分に除去する。下層の1.0mlを採取し、カウントバイアルに入れ、ホットプレート上で溶媒を除去し、これにインスタゲル10mlを加えて液体シンチレーションカウンターで測定する（脂肪区分）。
- (k) 秤量した組織を30%水酸化カリウム溶液 2.0ml に入れ液化するまで沸騰水中で処理し、5mlの95%エタノール溶液を加え十分に混和し、再び加熱し、わずかに沸騰しはじめたら直ちに放冷し、3,000rpm で30分間遠沈する。上澄液を捨て、沈澱に蒸留水2mlを加え、数分間加熱後30%水酸化カリウム溶液1滴と3ml 95%エタノール溶液を加え混和し、加熱沸騰させた後室温に放冷する。10分間 3,000rpm で遠沈し上澄液を捨てる。この操作は二度くり返す。
- (l) 沈澱を0.5mlの蒸留水に溶かし、10mlのインスタゲルを入れた測定バイアルに加え、さらに遠沈管を0.5mlの蒸留水で洗い、これもバイアルに加えて、液体シンチレーションカウンターで測定する。（グリコーゲン区分）
- (m) 秤量した約50mgの組織片をバイアルに入れ組織融解剤 Protozol を1ml加え、55℃の恒温器に2～3時間温置する。組織が完全に溶解したのを確認した後、10mlインスタゲルを加えて液体シンチレーションカウンターで測定する（組織総取り込み量）。

## 第2節 飢餓魚の摘出組織標本におけるグルコースの代謝

魚類の絶食時の血液性状や体成分などの変化については、主に養殖魚コイ（竹内他1969, NAGAI and IKEDA 1971a）、ウナギ（SANO 1962, INUI and OHSHIMA 1966）、ニジマス（柴田他1974, 新聞他1976）、ハマチ（藤谷・塚原1969, 坂口・浜口1976）などで調べられている。マダイについては、SAKAMOTO et al. (1978), SAKAMOTO and YONE (1978), 坂口・浜口 (1981), Woo and MURAT (1981) によって飢餓時の魚体成分、内臓の化学成分や重量、血液性状とその化学成分についての報告がある。それらの結果には多少の相違は認められるが長期の飢餓が体成分や血液性状に影響を与えている点では一致しており、このことは代謝の様相が大きく変化していることを示唆している。特に NAGAI and IKEDA (1971a) はこの点に焦点をあてた研究を展開し、飢餓がエネルギー代謝の様相を大きく変えていることを報告した。

ストレス反応は、代謝の観点からみると、第1章に述べた血糖値の増加にみられるような、急激なエネルギー動員の反応である。このストレス反応が飢餓時のように魚の代謝系の様相に変動がある時にどのような影響を受けるのかを考察するためには、飢餓時と平常時におけるグルコース利用の様相を比較することが大切である。本節では、各種組織標本で *in vitro* 実験系を用いてエネルギー代謝の中心となるグルコースの利用を調べた。

### 1. 実験条件

供試魚は、1980年種苗生産されその後養殖されたマダイ2年魚を用いた。1981年5月25日養殖場から船舶により研究室に輸送し、1トンのコンクリート水槽に収容後海水で約2カ月間投餌せずに飼育した個体を飢餓区とし、この間、毎日2回生ガキを与えて飼育した魚を対照区とした。飼育水温は15.1℃～24.7℃の間の自然水温であり、温度上昇時期にあった。

グルコースの炭酸ガスへの転換量、組織への総取り込み量、グリコーゲンへの転換量は第1節に述べた方法によって測定した。

### 2. 実験結果

約2カ月後の魚体計測値を Table 23 に示した。温度上昇期2カ月間の飢餓はマダイの成長に大きな影響を与えた。飢餓区は、尾叉長は増加せず、体重は減少した。肥満度は有意に減少し、肝臓の対体重比も有意に減少し、対照区の約1/2に低下し、飢餓の影響は肝臓に強く現われた。

Table 23. Body conditions of the red sea bream after 2-month-starvation (mean±s.d. n=10).

Treatment	Fork length (cm)	Body weight (g)	Hepato-somatic <sup>1)</sup> index	Condition <sup>2)</sup> factor
Before starvation	11.4±0.69	30.2±5.68	—	—
Fed for 2 months <sup>3)</sup>	14.0±1.43	58.7±20.75	1.40±0.53	2.04±0.29
Starved for 2 months	11.7±0.69*	25.8±6.10*	0.72±0.23*	1.58±0.09*

1); Hepato-somatic index =  $100 \times (\text{liver weight} / \text{Body weight})$ .

2); Condition factor =  $100 \times (\text{Body weight}) / (\text{Fork length})^3$ .

3); Fish was fed raw oyster pieces twice a day.

\* ; Significantly different from fed group. ( $p \leq 0.05$ ).



Table 24. Effect of starvation on the utilization of U-<sup>14</sup>C-glucose in the incubation medium by isolated tissue samples. (mean  $\pm$  s.d.) (n)

Tissue	Fraction	Radioactivity (dpm/mg tissue/h)	
		Fed (Control)	Starved
Liver	CO <sub>2</sub>	5.35 $\pm$ 1.873 (10)	8.29 $\pm$ 1.648* (8)
	Tissue incorporation	63.34 $\pm$ 26.978 (10)	52.62 $\pm$ 19.147 (9)
	Glycogen	1.90 $\pm$ 1.077 (10)	2.87 $\pm$ 2.052 (10)
Trunk muscle	CO <sub>2</sub>	0.042 $\pm$ 0.025 (8)	0.064 $\pm$ 0.026 (7)
	Tissue incorporation	49.04 $\pm$ 19.545 (10)	59.42 $\pm$ 39.695 (9)
	Glycogen	0.054 $\pm$ 0.034 (10)	0.030 $\pm$ 0.017 (9)
Adipose tissue	CO <sub>2</sub>	1.78 $\pm$ 1.15 (9)	3.27 $\pm$ 0.99* (8)
	Tissue incorporation	19.62 $\pm$ 7.200 (8)	29.26 $\pm$ 24.604 (10)

\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

培養液中のグルコースの取り込みと利用を標識グルコースで調べた結果を Table 24 に示した。本結果では個体差は非常に大きい、対照区と飢餓区ではグルコースの利用に相違のあることが明らかとなった。両区で最も顕著な点は炭酸ガス生成量である。グルコースからの炭酸ガス生成量は肝臓組織 > 腹腔内脂肪組織 > 白筋の順に小さくなり、特に白筋組織で小さい。飢餓区の肝臓組織では対照区の約15%に、腹腔内脂肪組織では184%にも炭酸ガス生成量が有意に増加した。白筋においては個体差が大きく有意差は認められなかったが、増加傾向がうかがわれた。

グルコースの組織への総取り込み量は、対照区では肝臓への取り込みが非常に大きく、次いで白筋となり、腹腔内脂肪組織への取り込みが最も小さかった。飢餓区での平均値は白筋 > 肝臓 > 脂肪組織の順であるが両区とも個体差が大きく有意差は認められなかった。

グルコースの組織内グリコーゲンへの転換は肝臓で大きい。白筋においても肝臓の約1/40の蓄積が認められた。飢餓区の肝グリコーゲンへの取り込みは対照区より大きいが個体差も大きく、対照区と飢餓区の差は認められなかった。

### 3. 考 察

#### 1) 飢餓時の計測学的変動

魚類は摂餌しなくても長期間生存することができるため古くから飢餓に関しては興味を持たれ、多くの飢餓実験が行われてきた (LOVE 1970, LOVE 1980)。これらの研究の大部分は飢餓期間中の魚体計測値と血液や体成分の変動に関するものであるが、得られた結果は魚種、飼育水温、発育段階、実験開始前の栄養条件等によって異なり、統一的な規則性は得られていない。大まかにみれば、共通な現象としてどの魚種に関しても体重および肝臓重量の減少がみられる。淡水魚については、コイで NAGAI and IKEDA (1971a) は15~25gの魚の101日間の絶食で15%の体重減少

を報告し、示野(1974)も体重約48gの魚体の21日間の絶食で体重と肝臓重量の減少を報告している。この他コイ(竹内他1969)、ニジマス(金子他1966, 新聞他1976)、ウナギ(INUI and OHSHIMA 1966, INUI and YOKOTE 1974)でも同じ結果が報告された。海産魚についてはハマチで藤谷・塚原(1969)、示野(1974)、坂口(1976)が、Woo and CHEUNG(1980)は *Ophiocephalus maculatus* で同様の結果を報告した。

マダイに関しては SAKAMOTO et al.(1978)が野生魚(体重約60g)を90日間絶食させた時、坂口・浜口(1981)が約270g体重魚を冬期、自然水温と加温条件で飢餓試験を行った時、Woo and MURAT(1981)が13°Cで160日間絶食をさせた時の体重や肝体重比の変化を報告している。これらの結果は絶食期間と水温(季節)によりその影響の大きさは異なるが、長期飢餓時には同様な傾向を示し、肝体重比の減少が認められ、肝臓が栄養貯蔵器官としても重要な役割を持つことを示している。本研究(Table 23)でも水温上昇期2カ月間の絶食で肝体重比は半減し、体重の減少を考えあわせると供試飢餓魚は飢餓の進んだ段階にあると考えてよい。

## 2) 飢餓時の化学成分の変動

魚類の飢餓試験で測定されたその他の項目は、体成分組成(竹内・石井1969, 新聞他1976, NAGAI and IKEDA 1971a, INUI and OHSHIMA 1966, INUI and EGUSA 1967, SAKAMOTO et al. 1978, 坂口1976, 坂口・浜口1981, 藤谷・塚原1969, INUI and YOKOTE 1974, 示野1974, Woo and CHEUNG 1980, Woo and MURAT 1981)と血液性状や血液成分(柴田他1974, SANO 1962, NAGAI and IKEDA 1971a, SAKAMOTO and YONE 1978, 坂口1976, 坂口・浜口1981, 藤谷・塚原1969, INUI and YOKOTE 1974, 示野1974)と多いが、本研究に関係のある観点からの報告例は少ない。

炭水化物代謝に関連ある成分としては血糖、肝臓や筋肉のグリコーゲン、血漿アミノ酸、肝臓や筋肉の脂肪、肝臓の GOT, GPT 等酵素活性が調べられている。ニジマスでは柴田他(1974)は55日間の飢餓で血糖はほとんど変動せず、血漿トリグリセリドや血漿遊離脂肪酸は増加傾向にあることを報告し、新聞他(1976)も同様の結果と肝臓グリコーゲン、遊離脂肪酸、トリグリセリドは大きくは変動しないと報告した。コイでは竹内・石井(1969)は冬期絶食期間中に筋肉および肝臓のグリコーゲンとトリグリセリドが減少したとし、NAGAI and IKEDA(1971)は101日間の絶食で血糖と肝臓グリコーゲン量の低下をみているが22日までは両成分の減少傾向を認めていない。示野(1974)は21日間の絶食で血糖値、肝臓グリコーゲン量は餌料投与魚との間に有意差は生じなかったとした。ウナギでは SANO(1962)が90日間の絶食で血糖値の実験開始時の165mg/dlから49.3mg/dlへの低下を報告しているが、開始時の値が他の諸報告の値に比べて高いことから、取り扱いストレスの影響があったと考えた方がよい。もし取り扱い条件が同一とすれば、彼の報告は飢餓がストレス反応の大きさに影響を与えたことを示唆するものとして興味深い。INUI and YOKOTE(1974)は90日間の絶食で血糖値の変動はなく、肝臓グリコーゲンは減少した後ゆるやかに増加する動態を示しこの時、肝臓の GOT および GPT 活性と血漿アミノ酸量が増加すること、肝臓脂肪はゆるやかな減少傾向を示すことなどから、体蛋白質由来のアミノ酸からの糖新生系が中心となって血糖が維持されると推測した。異体類の *Pleuronectes platessa* で JOHNS-

TON and GOLDSPIK (1973), PATTERSON et al. (1974) は7.5°C, 14週間の飢餓時の赤筋と白筋のグリコーゲン、脂質、蛋白質、水分量を調べ、水分量以外の成分は絶食期間が長びくと減少するが、その動態は赤筋と白筋で異なると報告した。Woo and CHEUNG (1980) は *Ophiocephalus maculatus* で、長期飢餓時に血糖値は減少し、肝臓グリコーゲンも減少しているが筋肉のグリコーゲン減少はみられなかったとしている。この肝臓の蛋白質の減少は著しい。ハマチでは坂口 (1976) が50日間の飢餓で肝臓グリコーゲンが著しく減少したとし、示野 (1974) は3日間の絶食で血糖も肝臓グリコーゲンも有意に低下しその後は安定した値を示すとし、この時の肝臓の糖代謝系の酵素の動態が基本的にはコイの場合と類似したという。マダイでは SAKAMOTO and YONE (1978) が30日間の絶食で血糖の変動を認めず、坂口・浜口 (1981) も血糖値は絶食期間中自然水温区ではほとんど変動しないが加温区では25日以上絶食でやや低下し、肝臓グリコーゲンの減少は著しかったと述べている。Woo and MURAT (1981) は低温時、絶食後期に肝臓や筋肉のグリコーゲンが減少し、筋肉蛋白質の減少とともに肝臓の GOT, GPT 活性が上昇したと報告した。

これらの報告は多少の相違はあるものの、血糖値はやや低い値で安定すること、脂肪、グリコーゲン、蛋白質量の減少と、その中間代謝物量の変動を示しており、池田 (1979) がまとめたように魚類における絶食時の肝臓における糖新生を示唆している。

### 3) 飢餓時のグルコース利用

上述の現象は魚類のエネルギー代謝の一側面を *in vivo* 系で調べたものであり、血糖の恒常的維持に論議が集中しておりその利用については触れられていない。血液中のグルコースは魚体全組織に於てエネルギー産生を行うために利用され、最終的には水と炭酸ガスとして排泄される。本実験のように十分な酸素が与えられた条件下では、グルコースはクエン酸回路を経て酸化される。本実験では、肝臓、筋肉、腹腔内脂肪の呼吸により培養液中に十分に存在する標識グルコースから産生される炭酸ガス量に飢餓の影響が強くみとめられた。Table 23 に示した飢餓魚の肝臓では、生鮮組織単位重量あたりの炭酸ガス生成量は有意に大きい。LOVE (1980) は、コイの4ヵ月と12ヵ月の飢餓で肝細胞が収縮し核が凝集してゆく組織像を紹介し、単位重量あたりの細胞数増加を報告し、さらにグリコーゲンの絶食による消失像を紹介している。同じ現象をウナギについて INUI and EGUSA (1967) が101日の絶食の結果として報告している。これら諸報告と肝臓重量や組織の色調から考えると本実験結果は飢餓により貯蔵物質量が減少したために呼吸活性物質のみが残り、単位重量あたりの炭酸ガス生成量値が高くなったためと考えられる。肝臓以外の白筋組織や腹腔内脂肪組織も貯蔵組織としての機能を持っているから、単位重量あたりの呼吸量の増加は当然予想されるところであり、腹腔内脂肪の炭酸ガス生成量にも有意差が認められた。これは貯蔵機能の大きさに依存するところが大きいことを示唆している。

炭酸ガス産生に関して飢餓によって各組織の炭酸ガス生成割合が変化するか否かをみるため、同一個体の肝臓、筋肉、腹腔内脂肪の炭酸ガス成分の放射能 (dpm) の合計値を100%とし相対比を算出した。白筋の炭酸ガス生産割合(%)は摂餌区と飢餓区でそれぞれ $0.55 \pm 0.38$  (平均値±標準偏差) %と $0.56 \pm 0.26$  %で差はみられなかった。肝臓では $79.1 \pm 10.19$  %と $70.0 \pm 4.08$  %で減少が、腹腔内脂肪では $20.4 \pm 10.21$  と $29.4 \pm 4.13$  %で増加の傾向がみられた。炭酸ガス生成

量が組織の内呼吸の大きさを示しているとすれば、飢餓のこの段階では腹腔内脂肪動員が相対的に大きいことを示すものであろう。

個体の肝臓重量あたりの炭酸ガス生成量をみると、摂餌魚で $5552.8 \pm 4628.3$ dpm/肝臓、絶食魚で $1462.5 \pm 558.4$ /肝臓であり、明らかに摂餌魚の約1/4に減じている。また、1個体1肝臓あたりのグリコーゲンへの転換は、摂餌魚で $1855.9 \pm 525.1$ dpm/肝臓 ( $n=8$ ) 絶食魚で $544.9 \pm 539.2$ dpm/肝臓 ( $n=10$ ) となり、グリコーゲンへの取り込み量も有意に減少している。また組織への取り込み量も、絶食後には明らかに減少している。これらのことは、飢餓時にはグルコースのエネルギーとしての利用だけでなく、肝臓全体としての代謝機能が低下していることを示すものであろう。

腹腔内脂肪組織に関しては実験操作上短時間で全腹腔内脂肪組織量を測定することが困難であるので肝臓の場合のような計算はできないが、約2倍の炭酸ガス生成量があったとしても (Table 24) 細胞当りの呼吸量は必ずしも増加しているとはいえない。筋肉組織に関しては、飢餓魚における炭酸ガス生成量は対照魚の150%しかなく炭酸ガス生成量に有意差は認められなかったが、体重減少が大きいところから筋肉部分全体としての呼吸量は低下していることが予想される。本実験の飢餓の段階においてはマダイの組織はエネルギー源物質の減少に対応して適応的に呼吸量の低下 (エネルギー生産の減少) を起しているものと考えられる。

この組織の代謝機能の低下は魚類が長期飢餓に耐え得ることの説明にもなる。飢餓時の酸素消費量の低下は *Gadus morhua* (SAUNDERS 1963), *Ophiocephalus maculatus* (Woo and CHEUNG 1980) で認められているが、これらは飢餓の一段階では個体の代謝機能の低下が起ることを裏づけるものであろう。

飢餓時には絶食開始時と比べて低血糖を示すという報告が多い (柴田他 1974, SANO 1962, NAGAI and IKEDA 1971, 示野 1974, Woo and CHEUNG 1980)。また肝臓や筋肉中のグリコーゲンも前述のように減少している。このことは魚体全体としては急激に動員し得るエネルギー源物質が枯渇していることを意味している。

本研究結果から飢餓時には存在する基質量に対応した代謝が営なまれ代謝機能が全体的に低下すると考えられるが、これは第1章で明らかになったストレス時の共通的な反応である血糖増加の速度や反応の大きさを大きく変えるものと予想させる。

### 第3節 抽出組織標本からのグルコースおよび脂肪酸遊離におよぼす各種ホルモンの影響

魚類においても、ストレス反応時、血中エピネフリンやコーチゾール等のホルモン量の増加と血液中グルコース量の増加があることはよく知られている。魚類のストレス反応時の血中グルコース量増加は肝臓グリコーゲンに由来すると DEMAËL et GARIN (1974, 1978) は述べているが、グルコースがこれらのホルモンによって肝臓よりどのように遊離されるのか、また、肝臓やその他の組織からの脂肪酸の遊離がホルモンによって制御されるのかどうかを知ることはストレス反応時の代謝機構を明らかにするために重要なことである。ホルモンと血中グルコース量増加の関係は主に *in vivo* 系の実験で観察されてきた。しかし、魚類の場合には、第1章第5節 (石岡 1984 a) の報告にみられるように、*in vivo* 実験に際しての種々な“取り扱い”が強いストレッ

サーとなり、血中グルコース量増加などの症状をひき起こすので *in vivo* 実験系によるホルモン固有の作用機構の解析は容易でない。

そのため、本節では摘出しスライスした肝臓、筋肉、腹腔内脂肪組織標本を用いて、エピネフリン、グルカゴン、コーチゾール、インスリンが、グルコースおよび脂肪酸を遊離する効果について *in vitro* 実験系で調べた。その結果を報告する。

## 1. 実験条件

供試魚の尾叉長、体重、肝臓重量は平均値±標準偏差でそれぞれ $28.8 \pm 1.78$ cm,  $479.9 \pm 81.19$ g,  $5.25 \pm 2.22$ g であった。

組織標本は氷冷したカルシウム不含クレブス氏緩衝液中に保存した後、培養緩衝液に入れ実験に供したが、脂肪組織標本は氷冷の取り扱いを行わなかった。1回の実験では1個体の各組織標本の対照区と処理区を同一条件で同時に扱った。

培養方法：培養液は肝臓からのグルコース遊離実験にはクレブス氏重炭酸緩衝液 (pH 7.4) を、脂肪酸遊離実験にはクレブス氏リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いた。20ml ゴム栓付きフラスコに緩衝液を3ml ずつ分注し、エピネフリン (30 $\mu$ g)、グルカゴン (50 $\mu$ g)、コーチゾール (30 $\mu$ g)、インスリン (30 $\mu$ g) をそれぞれ添加した。用いたホルモンはいずれも Sigme 社の(+) Epimephrine No.E-4250, Glucagon No.G-4250, Hydrocortisone No. H-4001, Insulin No. I-5500 であった。対照区は緩衝液のみを加えた。

組織標本は25℃の緩衝液中で15分間予備培養を行った後、0.2~0.5g の範囲で組織片を取り上げ、培養フラスコに入れ、酸素95%炭酸ガス5%を吹き込みながら、クレブス氏重炭酸緩衝液中の組織標本は1時間、クレブス氏リン酸緩衝液中の組織標本は3時間の振盪培養を行った。所定時間後、培養フラスコを氷水中に入れて反応を停止させ、直ちに中の組織片を取り除いた。重炭酸緩衝液は遊離グルコース量の定量に供した。リン酸緩衝液中の取り出した組織片は重量測定後、緩衝液と共に遊離脂肪酸の定量に供した。

分析方法：グルコースの定量は酵素法によった(藤沢メディカル：ニューグルコスタット、「フジサワ」)。

脂肪酸定量は重量測定後の組織標本を Dole 試薬でホモジナイズし、培養緩衝液と合わせ、50ml の遠沈管に移した後、Dole 液で抽出し、Trout et al. (1960) の方法により行った。

## 2. 実験結果

重炭酸緩衝液中の肝臓組織標本からのグルコース遊離の結果を Table 25 に示した。対照区(100%とする)に対してエピネフリン添加は171.3%、グルカゴン添加は165.7%とグルコース遊離量の増加を起こした。これに対して、コーチゾールは93.3%、インスリンは86.8%となり、明らかに肝臓からのグルコース遊離を抑制する効果が認められた。*in vitro* 実験系へのホルモンの添加は肝臓組織からのグルコース遊離に影響を与えることが明らかとなった。

リン酸緩衝液中の肝臓、筋肉、脂肪組織からの脂肪酸遊離の結果を対照区に対する%値で Table 26 に示した。この値からみると個体差が大きく、どの組織でもエピネフリン、グルカゴン、インスリンには統計的に有意な効果は認められなかった。コーチゾールは肝臓における脂肪

Table 25. The effects of epinephrine, glucagon, cortisol and insulin on the glucose release from the sliced liver samples of the red sea bream in Kreb's bicarbonate ringer solution.

Fish number	Released glucose (mg/h/g tissue)				
	Control	Epinephrine (10 $\mu$ g/ml)	Glucagon (17 $\mu$ g/ml)	Cortisol (10 $\mu$ g/ml)	Insulin (10 $\mu$ g/ml)
1	5.74	6.64	6.30	5.17	4.82
2	5.77	9.34	9.30	5.61	4.43
3	10.46	14.32	14.34	9.93	8.69
4	6.27	15.00	13.54	5.56	5.76
5	8.81	13.97	12.80	7.83	6.71
6	8.47	10.59	9.14	8.20	7.36
7	7.53	8.79	9.43	7.80	7.17
8	0.53	0.63	0.75	0.50	0.65
9	6.94	14.76	15.60	4.99	4.88
10	2.73	8.95	7.87	2.92	2.22
Ratio to controls (%) (mean $\pm$ s.e.)	100.0	171.3 $\pm$ 21.92*	165.7 $\pm$ 18.56*	93.3 $\pm$ 3.04**	86.8 $\pm$ 4.62*

\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.01$ ).

\*\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

Table 26. The effects of epinephrine, glucagon, cortisol and insulin on free fatty acid release from isolated tissues of the red sea bream. The values are expressed as % to control values (mean  $\pm$  s.d.).  
(n)

Tissue	Epinephrine (10 $\mu$ g/ml)	Glucagon (17 $\mu$ g/ml)	Cortisol (10 $\mu$ g/ml)	Insulin (10 $\mu$ g/ml)
Liver	118.8 $\pm$ 25.24 (8)	113.2 $\pm$ 22.09 (6)	116.9 $\pm$ 13.76* (7)	119.3 $\pm$ 40.89 (7)
Adipose tissue	103.9 $\pm$ 25.12 (8)	109.4 $\pm$ 36.63 (8)	100.1 $\pm$ 22.07 (8)	90.5 $\pm$ 18.24 (8)
Fin muscle	110.2 $\pm$ 13.58 (8)	116.6 $\pm$ 28.33 (7)	112.7 $\pm$ 24.59 (6)	119.4 $\pm$ 26.71 (8)

\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

酸遊離を増加させる傾向があるようにみえた。しかし値のばらつきからみて、実験例数をさらに増加してみる必要があるだろう。統計的に有意ではないが、平均値で比較するとホルモンによる脂肪組織からの脂肪酸遊離は肝臓や筋肉からのそれよりも、小さな値を示した。

### 3. 考 察

魚類の物質代謝におけるホルモンの作用機構に関する研究は哺乳動物に比べて遅れている。その理由の一つは各魚種のホルモンの化学的構造と活性の種特異性にあると考えられる。本実験で用いたホルモンのうちグルカゴンとインスリンは蛋白性ホルモンで、哺乳類から抽出されたものであり、魚類のものとは化学的構成に違いがある。コーチゾールは多くの硬骨魚の血液中に存在する主たる corticosteroid であることが確認されており、この種の実験によく用いられている。マダイの血液のジクロロメタン抽出物の中にコーチゾールが存在することは薄層クロマトグラフ

で確認されている(石岡・石岡, 1978)。エピネフリンについては NAKANO and TOMLINSON (1967) がサケ科魚類で哺乳類のものと同であることを確認し, ストレス時の血液中エピネフリン量の変動に関する報告もみられる (MAZEAUD et al. 1977)。

マダイにストレスを与えた時, 条件によっては短時間のうちに高血糖を起すことが本研究第1章で明らかにされた。本節では血糖上昇に与えるホルモンの影響を知るための実験を行ったが, この結果を他魚種での報告と比較検討し, それぞれの作用の特徴を明らかにしたい。

### 1) エピネフリン

エピネフリンの炭水化物代謝に与える影響については in vivo 実験でエピネフリンを投与した後の血液中のグルコース量増加の報告例が多い。Table 27 にこれをまとめた。これらの諸報告は, エピネフリンが, 円口類から板鰓類, 硬骨魚類に至る魚類で血糖上昇を起すことを示しており, この血糖上昇の程度と持続時間や経時変化パターンは投与量や温度との関係が大きいことを示唆している。血糖上昇はエピネフリン投与後速やかに始まる点は共通しており, 投与後15分で明瞭な血糖上昇がみられる場合すらある。

魚類の in vitro 実験における肝臓からのグルコース遊離に関してはウナギで HAYASHI and OOSHIRO (1975a, b) が 0.5mM のエピネフリンが60分間で対照値の約2倍のグルコースを遊離させたと報告し, ウナギの灌流肝を用いた実験でも, エピネフリン $10^{-2}$ mM の添加は顕著なグルコ

Table 27. Effect of epinephrine to the elevation of blood glucose level of the fish

Fish	Administration method	Dose mg/KgB.W.	Temp. °C	Elapsed time(h)	Response*	Author
<i>Lampetra fluviatilis</i>	Intraperitoneal injection	0.2	Winter	1	+	Bentley & Follett (1965)
<i>Scyliorhinus stellaris</i>	Intraaortic infusion	0.025	—	0.5	+	DeRoos & DeRoos (1978)
		0.05	—	0.5	+	"
		0.075	—	0.5	+	"
<i>Squalus acanthias</i>	"	0.075	—	0.25	+	"
<i>Salmo gairdneri</i>	Muscle injection	0.5	12	5	+	Perrier et al. (1971)
	Intraperitoneal injection		14	1	+	Morata et al. (1982)
<i>Esox lucius</i>	Intraventricle infusion	0.05	10-15	0.5	+	Thorpe & Ince (1974)
		1.0	"	"	+	"
		5.0	"	"	+	"
<i>Cyprinus carpio</i>	Intraperitoneal injection	0.1	20	1	+	Mazeaud (1964)
		1.0	16	1	+	Murat (1976)
		1.0	6	1	+	Murat & Serfaty (1975)
		1.0	20	1	+	"
<i>Anguilla anguilla</i>	Intraperitoneal injection	0.5	12	1	+	Larsson (1973)
		5.0	12	1	+	"
	Intraventricle infusion	0.025	15-18	0.25	+	Ince & Thorpe (1977)
		0.05	"	"	+	"

\*; Significantly higher than control values.

