

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-503185

(P2017-503185A)

(43) 公表日 平成29年1月26日(2017.1.26)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 A	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 A	
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88 E	
C 1 2 Q 1/60 (2006.01)	C 1 2 Q 1/60	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2016-559682 (P2016-559682)  
 (86) (22) 出願日 平成26年12月17日 (2014.12.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月19日 (2016.8.19)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/078117  
 (87) 国際公開番号 W02015/091591  
 (87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)  
 (31) 優先権主張番号 13198450.2  
 (32) 優先日 平成25年12月19日 (2013.12.19)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)  
 (31) 優先権主張番号 14172747.9  
 (32) 優先日 平成26年6月17日 (2014.6.17)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 514185611  
 ユニベルシテイト ゲント  
 UNIVERSITEIT GENT  
 ベルギー王国 ビー9000 ゲント、シ  
 ントーピーテルスニューストラート 25  
 Sint-Pietersnieuwst  
 raat 25, B-9000 Gen  
 t, Belgium

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性ストレスのバイオマーカーとしての魚のうろこにおけるグルココルチコイドの定量化

(57) 【要約】

本発明は、長期間にわたって魚が経験するストレスのレベルの決定に関し、これは魚の福祉状態の評価に使用可能である。より詳細には、本発明は、魚からサンプリングしたうろこ、ならびに耳石、棘および軟鱗条などの石灰化組織の、前記うろこ/基質内のグルココルチコイドのレベルを定量化するための使用に関する。コルチゾールまたはコルチコステロンなどの前記グルココルチコイドのレベルは、うろこにおいて時間とともに高くなり、これは、魚がその生存の間に受け、そのストレスレベルに影響を及ぼすところの、長期的なストレスの多い条件を反映する。したがって、本発明は、魚における慢性ストレスレベルを定量化するための *in vitro* の方法であって、ストレスホルモンの精密で正確な定量化のための、ロジスティックに実行可能な非侵襲的な基質としてのうろこを使用した、前記方法を開示する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

魚における慢性ストレスレベルを定量化するための *in vitro* 方法であって、

- 前記魚から少なくとも1枚のうろこを得ること、
- 前記うろこからグルココルチコイドを抽出すること、
- 前記うろこから抽出されたグルココルチコイドを精製すること、
- 前記精製されたグルココルチコイドを定量化すること、および
- 前記定量化されたグルココルチコイドと慢性ストレスレベルの、相関をとること、

を含む、前記方法。

## 【請求項 2】

グルココルチコイドが、コルチゾール、コルチコステロン、17 $\beta$ -ヒドロキシprogesterone、11 $\beta$ -デオキシコルチゾール、11 $\beta$ -デオキシコルチコステロン、コルチゾン、20 $\beta$ -ジヒドロコルチゾン、テトラヒドロコルチゾール、および/またはテトラヒドロコルチゾンである、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

魚が硬骨魚類下綱に属していることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

魚から少なくとも1枚のうろこを得ることが、魚から 40 ~ 80 枚のうろこを得ることである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 5】

グルココルチコイドを抽出することが、メタノールを抽出溶媒として添加することにより実施される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 6】

メタノールによる抽出に続いて固相抽出を行う、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

抽出されたグルココルチコイドの定量化を、タンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィー、紫外線、ダイオードアレイ、もしくは蛍光検出と組み合わせた高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー、ラジオイムノアッセイ、酵素免疫測定法、またはセンサーに基づく技術により行う、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 8】

タンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィーが、超高速液体タンデム質量分析である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

免疫測定法が、ラジオイムノアッセイまたは酵素免疫測定法である、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 10】

魚からサンプリングした魚のうろこの、前記魚の慢性ストレスレベルを定量化するための使用。

## 【請求項 11】

定量化が、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法により実施される、請求項 10 に記載の使用。

## 【請求項 12】

魚からサンプリングした棘、鱗条または耳石の、前記魚の慢性ストレスレベルを定量化するための使用。

## 【請求項 13】

魚における慢性ストレスレベルを定量化するための *in vitro* 方法であって、

- 前記魚から少なくとも1つの棘、鱗条または耳石を得ること、
- 前記棘、鱗条または耳石からグルココルチコイドを抽出すること、
- 前記棘、鱗条または耳石から抽出されたグルココルチコイドを精製すること、
- 前記精製されたグルココルチコイドを定量化すること、および

10

20

30

40

50

- 前記定量化されたグルココルチコイドと慢性ストレスレベルの、相関をとること、を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、魚の慢性ストレス状態の評価に使用することができる、魚が経験したストレスレベルを決定することに関する。より具体的には、本発明は、魚からサンプリングしたうろこならびに棘、軟鱗条および耳石などの他の石灰化組織の、前記うろこおよび他の基質におけるグルココルチコイドレベルを定量化するための使用に関する。コルチゾールまたはコルチコステロンなどの前記グルココルチコイドのレベルは、うろこにおいて時間と共に高くなり、これは、魚がその生存の間に受けてそのストレスレベルに影響を及ぼす、長期的なストレスの多い条件を反映する。したがって本発明は、魚における慢性ストレスレベルを定量化するための *in vitro* の方法であって、ストレスホルモンの精密で正確な定量化のための、ロジスティックに実行可能で非侵襲的な基質としてのうろこを使用した、前記方法を開示する。

10

【背景技術】

【0002】

魚は世界中でますます、公共的、科学的、および政治的な関心を集めている。レクリエーションおよび商業漁業は、我々の社会において盛んである；魚の問題は、保全生物学（1）および環境保護への取り組み（例えば気候変動、新たな捕食者、新たな動物 - 環境関係の、ストレスに対する、およびその結果として適応度に対する影響）（2、3）に関連した議論において、関連性の高い位置を占める。人間活動（例えばエネルギー生産、輸送交通、産業公害）は、自然のストックを危うくする（4）。したがって、様々な国際監視制度が、海洋ニッチの健康状態に及ぼすそれらの影響について、科学的に明らかにすることを目指している。同様の状況が淡水のストックにおいても存在し、それは淡水ストックが農業の拡大に伴う土壌浸食、肥料などの脅威にさらされていることによる。人口は拡大を続けており、持続可能な食料生産の必要性は、世界的に最重要な優先事項となっている。魚のタンパク質は、ヒトの消費のための最も重要なタンパク質源の1つである。現在の漁業は収量の限界を迎えており、水産養殖が急速に世界的に膨張して、養殖業者に対して最適で持続可能で動物に優しい方法で生産するよう、ますます圧力をかけている（5、6）。多くの魚（例えば、ゼブラフィッシュおよびメダカ）が、生物医学研究において脊椎動物モデルとして、および齧歯類の代替として使用されている（例えば、骨の生理学的研究において）。世界的に経済のアウトプットが縮小するなかで、この分野での研究主導型のイノベーションを維持するための必須条件が、魚の開発に追加される。近年、魚の苦しみや福祉に関する倫理は、多くの魚の、漁業（7）、急速に成長し強化されている水産養殖業（8、9）、公共水族館（10、11）および科学研究機関（12）などへの関与に、より多くの注意を促す。魚の生物学を、魚の開発における管理、制御、および意思決定のベースとして認識し理解することは、多くの分野（分子生物学からエコ生理学まで）からの関係者に対して、複数の角度（すべて異なる利害関係者）から見た現象的なチャレンジを与え、高度に特異的で望ましい専門知識を表す。このフレームワークにおいて、魚におけるストレス、特に慢性ストレスのレベルを評価する科学的に検証された新規なバイオマーカーは、非常に重要である。

20

30

40

【0003】

魚の福祉は危険にさらされやすいため、水質等の一貫性に劣る間接的な畜産関連のパラメータよりも優れた、動物に基づく生理学的指標が必要である。しかし、慢性ストレスについての、実用的で信頼できる検証されたバイオマーカーは不足している。頻繁に使用される、魚に対して一見論理的なバイオマーカーは、「ストレスステロイド」であるコルチゾールの血中レベルである。ストレスの刺激に直面した魚は、視床下部 - 下垂体 - 腎間（HPA）軸の活性化を介した内分泌ストレス応答を起動して、コルチゾールを血中に放出する（13、14）。コルチゾールは、一連の生理学的および行動的变化を誘発し（15

50

- 17)、これは魚が変化した状況に対応することを可能にする(18-20)。短期的なコルチゾール作用の適応値は、広く認識されている(21、22)。持続的なストレスならびに、健康、成長、および再生に対する多くの場合有害なその結果については、ほとんど知られていない(19、20)。堅牢で容易に実施可能で、かつ科学的に検証された、慢性ストレスのバイオマーカーの定義は、このように最も重要である。魚の血漿中のグルココルチコイドレベルは、日周変動を示し(23)、魚の生涯にわたるストレスに対する曝露は明らかにせず、サンプリングの時点におけるコルチゾールの状態のスナップショットしか提供しない(24、25)。さらに、血液のサンプリングは侵襲的であり、網による捕獲、空気曝露およびハンドリングのため、魚に対して交絡(confounding)ストレスの原因とならざるを得ない。血漿コルチゾールレベルはストレスとの対決の後数分間で急速に上昇するため、血漿コルチゾールにはバイアスが発生しやすい(13)。血液サンプリングを容易にするために用いられる麻酔薬は、それ自体がHPI軸の活性化を低下または遮断する可能性があり、これによりコルチゾールの血液中への放出に影響を与え、誤った結果をもたらす(26、27)。制限事項はまた、粘液(28、29)、腸の内容物(29)、糞(30)および水(31、32)などの代替基質中のコルチゾールの測定にも適用される。関連する文献は、慢性ストレスの評価に適した基質における、コルチゾールのデータを欠いている。これまで、研究の大半はコルチゾールのみに対処し、グルココルチコイド産生経路(単数または複数)(33)またはそれらの慢性ストレスでの重要性についての報告は少ない。魚は、生物的事象を記録し、石灰化組織内にその履歴を保存する。鳥の羽毛(38)および哺乳動物の毛(39)と同様に、魚の慢性ストレスの評価のための理想的な基質は、少なくとも以下の基準を満たすべきである：(i)グルココルチコイドの取り込み；(ii)ゆっくりであるが持続的な成長；および(iii)サンプリングの容易さ。

#### 【0004】

板状鱗(elasmoid scale)、すなわち石灰化真皮外骨格構造(40)は、魚と共に成長し、無細胞コラーゲン基質から構成されており、これは、外層がカルシウムヒドロキシアパタイトで鉱化され、骨芽細胞様および破骨細胞様の特性を有する細胞の単層で裏打ちされている。うろこは、除去されても何日間かのうちに再生される(41)。うろこは、内分泌刺激についての標的である。高親和性の低容量エストラジオール-17b結合は、ニジマス(*Oncorhynchus mykiss*)の骨片形成細胞質ゾルに見出され(42)、エストロゲン受容体はモザンビークテラピア(*Oreochromis mossambicus*)およびゴウシュウマダイ(gilthead sea bream)(*Sparus auratus*)のうろこで免疫組織化学的に検出されている(43)。うろこは簡単かつ迅速に、魚が無視できる程度の傷害およびストレスで収集され、そのコルチゾールレベルはサンプリング手順によって悪化されない。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0005】

【図1】図1は、ステロイドホルモン原理経路および慢性ストレス応答に關与する分析物の図である<sup>44</sup>。

【図2】図2は、方法の概略図である。

【図3】図3は、検証のための、うろこ、棘、および軟鰭条についての基質の最適量を示す図である。

【図4】図4は、うろこ、棘、および軟鰭条中のコルチゾールについての抽出時間および反復の最適化を示す図である。

【図5】図5は、魚のうろこにおけるコルチゾールについての、希釈液および基質中の検量線の図である。

【図6】図6は、処置の42日目の、コルチゾール(nM)、グルコース(mM)、乳酸塩(mM)、全カルシウム(mM)、および重量オスモル濃度(mOsm·kg<sup>-1</sup>)の血漿分析の図である。観測の50%が、箱の下端および上端(第1および第3四分位点)の間に発生し、ひげは、箱からの四分位範囲の1.5倍以内である最も極端な観察まで伸びている；白丸はこの範囲外の値を表す。

