

## 養殖ハマチの血清成分量にみられる日内変動

池田 弥生・尾崎 久雄・沢田 茂樹・  
藤井 淳司・荒木 育生

### Diurnal Variations in Serum Levels of Various Constituents in Cultured Yellow-Tail (*Seriola quinqueradiata*)

Yayoi Ikeda, Hisao Ozaki, Sigeki Sawada,  
Atsushi Fujii, and Ikuo Araki

(Received April 8, 1976)

The diurnal variations in the serum levels of 13 chemical constituents were studied at interval of four hours, from 6:00 AM to next 2:00 AM, in yellow-tail (*Seriola quinqueradiata*). One group of yellow-tail was reared with raw fish and another with compound diet as food. The fish were not fed on the day of experiment and 3 fish for each group were sacrificed at each time.

The diurnal variations in the fish fed on raw fish were various in pattern with different constituents. For most of the constituents, the serum levels were higher in daytime and lower in night. The time of a day at blood sampling should be strictly chosen for determining more accurately constituents of the serum levels.

The diurnal variations in the fish fed on the compound diet were generally different and indistinct in pattern with those in the fish fed on raw fish. The significance of the differences in the diurnal variation between both groups were discussed to ameliorate the compound diet.

(YI, HO, SS, & AF: Tokyo University of Fisheries, Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo 108; IA: Research Laboratory, Nippon Shiryō Kaisha, Ltd., Chidori 2-9-16, Minato-ku, Nagoya 455.)

血液成分量の変動から魚類の生理状態を診断する場合、採血時刻による影響を検討しておかねばならない。魚類で血液成分量の日内変動を調べた研究は少なく、Boehlke *et al.* (1966) が *Ictalurus punctatus* で副腎皮質ホルモン量について、Narasimhan and Sundararaj (1971) が *Notopterus notopterus* と *Colisa fasciata* で糖と乳酸量について報告しているにとどまる。

本研究では養殖ハマチの種々の血清成分量について、日内変動を調べた。なお、現時点においては、生餌で飼育したハマチは成長がよく病気にも強いが、配合飼料で飼育したものは成長も劣り病気に対する抵抗力も小さい(松森ら, 1970; 佐藤ら, 1970)。従ってここでは生餌で飼育したハマチと配合飼料で飼育したハマチの結果を比較し、配合飼料改善への手懸りをも併せて検討した。

#### 材料および方法

供試魚は和歌山県田辺湾内で網生簀養殖された0年魚

ハマチ (*Seriola quinqueradiata*) で、生餌で飼育されたもの(生餌区と略称) 18尾(体長  $27.8 \pm 1.4$  cm, 体重  $436 \pm 62$  g) と2ヵ月間配合飼料で飼育されたもの(配合区) 18尾 ( $25.6 \pm 1.2$  cm,  $295 \pm 57$  g) とを用いた。飼料の詳細は Table 1 に示した。

検査は1972年9月27日(水温  $23^{\circ}\text{C}$ ) に実施した。26日の16時に最後の給餌をした後、27日の6時から28日の2時まで4時間毎に両区から3尾ずつ釣り上げ、直ちに尾柄部切断により採血し、1時間以内に血清を分離し、分析に供した。池田ら(1975) が述べたようにハマチは刺激に対して敏感に反応するため、本研究を進めるに当たってはこの点に特に注意を払った。

検査項目および定量方法は、血清中のコレステロン: 硫酸螢光法 (Guillemin *et al.*, 1959), 塩化物: Schales-Schales 法\*, カルシウム: OCPC 法\*, マグネシウム: Xylidil blue II 法\*, 無機磷: Molybdic blue 法\*, 鉄: 松原変法\*, 総コレステロール: *o*-phthal-aldehyde 変法\*,

