

ニジマス血中ナトリウム濃度に及ぼす酸性環境水のpH依存的効果

誌名	養殖研究所研究報告 = Bulletin of National Research Institute of Aquaculture
ISSN	03895858
著者名	矢田,崇 東,照雄 北村,章二 生田,和正
発行元	水産庁養殖研究所
巻/号	29号
巻号補足	
掲載ページ	p. 217-224
発行年月	2000年3月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



ニジマス血中ナトリウム濃度に及ぼす 酸性環境水の pH 依存的効果

矢田 崇・東 照雄・北村章二・生田和正

(2000 年 1 月 12 日 受理)

Dose-depending Effect of Exposure to Acidic Water on Plasma Sodium Levels in Rainbow Trout

Takashi Yada*, Teruo Azuma*, Shoji Kitamura*, and Kazumasa Ikuta*

To know the appropriate parameter for physiological condition of the fish exposed to acidic water, plasma sodium levels, gill Na^+ , K^+ -ATPase activity, plasma cortisol levels, and plasma immunoglobulin M (IgM) levels were examined in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Exposure to acidic water decreased plasma sodium levels of the trout in dose-depending manner, and Na^+ , K^+ -ATPase activity showed a transient increase only at pH 4.0. Regression analysis showed a significant positive relationship between environmental pH and plasma sodium levels. At pH 4.5, there was a decrease in plasma sodium and an increase in plasma cortisol levels, while plasma IgM levels did not show significant change. These results suggest that plasma sodium level is usable as a parameter to know physiological condition of fish which was exposed to acidic water.

Key words : acid water, trout, Na^+ , K^+ -ATPase, sodium, cortisol, immunoglobulin

緒 言

酸性雨による河川・湖沼の酸性化、水産増養殖に対して直接影響を与えることが懸念される。北欧・北米では 30 年ほど前から酸性雨の影響が顕在化し、特にサケ科魚類の資源が激減する大きな被害を与えた。我が国では土壌の緩衝能がこれらの国々に比して高いことから、酸性雨による被害はそれほど顕著ではないとされる。しかしながら pH 4 前後の酸性度の強い降雨は、現在各地でごく普通に観測されるようになり、将来深刻な被害が現れる可能性がある。酸性雨の状況を的確に把握し被害を最小限とするため、環境水酸性化が生物に与える影響を解析し、生物自身を指標とする評価手法の開発が必要とされる。

サケ科魚類の放流適期を判定するための手法として、海水移行後の血中ナトリウム濃度を指標とした海水への適応能の評価が用いられている (Clarke and Blackburn, 1977)。環境水の酸性化は、様々な魚類で血中ナトリウム濃度を低下させることが知られている (Fromm 1980, Wood

*養殖研究所日光支所 (Nikko Branch, National Research Institute of Aquaculture, Nikko, Tochigi 321-1661, Japan)

1989)。また近年コイ (*Cyprinus carpio*) において、環境水酸性化がストレスホルモンであるコルチゾルの分泌を刺激し、これにより免疫機能が抑制される可能性が報告されている (長江ら 1998)。本研究では環境水酸性化がサケ科魚類に与える生理学的影響について、血中ナトリウム濃度を指標として評価できるかを、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) を用いて検討した。併せてサケ科魚類における、環境水酸性化とコルチゾル分泌及び免疫機能との関連についても検討した。