【図7】図7は、処置の42日目の、視床下部(crf)、下垂体前葉(pomc)、および腎間(star)の遺伝子の分析を示す(平均正規化発現-MNE)。箱ひげ図(ボックスプロット)のひげは、図6で定義の通りである。

【図8】図8は、処置の42日後の、えらにおけるatp1a1aの遺伝子発現(MNE)の図である。箱ひげ図のひげは、図6で定義の通りである。

【0006】

【図9】図9は、処置の21日および42日後の、個体発生うろこにおけるコルチゾール(うろこ当たりのpmol)を示す図である(CC = 決定限界およびCC = 検出能力)。42日目のSTRESSの1つの値(うろこ当たり2.8pmol)は、表示の理由により箱ひげ図から省略した。箱ひげ図のひげは、図6で定義の通りである。

10

【図10】図10は、個体発生うろこおよび再生うろこ(MNE)の相対的col1a1発現に対する血漿コルチゾール(nM)の、バッグプロット(bagplot)を示す図である。バッグは、すべての観測の50%を含む。挿入図は、21日の再生うろこにおけるコルチゾール(うろこ当たりのpmol)を示す。箱ひげ図のひげは、図6で定義の通りである。

【図11】図11は、処置の42日目の、コルチゾール(nM)、グルコース(mM)、全カルシウム(mM)、および重量オスモル濃度(mOsm·kg<sup>-1</sup>)の血漿分析の図である。観測の50%が、箱の下端および上端(第1および第3四分位点)の間に発生し、ひげは、箱からの四分位範囲の1.5倍以内である最も極端な観察まで伸びている；白丸はこの範囲外の値を表す。

20

【図12】図12は、処置の21日および42日後の、個体発生うろこにおけるコルチゾール(うろこ当たりのpmol)を示す図である(CC = 決定限界およびCC = 検出能力)。箱ひげ図のひげは、図11で定義の通りである。

【図13】図13は、処置の21日後の、再生うろこにおけるコルチゾール(うろこ当たりのpmol)を示す図である(CC = 決定限界およびCC = 検出能力)。箱ひげ図のひげは、図11で定義の通りである。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、魚においてグルココルチコイドのプロファイルがうろこに捕捉されること、および、これらの皮骨プレートにおけるグルココルチコイドレベルが、魚が時間とともに経験したストレスの度合いの時間積分された試料を反映すること、との所見に関する。うろこは簡単に非侵襲的にサンプリングされ、うろこにおけるグルココルチコイドレベルのさらなる定量化のための、便利な試料調製を可能にするために、うろこは実際、魚における慢性ストレスのモニタリングのための理想的な基質と考えられている。したがって本発明は、魚のうろこにおけるコルチゾールなどの糖質コルチコイドを定量化して、長期間のストレスへの魚の暴露を評価するための、精密で正確かつ堅牢な方法に関する。

30

より具体的には、本発明は、魚における慢性ストレスレベルを定量化するためのin vitro方法であって、

- 前記魚から少なくとも1枚のうろこを得ること、
  - 前記うろこからグルココルチコイドを抽出すること、
  - 前記うろこから抽出されたグルココルチコイドを精製すること、
  - 前記精製されたグルココルチコイドを定量化すること、および
  - 前記定量化されたグルココルチコイドと慢性ストレスレベルの、相関をとること、
- を含む、前記方法に関する。

40

【0008】

用語「グルココルチコイド」は、硬骨魚類下綱(infraclass Teleostei)に属する魚(Pisces)から(板状)鱗が採取された場合にはコルチゾールを意味し、および/または、軟骨魚綱(class Chondrichthyes)に属する魚から(硬)鱗が採取された場合にはコルチコステロンを意味し、および/または、可能な腎間外経路の検出が追加的に必要とされる場合には、17-ヒドロキシprogesteroneおよび/または11-デオキシコルチ

50

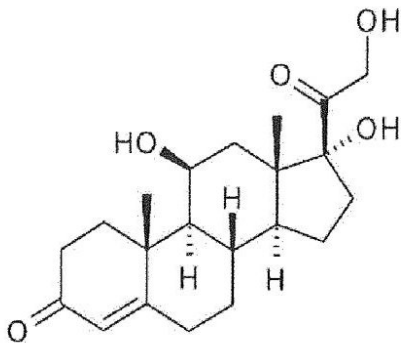
ゾールなどのコルチゾールの前駆体、および/または 11 - デオキシコルチコステロンなどのコルチコステロンの前駆体を意味し、および/またはコルチゾン、ライヒシュタイン U (または 20 - ジヒドロコルチゾン)、テトラヒドロコルチゾール、および/またはテトラヒドロコルチゾンなどのコルチゾールの代謝物、および/またはコルチコステロンの代謝物を意味し、なぜならばこれらの代謝物は、うろこにおけるグルココルチコイドレベルに影響を与える可能性があり、したがってそれらの検出が追加的に必要とされるからである。

【0009】

上記に示したグルココルチコイドの化学構造を以下に示す<sup>4 5</sup>：

- コルチゾールまたは 11 $\beta$  - ヒドロキシ - 20 - ジヒドロコルチゾン、17 $\beta$  - ヒドロキシ - 21 - トリヒドロキシプレグナ - 4 - エン - 3, 20 - ジオン： 10

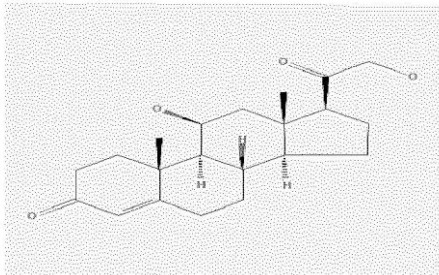
【化 1】



20

- コルチコステロンまたは 11 $\beta$  - ヒドロキシ - 21 - ジヒドロキシ - 4 - プレグネン - 3, 20 - ジオン：

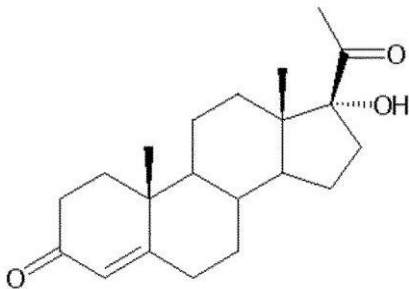
【化 2】



30

- 17 $\beta$  - ヒドロキシprogesteroneまたは 17 $\beta$  - ヒドロキシプレグナ - 4 - エン - 3, 20 - ジオン：

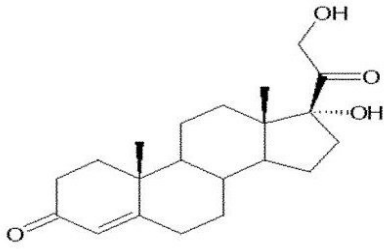
【化 3】



40

- 11 - デオキシコルチゾールまたは 17 $\beta$  - ヒドロキシ - 21 - ジヒドロキシプレグナ - 4 - エン - 3, 20 - ジオン：

【化 4】

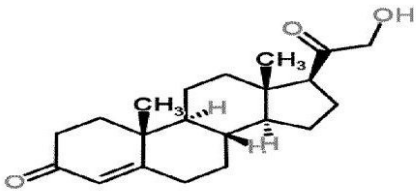


10

【 0 0 1 0】

- 11 - デオキシコルチステロンまたは 21 - ヒドロキシプレグナ - 4 - エン - 3 , 20 - ジオン :

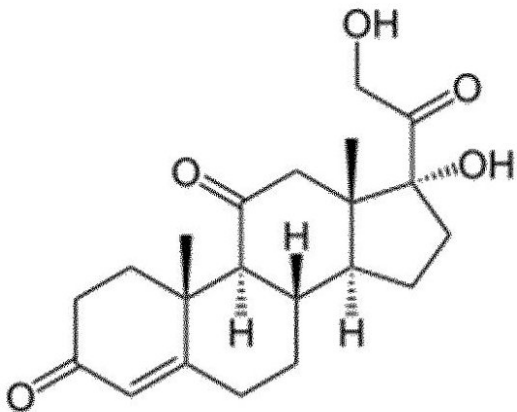
【化 5】



20

- コルチゾンまたは 17 , 21 - ジヒドロキシ - プレグナ - 4 - エン - 3 , 11 , 20 - トリオン :

【化 6】

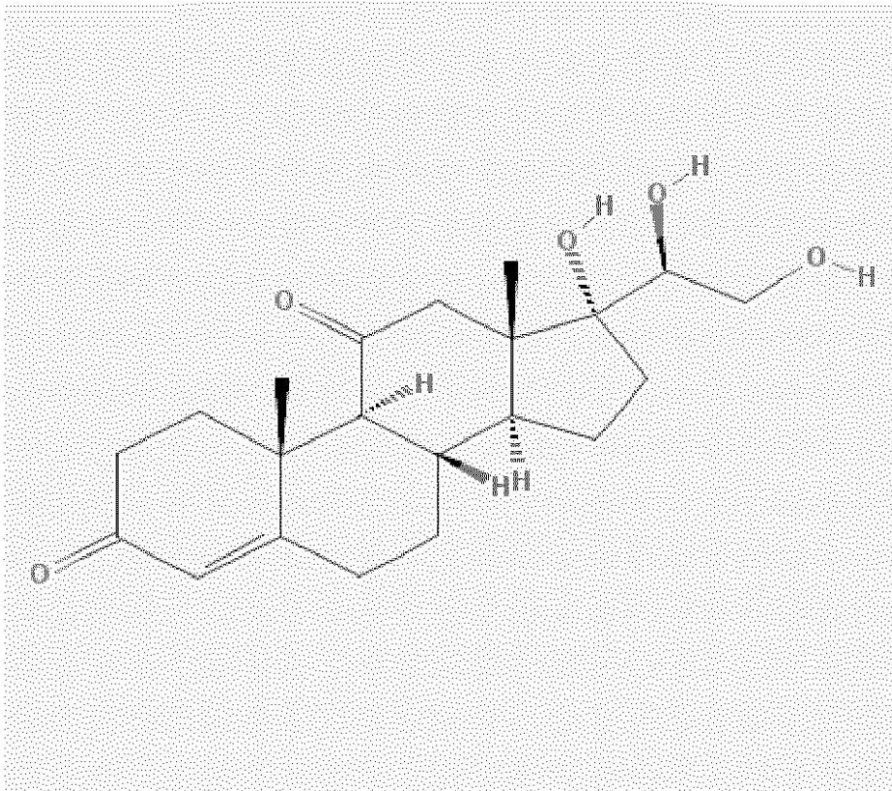


30

- ライヒシュタインUまたは 20 - ジヒドロコルチゾンまたは 17 , 20 , 21 - トリヒドロキシ - プレグナ - 4 - エン - 3 , 11 - ジオン

40

## 【化 7】

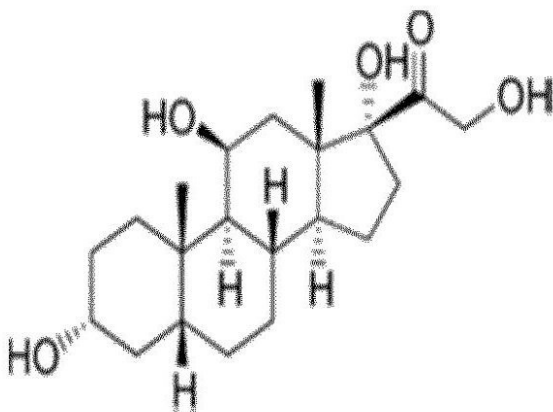


10

20

- テトラヒドロコルチゾールまたは 3, 11, 17, 21 - テトラヒドロキシ - 5 - プレゲナン - 20 - オン :