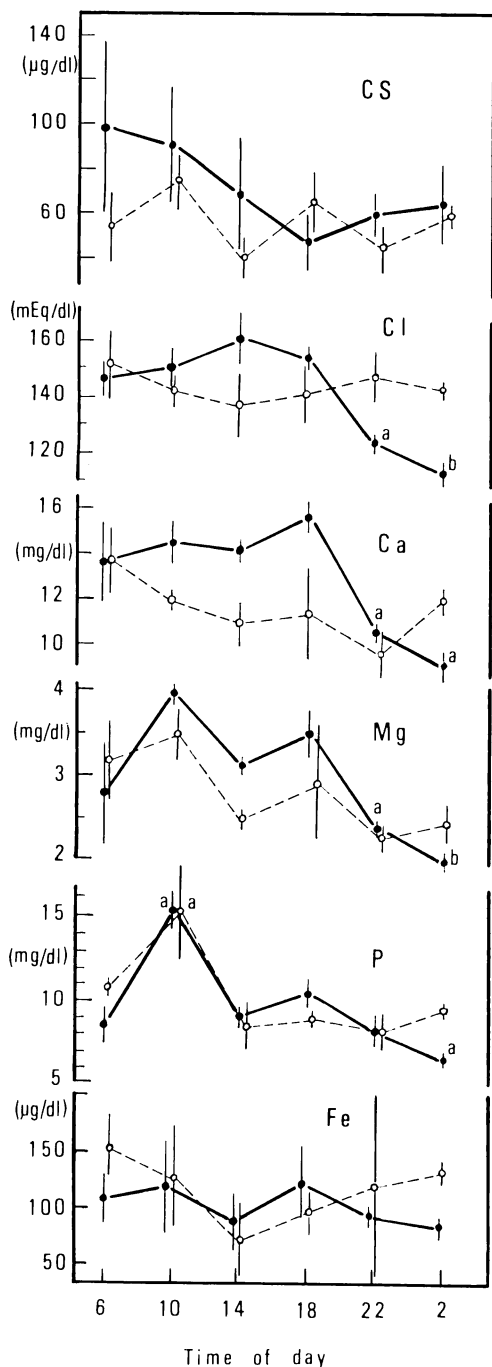


Fig. 1. Diurnal variations in serum levels of corticosterone (CS), chloride (Cl), calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphate-P (P) and iron (Fe) in yellow-tail fed on raw fish (—●—) or the compound diet (---○---). Vertical bars represent standard deviation

Table 1. Composition of diets.

Raw fish	Compound diet	
Frozen sand eel 100% ( <i>Ammodytes</i> )	White fish meal	73.2%
	Gluten	11.8
	α-Starch	1.8
	Vitamin complex* <sup>1</sup>	2.7
	Mineral mixture* <sup>2</sup>	0.9
	Iron succinate* <sup>3</sup>	0.5
	Feed oil* <sup>4</sup>	9.1

\*<sup>1</sup> The composition is as follows: vitamins in amount per 100 g, A 40,000 I.U., B<sub>1</sub> 120 mg, B<sub>2</sub> 400 mg, B<sub>6</sub> 80 mg, B<sub>12</sub> 0.18 mg, C 4,000 mg, D<sub>3</sub> 4,000 I.U., E 800 I.U., K<sub>3</sub> 80 mg, Biotin 12 mg, Ca-Pantothenate 560 mg, Inositol 8,000 mg, Folic acid 30 mg, Nicotinamide 1,600 mg, Choline chloride 16,000 mg, and *p*-Aminobenzoic acid 800 mg.

\*<sup>2</sup> USP. XII No. 2.

\*<sup>3</sup> The formulation containing 10% of iron in weight (Tokyo Tanabe Co.).

\*<sup>4</sup> Riken Co.

遊離コレステロール: Digitonin 法\*, 尿素-N: DAM-TSC 法\*, クレアチニン: Folin-Wu 法\*, 総蛋白: Biuret 法\*, 蛋白分画: セルローズ・アセテート膜電気泳動法 (電気泳動学会, 1966) によった. 星印を付したものは市販 (和光純薬工業 K.K. 製) の臨床検査用試薬キットを使用した. 各測定値は平均値±標準偏差で Fig. 1 と Fig. 2 に示した.

なお, 検査当日は晴天で, 日出は5:50, 日没は17:50であった.

