

サケ稚魚の種苗性を判断する簡便な方法の開発

小山 達也

キーワード：サケ稚魚、種苗性、i-STAT、血中ナトリウム量、グルコース量

1. はじめに

北海道の秋サケ資源は人工ふ化放流事業によって支えられていますが、近年の秋サケ来遊量は4,000万尾前後と低迷し、かつ、海区間の格差が大きくなっています。こうした状況に対し放流後の沿岸環境等の影響について調査研究が行われていますが、各ふ化場から放流される稚魚の「種苗性」も回帰率を左右する重要な要素と考えられます。

ここで、「種苗性」という言葉について解説します。一般に、水産増殖を目的として種苗放流を行う場合、質の高い種苗を放流することが重要です。ウナギの研究で有名な塚本勝巳先生（東京大学名誉教授・日本大学教授）は著書の中で種苗性について次のように記しています。「種苗性とは放流種苗としての“適性”である。具体的には放流効果に直接影響を及ぼす形態的・生理的・生態的諸特性によって評価される」。

サケの回帰率を評価する際にもしばしばその種苗性が論議されています。しかし、全道のたくさんのふ化場から毎年放流されているサケ稚魚に対し行われている種苗性の評価は、放流前に海水（塩分33%）の入った水槽に稚魚数十尾を投入して、48時間以内の生残率を調べる試験が行われている程度です。この試験は海水適応能が著しく低下した稚魚を検出するには有効ですが、サケ稚魚の種苗としての質の良し悪しを評価するにはもっと感度のよい評価基準が望まれます。

一方、最近のサケの種苗性の研究では、体全体

のATP量を測定することが有効だと分かってきました。ATPとはアデノシン三リン酸のことで、「生体のエネルギー通貨」とも言われ、生物に必要なエネルギーの供給源です。これまでの研究により、健康な稚魚では体全体ATP量が10~100 pmol/g 体重の範囲にあり、池で過密になったり、飼育水の溶存酸素が低くなるなど悪条件下で飼育された稚魚ではこの範囲から外れることがわかっています（水野2013）。この指標は有効ですが、測定にはサンプルとする稚魚を急速超冷凍する必要があり、測定時の検体の取り扱いや薬品の調合等の操作に熟練した技術が不可欠です。

そこで、もっと手軽にサケ稚魚の種苗性を評価できる方法はないかと考え、評価手法の実験を試みてきました。それらについてご紹介いたします。

2. 稚魚の行動とATP値は合致していなかった

最初に、池を泳いでいるサケ稚魚の動きを観察し、各個体の俊敏性、集群性、給餌に対する反応等を総合的に捉えて稚魚の健康度を判断しました。客観的とは言い難い基準ですが、健康度が低下した稚魚は見るからに動きが鈍く、人が近づいても逃げようとしなないといったことさえあります。

道内のふ化場のいくつかに出向いて、それらサケ稚魚の行動に基づいて「良い、普通、悪い」と三段階に分けて判断してみました。同時に、池からサンプリングした稚魚の体全体ATP量を測定し、両者を照らし合わせてみました（表1）。前述のと

表1 各心化場で観察した良否とATP量の数値

観察した 良否	心化場	体全体ATP量(pmol/g体重)	
		平均値	標準偏差
普通 と判断	D	6.2	1.13
	A	9.6	1.72
	N	11.5	3.31
	G	12.0	3.01
	P	17.7	5.33
	I	20.9	4.42
	B	23.4	5.67
	O	26.1	6.45
	K	39.8	10.11
	F	84.5	43.30
良い と判断	L	9.0	2.14
	R	11.6	3.14
	M	15.3	3.70
	C	18.7	5.24
	H	35.2	10.51
悪い と判断	E	10.7	1.97
	Q	36.0	9.82
	J	48.2	12.98

おり、体全体ATP量の健康基準値は10~100pmol/g体重の値が適正とされています。

表1に示したように、必ずしも観察した稚魚の行動とATPの測定値は合致しませんでした。稚魚の泳ぎが俊敏でないと判断された稚魚でありながらATP値では問題が無かったり、また、その逆に活発に群れをなして泳いでいる稚魚にもかかわらずATP値が低かったという例がみられました。種苗性を判断する材料として、こうした稚魚の行動から何らかのカギを得られないかと探ったのですが、どうもこうした行動の記録といった点からのアプローチは難しいようです。