## 【化 8】

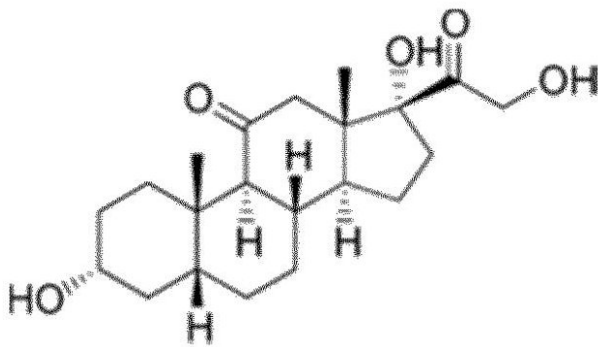


30

40

- テトラヒドロコルチゾンまたは 3, 17, 21 - トリヒドロキシ - 5 $\alpha$  - プレゲナン - 11, 20 - ジオン :

## 【化 9】



10

## 【0011】

したがって本発明は、本明細書に記載の方法であって、グルココルチコイドがコルチゾール、17-ヒドロキシプロゲステロン、11-デオキシコルチゾール、コルチコステロン、11-デオキシコルチコステロン、コルチゾン、ライヒシュタインU、テトラヒドロコルチゾール、および/またはテトラヒドロコルチゾンである、前記方法に関する。硬骨魚におけるストレス応答を反映すると考えられる古典的なパラメータとして、コルチゾールは血流中に放出され、石灰化構造への組み込みが可能となり、これにより慢性ストレス研究のための主要な標的分析物となる。その前駆体である17-ヒドロキシプロゲステロンおよび11-デオキシコルチゾールは、可能な腎間外経路の存在を解明するための方法に含められていた。魚における腎間外経路の存在は、現在知られていないが、ヒトにおける副腎外経路の兆候があるため<sup>4,6</sup>、両方の分析物は、さらなる研究目的のための方法に組み込まれた。かかる経路の存在は、HPI軸の、またその結果としてのストレスについての我々の理解に対して、大きな影響を与える可能性がある。代謝物であるコルチゾン、ライヒシュタインU、テトラヒドロコルチゾールおよびテトラヒドロコルチゾンもまた方法に含められたが、これは、水中の外因性のグルココルチコイド（他の魚、人為的活動等に由来）が内分泌かく乱物質として作用し得て、うろこにおけるグルココルチコイドのプロファイルに影響を与える可能性があるからである。

20

30

## 【0012】

用語「魚」は本質的に、うろこを有し、えらのある任意の有頭水生動物を意味するが、しかし特には、軟骨魚綱（軟骨魚）の分類学的クラス、または硬骨魚類（硬骨魚）の分類学的下綱に属する魚を指す。

本発明はさらに具体的に、前記魚が硬骨魚類下綱に属する、上述の方法に関する。

より具体的には、本発明は、前記硬骨魚類下綱に属する魚が、モロネ科（例えば、ヨーロッパアンシーバス）、タイ科（例えば、タイ類（Sea breams））、ササウシノシタ科（例えば、ヨーロッパソールおよびセネガルソール）、サケ科（例えば、サケ、マス）、いわゆるキングフィッシュ（例えばイエローテールキングフィッシュ）、サバ科（例えばマグロ）、タラ科（例えばタラ）、コイ科（例えば、コイ、鯉（錦鯉））、およびシクリッド魚（例えば、モザンビークおよびナイルテラピア）に属する魚である、上述の方法に関する。

40

## 【0013】

用語「うろこ」は、魚の皮に一般に見出される皮骨プレートであって、成長に依存して同心円状の輪または環を示すものを意味する。より具体的には、用語「うろこ」は、硬骨魚類に見られるような「板状鱗」、および軟骨魚綱に見られるような「硬鱗」を指す。

魚における「慢性ストレス」の用語は、時間とともに増大して長期に持続するストレスの多い状況を反映するストレスを意味し、かかる状況は、取り扱い、水質悪化、ストック密度、捕食、および風車（windmills）、漁船による輸送、接触等その他いくつかの人の活動の要因によるものである。慢性ストレスはこのように、魚が完全には回復できない長

50

期に持続する条件である。ストレス因子の直接の影響、ならびに内分泌レベル、免疫システムまたは機能的レベルで生じる変化は、(前)病理学的結果に影響し得て、これは魚の福祉を低下させる。

「魚からうろこを得る」という用語は、前記(生きているか死んだ)魚の皮から、少なくとも1枚のうろこを、例えば微細ピンセットを用いて除去することを意味する。前記うろこは、魚の体の任意の部分から採取することができる：すなわち、背側、頭腹側、中腹側、尾側、右側または左側など。本発明の方法を標準化するために、うろこは胸びれの背側の中背腹ゾーンから採取した。試料収集のこの非侵襲的な方法は、除去されたうろこが短期間で再生するため、魚には影響を及ぼさない。これらの再生うろこは、経験したストレスに関して同一のグルココルチコイドの取り込みプロファイルを示すことが証明され、したがって、明確に定義された時間枠内の慢性的ストレスを定量化するための、追加のツールを提供する。

#### 【0014】

うろこ1枚の重量は、魚種にだけでなく魚の年齢にも依存し、稚魚は小さいうろこを有するため、必要なうろこの数はこれらの要因の両方に依存する。そのため、本発明の方法は、例えば100mgのうろこに対応する標準化されたうろこ量を用いて、標準化した；しかし、試験の指摘によれば、より少量(例えば、80、60、40、20、10、5、1mg、などのうろこ)を用いることも可能である。例えば100mgのうろこに対応するうろこの数は、多くの場合、約40~80枚のうろこ、例えば60枚のうろこであるが、本発明の方法を、上記のような両因子を考慮して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10または11枚以上のうろこを使用して実施可能であることは、明らかである。

したがって、本発明は、また、上述の方法に関し、魚から少なくとも1枚のうろこを得ることが、前記魚から40~80枚のうろこを得ることである。

#### 【0015】

「うろこからグルココルチコイドを抽出する」という用語は、前記うろこからグルココルチコイドを分離/抽出するための任意の方法に関する。本発明の典型的な、しかし非限定的な抽出方法は、水相から有機相への、グルココルチコイドの抽出を含む。例えば、使用可能な抽出溶媒は、メタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、ジエチルエーテル等である。しかし、好ましい溶媒は、メタノールである。

したがって本発明は、グルココルチコイドの抽出が、メタノールを抽出溶媒として添加することにより実施される、上記の方法に関する。本発明の抽出の例は、以下である：均質化うろこ試料0.1g±0.001gを、10mLの試験管に秤量する。続いてメタノール8mLを抽出溶媒として添加し、0.5μg·L<sup>-1</sup>のコルチゾール-d<sub>4</sub>溶液10μLを、内部標準として添加する。試料を30秒間ボルテックス混合し、室温で1時間、60rpmでオーバーヘッドシェーカー上に置き、7、3500×gで10分間遠心分離する。すべての上清を採取し、窒素下60で窒素エバポレーターを用いて乾燥するまで蒸発させ、後続の固相抽出(SPE)のために、5mLのH<sub>2</sub>O/MeOH(80:20;v/v)中に再構成する。

#### 【0016】

用語「うろこから抽出したグルココルチコイドを精製する」とは、本発明のグルココルチコイドを、純粋にまたはさらに純粋にし、および濃縮するかまたはさらに濃縮するための、および/または可能な限り多くの不純物を除去するための、任意の方法に関する。

特に、本発明はまた、メタノールを用いた抽出の後にSPE(固相抽出)が続く、上記の方法にも関する。本発明の精製ステップの非限定的な例は、以下である：C18SPEカラムを3mLのメタノールと続いて3mLの超純水でコンディショニング後、上記のようにして得られた試料を供する。カラムを4.5mLのH<sub>2</sub>O/MeOH(65:35;v/v)で洗浄し、保持された化合物を、2.5mLのH<sub>2</sub>O/MeOH(20:80;v/v)で10mLの試験管に溶出し、窒素下60で窒素エバポレーターを用いて乾燥するまで蒸発させる。試料を最後に、バイアル内の100μLのH<sub>2</sub>O/MeOH(80:20;v/v)中に再構成し、タンデム質量分析と組み合わせた超高速液体クロマト

10

20

30

40

50

グラフィー ( U P L C - M S / M S ) により分析する。

「精製したグルココルチコイドを定量化する」という用語は、上記のように抽出 / 精製後に得られたグルココルチコイドの量を決定するための、任意の方法を指す。

【 0 0 1 7 】

より具体的には、本発明は、抽出され精製されたグルココルチコイドの定量化が、タンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィー ( ( U ) H P L C - M S / M S ) <sup>47 - 48</sup>、紫外線検出 ( H P L C - U V ) およびダイオードアレイ検出 ( H P L C - D A D ) <sup>49 - 50</sup> または蛍光検出 ( H P L C - F L ) <sup>51 - 52</sup> と組み合わせた高速液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー ( G C ) <sup>53 - 54</sup>、(放射)(酵素)免疫測定法 ( R I A ) <sup>55 - 56</sup> ( E I A ) <sup>57 - 58</sup> またはセンサーベースの技術 <sup>59 - 60</sup> によって実施される、上述の方法に関する。

10

本発明はまた、タンデム質量分析と組み合わせた液体クロマトグラフィーが、超高速液体タンデム質量分析である、上述の方法に関する。

より具体的には、本発明は、免疫測定法が、ラジオイムノアッセイまたは酵素免疫測定法である、上述の方法に関する。

【 0 0 1 8 】

「定量化グルココルチコイドと慢性ストレスレベルの相関をとる」という用語は、ストレスを受けた硬骨魚がコルチゾールを生成し、これが血流中に放出されるという事実を指す。このストレス負荷が時間的に持続されると、コルチゾールは、この期間の間に血液中を循環する。うろこの構造を考慮すると、この生理活性かつ遊離の循環コルチゾールの一定割合は、うろこに取り込まれる。うろこが時間と共に成長すると、これはコルチゾールを、したがって時間におけるストレス負荷を定量化する機会を与える。これを知り、変化するストレス負荷にさらされる魚のうろこを、グルココルチコイドについて分析することができる。例えば、小さなストレス負荷にさらされている魚 (すなわち、低減された容積 (例えば元の容積の 25%) への、1日おきに 30 分間の閉じ込め) は、 $1.70 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  の平均コルチゾール量を有し、一方高度なストレスの魚 (すなわち、1日おきに 10% 容積に 30 分間の閉じ込め + 5 分間追い回し、+ 週に 1 回 1 分間空気に暴露する) では、これは  $3.44 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  である。

20

したがって本発明は、本質的に、魚からサンプリングした魚のうろこの、前記魚における慢性ストレスレベルを決定または定量化するための使用に関する。

30

【 0 0 1 9 】

本発明は、定量化 / 決定が、上記の方法に従った方法により行われる、上述の使用にも関する。

うろこは、それらが非侵襲的に収集されるため、慢性ストレスの定量化のための最も重要な基質である。しかし、耳石、棘、鰭条などの他の石灰化基質も、一定の状況においては、慢性ストレスの定量化のための基質と同様に使用することができる。後者の定量化は、うろこについて上述したのと同様の方法で行うことができる。特に、棘と鰭条はハサミで切断し、それらを小片にカットして均質化し、一方耳石はメスで除去し、乳鉢を用いて粉砕することにより均質化する。