### 結 果

コルチコステロン量 (Fig. 1, CS) 生餌区では朝6時に日内最高値を示し, 以後減少して夕方6時 (18時) に日内最低値 (最高値の約 1/2) となり, 22時以降増加する傾向がみられた. 配合区では生餌区に比べて全体にやや低値であり, その変動は不規則で, 生餌区にみられるような一定した変動パターンは認められなかった.

無機物量 (Fig. 1) 塩素, カルシウムおよびマグネシウムは何れもよく似たパターンを示し, 昼間 (6~18時) 高値を保ち, 夜間低値を示した. 18時と22時の差は大きく, 有意 ( $P < 0.01$ ) であった. 更に続く4時間後にも

of the mean ( $n=3$ ). a: Significantly different from the values at 18:00 in fish fed on raw fish ( $P < 0.01$ ). b: Significantly different from the values at 22:00 in fish fed on raw fish or compound diet ( $P < 0.05$ ).

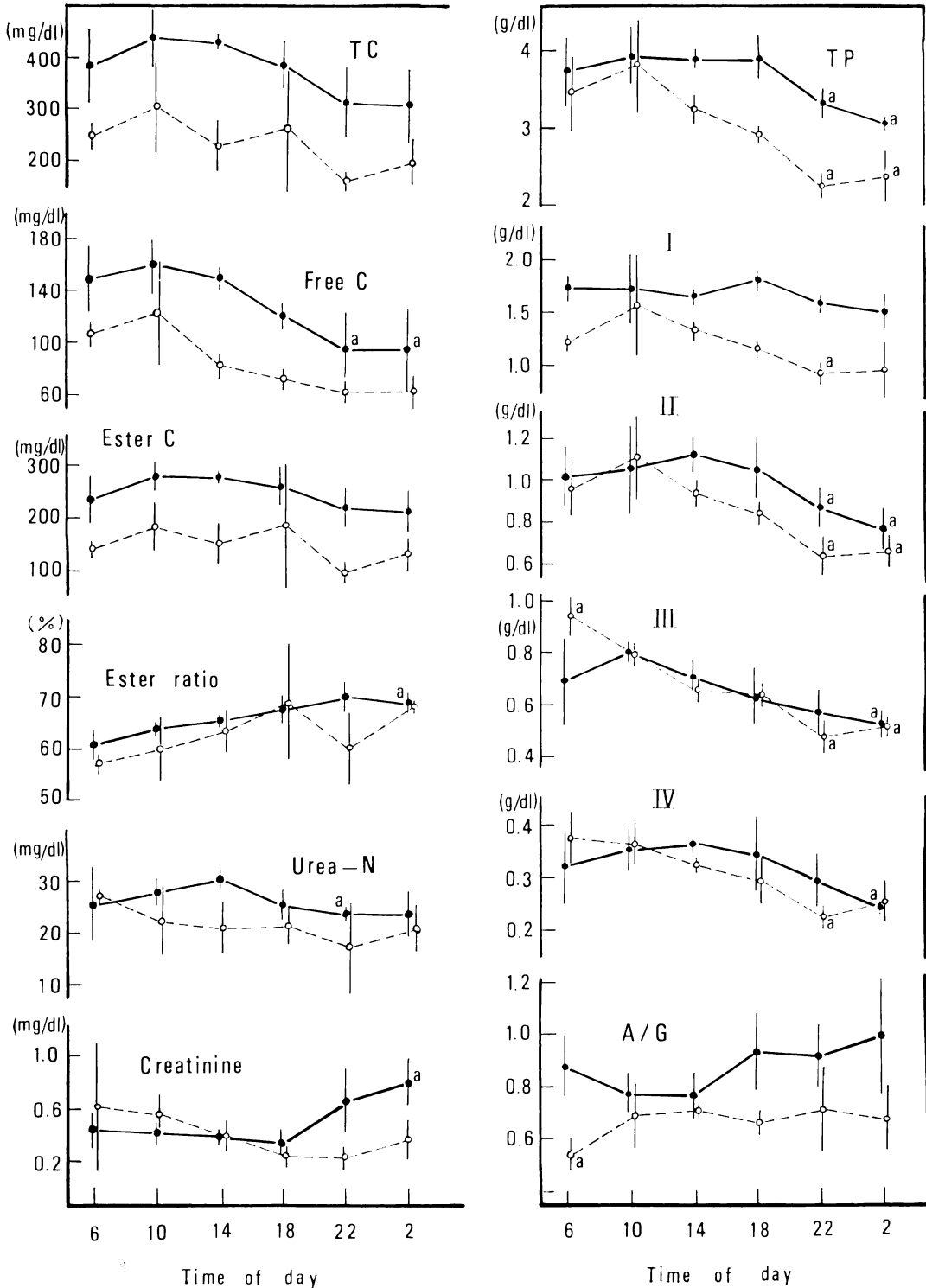


Fig. 2. Diurnal variations in serum levels of total cholesterol (TC), free cholesterol (Free C), ester cholesterol (Ester C), ester ratio of cholesterol, urea-N, creatinine, total protein (TP), I-IV fractions of protein and A/G in yellow-tail fed on raw fish (—●—) or the compound diet (---○---). Vertical bars represent standard deviation of the mean (n=3). a: Significantly different from the values at 14:00 in fish fed on raw fish or the compound diet (P < 0.05).

Table 2. Correlation among diurnal serum levels of various constituents in yellow-tail fed on raw fish (upper side of the bisector) or the compound diet (lower side of the bisector).  
 +: P<0.01, ±: P<0.05, -: no correlation.

	Corticosterone	Chloride	Calcium	Magnesium	Phosphate-P	Iron	Creatinine	Urea-N	Total protein	Protein fraction I	Protein fraction II	Protein fraction III	Protein fraction IV	A/G (I/II+III+IV)	Total cholesterol	Free cholesterol	Ester ratio of cholesterol
Corticosterone	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	±	±	-	-	±	+