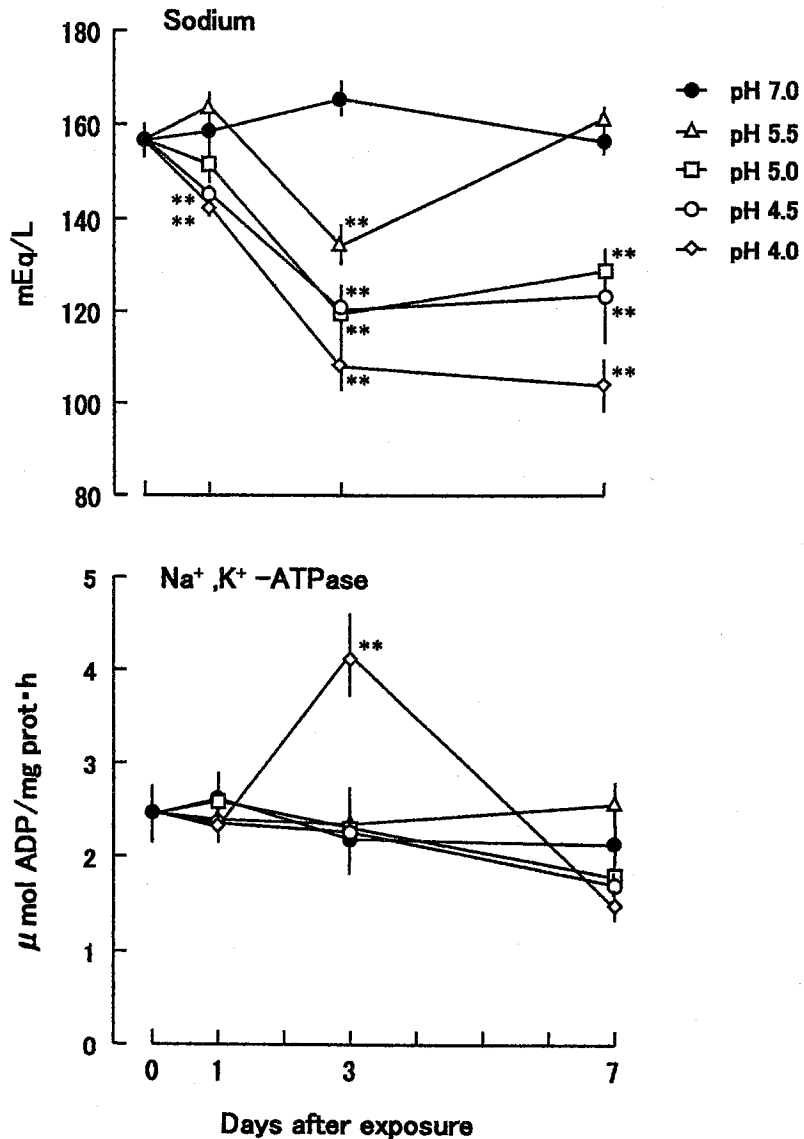


図1. 様々な pH の環境水に移行したニジマスの血中ナトリウム濃度及び鰓 Na⁺, K⁺-ATPase 活性の経時変化。図形と誤差線は、平均値±標準誤差を表す (n=4-10)。アスタリスク (**) は pH 7.0 との間の有意差を示す (P<0.01)。

材料と方法

ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) は体重 10-20 g, 日光支所屋外池で継代飼育されているものを用いた。飼育水は通年約 10℃の湧水を用い, 市販の配合飼料 (Oriental) を与えた。実験に際して, 魚は屋外池と同じ湧水を供給している屋内実験水槽に移した。飼育水のナトリウム濃度は 445 μM , カルシウム濃度は 214 μM , マグネシウム濃度は 9.0 μM , カリウム濃度は 28.7 μM , 塩素濃度は 0.09 μM , 硬度は 2.4 mg CaCO_3/L , アルカリ度は 1.10 me/L であった。実験水槽の pH は, 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液を滴下するペリスタポンプ (AC-2110, Atto) と接続した, pH コントローラ (NPH-6800, Atto) によって調節した。