柔鰭条は柔軟で、先端部で分節および分岐し、先端に新しい分節を追加することにより延長される。棘は分節していないが、基底から癒合しており、持続的な成長を示す。耳石は、内耳のバランスの器官の一部であり、アラゴナイトの形態の結晶化した炭酸カルシウム、およびオトリン (otoline) と呼ばれる繊維質のコラーゲン様タンパク質から、主として構成される。これらは、放射状に堆積され、体細胞の成長がない場合には維持される、容易に識別可能な毎日の増分を表示する。柔鰭条およびうろこは、失われたかまたは損傷された場合には、急速に再生可能である。

40

【 0 0 2 0 】

したがって本発明はさらに、魚からサンプリングした棘、鰭条、耳石などの他の石灰化基質の、前記魚の慢性ストレスレベルを定量化するための使用に関する。

したがって本発明はさらに、魚における慢性ストレスレベルを定量化する in vitro の方

50

法であって、

- 前記魚から少なくとも1つの棘、鰭条または耳石を得ること、
- 前記棘、鰭条または耳石からグルココルチコイドを抽出すること、
- 前記棘、鰭条または耳石から抽出されたグルココルチコイドを精製すること、
- 前記精製されたグルココルチコイドを定量化すること、および
- 前記定量化されたグルココルチコイドと慢性ストレスレベルの、相関をとること、を含む、前記方法に関する。

本発明を、以下の非限定的な実施例によって説明する。

#### 【実施例】

##### 【0021】

例1：ヨーロピアンシーバス (Dicentrarchus labrax) のうろこにおけるグルココルチコイドを定量化するための、UPLC-MS/MS法の開発および検証

方法および材料

機器、材料、および試薬

クロマトグラフィー分析は、Acquity Ultra Performance LC BEH C18カラム (1.7 μm; 2.1 × 100 mm) を用いてAcquity UPLC-MS/MS Premier XE (Waters, Milford, USA) で実施した。試料は、Turbovap (商標) 窒素エバポレーター (Biotage, Sweden) で乾燥まで蒸発させた。固相抽出 (SPE) 用のGrace Pure (商標) SPE C18-Maxカラム (500 mg, 6 ml) は、Grace Davison Discovery Sciences (Lokeren, Belgium) から入手した。抽出溶媒としての、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 勾配グレードのメタノール (Hipersolv Chromanorm) は、VWR International BVBA (Leuven, Belgium) から入手し、一方、Biosolve BV (Valkenswaard, The Netherlands) からのLC-MS無水メタノールおよびUPLC-MSグレードギ酸、およびMillipore (Billerica, USA) からのMilli-Q勾配Q-Gard 2の超純水を、移動相溶媒として使用した。

##### 【0022】

化合物、標準、および溶液

分析証明書を持つ製品のみを使用した。コルチゾール、コルチゾン、17β-ヒドロキシプロゲステロン、および11-デオキシコルチゾールは、Sigma-Aldrich (Diegem, Belgium) から入手した。テトラヒドロコルチゾールおよびテトラヒドロコルチゾンは、Sequoia Research Products Ltd (Pangbourne, United Kingdom) から入手した。CDN Isotopes (Pointe-Claire, Canada) からのコルチゾール-d<sub>4</sub>を、内部標準として使用した。

すべての化合物および内部標準の、1 mg · mL<sup>-1</sup>の個々のストック標準溶液は、メタノール中に調製し、4℃で保存した。0.005 mg · L<sup>-1</sup> ~ 0.1 mg · L<sup>-1</sup>までの範囲の校正標準は、0.5 μg · L<sup>-1</sup>のコルチゾール-d<sub>4</sub>溶液10 μLを、100 μLのH<sub>2</sub>O / MeOH (80 : 20; v/v)中のそれぞれ1 μg · L<sup>-1</sup>の標準溶液0.5 μL、1 μL、2.5 μL、5 μL、および10 μLに添加することにより調製した。100 mgの試料を使用したもので、これは、基質中5 μg · kg<sup>-1</sup> ~ 100 μg · kg<sup>-1</sup>の範囲に相当する。

##### 【0023】

サンプリング

すべての石灰化構造は、2-フェノキシエタノールで深く麻酔し脊髄切断により屠殺したヨーロピアンシーバス (Dicentrarchus labrax) からサンプリングした。すべての魚は約100 gの重量であった。胸びれの背側の左中背腹ゾーンから60枚のうろこを、微細ピンセットで皮から除去した。尾びれからの4個の背棘と6個の柔鰭条は、ハサミを使用して取得した。2つの矢状耳石は、開いた頭骨から採取した。全試料は超純水ですすぎ、室温でティッシュペーパー上空気乾燥させた。

##### 【0024】

試料調製

うろこ、棘、および柔鰭条は、ハサミで微細片に切断した。耳石は乳鉢で粉碎した。ハサミと乳鉢は、エタノールと続いて超純水で洗浄し、ティッシュペーパーで乾燥させた。

10

20

30

40

50

均質化した試料  $0.1 \text{ g} \pm 0.001 \text{ g}$  を、 $10 \text{ mL}$  の試験管に秤量した。続いて  $8 \text{ mL}$  のメタノールを抽出溶媒として添加し、 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  のコルチゾール- $d_4$  溶液  $10 \mu\text{L}$  を、内部標準として添加した。試料を  $30$  秒間ボルテックス混合し、室温で  $1$  時間、 $60 \text{ rpm}$  でオーバーヘッドシェーカー上に置き、 $7$ 、 $3500 \text{ g}$  で  $10$  分間遠心分離した。すべての上清を採取し、窒素下  $60$  で窒素エバポレーターを用いて乾燥するまで蒸発させ、 $5 \text{ mL}$  の  $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH}$  ( $80 : 20 ; \text{v} / \text{v}$ ) 中に再構成した。C18 SPEカラムを  $3 \text{ mL}$  のメタノールと続いて  $3 \text{ mL}$  の超純水でコンディショニング後、試料を供した。カラムを  $4.5 \text{ mL}$  の  $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH}$  ( $65 : 35 ; \text{v} / \text{v}$ ) で洗浄し、保持された化合物を、 $2.5 \text{ mL}$  の  $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH}$  ( $20 : 80 ; \text{v} / \text{v}$ ) で  $10 \text{ mL}$  の試験管に溶出し、窒素下  $60$  で窒素エバポレーターを用いて乾燥するまで蒸発させた。試料を最後に、バイアル内の  $100 \mu\text{L}$  の  $\text{H}_2\text{O} / \text{MeOH}$  ( $80 : 20 ; \text{v} / \text{v}$ ) 中に再構成し、UPLC-MS/MSにより分析した。

10

## 【0025】

## LC-MS/MS分析

グルココルチコイドを、移動相 A および B の勾配溶出を使用して分離した。移動相 A は、超純水と  $0.1\%$  ギ酸の混合物であり、一方移動相 B は、メタノールと  $0.1\%$  ギ酸の混合物であった。最初に、勾配溶出は、 $20\%$  ( $\text{v} / \text{v}$ ) の移動相 B で開始した。次に、移動相 B を  $1.5$  分で  $56\%$  まで、 $6.5$  分で  $63\%$  まで、 $7.5$  分で  $99.1\%$  まで増加し、その後これを  $8$  分まで  $99.1\%$  に維持し、最終的に  $9$  分で  $20\%$  まで減少させ、ここで  $10$  分まで維持した。流量は、 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{分}^{-1}$  の一定値に維持し、 $10$  分の実行時間を得た。試料はオートサンプラーで  $7$  に冷却した。注入容量は  $40 \mu\text{L}$  とし、一方カラム温度は  $30$  に維持した。

20

## 【0026】

クロマトグラフィー分析は、最適な感度および選択性を達成するために、複数反応モニタリング (MRM) モードで使用する質量分析計で実施した。すべての標的分析物のために、2 種の前駆フラグメントイオンの遷移を決定した。機器のパラメータは、メタノール中  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  の標準液 +  $0.1\%$  ギ酸への、 $10 \mu\text{L} \cdot \text{分}^{-1}$  の流量での直接注入により、最適化した。2 種の前駆フラグメントイオンの遷移の使用により、両遷移の間の比率の決定が可能となり、これは、相対保持時間と共に、Commission Decision No. 2002/657/EC<sup>61</sup> の要件に従った各分析物の同一性の同定および確認のために使用した。質量分析計は、正のエレクトロスプレーイオン化モード (ESI<sup>+</sup>) で使用した。すべての化合物は、それらのプロトン付加体  $[\text{M} + \text{H}]^+$  と共に分析した。MS 検出器の設定は以下の値とした：ソース温度  $120$ 、ガス流  $800 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$  で脱溶媒和温度  $300$ 、コーンガス流量  $50 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ 、およびキャピラリー電圧  $3 \text{ kV}$ 。アルゴンを、 $1.11 \cdot 10^{-2} \text{ mbar}$  の圧力で衝突ガスとして使用した。全化合物の保持時間、前駆イオン、生成イオン、コーン電圧、および衝突エネルギーを示した最適化 UPLC-MS/MS 条件を、表 1 に示す。

30

## 【0027】

表 1. 化合物ごとの最適化 UPLC-MS/MS 条件

【表 1】

化合物	保持時間 (分)	前駆イオン (m/z)	フラグメントイオン 定量化*と認定 (qualification) トレース(m/z)	コーン 電圧(V)	衝突エネルギー (eV)
20ジヒドロコルチゾン	2.80	363.3	163.00*	35	25
			267.20		22
コルチゾン	2.88	361.2	121.00*	45	37
			163.00		24
コルチゾール-d <sub>4</sub>	3.14	367.2	121.10*	35	20
			331.30		18
コルチゾール	3.15	363.2	121.10*	35	20
			327.30		18
11-デオキシコルチ ゾール	3.95	347.2	97.10*	40	25
			109.10		30
テトラヒドロコルチゾ ール	4.26	367.1	313.20*	20	10
			331.30		10
テトラヒドロコルチゾン	4.49	365.1	329.20*	30	15
			347.20		12
17 $\alpha$ -ヒドロキシプ ロゲステロン	5.66	331.2	97.00*	35	25
			109.10		25

データ分析は、WatersからのQuan/Targetlynxソフトウェアを用いて行った；分析結果は、包含係数(k)が2(95%の信頼区間)における、値( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) $\pm$ 拡張測定不確かさ( $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )として報告した。

【0028】

検証

すべての石灰化構造の検証試料は、同様の条件下で飼育したそれぞれ51、51、57、および118匹の魚からのうろこ、棘、柔鱗条、および耳石のブリーングによって作製された。上記の分析物/基質の組み合わせについての認証標準物質、実験室間の比較試験、または任意の他の検証された方法は存在しないため、検証は、検証試料への標準添加を用いて行った。すべての石灰化構造に対して、1~50 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ の範囲の5つの濃度レベルを5重で試験し、これを、1ヶ月の期間内の4つの異なる日に、実験内再現性条件(intra-reproducibility conditions)のもとで、すなわち2人が異なる溶液および1つのUPLC-MS/MSシステムを使用して、繰り返した。すべての検証実験は、許可された者により、制御された環境下で、校正機器と制御された溶液を用いて、標準EN ISO/IEC 17025<sup>6,2</sup>の要件に従って実施した。分析は、異なる校正標準、ブランク、陰性および陽性対照(すべて希釈液中)からなる標準化された順序を用いて行った。すべての化合物についての結果は、(相対)保持時間および化合物とその断片の相対的なイオン強度を評価することにより、評価した。全ての検証パラメータは、Commission Decision No. 2002/657/ECの要件に応じて決定し、評価した：真度、精度、動作範囲、直線性、決定限界(CC)、検出能力(CC)、感度、および選択性。