ース遊離を起こしたと報告している。UMMINGER and BENZIGER (1975) は *Ictalurus nebulosus* の肝臓組織片は $20\mu\text{g/ml}$ のエピネフリンを加えた時、30分間後にグルコース遊離を増大させると報告した。BIRNBAUM et al. (1976) はキンギョの遊離肝細胞で  $0.05\mu\text{M}$  のエピネフリンが2時間間わたってグルコース遊離を直線的に増大させ続けると報告している。

このグルコース遊離に関するエピネフリンの効果は in vivo 実験系と in vitro 実験系で同一の傾向を示している。今回のマダイの肝臓スライス標本についても、個体差は大きいですが、 $10\mu\text{g/ml}$  のエピネフリンはグルコース遊離を促進する効果を持つことを示した。

エピネフリンの脂肪酸動員作用に関する報告例は少なく、今回のマダイ実験結果のように顕著な効果のみられなかった例もある。FARKAS (1967) はコイに  $2\text{mg/尾}$  のエピネフリンを注射した後2時間して血液および腹腔内脂肪の遊離脂肪酸量の増加は認められなかったとしており、腹腔内脂肪を用いた in vitro 実験でも、エピネフリンによる脂肪酸遊離の効果は認められなかったとし、hormone sensitive lipase が存在しないのではないかと推論している。LÅRSSON (1973) はウナギに  $5\text{mg/kg}$  の多量注射では、1時間から24時間以上にわたる高脂肪酸血症を報告した。MINICK and CHAVIN (1973) はキンギョに $10\mu\text{g/kg}$ 体重のエピネフリンを筋注射した後15分後血清脂肪酸の低下を報告し、INCE and THORPE (1975) は *Esox lucius* で血管カニューレからエピネフリン $0.05\text{mg/kg}$ 体重を注入して血液中遊離脂肪酸の低下を報告した。このようなエピネフリンの血漿遊離脂肪酸量に対する相反する効果が得られた理由は明らかではない。

本実験で用いたエピネフリン濃度は各魚種の in vitro 実験例で用いられた濃度の範囲内にあるが、魚の生理学的攪乱時にみられる血中濃度よりは高い値である (MAZEAUD et al. 1977)。また、反応時間は1時間および3時間で、in vivo 実験で行われるような長時間ではないがストレス時には反応を起こし得る時間である。Table 26 の結果からみても、魚類ではエピネフリンはグルコース遊離には強い作用を持つが、短時間のうちに脂肪酸を動員する効果はないのではないかと考えられる。

## 2) グルカゴン

グルカゴンに関して、魚類での研究はあまり進んでいない。EPPLE (1969) は魚類におけるグルカゴン存在の報告をまとめ、哺乳類グルカゴンの魚類に対する効果を総括しているが、その作用は未だ明確でないとしている。このホルモンは種特異性がかなり高いが、一般的には哺乳動物のグルカゴン投与で魚は血糖上昇を起こすとされている。THORPE and INCE (1974) は *Esox lucius* で  $1\text{mg/kg}$ 、 $2\text{mg/kg}$  の哺乳類グルカゴンの動脈内注入によって、血糖上昇を観察したが、血漿アミノ酸、コレステロールには変動をみていない。また彼ら (1977) はウナギ *Anguilla anguilla* に同じ処理をして15分後に最大血糖上昇を観察した。UMMINGER et al. (1975) は *Fundulus heteroclitus* を用いた in vitro 実験でグルカゴンが肝臓のグリコーゲン・フォスホリラーゼ活性の減衰を抑制することを確認し、このホルモンがグリコーゲン分解に大きく関与することを報告している。また CHAN and WOO (1978 a), INUI and YOKOTE (1977) はウナギで  $0.1\text{mg/kg}$  の筋注、 $50\sim 500\mu\text{g/kg}$  腹腔内注射で有意な血糖上昇を観察した。CARNEIRO and AMARAL (1983) は *Pimelodus maculatus* で  $2.5\text{mg/kg}$  のグルカゴン腹腔内注射が15分後の有意な血糖上昇



を起こしたとしている。これらは哺乳類のグルカゴンが硬骨魚類で血糖上昇作用を有することを示しているが、板鰓類に関しては BENTLEY and FOLLETT (1965), MURAT and PLISETSKAYA (1977)によるとこの作用はみられない。

グルカゴンの作用は硬骨魚類の場合反応速度や血糖上昇の大きさではエピネフリンと類似している。本実験で哺乳類グルカゴンによるマダイ肝臓スライスからのグルコース遊離増加はこれら諸報告と同じものと考えられる。しかしストレス時にグルカゴン分泌亢進があるか否かは明らかでない。

エピネフリンの効果とグルカゴンの効果を比較するために対照区に対するグルコース生成率を%で示し、両者の関係を Fig. 32 に示した。濃度はエピネフリンは  $10\mu\text{g/ml}$ 、グルカゴンは  $17\mu\text{g/ml}$  と異なるが、グルコース遊離に与える影響は類似しており、この現象は基質としてアミノ酸も乳酸も添加していないこと、およびグルコース遊離量が肝体重比が0.8以下の個体では小さいことから、UMMINGER et al. (1975) の示すように、グリコーゲン分解によるグルコース遊離の促進であろうと推察される。MORATA et al. (1982a, b) はニジマスにおける *in vivo* と *in*

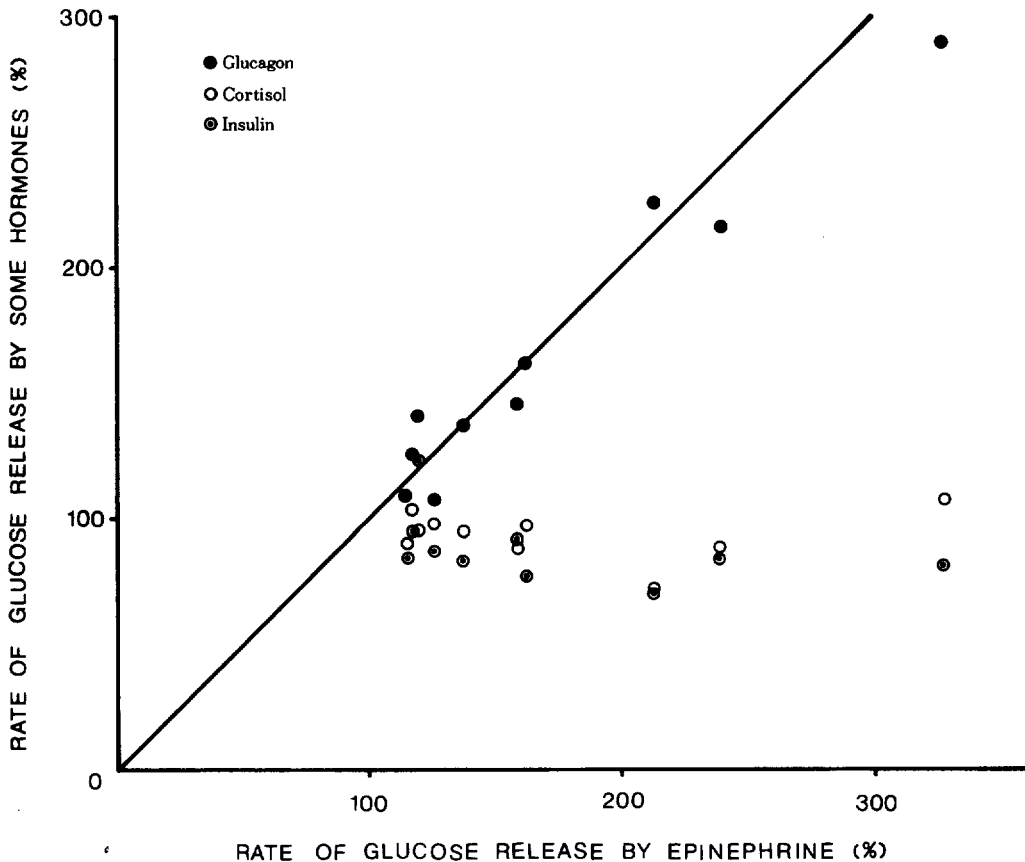


Fig. 32. The relationship between the relative rates of glucose release by epinephrine and those by glucagon, cortisol and insulin from the liver slices.

in vitro 実験でアドレナリン、グルカゴン、cyclic-AMP 添加が肝スライスからのグルコース遊離を促進したにもかかわらず、肝組織のグリコーゲン含量に変化が認められなかったことから、このグルコース遊離は組織中の基質からの糖新生に由来するとしている。しかし遊離されたグルコース量と存在するグリコーゲン量を比較する場合には組織と血液の分布の量的検討が必要で、この点を厳密に検討しないと判断は下せない。

グルカゴンと血液中遊離脂肪酸に関して TASHIMA and CAHILL (1964), LARSSON and LEWANDER (1972), CHAN and WOO (1978 a) はそれぞれ *Opsanus tau*, *Anguilla anguilla*, *Anguilla japonica* でグルカゴン注射は遊離脂肪酸には変化を与えないとしているが、INCE and THORPE (1975) は *Esox lucius* で投与後6時間で有意な上昇を認めている。本実験からみると、グルカゴンはストレス時緊急に脂肪酸遊離に作用するとは考えられないが、この物質の作用についてはなお究明すべき問題点が残されている。

### 3) コーチゾール

魚類における corticosteroid の研究は IDLER and TRUSCOTT (1972) の総説にあるように化学的性質に関してはかなり多くの論文がみられる。一般的には、条件によって変動はあるが血中にはコーチゾールの多いことがよく知られている。しかし、コーチゾールの生物学的作用に関しては糖新生に関するもの以外には報告が少ない。CHESTER-JONES et al. (1972) は硬骨魚肝における糖新生へのコーチゾールの関与は基本的には哺乳類におけるものと変わらないとしている。脂肪酸やアミノ酸代謝についての報告は少ない。

HILL and FROMM (1968) はニジマス腹腔内にコーチゾールペレットを移植して1~2週間後に採血したところ血糖値は上昇しなかったとしている。

BUTLER (1968) はウナギ *Anguilla rostrata* に5 mg/kg 体重のコーチゾールの腹腔内注射を10日から3週間続けた時血中グルコース濃度が増加し、筋肉と肝臓のグリコーゲンが増加したとしている。また、UMMINGER and GIST (1973) はキンギョにコーチゾール 1  $\mu\text{g/g}$  体重の2回目の注射後2時間して有意な血糖上昇を認めており、MURAT (1976) はコイにコーチゾール 2.5mg/kg 体重を注射し12時間後に血糖値は増加したと報告した。INUI and YOKOTE (1975 b, c) はウナギ *Anguilla japonica* に2, 10mg/kg 体重のコーチゾールを5日~10日注射を続けた時、血糖値、肝臓グリコーゲン量、肝臓 GOT, 肝臓 FDP, 肝臓 PFK 活性が増加したとし、さらに肝臓を除去したウナギにコーチゾールを注射(1回, 10mg/kg 体重, 筋肉内)した後、血中グルコースは検出できず、血漿アミノ酸量の増加もみられなかったとしている。CHAN and WOO (1978 b) はウナギ *Anguilla japonica* に1 mg/kg 体重のコーチゾールを筋肉注射し、酸素消費量増加、血清グルコース量増加、血清アミノ酸量増加、肝臓の蛋白質、グリコーゲン、脂質量の増加等を見ており、これらの変化は2時間後から始まり変動することを示している。彼等はコーチゾールが末梢組織の蛋白質や脂肪を分解し、肝臓でそれらからの糖新生を促進すると結論づけている。LIDMAN et al. (1979) はウナギ *Anguilla anguilla* に5 mg/kg 体重のコーチゾールを腹腔内注射し1, 4, 14 日後に取り上げ血清中グルコースの増加や肝グリコーゲンの増加を観察しており、血清脂肪酸量の変化はなかったとしている。DAVE et al. (1979) はコーチゾール注射によって血

液の脂肪酸組成が長期飢餓時のものと似てくることから、中性脂肪の分解と脂肪酸代謝がコーチゾールによって促進されるだろうと推論している。また、LEACH and TAYLOR (1980) はコーチゾールブロック剤を飼育水に加えておいて、魚にストレスを与えた時の血中コーチゾール、グルコース量を測定し、1～3時間後の血液グルコース量の増加はグリコーゲン分解により、6時間後の増加は糖新生によるものと推論した。さらに LEACH and TAYLOR (1982) は *Fundulus heteroclitus* にコーチゾール 200 $\mu$ g/尾を5日間注射したが各注射後数時間以内に高血糖上昇ピークのあることを認めている。

これらコーチゾールの代謝に与える影響についてはすべて in vivo 実験によるものであり、ホルモン投与量が違っても血糖量増加が認められるが、それ以外の反応については、結果は一致していない。特に CHAN and WOO (1978 b) が指摘するように、コーチゾール投与後の採血時間が影響するとすれば、結果に混乱が生じるのも無理はないと考えられる。in vivo 実験のコーチゾールの糖新生効果に関しては、基質がアミノ酸その他種々な物質が存在していることと糖新生現象すなわち血糖上昇が現われるまでに6時間以上の time lag がみられることなどが特徴的である。第1章で報告した各種ストレス時の血糖上昇は条件によっては比較的短時間（1時間以内）で起っている。このことはコーチゾールによる血糖上昇の経時的現象とは異なり、ストレス時の初期の血糖上昇にはコーチゾールが直接関与していないことを推測させる。本実験では組織は神経支配や血流を通じての基質補給や他ホルモンの共存がない状態に置かれており、1時間の初期の反応をみているという点で in vivo 実験とは大きく異なる。供試魚マダイの肝臓は、肝臓であり、Table 24にみられるように、対照組織からのグルコース遊離はかなり大きい。これに対してコーチゾールを添加した時にはグルコース遊離が抑制されている。また、3時間の振盪培養時に肝臓での脂肪酸遊離量は対照区に比べて多かったが、その値は個体差が大きく今後の検討が必要であろう。これらの結果や諸報告からみるとストレス時初期の血糖上昇や遊離脂肪酸の変動にはコーチゾールが主役を果しているとは考えられない。

#### 4) インスリン

インスリンの硬骨魚に対する血糖低下作用は比較的よく研究されている。LEIBSON and PLISSETSKAYA (1968) は *Scorpaena porcus*, *Spicara smaris*, *Trachurus mediterraneus*, *Gobiidae sp.*, *Gyprinus carpio* で、30～80I.U./kg体重のインスリン腹腔内注射で血糖低下がみられたとし、TASHIMA and CAHILL (1968) は *Opsanus tau* への100I.U./kgの牛豚インスリンの静脈注射によって、INUI and YOKOTE (1975 a) は *Anguill japonica* に5 I.U./kg体重の豚インスリン注射によって、INCE and THORPE (1976) は *Esox lucius* に2 I.U./kgのタラインスリンの動脈内注射によって、LEWANDER et al. (1976) は *Anguilla anguilla* に牛豚混合インスリンの腹腔内注射によって、OTTOLENGHI et al. (1982) は *Ictalurus melas* に60I.U./kgの牛インスリンの腹腔内注射によって、マダイに関しては古市・米 (1971 c) が0.02, 2 I.U./100g体重の注射によってそれぞれ顕著な血糖低下を観察している。これらの報告はインスリンが哺乳類のものでも魚類のものでも、また、投与方法が異なっても同様に血糖低下作用を起こすことを示している。経時的なサンプリングを行ったデータからは1時間後にすでに低血糖効果が認められており、この反応の

現われ方は早い。肝臓の炭水化物代謝に与えるインスリンの効果についての *in vitro* 研究は少ない。HAYASHI and OOSHIRO (1975 b) はウナギ灌流肝でインスリン添加がグルコース遊離を抑制したと報告し、DE VLAMING and PARDO (1975) は *Notemigonus crysoleucus* の *in vitro* 実験で、インスリンによる肝臓のグリコーゲン蓄積効果が温度条件によって変わることを報告した。

インスリン注射による血糖値低下は肝臓自体からのグルコース遊離抑制と、肝臓以外の組織による血中グルコースの取り込み増大の相乗効果によるものでないかと考えられる。

Fig. 32 は、エピネフリンやグルカゴンの効果と比較すると、コーチゾールやインスリンのグルコース遊離抑制が100%以下のほぼ一定の値で推移することを示している。これがどのような意義を持つのか明らかではないが、その作用機序においてコーチゾールとインスリンは、エピネフリンやグルカゴンとは異質なものであることを示唆していると考えられる。

魚に投与したインスリンが血中遊離脂肪酸に与える影響については血糖ほどはっきりした傾向は得られていない。TASHIMA and CAHILL (1968) は *Opsanus tau* で100I.U./kgのインスリン静脈注射で4時間後の血中遊離脂肪酸は変動しなかったと報告したが、INCE and THORPE (1975) は *Esox lucius* に2I.U./kg体重のインスリンを投与して著しい遊離脂肪酸の低下を観察した。さらに、MINICK and CHAVIN (1972), LEWANDER et al. (1976) はキンギョとウナギ *Anguilla anguilla* でインスリン投与後の血中遊離脂肪酸低下を報告している。

##### 5) ストレス時の物質代謝に関与するホルモン

今回の *in vitro* 実験系に用いた肝臓は肝臓であるということ、グルコースを添加しない条件であること、反応温度25℃はマダイの通常の生息温度範囲内にあるが、やや高い温度であること、15分間の予備反応後1時間の反応を測定していることなどの条件で取り扱われた。これらの条件はストレス時に放出されたホルモンが代謝に与える直接的影響を見るために設定した条件である。特にストレス時の短時間（1時間以内）に起る血糖上昇には、肝臓や筋肉等のグリコーゲン貯蔵器官からの速やかなグルコース生成と血液中への放出がなければならない。本実験結果から、この条件を満たすものは、エピネフリンとグルカゴンであった。エピネフリンはストレス時、血中に速やかに増加することがよく知られており、この点からも、ストレス時の代謝を支配する主たるホルモンと考えられる。グルカゴンはストレス時にストレスサーに対応して速やかに分泌されるものかどうかは明らかでない。

コーチゾールはストレス時、血液中に著しく増加するホルモンではあるが本実験結果にもみられるように、短時間内に直接肝臓からグルコースを遊離させる作用はみられない。むしろ基質のない状態ではこれを抑制する効果を示した。この効果が *in vivo* 系でも起こっている可能性もあるが、その抑制の程度は大きくないことから、このホルモンの主たる作用が血糖低下にあるとは考え難い。また、このホルモンによる糖新生の可能性については、別途実験をする必要がある。

肝臓からのグルコース遊離はエピネフリンによって大きく促進されることが確認されたが、哺乳類で定説となっているエピネフリンによる脂肪酸遊離の制御に関しては不明のままに残された。ストレス反応時の緊急なエネルギー動員の機構は魚類では哺乳類ほど質的、かつ量的に進化して

いないと考えることもできる。これらの諸点に関しては、さらに、研究を積み重ねてゆく必要があろう。

#### 第4節 エピネフリンの物質代謝にあたる影響

エピネフリン（アドレナリン）は、ストレス時に分泌が促進されるホルモンとしてよく知られている。魚類でもストレス時に血中エピネフリン濃度が増加することは MAZEAUD et MAZEAUD (1981) により報告されている。このホルモンの物質代謝にあたる影響としては、肝臓、筋肉における解糖に関する研究が多い。マダイでは前節の実験結果のように肝臓からのグルコース遊離を速やかに行わせる作用があった。

本節では、ストレス時エピネフリンの存在下で血中グルコースの利用が、どのような影響を受けるかを知るために<sup>14</sup>C-標識グルコースを用いた実験を行ったのでその結果を述べる。

##### 1. 実験条件

実験は2回行った。第1回は1981年秋より南西海区水産研究所陸上コンクリート水槽で、生ガキを与え長期間飼育したマダイ2歳魚を用い、1982年3月20日から4月15日の間に、第2回は養殖場より運搬し約0.5カ月飼育した3歳魚を用いて1983年1月19日から2月10日の間に行った。供試マダイは実験日前日は餌を与えなかった。実験当日は1尾を水槽からとり上げMS222で麻酔し、尾叉長と体重を測定した後、組織標本を調製し、第1節で述べたマニュアルに従って、肝臓スライス標本、胸鰭筋肉剥離標本、腹腔内脂肪組織細片による培養緩衝液中のU-<sup>14</sup>C-グルコースからの炭酸ガス生成、グリコーゲンへの転換、総脂質への取り込みを測定した。実験区にはエピネフリン（シグマ社(→)EPINEPHRINE NO. E-4250)を1フラスコ当り30 $\mu$ gとなるように懸濁緩衝液50 $\mu$ lを添加した。

##### 2. 実験結果

実験IおよびIIに供試したマダイの尾叉長、体重、肥満度および肝体重比をTable 28に示した。実験Iのマダイの全身状態は比較的均一であるのに対して実験IIのマダイではばらつきが大きかった。

各組織標本の実験結果をTables 29~31に示した。肝臓におけるグルコースの代謝では炭酸ガス生成量がグリコーゲンや脂肪として蓄積される量より多い。これはグルコースがエネルギーとして多く消費されることを示している。しかし、組織総取り込み量に比べればそれらの量は少な

Table 28. Body conditions of the red sea bream supplied for the experiment on the effect of epinephrine on glucose metabolism in the tissues (mean $\pm$ s. d.).

Experiment	Fork length (cm)	Body weight (g)	Liver weight (g)	Condition factor <sup>1)</sup>	Hepatosomatic <sup>2)</sup> index
I (n=6)	27.6 $\pm$ 1.35	429.6 $\pm$ 72.85	5.43 $\pm$ 0.95	2.03 $\pm$ 0.16	1.27 $\pm$ 0.18
II (n=7)	29.3 $\pm$ 3.31	495.4 $\pm$ 215.2	10.21 $\pm$ 5.72	1.88 $\pm$ 0.39	2.03 $\pm$ 0.71

<sup>1)</sup>; Condition factor and hepato-somatic index were calculated with body weight, fork length, and liver weight according to the formula listed in Table 23.

Table 29. Effect of epinephrine on the utilization of U-<sup>14</sup>C-glucose in the medium by isolated liver slices from the red sea bream (mean±s. d.).  
(n)

No.	Experiment group	<sup>14</sup> C-incorporation (dpm/mg tissue/h)			
		CO <sub>2</sub>	Tissue incorp.	Glycogen	Lipid
I	Control	9.74±2.10 (5)	—	2.37±1.11 (5)	2.82±0.58 (5)
	Epinephrine	9.98±2.01 (6)	—	1.30±0.56* (6)	2.56±0.37 (5)
II	Control	5.68±3.85 (6)	206.6±43.69 (6)	2.52±0.88 (6)	1.62±0.56 (6)
	Epinephrine	5.16±1.53 (6)	223.2±40.37 (7)	4.41±3.14 (6)	1.37±0.34 (6)

\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

Table 30. Effect of epinephrine on the utilization of U-<sup>14</sup>C-glucose in the medium by isolated fin muscles from the red sea bream (mean±s. d.).  
(n)

No.	Experiment group	<sup>14</sup> C-incorporation (dpm/mg tissue/h)			
		CO <sub>2</sub>	Tissue incorp.	Glycogen	Lipid
I	Control	3.43±1.42 (6)	—	32.55±12.91 (6)	0.85±0.21 (6)
	Epinephrine	3.19±0.64 (6)	—	14.87±7.13* (6)	0.98±0.40 (6)
II	Control	3.00±0.76 (5)	333.1±30.04 (6)	29.88±13.01 (6)	0.35±0.07 (6)
	Epinephrine	2.94±0.65 (5)	315.0±47.99 (6)	21.01±9.93* (6)	0.39±0.14 (6)

\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

Table 31. Effect of epinephrine on the utilization of U-<sup>14</sup>C-glucose in the medium by isolated adipose tissue pieces from the red sea bream (mean±s. d.).  
(n)

No.	Experiment group	<sup>14</sup> C-incorporation (dpm/mg tissue/h)			
		CO <sub>2</sub>	Tissue incorp.	Glycogen	Lipid
I	Control	1.57±0.06 (5)	—	—	0.99±0.13 (6)
	Epinephrine	1.99±0.88* (5)	—	—	1.01±0.29 (6)
II	Control	0.85±0.42 (4)	37.83±20.49 (4)	—	1.16±0.37 (4)
	Epinephrine	0.82±0.39 (4)	33.28±8.38 (4)	—	1.24±0.34 (4)

\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

い。胸鰭筋肉 (Table 30) ではグルコースはグリコーゲンとして取り込まれる量が多く、組織取り込み量の約10%を占め、炭酸ガス生成量の約10倍にあたる。脂肪組織 (Table 31) では炭酸ガス生成量、組織への取り込み量、脂肪への転換量は少なかった。

各組織のグルコースの利用に関して、エピネフリンを添加すると、いくつかの変化が起こった。肝臓組織では、グルコースからのグリコーゲン生成は実験Ⅰでは抑制されたが、実験Ⅱでは抑制はなく平均値はむしろ増大した。胸鰭筋肉組織では、エピネフリンは実験Ⅰと実験Ⅱでグルコースのグリコーゲンへの転換を抑制した。この抑制は実験Ⅰの方が大きかった。脂肪組織では実験Ⅰで炭酸ガス生成量がエピネフリン添加によって有意に増大したが、実験Ⅱではこの傾向は認められなかった。

### 3. 考 察

#### 1) 組織における炭水化物代謝

魚類の炭水化物代謝に関する報告は多いが、各組織や器官の代謝の様相を明らかにしているものは少ない。その中で肝臓組織については比較的多く *in vivo* と *in vitro* の研究がみられる。NAGAI and IKEDA (1971 b, 1972) は、 $\text{glucose-6-}^{14}\text{C}$ ,  $1\ \mu\text{Ci}$  をコイの腹腔内に注射した時、炭酸ガス生成に10%、肝臓グリコーゲンへの取り込みに1.11%利用されること、また、 $\text{glucose-U-}^{14}\text{C}$  を腹腔内注射した時は炭酸ガスに9.67%、肝臓グリコーゲンに2.10%、中性脂肪に0.67%利用されることをみている。RENAUD and MOON (1980) は *Anguilla rostrata* の摘出肝臓細胞における $^{14}\text{C}$ - $\text{glucose}$  を用いたグルコース利用に関する実験で炭酸ガス、脂質、グリコーゲンへの取り込み比率はそれぞれ2.5:60.5:8.3%となると報告した。本実験の場合には実験ⅠとⅡで結果が異なったが、グリコーゲンへの取り込み比率は NAGAI and IKEDA のコイの実験結果と近い値を示しており、炭酸ガスとしての利用率が高い。RENAUD and MOON の実験結果との差は魚種、魚の状態、用いたグルコースの濃度等の違いによるものと考えられる。

筋肉組織について WITTENBERGER and DIACIUC (1965) は電気刺激したコイの側線部の赤筋と白筋の乳酸、グリコーゲン、ピルビン酸量の変動から赤筋が筋肉の代謝中心的な役割を果たすことを推察し、さらに  $\text{U-}^{14}\text{C}$ - $\text{glucose}$   $6\ \mu\text{Ci}$  を *Scomber scombrus* の体側赤筋に注射し、1時間後に赤筋、白筋、肝臓への取り込み量とグリコーゲンへの取り込み量をみている (WITTENBERGER 1972)。興味深いことには、肝臓のグリコーゲンへ1.3%がとり込まれるのに対して赤筋のグリコーゲンへは27.7%とり込まれており、これは本実験のマダイで、グリコーゲンへの取り込み量が、肝臓:胸鰭筋肉(赤筋)で2.37:32.55と2.52:29.88であることと類似した結果である。