Chloride	-	+	+	+	-	+	±	+	+	+	+	+	+	-	-	-	±
Calcium	-	+	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	±
Magnesium	-	-	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	±
Phosphate-P	-	-	±	+	-	-	-	-	-	-	-	+	±	±	-	-	-
Iron	-	-	+	-	±	-	-	-	+	-	-	-	-	-	±	±	-
Creatinine	-	-	-	-	±	-	-	±	±	-	-	-	-	-	+	+	±
Urea-N	-	-	+	-	-	±	-	±	-	±	±	±	±	-	±	-	-
Total protein	-	-	±	+	-	-	±	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Protein fraction I	-	-	-	-	+	-	-	+	+	±	-	±	-	-	+	+	-
Protein fraction II	-	-	-	+	±	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±
Protein fraction III	-	-	+	+	±	-	±	+	±	±	±	±	±	±	-	±	±
Protein fraction IV	-	-	-	-	±	-	±	+	+	+	+	+	+	+	±	±	±
A/G (I/II+III+IV)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	±
Total cholesterol	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-
Free cholesterol	±	-	-	±	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Ester ratio of cholesterol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-

小さな、しかし有意 (P<0.01 または 0.05) な減少がみられ、2 時には日内最低値を示した。配合区では生餌区でみられたような一定した変動パターンは認められず、塩素は終日ほぼ一定であり、カルシウムとマグネシウムは 6 時または 10 時に日内最高値を示し、生餌区に比して早い時刻から減少する傾向がみられた。

無機磷は生餌区、配合区共に 10 時に日内最高値を示し、14 時には大きく減少した。生餌区では 2 時に更に有意 (P<0.01) な減少があった。

鉄は生餌区では日内変動はみられなかった。配合区では統計的な有意差はないが 14 時に低く、6 時および 2 時に高い傾向がみられた。

コレステロールおよび窒素成分量 (Fig. 2, 左側) 総コレステロール (TC) および遊離コレステロール (Free C) は、生餌区では昼間 (6 時~14 時) に高値を保ち、徐々に低下して夜間 (22 時~2 時) 最低値を示した。遊離コレステロールでは両者の差は有意 (P<0.01) であった。これに対して、エステル・コレステロール (Ester C) は終日ほとんど変動しなかった。総コレステロールに対するエステル・コレステロールの割合 (Ester ratio) は 6 時