【0029】

10

20

30

40

50

全化合物の見かけの回収ならびに精度（反復性および実験室内再現性）は、実験内再現性条件下で決定され、すべての濃度レベルについて20の分析結果および、化合物および基質あたり全部で100の分析結果が得られた。濃度レベルが低いため、ディクソンの異常値試験<sup>6 3</sup>およびGrubbs検定<sup>6 4</sup>を実施して、可能な外れ値を検出した。決定限界（CC）は、検量線の切片に実験室内再現性の標準偏差の2.33倍を加えて算出し（ $= 1\%$ ）、一方検出能力（CC）は、CCの濃度の実験室内再現性の標準偏差の1.64倍を加えて算出した（ $= 5\%$ ）。拡張測定不確かさは、真度および実験室内再現性の検証データに基づき、2つの異なるアプローチ、すなわち線形加算により、および二次加算またはNordtest法により決定した。また、方法の堅牢性および希釈液中および基質中の検体の安定性は、方法の開発中にモニタリングした。最後に、拡張測定不確かさは、線形加算によってだけでなく、二次加算またはNordtest法<sup>4 7 - 5 2</sup>によって決定した（文献には好ましい方法に関するコンセンサスはない）。

10

#### 【0030】

##### 結果

魚のうろこにおける、コルチゾール、その前駆体である17-ヒドロキシprogesteronおよび11-デオキシコルチゾール、コルチゾン、および重要な代謝物であるテトラヒドロコルチゾール、およびテトラヒドロコルチゾンについてのUPLC-MS/MS定量法は、EN ISO/IEC 17025:2005認定の環境で開発され、Commission Decision No. 2002/657/ECの要件に従って検証された。ほとんどの魚においてストレス応答を反映していると考えられる古典的なパラメータとして、コルチゾールは血流中に放出されて、石灰化構造への組み込みが可能となり、これにより、慢性ストレス研究のための標的分析物となっている。その前駆体17-ヒドロキシprogesteronおよび11-デオキシコルチゾールも、可能な腎間外経路の検出をカバーするために分析に含めた。代謝物テトラヒドロコルチゾールおよびテトラヒドロコルチゾンも含めたが、これは、外因性グルココルチコイド（水中）が内分泌かく乱物質として作用し、試験する石灰化構造のグルココルチコイドプロファイルに影響を与える可能性があるためである。この方法は、棘、柔鱗条、および耳石についても試験して検証された。うろこのサンプリングの利便性が検討される。

20

#### 【0031】

##### 方法の開発

##### サンプリングおよび試料調製

各石灰化構造について、サンプリング位置を決定した。うろこは、変態後の魚における中胚葉性骨格要素である。魚の様々な側面（例えば、背側、頭腹側、中腹側、または尾側）から採取したうろこにおけるコルチゾール含有量に差はなく、左側と右側から採取したうろこの間にも差は見出されなかった。側線のうろこは、構造が異なるため避けるべきである。簡便さと将来の研究のために（水産養殖における適用可能性を考慮して）、うろこは、胸びれの背側の中背腹ゾーンから選択した。シーバスの棘は、特に、第一背びれの頭骨部分に見出される（8~10個の棘）。棘は分節しておらず、基底に癒合しており、したがって柔鱗条よりも硬い。グルココルチコイドのより高い濃度は、そのベースにある棘において見出され、この組織は経時的なコルチゾールの取り込みについてよりよい微調整を必要とする。さらに、棘の末端部を除く全体は上皮で覆われている。背びれ、頭腹部のひれ、中腹部のひれ、または尾びれから採取した柔鱗条におけるコルチゾール含有量に、差は見出されなかった。水産養殖における適用可能性を考慮して、尾びれからの柔鱗条を選択した。矢状耳石は、最も大きく、最も取り出しが簡単であるために選択された。

30

40

#### 【0032】

ロジスティックな実行可能性と分析性能の最適な組み合わせの点で、分析のための基質の最適量は、各石灰化構造について異なる量の試料をスパイクすることにより、すなわち、同じ魚から異なる数のうろこ、棘、および柔鱗条を、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ の標的分析物を用いてスパイクすることにより、決定した。うろこ、棘、および柔鱗条についての結果を図3に示す。水産養殖および野生生物における将来の適用性を考慮して、検証のために、すべての石灰化構造について0.1gを選択した。

50

図 3 . 検証用のうろこ、棘、および柔鱗条についての基質の最適量

内因性<sup>6 5</sup>および外因性のグルココルチコイドを含むことが知られている粘液を除去するために、全試料を、超純水により集中的に洗浄した。

異なる抽出効率の4種の溶媒を試験した：メタノール、2-プロパノール、アセトニトリル、ジエチルエーテル。メタノールは、うろこならびに棘および柔鱗条における様々なグルココルチコイドについて、最良の結果を与えた；耳石中では、溶媒間に明確な差は見られなかった（データ示さず）。

次に、メタノールによる時間依存性のインキュベーション（15、60、120分および16時間）および反復抽出を試験した。魚のうろこ中のコルチゾールについて、抽出の改善は、60分のインキュベーション後に見られなかった。2回目の抽出での改善も、15分2サイクルの組み合わせ（60分1サイクルに対して）での改善も見られなかった。うろこ、棘、および柔鱗条についての結果を図4に示す。

図 4 . うろこ、棘、および柔鱗条におけるコルチゾールについての抽出時間と反復の最適化【0033】

高いスループットとコスト効果的な方法が必要とされているため、うろこでの抽出は、8mlのメタノールによる、オーバーヘッドシェーカー上室温で1時間を標準とした。

#### SPE手順

C18相SPEカートリッジは、血漿<sup>6 6</sup>、尿<sup>6 7</sup>、糞<sup>6 8</sup>などの生物学的試料からのグルココルチコイド抽出に成功して使用され、したがってこのカラムの種類を、本研究における石灰化構造からの選択されたグルココルチコイドの抽出および精製を最適化するように選択した。

Grace Pure（商標）SPE C18-Max（500mg、6ml）カラムは、シリカベースの支持体上に重合的結合した17.1%の炭素が装填された逆相吸着剤である。逆相抽出法を選択した理由は、極性の試料基質からの、適度に極性から非極性の化合物に結合するためである。500mgの床のサイズは、25mgの吸着剤保持能力を提供する。うろこおよび他の石灰化構造におけるグルココルチコイドの予測濃度範囲を考慮すると、この保持能力は、関心のあるすべての分析物を結合するのに十分であろう。SPEのためのコンディショニング、試料の負荷、洗浄および溶出ステップは、溶媒の種類と量について最適化した。3mlのメタノールによるコンディショニングステップで吸着剤のリガンドを活性化し、続いて3mlの超純水で吸着床を平衡化することにより、最良の結果が得られた（コルチゾールの平均回収率>90%）。両方の溶媒の最小容量は2.5mlであり、一方3mlより多くの容量を使用した試験では、精製は改善されなかった。蒸発された試料を5mlのH<sub>2</sub>O/MeOH（80:20；v/v）に再懸濁させる、試料の負荷ステップは、最良の結果をもたらした。超純水および/またはメタノールの割合を変化させた溶媒の組み合わせは、次善の結果をもたらした。カラムを4.5mlのH<sub>2</sub>O/MeOH（65:35；v/v）で洗浄することは、グルココルチコイドの回収について最良の結果をもたらした。

#### 【0034】

メタノールのより高い濃度は、グルココルチコイドの溶出をもたらし、一方メタノールのより低い濃度は、ノイズの増加をもたらした。保持された化合物を、10mlの試験管内の2.5mlのH<sub>2</sub>O/MeOH（20:80；v/v）に溶出させた。低い溶出体積または超純水の増加は、すべてのグルココルチコイドを回収せず、一方より高い溶出体積またはメタノールの増加は、効率に関して準最適であり、これは、基質からより多くの妨害化合物が溶出されたからである。蒸発の後、試料をバイアル内の100μLのH<sub>2</sub>O/MeOH（80:20；v/v）に再懸濁させ、LC-MS/MSによって分析した。100μL中での再構成は、デュプロ注入の可能性を有するように選択した。メタノールに対する超純水の比率を変化させる溶媒の組み合わせは、準最適な結果をもたらしたが、これは、クロマトグラフィー分析のための勾配が最適化されて、H<sub>2</sub>O/MeOH（80:20；v/v）で開始されたからであった。H<sub>2</sub>O/MeOH（20:80；v/v）まで

10

20

30

40

50

の濃度での再構成は可能であったが、クロマトグラフィーのピーク形状にマイナスの影響を及ぼした。

#### 【0035】

##### クロマトグラフィー分析

Acquity Ultra Performance LC BEH C18カラム (1.7  $\mu\text{m}$ ; 2.1  $\times$  100 mm) を用いたクロマトグラフィー分析を最適化するための最初のステップにおいて、全化合物ならびに内部標準を、正 (ESI<sup>+</sup>) および負 (ESI<sup>-</sup>) のエレクトロスプレーイオン化モードでの質量分析計を使用して調整した。ESI<sup>-</sup> で得られた結果は小さなピークと少ないノイズを与え、一方 ESI<sup>+</sup> は、全体的に良好な結果を与え、これをさらなる試験のために選択した。

10

#### 【0036】

第2のステップにおいて、超純水およびメタノールとアセトニトリルなどの非極性溶媒を0.1%ギ酸と共に用いる、異なる勾配系を試験した。最初に、超純水とアセトニトリルを使用した第1の勾配を試験した：アセトニトリルの高い出発濃度は短い保持時間を与え、コルチゾール、コルチゾンおよび17 $\beta$ -ヒドロキシプロゲステロンの分離のみが見られた；アセトニトリル濃度をゆっくりと増加する勾配を実行すると、17 $\beta$ -ヒドロキシプロゲステロンのピークの損失と、12分の実行時間がもたらされ、アセトニトリルは移動相として適切でないとされた。続いて超純水とメタノールを使用した勾配を試験した：メタノール濃度の緩やかな増加から極めて迅速な増加の範囲の、異なる勾配を実行した後に、全化合物は完全に分離され、異なる添加剤の種々の濃度を試験した。0.5%酢酸の使用は、pH 3.0での2 mMのギ酸アンモニウムまたはpH 5.0での酢酸アンモニウムよりも良好な結果を与えたが、0.1%ギ酸よりも劣っていた。続いてギ酸の濃度を最適化し、0.1%ギ酸を選択した；ギ酸の低い濃度は、他の添加剤を用いる方法からのキャリーオーバーのために、不安定な結果をもたらした。最後に、カラム温度および流量を、それぞれ30 $^{\circ}\text{C}$ 、0.4 ml $\cdot$ 分<sup>-1</sup>に最適化して、10分の総実行時間とした。

20

最後のステップで、MS/MS法を最適化した：滞留時間を最適感度のために増加して、全化合物のすべてのイオンのピークに渡る点が少なくとも20のデータ点からなることを確実にし、MSフレームウィンドウをそれに応じて最適化した。

#### 【0037】

##### 検証

うろこ（または任意の他の石灰化構造）におけるグルココルチコイドの濃度の値は、公開された文献には載っておらず、そのため我々は、1  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ~ 50  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  の初期動作範囲を選択した。

30

魚のうろこ中のコルチゾールの見かけの回収は、Commission Decision No. 2002/657/ECの要件に従って80% ~ 110%の性能基準内である、88.14% ~ 98.85%の範囲のCCレベルより下か、このレベルであるか、またはこれより上である。プールされた検証試料の均質化が最適ではなかったという事実にもかかわらず（すなわち、均質な粉末ではなく、非常に細かい断片のプールであった）、魚のうろこ中のコルチゾールについての再現性は、12.36% ~ 17.15%の範囲であった。実験室内の再現性は、14.63% ~ 20.02%の範囲であった。魚のうろこにおいて分析された化合物の、真度、精度および測定不確かさの結果を表2に示す。