本実験結果の対照区の値からグルコースからの炭酸ガス生成(エネルギーとしての利用)を組織間で比較すると、肝臓>胸鰭筋肉>腹腔内脂肪組織の順となる。腹腔内脂肪を1とすると胸鰭筋肉ではその2~4倍、肝臓では6~7倍となる。炭酸ガス生成量は組織呼吸量を示すので、この数値は組織の代謝活性の程度を示すものといえよう。

組織への総取り込み量は胸鰭筋肉>肝臓>腹腔内脂肪の順となり、腹腔内脂肪を1とすると肝臓では約6倍、胸鰭筋肉では約9倍となり、これはグルコースの組織に対する親和性や利用程度が異なることを意味しているものと考えられる。

グリコーゲンへの利用は胸鰭筋肉では肝臓の10倍以上も活発である。脂質への利用は肝臓 > 腹腔内脂肪組織 > 胸鰭筋肉の順となっている。これらグルコースのとり込み型と量の相違は各組織ごとのグルコース利用の方法に特徴があることを示している。

## 2) エピネフリンの効果

本研究ではストレス時のグルコース利用の様相を知るために、これら異なったグルコース利用特性を持つ組織代謝系へのエピネフリン添加の影響を調べた。2つの実験に共通した効果は、胸鰭筋肉組織におけるグルコースのグリコーゲンへの利用の抑制であった。肝臓でのグリコーゲンとしての利用の抑制は実験Ⅰで認められたが、実験Ⅱでは認められなかった。実験Ⅱの魚の肝臓ではグルコースからのグリコーゲン生成の増加を示し、対照値に対する増加率は225.5%にも達した。このことは実験季節や年齢等に関係があるのかもしれない。

魚類でエピネフリンが組織の物質代謝に与える影響に関しては、心臓血管系、筋肉、肝臓組織についていくつかの報告がみられる。

PEYRAUD-WAITZENEGGER (1979) はウナギ *Anguilla anguilla* における *in vivo* 実験でアドレナリン投与による呼吸水量増加を報告したが、さらにこのアドレナリン効果が冬期と夏期では全く異なり、冬期には  $\alpha$ -receptor が夏期には  $\beta$ -receptor が反応することを報告した (PEYRAUD-WAITZENEGGER et al. 1980)。TIRRI and RIPATTI (1982) は *Perca fluviatilis* の摘出心臓に対するアドレナリンの影響を調べ、アドレナリンは心拍数を減少させ、この効果は温度が低いほど大きいとした。PÄRT et al. (1982) はアドレナリンはニジマスの灌流鰓の血管系の収縮を起こすとした。

筋肉組織におけるグリコーゲン消長とエピネフリンの効果に関して、BENTLEY and FOLLETT (1965) は *Lampetra fluviatilis* にアドレナリンを腹腔内注射して血糖増加と筋肉グリコーゲンの有意の減少をみたが、肝臓のグリコーゲン減少は認められなかった。WITTENBERGER et al. (1975) は体側の赤筋と白筋の *in vitro* 実験で培養液中にグルコースが存在すると赤筋ではグリコーゲンの減少がみられず、白筋でのみ認められたとし、赤筋におけるグルコースからのグリコーゲン合成能の大きさを確認し、この系にアドレナリンを添加すると赤筋における著しいグリコーゲン減少が認められたとしている。

肝臓組織については、アドレナリン投与と、グリコーゲン量変化やグリコーゲン・フォスホリラーゼ活性との関係に関する報告がある。MURAT et SERFATY (1975) は6℃、20℃、30℃で4カ月飼育したコイに100 $\mu$ g/100g 体重のアドレナリンを腹腔内注射し血糖の有意な増加は認められたが、肝臓、白筋、赤筋のグリコーゲンは変動も少なくかつ一定の傾向をみていない。UMMINGER and BENZIGAR (1975) は *Ictalurus nebulosus* の摘出肝臓片を用い、培養液にエピネフリンを加えるとグリコーゲン・フォスホリラーゼ活性の減衰が阻止され、同時に培養液中にグルコースが遊離したことから、エピネフリンは効果的な解糖促進剤であるとした。また UMMINGER et al. (1975) は *Fundulus heteroclitus* で同様な結果を得た。VERNIER et SIRE (1978a) はニジマスの肝臓組織を用いた *in vitro* 実験でアドレナリンがグリコーゲン・フォスホリラーゼ活性の減衰を抑制し、グリコーゲンが消費されることを報告し、さらに *in vivo* 実験で50 $\mu$ g/100



8 体重のアドレナリンを静脈注射した時、グリコーゲン・フォスホリラーゼ活性は増大したという (VERNIER et SIRE 1978 b)。BIRNBAUM et al. (1976) は、キンギョの摘出肝細胞の培養液中のグルコース量の有意な増加と共に肝細胞グリコーゲン量が減少したとしている。そして、この反応の初期に cyclic-AMP が増加していることから、このグルコース遊離が解糖によることを明らかにした。

これらエピネフリンの物質代謝に与える影響は解糖によるエネルギー産生を意味していることで一致している。

本実験で明らかにされた胸鰭筋肉や肝臓におけるグルコースからのグリコーゲン合成のエピネフリンによる抑制は、エピネフリンによる肝臓からのグルコース遊離増加 (第3節 (石岡 1984 c)) と表裏一体の関係にあるものと推測される。すなわち、エピネフリンによる解糖代謝系の活性化が関与していると考えられる。示野 (1974) は魚類の肝臓や筋肉組織が解糖系の諸酵素を有していると述べている。彼によると解糖系の key 酵素である phosphoglucose isomerase と phosphofructokinase は肝臓、腎臓、心臓、消化管、血合肉、普通肉に広く分布し、活性は肝臓と普通肉で高く、両酵素の組織分布パターンは数種類の魚でよく似ている。マダイでも肝臓や筋肉にはこの解糖経路が備わっているものと考えられる。マダイでは少なくとも肝臓には phosphofructokinase が存在しかなりの活性を示すことを確認している (石岡未発表)。

本実験結果では培養液中に多量のグルコースが存在し、組織取り込み量からみてグルコースの組織への透過性は高いにもかかわらず、エピネフリンを添加しても肝臓や筋肉ではグルコースからの炭酸ガス生成に変化がなく、総脂質への取り込みにも変化はなかった。このことはエピネフリンは、代謝の方向をグリコーゲン分解へ切り換える役割を特異的に果し、結果的に各組織におけるグルコースの利用特にグリコーゲンとしての利用を抑制するものと考えられる。特に胸鰭筋肉組織では細胞外グルコースからのグリコーゲン合成機能が著しく高いので、グルコース利用率は低下することになる。一方、筋肉に対するグルコース透過性が高いということは白筋が継続的に多量のグルコースの供給を受けることにつながり、同時にエネルギーとしての利用が抑制されることはないので緊急時の逃避行動には有利であると考えられる。

## 第5節 コーチゾールの物質代謝にあたる影響

ストレス時に短時間内に循環血液中のコーチゾール量が増加する事実はよく知られている。しかし、このホルモンが糖新生に効果を持つということだけは比較的多くの報告があるが物質代謝系に与える影響に関する研究は少ない。それはこのホルモンが十分な効果を発揮するまでに長時間を要する故かもしれない (第3節) が、ストレス時のこのホルモンの物質代謝系に対する役割や意義に関しては不明確な点が残されている。本節ではコーチゾールが短時間内に魚類の物質代謝に与える作用をみるため in vitro 系で組織標本を用いグルコース、乳酸、グリシンの物質代謝にあたる影響を調べた。

### 1. 実験条件

グルコース利用に対するコーチゾールの効果の実験は第4節の実験Ⅱの魚体と同一のものを

いた。実験区には1フラスコ当たりコーチゾール（シグマ社 Hydrocortisone No. H-4001）を30 $\mu$ g となるよう懸濁緩衝液50 $\mu$ l を添加した。

乳酸利用に対するコーチゾールの効果の実験では、結晶乳酸（シグマ社、L(+)-Lactic acid L-1750）を用い、これの0.5M 溶液4 ml に U-<sup>14</sup>C-乳酸50 $\mu$ Ci を含む標識乳酸を原液とし、蒸溜水で10倍希釈したものの50 $\mu$ l を3 ml の培養液（クレブス氏重炭酸緩衝液）に加え基質とした（0.0625  $\mu$ Ci/2.5 $\mu$ mol 乳酸）。組織標本の作製、振盪培養方法等は第一節で述べたとおりである。炭酸ガス生成、組織への取り込み量、グリコーゲンや総脂質への取り込み量の測定は第1節のマニュアルによったが肝臓に関しては、乳酸からのグルコース生成量も測定した。

アミノ酸利用に与えるコーチゾールの効果の実験ではグリシンを基質とした。標識グリシンとしては U-<sup>14</sup>C-グリシンを用い、100 $\mu$ Ci/0.5M グリシン液を50 $\mu$ l 培養液に添加した（1 $\mu$ Ci/25  $\mu$ mol グリシン）。コーチゾールは、実験区に30 $\mu$ g/50 $\mu$ l の懸濁液を添加した。振盪時間は予備実験の結果から3時間とした。アミノ酸基質の場合はグルコース生成量を求める時 pH 調整に時間がかかり容量決定が困難なので、炭酸ガス生成量測定と、組織総取り込み量、グリコーゲン、脂質、グルコース生成量測定とは、並行して別のフラスコで行った。前者は内室付き二重フラスコを、後者は20ml シリコンゴム栓付三角フラスコを用いた。炭酸ガス生成量測定用フラスコは1時間の振盪培養後マニュアル通りに、その他の測定用フラスコは3時間の振盪培養後、1本づつ氷冷水につけ反応を停止させ直ちに組織片を取り出して重量測定を行い、組織を分割、重量測定後必要な操作を行った。

## 2. 実験結果

実験Ⅰ（グルコース基質）、実験Ⅱ（乳酸基質）、実験Ⅲ（グリシン基質）に用いた魚の状態を Table 32 に示した。実験ⅠとⅡの魚は3年魚、実験Ⅲの魚は2年魚である。

Table 33 に グルコース利用の代謝に関する各組織の炭酸ガス生成、組織への取り込み、グリコーゲンへの転換量、総脂質への転換量を<sup>14</sup>Cによって測定した結果を示した。代謝の様相は第4節で述べたように肝臓では炭酸ガス生成に利用される割合が高く、胸鰭筋肉ではグリコーゲンへ取り込まれる量が多く脂肪組織では組織取り込み量が少ない。これに対してコーチゾールの添加は胸鰭筋肉における<sup>14</sup>C 総取り込み量を有意に減少させた。その値は対照区の約88%であった。腹腔内脂肪組織では総脂質への取り込みを増加させ対照区の約120%となった。コーチゾールの添加は組織におけるエネルギーとしての利用（炭酸ガス生成）とグリコーゲンへの転換には影響を与えなかった。

乳酸を基質とした場合の結果を Table 34 に示した。肝臓では乳酸からの炭酸ガス生成、グル

Table 32. Body conditions of the red sea bream supplied for the experiment (mean $\pm$ s. d.).

Experiment No.	Fork length (cm)	Body weight (g)	Liver weight (g)	Condition factor	Hepato-somatic index
I (n=7)	29.3 $\pm$ 3.31	495.4 $\pm$ 215.2	10.21 $\pm$ 5.72	1.88 $\pm$ 0.39	2.03 $\pm$ 0.71
II (n=7)	30.3 $\pm$ 1.40	550.6 $\pm$ 75.0	8.34 $\pm$ 2.61	1.98 $\pm$ 0.10	1.53 $\pm$ 0.51
III (n=9)	25.5 $\pm$ 1.43	332.0 $\pm$ 59.4	3.81 $\pm$ 1.39	1.99 $\pm$ 0.12	1.13 $\pm$ 0.31

Table 33. Effect of cortisol on the utilization of U-<sup>14</sup>C-glucose in the medium by isolated tissue samples of the red sea bream (mean±s.d.).  
(n)

Tissue	Group	<sup>14</sup> C-incorporation (dpm/mg tissue/h)			
		CO <sub>2</sub>	Tissue incorp.	Glycogen	Lipid
Liver	Control	5.79±3.52 (7)	206.23±43.94 (6)	2.48±0.81 (7)	1.667±0.525 (7)
	Cortisol	5.41±2.78 (7)	203.34±49.26 (6)	2.44±0.63 (7)	1.709±0.537 (7)
Fin muscle	Control	2.95±0.63 (7)	333.15±30.04 (6)	32.96±14.40 (7)	0.350±0.068 (7)
	Cortisol	2.81±0.91 (7)	292.66±35.48* (6)	29.59±13.54 (7)	0.330±0.034 (7)
Adipose tissue	Control	1.22±0.97 (7)	70.93±55.76 (6)	—	1.057±0.322 (7)
	Cortisol	2.14±3.96 (7)	81.66±102.80 (6)	—	1.265±0.382** (7)

\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

\*\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.01$ ).

Table 34. Effect of cortisol on the utilization of U-<sup>14</sup>C-lactic acid in the medium by isolated tissue samples of the red sea bream (mean±s.d.).  
(n)

Tissues	Group	<sup>14</sup> C-incorporation (dpm/mg tissue/h)				
		CO <sub>2</sub>	Tissue incorp.	Glycogen	Lipid	Glucose
Liver	Control	43.61±17.40 (6)	37.69±19.80 (6)	0.584±0.783 (6)	17.31±18.57 (6)	44.06±27.62 (6)
	Cortisol	48.25±23.52 (5)	37.69±16.90 (6)	0.540±0.755 (6)	15.82±16.61 (6)	41.58±36.09 (6)
Fin muscle	Control	9.16±2.86 (6)	14.15±3.84 (6)	0.835±0.625 (6)	0.740±0.312 (6)	—
	Cortisol	8.79±3.80 (6)	13.74±2.53 (6)	0.991±0.757 (6)	0.667±0.322 (6)	—
Adipose tissue	Control	7.40±2.37 (5)	7.15±3.00 (5)	—	2.919±1.822 (5)	—
	Cortisol	7.20±2.93 (5)	6.01±3.09 (5)	—	2.386±1.283 (5)	—

コース生成, 総脂質への取り込みは大きい, グリコーゲンへの取り込みは少ない。総脂質への乳酸の取り込み量は組織取り込み量の38%に達した。胸鰭筋肉では乳酸による炭酸ガス生成量が多いが, グリコーゲンと総脂質への取り込みは少ない。腹腔内脂肪組織では組織への取り込み量は少ないが乳酸からの炭酸ガス生成, 総脂質への取り込み量は多い。コーチゾールの添加はこれら測定した項目いずれについても有意な影響を与えなかった。

Table 35 にアミノ酸 (グリシン) を基質とした場合の結果を示した。本実験結果では個体差が大きかった。肝臓ではグリシンからの炭酸ガス生成は大きい。組織への総取り込み量は大きい, これに比べるとグリコーゲン, 総脂質, グルコースへの取り込みは相対的に少なかった。

Table 35. Effect of cortisol on the utilization of U-<sup>14</sup>C-glycine in the medium by isolated tissue samples of the red sea bream (mean±s.d.).  
(n)

Tissue	Group	<sup>14</sup> C-incorporation (dpm/mg tissue/3h.)				
		CO <sub>2</sub>	Tissue incorp.*	Glycogen*	Lipid*	Glucose*
Liver	Control	536.25±496.80 (6)	1006.99±206.55 (9)	13.51±17.80 (9)	29.40±27.50 (6)	91.45±84.16 (8)
	Cortisol	482.46±374.46 (6)	1059.99±248.03 (9)	4.58±8.24** (9)	20.74±16.01 (6)	88.75±94.78 (8)
Fin muscle	Control	0.69±0.57 (4)	392.10±25.67 (6)	0.014±0.007 (6)	0.879±0.496 (6)	—
	Cortisol	0.68±0.60 (2)	370.65±29.37** (6)	0.017±0.014 (6)	0.526±0.059 (6)	—
Adipose tissue	Control	2.12±1.59 (4)	165.52±60.55 (5)	—	0.645±0.183 (5)	—
	Cortisol	2.76±1.35 (4)	189.30±72.78 (5)	—	0.627±0.119 (5)	—

\*; Data from tissues without fixation by 2N HCl solution.

\*\*; Significantly different from controls ( $p \leq 0.05$ ).

胸鰭筋肉では炭酸ガス生成は極めて少なくブランクとの差が求められない例も多かった。また、この組織でのグリコーゲンや脂質としての利用も少なかった。腹腔内脂肪組織ではグリシンから炭酸ガス生成も総脂質への取り込みも少なかった。このような各組織の代謝系へのコーチゾールの添加は肝臓におけるグリシン <sup>14</sup>C のグリコーゲンへの利用を抑制し (対照値の34%)、また胸鰭筋肉組織におけるグリシンの総取り込みを減少させた (対照値の95%)。

### 3. 考 察

肝臓、胸鰭筋肉、腹腔内脂肪組織における、グルコース、乳酸、グリシン等、エネルギー源物質の代謝に関する魚類での研究は少ない。

#### 1) グルコースの代謝とコーチゾール

基質グルコースの代謝に関してコーチゾールは胸鰭筋肉におけるグルコース取り込みの抑制と腹腔内脂肪組織における脂質への取り込み増加という効果を示した。ストレス時の高血糖の原因として、体組織におけるグルコース取り込み抑制があるのではないかという仮説に対しては、うまくあてはまる結果となっている。しかし、胸鰭筋肉組織は肝臓よりもグリコーゲン合成機能の高い組織であり、ストレス時にはグルコース遊離を行い、白筋でのグルコース利用を助ける働きをするものと考えれば (第4節)、外部グルコース取り込み機能の抑制は合理的な効果とは考え難い。実験条件は、高濃度グルコース、高濃度コーチゾール存在下で行っており、この取り込み抑制の程度もそう大きくはないのでストレスの状態によっては起こり得る状況であり、かつ、グルコースの細胞における取り込みに対するコーチゾールの直接的作用と考えるより、複合的なグルコースの代謝に由来する二次的な効果と考えた方がよいであろう。

腹腔内脂肪組織におけるグルコースの脂質区分への取り込み増加を含めてコーチゾールの添加は腹腔内脂肪組織での活性を高める傾向がみられる。哺乳類での報告とは全く逆のこの現象

(FAIN and CZECH 1973) のストレス時の意義については明らかでない。エピネフリンの作用(第3節)も、コーチゾールの効果も、哺乳類のものとは異っており、魚類の脂質代謝とホルモンの関係については、より一層の研究が必要であろう。

## 2) 乳酸の代謝とコーチゾール

乳酸基質の場合、炭酸ガス生成量は肝臓>胸鱭筋肉>腹腔内脂肪組織の順となり、順位はグルコース基質の場合と同じであるが、炭酸ガス生成に利用される<sup>14</sup>Cの比率は肝臓での炭酸ガス生成にみられるように著しく大きい。組織への総取り込み量も順位は肝臓>胸鱭筋肉>腹腔内脂肪組織となる。組織への取り込み量と炭酸ガス生成量の割合はほぼ1:1であり、組織にとり込まれても、直ちにエネルギーとして利用されるものと考えられる。また、グリコーゲンへの利用量に比べて総脂質への取り込み量が多いことが特徴的である。

HAYASHI and OOSHIRO (1975 a, b, c, 1977, 1979) は乳酸からの糖新生を灌流肝、肝スライズ組織、肝細胞で調べているが、灌流肝での乳酸からの<sup>14</sup>C-グルコースの生成は速やかに添加乳酸量に対して1時間1g組織あたり5.47%と14.3%の値を得ている。RENAUD and MOON (1980) は *Anguilla rostrata* の遊離肝細胞を用いた *in vitro* 実験で U-<sup>14</sup>C-乳酸はグルコースと脂質に多く取り込まれ、グリコーゲンへの取り込みはきわめて少なかったとしている。本研究の結果と比べると、炭酸ガス生成、グルコース、脂質、グリコーゲンへの取り込み率は異なっているが、グリコーゲンへの取り込みが少ないという点では一致している。上記実験の中にもみられるように取り込み率は濃度により影響されるであろうし、魚種や魚の状態、用いた化合物の形、実験条件によっても異なってくると考えられる。いづれにしても乳酸からのグルコース生成はマダイの肝臓においても速やかに行われ、添加乳酸がグルコース生成に利用される割合は高い。

RENAUD and MOON (1980) は *in vitro* 実験で乳酸からの糖新生はコーチゾールによって促進される現象が培養3時間後には認められたとしているが、2時間までは有意差を認めていない。この結果は糖新生にコーチゾールが直接関与している点を確認している点では重要であるが、本実験結果と考えあわせると、ストレス反応時初期、乳酸からの糖新生をコーチゾールが促進しているとは考えられない。

## 3) アミノ酸の代謝とコーチゾール

比較した3組織では肝臓におけるアミノ酸代謝が活発で胸鱭筋肉や腹腔内脂肪ではやや不活発であるという特徴が明らかとなった。肝臓ではグリシンは炭酸ガス生成(エネルギーとしての利用)に用いられる割合が非常に高いのに対しグリコーゲンとして蓄積される割合は低い。胸鱭筋肉と腹腔内脂肪組織では炭酸ガス生成、グリコーゲン生成、脂質への取り込み量はきわめて少ない。炭酸ガス生成、グリコーゲン、脂質への取り込み量と比べて、組織への取り込み量が多いことはグリシンがエネルギーとしてよりも蛋白質やその中間代謝物として利用される割合が高いという推定の根拠となろう。

### (1) アミノ酸の組織取り込みに対する効果

アミノ酸を基質とした時の物質代謝はグリシンにかぎらずロイシン、セリン、アラニン等が *in vivo*, *in vitro* 実験系で用いられている。JACKIM and LAROCHE (1973) は *Fundulus heteroclitus*

の背部筋肉蛋白質への U-<sup>14</sup>C-ロイシンの取り込みを調べ、温度や酸素分圧低下 (2.5ml/l 以下) その他のストレスで、取り込み量は減少したと述べているがこの際コーチゾンは取り込みに何ら効果を示さなかったとしている。本実験では胸鱭筋肉でわずかに全体的な組織への取り込みの低下が認められた。STEELE (1975) はラットの横隔膜筋におけるアミノ酸とり込みの抑制がコーチゾール投与後数時間以内に起ることを intact と副腎除去動物で調べた報告を紹介しており、この部分は今回のマダイ胸鱭筋肉で得られた結果と一致している。

## (2) アミノ酸からの糖新生に対する効果

WALTON and COWEY (1979 b) はニジマスの遊離肝細胞における U-<sup>14</sup>C-セリンからの糖新生を調べ 5.7  $\mu$ mol/hr/g という数値を報告している。これは 171dpm/mg 組織/hr. に相当し、本実験のグリシンによって得られた値よりかなり大きい。このセリンからの糖新生はピルビン酸や他のアミノ酸 (アラニン) の存在によって増加することも報告されている。また WALTON and COWAY (1979 a) はニジマスの肝細胞でアラニンからの糖新生を調べ乳酸からの量の 1/2 以下であるとしている。HAYASHI and OOSHIRO (1977, 1979) はウナギの灌流肝や肝細胞においてアラニンからの糖新生を確認している。グリシンの利用に関しては in vivo 系による実験が多い。DEMAËL-SUARD et al. (1974) は *Tinca vulgaris* に 1  $\mu$ Ci の <sup>14</sup>C-グリシンを腹腔内注射し、短時間のうちに肝臓グリコーゲンやグルコースへ転換されることをみている。これらの諸報告は、魚種や実験方法、基質となるアミノ酸の種類と量などが異なるが、アミノ酸からの糖新生が速やかに行われることでは一致している。肝臓におけるグリコーゲンとしての利用や糖新生の大きさは条件によって異なっている。本研究でも肝臓におけるグリシンからのグルコース生成が速やかでその量も比較的多いことは明らかとなったが、3 時間の培養でこの作用をコーチゾールが促進することはなく、in vivo 実験による糖新生促進効果とは異なった結果となっている (INUI and YOKOTE 1975a, b, DAVE et al. 1979, LIDMAN et al. 1979)。コーチゾールの数日間投与による血糖増加反応とも、CHAN and WOO (1978 b) や LEACH and TAYLOR (1982) のように 1 回投与後短時間内の血糖増加の結果とも一致しない。in vivo 実験ではコーチゾール以外の要因 (エピネフリン) で血糖上昇が起こり易いことを考え合わせると、コーチゾールの作用により 1, 2 時間内に糖新生が急に多くなることはないであろう。

## (3) アミノ酸のグリコーゲン、脂質への取り込みに対する効果

グリシンのグリコーゲンや脂質への取り込みは Table 35 にみられるように速やかに行われ、この機能は肝臓において著しい。コーチゾールは、肝臓グリコーゲンへの取り込みを減少させる効果を示した。アミノ酸が魚類の肝臓グリコーゲンに速やかに取り込まれることは DEMAËL-SUARD et al. (1974) が *Tinca vulgaris* で RENAUD and MOON (1980) が *Anguilla rostrata* で報告した。しかし in vitro 実験系でコーチゾールがアミノ酸のグリコーゲンへの取り込みを抑制することに関する報告例はみられない。in vivo 実験系におけるコーチゾール注射と肝臓グリコーゲンの増減に関しても一定の傾向は得られていない。STORER (1967) はキンギョに 200  $\mu$ g/g 体重のコーチゾールを毎日 1 回 4 日間飢餓魚と摂餌魚にくり返し腹腔内注射をした。その結果肝臓グリコーゲン量には変化はなかったとした。BUTLER (1968) は脳下垂体除去手術をし

た *Anguilla rostrata* と正常魚に毎日 5 mg/kg 体重のコーチゾール腹腔内注射を10日間続けた時、肝臓と筋肉のグリコーゲン増加を起こしたという。INUI and YOKOTE (1975a,b) はウナギ *Anguilla japonica* に 2 mg/kg のコーチゾールを毎日注射し 5 日と10日後に血糖、肝臓重量、肝臓グリコーゲン、GOT、GPT 活性の増加を報告したが、同時に肝臓における解糖 key 酵素の PFK 活性の著しい増加があることや血漿アミノ酸窒素の増加がみられないこと等を報告し、ウナギでは体蛋白質の分解と移動にコーチゾールが果たす役割はインスリンほど明確でないとしている。CHAN and Woo (1978b) は *Anguilla japonica* に 1 mg/kg のコーチゾールを正常魚と脳下垂体除去魚に1回だけ注射し、その後の代謝変化を調べ、コーチゾールの作用が比較的少量の投与量で、短時間のうちに起こることを明らかにし、酸素消費量増加、呼吸商低下、血糖増加、血清  $\alpha$ -アミノ酸増加、肝臓 GOT 活性増加、9時間後の肝臓グリコーゲン増加、24時間後の肝臓脂肪の増加等を報告し、肝臓グリコーゲンや血糖の基になる炭素骨格は筋肉のような末梢組織からのアミノ酸や脂肪酸によると推測した。DAVE et al. (1979)、LIDMAN et al. (1979) は *Anguilla anguilla* に 5 mg/kg 体重のコーチゾールを毎日14日間腹腔内注射した後に、対照値と比べて血糖値と肝臓グリコーゲン量の増加を認めている。LEACH and TAYLOR (1982) は *Fundulus heteroclitus* に毎日 20  $\mu$ g/g のコーチゾールを5日間注射した場合と1回注射の場合の物質代謝の影響を摂餌魚と飢餓魚で観察し、1回注射の場合には1時間以内に血糖増加の効果がみられること、長期多量投与の場合に肝臓グリコーゲン蓄積がみられるのは飢餓魚の場合だけであったと報告した。

コーチゾールの物質代謝に対する研究では効果が現われるまでにかかなりの時間がかかること、明確な効果を見るには、コーチゾールの反復投与が必要であること、脳下垂体除去手術を行い ACTH の作用を除き体ステロイド量を低下させた個体にコーチゾールを投与する等の工夫が必要であることなどいくつかの工夫が含まれている。これらは、体内産生コーチゾールを抑制した上で添加コーチゾールの効果を観察する方法であるが、このことは、コーチゾールが微量で常時個体の物質代謝全体に重要な役割を果たしていることを意味し直接的反応の主体の把握を困難にしている。

#### 4) ストレス時の血糖上昇とコーチゾール

魚のストレス時の血中コーチゾール量増加の状態は実験系としては、脳下垂体除去や長期にコーチゾールを注射した時の状態ではなく“intact”な魚に過剰なコーチゾールを投与した状態とみられ、その状態は数時間継続することになる。本実験は、この状態の初期反応の機構を理解することを目的とした。実験結果を Fig. 33 に模式的に示した。添加物質の比放射能が異なるので同一基準で比較するのは困難であるから、各基質の肝臓組織への取り込み量を1とした時の比率で示した。ここではストレス時の代謝の特徴である血糖上昇にコーチゾールが積極的に関与しているという結果は得られていない。すなわち肝臓における糖新生機能を亢進することによる血糖増加は少なくともコーチゾール増加反応初期にはないものと考えられる。ただし、基質量が多い場合にも、肝臓における取り込みや糖新生を抑制する作用はないことから、ストレス時、乳酸やアミノ酸等の基質増加がある時は、糖新生量は増加し、血糖上昇の一因となることは予想される。特に乳酸は、Fig. 33 に示されるように肝臓に取り込まれると、組織内に保持されることなくエ

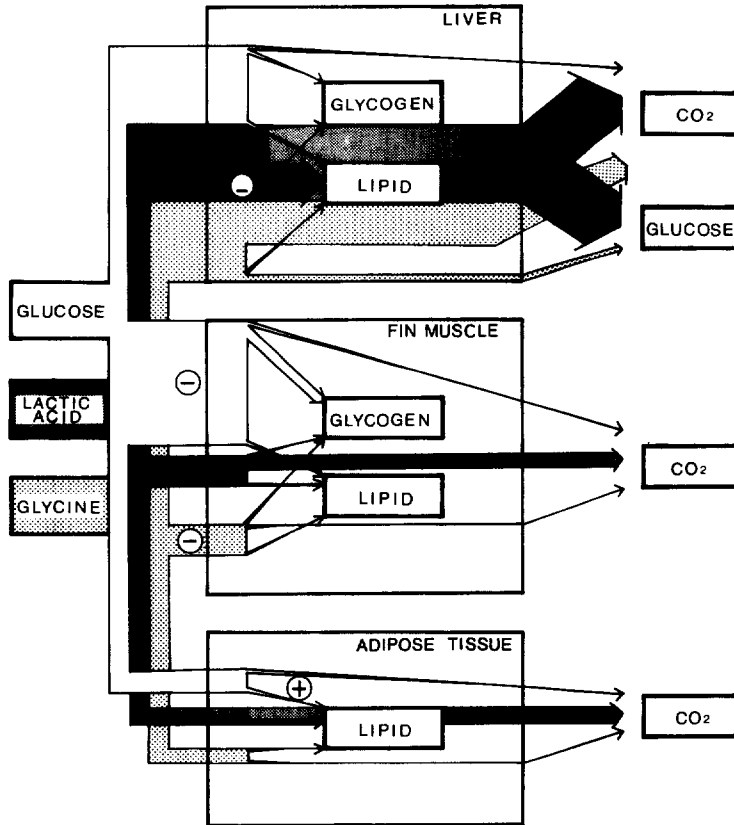


Fig. 33. Cortisol action on glucose, lactic acid and glycine metabolism observed in the red sea bream tissues in vitro. The plus or minus signs indicate stimulation or inhibition, respectively.