に日内最低値を示し、徐々に増加して 22 時に最高値を示した。配合区では遊離型もエステル型もともに生餌区に比して量的に少ないが、変動パターンはほぼ似ていた。

尿素-N は生餌区では 6 時から増加の傾向を示して 14 時に日内最高値となり、以後減少して 2 時に最低値を示した。配合区では 6 時に日内最高値がみられたが、その他の時刻では何れも低値で、生餌区とは異なった変動パターンを示した。

クレアチニンは生餌区ではこれまでみられたパターンとは逆に昼間 (6 時~18 時) は低値を、夜間 (22 時~2 時) は有意 (P<0.01) な高値を示した。配合区では夜間の上昇がみられず、終日ほぼ一定であった。

蛋白質 (Fig. 2, 右側) 生餌区の結果をみると、総蛋白質 (TP) は昼間 (6 時~18 時) 高値を保ち、夜間 (22 時~2 時) は低値を示した。その差は有意 (P<0.01) である。蛋白質の各分画の変動パターンは分画 I (アルブミンとする) では昼夜の差がみられず終日ほぼ一定であるが、分画 II~IV (グロブリンとする) では明らかに昼間の高値と夜間の低値とが示された。従って、A/G 比は統計的に

は有意ではないが、10～14時の値が他の時刻に比べて低い傾向を示した。

配合区では総蛋白および蛋白分画のすべてにおいて昼間高く夜間低い傾向がみられた。しかし、生餌区との間の顕著な差は朝6時(分画 III と IV) または 10 時(総蛋白, 分画 I と II) を最高値として、早い時刻から減少が始まることである。配合区で昼間の高い値が維持されない傾向は塩素, カルシウム, マグネシウム, 遊離コレステロール, 尿素-N などにみられたが、ここでも明瞭に現われている。A/G 比は6時は低く、10時～2時はほぼ一定であった。

**各成分間の相関** 生餌区および配合区の測定した全個体について、各成分間の相関を求めた。生餌区の結果は Table 2 の斜線右上に、配合区の結果は斜線の左下に示してある。総蛋白は蛋白各分画(I～IV) およびコレステロール(遊離および総コレステロール) に対して高い相関を示し、この相関は生餌区と配合区とに共通してみられた。一方、無機物(塩素, カルシウム, マグネシウム) は生餌区においては他のすべての成分と相関を示す例が多かったが、配合区においては他の成分との相関を示す例が極めて少なかった。

## 考 察

いくつかの血清成分には採血時刻によって量的な差がみられた。生餌区の 10 時と 14 時の値を比較してみると、マグネシウムおよび無機物は両時刻で値に大きな差があったが、その他の成分はほぼ近い値を示した。本実験は4時間おきの検査であるため確かなことはいえないが、通常我々が実験している昼間に採血すればそれほど大きな差は生じないと思われる。成分によっては早朝や夕方に大きく変動するものもあり、そのため個体差も大きくなる危険性がある。また研究目的により期待される差異が小さい時には同一時刻に採血することが望ましいし、更に1日のうち、時間をおいて何回か調べることが望ましい。Mills (1966) が主張しているように、特に厳密な目的の実験には時刻を明記する必要がある。

本実験で得られたコルチコステロン量には統計的にみて有意な日内変動はみられなかった。病理的あるいは薬理の変動に比べて、日内変動などの生理的変動は本来僅かな差である。従って本結果を読む場合にも、統計的有意差はなくても、一定の変異係数をもってその平均値が徐々に減少するか、または徐々に増加する場合、例えば生餌区のコルチコステロンは一定の日内変動傾向を有するものと解釈すべきと考える。逆に配合区のコルチコステロンは時刻に対して一定の増減傾向をもっていない。

い。このような場合こそ、真に有意差がないというべきである。従って、生餌区のコルチコステロンは一つの変動傾向を有し、一方配合区はこの傾向をもたないといえる。Boehlke et al. (1966) はナマズ目の *Ictalurus punctatus* の血清副腎皮質ホルモンは日内変動すると報告している。ヒト (Mills, 1966) やラッテ (Cheifetz et al., 1968; Hiroshige et al., 1969) でもこのホルモンは一峰性の日内リズムを有することが認められている。これらのことからハマチでも日内リズムを有すると推測される。