3. 血液分析機器「i-STAT」の活用を検討

次に、池での遊泳行動等の見た目での評価基準でなく、生理的な項目の数値で種苗性を客観的に判断していただくことを検討してみました。生理的な項目には体全体ATP量を始め様々な指標が考えられますが、先ほども述べましたが、簡便に測定が可能で、結果をいち早く得ることができる評価方

法を検討してみました。

話は水産研究からそれますが、医療・臨床現場では即時に患者さんに対応するために迅速で正確な必要検査項目の測定が求められます。したがって、そうした現場で用いられている機器は即座に測定でき、操作が容易、しかも、軽量で場所を取らずにコンパクトという点が要求されます。これらに加え最近では新生児や乳児にも対応するため、測定に必要とする検体量が微量でも可能といった便利な機器が使用されています。

こうした機器のひとつとして「i-STAT」(扶桑薬品工業株式会社)という血液分析測定機器があります。この機器はアメリカ合衆国で獣医学部の先生により開発されましたが、現在、医療機器のひとつとして多くの病院でも使用されています。測定項目によりそれぞれ使用する専用のカートリッジがあり、検体を注入したカートリッジをi-STATにセットして目的とする成分、項目を瞬時に測定することができます。最近では手軽に持ち運びが可能なことから診療施設以外の在宅医療現場、または震災災害時の現場などでの有効性も強調されているところです。本機は北海道内で200台以上が使用されているそうですが、医療分野、畜産分野別の稼働状況は半々の割合とのこと。サケ稚魚を対象とした活用事例はありませんでしたが、ここでは稚魚の種苗性の評価にこの機器の活用を検討してみました。

4. i-STATを使うにあたっての工夫

このようにi-STATという血液分析機器の使用を考えたわけですが、サケ稚魚で用いるには一工夫する必要がありました。その理由は、対象とするサケ稚魚が小さく一尾から十分な量の血液が採取できないことでした。測定するのに必要な血液の検体量は65 μ lです。実際のところは60 μ lでも測定



図1 採血、血液分析に係る器具

可能なのですが、放流直前のサケ稚魚で最も小さなサイズは0.8グラム程、このサイズのサケ稚魚から採取できる血液量は6～8 μ lで1個体のみからの採血量では必要量を確保するのは不可能です。そこで数尾の血液をプールしたり、採血した血液を遠心分離して上澄み液である血漿成分を検体としたり、希釈液を用いるなどの工夫をすることで必要量の60 μ lを確保しました。

現在行っている操作過程の様子を図1に示し、具体的な手順を以下に記します。

- ・ 1検体につき4尾の稚魚を用意する。
- ・ 尾柄部を切断しヘマトクリット毛細管で6～8 μ l以上（管の長さで6～8mm）採血する。

- ・ この毛細管を3000rpmで15分間遠心分離する。
- ・ 遠心分離後の毛細管から血漿をマイクロピペットで3 μ l取り出し、マイクロチューブ等に4尾分をプールする。
- ・ 4尾分プールした12 μ lの血漿に希釈液を48 μ l混合し、総量で60 μ lにする。

5. どういった状況の血液を分析するのか

i-STATではナトリウム、カリウム、クロールの各種電解質、その他にグルコースを同時に測定出来ます。このうち、血中ナトリウム量は以前からサケ・マス類の幼魚の海水適応能の評価に用いられています。海水中でサケ稚魚は体内の水分が体外へ流出するのを海水を飲むことにより補い、併せて、入ってきた塩類を鰓から排出することにより、血中ナトリウム量を一定に保つといった浸透圧調節が働きます。海水適応能が低い稚魚はこの浸透圧調節が働かず血中ナトリウム量が高くなることから、海水に入れた後の数値は種苗性を判断する指標になるのです。いままで、液体中の微量な物質の測定にはメンテナンスを適切に施した原子吸光度計という専門的な測定機器とそれを扱う熟練した技術が必要でしたが、i-STATを用いることで簡単かつ迅速に測定することが期待できます。また、一般的な海水の塩分濃度は33～34%ですが、その塩分の海水に投入した場合には血中ナトリウム量に明瞭な違いが出ないことが多いため、通常の海水より塩分が高い海水（42%）に投入することによる強度の負荷試験での血中ナトリウム量も測定してみました。