エネルギーとして利用されるか、あるいはグルコースへ転換される割合が高いという代謝特性から血糖上昇に寄与するものと考えられる。

また、胸鰭筋肉において、コルチゾールが基質のグルコース、グリシンの取り込み抑制効果を示したことは、結果的には血糖上昇に関与していることになろう。ただし、その抑制の程度は小さく、コルチゾールによる基質の細胞取り込みに対する直接的作用とは考え難く、条件依存的な代謝の結果と考えた方がよいであろう。

これらの結果を総合すると、ストレス時の迅速な血糖上昇反応などにコルチゾールが主役を果しているようにはみえない。コルチゾールの効果の現われる時間や効果の大きさからみて、ストレス反応初期は主にカテコラミンが、その後の物質代謝、特にエネルギー動員にコルチゾールが関与し、一連の反応を持続させているものと考えられる。

## 第6節 小 括

### 1. ストレス時の血糖上昇機構

ストレス反応時の代謝変化を起こす直接的原因は、(1)ストレスによる生体組織の直接的障



害、(2)自律神経系や内分泌系の反応によって仲介される非特異的の共通反応、(3)(1)や(2)の結果起こる血流停滞による組織の二次的機能低下にあるとされており、ストレス時の代謝変化は、これら直接的原因が複雑にからみあっているものであろう。本章では第2原因に関する物質代謝を扱った。これには魚の体色変化、コーチゾールやエピネフリン等のホルモンの分泌促進と循環血液中でのこれらホルモンの増加、これらホルモンの作用によって誘発される血糖量増加等の直接的代謝変化等が含まれる。

魚類でもストレス時のエピネフリン放出が交感神経支配下にあるという点に関してはいくつかの報告がみられる。NILSSON et al. (1976) はタラ *Gadus morhua* における *in vivo*, *in vitro* 実験で、頭腎のクローム親和性細胞からのエピネフリン放出が交感神経によって支配されると結論づけ、HOLMGREN and NILSSON (1982) は魚類における自律神経のうちアドレナリン作動性神経の主たる神経伝達物質がアドレナリンであることをみとめている。分泌されたエピネフリンは第3節と第4節に述べたように種々な代謝変化を起こす。

またストレス時に循環血中のコーチゾール量が増加することは第1章の実験でも明らかである。このホルモンが脳下垂体から分泌される ACTH によって間腎組織から分泌されることは、DONALDSON (1981) の総説に詳述されている。

本研究では第1章で、ストレス時に血液性状にあらわれる共通の変化としてヘマトクリット値増加、血糖値増加、血清ナトリウム量変動が顕著であることから、これらを用いたストレス状態の分類を試みたが、本章では、高血糖が起こる機構を考察したい。Fig. 34 にその概要を示した。循環血中にグルコース量が増加するためには、血管以外の組織からのグルコース供給が増大する場合と、循環血中のグルコースの利用低下が起こる場合とが考えられる。物質代謝のホルモンによる制御実験はストレス時にはこの両方の反応が同時に起こっていることを示唆している。

## 2. グリコーゲン分解による血糖上昇

### 1) 肝臓グリコーゲン分解

血液中のグルコースの主たる供給源は肝臓と筋肉組織である。肝臓でのグリコーゲン分解に関する律速酵素としてはグリコーゲン・フォスフォリラーゼとグルコース-6-フォスファターゼがあげられ、循環血中のカテコラミンが肝臓フォスフォリラーゼを活性化することは UMMINGER and BENZIGER (1975), UMMINGER et al. (1975) が *Ictalurus nebulosus*, *Fundulus heteroclitus* で、VERNIER et SIRE (1978a, b) がエジマスで報告した。活性化された酵素はグリコーゲン分解を促進しグルコースを産生する。この時、同時にエピネフリンは、本章第4節の実験結果にみられるように、グルコースからのグリコーゲン合成を抑制し、Fig. 34 の肝臓のグリコーゲンとグルコースの経路部分にみられるように結果としてグルコース産生がより強化される。コイのように肝臓にグリコーゲン・フォスフォリラーゼが見出されないといわれている魚種においても (MURAT 1976, PICUKANS and UMMINGER 1979) グリコーゲン分解がエピネフリンで促進されるかどうかは明らかでない。

### 2) 肝臓からのグルコース遊離

肝臓からのグルコース遊離がエピネフリンによって強化されることは本章第3節の結果からも

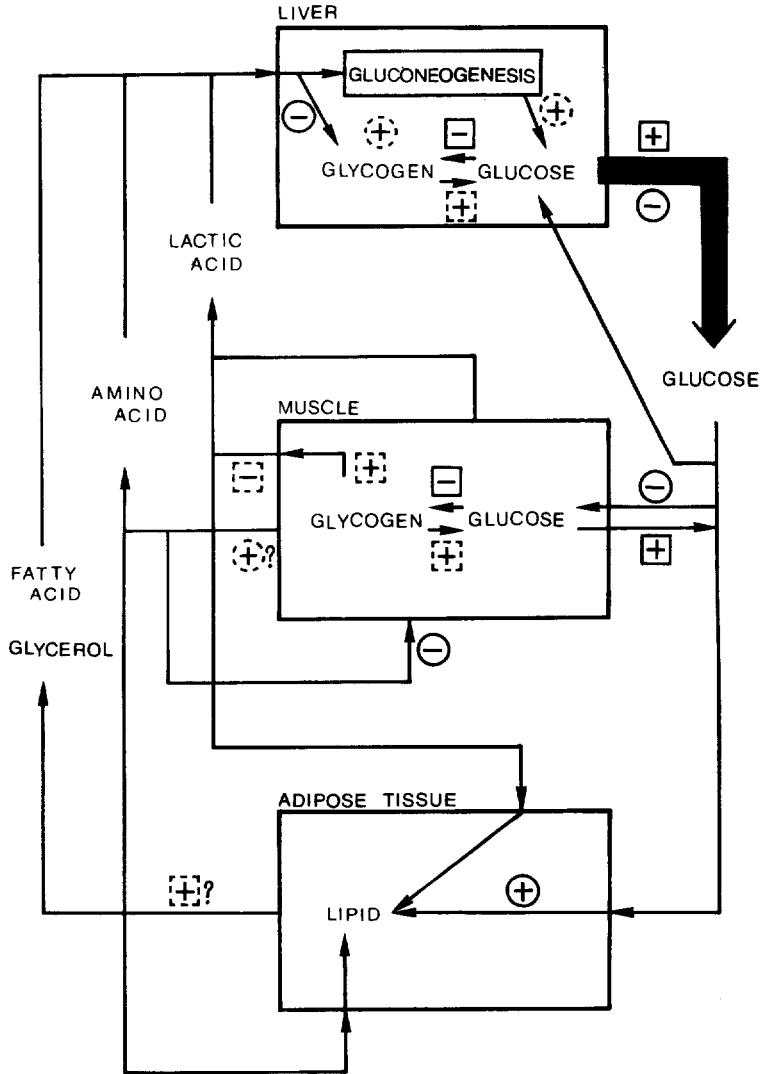


Fig. 34. Actions of catecholamine and cortisol on carbohydrate, lipid and protein metabolism of the fish. The arrows indicate the general flow of substrates reported in the fish. The plus or minus signs indicate stimulation or inhibition, respectively. The rectangle and the circle indicate catecholamine action and cortisol action, respectively. Dotted lines mean the informations according to published reports.

明らかであり、他にも報告が多い (HAYASHI and OOSHIRO 1975a, b, 1977, BIRNBAUM et al. 1976)。グルコースは、第5節の研究結果に明らかなように、肝臓組織での透過性が高いので、肝臓から外への放出には特に障壁はないものと考えられる。肝臓からのグルコース遊離を抑制するコーチゾールの作用は、短期の一過性の作用として哺乳類においても認められている (伊藤1976) が、長期にわたるコーチゾールの作用としては、むしろ糖新生によるグルコースの生成増加が考えられている。しかし第3節の結果 (Fig. 32) にみられるように、コーチゾールによるグルコ

ース遊離抑制の程度は小さく、組織のグルコース遊離能力（グリコーゲン量）に関係なく一定の値を示したので、エピネフリン濃度の高い時は、全体としてグルコース遊離増加が起こるものと考えられる。

### 3) 筋肉グリコーゲンからのグルコース生成とその放出

筋肉組織においてもエピネフリン存在下に貯蔵グリコーゲンのグルコースへの分解が促進されることは WITTENBERGER et al. (1975) の報告にみられるが、第3節におけるマダイ予備実験でもこの傾向が認められた。すなわち、胸鰭筋肉剝離標本を3mlのクレブス氏重炭酸緩衝液に入れ30 $\mu$ gのエピネフリンを添加し1時間の振盪培養を行った後緩衝液中のグルコースを定量した時、対照区0.67mg/gに対して0.98mg/gの値を得た。

## 3. 糖新生

血糖上昇との関係で、ストレス時の血液性状の変化として報告されているものの中に糖新生の基質となるものが多いことに注目したい。魚類でアミノ酸、乳酸、脂肪酸、グリセロールからの糖新生が行われていることは、第5節で考察した。

### 1) 乳酸からの糖新生

魚類の筋肉における乳酸生成に関しては、よく知られており、輸送（林1977）、捕獲（DANDO, 1969）、強制運動（DRIEDZIC and HOCHACHKA 1976）、酸素低下時（BURTON and SPEHAR 1971, JOHNSTON 1975a, b, DRIEDZIC and HOCHACHKA 1975, THILLART et al. 1976）、生物学的ストレス：魚種間競争、闘争（GRONOW 1974）の時に筋肉特に白筋中の乳酸量が増加することが報告されている。この乳酸生成の機構は筋肉のグリコーゲンの嫌氣的分解によるとされ、ストレス時の共通的反応であるかどうかは疑問としても、ストレス時の逃避行動を含む反射的な急激な運動や、エピネフリン増加時の血管系の収縮や血流量減少等による組織の低酸素状態への移行等は、乳酸の生成を促進すると考えられるので、血液中の乳酸は平常時よりは増加するものと考えられる。筋肉中で生産された乳酸の血液中への放出は、WARDLE (1978) が考察したようにエピネフリンによって抑制され、筋肉に大量に保持されることになり、血液 pH の急激な変化は避けられる。血中に放出された乳酸は主に肝臓で代謝されるが、代謝は極めて早く、炭酸ガスとしてエネルギー生成に使われるか、糖新生経路を経てグルコースとして再利用される。肝臓組織内に他の中間代謝物として保持されたり、グリコーゲンに転換されたりする割合は少なく、これはストレス時の解糖経路の亢進を抑制する要因とはなりにくい。第5節の実験結果にみられるように、肝臓、筋肉、腹腔内脂肪組織での短時間内の乳酸の取り込みや利用に関して、エピネフリン、コーチゾールの積極的関与は認められないが、抑制的効果もみられないので、血中に増加する乳酸からの糖新生は基質濃度依存的に進行するものと考えられ、これはストレス時の高血糖の直接的原因となろう。魚類でコーチゾールによる乳酸からの糖新生系の強化が起こっていることを直接 *in vitro* 系で証明した例としては RENAUD and MOON (1980) の報告があり、ストレス時の後期（数時間以降）の血糖上昇には、このホルモンの積極的関与の可能性も考えられる。

### 2) アミノ酸からの糖新生

アミノ酸は魚類で糖新生の重要な基質であるが（LOVE 1980）、筋肉等組織での蛋白質分解によ

り遊離したアミノ酸の動員機構がストレス時に起こるか否かについては魚類では明らかでない。コーチゾール投与実験における窒素排泄増加 (STORER 1967, CHAN and WOO 1978) はこれを裏づけているようにも考えられるが INUI and YOKOTE (1975a) のように血漿アミノ酸の変動を認めていない報告もある。しかし第5節のグリシン基質の実験結果にみられるように胸鱭筋肉組織におけるアミノ酸の取り込みは抑制されており、このことは筋肉における血液中アミノ酸の積極的利用がないことを意味し、結果的に肝臓で代謝される基質としてのアミノ酸をわずかでも増大させることにつながると考えられる。

肝臓におけるアミノ酸からの糖新生に対するコーチゾールの影響については魚の場合、未だ報告がみられず、長期の *in vivo* 投与実験で推定されているだけである (第5節)。肝臓においてアミノ酸からのグリコーゲン合成が抑制されるという本章第5節の結果は、コーチゾール作用時に肝臓グリコーゲンが増加するという *in vivo* の諸報告 (LIDMAN et al. 1979, LEACH and TAYLOR 1982) とは相反する。反応初期だけの現象なのかどうか判然としない。Fig. 33 にはとり込んだアミノ酸から直接グリコーゲンへの経路が描かれているが、これは脱アミノされたアミノ酸の炭素骨格のグリコーゲンへの取り込みが減少したということであり、その間の経路は不明であるので、これがどのような意味を持つのか今後の研究が必要であろう。

### 3) 脂肪酸・グリセロールからの糖新生

脂肪酸がエピネフリンの影響によって末梢組織から血液中に動員されることについては、第3節で考察したように *in vivo*, *in vitro* 実験結果から増加、あるいは変化なしで明確な結果は得られていないが、動員抑制の報告は少ない。脂肪酸の炭素骨格がグリコーゲンやグルコースへ入ることは予想されるがその経路は魚類では明らかでない。

グリセロールは RENAUD and MOON (1980) の結果によれば糖新生の基質として効率的に利用され重要であるがストレス時にこの成分が増加することについての情報はない。

### 4. 血糖利用組織への取り込み・利用の抑制

循環血中のグルコースの取り込みや利用に関しては、Fig. 34 の筋肉組織にみられるように、平常時にグルコースからグリコーゲンへ大量に転換される経路はエピネフリンによって抑制されグリコーゲン分解は一層促進される。これは主として赤筋における反応結果であるが、WITTENBERGER et al. (1975) が報告しているように、白筋でのグルコース利用が赤筋との共同作用によって持続しており、白筋が急速な運動時に機能するとすれば (LOVE, 1980), グルコースは白筋で有効に利用されるようにストレス時の代謝は進行していることになる。このことは、コーチゾールによって胸鱭筋肉におけるグルコース取り込み抑制が起こっていることは矛盾しているが、その抑制程度が小さいことと、炭酸ガス生成をはじめ他の代謝の大きさには全く変化がないことを考え合わせると、ストレス時にはエピネフリンの作用が大きく発現するものと考えられる。いずれにせよグルコースの筋肉における取り込み抑制は、結果的に循環血中グルコース量を増加させる要因となろう。

以上、本研究の実験結果および魚類で研究された諸報告をまとめて、ストレス時の血糖増加が

エピネフリン、コーチゾールによって促進されることを考察した。中でも、ストレス時にはエピネフリンの支配下の、肝臓、筋肉からのグリコーゲン分解によるグルコース遊離は、反応の大きさや速度、ホルモンによる反応支配の確実さ等からみて、ストレッサーを受けた直後少なくとも数時間は乳酸、アミノ酸、グリセロール等からの肝臓における糖新生や肝臓以外の組織における血糖取り込み抑制による血糖値の上昇以上に重要な意味を持つと考えられた。このことは、ストレス時の血糖増加速度や血糖増加量が、本章第2節で考察したように、飢餓あるいは栄養過剰のような魚の状態によって左右されることを予想させる。

### 第III章 総 括

#### 1. ストレス反応の定義

“ストレス”という語は明確な定義によらず、漠然とした概念で利用されることが多い。特に科学的用語というよりも一般的、社会的に通用している用語であるだけにその混乱も大きい。ある場合には、ストレス反応を起こす要因（ストレッサー）の意味で使われ、ある場合には個体、群、生態系の反応（ストレス）を指している。

魚類研究の分野でも“ストレス”には大きな関心が寄せられ、種々な角度から研究されるようになったが、概念を厳密に統合しようとするよりも、多少の相異は含みながら広義な概念のままに研究が続けられている。

PICKERING (1981) はこの混乱を指摘し、一般的な言葉の使われ方から、“ストレス”を“刺激”、これに応じて起こる反応を“ストレス反応”と呼ぶことを提唱している。

“ストレス”を最初に使用した SELYE (1950) は、「ストレスは個体が外部から加えられる各種の刺激に対して内部環境を維持するために起こす生理学的反応（汎適応症候群）」と定義している。しかし、一般的にはこの定義によって“ストレス”が厳密に使用されているわけではなく、“stress”の語源から、「生物体内に生じた生理学的歪み」、すなわち、「外部から加えられた各種の刺激に応じて個体の体内に生じた障害と防衛反応の総和」と考えられている場合が多い。本論文でもこの一般的解釈に沿ってストレス反応を扱っている。この時、個体の体外から加わりストレス反応を起こす各種の刺激をストレッサー (stressor) という場合も多い。

生物は常に何らかの刺激に曝され、それに対する反応を継続しながら生存しており、その刺激量が多くなったり急激に変化したり、異質なものになったりすると、その新たな刺激に適応しようとする反応が起こり、その刺激の種類と量によっては完全に適応することも可能である。SELYE (1973) はこの考え方を明確にするために、汎適応症候群を相に分け、それぞれに警告相 (alarm phase)、抵抗相 (resistance phase)、疲弊相 (exhaustive phase) と名付け、ストレス反応の経過を説明しようとした。alarm phase では新しい刺激に急速に対応するためのホルモン放出を含む反応が特徴的であり、次の resistance phase は生理学的失調回復の努力が行われる時相であり、exhaustive phase は不可逆的生理学的失調が認められる相である。SELYE のこの考え方や相の名付け方は、生物の動的な生理学的反応を明確に表現しており、適応の概念を根底に含んでいる

ものの、個体が刺激をうけ危機に陥入っているという疾病的感覚が強いという特徴がある。

適応という概念を強く打ち出した考え方としては、小坂(1981)が温度ストレスに対する生体反応として、急性反応(環境刺激が生体に加わる時、短い潜時で神経調節により誘発される急峻な反応)、慢性反応(神経性調節に遅れて起こる内分泌器官の活動で脳下垂体-副腎皮質系を軸とした液性調節反応)、器質性変化(刺激が長期に継続する時、体内に器質的变化が生じ形態の変化等も伴う)の3種類を時間軸に沿って分類しており、受け入れやすい考え方である。

魚類生理学の分野でも、最近になってストレス反応に関する研究が、SELYEの考え方を下敷きに、主に短期間に起こる生体反応を中心に進められており、複合的な生理学的諸反応を総合・分類する試みも行われるようになった。MAZEUD et al. (1977)はカテコラミンやコルチコステロイドの血中放出のようなホルモン遊離の反応を一次反応(primary reaction)、それ以外の血糖値上昇、無機塩の変動、水分の移動のような生理学的諸反応を二次反応(secondary reaction)とする考え方を打ち出した。また、WEDEMEYER and MCLEAY (1981)は、この考え方をさらに進めて、a)第1次変化(primary alterations)、b)第2次変化(secondary alterations, physiological)、c)第3次変化(tertiary effects)という考え方を示している。a、bはそれぞれMAZEUD et al.の第1次反応、第2次反応に相当するが、第3次変化として個体の成長、変態、成熟、疾病に対する影響や問題まで含めた反応を考えている点に特徴がある。これらの考え方は魚の適応反応を分類するというよりも、魚の生理学的反応を種類や反応の時間的経過によって分けた便宜的な分類の方法である。

本研究では第1章で試みたように、血液性状に表われる動的变化を総合的に把握し、種々な刺激が与えられた時の魚の一般的ストレス状態を把握する目的でストレス反応の分類を試みた。

魚類のストレス反応研究において顕著な点は、(1)哺乳動物とは異なり、長期にわたって個体の生理学的反応を追跡することが、生理学的本質(変温動物で水中生活をしている)からも技術的にも困難であるため、時間軸に沿った反応の分離や分類が困難であること。(2)実用的に魚を食物として、あるいは環境のモニター生物として利用しようとする考え方から、個体の生理学的反応を利用しようという考え方が強いことである。

## 2. ストレッサーとストレス反応

魚類におけるストレス反応の研究は比較的最近になって研究の意図を明確にして行われるようになったが、その研究目的がストレス反応そのものに焦点を合わせていなくても、生理学的な負荷をかけた時の生体の反応を調べた研究の中から多くの情報を得ることができる。魚類で研究されたストレッサーとストレス反応の中で最も多いものは、第1章でも中心課題とした環境要因をストレッサーとした時の反応である。

温度と魚類の生理学的反応に関する研究は大別すると急激な温度変化に対して短時間内に起こる過渡的な生理学的な適応反応と順応反応に分けられる。

ストレス反応として報告されているものには、血液中コルチゾール量増加、血液中グルコース量増加、クロライド、ナトリウム量等無機成分の変動に関するものが多い(HOUSTON 1962, HICKMAN et al. 1964, HOUSTON 1968, UMMINGER 1971, ALLANSON et al. 1971, STANLEY and

COLBY 1971, WEDEMEYER 1973, FARGHALY et al. 1973, PICKFORD et al. 1974, LA COMBE and CREACH 1974, FRYER 1975, MURAT and PARENT 1975, CATLETT and MILLICH 1976, DEMAËL et GARIN 1978, PERRIER et al. 1979, 石岡 1980a, PARENT et al. 1981)。これらはストレス時のホルモンの血中放出と炭水化物代謝変化および浸透圧攪乱の現象を示している。血液性状の変動 (BALL and SLICHER 1962, HOUSTON and DEWILDE 1969, FARGHALY et al. 1973, PICKFORD et al. 1974, CATLETT and MILLICH 1976, SRIVASTAVA and AGRAWAL 1977) の観察例で、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量の変動があるが、これは浸透圧調節攪乱によって生じた水分の移動やホルモン、神経刺激による血管系や脾臓収縮の結果とみられる血球放出や移動の複合的反應の結果と考えられる。温度低下刺激を与えた時、PICKFORD et al. 1974 が *Fundulus heteroclitus* で、BALL and SLICHER 1962 が *Mollienesia latipinna* で、SRIVASTAVA and AGRAWAL 1977 が *Colisa fasciatus* で報告している白血球系細胞の短時間の一時的変動は、このストレスサーが、ホルモンを介して魚の細網内皮系の反応を誘起していると考えられるが、直接的な証明の報告は得られていない。

温度変化刺激に対する魚の反応としては、この他に自律神経支配下の反応が多く報告されている。これらはストレス反応というよりも短期間に起こる生理学的調節作用とでもいう性格の反応である。CAMERON (1976) は *Thymallus arcticus* で10℃から17℃への温度上昇時の鰓におけるナトリウムとクロライドの取り込み増加を報告し、PAYAN and MATTY (1975) はニジマスで17℃から7℃の水温低下状態においた時の鰓におけるアンモニア排泄低下を報告した。MACKAY (1974)はキンギョが10℃から20℃の温度上昇によって尿量が増加しナトリウム、クロライドの再吸収が低下したとし、BURTON (1979) は *Trinectes maculatus* 等の暖水性汽水魚が5℃の水温上昇によって換水量を増加させたとし、HEATH and HUGHES (1973) はニジマスの温度上昇時の心拍数、血圧、呼吸数の増加を、HUGHES and ROBERTS (1970) はニジマスの温度上昇時の呼吸数、心拍数の増加を報告している。これらの反応は一般的には温度上昇に対しては亢進的反應、温度低下に対しては抑制的反應として現われ、変温動物の適応的反應と考えられるものでストレス反応とは判断しないことが多い。

これら諸報告や実験結果で興味ある点は、反応の時間的尺度である。温度に対する順応反応をみる場合には週、月、季節の単位が、また、ストレス反応も含む調節反応は、分、時間、日が単位となっている。そして、短期の調節反応には前述のように炭水化物や血液中無機塩量の変化、自律神経支配下の諸反応が含まれ、後者には蛋白質や酵素のような成分の変化、形態、生態変化等が主として含まれている。

魚類が外部環境水の塩分変化に対してとる体内浸透圧維持のための調整は(1)海水の嚥下作用の調節、(2)体表粘液増加による調節、(3)消化管壁における吸収の調節、(4)腎臓における排泄機能変化による調節、(5)鰓における吸収、排泄機能変化による調節、(6)これらを全体的に制御する脳下垂体機能変化等によって行われている。これらの反応は大別して急激な塩分変化への対応と順応的变化に分けられ、このうち後者としては鰓、消化管、腎臓等の組織学的変化や酵素化学的变化を観察している例が多い。急激な塩分変化への対応のうちストレス反応として研究されている内