配合区の結果は副腎皮質機能の低下を考えさせる。配合区では血清サイロキシンでも日内リズムの消失がみられている(未発表)。池田ら (1975) が報告したように、取扱いに対する反応にも差がみられたことは内分泌機能低下を裏付けるものであろう。

血清成分にみられた日内変動の原因を二、三検討してみる。

血清蛋白量は昼間高く、夜間低いパターンを示した。本実験は当日無給餌であったため、飢餓の影響を無視する訳にはいかないが、給餌をした場合(池田ら, 1976)でも昼間高く、夜間低くなるパターンを示した。従って、絶対値では給餌した場合と無給餌の場合とで差がみられたが、日内変動としては同一パターンを示している。ヒト(柴田・和嶋, 1969) やラッテ (Scheving et al., 1968) でも昼夜の差がみられている。日内変動を起こした原因としてまず考えられることは運動量の差である。池田ら (1975) はハマチを運動させたとき血清蛋白量の増加をみた。総蛋白量と蛋白の各分画とは各々高い相関を示すことから、運動による増加は血液中の水分量の増減によると考えられる。この点についてはヒト(柴田・和嶋, 1969) やラッテ (Scheving et al., 1968) でも同様に解釈されている。

尿素-N 量にも昼間高く、夜間低いパターンがみられ、給餌した場合(池田ら, 1976)にも同様な結果が得られた。運動させた時(池田ら, 1975)には増加をみていないので、別の要因によると考えられる。

無機燐量の日内変動パターンは蛋白や尿素-N の動きに比してやや複雑であるが、給餌をした場合(池田ら, 1976)にも本結果に近いパターンを得た。無機燐が運動によって増加することはハマチ(池田ら, 1975) やニマス (Nakatani, 1975; Hammond and Hickman, 1966) でみられており、日内変動を起こす一要因と考えられる。

コレステロール量も昼間高く、夜間低くなるパターンを示した。給餌した場合(池田ら, 1976)にも同様なパターンである。夜行性のラッテでは肝臓のコレステロール合成律速酵素である 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA

還元酵素の活性に規則正しい日内リズムがみられ、夜間の酵素活性は昼間の5~6倍に及ぶと報告されている(Shapiro and Rodwell, 1969). 従って、昼行性のハマチでは昼間合成速度が高まることが類推される。一方、コレステロールの異化反応系は微量の甲状腺ホルモンで促進されることがラッテで報告されている(Takeuchi et al., 1975). ハマチでは血中のサイロキシン量は昼間低く、夜間高くなる(著者ら、未発表)ことから、夜間コレステロール量が減少することも類推できる。

無機物、特に塩素、カルシウム、マグネシウム量は昼間高く、夜間低くなるパターンを示した。給餌した場合(池田ら, 1976)にも、カルシウムおよびマグネシウムは同様の変動傾向を示した。ハマチを運動させるとこれら成分量が増加する(池田ら, 1975)ことから、運動がその一因に考えられる。

飼料の違いによる観点から生餌区と配合区の結果を比較すると、殆どどの成分において両区で類似の変動パターンが得られたが、異なった点は前述の内分泌面の外に、生餌区で昼間高値を示すのに配合区ではこの高値を維持できず、早い時刻から低下し始める傾向がみられたことである。これは塩素、カルシウム、マグネシウム、遊離コレステロール、尿素-N、総蛋白およびその分画などで顕著にみられた。配合区のハマチは生餌区のものに比べて運動はむしろ活発であるので、これらの差は主として恒常性維持能の低下や合成能の低下などによると考えられる。コレステロールにみられた量的な大差は合成能の低下、あるいは飼料からの摂取不足と考えられる。現在の段階でこれらの差をもたらす原因を明らかにすることはできないが、カルシウムやマグネシウムは副腎皮質ホルモンの合成に関与していることも報告されている(川村ら, 1972; 渡辺, 1975)し、また膜の透過性や多くの酵素への賦活作用など種々の代謝過程に関与していることも一般によく知られていることである。従って、両飼料区にみられたこれら無機物の血清濃度の差の意義は無視できないものがあると考えられる。