また、グルコース量はストレスにより増加することが知られています。海水に入れた時に稚魚が苦痛を感じたならばグルコース量の上昇も観察されるかもしれません。そこで、これらの観点でi-STATによる血液分析を行いました。

6. 各ふ化場で数値測定してみた結果

道内の約20か所のふ化場で飼育中のサケ稚魚をサンプリングし、種苗性を評価するため前述の海水適応能に係る血液分析実験を行いました。実験の概要ですが、先ほども述べたように通常の海水の塩分である33%海水とそれよりも高塩分の42%海水の二つの試験区と、これに対する淡水の対照区を設けました。これら3種類の淡水、海水を15~18ℓ入れたバケツにエアレーションを施し24尾から36尾のサケ稚魚を投入し24時間後に採血しました。

投入24時間後の斃死状況(表2)をみてみると、33%海水では斃死はほとんどみられず、二か所のふ化場で数尾が斃死したのみでした。42%海水では約半数のふ化場で斃死がみられ、その斃死数は数尾のふ化場が殆どでしたが、ただ一か所のふ化場では全数が死に至りました。

次に、i-STATで測定した血中ナトリウム量の数値をみると、淡水、各海水濃度にかかわらず140mmol/L前後の値で殆ど変化しないふ化場、海水の濃度により徐々に上昇するふ化場、また、急激に上昇して42%海水では170mmol/Lを超えるふ化場がありました(図2)。唯一42%で全数斃死したふ化場では33%海水で既に170mmol/Lを超えました。また、淡水での血中ナトリウム量を見てみると、140mmol/L前後を示すふ化場が大多数でしたが、中には130mmol/L前後と低い値を示すふ化場も見られ、これらふ化場の多くでは42%海水で血中ナトリウム量が高い値を示しました。

同時に測定したグルコース量は(図3)、淡水中では多くのふ化場で60mg

表2 海水適応能試験における斃死数

ふ化場	塩分濃度		
	淡水	33%	42%
A	0/24	0/24	1/24
B	0/37	0/37	0/36
C	0/27	0/26	0/27
D	0/30	0/30	3/30
E	0/28	0/31	0/30
F	0/24	0/24	0/24
G	0/24	0/24	0/24
H	0/30	0/30	0/30
I	0/35	0/31	0/30
J	0/30	0/30	0/30
K	0/31	0/30	3/30
L	0/24	2/24	25/25
M	0/24	0/25	0/24
N	0/24	0/24	3/24
O	0/30	0/30	0/32
P	0/31	0/30	11/30
Q	0/31	1/30	1/30
R	0/30	0/31	6/30

(斃死数/供給尾数)