40

#### 【0038】

表2：魚のうろこにおける全化合物についての、真度（見かけの回収AR、パーセント）の値、精度（再現性CV<sub>r</sub> および実験室内での再現性CV<sub>R</sub>）についての変動値の係数（CV、パーセント）、および拡張測定不確かさ（U、パーセント）。

【表 2 - 1】

化合物	レベル ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	AR (%)	CV <sub>r</sub> (%)	CV <sub>R</sub> (%)	U <sup>1</sup> (k=2) (%)	U <sup>1</sup> (k=3) (%)	U <sup>2</sup> (k=2) (%)
コルチゾール	1	98.85	17.15	20.02	41.19	61.21	66.16
	5	88.14	12.36	15.01	41.88	56.89	58.08
	10	98.20	16.21	18.05	37.90	55.95	61.44
	25	90.97	13.81	14.85	38.73	53.58	56.08
	50	91.16	13.47	14.63	38.10	52.73	55.57
<b>前駆体</b>							
17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン	1	114.00	27.83	32.08	78.16	110.24	106.46
	5	104.44	33.09	43.74	91.92	135.66	131.31
	10	123.75	13.09	21.98	67.71	89.69	91.08
	25	135.64	6.64	16.23	68.10	84.33	96.06
	50	141.34	7.79	18.38	78.10	96.48	109.63
11-デオキシコルチゾール	1	<sub>-3</sub>	<sub>-3</sub>	<sub>-3</sub>	<sub>-3</sub>	<sub>-3</sub>	<sub>-3</sub>
	5	68.53	20.09	26.44	84.35	110.79	96.79
	10	84.55	16.83	31.71	78.87	110.58	95.44
	25	102.42	8.59	15.37	33.16	48.53	56.19
	50	113.49	6.13	14.88	43.25	58.13	62.77

10

20

【表 2 - 2】

		代謝物					
コルチゾン	1	104.37	38.94	66.90	138.17	205.07	196.46
	5	96.88	27.81	38.51	80.14	118.65	112.94
	10	93.67	24.26	37.06	80.45	117.51	108.22
	25	83.21	19.78	25.61	68.01	93.62	82.52
	50	84.28	17.20	18.91	53.54	72.45	68.23
20-ジヒドロコルチゾン	1	99.63	20.58	38.46	77.29	115.75	136.72
	5	102.05	18.72	37.38	76.81	114.19	119.88
	10	129.33	12.97	22.44	74.21	96.65	71.89
	25	138.74	12.35	18.61	75.96	94.57	73.71
	50	143.29	6.66	15.51	74.31	89.82	84.79
テトラヒドロコルチゾール	1	90.23	35.70	39.35	88.47	127.82	113.47
	5	95.97	31.72	30.10	64.23	94.33	90.78
	10	103.69	27.61	27.94	59.57	87.51	87.88
	25	104.04	25.11	24.42	52.88	77.30	78.88
	50	116.79	17.33	21.16	59.11	80.27	80.80
テトラヒドロコルチゾン	1	103.17	45.30	50.81	104.79	155.60	150.09
	5	108.83	26.85	37.09	83.01	120.10	116.11
	10	106.80	25.01	31.64	70.08	101.72	99.63
	25	103.61	24.83	34.06	71.73	105.79	104.19
	50	110.41	15.60	21.90	54.21	76.11	76.61

10

20

30

<sup>1</sup> 包含係数 (k) がそれぞれ 2 (95% の信頼区間) および 3 (99% の信頼区間) での線形加算を用いた、拡張測定不確かさの算出。

<sup>2</sup> 包含係数 (k) が 2 (95% の信頼区間) の二次加算 (Nordtest法) を用いた、拡張測定不確かさの算出。

<sup>3</sup> クオリアファイヤーイオンについての不十分な応答。

【0039】

今後の研究において、基質に適合した検量線は実質的に実現不可能であるので、可能な基質の効果の決定を、希釈液中の検量線からのデータを、すべての石灰化構造における全化合物について  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  の範囲で基質に適合したものと比較することにより、行った。図 5 では、魚のうろこ中のコルチゾールについて顕著な効果は示されないが (試料の生物学的変動を考慮すると)、しかし希釈液および基質中の検量線は通常は分けられているので、希釈液中の検量線を用いた定量化が可能である。

図 5 . 魚のうろこ中のコルチゾールについての、希釈液中および基質中の検量線

その後、すべての石灰化構造内の全化合物に対する応答の直線性を、希釈液における、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  の範囲の、5 個の校正点からなる 4 重の検量線を用いて、実験室間の再現性条件下で分析して試験した。全化合物についてこの範囲の線形性を評価した場合、0.99 より低い決定係数 ( $R^2$ ) の値は見出されなかった。さらに、計算されたモデルは、全化合物について正規分布を示した。魚のうろこにおける全化合物についての直線性、CC、および CC の結果を、表 3 に示す。

40

50

## 【 0 0 4 0 】

表 3 : 魚のうろこにおける全化合物についての、検量線の決定係数 ( $R^2$ )、決定限界 ( $CC$ 、 $\mu g \cdot kg^{-1}$ )、および検出能力 ( $CC$ 、 $\mu g \cdot kg^{-1}$ )。

## 【表 3】

化合物	$R^2$	$CC\alpha$ ( $\mu g \cdot kg^{-1}$ )	$CC\beta$ ( $\mu g \cdot kg^{-1}$ )
コルチゾール	0.999	2.74	4.64
コルチゾールの前駆体			
17 $\alpha$ -ヒドロキシプロゲステロン	0.998	2.37	3.90
11-デオキシコルチゾール	0.997	1.79	2.88
コルチゾールの代謝物			
コルチゾン	0.996	3.74	6.36
20-ジヒドロコルチゾン	0.998	2.43	4.07
テトラヒドロコルチゾール	0.997	4.84	8.25
テトラヒドロコルチゾン	0.992	0.99	1.68

10

20

30

## 【 0 0 4 1 】

この方法の感度を、ブランクの基質試料の希釈系列を作製することによって決定し、予測動作範囲を考慮した場合の、魚のうろこにおける全化合物についての良好な感度を有する方法が得られた。方法の選択性は、ブランクおよびスパイクされた試料を分析することにより証明された。スパイクされた試料において、全化合物は、予想保持時間でそれらの2つのイオン遷移を有して出現した。イオン比を標準的な注入と比較し、Commission Decision No. 2002/657/ECの要件に従って許容可能であることが見出された。さらに、干渉ピークは観察されなかった。

この方法の堅牢性を、抽出およびSPE精製などのすべての重要なステップについての方法の開発中に、最適値を変化させることにより試験した。

魚のうろこにおけるコルチゾール、その前駆体(17-ヒドロキシプロゲステロンおよび11-デオキシコルチゾール)、コルチゾンおよび代謝物(テトラヒドロコルチゾールおよびテトラヒドロコルチゾン)に対するUPLC-MS/MS法は、EN ISO/IEC 17025:2005認定の環境で開発され、Commission Decision No. 2002/657/ECの要件に従って検証され、その意図する目的に適していることが証明された。さらにこの方法は、棘、柔鰭条および耳石である他の3種類の石灰化構造に対しても試験され検証された。

40

## 【 0 0 4 2 】

例 2 : ストレス有り対ストレス無しのシーバス (Dicentrarchus labrax) のうろこにおけるグルココルチコイドレベルの定量化

方法および材料 (例1参照)

50

## 実験の設定

3つの条件の2回の反復で試験した：対照（低ストレス、中ストレスおよび高ストレス）。ストレスは、3週間の期間中にランダム適用された様々な種類のストレッサー（混雑、追い回しおよび空気曝露）の組み合わせであった。ストレッサーは、1日のうちいくつかの予測不可能な時点で、示されているように適用した：

- ・低ストレス：閉じ込め（25%容積）30分を1日おき
- ・中ストレス：閉じ込め（25%容積）30分、追い回し5分を1日おき
- ・高ストレス：閉じ込め（10%容量）30分、追い回し5分を1日おき、大気への曝露を週1回1分間

### 【0043】

血漿コルチゾールはデュプリケートで、Gorissenら<sup>6,9</sup>に従って96ウェルプレート中のRIAを使用して測定した。一次抗体は、コルチゾールに100%の交差反応性を示し、11-デオキシコルチゾールに0.9%、コルチコステロンに0.6%、および11-デオキシコルチコステロン、プロゲステロン、17-ヒドロキシプロゲステロン、テストステロンおよびエストラジオールに<0.01%の交差反応性を示した。「非特異物（non-specifics）」を除くすべてのウェルに、100 $\mu$ lのコルチゾール抗体（コルチゾール抗体[xm210]モノクローナルおよびIgG精製（Abcam）、50mMのNaHCO<sub>3</sub>、50mMのNaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、0.02%のNaN<sub>3</sub>、pH=9.6）を加え、4で一晚インキュベートした。翌日、プレートを200 $\mu$ l/ウェルの洗浄緩衝液（100mMトリス、0.9%のNaCl、0.02%のNaN<sub>3</sub>）で3回洗浄した。その後、非特異的部位を、各ウェルに100 $\mu$ lのブロッキング緩衝液（100mMトリス、0.9%のNaCl、0.02%のNaN<sub>3</sub>、0.25%正常ウシ血清）を添加することによりブロックした。プレートを覆い、37で1時間インキュベートした。続いて、10 $\mu$ lの標準（100mMトリス、0.9%のNaCl、0.1%の8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸、0.02%のNaN<sub>3</sub>を含有する、4pg~2048pgのコルチゾール/10 $\mu$ lのアッセイ緩衝液）、または10 $\mu$ lの非希釈血漿もしくは洗い流し培地（perifusion medium）を、指定されたウェルに添加した。非特異物およびB0に、10 $\mu$ lのアッセイ緩衝液を加えた。標準および試料を添加した後、90 $\mu$ l（333Bq）の<sup>3</sup>H-ヒドロコルチゾン（PerkinElmer, USA、アッセイ緩衝液中1:10,000）溶液を、すべてのウェルに添加した。プレートを室温で4時間インキュベートし、または4で一晚保存した。次いで、プレートを洗浄緩衝液で3回洗浄した。最後の洗浄ステップの後、すべてのウェルに200 $\mu$ lの「Optiphase hisafe-3シンチレーション液」（PerkinElmer, USA）を添加し、これを覆った。ベータ放射を、Microbeta Plus（Wallac/PerkinElmer, USA）を使用してウェルあたり3分の計数によって定量した。アッセイ間およびアッセイ内の変動は、それぞれ12.5%および3.5%であった。

### 【0044】

## 結果

10

20

30

【表 4】

血漿中コルチゾール			
	血漿中の平均コルチゾール濃度 (ng/ml)	標準偏差(ng/ml)	変動係数(%)
低ストレス			
反復1	274.81	151.81	55.24
反復2	100.86	101.70	100.84
全反復(20試料)	183.26	152.90	83.43
中ストレス			
反復1	319.00	106.04	33.24
反復2	190.58	136.65	71.70
全反復(20試料)	254.79	136.06	53.40
高ストレス			
反復1	112.64	95.22	84.53
反復2	187.92	73.90	39.32
全反復(20試料)	150.28	91.50	60.89

10

20

30

【 0 0 4 5 】

【表 5】

うろこ中のコルチゾール			
	うろこ中の平均コルチゾール濃度 ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	標準偏差( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	変動係数(%)
低ストレス			
反復1	1.90	1.00	53.58
反復2	1.50	1.70	109.19
全反復(20試料)	1.70	1.35	79.58
中ストレス			
反復1	2.40	2.00	83.29
反復2	2.10	1.50	69.13
全反復(20試料)	2.27	1.72	75.86
高ストレス			
反復1	3.20	2.30	69.57
反復2	3.60	4.00	109.08
全反復(20試料)	3.44	3.15	91.50