容には第1章第3節で扱ったような血液性状や成分に関する報告が多い。なかでも、このストレスは淡水産、海産を問わず、直接、魚体内の浸透圧変化を起こす要因でもあるので、血液や体組織（主に筋肉）のナトリウム、クロライド量のような電解質や浸透圧の変化に関する報告が多い（GORDON 1959, PARRY 1961, STANLEY and FLEMING 1965, CHAN et al. 1967, YAMASHITA 1970, 板沢・早川1972, DAVIS and SIMCO 1976, 小栗・大島1977, EDDY and BATH 1979, BATH and EDDY 1979, LOGAN et al. 1980, MACEINA et al. 1980, 石岡 1980b, Woo and FUNG 1981, HEGAB and HANKE 1982, GUPTA and HANKE 1982）。また、急激な浸透圧変化の結果を重量変化でみている例もある（JACKSON 1981, 尾崎・菊地1972, 板沢・早川1972）。さらにこの浸透圧調節に関与するとされるホルモン、コーチゾールやプロラクチンの変動を調べた報告も多い（NISHIMURA et al. 1976, HENDERSON et al. 1976, FAGERLUND 1967, SINGLEY and CHAVIN 1975, FORREST et al. 1973, BALL et al. 1971, HIRANO 1969）。コーチゾールは淡水魚を海水に入れた時に急激に増加する浸透圧調節ホルモンとして知られているが、FORREST et al. (1973), BALL et al. (1971) は適応が完了すると血中濃度は低下するとしており、ストレス反応と考えてもよいように思える。しかし本研究におけるように急激な塩分の上昇下降の変化は明らかに血中コーチゾールの増加を伴なうことからストレス反応と考えられるが、適応的な反応の場合には一般的にストレス反応とは考えられていない。いずれにしてもこれらの反応は浸透圧調節部位へのエネルギー供給の必要性とその在り方を示唆している。そして、これら諸反応も時間軸に沿ってみれば、主に分、時間、日、週が単位となっており、これより長い時間単位で測定される反応は順応反応として扱われている。

酸素分圧の変化に対する魚類の生理学的反応としては、血液性状の変化に関するものが圧倒的に多い。長期間にわたる順応的变化を除いて、測定された内容は主として外部環境の酸素分圧低下に伴って起こる魚体の嫌気代謝の内容を明らかにしようとする観点から解析されている。特にこのストレスの場合には、共通のストレス反応に附随して起こる二次的な組織の血液灌流低下による酸素欠乏と全く同じ条件であるため、ストレスによる特異的反応とストレス反応の弁別を行うことは困難である。内分泌系の反応である低酸素時の血中コーチゾール増加は DEMAËL et GARIN (1978), TOMASSO et al. (1982), 石岡 (1982) によって、また、アドレナリンの増加は MAZEAUD and MAZEAUD (1981) の報告にみられる。

この他の生理学的諸反応を機能の面で分類してみると血液—呼吸機能の変化に関するものが多い。本研究第1章第4節に述べたヘモグロビン量、ヘマトクリット値や赤血球数の増加の報告は淡水魚、海産魚を問わず多い（HALL et al. 1926, HOLETON and RANDALL 1967, PROSSER et al. 1970, WOOD and JOHANSEN 1972, SWIFT and LLOYD 1974, KIRK 1974, HATTINGH 1976, SCOTT and ROGERS 1981, 石岡1982）。血液中のこれら成分の増加は脾臓からの血球放出、血液水分の移動、血球膨潤等が考えられるが、これらの反応は後述するように、少なくとも一部はエピネフリンによって誘発されている可能性があり、これによって組織への酸素供給の増大が行われていると考えられる。また、これと関連して浸透圧調節機能の変化（血液水分の移動）が起こっていることは血液浸透圧、水分量、血液中ナトリウム、クロライド量の変動からもうかがえる（HALL et al. 1926, MEYER et al. 1954, HUNN 1969, KIRK 1974, WALKER and JOHANSEN



1977)。さらに物質代謝面では血糖、血液や筋肉中乳酸、肝臓や筋肉グリコーゲン、ピルビン酸、コハク酸等に変動が認められており (HOLETON and RANDALL 1967, WITTENBERGER 1968, BURTON and SPEHAR 1971, DEMAËL-SUARD 1972, WOOD and JOHANSEN 1972, KIRK 1974, DRIEDZIC and HOCHACHKA 1975, JHONSTON 1975a, b, HARDISTY et al. 1976, HATINGH 1976, THILLART et al. 1976, DEMAËL et GARIN 1978, WALKER and JOHANSEN 1977, BURTON and HEATH 1980, SCOTT and ROGERS 1981), 特に低酸素時の血糖や血中乳酸増加は主に筋肉と肝臓のグリコーゲン分解によると推測されている。

明確なストレスラーとしての位置づけで研究されているものには、第1章第5節、第6節で述べた取り扱い、輸送 (石岡 1984b)、麻酔時のストレス反応がある。しかし、第1章で述べたようにこれらストレスラーは生理学的要因の面からみると、窒息、嫌氣的筋肉運動その他の要因の複合体であり、そのストレス反応には共通のものがみられる。取り扱いストレスによる反応としては血液性状の変化に関する報告が多く、第1章第5節第6節で述べたように、コーチゾールやエピネフリン量増加、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量増加、血糖・血液乳酸量の増加、血液中ナトリウムやクロライド量、浸透圧の変動が共通している。この他に呼吸数、心拍数、酸素消費量 (LEIVESTAD et al. 1957, RANDALL 1962, HOUSTON et al. 1971) にも大きな変動がみられているが、その変動は必ずしも一定の方向を示さずストレスラーの種類や魚種により異っている。

種々な化学物質の生物に対する毒性を調べる目的の研究の中で、これをストレスラーと考えた時の反応は、酸、塩基、アンモニウムイオン、塩素、重金属類、ホルマリン、漂白パルプ廃液等での報告がみられる。硫酸、硝酸、塩酸等による飼育水 pH 低下時のストレス反応の報告例はないが、飼育水 pH 低下は鰓における  $\text{Na}^+$  と  $\text{H}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  と  $\text{Cl}^-$  の交換にかかわる機能失調を起こし、淡水魚では血液浸透圧失調が著しいとされている (MCDONALD et al. 1980, MCWILLIAMS 1980, ULTSCH et al. 1981, MCDONALD and WOOD 1981)。この他、MURTHY et al. (1980) はティラピアで急激な飼育水の pH 低下時に赤筋のグリコーゲンが増加し白筋のそれが低下した現象をみており、炭水化物代謝の変動を示すものと考えられる。MILLIGAN and WOOD (1982) はニジマスで心拍数増加やヘマトクリット値の増加をみており、これらはストレス反応の一部を把握しているものと考えられる。アンモニウムをストレスラーとした時の興味ある報告は TOMASSO et al. (1980) の *Ictalurus punctatus* における血漿ナトリウム量の低下に示される浸透圧失調と ARILLO et al. (1981) のニジマスにおけるレニン活性増加と稀積尿である。これがストレス反応であるのかアンモニアによる特異的反応であるのか区別はできない。塩素の毒性についてはその酸化能から鰓でヘモグロビンを methemoglobin に変えるため組織の酸素欠乏を起こし代償的にヘマトクリット値増加が起るとされている (BLOCK 1977, BUCKLEY 1976) が、ZEITOUN et al. (1977) は血漿無機塩濃度が血液濃縮のため増加したとし、このストレスラーが血液性状や浸透圧調節機能に大きな影響を与えているとしている。重金属では銅、亜鉛、カドミウム、クロム、水銀などについての毒性研究報告が多く、これらはストレスラーとして共通の反応をひき起こしていることがうかがえる。STRIK et al. (1975) は6価クロムに曝露された時、魚の血液ナトリウムイオンやグルコース量、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量が増加したとし、

DONALDSON and DYE (1975) は $10^{-6}$ M 程度の硫酸銅溶液の中の魚は血中コルチコステロイド濃度の上昇を示したと報告した。SCHRECK and LORZ (1978) は銅処理の場合には著しくコーチゾール量は増加するが、カドミウム処理の場合にはそれが致死濃度でも、血中コーチゾール量増加は認められなかったとしている。WAIWOOD (1980) はニジマスに硫酸銅溶液を入れた時ヘマトクリット値の増加をみており、STAGG and SHUTTLEWORTH (1982) は *Platichthys flesus* を銅イオンに曝露した時、浸透圧調節機能が損なわれて血液中ナトリウム、クロライド量が変動すると報告した。これらは一部は重金属の鰓への直接作用によるものとみられるが、ストレスラーとして共通の内分泌系の反応や他の生理学的変化を起していることを示唆している。さらに O'NEILL (1981) は *Salmo trutta* を銅、クローム、ニッケル、亜鉛等に曝露した後の免疫応答を問題にした。この他、化学物質としてはホルマリン、漂白パルプ工場廃液等が、血液の酸、塩基平衡の失調、血液中コーチゾール量増加、血糖値増加等の反応を起していることは、WEDEMEYER (1971), MCLEAY (1973b, 1977), MCLEAY and BROWN (1974, 1975, 1979), MCLEAY and GORDON (1977) の報告に述べられている。

その他の興味深いストレスラーとしては、生物学的ストレスラーとよばれるものがあり、最近になって報告がみられるようになった。高密度飼育が“ストレス”となっているらしいことは一般的に知られているが、これが生理学的なストレス反応を起していることが報告されている。WEDEMEYER (1976) はギンザケとニジマスについて魚を移して高密度で飼育すると血糖値の増加現象が1週間以上も続くとして報告した。BURTON and MURRAY (1979), MURRAY and BURTON (1979) はキンギョの高密度飼育時の血液性状を調べ、ヘモグロビン量とヘマトクリット値が低下し、血球沈降速度は増加の傾向にあり、赤血球数と栓球数は減少し、リンパ球と全白血球系細胞の割合は増加し、赤血球の大きさは小さくなったと述べている。このことはさらに *Ictalurus punctatus* でも認められた (MURRAY, 1980)。FAGERLUND et al. (1981) は *Oncorhynchus kisutch* の高密度飼育の結果、成長抑制、体水分量増加、脂肪と蛋白質含量の低下、間腎組織細胞の核径の増大等を報告した。これらは長期間にわたるストレス反応も含んでおり、その影響の大きさが推測される。

また、攻撃性の強い魚で、強弱の個体を狭い水槽で同時に飼育した時のストレス反応についての報告もみられる。ERICKSON (1967) は *Lepomis gibbosus* をグループで飼育し、その中の魚体の強さの順位と間腎組織量が負の相関々係にあることを報告し、GRONOW (1974) は“Biologischen Stress”で背部筋肉中の乳酸、ピルビン酸、glucose-6-phosphateが増加したという。NOAKES and LEATHERLAND (1977) はニジマスで劣位の個体の間腎細胞の活性は高かったとしている。EJIKE and SCHRECK (1980) は *Oncorhynchus kisutch* で弱い魚群は肝臓グリコーゲン量が少なく、血漿コーチゾール濃度が高く、間腎細胞の核径が大きかったとしている。PETERS et al. (1980a, b) は *Anguilla anguilla* で弱い魚では血中コーチゾール濃度は増加し、血糖、血中乳酸量の増加と肝臓グリコーゲン量の減少がみられたとし、白血球数は増加したとしている。さらに、PETERS (1982) は弱いウナギの消化官系の組織学的検査を行い、胃や消化管の萎縮や変性を認めている。これらの諸報告は、魚種にもよるが、群の中で劣位にある個体は強いストレスを

Table 36. Stressors and stress responses observed in the fish.

Stressors	Stress responses
Temperature	Activation of endocrine system (Release of hormones into the circulatory system and into the target tissue) ACTH Catecholamines Corticosteroids
Salinity	
Dissolved oxygen	
Handling	Disturbance of carbohydrate metabolism Hyperglycemia Hyperlactemia Decrease of liver and muscle glycogen
Transportation	
Forced exercise	
Anesthesia	Disturbance of osmotic regulation Change of plasma sodium and chloride levels Change of body weight Change of tissue water content
Chemical substances	
NH <sup>+</sup> H <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup> heavy metals (Hg, Zn, Cd, Cu) pulp mill effluent	
Biological stress	Hematological alterations Change of hematocrit value Change of hemoglobin level Change of leucocyte number
rearing density	
social stress	
Others	Change of physiological responses under autonomic nervous system Contraction or dilation of vascular system Change of heart beat Change of respiration rate Change of gill blood flow Melanophore aggregation etc. (Immunosuppression)
electric shock	

急性にも慢性にも受けていることを示している。

これら魚類で報告された種々なストレスとストレス反応を大まかに MAZEAUD et al. (1977) の分類で分ければ Table 36 のようになる。すなわち、種々なストレスによって魚類に共通に認められるストレス反応は、内分泌系の反応としてはカテコラミン、コルチコステロイドの血液中での増加が、それ以外の生理学的反応としては、炭水化物代謝の変調、浸透圧調節機能攪乱、血液性状変化、自律神経支配下諸反応の変化、その他の行動変化や免疫応答の変化等である。

### 3. ストレス関与ホルモンとストレス反応

第 I 章では、マダイに関しても温度、塩分、酸素分圧の変動がストレスとなること、この時のストレス反応が血糖増加、ヘマトクリット値増加、血清ナトリウム量の変動に顕著に現われ、これらの値の組み合わせによって強度や種類のわかっていないストレスに曝された魚のスト

レス状態の判定が可能であることを明らかにした。この3成分はそれぞれ Table 36 の中では第二次変化の炭水化物代謝攪乱, 血液性状変化, 浸透圧調節機能失調を代表するものとなっている。ここで、これらの変化とホルモンの作用がどのような関係にあるのかを考察するためその概要を Fig. 35 に示した。ストレッサーが魚体に加えられた時、その刺激は神経を経て、あるいは液性刺激として脳に伝達される。脳内では視床下部から CRF (コルチコトロピン放出因子) が出力され脳下垂体を刺激し、ここから ACTH (副腎皮質刺激ホルモン) が分泌されることは、FRYER and PETER (1977a, b, c) によってキンギョで確かめられた。ACTH が間腎組織を活性化しコーチゾールを遊離することは、OGURI (1960a), HIRANO (1969) によってキンギョやウナギについて報告されている。さらに間腎組織でコーチゾールが合成されることは PHILLIPS and MULROW (1959), SANDOR et al. (1966) によって *Fundulus heteroclitus*, *Anguilla anguilla* でのトレーサー実験によって証明されている。また JURANI et al. (1972) はニジマスでストレッサーを与えてからコーチゾール分泌までの経路 (Fig. 35) を確認している。一方、エピネフリンの分泌が頭腎部分にあるクローム親和細胞から行われることはよく知られているが、カテコールアミンが交感神経による刺激によって遊離されることは NILSSON et al. (1976), ABRAHAMSSON (1979) によって、*Gadus morhua*, *Squalus acanthias* について報告された。これら分泌されたホルモンは種々な標的組織で種々な反応をひき起こす。まずカテコールアミン、特にエピネフリンによる体表の色素胞の凝集・拡散はよく知られているが、これは循環血中のエピネフリンによるよりも交感神経繊維末端からの神経伝達物質アドレナリンの作用と考えられており (Iga 1978), この部分は Fig. 35 には示されていない。血液循環系に対する作用に関しては比較的報告が多く、鰓、心臓、内臓の血管系で報告がみられる。鰓の血管系に対するアドレナリンの影響としては、ニジマス鰓の血管容量の減少や灌流量の増加 (GIRARD and PAYAN 1976), *Ictalurus punctatus* の鰓における赤血球の分布の鰓葉への偏り (HOLBERT et al. 1979), *Gadus morhua* における血管系の収縮や拡張 (WAHLQVIST 1980), ニジマス鰓血管抵抗性の増加 (PÄRT et al. 1982) 等が報告され、心臓血管系や呼吸系では *Anguilla anguilla* における hyperventilation とそれにひきつづく動脈血酸素分圧増加や減少 (PEYRAUD-WAITZENEGGER 1977, PEYRAUD-WAITZENEGGER et al. 1980), ニジマスの背部動脈における酸素量増加 (NIKINMAA 1982), *Perca fluviatilis* における心拍数低下 (TIRRI and RIPPATTI 1982) 等が報告されている。また内臓血管系としては *Anguilla japonica* の肝臓における灌流量低下 (HAYASHI and OOSHIRO 1977) の報告がみられる。脾臓の収縮については、直接エピネフリンの影響を観察した例はないが、YAMAMOTO et al. (1980) のハマチの実験例にみられるように強制運動や酸素低下ストレス時に観察されているところから推測される。これら諸報告ではアドレナリンが1つの器官に作用しても、反応の方向が両方向みられる場合があり、これは標的器官における receptor の問題として論議されており、魚類では水温や季節等との関係もあり、今後に残された問題となっている。ここでは血液性状にあらわれるヘマトクリット値増加の直接の要因の1つとして、エピネフリンによる血管系の収縮拡張とそのため血球の偏在、心拍数変化、脾臓収縮による貯蔵血球の放出等血管系筋肉への作用があることを指摘したい。

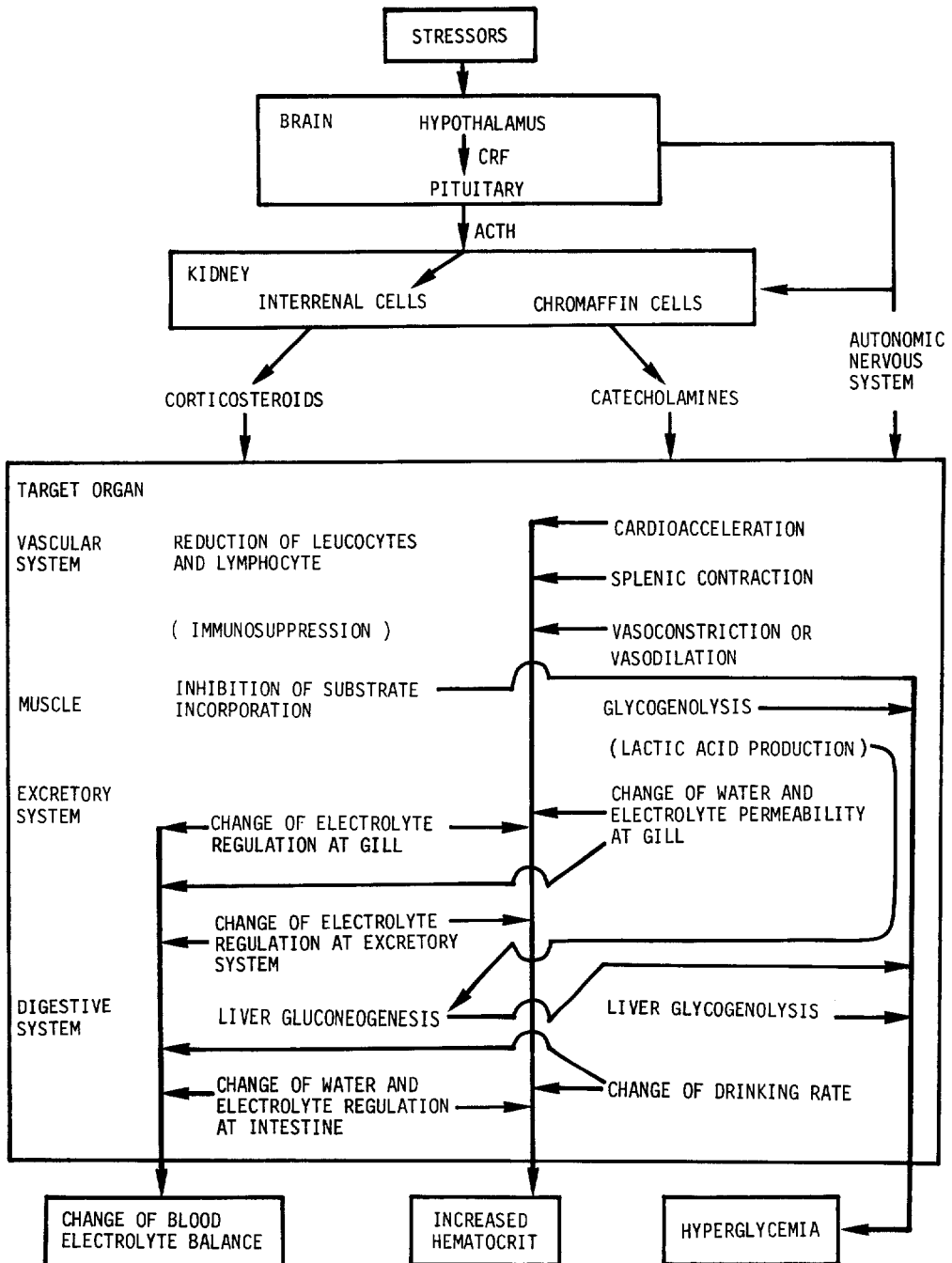


Fig. 35. Proposed sequence of events through which stressors may exert their hematological effects (hyperglycemia, increased hematocrit value and change of blood electrolyte balance).

筋肉においては第Ⅱ章第6節で考察したように貯蔵グリコーゲンの分解によるグルコースの生成と嫌氣的代謝による乳酸の生成が、前者は直接循環系に入って後者は肝臓で糖新生経路を経て、共に高血糖の原因となっている。また、エピネフリンが鰓における水、ナトリウム、クロライドの透過性を直接的に左右する作用を持つことは PIC et al. (1974), PIC et al. (1975), GIRARD and PAYAN (1980) の報告にみられる。これらは、ヘマトクリット値増加の遠因となると同時に血液中ナトリウムやクロライド量が変動する要因となる。

肝臓組織では、第Ⅱ章で考察したようにエピネフリンはグリコーゲン分解を促進し、合成を抑制することによって炭水化物代謝に大きな影響を与え、肝臓のグリコーゲンは減少し、その結果として高血糖を起こすこととなる。また、海産魚ではアドレナリンは海水の嚥下作用を減少させるとされ (PIC et al. 1974, 1975) これもヘマトクリット値増加、血中ナトリウム量変動の原因となる。

一方のコルチコステロイド (主としてコーチゾール) もそれぞれの標的組織で大きな変化を起している。循環系に関しては、白血球やリンパ球の減少がコーチゾール投与によって起こることが *Oncorhynchus kisutch* で McLEAY (1973a) が、*Anguilla anguilla* で JOHANSSON-SJÖBECK et al. (1978) が観察している。免疫応答の低下に関してはストレス時の成長抑制や疾病の多発から飼育現場では最も望まれている情報であるにもかかわらずその機構が解明されておらず、コーチゾールの果す役割についても報告はみられない。

筋肉組織においては、第Ⅱ章で明らかにしたように、短期間内では筋肉におけるグルコースやアミノ酸の取り込みや利用の抑制が結果的に血糖増加の遠因となっている。魚類でコーチゾールが浸透圧調節に関与するホルモンでもあることはよく知られており、具体的には鰓、腎臓、消化管でナトリウムの吸収、排出に関与していることについての報告は多い (平野1976)。これらは血液中の電解質量の変動に関係してくるものと考えられる。

肝臓においてコーチゾールは第Ⅱ章で考察したように長期的には乳酸、アミノ酸からの糖新生を促進し、高血糖を継続させる。

コーチゾールのこれらの作用は血糖増加、ヘマトクリット値上昇、血清ナトリウム量変動等エピネフリンと同じ作用をもつようにみえるが、第Ⅱ章の実験結果や、コーチゾール作用に関する諸報告をみると反応時間単位が異なっている点に特徴がある。このことは、ストレッサーを受けた最初にはエピネフリン作用による生理学的変化があり、これに引き続いてコーチゾールによる作用が起こりストレス反応が持続されると考えてよいのではないだろうか。

いずれにしても第Ⅰ章で確認したストレス時の高血糖、ヘマトクリット値増加、血清ナトリウム量の変動等は、全身的な反応の総合的反映であることがうかがえる。

#### 4. 環境要因のストレッサー強度と生存限界値

マダイにストレス反応を起こす温度、塩分、酸素等物理的に測定できるストレッサーの強度が、マダイの生存にとってどの程度のものであるかを考えてみたい。

温度耐性は順応温度と到達温度の組み合わせによって決ることはよく知られている。マダイでは Woo and FUNG (1980) が温度耐性実験を行い、そのダイヤグラムを報告した。魚を急速に順

応温度から設定温度に移した時の、48時間  $LT_{50}$  を算出したものである。9℃、14℃、20℃、28℃に順応させた時の高温部  $LT_{50}$  はそれぞれ25℃、27.2℃、30.5℃、31.6℃であったとし低温部  $LT_{50}$  は6.5、7.5、11.5、15.5℃であるとした。絶対致死水温は32℃、5.5℃であった。第1章第2節の実験では Table 1 にみられるように順応温度は17℃~24.5℃で Woo and FUNG (1980) のダイアグラムのちょうど中心部分の面積を占めることになり、到達温度は、温度上昇時も、温度下降時も実験Ⅰの場合を除いて、この“Tolerance polygon”をわずかにはみ出した部分にある。実験Ⅰの条件だけはこの範囲内の境界に比較的近い位置にあり、この場合にはどの時間帯の血液性状もストレス反応を示していない。ストレス反応を起こしている実験区の温度差は7.4℃以上であった。これらのことは実験的に与えた条件でストレス反応を起こすには温度変化の3要素(温度変化速度、温度差、到達温度)のうち到達温度が有効に働いているものと考えられた。

マダイの塩分耐性に関する実験は断片的なものしかみられない。Woo and FUNG (1981) は普通海水から約 $\frac{1}{4}$ 海水までの稀釈海水中でマダイの10日間飢餓試験を行い、170mOsm/kg (約 $\frac{1}{4}$ 海水)では3日以内に斃死し、体重や血液性状成分から限界塩分は250mOsm/kg (約 $\frac{1}{4}$ 海水)であると推論した。さらに Woo and MURAT (1981) は海水、 $\frac{2}{3}$ 海水、 $\frac{1}{3}$ 海水に完全に適応したマダイで高温時の飢餓試験を継続し、 $\frac{1}{3}$ 海水に適応したマダイの方が生存日数が長かったとしている。萩田(1972)はマダイ2歳魚を稀釈海水 Cl. 15.64%、10.78%、5.35%、0.17%にそれぞれ収容し72時間耐性をみて Cl. 5.35%でも外観上異常は認められなかったという。稚仔魚期のマダイの実験では比重1.025 (Sal. 33.7%) から1.010 (Sal. 14.13%) の間であればその変化が大きくない時は斃死は全く認められなかったとされ(梶山・西岡1930)、APOSTOLOPOULOS (1976) は27.03%から34.80% (Sal.) であれば正常なフ化率が得られたが、19.02%以下では正常な温度範囲でもフ化率は悪かったという。今回の実験の到達塩分は実験Ⅰ、Ⅱ、Ⅴ、Ⅵで諸報告の実験範囲を越えており、何らかの悪影響が考えられる数値である。ただし、Woo and FUNG (1981) のいう限界塩分 ( $\frac{1}{4}$ 海水) に近いところの範囲内で、実験Ⅲと実験Ⅳのように到達温度が似通っていても、実験Ⅲではストレス反応が認められていないことは、到達塩分と同時に塩分変化速度が本研究で対象とした種類のストレス反応を起こす要因となっていると考えられる。

酸素分圧のマダイに対する限界値は古く梶山(1933)が1 ml/l 前後であることを示している。沼田(1975)はマダイ稚魚を用いて横転魚出現時までの酸素消費を調べ、0.74ml/l から1.64ml/l の値を得ている。これらの数値と今回の実験で用いた到達酸素量を比べると、条件の厳しい実験Ⅰ、Ⅱが0.91ml/l、1.31ml/l でこの限界値に近い値を示しているが、実験Ⅲ、Ⅳでは、これからかなりはずれている。それにもかかわらず、どの実験区でもストレス反応を起こす時点が認められている。

このようにストレス反応を起こしている条件と、既往のデータから拾った環境要因の生存限界値との比較をみると、ストレスの種類によって正常から死に至る生理学的距離におけるストレス反応の起る位置が大きく異なることがわかる。すなわち、温度、塩分がストレスとなる時の位置は致死条件に近いところにあるのに比べて、酸素分圧がストレスとなる時は、正常に近い方の位置にある。Table 36 に示したストレスをみると、取り扱い、輸送、麻酔、塩

素等は何らかのかたちで組織内酸素低下を起こさせる条件を含んでおり、これらは典型的なストレス反応を起こしている。この他に強制運動や電気ショックでは、血液や筋肉中の乳酸増加から明らかなように、組織の嫌氣的代謝を起こしているし、重金属では銅イオンの場合には、これが鰓組織に損傷を与え、そのために酸素欠乏を来たしている可能性が考えられる。これらのことはどこかで組織の酸素欠乏を来たすような条件を含むストレスは本研究で扱ったようなストレス反応を起し易いと考えてよいであろう。

本論文では比較的短時間内に大きな変化量のストレスを受けた時のストレス反応を扱った。産業上、今後、重要になってくるのは Table 36 の最下段にみられる免疫応答や、複合的ストレスに対する魚の抵抗性の問題、生物学的ストレス等であろう。これらの問題を扱うには研究手法の開発を含め新しい視点からの発想が必要であろう。本研究がその一助ともなれば幸である。