環境水が血中ナトリウム濃度に与える pH 依存的影響を調べるため, pH を低下させる前 (0 日目) 及び 1, 3, 7 日後にサンプリングを行った。血液は背大動脈より Hasegawa *et al.* (1987) の方法で採取し, 直ちに 3000 g の遠心によって血漿を分離, 測定に供するまで -80℃ で凍結保存した。鰓は採血後速やかに切り出し, 100 μl の水で冷やしたショ糖-EDTA-イミダゾール溶液 (150 mM ショ糖, 10 mM EDTA, 50 mM イミダゾール, pH 7.3) に入れ 30 分以内に凍結し, 測定に供するまで -80℃ で凍結保存した。血中ナトリウム濃度は, 原子吸光光度計 (180-50, Hitachi) により測定した。血中コルチゾル濃度は, Yamada *et al.* (1996) の時間分解酵素抗体法 (TR-FIA) によって測定した。血中免疫グロブリン M (IgM) 濃度は, Nagae *et al.* (1993) の酵素抗体法 (ELISA) によって測定した。鰓の Na^+ , K^+ -ATPase 活性は, McCormick (1993) の方法により測定した。

2 群間の統計学上の有意差は, 分散分析 (ANOVA) の後, Duncan の多重範囲検定または Mann-Whitney の *U* 検定により判定した。有意差の検定及び環境水 pH-血中ナトリウム濃度間の一次相関係数の計算は, コンピュータプログラム (STATISTICA, Design Technologies) を用いて行った。

結 果

酸性環境水に移行後の, 血中ナトリウム濃度と鰓 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の経時変化を図 1 に示す。pH 5.5 に移行した群において, 血中ナトリウム濃度は 3 日目に一度低下した後, 7 日目には pH 7.0 の対照群のレベルまで回復した。より低い pH に移行した群では, 血中ナトリウム濃度は実験期間中有意に低下したままであり, pH 7.0 の対照群のレベルまで回復することはなかった。鰓 Na^+ , K^+ -ATPase 活性は, pH 4.0 に移行した群において 3 日目に有意な上昇がみられたが, 7 日目には対照群のレベルまで低下した。他の群では実験期間中, 鰓 Na^+ , K^+ -ATPase 活性に有意な変化はみられなかった。

酸性環境水移行の 1, 3, 7 日後, それぞれにおいての血中ナトリウム濃度と環境水 pH との相関関係を図 2 に示した。どの場合も両者の相関は有意であり ($P < 0.01$), それぞれの相関係数は 0.53, 0.88, 0.69 であった。

図 3 は, pH 4.5 の環境水へ移行後の血中ナトリウム, コルチゾル, IgM 濃度の経時変化を表した。血中ナトリウム濃度は連続した低下を示し, 反対にコルチゾル濃度は連続した上昇を示した。一方で血中 IgM 濃度は, 実験期間を通して有意な変化を示さなかった。