10

20

30

## 【0046】

例3：コイ (*Cyprinus carpio* L.) のうろこにおけるグルココルチコイドレベルの定量化方法および材料 (例1など参照)

## 実験の設定

各6匹の魚の、4つの条件の3回の反復でコイについて試験した：対照（ストレスなし）、デキサメタゾン（ストレス経路の阻害）、コルチゾール（ストレス経路の活性化）、および6週間ランダム適用の様式で与えられた種々のストレス。

## 【0047】

## 方法

実験手順はオランダの法律に従い、地元の倫理委員会によって承認された。コイ (*Cyprinus carpio* L.) は、Radboud University of Nijmegenで飼育し、既往歴を確実にした。成長した成魚（21日目：340 ± 92 g および 24.6 ± 2.4 cm；42日目：377 ± 108 g および 25.4 ± 2.5 cm）を、12：12時間の明：暗の下で保持し、1日に2食（9：30 a.m. および 15：30 p.m.）、体重の0.9%を与えて、20.0 ± 0.4 で6週間維持した。4つの群を、1群当たり2つのタンクの反復で、各140 Lのタンク当たり6匹の魚に設定した。CTR群の魚は、妨害なしで維持した。DEX群およびCORT群には、500 mg · kg<sup>-1</sup> でスパイクした餌を与えた。STRESS群には、1日1回ストレスを与えた；ストレスの種類、持続時間およびタイミングは

40

50

ランダムに適用され、以下を含む：網による捕獲（15～60分）、空気暴露（1～3分）、温度低下（5℃まで）、追い回し（10分まで）、および閉じ込め（低水位のバケツで）。全実験の間に、健康および挙動の劣化の兆候は認められなかった。42日後、魚を2-フェノキシ-エタノール（0.1% v/v）で麻酔して屠殺し、尾部血管から血液およびうろこ（個体発生および21日間再生うろこ）を収集した。血漿は、コルチゾール<sup>6</sup>、グルコース<sup>70</sup>、乳酸塩<sup>70</sup>、全カルシウム<sup>71</sup>、および重量オスモル濃度<sup>70</sup>について分析した。うろこは側線の背側の標準化された列からサンプリングした。標的遺伝子のMNEを、*ef1a1*、*rps5*およびβ-アクチンを参照遺伝子として用いて評価した<sup>72</sup>。すべてのパラメータは、SAS 9.4（SAS Institute Inc., Cary, NC）の線形混合モデルを用いて、処置、サンプリングの日およびそれらの相互作用（適切な場合）を固定効果としてモデル化した。タンクについてのランダム切片をモデルに導入して、タンク内の魚のクラスタリングを補正した。ダネット検定を実施して、処置と対照を比較した。

【0048】

結果

#### 1) 論理的根拠の制御および実験設定の実行

6週間の試験期間中、妨害なしのコイ（CTR）と毎日ストレスを与えたコイ（STRESS）を比較した。デキサメタゾン（DEX）またはコルチゾール（CORT）を与えた魚は、うろこにおけるコルチゾール取り込みについての、それぞれ陰性および陽性対照とした。すべての処置において、提供された餌は5分以内に消費され、条件因子<sup>73</sup>によって示されるようにすべての魚は臨床的に健康なままであり、死亡は観察されなかった。適切な水質は、毎日（pH、温度、溶存酸素）または毎週（亜硝酸塩、硝酸塩、アンモニウム）のモニタリングにより維持した。餌からの漏れによる、水に媒介されたグルココルチコイドの観察された効果に対する寄与は、排除可能である。コルチゾール、その前駆体および代謝物の、社内開発され検証された（うろこコルチゾールを参照）超高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析（UPLC-MS/MS）による分析は、水中でのコルチゾール濃度の上昇が、給餌後2.5時間以内にベースラインに戻ったことを明らかにした。

【0049】

一般的にストレスの指標として使用される5つの血液パラメータについての結果は、DEXの魚が陰性対照として、およびCORTの魚が陽性対照として考えられることを確認する（図6）。血漿コルチゾールは、CORT群で上昇しており（CORT対CTR：P<0.0001）、コルチゾールの餌から血中への吸収を確認した；STRESSの魚において、コルチゾールレベルは陰性対照と差がなく、後者が慢性ストレスの評価に不适当であることを示した。二次ストレスパラメータである血漿グルコースは、予想されるグルココルチコイドの作用（糖新生）を反映するが、これはDEXで増加し（DEX対CTR：P<0.0001）、一方CORT（CORT対CTR：P=0.2004）およびSTRESS（STRESS対CTR：P=0.0531）では有意な差はなく、これはDEXのより強力な作用と整合した。血漿乳酸塩は、DEX（DEX対CTR：P<0.0001）およびCORT（CORT対CTR：P=0.0004）で増加したが、しかしSTRESS（STRESS対CTR：P=0.4224）では有意ではなく、DEXとCORTの下流の効果と整合した。血漿総カルシウムおよび重量オスモル濃度は影響を受けず、処置が魚の回復力を超えず、ストレスを引き起こさなかったことを示した。我々は以下の結論を得た：(i) CTR、DEXおよびCORTの処置が、意図したグルココルチコイド作用を誘発した；(ii) STRESSの魚の血漿中において、HPI軸の活性化の兆候は認められなかった；(iii) 血漿パラメータは、所与の時点でのストレス応答のスナップショット以上のものを反映しないため、慢性ストレスの優れた予測因子ではない。

【0050】

上記から、慢性的にストレスを受けた魚における血漿コルチゾール値は、経験したストレスについての適切な読み出しを提供しないことになる。しかし、図7は、内分泌ストレ

10

20

30

40

50

ス軸が最も確かに活性化されることを示している。視床下部、下垂体前葉、および腎間の主要な遺伝子：*crf* (STRESS対CTR：P = 0.0002)、*pomc* (STRESS対CTR：P < 0.0001)、および*star* (STRESS対CTR：P = 0.0140)の発現は、実際有意に上方制御されている。負のグルココルチコイドフィードバックが、有意に減少した*pomc*発現 (DEX対CTR：P = 0.0236)によって示されている。

血漿コルチゾールのレベルでは見えない、慢性ストレスの第2の証拠は、えらの $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}^{74}$ のサブユニット1をコードする遺伝子の上方制御である (図8)。DEX (DEX対CTR：P = 0.0001)、CORT (CORT対CTR：P < 0.0001)およびSTRESS (STRESS対CTR：P = 0.0215)の魚において、有意に増大された発現レベルが観察され、コルチコイドの作用を示す。

要約すると、結果は、STRESS群の魚が慢性的にストレスを受けたことを示す。我々は次に、板状鱗におけるコルチゾールの定量化に着手した。

#### 【0051】

#### 2) 慢性ストレスのバイオマーカーとしての、魚の個体発生うろこにおけるコルチゾール

5枚 (21日目) から6枚 (42日目) のうろこを、検証されたUPLC-MS/MS法 (Commission Decision No. 2002/657/ECの要件に従って) によりNBN EN ISO/IEC 17025規制環境下で、コルチゾールについて分析した。CTRおよびDEXのすべての魚は、検出能力 (CC) 未満のうろこのコルチゾール値を示した；21日目に、12匹のCORTの魚のうち10匹はCCを超える値を示し、42日目ではすべてがCCを超えていた；21日目に、11匹のSTRESSの魚のうち7匹はCCを超える値を示し、42日目ではすべてがCCを超えていた (図9)。処置を比較すると、21日目にCORTの魚に有意な蓄積が見出された (CORT対CTR：P < 0.0001)；42日目にSTRESSの魚に有意な蓄積が見出された (STRESS対CTR：P = 0.0001)。21~42日の処置内で比較すると、うろこのコルチゾールの有意な増加が、STRESS (P = 0.0031) およびCORT (P = 0.0026) の魚で見出された。これらの所見は、時間経過によるうろこ中のコルチゾールの、予測された取り込みおよび蓄積と整合するものであり、うろこのコルチゾール含有量を、慢性ストレスのバイオマーカーとして確認した。DEXによる、内因性コルチゾールの生産をブロックする予測された効果と整合して、我々は、DEX処置の魚のうろこにコルチゾールの取り込みは認めなかった。一方、魚にコルチゾールを供給して物理的にストレスを与えると、うろこのコルチゾールレベルが増大された。

要約すると、個体発生うろこ中のコルチゾールの結果により、うろこ中のコルチゾールは、魚が時間と共に経験するストレスレベルを反映することを確認した。我々は、慢性ストレスの定量化のための追加のツールとしての、再生うろこ中のコルチゾールの定量化と、最も豊富な基質タンパク質コラーゲン1の遺伝子発現レベルとのその相関について着手した。

#### 【0052】

#### c) 個体発生うろこの次に、コルチゾールは再生うろこにも蓄積する

コルチゾール濃度を、個体発生うろこの除去後21日に、魚当たり5枚の再生うろこにおいて決定した (図10)。*col1a1*のMNEは、個体発生うろこで阻害されることが見出され、高い血漿コルチゾールレベルと相関し、これは、よく知られている骨形成に対するグルココルチコイドの阻害効果と整合する。再生うろこにおいて、骨片母細胞 (うろこを形成する骨芽細胞様の細胞<sup>75</sup>) は、すべての処置における同様の*col1a1*発現により示されるように、グルココルチコイドフィードバックに対し感度が低いように見える。形態学的には、CTR、STRESS、およびCORTの再生うろこは類似していることが判明し、一方、DEXの魚のうろこの面積、周囲長、および隆起部の数は、顕著に低い値を示し、障害され遅延された再生を示す。CORTの魚における、42日目の個体発生および再生うろこのサンプリングの時点における、高いコルチゾール血漿レベルは、うろこの高いコルチゾール含有量と相関し、これは、遊離コルチゾールがうろこに取り込

10

20

30

40

50

まれていることを確認する。さらに、STRESSの魚中の再生うろこのコルチゾール含有量は、有意ではないが、CTRよりも高くしかしCORTよりも低いようであり、基質中でコルチゾールの最大の封鎖 (sequestering) に達していなかったことを示す。これにより、分析された基質の非常に低い量 (平均してうろこ4 mg) に注意すべきである。CORTの魚のうろこにおいて、コルチゾールの有意な増加が観察された (CORT対CTR:  $P < 0.0001$ )。この所見は、コルチゾールのうろこ中への時間経過による取り込みおよび蓄積、および高い血漿コルチゾールレベルと整合し、個体発生うろこについての我々の所見を再確認する。再生うろこについての結果は、このように個体発生うろこの結果を、したがってうろこ中のコルチゾールが、時間内に魚が経験するストレスレベルを反映しているという事実を裏付ける。

10

## 【0053】

例4：テラピア (Oreochromis mossambicus) のうろこにおけるグルココルチコイドレベルの定量化

方法および材料 (例1など参照)

実験の設定

各6匹の魚の、4つの条件の2回の反復でテラピアについて試験した：対照 (ストレスなし)、デキサメタゾン (ストレス経路の阻害)、コルチゾール (ストレス経路の活性化)、および6週間ランダム適用の様式で与えられた種々のストレスに起因するストレス。