## 要 約

近年、種苗生産技術が発展し、マダイは完全養殖魚として広く生産されるようになった。マダイの生産過程で受ける種々なストレスは疾病、成長抑制、事故による大量斃死などを通して生産を低下させることにつながり生物学的、非生物学的環境に対するマダイの適応性(ストレス反応)の解明は単に魚類生理学的観点からのみではなく生産管理技術向上のためにも必要とされている。本研究では種々なストレス時のマダイのストレス反応を血液学的性状の変化として把握し、それらの結果よりストレス反応の状態の程度のカテゴリを試みた。また、ストレス反応の機構を知るためストレス時の物質代謝がホルモンによってどのように制御されるかを遊離組織標本を用いた *in vitro* 実験系によって明らかにしようとした。

(1) スレッサーとして飼育水の温度変化刺激を与えた時のマダイの血液性状の変動を測定した。

急激な温度上昇刺激を受けた魚はヘマトクリット値、ヘモグロビン量、血清コチゾール量、血清グルコース量の増加を示した。急激な温度低下刺激はヘマトクリット値低下とヘモグロビン量の減少、血清コチゾール量、血清グルコース量の増加をひき起した。温度変化刺激を受けた魚のストレス状態を分類するために、採血時間毎の魚類のヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量の平均値を用いてユークリッド距離を算出しクラスター分析を行った。その結果全体の血液性状はストレスを与えていない時の状態(対照相)前ストレス状態(前反応相)ストレス状態(反応相)疲弊状態(疲弊相)の4群に分類することができた。前反応相では血清ナトリウム量がわずかに低下し、反応相では血清グルコース量とヘマトクリット値の増加が顕著であった。疲弊相では血清ナトリウム量の著しい増加が特徴的であった。

(2) スレッサーとして塩分変化刺激を与えた時のマダイの血液性状の変動を調べた。

急激な塩分上昇刺激に対して、血清グルコース量、血清コチゾール量、ナトリウム量、クロライド量の上昇が認められ、急激な塩分低下刺激に対しては、高血糖、コチゾール量増加、高ヘマトクリット値、血清ナトリウム量、クロライド量の減少が認められた。



## マダイのストレス反応

これら血液性状の変動の在り方から、海産魚のストレス状態の分類をクラスター分析によって試み、対照相、反応相、疲弊相が分類された。反応相ではグルコース値上昇が顕著で疲弊相では、ナトリウム量が周囲環境水に大きく影響を受けている状態が示された。

(3)飼育水の溶存酸素量を減少させた時のマダイの血液性状を測定した。急性、亜急性の溶存酸素量減少はヘマトクリット値、ヘモグロビン量の増加と著しい高血糖、血清コルチゾール量の増加をひき起こした。4時間で1.72ml/l、1.92ml/lの溶存酸素量減少の時のマダイではわずかに血糖値の増加が認められただけであった。ヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量を用いて行なったクラスター分析では、酸素量低下時のストレス状態は3群に分別することができた。反応相では高血糖と高ヘマトクリット値が特徴的であり、また3変数の値が著しく低い一群が分離された。

(4)“取り扱い”や“麻酔”などの通常の魚取り扱い操作がマダイの血液性状に与える影響を知るために、緩やかな“取り扱い”(ネットで魚を持ち上げて一分間空中に放置)、酷い“取り扱い”(魚を取り上げ麻酔をし胃中にカテーテルで餌料を挿入する)、MS222 (50ppm, 100ppm)による麻酔の実験を行ない、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血清グルコース量、ナトリウム量、塩素量、カリウム量等を測定した。

緩やかな“取り扱い”直後の血液性状では、カリウム量の有意な低下がみられたものの他の成分には変化はみられなかった。酷い“取り扱い”の場合には、取り扱い直後から血糖の増加、血清カリウム量の増加等が認められた。

MS222による麻酔では2～3分程度で魚が横転する濃度100ppmの時には血液性状には特に変化はみられないが、15分以上かかる麻酔(50ppm)では一時的なヘモグロビン量の減少、血糖値の増加、血清ナトリウム量の増加等が認められた。

これらマダイで得られた結果と他の魚種で得られている血液性状変化に関する知見から、“取り扱い”麻酔時のストレス反応の特徴を論じた。

(5)マダイ輸送時にどの程度のストレス反応が起っているかを知るために、船舶活魚倉輸送と、トラックコンテナ輸送を行なった。船舶輸送の場合には、1×1×1mの活魚倉に魚を収容し18.5 km/hで運行し、海水は船底からの流入流出にまかせた状態で行ない、コンテナ輸送の場合には、大型厚手ビニール袋に20lの海水を入れ、これに酸素ガスを30秒間吹き込み、その後密閉して段ボール箱に収容しトラックに積み込み輸送した。輸送中、輸送後の適当な時間に魚を取り上げ、キュービエ氏管より採血し、ヘマトクリット値を測定し、分離した血清についてグルコースとナトリウム量を測定した。

船舶輸送の際、輸送直前に魚を活魚倉に収容した場合には顕著な血糖値の上昇が認められ、また、ヘマトクリット値、血清ナトリウム量の増加が認められる場合もあった。しかし、24時間前に魚を収容しておくとも顕著な血糖値の上昇は認められなかった。このことは、“取り扱い”の影響が極めて大きいことを意味している。

コンテナ輸送の場合には、収容時間の如何を問わず、顕著な血糖増加が認められ、ヘマトクリット値は高溶存酸素の影響による低下が認められた。

魚の輸送時に、ストレス反応が起っていることは明らかである。その反応の起り方は実験毎に異なり、輸送のような複合的なストレスの影響に対する反応は必ずしも一定でないと判断された。

(6)瀬戸内海における天然マダイの血液性状を調べた。釣り上げた後10分以内に船上で採血し、ヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量、血清カリウム量等を測定した。ヘマトクリット値は  $34.8 \pm 4.87\%$ 、(平均値  $\pm$  標準偏差,  $n = 31$ ) 血清グルコース量は  $63.5 \pm 25.14$  mg/dl,  $n = 47$ ), 血清ナトリウム量は  $181.7 \pm 20.00$  mEq ( $n = 71$ ) であった。血清ナトリウム量は季節により大きな変動を示した。

(7)ストレスの強度の明らかな温度変化、塩分変化、溶存酸素量低下時のマダイの血液性状を基にマダイがストレス状態にあるか否かを判断するための判別函数分析を行なった。それぞれの実験結果より対照相、反応相と判断されたクラスターに含まれる各個体の  $10 \times$ (ヘマトクリット値),  $100 \times \log$ (血清グルコース量), 血清ナトリウム量の3変数を用いてそれぞれのグループを定義した。農林水産計算センターの多変量解析プログラムによって算出した判別函数式は

$$Z = 19.268 - 0.004X_1 - 0.029X_2 - 0.027X_3$$

$Z$  : それぞれのグループからの距離,  $X_1$  :  $10 \times$ (ヘマトクリット値)

$X_2$  :  $100 \times \log$ (血清グルコース量),  $X_3$  : 血清ナトリウム量

であった。

取り扱い、MS222による麻酔、輸送、釣り上げ時のマダイ個体のヘマトクリット値、血清グルコース量、血清ナトリウム量の測定値を判別函数式に適用しストレス状態にあるか否かの判別を行った。

(8)ストレス時のエネルギー代謝を明らかにするために主として $^{14}\text{C}$ を用いたトレーサー実験を行なった。組織標本は肝臓、筋肉組織、腹腔内脂肪組織を用いた。肝臓組織はスタディ・リグススライサーを用い薄切片とし、筋肉組織は胸鱭骨上体表側筋肉を剥離し、腹腔内脂肪組織は20mg程度の細切片として *in vitro* 実験に供した。

(9)遊離組織標本についてクレブス氏重炭酸緩衝液中の  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -グルコースの代謝に与える飢餓の影響を研究した。

初夏、2ヶ月間の絶食は肥満度、肝体重比の著しい減少を起した。*in vitro* 実験では標識グルコースは効率的に利用され、特に飢餓魚では肝臓や腹腔内脂肪組織では湿重量あたりの炭酸ガス生成は著しく増大した。しかし、組織への取込みやグリコーゲンへの転換には有意差は認められなかった。グルコースの炭酸ガス生成としての利用増大や、貯蔵物質の減少は、飢餓時の血液学的性状にみられるストレス反応の様相を正常時とは異なったものにするであろうと推測された。

(10)マダイのスライスした肝臓組織標本、胸鱭骨上剥離筋肉および腹腔内脂肪組織細片を用いた *in vitro* 実験で、各種ホルモンが肝臓組織からのグルコース遊離、及び肝臓、筋肉、脂肪組織からの脂肪酸遊離に与える影響を調べた。

ホルモンを添加しない同一魚体の対照区との比較で、エピネフリンとグルカゴンは肝臓からのグルコース遊離を促進し、コーチゾールとインスリンは肝臓からのグルコース遊離を抑制した。

クレブス磷酸緩衝液中で各種組織の振盪培養を3時間行なった後、組織と緩衝液を Dole の液で振盪抽出し、Trout の方法により脂肪酸の定量を行なった。エピネフリン、グルカゴン、インスリンは、どの組織についても特定の効果を示さなかった。コーチゾールには肝臓の遊離脂肪酸を増加させる傾向が認められたがその量は大きくなく、今後の検討が必要と考えられた。

(11)遊離組織標本におけるグルコース利用に与えるエピネフリンの影響を U-<sup>14</sup>C-グルコースにより調べた。2回の実験を行なった。クレブス氏重炭酸緩衝液中の遊離組織標本は基質グルコースを組織に取り込み、炭酸ガス生成やグリコーゲン合成のために利用し、特に胸鱭筋肉に於けるグルコース利用は大きかった。

エピネフリンは2回の実験で胸鱭筋肉におけるグリコーゲン合成を抑制し、1つの実験では肝臓におけるグリコーゲン合成の抑制と腹腔内脂肪組織における炭酸ガス生成の増加を起した。

(12)遊離組織標本における U-<sup>14</sup>C-グルコース、U-<sup>14</sup>C-乳酸、U-<sup>14</sup>C-グリシンの利用に与えるコーチゾールの影響を *in vitro* 実験系で論じた。これら基質の代謝の様相は組織毎に異なった。グルコースは、肝臓と胸鱭筋肉で主に呼吸(炭酸ガス生成)とグリコーゲン合成に多く利用され、乳酸は肝臓では呼吸と脂肪合成と糖新生に脂肪組織では脂肪合成に利用され、グリコーゲン合成に利用される割合は少なかった。グリシンは、肝臓では呼吸基質とグルコース生成に利用され、グリコーゲンや脂質に利用される割合は少なく、胸鱭筋肉や腹腔内脂肪組織では呼吸基質、グリコーゲン、脂肪としての利用は少なかった。

コーチゾールを実験系に添加すると、グルコースの胸鱭筋肉取り込み抑制と腹腔内脂肪組織におけるグルコースからの脂肪合成の促進がみられた。また、肝臓においてグリシンからのグリコーゲン生成抑制と胸鱭筋肉におけるグリシン取り込み抑制がみられた。調べた条件範囲内では乳酸の代謝に関してコーチゾールの影響は認められなかった。

(13)ストレス時に血液中に増加するエピネフリン、コーチゾールの物質代謝に与える影響とストレス時の高血糖の機構を考察した。*in vitro* 実験の結果から少なくともストレス時初期の血糖上昇は、肝臓や筋肉におけるグリコーゲン分解によるグルコース生成、末梢組織におけるグルコース利用の抑制、肝臓における乳酸やアミノ酸等からの糖新生等の複合的結果であると考えられた。特に乳酸は、ストレス状態で起り易い組織窒息の結果産生され、肝臓では組織内に保持されることなく呼吸基質、脂肪、糖として代謝されるという特性から糖新生基質として、重要であると考えられた。

反応の大きさや確実さからストレス時の初期の代謝変化を起すホルモンは主にエピネフリンであると考えられた。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、京都大学農学部教授、池田静徳博士、ならびに東京水産大学増殖学科教授、尾崎久雄博士に、終始、御指導と御鞭達を賜わり、また、本論文の御校閲をいただきました。両博士に謹んで御礼申し上げます。

本研究を開始し継続する機会を与えられた元南西海区水産研究所、藤谷超博士（現日本海区水産研究所所長）、元南西海区水産研究所、阪口清次博士（現養殖研究所病理部部長）に感謝いたします。養殖研究所病理部病理研究室室長 乾靖夫博士には、内容の一部について良い示唆を与えられたことを感謝いたします。また、多変量解析を行うにあたって、デスクトップコンピューター YHP30, YHP45 でのクラスター分析、判別函数分析のプログラムの使用を許された南西海区水産研究所、石岡清英技官、本実験遂行にあたり魚の飼育、実験補助をお願いした松原恵、山手美代子両氏に深謝いたします。

## 文 献

- ABRAHAMSON, T., 1979: Phenylethanolamine-N-methyl transferase (PNMT) activity and catecholamine storage and release from chromaffin tissue of the spiny dogfish, *Squalus acanthias*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **64C**, 169-172.
- ALDRIN, J. F., J. L. MESSENGER et M. MEVEL, 1979: Essai sur le stress de transport chez le saumon coho juvenile (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, **17**, 279-289.
- ALLANSON, B. R., A. BOK and N. I. VAN WYK, 1971: The influence of exposure to low temperature on *Tilapia mossambica* PETERS (cichlidae) II. Changes in serum osmolarity, sodium and chloride ion concentrations. *J. Fish Biol.*, **3**, 181-185.
- APOSTOROPOULOS, J. S., 1976: Combined effect of temperature and salinity of the hatching rate, hatching time and total body length of the newly hatched larvae of the Japanese red sea bream, *Pagrus major*. *La Mer*, **14**, 23-30.
- ARILLO, A., B. UVA and M. VALLARINO, 1981: In activity in rainbow trout (*Salmo gairdneri* RICH.) and effects of environmental ammonia. *Comp. Biochem. Physiol.*, **68A**, 307-311.
- 栗倉輝彦, 1964: ニジマスの海水に対する抵抗性について (II). *魚と卵*, **15**, 8-13.
- 馬場茂明・奥田 清編, 1973: 医化学実験法講座, 臨床化学Ⅱ, 337-338. 中山書店, 東京.
- BALL, J. N. and A. M. SLICHER, 1962: Influence of hypophysectomy and of an adrenocortical inhibitor (SU-4885) on the stress response of the white blood cells in the teleost fish, *Mollinnesia latipinna* LE SUEUR. *Nature*, **196**, 1331-1332.
- BALL, J. N., C. JONES, M. E. FORSTER, G. HARGREAVES, E. F. HAWKINS and K. P. MILNE, 1971: Measurement of plasma cortisol levels in the eel, *Anguilla anguilla* in relation to osmotic adjustments. *J. Endocr.*, **50**, 75-96.
- BARTON, B. A., R. E. PETER and C. R. PAULENCU, 1980: Plasma cortisol levels of fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest and subjected to handling, confinement, transport and stocking. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 850-811.
- BATH, R. N. and F. B. EDDY, 1979: Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from freshwater to sea water. *J. Exp. Biol.*, **83**, 193-202.
- BEGGS, G. L., G. F. HOLETON and E. J. CROSSMAN, 1980: Some physiological consequences of angling stress in muskellungs, *Esox masquinongy* MITCHILL. *J. Fish Biol.*, **17**, 649-659.
- BENTLEY, P. J. and B. K. FOLLETT, 1965: The effects of hormones on the carbohydrate metabolism of the lamprey, *Lampetra fluviatilis*. *J. Endocr.*, **31**, 127-137.
- BIRNBAUM, M. J., J. SCHULTZ and J. N. FAIN, 1976: Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, **231**, 191-197.

- BLOCK, R. M., 1977: Physiological responses of estuarine organisms to chlorine. *Chesapeake Science*, **18**(1), 158-160.
- BOGDAN, E. and D. WALUGA, 1980: The effect of transport on the quality of eel stocking material. *Aquaculture*, **20**, 139-146.
- BOUCK, G. R. and R. C. BALL, 1966: Influence of capture methods on blood characteristics and mortality in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Trans. Am. Fish. Soc.*, **95**, 170-176.
- BOUCK, G. R., M. A. CAIRNS and A. R. CHRISTIAN, 1978: Effect of capture stress on plasma enzyme activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 1485-1488.
- BUCKLEY, J. A., 1976: Heinz body hemolytic anemia in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to chlorinated waste water. *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**, 215-224.
- BURTON, D. T. and A. M. SPEHAR, 1971: A re-evaluation of the anaerobic endproducts of fresh-water fish exposed to environmental hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol.*, **40A**, 945-954.
- BURTON, D. T., 1979: Ventilation frequency compensation responses of three eurythermal estuarine fish exposed to moderate temperature increases. *J. Fish. Biol.*, **15**, 589-600.
- BURTON, D. T. and A. G. HEATH, 1980: Ambient oxygen tension ( $P_{O_2}$ ) and transition to anaerobic metabolism in three species of fresh water fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 1216-1224.
- BURTON, C. B. and S. A. MURRAY, 1979: Effects of density on goldfish blood-I. Haematology. *Comp. Biochem. Physiol.*, **62A**, 555-558.
- BUTLER, D. G., 1968: Hormonal control of gluconeogenesis in the North American eel (*Anguilla rostrata*). *Gen. Comp. Endocr.*, **10**, 85-91.
- CAMERON, J. N., 1970: The influence of environmental variables on the hematology of pinfish (*Lagodon rhomboides*) and striped mullet (*Mugil cephalus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **32**, 175-192.
- CARNEIRO, N. M. and A. D. AMARAL, 1983: Effects of insulin and glucagon on plasma glucose levels and glycogen content in organs of the fresh water teleost, *Pimelodus maculatus*. *Gen. Comp. Endocr.*, **49**, 115-121.
- CASILLAS, E. and L. S. SMITH, 1977: Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.*, **10**, 481-491.
- CATLETT, R. H. and D. R. MILLICH, 1976: Intracellular and extracellular osmoregulation of temperature acclimated goldfish, *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55A**, 261-269.
- CHAN, D. K. O., I. C. JONES, I. W. HENDERSON and J. C. RANKIN, 1967: Studies on the experimental alteration of water and electrolyte composition of the eel (*Anguilla anguilla* L.). *J. Endocr.*, **37**, 297-317.
- CHAN, D. K. O. and N. Y. S. WOO, 1978a: Effect of glucagon on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocr.*, **35**, 216-225.
- CHAN, D. K. O. and N. Y. S. WOO, 1978b: Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. *Gen. Comp. Endocr.*, **35**, 205-215.
- CHAVIN, W. and J. E. YOUNG, 1970: Factors in the determination of normal serum glucose levels of goldfish, *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **33**, 629-653.
- DANDO, P. R., 1969: Lactate metabolism in fish. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, **49**, 209-223.
- DAVE, G., M.-L. JOHANSSON-SJÖBECK, A. LARSSON, K. LEWANDER and U. LIDMAN, 1979: Effects of cortisol on the fatty acid composition of the total blood plasma lipids in the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **64A**, 37-40.
- DAVIS, K. B. and B. A. SIMCO, 1976: Salinity effects on plasma electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 741-746.
- 出口吉昭, 1982: 1. 輸送中の生理, 2. 排泄, 水産学シリーズ39, 活魚輸送, 日本水産学会編, pps 137, 恒星社厚生閣, 東京.

- DEMAËL-SUARD, A., 1972: Influence d'une anoxie brutale sur la regulation endocrinienne du metabolisme glucidique d'un poisson Cyprinide, *Tinca vulgaris* L. Societe de Biologie de Lyon, **24**, 394-398.
- DEMAËL, A. et D. GARIN, 1974: Etude in vitro du metabolisme hydrocarbone du poisson au cours du choc thermique. Cahiers du Laboratoire de Montereau. (1), 27-32.
- DEMAËL-SUARD, A., D. GARIN, G. BRICHON, M. MURE et G. PERES, 1974: Neoglycogenese a partir de la glycine  $^{14}\text{C}$  chez la tanche (*Tinca vulgaris* L.) au cours de l'asphyxie. Comp. Biochem. Physiol., **47A**, 1023-1033.
- DEMAËL, A. et D. GARIN, 1978: Effets d'un choc thermique de  $10\text{C}^{\circ}$  ( $15\text{-}25\text{C}^{\circ}$ ) sur certains parametres metaboliques de la tanche adaptee ades eaux diversement oxygenees. Cahiers du Laboratoire de Montereau, (7), 15-25.
- DEROOS, R. and C. C. DEROOS, 1978: Elevation of plasma glucose levels by catecholamines in elasmobranch fish. Gen. Comp. Endocr., **34**, 447-452.
- DONALDSON, E. M. and H. M. DYE, 1975: Corticosteroid concentrations in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) exposed to low concentrations of copper. J. Fish. Res. Board Can., **32**, 533-589.
- DONALDSON, E. M., 1981: The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. Stress and Fish (edited by Pickering), 11-47., Academic Press, London, New-York, Toronto, Sydney, San-Francisco.
- DRIEDZIC, W. R. and P. W. HOCHACHKA, 1975: The unanswered question of high anaerobic capabilities of carp white muscle. Can. J. Zool., **53**, 706-712.
- DRIEDZIC, W. R. and P. W. HOCHACHKA, 1976: Control of energy metabolism in fish white muscle. Am. J. Physiol., **230**, 579-582.
- EDDY, F. B. and R. N. BATH, 1979: Ionic regulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) adapted to fresh water and dilute sea water. J. Exp. Biol., **83**, 181-192.
- EJKE, C. and C. B. SCHRECK, 1980: Stress and social hierarchy rank in coho salmon. Trans. Am. Fish. Soc., **109**, 423-426.
- EPPLE, A., 1969: The endocrine pancreas. Fish Physiology (edited by Hoar and Randall), Vol. 2, 275-319.
- EPPLE, A. and T. L. LEWIS, 1977: Metabolic effects of pancreatectomy and hypophysectomy in the yellow American eel, *Anguilla rostrata* LeSuer. Gen. Comp. Endocr., **32**, 294-315.
- ERICKSON, J. G., 1967: Social hierarchy, territoriality and stress reactions in sunfish. Physiol. Zool., **40**, 40-48.
- FAGERLUND, U. H. M., 1967: Plasma cortisol concentration in relation to stress in adult sockeye salmon during the freshwater stage of their life cycle. Gen. Comp. Endocr., **8**, 197-207.
- FAGERLUND, U. H. M., J. R. MCBRIDE and E. T. STONE, 1981: Stress-related effects of hatchery rearing density on coho salmon. Trans. Am. Fish. Soc., **110**, 644-649.
- FAIN, J. N. and M. P. CZECH, 1975: Glucocorticoid effects on lipid mobilization and adipose tissue metabolism. Handbook of Physiology, Section 7, Endocrinology, Vol. VI. Adrenal gland, 169-178, American Physiological Society, Washington.
- FARGHALY, A. M., A. A. EZZAT and M. B. SHABANA, 1973: Effect of temperature and salinity changes on the blood characteristics of *Tilapia zilli* G. in Egyptian littoral lakes. Comp. Biochem. Physiol., **46A**, 183-193.
- FARKAS, T., 1967: The effect of catecholamines and adrenocorticotrophic hormone on blood and adipose tissue FFA levels in the fish, *Cyprinus carpio* L. Progr. Biochem. Pharmacol., **3**, 314-319.
- FERREIRA, J. T., G. L. SMIT and H. J. SCHOONBEE, 1981: Haematological evaluation of the anaesthetic benzocaine hydrochloride in the fresh water fish, *Cyprinus carpio* L. J. Fish Biol., **18**, 291-297.
- FLETCHER, G. L., 1975: The effects of capture "stress" and storage of whole blood on the red blood cells, plasma proteins, glucose and electrolytes of the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*).

- Can. J. Zool., **53**, 197-206.
- FOLCH, J., M. LEES and G. H. S. STANLEY, 1957: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-500.
- FORREST, J. N. JR., W. C. MACKAY, B. GALLAGHER and F. H. EPSTEIN, 1973: Plasma cortisol response to saltwater adaptation in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Am. J. Physiol.*, **224**, 714-717.
- FRYER, J. N., 1975: Stress and adrenocorticosteroid dynamics in the goldfish, *Carassius auratus*. *Can. J. Zool.*, **53**, 1012-1020.
- FRYER, J. N. and R. E. PETER, 1977a: Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish I. Corticotrophin-releasing factor activity in teleost brain tissue extracts. *Gen. Comp. Endocr.*, **33**, 196-201.
- FRYER, J. N. and R. E. PETER, 1977b: Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish II. Hypothalamic lesioning studies. *Gen. Comp. Endocr.*, **33**, 202-214.
- FRYER, J. N. and R. E. PETER, 1977c: Hypothalamic control of ACTH secretion in goldfish III. Hypothalamic cortisol implant studies. *Gen. Comp. Endocr.*, **33**, 215-225.
- 藤谷 超・石岡宏子・福原 修, 1972: 浅海域における増養殖漁場の開発に関する総合研究(備後灘周辺実験漁場), 1. クルマエビ人工種苗の生理生態に関する研究, 昭和46年度別枠研究成果, 10-15.
- 藤谷 起・塚原宏子, 1969: 養魚餌料の研究—第Ⅷ報 飢餓魚に現われた症状. 南海海区水産研究所研究報告, (1), 63-69.
- 古市政幸・四反田勝久・米 康夫, 1971a: マダイの栄養要求に関する研究—Ⅳ. 各種炭水化物の栄養価. *Rep. Fish. Lab. Kyushu Univ.*, (1), 75-81.
- 古市政幸・四反田勝久・米 康夫, 1971b: マダイの栄養要求に関する研究—Ⅴ. 炭水化物の適正量. *Rep. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ.*, (1), 91-100.
- 古市政幸・米 康夫, 1971c: マダイの栄養要求に関する研究—Ⅵ. グルコースおよびインシュリン負荷試験による糖利用能の検討. *Rep. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ.*, (1), 101-106.
- 伏見 徹, 1975: Ⅱ. 飼育条件と発育, 4. 餌料, 水産学シリーズ8, 稚魚の摂餌と発育, 日本水産学会編, 67-83, 恒星社厚生閣, 東京.
- GIRARD, J. P. and P. PAYAN, 1976: Effect of epinephrine on vascular space of gills and head of rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, **230**(6), 1555-1560.
- GIRARD, J. P. and P. PAYAN, 1980: Ion exchanges through respiratory and chloride cells in freshwater- and seawater-adapted teleosts. *Am. J. Physiol.*, **238**, R260-R268.
- GORDON, M. S., 1959: Ionic regulation in the brown trout (*Salmo trutta* L.). *J. Exp. Biol.*, **36**, 227-252.
- GRONOW, G., 1974: Nukleinsäure und Substratgehalte in der dorsalen Rumpfmuskulatur von Teleosteen während eines "biologischen Stress". *Mar. Biol.*, **24**, 313-327.
- GUPTA, O. P. and W. HANKE, 1982: The effects of osmotic stressors on the euryhaline tilapia (*Sarotherodon mossambicus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **73A**(3), 405-411.
- 萩田健二, 1972: マダイ養殖の環境試験. 昭和47年度三重県尾鷲水産試験場事業報告, 84-91.
- HALL, F. G., I. E. CRAY and S. LEPKOVSKY, 1926: The influence of asphyxiation on the blood constituents of marine fishes. *J. Biol. Chem.*, **67**, 549-554.
- HANE, S., O. H. ROBERTSON, B. C. WEXLER and M. A. KRUPP, 1966: Adrenocortical response to stress and ACTH in Pacific salmon and steelhead trout at successive stages in the sexual cycle. *Endocrinology*, **78**, 791-800.
- HARDISTY, M. W., P. R. ZELNIK and V. C. WRIGHT, 1976: The effects of hypoxia on blood sugar levels and on the endocrine pancreas, interrenal and chromaffin tissues of the lamprey, *Lampetra fluviatilis* (L.). *Gen. comp. Endocr.*, **28**, 184-204.
- HARMAN, B. J. and D. L. JOHNSON, 1980: Physiological responses of Lake Erie freshwater drum to capture by commercial shore seine. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **109**, 544-551.