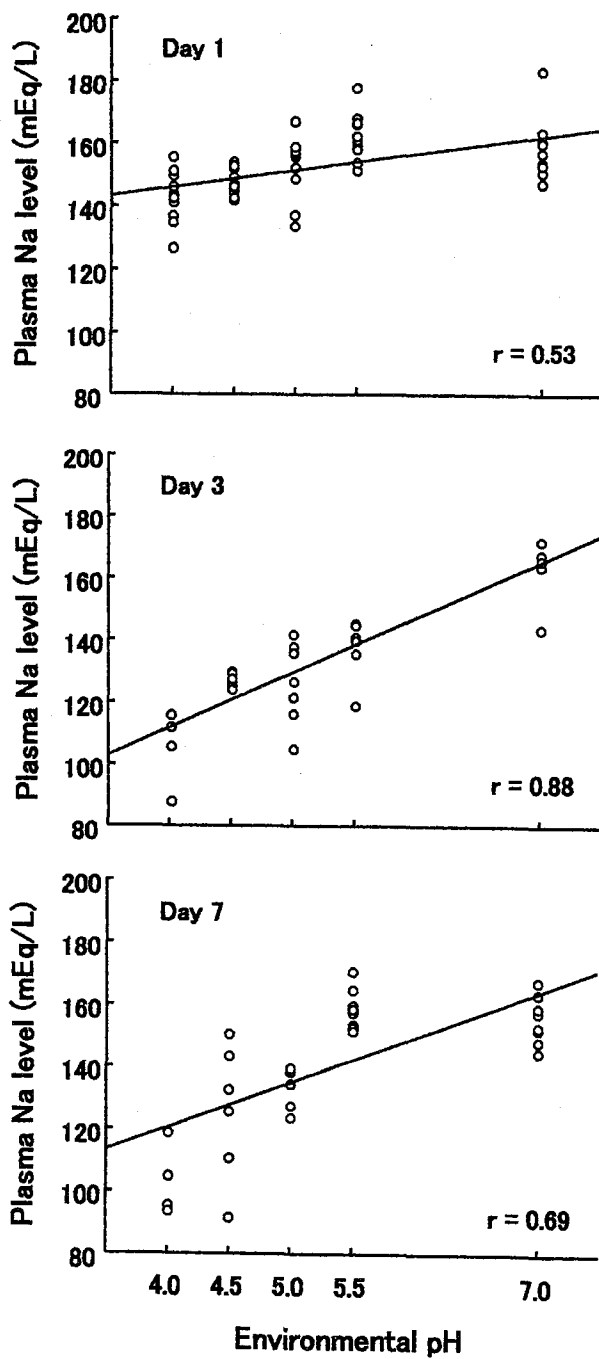


図2. 環境水 pH と血中ナトリウム濃度の相関を示す散布図, 及び回帰直線。

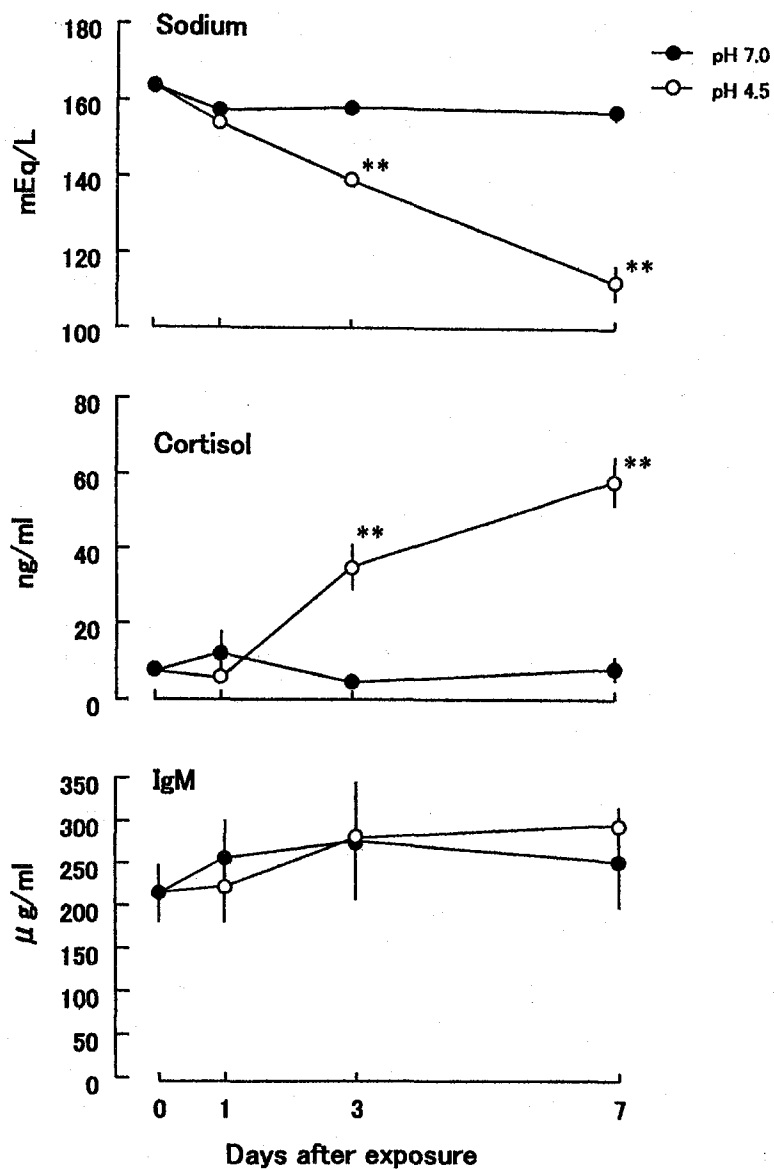


図3. pH 4.5 の環境水に移行後の血中ナトリウム、コルチゾル、及び IgM 濃度の経時変化。図形と誤差線は、平均値±標準誤差を表す (n = 5-6)。アスタリスク (**) は pH 7.0 との間の有意差を示す ($P < 0.01$)。