#### 引用文献

Boehlke, K. W., R. L. Church, O. W. Tiemeier, and B. E. Eleftheriou. 1966. Diurnal rhythm in plasma glucocorticoid levels in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 7: 18~21.  
 Cheifetz, P., N. Gaffud, and J. F. Dingman. 1968. Effects of bilateral adrenalectomy and continuous light on the circadian rhythm of corticotropin in female rats. *Endocrinology*, 82: 1117~1124.  
 電気泳動学会. 1966. 電気泳動法による血清蛋白質分

画定量法の標準操作法集. 生物物理化学, 11: 267~269.  
 Guillemin, R. M. D., G. W. Clayton, H. S. Lipscomb, and J. D. Smith. 1959. Fluorometric measurement of rat plasma and adrenal corticosterone concentration. *J. Lab. Clin. Med.*, 53: 830~832.  
 Hammond, B. R. and C. P. Hickman, Jr. 1966. The effect of physical conditioning on the metabolism of lactate, phosphate, and glucose in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 23: 65~83.  
 Hiroshige, T., M. Sakakura, and S. Itoh. 1969. Diurnal variation of corticotropin-releasing activity in the rat hypothalamus. *Endocrinol. Japon.*, 16: 465~467.  
 池田弥生・尾崎久雄・上松和夫. 1975. 養殖ハマチの血清成分におよぼす取扱いの影響. *日本水産学会誌*, 41: 803~811.  
 池田弥生・尾崎久雄・沢田茂樹・藤井淳司・荒木育生. 1976. 養殖ハマチの血清成分量にみられる食後変動. *魚類学雑誌*, 印刷中.  
 川村将弘・中村幹雄・松葉三千夫. 1972. 副腎皮質ミトコンドリアクリステ膜における corticoidogenesis および corticoidogenesis に参与する電子伝達系に対する二価陽イオンの影響. *日本内分泌学会誌*, 47: 891.  
 松森茂・松崎幸夫・菅昭人・西村忠恭. 1970. 新餌料開発研究. 山口外海水試, 昭和44年指定調査研究報告, 1~17.  
 Mills, J. N. 1966. Human circadian rhythms. *Physiol. Rev.*, 46: 128~171.  
 Nakatani, R. E. 1957. Changes in the inorganic phosphate and lactate levels in blood plasma and muscle tissue of adult steelhead trout after strenuous swimming. *Univ. Washington School of Fisheries. Tech. Rep.*, (30): 1~14.  
 Narasimhan, P. V. and B. I. Sundararaj. 1971. Circadian variations in carbohydrate parameters in two teleosts, *Notopterus notopterus* (Pallas) and *Colisa fasciata* (Bloch and Schneider). *Comp. Biochem. Physiol.*, 39B: 89~99.  
 佐藤正明・北島力・松里寿彦. 1970. ハマチにおける石油酵母餌料化試験. 広島水試, 昭和44年指定調査研究報告, 1~24.  
 Scheving, L. E., J. E. Pauly, and T-H. Tsai. 1968. Circadian fluctuation in plasma proteins of the rat. *Am. J. Physiol.*, 215: 1096~1101.  
 Shapiro, D. J. and V. W. Rodwell. 1969. Diurnal variation and cholesterol regulation of hepatic HMG-CoA reductase activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 37: 867~872.  
 柴田進・和嶋毅. 1969. 総蛋白, アルブミン, グロブリン. *日本臨牀*, 27 (増刊号): 16~25.  
 Takeuchi, N., M. Ito, K. Uchida, and Y. Yamamura. 1975. Effect of modification of thyroid function on cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylation in the rat liver.

池田・尾崎・沢田・藤井・荒木：ハマチの血清成分の日内変動

Biochem. J., 148: 499~503.

渡辺晃祥. 1975. 各種動物の副腎遊離細胞におけるステロイド産生に及ぼすカルシウムの影響. 日本内分泌学会誌, 51: 580~588.

(池田・尾崎・沢田・藤井: 108 東京都港区港南 4-5-7 東京水産大学; 荒木: 455 名古屋市港区千鳥 2-9-16 ニッポン飼料株式会社技術部研究所)