- 橋本 進, 1982: サケ親魚の活魚輸送時に必要な酸素放出量について. 北海道さけ・ますふ化場研究報告, (36), 71-73.
- HATTINGH, J. and A. J. J. VAN PLETZEN, 1974: The influence of capture and transportation on some blood parameters of fresh water fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **49A**, 607-609.
- HATTINGH, J., 1976: Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater fish, *Labeo capensis* (SMITH). *J. Fish Biol.*, **10**, 191-195.
- HATTINGH, J., 1977: The effect of tricane methanesulphonate (MS222) on the microhaematocrit of fish blood. *J. Fish Biol.*, **10**, 453-455.
- 林孝市郎, 1977: 14. 活魚輸送. 魚類生理学 (川本信之編), 306-317, 恒星社厚生閣, 東京.
- HAYASHI, K., N. W. GREEN and E. C. BLACK, 1964: Carbohydrate metabolism during transportation of live rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Rep. Fac. Fish., Pref. Univ. Mie*, **5**(1), 51-125.
- HAYASHI, S. and Z. OOSHIRO, 1975a: Glycogenolysis and gluconeogenesis by eel liver slices. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, **24**, 119-122.
- HAYASHI, S. and Z. OOSHIRO, 1975b: Gluconeogenesis and glycolysis in isolated perfused liver of the eel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 201-208.
- HAYASHI, S. and Z. OOSHIRO, 1975c: Incorporation of <sup>14</sup>C-lactate into glucose by perfused eel liver. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**(7), 791-796.
- HAYASHI, S. and Z. OOSHIRO, 1977: Gluconeogenesis in perfused eel liver—Effect of starvation, aminoxyacetate, D-malate and hormones. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.*, **26**, 89-95.
- HAYASHI, S. and Z. OOSHIRO, 1979: Gluconeogenesis in isolated liver cells of the eel, *Anguilla japonica*. *J. Comp. Physiol.*, **132**, 343-350.
- HAYWOOD, G. P., 1975: Indications of sodium, chloride and water exchange across the gills of the striped dogfish, *Paroderma africanum*. *Mar. Biol.*, **29**, 267-276.
- HEATH, A. G. and G. M. HUGHES, 1973: Cardiovascular and respiratory changes during heat stress in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Biol.*, **59**, 323-338.
- HEGAB, S. A. and W. HANKE, 1982: Electrolyte changes and volume regulatory processes in the carp (*Cyprinus carpio*) during osmotic stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, **71A**, 157-164.
- HEINICKE, E. A. and A. H. HOUSTON, 1965: A note on water balance in the goldfish, *Carassius auratus* L., during lethal heat shock. *Can. J. Zool.*, **43**, 847-852.
- HENDERSON, I. W., V. JOTISANKASA, W. MOSLEY and M. OGURI, 1976: Endocrine and environmental influences upon plasma cortisol concentrations and plasma renin activity of the eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Endocr.*, **70**, 81-95.
- HICKMAN, C. P. JR., R. A. McNABB, J. S. NELSON, E. D. VAN BREEMEN and D. COMFORT, 1964: Effect of cold acclimation on electrolyte distribution in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Zool.*, **42**, 577-597.
- HILL, C. W. and P. O. FROMM, 1968: Response of interrenal gland of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to stress. *Gen. Comp. Endocr.*, **11**, 69-77.
- HIRANO, T., 1969: Effects of hypophysectomy and salinity change on plasma cortisol concentration in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Endocrinol. Japon.*, **16**(5), 557-560.
- HIRANO, T. and S. UTIDA, 1971: Plasma cortisol concentration and rate of intestinal water absorption in the eel, *Anguilla japonica*. *Endocrinol. Japon.*, **18**(1), 47-52.
- 平野哲也, 1976: プロラクチン作用の本質についての比較内分泌学的アプローチ. 水・電解質代謝を中心として. ホルモンの生物科学. 1. 比較内分泌学序説, (日本内分泌学会編), 157-179, 東京大学出版会, 東京.
- 広島県水産試験場・山口内海水産試験場・愛媛県水産試験場・高知県水産試験場・大分県水産試験場・宮崎県水産試験場, 1982: 昭和56年度回遊性魚類共同放流実験調査事業. 瀬戸内海西部海域総合報告書, 広島県, 1-34.



- HOLBERT, P. W., E. J. BOLAND and K. R. OLSON, 1979: The effect of epinephrine and acetylcholine on the distribution of red cells within the gills of the channel catfish (*Ictalurus punctatus*). J. Exp. Biol., **79**, 135-146.
- HOLETON, G. F. and D. J. RANDALL, 1967: The effect of hypoxia upon the partial pressure of gasses in the blood and water afferent and efferent to the gills of rainbow trout. J. Exp. Biol., **46**, 317-327.
- HOLMGREN, S. and S. NILSSON, 1982: Neuropharmacology of adrenergic neurons in teleost fish. Comp. Biochem. Physiol., **72C**, 289-302.
- 細谷憲政・町谷肇彦, 1971: C. 組織をもちいる実験法 1. スライスの作製方法と肝腎をもちいた実験. 医化学実験法講座第2巻A《代謝および酵素》, 243-250, 中山書店, 東京.
- HOUSTON, A. H., 1962: Some observations on water balance in the goldfish, *Carassius auratus* L., during cold death. Can. J. Zool., **40**, 1169-1174.
- HOUSTON, A. H. and J. A. MADDEN, 1968: Environmental temperature and plasma electrolyte regulation in the carp, *Cyprinus carpio*. Nature, **217**, 969-970.
- HOUSTON, A. H. and M. A. DEWILDE, 1969: Environmental temperature and the body fluid system of the freshwater teleost-III. Haematology and blood volume of thermally acclimated brook trout, *Salvelinus fontinalis*. Comp. Biochem. Physiol., **28**, 877-885.
- HOUSTON, A. H., J. A. MADDEN, R. J. WOODS and H. M. MILES, 1971: Some physiological effects of handling and tricaine methanesulphonate anesthetization upon the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. J. Fish. Res. Board Can., **28**, 625-633.
- HOUSTON, A. H., C. L. CZERWINSKI and R. J. WOODS, 1973: Cardiovascular-respiratory activity during recovery from anesthesia and surgery in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and carp (*Cyprinus carpio*). J. Fish. Res. Board Can., **30**(11), 1705-1712.
- HOUSTON, A. H. and D. CYR, 1974: Thermoacclimatory variation in the haemoglobin systems of goldfish (*Carassius auratus*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Exp. Biol., **61**, 455-461.
- HUGHES, G. M. and J. L. ROBERTS, 1970: A study of the effect of temperature changes on the respiratory pumps of the rainbow trout. J. Exp. Biol., **52**, 177-192.
- HUNN, J. B., 1969: Chemical composition of rainbow trout urine following acute hypoxic stress. Trans. Am. Fish. Soc., **98**, 20-22.
- IDLER, D. R. and B. TRUSCOTT, 1972: Corticosteroids in fish. Steroids in Nonmammalian Vertebrates (edited by D. R. Idler), 127-252, Academic Press, New York and London.
- IGA, T., 1978: The mode of action of potassium ions on the leukophores of the fresh water teleost, *Oryzias latipes*. J. Exp. Zool., **205**, 413-422.
- 池田静徳, 1977: 6. 消化酵素. 魚類生理, 140-159, 恒星社厚生閣, 東京.
- 池田静徳, 1979: 魚類の糖代謝. 蛋白質・核酸・酵素, **24**(3), 292-136.
- 池田弥生, 1976: 養殖ハマチの血液成分に関する診断学的研究. 京都大学農学部学位論文, 1-91.
- INCE, B. W. and A. THORPE, 1975: Hormonal and metabolite effects on plasma free fatty acids in the northern pike, *Esox lucius* L. Gen. Comp. Endocr., **27**, 144-152.
- INCE, B. W. and A. THORPE, 1976: The in vivo metabolism of <sup>14</sup>C-glucose and <sup>14</sup>C-glycine in insulin-treated northern pike (*Esox lucius* L.). Gen. Comp. Endocr., **28**, 481-486.
- INCE, B. W. and A. THORPE, 1977: Plasma insulin and glucose responses to glucagon and catecholamines in the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). Gen. Comp. Endocr., **33**, 453-459.
- INUI, Y. and Y. OHSHIMA, 1966: Effect of starvation on metabolism and chemical composition of eels. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **32**, 492-501.
- INUI, Y. and S. EGUSA, 1967: Histological changes observed in glass eel liver during starvation. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **33**(3), 181-189.

- INUI, Y. and M. YOKOTE, 1974: Gluconeogenesis in the eel-I. Gluconeogenesis in the fasted eel. Bull. Freshwater Fish. Res. Lab., **24**(1), 33-46.
- INUI, Y. and M. YOKOTE, 1975a: Gluconeogenesis in the eel-III. Effects of mammalian insulin on the carbohydrate metabolism of the eel. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **41**, 965-972.
- INUI, Y. and M. YOKOTE, 1975b: Gluconeogenesis in the eel-IV. Gluconeogenesis in the hydrocortisone administrated eel. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **41**, 973-981.
- INUI, Y. and M. YOKOTE, 1975c: Gluconeogenesis in the eel-V. Effects of alloxan and hydrocortisone administration on amino acid mobilization in the hepatectomized eel. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., **41**, 1101-1104.
- INUI, Y. and M. YOKOTE, 1977: Effects of glucagon on amino acid metabolism in Japanese eels, *Anguilla japonica*. Gen. comp. Endocr., **33**, 167-173.
- INUI, Y. and H. ISHIOKA, 1983a: Effects of insulin and glucagon on the incorporation of <sup>14</sup>C-glycine into the protein of the liver and opercular muscle of the eel in vitro. Gen. Comp. Endocr., **51**, 208-212.
- INUI, Y. and H. ISHIOKA, 1982b: Effects of insulin and glucagon on amino acid transport into the liver and opercular muscle of the eel in vitro. Gen. Comp. Endocr., **51**, 213-218.
- 井上 進・古市政幸, 1979: 活魚輸送中の水ゆれが魚体に及ぼす影響と水ゆれ防止型水槽の試作について. Rep. Fish. Res. Lab., Kyushu Univ., (4), 79-114.
- 石岡清英・石岡宏子, 1978: コーチゾールラジオイムノアッセイの標準曲線のあてはめに関する検討. 南西海区水産研究所報告, (11), 65-74.
- 石岡宏子・国行一正, 1979: 養殖マダイと天然マダイの形態の比較. (未発表).
- 石岡宏子・乾 靖夫, 1980: 養殖魚における病害の予防に関する研究(8), 臨床検査のための標準値. 農林水産技術会議研究成果, **128**, 74-82.
- 石岡宏子, 1980 a: 海産魚のストレス反応に関する研究-I. 温度変化によるストレス反応. 日本誌, **46**(5), 523-531.
- 石岡宏子, 1980 b: 急激な塩分変化がマダイの血液性状におよぼす影響. 日本誌, **46**(11), 1323-1331.
- 石岡宏子, 1982: 飼育水の酸素分圧低下によるマダイの血液性状変化. 日本誌, **48**(2), 165-170.
- 石岡宏子, 1983: In vitro 代謝研究のためのマダイの摘出筋肉標本. 日本誌, **49**(10), 1523-1526.
- 石岡宏子, 1984 a: 麻酔および取り扱いストレス時の血液性状変化. 南西海区水産研究所報告, (10), 53-62.
- 石岡宏子, 1984 b: 輸送時のマダイの血液性状成分の変動. 南西海区水産研究所報告, (10), 63-71.
- 石岡宏子, 1984 c: マダイ摘出組織標本におけるグルコースおよび脂肪酸遊離に与える各種ホルモンの影響. 南西海区水産研究所報告, (10), 73-84.
- 磯野泰三・中村四郎, 1929: 魚分類の水中酸素呼吸について. 水産研究誌, **25**(7), 163-168.
- 板沢靖男・早川 悟, 1972: 海水魚の浸透圧調節に関する一実験. 稀釈海水中におけるマダイの浸透圧調節. 九大農芸学雑誌, **26**, 197-202.
- 板沢靖男, 1982: I. 輸送中の生理, 1. 呼吸. 水産学シリーズ**39**, 活魚輸送, 9-21, 恒星社厚生閣, 東京.
- 伊藤真次, 1976: 8. 副腎皮質ホルモン. 内分泌学, 138-161, 理工学社, 東京.
- JACKIM, E. and G. LAROCHE, 1973: Protein synthesis in *Fundulus heteroclitus* muscle. Comp. Biochem. Physiol., **44A**, 851-866.
- JACKSON, A. J., 1981: Osmotic regulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) following transfer to sea water. Aquaculture, **24**, 143-151.
- JOHANSON-SJÖBECK, M.-L., G. DAVE, A. LARSSON, K. LEWANDER and U. LIDMAN, 1978: Haematological effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* L. Comp. Biochem. Physiol., **60A**, 165-168.
- JOHNSTON, I. A. and G. GOLDSPIK, 1973: Some effects of prolonged starvation on the metabolism of the red and white myotomal muscles of the plaice, *Pleuronectes platessa*. Mar. Biol., **19**, 348-353.
- JOHNSTON, I. A., 1975a: Studies on the swimming musculature of the rainbow trout II. Muscle metabo-

- lism during severe hypoxia. *J. Fish Biol.*, **7**, 459-467.
- JOHNSTON, I. A., 1975b: Anaerobic metabolism in the carp (*Carassius carassius* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **51**, 235-241.
- JONES, I. C., D. BELLAMY, D. K. O. CHAN, B. K. FOLLETT, I. M. HENDERSON, L. G. PHILLIPS and R. S. SNART, 1972: Biological actions of steroid hormones in nonmammalian vertebrates. *Steroids in Nonmammalian vertebrates* (edited by Idler), 415-480, Academic Press, New York and London.
- JOZUKA, K., 1966: Chloride-excreting and mucus-secreting cells in the gills of the Japanese common eel, *Anguilla japonica*. *Annot. Zool. Japon.*, **39**, 202-210.
- JURANI, M., L. MIKULAJ and K. MURGAS, 1972: Phylogenetic aspects of adrenocortical activity during the process of adaptation. *Advan. Exp. Med. Biol.*, **33**, 619-629.
- 梶山英二, 1928: 真鯛フ化及び発育に及ぼす水温及び比重の影響に就て. *動物学雑誌*, **40**, 521-522.
- 梶山英二・西岡丑三, 1930: 鯛「ラーパ」飼育完成に就て. *水産研究誌*, **25**, 35-40.
- 梶山英二, 1933: 小鯛の酸素消費量及び呼吸停止時に於ける酸素含有量に及ぼす水温, 鹹度及び水素イオン濃度の影響. *日水誌*, **2** (1), 8-12.
- 神谷美江, 1975: 魚のえらとイオンの能動輸送一塩類細胞における Na-K ATPase の役割. *化学と生物*, **13**, 155-157.
- 金子徳五郎・竹内昌昭・石井清之助・東 秀雄・菊地貴明, 1966: 養魚飼料における脂質の役割に関する研究一Ⅳ. 絶食時のニジマス可食部脂肪酸組成の変化. *日水誌*, **33**(1), 56-58.
- 狩谷貞二, 1950: 魚類の赤血球抵抗力について. 第1報, 呼吸困難状態の魚の赤血球抵抗力. *日水誌*, **25**, 728-734.
- 川津浩嗣, 1980: 養殖魚における病害の予防に関する研究. *農林水産技術会議事務局研究成果*, **128**, 17-20.
- KIRK, W. L., 1974: The effects of hypoxia on certain blood and tissue electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (RAFINESQUE). *Trans. Am. Fish. Soc.*, **103**(3), 593-600.
- 北島 力, 1978: マダイの採卵と稚魚の量産に関する研究. *長崎県水産試験場論文集*. 第5集, 1-92.
- KONAGAYA, T., 1977: Change of body temperature of tuna during hauling operation. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 1351.
- 小坂光男, 1981: 温度適応. *温熱生理学* (中山昭雄編), 483-488, 理工学社, 東京.
- 九州・山口ブロック水産試験場マダイ種苗生産研究会, 1977: マダイ種苗生産の技術の現状と問題点. *日本水産資源保護協会*, 1-179.
- LA COMBE, C. et Y. CREACH, 1974: Influence d'une elevation de temperature sur quelques parametres physiologiques en relation avec le metabolisme azote et hydromineral de la carpe (*Cyprinus c. L.*). *Cahiers du Laboratoire de Montereau*, (1), 71-84.
- LARSSON, A. and K. LEWANDER, 1972: Effects of glucagon administration to eels (*Anguilla anguilla* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **43A**, 831-836.
- LARSSON, A. L., 1973: Metabolic effects of epinephrine and norepinephrine in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocr.*, **20**, 155-167.
- LEACH, G. J. and M. H. TAYLOR, 1980: The role of cortisol in stress-induced metabolic changes in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocr.*, **42**, 219-227.
- LEACH, G. L. and M. H. TAYLOR, 1982: The effects of cortisol treatment on carbohydrate and protein metabolism in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocr.*, **48**, 76-83.
- LEIBSON, L. and E. M. PLISETSKAYA, 1968: Effect of insulin on blood sugar level and glycogen content in organs of some cyclostomes and fish. *Gen. Comp. Endocr.*, **11**, 381-392.
- LEIVESTAD, H., H. ANDERSON and P. F. SCHOLANDER, 1957: Physiological response to air exposure in codfish. *Science*, **134**, 505.
- LEWANDER, K., G. DAVE, JOHANSSON-SJÖBECK, M.-L., A. LARSSON and U. LIDMAN, 1976: Metabolic effects of insulin in the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. Comp. Endocr.*, **29**, 455-467.

- LIDMAN, U., G. DAVE, M.-L. JOHANSSON-SJÖBECK, A. LARSSON and K. LEWANDER, 1979: Metabolic effect of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **63A**, 339-344.
- LLOYD, R. and W. R. WHITE, 1967: Effect of high concentration of carbon dioxide on the ionic composition of rainbow trout blood. *Nature*, **216**, 1341-1342.
- LOGAN, A. G., R. MORRIS and J. C. RANKIN, 1980: A micropuncture study of kidney function in the river lamprey, *Lampetra fluviatilis* adapted to sea water. *J. Exp. Biol.*, **88**, 239-247.
- LOVE, R. M., 1970: *The Chemical Biology of Fishes* vol. I. 541 pps, Academic Press, London and New York.
- LOVE, R. M., 1980: *The Chemical Biology of Fishes* vol. II. 943 pps, Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- MACEINA, M. J., F. G. NORDLIE and J. V. SHIREMAN, 1980: The influence of salinity on oxygen consumption and plasma electrolytes in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* Val. *J. Fish Biol.*, **16**, 613-619.
- MACKEY, W. C., 1974: Effect of temperature on osmotic and ionic regulation in goldfish, *Carassius auratus* L. *J. Comp. Physiol.*, **88**, 1-19.
- 松宮義晴・金丸彦一郎・岡 正雄・立石 賢, 1982: 判別函数を用いた外部形態による天然マダイ当歳魚と人工放流魚の識別. 昭和57年度日本水産学会秋季大会講演要旨集, 302.
- 松里寿彦・北島 力, 1972: 魚病診断のための血色素量測定法の比較. *水産増殖*, **19**, 121-127.
- MAZEAUD, F., 1964: Vitesse de production de l'hyperglycémie en fonction de la température chez la Carpe. Intensité de la réponse en fonction de la dose d'hormone. *C. R. Soc. Biol.*, **158**, 36-40.
- MAZEAUD, M., F. MAZEAUD and E. M. DONALDSON, 1977: Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **106**(3), 201-218.
- MAZEAUD, M. M. and F. MAZEAUD, 1981: 3. Adrenergic responses to stress in fish. *Stress and Fish* (edited by Pickering), Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- McFARLAND, W. N., 1960: The use of anesthetics for the handling and the transport of fishes. *California Fish and Game*, **46**(4), 407-431.
- MCDONALD, D. G., H. HOBBS and C. M. WOOD, 1980: The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low environmental pH. *J. Exp. Biol.*, **88**, 109-131.
- MCDONALD, D. G. and C. M. WOOD, 1981: Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH. *J. Exp. Biol.*, **93**, 101-118.
- MCLEAY, D. J., 1973a: Effects of cortisol and Dexamethasone on the pituitary-interrenal axis and abundance of white blood cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocr.*, **21**, 441-450.
- MCLEAY, D. J., 1973b: Effects of a 12-hour and 25-day exposure to kraftpulp mill effluent on the blood and tissues of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 395-400.
- MCLEAY, D. J. and D. A. BROWN, 1974: Growth stimulation and biochemical changes in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to bleached kraft pulpmill effluent for 200 days. *J. Fish. Res. Board Can.*, **31**, 1043-1049.
- MCLEAY, D. J. and D. A. BROWN, 1975: Effects of acute exposure to bleached kraft pulpmill effluent on carbohydrate metabolism of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during rest and exercise. *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**, 753-760.
- MCLEAY, D. J., 1977: Development of a blood sugar bioassay for rapidly measuring stressful levels of pulpmill effluent to salmonid fish. *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**, 477-485.
- MCLEAY, D. J. and M. R. GORDON, 1977: Leucocrit: A simple hematological technique for measuring

- acute stress in salmonid fish, including stressful concentrations of pulpmill effluent. *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**, 2164-2175.
- MCLEAY, D. J. and D. A. BROWN, 1979: Stress and chronic effects of untreated and treated bleached kraft pulpmill effluent on the biochemistry and stamina of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**, 1049-1059.
- MCWILLIAMS, P. G., 1980: Acclimation to an acid medium in the brown trout, *Salmo trutta*. *J. Exp. Biol.*, **88**, 269-280.
- MEYER, D. K., B. A. WESTFALL and W. S. PLATNER, 1954: Water and electrolyte balance of goldfish under conditions of anoxia, cold and inanition. *Am. J. Physiol.*, **184**, 553-556.
- MILLIGAN, C. L. and C. M. WOOD, 1982: Disturbances in hematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Biol.*, **99**, 397-415.
- MINICK, M. C. and W. CHAVIN, 1972: Effects of vertebrate insulins upon serum FFA and phospholipid levels in the goldfish, *Carassius auratus* L., *Comp. Biochem. Physiol.*, **41A**, 791-804.
- MINICK, M. C. and W. CHAVIN, 1973: Effects of catecholamines upon serum FFA levels in normal and diabetic goldfish, *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, **44A**, 1003-1008.
- MORATA, P., A. M. VARGAS, M. L. PITA and F. SANCHEZ-MEDINA, 1982a: Hormonal effects on the liver glucose metabolism in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **72B**, 543-545.
- MORATA, P., A. M. VARGAS, M. L. PITA and F. SANCHEZ-MEDINA, 1982b: Involvement of gluconeogenesis in the hyperglycemia induced by glucagon, adrenalin and cyclic-AMP in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **73A**, 379-381.
- 諸岡 等, 1967: 活魚輸送に関する研究. 長崎県水産試験場論文集, (3), 1-53.
- 村井 衛・青木雄二・西村和久, 1982: マダイ受精卵の46時間輸送結果について. 水産増殖, **30**, 43-47.
- MURAT, J. C. et A. SERFATY, 1975: Effets de l'adrenaline du glucagon et de l'insuline sur le métabolisme glucidique de la Carpe: influence de la température. *C. R. Soc. Biol.*, **169**, 228-232.
- MURAT, J. C. et J. P. PARENT, 1975: Effet de l'acclimatation thermique sur la croissance et le métabolisme glucidique chez la Carpe. Données préliminaires. *Cahiers du Laboratoire de Montreau*, (2), 23-34.
- MURAT, J. C., 1976: Studies on glycogenolysis in the carp liver: Evidence for an amylase pathway for glycogen breakdown. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55B**, 461-465.
- MURAT, J. C., 1976: Recherches sur la mobilisation des glucides tissulaires chez la Carpe. These présentée à l'Université Paul Sabatier de Toulouse, 1-164.
- MURAT, J. C. et E. M. PLISETSKAYA, 1977: Effets du glucagon sur la glycémie, le glycogène et la glycogène-synthétase hépatique chez la Carpe et la Lamproie. *C. R. Soc. Biol.*, **171**, 1302-1305.
- MURRAY, S. A. and C. B. BURTON, 1979: Effects of density on goldfish blood-II. Cell morphology. *Comp. Biochem. Physiol.*, **62A**, 559-562.
- MURRAY, S. A., 1980: Effects of loading density on catfish blood. *Experientia* **36**, 205-206.
- MURTHY, V. K., P. REDDANNA, M. BHASKAR and S. GOVINDAPPA, 1981: Muscle metabolism of freshwater fish, *Tilapia mossambica* (PETERS) during acute exposure and acclimation to sublethal acidic water. *Can. J. Zool.*, **59**, 1909-1915.
- NACE, P. F. and J. E. SCHUH, 1961: Environmental temperature change and blood sugar change in the toadfish, *Opsanus tau*. *Biol. Bull.*, **121**, 401.
- NAGAI, M. and S. IKEDA, 1971a: Carbohydrate metabolism in Fish-I. Effects of starvation and dietary composition on the blood glucose level and the hepatopancreatic glycogen and lipid contents in carp. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **37**, 404-409.
- NAGAI, M. and S. IKEDA, 1971b: Carbohydrate metabolism in fish-II. Effect of dietary composition on

- metabolism of glucose-6-<sup>14</sup>C in carp. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **37**, 410-414.
- NAGAI, M. and S. IKEDA, 1972: Carbohydrate metabolism in fish-III. Effect of dietary composition on metabolism of glucose-U-<sup>14</sup>C and glutamate-U-<sup>14</sup>C in carp. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **38**, 137-143.
- 中川平介・稲塚洋一朗・山崎繁久・平田八郎・笠原正五郎, 1982: 養殖ハマチに及ぼすクロレラエキス添加飼料の効果-I. 成長および血液性状に及ぼす影響. *水産増殖*, **30** (2), 67-75.
- 中川平介・熊井英水・中村元二・笠原正五郎, 1982: 養殖ハマチに及ぼすクロレラエキス添加飼料の効果-II. 血液性状からみた負荷(空气中放置)抵抗力への効果. *水産増殖*, **30** (2), 76-83.
- 中川平介・笠原正五郎・宇野悦央・見奈美輝彦・明楽公男, 1983: 養殖アユの血液性状, 体成分に及ぼすクロレラエキス添加飼料の効果. *水産増殖*, **30** (4), 192-201.
- NAKANO, T. and N. TOMLINSON, 1967: Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbance. *J. Fish. Res. Board Can.*, **24**(8), 1701-1715.
- 南西海区ブロック会議魚貝類研究会魚病班, 1980: 海産養殖魚類の病害対策の現状と問題点—南西海区ブロック会議魚病班10年の歩み—. 7-14, 日本水産資源保護協会, 東京.
- NEALE, N. L., K. V. HONN and W. CHAVIN, 1977: Haematological responses to thermal acclimation in a cold water squaliform (*Heterodontus francisci* GIRARD). *J. Comp. Physiol.*, **B**, **115**, 215-222.
- NIKINMAA, M., 1982: The effects of adrenaline on the oxygen transport properties of *Salmo gairdneri* blood. *Comp. Biochem. Physiol.*, **71A**, 353-356.
- NILSSON, S., T. ABRRAHAMSON and D. J. GROVE, 1976: Sympathetic nervous control of adrenaline release from the head kidney of the cod, *Gadus morhua*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **55C**, 123-127.
- NISHIMURA, H., W. H. SAWYER and R. F. NIGRELLI, 1976: Renin, cortisol and plasma volume in marine teleost fishes adapted to dilute media. *J. Endocr.*, **70**, 47-59.
- 丹羽正治・北村元任・斉藤正行(編), 1966: 1章 血糖. 臨床化学分析Ⅲ, 一糖および脂質—(日本化学会編), 分析ライブラリー3, 1-24, 東京化学同人, 東京.
- NOAKS, D. L. G. and J. F. LEATHERLAND, 1977: Social dominance and interrenal cell activity in rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Pisces, Salmonidae). *Env. Biol. Fish.*, **2**(2), 131-136.
- 沼田 武, 1975: II-4. 適環境試験. 栽培漁業種苗量産技術開発事業報告書, 神水試資料(226), 26-29.
- OIDE, M. and S. UTIDA, 1967: Changes in water and ion transport in isolated intestine of the eel during salt adaptation and migration. *Mar. Biol.*, **1**, 102-106.
- OGURI, M., 1960a: Studies on the adrenal glands of teleosts-V. Experimentally induced histological alterations in the interrenal cells of fishes. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **26**, 476-480.
- OGURI, M., 1960b: Studies on the adrenal glands of teleost-VI. On the interrenal tissues of chum salmon, *Oncorhynchus keta* (WALBAUM), migrating up river to spawn. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **26**, 981-984.
- OGURI, M. and Y. OOSHIMA, 1977: Early changes in the plasma osmolality and ionic concentrations of rainbow trout and goldfish following direct transfer from fresh water to sea water. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **43**, 1253-1257.
- 奥野忠一・芳賀敏郎・久米 均・吉澤 正, 1972: 多変量解析法, 393-400, 日科技連出版社, 東京.
- 奥野忠一・芳賀敏郎・矢島敬二・奥野千恵子・橋本茂司・古川陽子, 1977: 統多変量解析法, 77-114, 日科技連出版社, 東京.
- O'NEILL, J. G., 1981: The humoral immune response of *Salmo trutta* L. and *Cyprinus carpio* L. exposed to heavy metals. *J. Fish Biol.*, **19**, 297-306.
- 大島敏明・和田 俊・小泉千秋, 1983: 養殖および天然マダいの脂質成分の比較. 昭和58年度日本水産学会春季大会講演要旨集, 198.
- OTTOLENGHI, C., C. PUVIANI, A. BARUFFALDI and L. BIGHENTI, 1982: "in vivo" effects of insulin on carbohydrate metabolism of catfish (*Ictalurus melas*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **72A**, 35-41.
- 尾崎久雄, 1968: I. 血液の生理, 魚類生理学講座I, 1-99, 緑書房, 東京.
- 尾崎久雄・菊地界善, 1972: 稀釈海水中のコイの血液水分量. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **59**(1), 27-31.