考 察

本研究ではサケ科魚類において、血中のナトリウム濃度と環境水の pH との間に強い相関関係が示された。魚類の環境水酸性化への耐性には、種による差 (Brown and Sadler 1989, Turnpenny 1989, 生田ら 1993, Yada and Ito 1996) 及び性別による差 (Yada and Ito 1997) が知られている。一方、環境水酸性化に対する魚類の生理学的反応には、共通点がみられる。最初に主に鰓からのナトリウム流失の増大が観察され、その結果として体液浸透圧を維持できなくなることが、環境水酸性化による魚類の弊死の原因となると考えられている (Fromm 1980, Turnpenny 1989, Wood 1989, 岩田ら 1990)。酸性環境水中での血中ナトリウム濃度の維持には鰓 Na^+ , K^+ -ATPase の活性が重要であり (Saunders *et al.* 1983), その活性が上昇することの有無が酸性環境への耐性に関連するとされた (McKeown *et al.* 1985)。しかしながら本研究で鰓 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の上昇がみられたのは、もっとも pH の低い環境水に移行された pH 4.0 の群においてのみであり、他の群では有意な変化は観察されなかった。この pH 4.0 の群では血中ナトリウム濃度の回復傾向がみられなかったこと、逆に明らかな回復を示した pH 5.5 の群ではその活性に変化がみられなかったことから、鰓 Na^+ , K^+ -ATPase を酸性耐性の指標または生理学的影響の指標とすることは、困難と考えられる。鰓 Na^+ , K^+ -ATPase が外界からナトリウムイオンの体内への取り込みを行うことから、血中ナトリウム濃度の維持に重要な役割を果たすことは間違いない。一方これまでの研究では、酸性環境水への移行後に観察された鰓 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の上昇が、必ずしも体液ナトリウム濃度の維持とは一致しないことを、ティラピア (*Oreochromis niloticus*, *O. mossambicus*) 及びメダカ (*Oryzias latipes*) において報告した (Yada and Ito 1996, 1997)。今回観察された鰓 Na^+ , K^+ -ATPase 活性の上昇も、血中ナトリウム濃度低下に対する積極的反応であるよりも、ストレスによる一過的な反応であることが示唆される。

魚類におけるストレス反応は、哺乳類における副腎皮質ホルモンに相当する、コルチゾルの血中濃度測定による評価が一般に行われる (Barton 1997)。今回の結果でも血中コルチゾル濃度は pH 4.5 の環境水への移行により継続した上昇を示し、酸性環境水は強いストレスであることが示された。魚類へのコルチゾルの投与は、鰓 Na^+ , K^+ -ATPase 活性を上昇させる効果を持つことから、その分泌昂進は新しい環境に適応するための積極的反応であると考えられる (de Renzis and Bornancin 1984, Zadunaisky 1984)。一方サケ科魚類においても、血中免疫グロブリン濃度が内分泌系による調節を受けていることが明らかになっており (Balm 1997, Yada *et al.* 1999), コルチゾルは免疫機能に対して抑制的に働くことが知られている (Nagae *et al.* 1994)。またコイ (*Cyprinus carpio*) においては、酸性環境への移行に伴うコルチゾルの分泌昂進が、血中免疫グロブリン濃度の低下と関連することが報告されている (長江ら 1998)。しかしながらコイの免疫機能において、血中免疫グロブリン濃度の低下以外には pH 低下の影響はみられない。また今回の結果で、ニジマスにおいては血中免疫グロブリン濃度にも変化がみられなかったことから、免疫機能の低下を環境水酸性化による生理学的影響の指標とすることは困難と考えられる。本研究では、環境水酸性化による血中コルチゾル濃度の継続した上昇が認められた。しかしながら血中コルチゾル濃度は、魚の移動・取り上げ・麻酔等にも反応し数分で上昇してしまうため (Sumpter 1997), ストレスの指標とすることは可能であるが、酸性環境のみの影響を計る指標としては適用し難いと考えられる。