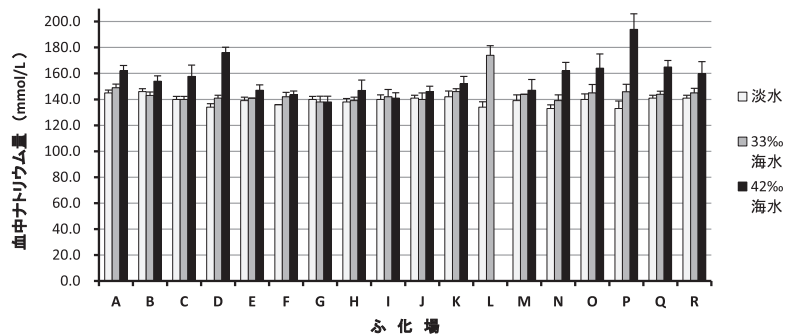


図2 各ふ化場における各海水濃度の血中ナトリウム量

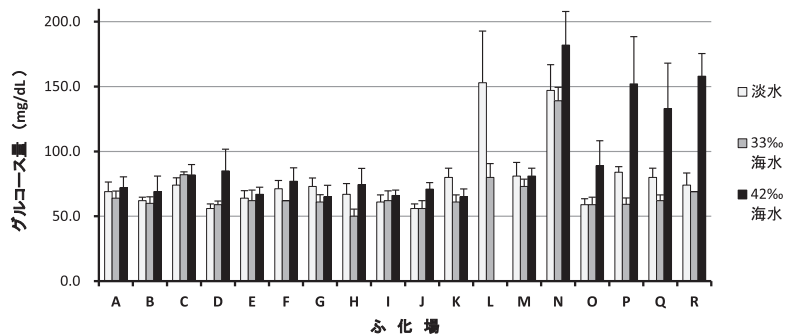


図3 各ふ化場における各海水濃度のグルコース量

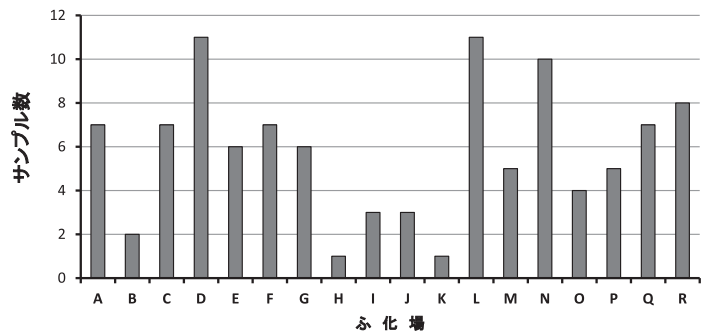


図4 各ふ化場でATP量が8~200pmol/g体重から外れたサンプル数

/dL 前後から80mg/dL の値でしたが、中には100mg/dL を遙かに超える値のふ化場も見られました。33%海水での値は淡水と比較すると同値か若干低下する値を示すところが大部分でした。このことは通常の海水中ではストレスを殆ど受けず淡水よりも代謝が促されることを意味しているのかもしれませんが。42%海水では淡水、33%海水よりも高い値を示し、中にはその上昇が急激で100mg/dL を超えるふ化場もいくつか見られました。

いままで、塩分33%の海水による適応能試験の生残率が唯一の種苗性の目安となっていました。今回の調査から一般的な塩分の海水よりも更に高塩分の海水を用いた負荷試験のほうがよりの確に判断できる事が分かりました。

7. i-STAT 測定値と ATP 値の比較対比

今回、稚魚の体全体 ATP 量は各ふ化場において15個体をサンプリングし測定に供しましたが、その内の8~200pmol/g 体重を外れたサンプル数について図4に示しました。これら結果を先のi-STATで測定した血中ナトリウム量、グルコース量の値と比較すると血中ナトリウム量が高い値を示したふ化場(図2のD,L,P)、または、グルコース量が高い値を示したふ化場(図3のL,N)はATP値が8~200pmol/g 体重を外れた個体数が多いふ化場と大方呼応することが分かりました。すなわち、i-STATによる血液分析測定値を指標にして種苗性を判断できる可能性が示されました。

8. おわりに

増殖事業現場では健康な稚魚を放流したいというのが飼育担当者の誰もが望んでいることでしょう。サケ稚魚は身体の具合悪さを訴えることが出

来ません。健康に不安を憶えるサケ稚魚のそうしたシグナルをいち早く感じ取ることが出来れば良いのですが、行動面だけからそれを把握するのが難しい場合もあります。人間でさえ定期的な健康診断を行うことによる早期発見、早期治療が推奨されているところです。

さて、本報告ではi-STATという便利な医療機器を利用することでサケ稚魚の血液性状を把握した上でその種苗性を判断する可能性について紹介しました。このほかにも最近では安価な測定機器もあり、その一つとして血糖値(グルコース量)を測る簡易測定器はかなりの機種が出回っています。種苗性を把握する一つの手段にこうした機器の利用も切り口になる可能性があり現在、その検討も進めているところです。

客観的に種苗性を判断する項目を見いだすこと、そして、その項目を測定する機器として最近の簡易な医療機器を利用すること、この二つの両輪がかみ合うことでサケ稚魚の種苗性把握、引いてはサケの回帰率向上に上手くつながればと考え、今も研究を続けているところです。

参考文献

- 水野伸也(2013)健康な種苗をそだてるために。
「サケ学大全」(帰山雅秀・永田光博・中川大介編)、北海道大学出版会、札幌、169-172。
塚本勝巳(1993)種苗の質。「放流魚の健苗性と育成技術」(水産学シリーズ93)、恒星社厚生閣、102-113。

(こやまたつや さけます内水試さけます資源部
報文番号 B2400)