- PARENT, J. P. et F. VELLAS, 1981 : Effets de variations thermiques chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri* RICH.). Cahiers Du Laboratoire de Montereau, (11), 29-40.
- PARRY, G., 1961 : Osmotic and ionic changes in blood and muscle of migrating Salmonids. J. Exp. Biol., **38**, 411-427.
- PÄRT, P., A. KIESSLING and O. RING, 1982 : Adrenaline increases vascular resistance in perfused rainbow trout (*Salmo gairdneri* RICH.) gills. Comp. Biochem. Physiol., **72C**, r107-108.
- PASANEN, S., M. VILJANEN and E. PULKKINEN, 1979 : Stress caused by the mark-recapture method to *Coregonus albula* (L.). J. Fish Biol., **14**, 597-605.
- PATTERSON, S., I. A. JOHNSTON and G. GOLDSPIK, 1974 : The effect of starvation on the chemical composition of red and white muscles in the plaice (*Pleuronectes platessa*). Experientia, **30**(8), 892-894.
- PAYAN, P. and A. J. MATTY, 1975 : The characteristics of ammonia excretion by a perfused isolated head of trout (*Salmo gairdneri*) : Effect of temperature and CO<sub>2</sub>-free ringer. J. Comp. Physiol., **96**, 167-184.
- PERRIER, H., C. PERRIER et J. GRAS, 1971 : Etude de L'hyperglycemie adrenalinique chez la truite arc-en-ciel d'levage (*Salmo gairdneri* RICHARDSON) : Action des substances adrenolytiques. C. R. Soc. Biol., **165**, 2141-2144.
- PERRIER, H., C. PERRIER, G. PERES et J. GRAS, 1979 : Effets immediats de chocs thermiques sur la taux de certains constituants du plasma de la truite arc-en-ciel d'levage : Composes temoins du stress et fractions proteique. Rev. Can. Biol., **38**, 37-41.
- PETERS, G., H. DELVENTHAL and H. KLINGER, 1980a : Stress diagnosis for fish in intensive culture system. Symposium on new developments in the utilization of heated-effluents and of re-circulation systems for intensive aquaculture. European Inland Fisheries Advisory Commission, Norway, 28-30.
- PETERS, G., H. DELVENTHAL and H. KLINGER, 1980b : Physiological and morphological effects of social stress in the eel, (*Anguilla anguilla* L.). Arc. Fisch Wiss., **30**, (2/3), 157-180.
- PETERS, G., 1982 : The effect of stress on the stomach of the European eel, *Anguilla anguilla* L. J. Fish Biol., **21**, 497-512.
- PEYRAUD-WAITZENEGGER, M., 1979 : Simultaneous modifications of ventilation and arterial Po<sub>2</sub> by catecholamines in the eel, *Anguilla anguilla* L. Participation of  $\alpha$  and  $\beta$  effects. J. Comp. Physiol., **B**, **129**, 343-354.
- PEYRAUD-WAITZENEGGER, M., L. BARTHELEMY and C. PEYRAUD, 1980 : Cardiovascular and ventilatory effects of catecholamines in unrestrained eels (*Anguilla anguilla* L.). A study of seasonal changes in reactivity. J. Comp. Physiol., **B**, **138**, 367-375.
- PHILLIPS, J. G. and P. J. MULROW, 1959 : Corticosteroid production in vitro by the interrenal tissue of killifish, *Fundulus heteroclitus* (Linn.). Proc. Soc. Expl. Biol. Med., **101**, 262-264.
- PIC, P., N. MAYER-GOSTAN and J. MAETZ, 1974 : Branchial effects of epinephrine in the seawater-adapted mullet I. Water permeability. Am. J. Physiol., **226**(3), 698-702.
- PIC, P., N. MAYER-GOSTAN and J. MAETZ, 1975 : Branchial effects of epinephrine in the seawater-adapted mullet II. Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> extrusion. Am. J. Physiol., **228**(2), 441-447.
- PICKERING, A. D. and D. J. MACEY, 1977 : Structure, histochemistry and the effect of handling on the mucous cells of the epidermis of the char, *Salvelinus alpinus* (L.). J. Fish Biol., **10**, 505-512.
- PICKERING, A. D., 1981 : 1. Introduction : The concept of biological stress. Stress and fish (edited by A. D. Pickering), Academic Press, London, Now York, Toronto, Sydney, San Francisco.
- PICKERING, A. D., T. G. POTTINGER and P. CHRISTIE, 1982 : Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress : A time-course study. J. Fish Biol., **20**, 229-244.
- PICKFORD, G. E., A. K. SRIVASTAVA, A. M. SLICHER and P. K. T. PANG, 1974 : The stress response in the

- abundance of circulating leucocytes in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. I. The cold-shock sequence and the effects of hypophysectomy. *J. Exp. Zool.*, **177**, 89-96.
- PICUKANS, I. and B. L. UMMINGER, 1979: Comparative activities of glycogen phosphorylase and  $\alpha$ -amylase in livers of carp (*Cyprinus carpio*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **62B**, 455-457.
- POTTS, W. T. W., M. A. FOSTER, P. P. RUDY and G. P. HOWELLS, 1967: Sodium and water balance in the cichlid teleost, *Tilapia mossambica*. *J. Exp. Biol.*, **47**, 461-470.
- PROSSER, C. L., L. M. BARR, R. D. PINC and C. Y. LAUER, 1957: Acclimation of goldfish to low concentrations of oxygen. *Physiol. Zool.*, **30**, 137-141.
- PROSSER, C. L., W. MACKAY and K. KATO, 1970: Osmotic and ionic concentrations in some Alaskan fish and goldfish from different temperatures. *Physiol. Zool.*, **43**, 81-89.
- RAFFY, A., 1952: Influence des variations de la temperature sur l'osmoregulation de petites carpes en eau douce et en eau salee. *C. R. Soc. Biol.*, CXLVI, 908-910.
- RANDALL, D. J., 1962: Effect of an anesthetic on the heart and respiration of teleost fish. *Nature*, **195**, 506.
- RAPKIN, E., 1961: Hydroxide of Hyamine 10X. Packard Technical Bulletin, 1-6.
- RENAUD, J. M. and T. W. MOON, 1980: Characterization of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the American eel, *Anguilla rostrata* LeSUEUR. *J. Comp. Physiol.*, **135**, 115-125.
- RUDER, H. J., R. L. GUY and M. B. LIPSETT, 1972: A Radioimmunoassay for cortisol in plasma and urine. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **35**, 219-224.
- 坂口宏海, 1976: 絶食時におけるハマチの血液・肝すい臓の化学成分などの変化について. *日本誌*, **42** (1), 1267-1272.
- 坂口宏海・浜口 章, 1979: 養殖マダイの生理学的研究—Ⅳ. 冬期の加温飼育による緑肝症の防止と血液性状. *日本誌*, **45**, 1371-1373.
- 坂口宏海・浜口 章, 1981: 養殖マダイの絶食時における血液肝すい臓成分などを与える水温の影響. *日本誌*, **47** (1), 27-33.
- SAKAMOTO, S. and Y. YONE, 1978: Effect of starvation on hematological characteristics and the contents of chemical components and activities of enzymes in blood serum of red sea bream. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **23**, 63-69.
- SAKAMOTO, S., M. FURUICHI and Y. YONE, 1978: Effect of starvation on organ weight and chemical component of red sea bream. *J. Fac. Agr. Kyushu Univ.*, **23**, 71-77.
- SANDOR, G., P. VINSON, I. CHESTER-JONES, I. W. HENDERSON and B. J. WHITEHOUSE, 1966: Biogenesis of corticosteroids in the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J. Endocr.*, **34**, 105-115.
- SANO, T., 1962: Haematological studies of the culture fishes in Japan. 6. Variation in blood constituents of Japanese eel, *Anguilla japonica* during starvation. *J. Tokyo Univ. Fish.*, **48**, 105-109.
- SAUNDERS, R. L., 1963: Respiration of the Atlantic cod. *J. Fish. Res. Board Can.*, **20** (2), 373-386.
- SCHRECK, C. B. and H. W. LORZ, 1978: Stress responses of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) elicited by cadmium and copper and potential use of cortisol as an indicator of stress. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 1124-1129.
- SCOTT, A. L. and W. A. ROGERS, 1981: Hematological effects of prolonged sublethal hypoxia on channel catfish, *Ictalurus punctatus* (RAFINESQUE). *J. Fish Biol.*, **18**, 591-601.
- 関沢泰治, 1978: 魚類と薬物—麻醉剤を例として—. *生態化学*, **1** (1), 13-28.
- SELYE, H., 1950: Stress and the general adaptation syndrome. *Brit. Med. J.*, (June 17), 1383-1392.
- SELYE, H., 1973: The evolution of the stress concept. *American Scientist*, **61** (6), 692-699.
- 柴田宣和・衣巻豊輔・市村 博, 1974: 養殖ニジマスの血漿トリグリセリド・コレステリン・遊離脂肪酸・グルコースおよびたんぱく質含量. *東海水研報*, 第77号, 77-87.



- 示野貞夫, 1974: 魚類の炭水化物代謝に関する研究. 高知大学水産実験所研究報告, (2), 1-107.
- 新間弥一郎・市村 博・柴田宣和, 1976: 絶食によるニジマス成魚の脂質の変化. 日水誌, 42 (1), 83-89.
- SINGLEY, J. A. and W. CHAVIN, 1975: The adrenocortical-hypophyseal response to saline stress in the goldfish, *Carassius auratus* L. Comp. Biochem. Physiol., 51A, 749-756.
- SLICHER, A. M., G. E. PICKFORD and J. N. BALL, 1962: Effects of ACTH and cold shock on the white cell count of fishes. Annat. Rec., 142, 327.
- SMIT, G. L., J. HATTINGH and A. P. BURGER, 1979a: Haematological assessment of the effects of the anesthetic MS222 in natural and neutralized form in three freshwater fish species: Interspecies differences. J. Fish Biol., 15, 633-643.
- SMIT, G. L., J. HATTINGH and A. P. BURGER, 1979b: Haematological assessment of the effects of the anesthetic MS222 in natural and neutralized form in three freshwater fish species: Intraspecies differences. J. Fish Biol., 15, 645-653.
- SMIT, G. L., J. HATTINGH and A. P. BURGER, 1979c: Haematological assessment of the effects of the anesthetic MS222 in natural and neutralized form in three freshwater fish species: Haemoglobin electrophoresis, ATP levels and corpuscular fragility curve. J. Fish Biol., 15, 655-663.
- SMITH, A. C., 1976: Occult haemoglobin in fish skin mucus as an indicator of early stress. J. Fish Biol., 9, 537-341.
- SMITH, A. C. and F. RAMOS, 1980: Automated chemical analysis in fish health assessment. J. Fish Biol., 17, 445-450.
- SOIVIO, A., K. WESTMAN and K. NYHOLM, 1974: The influence of changes in oxygen tension on the haematocrit value of blood samples from asphyxic rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, 3, 395-401.
- SOIVIO, A., M. MÄLKÖNEN and O. TUURALA, 1974: Effects of asphyxia and MS222 anaesthesia on the circulation of the kidney in *Salmo gairdneri* RICHARDSON, A microscopical study. Ann. Zool. Fennici, 11, 271-275.
- SOIVIO, A. and A. OIKARI, 1976: Haematological effects of stress on a teleost, *Esox lucius* L. J. Fish Biol., 8, 397-411.
- SOIVIO, A., K. NYHOLM and M. HUHTI, 1977: Effects of anaesthesia with MS222, neutralized MS222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. J. Fish Biol., 10, 91-101.
- SOIVIO, A. and G. M. HUGHES, 1978: Circulatory changes in secondary lamellae of *Salmo gairdneri* gills in hypoxia and anaesthesia. Ann. Zool. Fennici, 15, 221-225.
- SPECKER, J. L. and C. B. SCHRECK, 1980: Stress responses to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37, 765-769.
- SPIELER, R. E., 1974: Short-term serum cortisol concentrations in goldfish (*Carassius auratus*) subjected to serial sampling and restraint. J. Fish. Res. Board Can., 31, 1240-1242.
- SRIVASTAVA, A. K. and U. AGRAWAL, 1977: Involvement of pituitary-interrenal axis and cholinergic mechanisms during the coldshock leucocyte sequence in a fresh water tropical teleost, *Colisa fasciatus*. Archives Anatomie Microscopique, 66 (2), 97-108.
- STAGG, R. M. and T. J. SHUTTLEWORTH, 1982: The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations. J. Fish Biol., 20, 491-500.
- STANLEY, J. G. and W. R. FLEMING, 1965: Sodium metabolism in *Fundulus kansae* in fresh water and during adaptation to sea water. American Zoologist, 5, 688.
- STANLEY, J. G. and P. J. COLBY, 1971: Effects of temperature on electrolyte balance and osmoregulation in the alewife (*Alosa pseudoharengus*) in fresh and sea water. Trans. Am. Fish. Soc., 100 (4), 624-638.
- STEELE, R., 1975: Influences of corticosteroids on protein and carbohydrate metabolism. Handbook of

- Physiology Section 7: Endocrinology vol. VI, Adrenal gland, 135-167, American Physiological Society, Washington.
- STEVENS, E. D., 1972: Change in body weight caused by handling and exercise in fish. J. Fish. Res. Board Can., **29**, 202-203.
- STORER, J. H., 1967: Starvation and the effects of cortisol in the goldfish (*Carassius auratus* L.). Comp. Biochem. Physiol., **20**, 939-948.
- STRANGE, R. J. and C. B. SCHRECK, 1978: Anesthetic and handling stress on survival and cortisol concentration in yearling chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). J. Fish. Res. Board Can., **35**, 345-349.
- STRANGE, E. D., 1980: Acclimation temperature influences cortisol and glucose concentrations in stressed channel catfish. Trans. Am. Fish. Soc., **109**, 298-303.
- STRIK, J. J. T. W. A., H. H. DE IONGH, J. W. A. VAN RIJN VAN ALKAMADE and T. P. WUITE, 1975: Toxicity of chromium (VI) in fish, with special refernce to organoweights, liver and plasma enzyme activities, blood parameters and histological alterations. Sublethal Effects of Toxic Chemicals on Aquatic Animals (edited by Strik), 31-41, Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York.
- SWIFT, D. J. and R. LLOYD, 1974: Changes in urine flow rate and haematocrit value of rainbow trout, *Salmo gairdneri* (RICHARDSON) exposed to hypoxia. J. Fish Biol., **6**, 379-387.
- 竹田達右・米 康夫, 1971: マダイの栄養に関する研究Ⅱ. 予備飼育で合成飼料あるいは牛肝を摂ったマダイのビタミン B<sub>6</sub> 要求量の比較. Rep. Fish. Res. Lab. Kyushu Univ, (1), 37-47.
- 武田年秋・鳥島 嘉・平島 裕, 1972: マダイの受精卵およびフ化仔魚の海上輸送について. 栽培漁業技術開発研究. 1(1), 21-23.
- 竹村 望, 1950: 淡水魚体液の Cl<sup>-</sup> イオン濃度の変化に関する研究. 大阪大学医学雑誌, **3**, 329-333.
- 竹内昌昭・塩瀬淳也・佐々木治雄・金子徳五郎・富永正雄, 1969a: 冬期における養殖コイの生化学的研究Ⅰ. 越冬飼育の経過と分析用供試魚の性状. 東海水研報, **69**, 1-17.
- 竹内昌昭・石井清之助, 1969: 冬期におけるコイの生化学的研究Ⅱ. 筋肉および肝臓の脂肪酸組成とグリコーゲン含量の変化. 東海水研報, **69**, 19-27.
- 田村 修・塩崎晴朗・藤原 清・平島 裕, 1967: 活魚輸送に関する基礎的研究Ⅰ. 麻酔剤と低温の魚類酸素消費量に及ぼす影響. 長崎大学水産学部研究報告, (2), 57-67.
- 田村 正, 1950: 外圍の変化が魚類に及ぼす影響. 水産科学研究所報告, **11** (2), 1-35.
- 田中俊次, 1965: 海産魚の陸上輸送を目的とする呼吸作用に関する基礎的研究 (予報). 昭和39年度指定研究報告書, 活魚輸送技術研究, 京都府水産試験場業績, (2), 14-20.
- TANDON, R. S. and B. D. JOSHI, 1973: Blood glucose and lactic acid levels in the freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*, following stress. Z. Tierphysiol., Tierernährg. u. Futtermittelkde., **31**, 210-216.
- TASHIMA, L. and G. F. CAHILL JR., 1964: Role of glucagon and insulin in the carbohydrate metabolism of the toadfish. Excerpta Medica, International Congress Series, **74**, 140.
- TASHIMA, L. and G. F. CAHILL JR., 1968: Effects of insulin in the toadfish, *Opsanus tau*. Gen. Comp. Endocr., **11**, 262-271.
- VAN DEN THILLART, G., F. KESBEKE and A. VAN WAARDE, 1976: Influence of anoxia on the energy metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.). Comp. Biochem. Physiol., **55A**, 329-336.
- THORPE, A. and B. W. INCE, 1974: The effects of pancreatic hormones, catecholamines and glucose loading on blood metabolites in the northern pike (*Esox lucius* L.). Gen. comp. Endocr., **23**, 29-44.
- TIRRI, R. and P. RIPATTI, 1982: Inhibitory adrenergic control of heart rate of perch (*Perca fluviatilis*) in vitro. Comp. Biochem. Physiol., **73C**, 399-401.
- TOMASSO, J. R., C. A. GOUDIE, B. A. SIMCO and K. B. DAVIS, 1980: Effects of environmental pH and

- calcium on ammonia toxicity in channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **109**, 229-234.
- TOMASSO J. R., K. B. DAVIS and N. C. PARKER, 1982: Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (RAFINESQUE), during and after oxygen depletion. *J. Fish Biol.*, **18**, 519-526.
- TROUT, D. L., E. H. ESTES, JR. and J. S. FRIEDBERG, 1960: Titration of free fatty acids of plasma: A study of current methods and a new modification. *J. Lipid Research*, **1**(3), 199-202.
- 内田清一郎, 1974: 現代動物学の課題. (日本動物学会編), **2**, 53-82, 東京大学出版会, 東京.
- ULTSCH, G. R., M. E. OTT and N. HEISLER, 1981: Acid-base and electrolyte status in carp (*Cyprinus carpio*) exposed to low environmental pH. *J. Exp. Biol.*, **93**, 65-80.
- UMMINGER, B. L., 1969a: Physiological studies on supercooled killifish I. Serum inorganic constituents in relation to osmotic and ionic regulation at subzero temperatures. *J. Exp. Zool.*, **172**, 283-302.
- UMMINGER, B. L., 1969b: Physiological studies on supercooled killifish II. Serum organic constituents and problem of supercooling. *J. Exp. Zool.*, **172**, 409-424.
- UMMINGER, B. L., 1970: Effects of subzero temperatures and trawling stress on serum osmolality in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Biol. Bull.*, **139**, 574-579.
- UMMINGER, B. L., 1971: Patterns of osmoregulation in freshwater fishes at temperature near freezing. *Physiol. Zool.*, **44**, 20-27.
- UMMINGER, B. L., 1973: Death induced by injection stress in cold-acclimated goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **45A**, 883-887.
- UMMINGER, B. L. and D. H. GIST, 1973: Effects of thermal acclimation on physiological responses to handling stress, cortisol and aldosterone injections in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **44A**, 967-977.
- UMMINGER, B. L. and D. BENZIGER, 1975: In vitro stimulation of hepatic glycogen phosphorylase activity by epinephrine and glucagon in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus*. *Gen. Comp. Endocr.*, **25**, 96-104.
- UMMINGER, B. L., D. BENZIGER and S. LEVY, 1975: In vitro stimulation of hepatic glycogen phosphorylase activity by epinephrine and glucagon in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **51C**, 111-115.
- VERNIER, J. M. et M. F. SIRE, 1978a: Etude "in vitro" de la glycogene phosphorylase hepatique de la truite arc-en-ciel, son controle par le glucose, les corticoides, l'adrenaline et le glucagon. *Gen. Comp. Endocr.*, **34**, 360-369.
- VERNIER, J. M. et M. F. SIRE, 1978b: Etude "in vitro" des effets de l'adrenaline, des glucocorticoides et du jeune sur les activites de la glycogene phosphorylase, de la glucose-6-phosphatase et sur la teneur en glycogene du foie de la truite arc-en-ciel. *Gen. Comp. Endocr.*, **34**, 370-376.
- DE VLAMING, V. L. and R. J. PARDO, 1975: In vitro effects of insulin on liver lipid and carbohydrate metabolism in the teleost *Notemigonus crysoleucas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **51B**, 489-497.
- WAHLQVIST, I., 1980: Effects of catecholamines on isolated systemic and branchial vascular beds of the cod, *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol.*, **137**, 139-143.
- WAIWOOD, K. G., 1980: Changes in haematocrit of rainbow trout exposed to various combinations of water hardness, pH and copper. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **109**, 461-463.
- WALKER, R. M. and P. H. JOHANSEN, 1977: Anaerobic metabolism in goldfish (*Carassius auratus*). *Can. J. Zool.*, **55**(8), 1304-1311.
- WALTON, M. J. and C. B. COWEY, 1979a: Gluconeogenesis by isolated hepatocytes from rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **62B**, 75-79.
- WALTON, M. J. and C. B. COWEY, 1979b: Gluconeogenesis from serine in rainbow trout, *Salmo gairdneri* liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, **62B**, 497-499.
- WARDLE, C. S., 1972: The changes in blood glucose in *Pleuronectes platessa* following capture from the

- wild: A stress reaction. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, **52**, 635-651.
- WARDLE, C. S., 1978: Non-release of lactic acid from anaerobic swimming muscle of plaice, *Pleuronectes platessa* L.: A stress reaction. *J. Exp. Biol.*, **77**, 141-155.
- WEBER, R. E., S. C. WOOD and B. J. DAVIS, 1979: Acclimation to hypoxic water in facultative air-breathing fish: Blood oxygen affinity and allosteric effectors. *Comp. Biochem. Physiol.*, **62A**, 125-129.
- WEDEMEYER, G., 1970: Stress of anaesthesia with MS222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **27**, 909-914.
- WEDEMEYER, G., 1971: The stress of formalin treatment in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **28**, 1899-1904.
- WEDEMEYER, G., 1972: Some physiological consequences of handling stress in the juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **29**, 1780-1783.
- WEDEMEYER, G., 1973: Some physiological aspects of sublethal heat stress in the juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **30**, 831-834.
- WEDEMEYER, G. A., 1976: Physiological response of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish culture. *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 2699-2702.
- WEDEMEYER, G. A. and W. T. YASUTAKE, 1977: Clinical methods for the assessment of the effects of environmental stress on fish health. *Technical Papers of the U. S. Fish and Wildlife Service*, **89**, 1-19.
- WEDEMEYER, G. A., R. L. SAUNDERS and W. C. CLARK, 1980: Environmental factors affecting smoltification and early marine survival of anadromous salmonids. *Marine Fisheries Review*, **42**, 1-14.
- WEDEMEYER, G. A. and D. J. MCLEAY, 1981: Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. *Stress and Fish* (ed. A. D. Pickering), 247-275, Academic Press, London.
- WITTENBERGER, C. and I. V. DIACIUC, 1965: Effort metabolism of lateral muscles in carp. *J. Fish. Res. Board Can.*, **22**(6), 1397-1406.
- WITTENBERGER, C., 1968: Alterations of the carbohydrate metabolism in trout, induced by effort and hypoxia. *Rev. Roum. Biol.,-Zoologie, Tome.*, **13**(2), 131-137.
- WITTENBERGER, C., 1972: The glycogen turnover rate in mackerel muscles. *Mar. Biol.*, **16**, 279-280.
- WITTENBERGER, C., D. COPREAN and L. MORAR, 1975: Studies on the carbohydrate metabolism of the lateral muscles in carp (Influence of phloridzin, insulin and adrenaline). *J. Comp. Physiol.*, **101**, 161-172.
- Woo, N. Y. S. and S. I. CHEUNG, 1980: Metabolic effects of starvation in the snakehead, *Ophiocephalus maculatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **67A**, 623-627.
- Woo, N. Y. S. and A. C. Y. FUNG, 1980: Studies on the biology of the red sea bream, *Chrysophrys major*, I. Temperature tolerance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **3**, 121-124.
- Woo, N. Y. S. and A. C. Y. FUNG, 1981: Studies on the biology of the red sea bream, *Chrysophrys major* II. Salinity adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.*, **69A**, 237-242.
- Woo, N. Y. S. and J. C. MURAT, 1981: Studies on the biology of the red sea bream, *Chrysophrys major* III. Metabolic response to starvation in different salinities. *Mar. Biol.*, **61**, 255-260.
- WOOD, S. C. and K. JOHANSEN, 1972: Adaptation to hypoxia by increased HbO<sub>2</sub> affinity and decreased red cell ATP concentration. *Nature New Biology*, **237**, 278-279.
- 山口正男, 1978: タイ養殖の基礎と実際. 247-250, 恒星社厚生閣, 東京.
- YAMAMOTO, K., Y. ITAZAWA and H. KOBAYASHI, 1980: Supply of erythrocytes into the circulating blood from the spleen of exercised fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, **65A**, 5-11.

- 山下秀夫, 1967: カサゴの血液学的研究—I. 環境水の塩素量と血液水分量, 比重, 血清蛋白量および赤血球数との相互関係, 日本誌, 33(2), 81-90.
- YAMASHITA, H., 1970: Blood characteristics of marine fish in relation to the change of osmotic pressure of sea water-II. Change of osmotic pressure of serum and the electrophoretic pattern of the serum protein of young yellowtail. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 36(5), 450-454.
- 米 康夫・古市政幸・四反田勝久, 1971 a : マダイのビタミン要求に関する研究—I. イノシトール要求と餌料中グルコース量との関係. 日本誌, 37, 149-155.
- 米 康夫・古市政幸・酒本秀一, 1971 b : マダイの栄養に関する研究—III. 各種油脂の栄養価と至適脂肪量. Rep. Fish. Res. Lab., Kyushu Univ., (1), 49-60.
- YONE, Y. and M. FUJII, 1975a: Studies on nutrition of red sea bream-XI. Effect of  $\omega_3$  fatty acid supplement in a corn oil diet on growth ratio and feed efficiency. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 41, 73-77.
- YONE, Y. and M. FUJII, 1975b: Studies on nutrition of red sea bream-XII. Effect of  $\omega_3$  fatty acid supplement in a corn oil diet on fatty acid composition of fish. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 41, 79-86.
- ZEITOUN, I. H., L. D. HUGHES and D. E. ULLREY, 1977: Effect of shock exposures of chlorine on the plasma electrolyte concentrations of adult rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Fish. Res. Board Can., 34, 1034-1039.