サケ科魚類の放流通期判定では、海水移行 24 時間後の血中ナトリウム濃度を指標とした評価が

用いられている (Clarke and Blackburn, 1977)。本研究において血中ナトリウム濃度は、より低い pH の環境水では 1 日目から有意な低下を示したが、すべての実験群で顕著な低下を示したのは 3 日目であった。血中ナトリウム濃度と環境水 pH との相関は、酸性環境水への移行後 1, 3, 7 日目のいずれの場合も有意であったが、相関係数がもっとも高くなったのは 3 日目であった。7 日後に相関係数が低下した原因としては、pH 5.5 に移行した群での血中ナトリウム濃度が回復したことが挙げられる。従って本研究の場合、酸性耐性の評価には少なくとも 3 日より長い期間の酸性環境水曝露が必要であった。

魚類に対する環境水酸性化による影響の指標として、これまでは半数致死濃度が広く用いられてきた。しかしながら半数致死濃度試験では酸性耐性の評価はできるが、既に酸性雨の影響を受けている可能性がある場所で採集した魚において、生理状態を解析するための指標として用いることはできない。一方本研究の結果から、血中ナトリウム濃度は環境水 pH と強い相関を示すと共に、生理状態の回復も判断することができると考えられる。すなわち既に酸性化した水域で採捕した魚類において、血中ナトリウム濃度が安定した値 (本研究の対照群に相当) を示すならば、酸性化の影響は軽微または既に回復の傾向にあると判断される。また魚類採捕時の水質では酸性化しているとは判断されなかった水域においても、本研究で有意な低下として検定されたレベルの血中ナトリウム濃度が見出された場合では、傷病等の生理状態に障害を与える他の理由が見つからない場合、過去において断続又は継続して環境水が酸性化していたことが推測できる。従って血中ナトリウム濃度を指標として、将来我が国においても顕在化する可能性がある酸性雨による環境水酸性化について、魚類に与える影響を評価することが可能であると判断される。

謝 辞

本研究にあたり、長崎大学長江真樹博士から魚類免疫機能及び IgM の ELISA に関するご教示を戴いており、ここに謝意を表する。また材料として用いたニジマスの飼育にあたり、日光支所織田三郎氏と武藤光司氏にご協力戴き、記して感謝する。本研究は環境庁地球環境研究総合推進費を用いて行われた。

引 用 文 献

- Balm, P. H. M. 1997. Immune-endocrine interactions. pp. 195-221, In "Fish Stress and Health in Aquaculture", ed. by G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, and C. B. Schreck, Cambridge University Press, Cambridge.
- Barton, B. A. 1997. Stress in finfish: past, present and future-a historical perspective. pp. 1-33, In "Fish Stress and Health in Aquaculture", ed. by G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, and C. B. Schreck, Cambridge University Press, Cambridge.
- Brown, D. J. A. and Sadler, K. 1989. Fish survival in acid waters. pp. 31-44, In "Acid Toxicity and Aquatic Animals", ed. by R. Morris, E. W. Taylor, D. J. A. Brown, and J. A. Brown, Cambridge University Press, Cambridge.
- Clarke, W. C. and Blackburn, J. 1977. A seawater challenge test to measure smolting of juvenile salmon. Canad. Fish. Mar. Serv. Tech. Rep. 705: 1-11.
- de Renzis, G. and Bornancin, M. 1984. Ion transport and gill ATPases. pp. 65-104, In "Fish Physiology", ed. by W. S. Hoar and D. J. Randall, Vol. X, Part B, Academic Press, London.
- Fromm, P. O. 1980. A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid

- stress. *Env. Biol. Fish.* 5: 79-93.
- Hasegawa, S., Hirano, T., Ogasawara, T., Iwata, M., Akiyama, T., and Arai, S. 1987. Osmoregulatory ability of chum salmon, *Oncorhynchus keta*, reared in fresh water for prolonged periods. *Fish Physiol. Biochem.* 2: 101-110.
- 生田和正・鹿間俊夫・織田三郎・奥本直人 1992. サケ科魚類の発眼卵と稚魚の耐酸性評価. 養殖研報 21: 39-45.
- 岩田宗彦・下山友三・酒井典久・鈴木敬二・井田 齋・武藤光司・阿久津梅二 1990. 硫酸による酸性環境がイワナの浸透圧調節能に与える影響. 養殖研報 18: 31-37.
- McCormick, S. D. 1993. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na^+ , K^+ -ATPase activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 656-658.
- McKeown, B. A., Geen, G. H., Watson, T. A., Powell, J. F., and Parker, D. B. 1985. The effect of pH on plasma electrolytes, carbonic anhydrase and ATPase activities in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and largescale suckers (*Catostous macrocheilus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 80A: 507-514.
- Nagae, M., Fuda, H., Hara, A., Kawamura, H., and Yamauchi K. 1993. Changes in serum immunoglobulin M (IgM) concentrations during early development of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) as determined by sensitive ELISA technique. *Comp. Biochem. Physiol.* 106A: 69-74.
- Nagae, M., Fuda, H., Ura, K., Kawamura, H., Adachi, S., Hara, A., and Yamauchi, K. 1994. The effect of cortisol administration on blood plasma immunoglobulin M (IgM) concentrations in masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Fish Physiol. Biochem.* 13: 41-48.
- 長江真樹・伊藤文成・山口元吉・西村定一 1998. コイの生体防御機能に及ぼす酸性環境の影響. 平成10年度日本水産学会春季大会講演要旨集 p. 53.
- Sumpter, J. P. 1997. The endocrinology of stress. pp. 95-118, In "Fish Stress and Health in Aquaculture", ed. by G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, and C. B. Schreck, Cambridge University Press, Cambridge.
- Turnpenny, A. W. N. 1989. Field studies on fisheries in acid waters in the United Kingdom. pp. 45-65, In "Acid Toxicity and Aquatic Animals", ed. by R. Morris, E. W. Taylor, D. J. A. Brown, and J. A. Brown, Cambridge University Press, Cambridge.
- Yada, T. and Ito, F. 1997. Differences in tolerance to acidic environments between two species of tilapia, *Oreochromis niloticus* and *O. mossambicus*. *Bull. Natl. Res. Inst. Fish. Sci.* 9: 11-18.
- Yada, T. and Ito, F. 1998. Sexual difference in acid tolerance in medaka *Oryzias latipes*. *Fish. Sci.* 64: 694-699.
- Yada, T., Nagae, M., Moriyama, S., and Azuma, T. 1999. Effects of prolactin and growth hormone on plasma immunoglobulin M levels of hypophysectomized rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 115: 46-52.
- Yamada, H., Satoh, R., Yamashita, T., Iwata, M., Kambegawa, A. 1996. Time-resolved fluoroimmunoassay (TR-FIA) of steroid hormones using antigen immobilization method. Abstracts of 3rd International Symposium on Fish Endocrinology, Hakodate, Japan, p. 169.
- Wood, C. M. 1989. The physiological problems of fish in acid waters. pp. 125-152, In "Acid Toxicity and Aquatic Animals", ed. by R. Morris, E. W. Taylor, D. J. A. Brown, and J. A. Brown, Cambridge University Press, Cambridge.
- Zadunaisky, J. A. 1984. The chloride cell: the active transport of chloride and the paracellular pathways. pp. 129-176, In "Fish Physiology", ed. by W. S. Hoar and D. J. Randall, Vol. X, Part B, Academic Press, London.