20

## 【0054】

## 方法

実験手順はオランダの法律に従い、Animal Ethics Committee of the Radboud University (許可番号: RU-DEC2013-192) により承認された。テラピア (Oreochromis mossambicus) は、Radboud University of Nijmegenで飼育し、既往歴を確実にした。成長した成魚 (21日目:  $321 \pm 37$  g および  $26.0 \pm 0.9$  cm; 42日目:  $328 \pm 38$  g および  $26.5 \pm 0.9$  cm) を、12:12時間の明:暗の下で保持し、1日に2食 (9:30 am および 15:30 pm)、体重の0.9%を与えて、 $20.0 \pm 0.4$  で6週間維持した。2つの群を、1群当たり2つのタンクで反復し、各140Lのタンク当たり6匹の魚で設定した。CTR群の魚は、妨害なしで維持した。STRESS群には、1日1回ストレスを与えた; スレッサーの種類、持続時間およびタイミングはランダムに適用され、以下を含む: 網による捕獲 (15~60分)、空気暴露 (1~3分)、温度低下 (5℃まで)、追い回し (10分まで)、および閉じ込め (低水位のバケツで)。全実験の間に、健康および挙動の劣化の兆候は認められなかった。42日後、魚を2-フェノキシ-エタノール (0.1% v/v) で麻酔して屠殺し、尾部血管から血液およびうろこ (個体発生および21日間再生うろこ) を収集した。血漿は、コルチゾール、グルコース<sup>70</sup>、全カルシウム<sup>71</sup>、および重量オスモル濃度<sup>70</sup> について分析した。うろこは側線の背側の標準化された列からサンプリングし、超高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (UPLC-MS/MS) を用いて分析した。

30

## 【0055】

## 結果

40

## 1) 論理的根拠の制御および実験設定の実行

6週間の試験期間中、妨害なしのテラピア (CTR) と毎日ストレスを与えたテラピア (STRESS) を比較した。すべての処置において、提供された餌は5分以内に消費され、条件因子<sup>73</sup> によって示されるようにすべての魚は臨床的に健康なままであり、死亡は観察されなかった。適切な水質は、毎日 (pH、温度、溶存酸素) または毎週 (亜硝酸塩、硝酸塩、アンモニウム) のモニタリングにより維持した。餌からの漏れによる、水に媒介されたグルココルチコイドの観察された効果に対する寄与は、排除可能である。コルチゾール、その前駆体および代謝物の、社内開発され検証されたUPLC-MS/MSによる分析は、水中でのコルチゾール濃度の上昇が、給餌後2.5時間以内にベースラインに戻ったことを明らかにした。

50

一般的にストレスの指標として使用される、5つの血液パラメータを分析した(図11)。血漿コルチゾールは、STRESS群で上昇しており(STRESS対CTR:  $P = 0.0014$ )、後者が急性ストレスの評価に相当であることを示す。二次ストレスパラメータである血漿グルコースは、予想されるグルココルチコイドの作用(糖新生)を反映するが、これはSTRESSで増加し(STRESS対CTR:  $P = 0.0006$ )、有意に異なった。血漿総カルシウムおよび重量オスモル濃度は影響を受けず、処置が魚の回復力を超えず、ストレスを引き起こさなかったことを示した。我々は以下の結論を得た：(i) STRESSでの処置は、意図されたグルココルチコイド作用を誘発した、なぜならばSTRESSの魚の血漿において、HPI軸の活性化の兆候が観察されたからである；および(ii) 血漿パラメータは、所与の時点でのストレス応答のスナップショット以上のものを反映しないために、慢性ストレスの優れた予言者ではない。

#### 【0056】

慢性ストレスのバイオマーカーとしての、魚の個体発生うろこにおけるコルチゾール

5枚(21日目)から6枚(42日目)のうろこを、検証されたUPLC-MS/MS法(Commission Decision No. 2002/657/ECの要件に従って)によりNBN EN ISO/IEC 17025規制環境下で、コルチゾールについて分析した。

21日目に、全21匹のCTRおよびSTRESSの魚は、決定限界(CC)未満のうろこのコルチゾール値を示し、一方42日目では、STRESSの魚のレベルはほとんどがCCを超えていた(図12)。

処置を比較すると、21日目に、有意に近い蓄積がSTRESSの魚で見出された(STRESS対CTR:  $P = 0.0590$ )；42日目に、有意に近い蓄積がSTRESSの魚で見出された(STRESS対CTR:  $P = 0.0515$ )。21~42日の処置内で比較すると、うろこのコルチゾールの有意な増加は、CTRでは見出されず( $P = 0.3962$ )、一方、うろこのコルチゾールの有意な増加が、STRESSの魚で見出された( $P = 0.0020$ )。これらの所見は、うろこ中のコルチゾールの、時間経過による予測された取り込みおよび蓄積と整合するものであり、うろこのコルチゾール含有量を、慢性ストレスのバイオマーカーとしてさらに確認する。対照群での予測された効果と整合して、我々は、CTRの魚のうろこにおけるコルチゾールの有意な取り込みは認めなかった(CTR21対CTR42:  $P = 0.0770$ )。一方、物理的に魚にストレスを与えると、うろこのコルチゾールレベルが増大した(STRESS21対STRESS42:  $P < 0.0001$ )。

要約すると、個体発生うろこ中のコルチゾールの結果により、うろこ中のコルチゾールが、魚が時間と共に経験するストレスレベルを反映するという、コイにおける最初の所見が確認された。我々は、慢性ストレスの定量化のための追加のツールとしての、再生うろこ中のコルチゾールの定量化について着手した。

#### 【0057】

個体発生うろこの次に、コルチゾールは再生うろこにも蓄積する

コルチゾール濃度を、個体発生うろこの除去後21日に、魚当たり5枚の再生うろこにおいて決定した(図13)。

STRESSの魚の再生うろこにおいて、コルチゾールの有意な増加が観察された(STRESS対CTR:  $P = 0.0105$ )。42日目の再生うろこおよび個体発生うろこのサンプリング時点での、STRESSの魚における高いコルチゾール血漿レベルは、うろこの高いコルチゾール含有量と相関し、これは、遊離コルチゾールがうろこに取り込まれるという我々の仮説を確認した。この所見は、利用可能なより高い血漿コルチゾールレベルに伴う、時間経過によるうろこ中のコルチゾールの予測された取り込みおよび蓄積と整合し、これにより、個体発生うろこでの我々の所見を再確認する。再生うろこについての結果は、個体発生うろこの結果およびコイについての我々の前の所見を裏付けし、したがって、うろこ中のコルチゾールが時間内に魚が経験するストレスレベルを反映することを確認する。

#### 【0058】

血漿中ならびに糞、粘液および水などの代替基質中のコルチゾールのアッセイは、慢性ストレスの評価には適さない。我々は、うろこのコルチゾール含有量が、魚における慢性ストレスの定量化のために非常に適していることを示し、この見解は、うろこのコルチゾールを、魚に関連する科学や産業（例えば生理学、毒物学、免疫学、行動研究等）における、高い潜在的な影響を有する革新的で最先端のバイオマーカーとする。コイおよびテラピアについて示された所見は、板状鱗を有するすべての魚（例えば、コイ）に適用可能である。広義では、盾鱗（例えば、サメ）および硬鱗（例えばチョウザメ）も適しており、このバイオマーカーの使用を条鰭綱（actinopterygian）、さらには軟骨魚綱（chondrich tyan）の種へと拡大する。最後に、慢性ストレスのモニタリングのためのこの新しいツールは、広い範囲の政治的、学問的、および産業的設定、例えば動物にやさしい水産養殖の意思決定（例えば、再循環水産養殖システムの動物ベースの最適化や製品品質の改善）、野生の魚のストックのモニタリング（例えば、生態に基づく個体群動態）、公共水槽内および動物試験における魚の福祉などにおいて採用される、大きな物価安定の可能性（huge valorization potential）を有する。魚のうろこ中のコルチゾールについてのオンサイト分析のための、財政的でロジスティックな、広く適用でき実施可能なアッセイの開発が、必要とされている。

10

【0059】

例5：サケのうろこにおけるグルココルチコイドレベルの定量化

方法および材料（例1参照）

実験の設定

キングサーモンの12の試料（ストレス前およびストレス（1時間の閉じ込め））を、サケにおける慢性ストレスに関する米国との延長協力の枠組みの中で、うろこのグルココルチコイドについてブラインドで分析した。

20

【0060】

結果

【表6】

バイアルNo.	試料#	ピットタグ#	重量(g)	性別	20-ジヒドロコルチゾン(ng/g)	コルチゾン(ng/g)	コルチゾール(ng/g)
1	84	557	3875	M	8,924	20,861	98,174
2	85	no tag	4033	M	7,966	17,943	90,571
3	86	5293	2959	F	6,127	6,962	79,419
4	87	3224	6315	F	35,222	61,273	92,681
5	88	2510	3025	M	5,245	17,122	50,102
6	89	6820	5497	F	28,107	17,395	17,419
7	90	6484	3649	F	22,551	35,553	39,817
8	91	2109	4113	F	37,607	34,286	39,463
9	92	3485	4496	M		16,917	1,335
10	93	9611	4330	F	0,030	6,110	3,819
11	95	6334	4332	F	22,156	41,773	31,732
12	94	3464	5409	F	1,080	25,291	26,499

30

40

【0061】

例6：タイおよびシーバスのうろこにおけるグルココルチコイドレベルの定量化

方法および材料（例1参照）

実験の設定

魚に対するコンディショニングの影響（1日目対3日目）を、シーバス（*Dicentrarchus labrax*）およびタイ（*Pagrus pagrus*）を用いて試験した。

結果

シーバス

【表 7】

変数			処置ごと				全体	全体
			フラッシュなし		フラッシュあり		全体	全体
種類	日	基質/パラメータ	推定値	標準誤差	推定値	標準誤差	差	P
META データ	1	性別						
	1	長さ	25.67	0.65	25.78	0.65	0.11670	0.8999
	1	重量	178.62	16.85	186.25	16.85	7.63670	0.7516
	1	BCS	1.04	0.04	1.04	0.04	-0.00715	0.8951
	3	性別						
	3	長さ	26.33	0.61	26.25	0.61	-0.075	0.9319
	3	重量	191.78	13.86	193.44	13.86	1.65830	0.9333
血漿	1	PLコルチゾール	211.11	66.06	88.46	66.06	-122.66	0.2103
	3	PLコルチゾール	151.55	49.19	223.84	47.10	72.28570	0.3006
うろこOG	1	OGうろこの量	0.04	0.00	0.04	0.00	-0.00368	0.2789
	1	OGうろこ当たりの重量	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.00013	0.5434
	3	OGうろこの量	0.04	0.00	0.05	0.00	0.00620	0.1439
	3	OGうろこ当たりの重量	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00002	0.8984
	1	OGうろこ当たりのコルチゾール	0.06	0.01	0.06	0.01	-0.00348	0.8451
	1	OGうろこ当たりのコルチゾン	0.03	0.01	0.04	0.01	0.00171	0.8114
	1	OGうろこ当たりのライヒシュタインU	0.04	0.00	0.04	0.00	-0.00409	0.3737
	3	OGうろこ当たりのコルチゾール	0.04	0.00	0.02	0.00	-0.01601	0.0050
	3	OGうろこ当たりのコルチゾン	0.03	0.00	0.02	0.00	-0.00678	0.2305
3	OGうろこ当たりのライヒシュタインU	0.03	0.00	0.02	0.00	-0.00638	0.2573	

10

20

【 0 0 6 2 】

タイ

【表 8】

変数			処置ごと				全体	全体
			フラッシュなし		フラッシュあり		全体	全体
種類	日	基質/パラメータ	推定値	標準誤差	推定値	標準誤差	差	P
META データ	1	性別						
	1	長さ	23.04	0.25	23.21	0.25	0.16670	0.6455
	1	重量	208.65	8.08	210.16	8.08	1.50750	0.8962
	1	BCS	1.70	0.04	1.68	0.04	-0.02420	0.6640
	3	性別						
	3	長さ	22.75	0.45	23.75	0.45	1.00000	0.1301
	3	重量	210.71	11.36	227.45	11.36	16.73580	0.3089
血漿	1	PLコルチゾール	148.07	34.38	34.43	34.38	-113.6300	0.0289
	3	PLコルチゾール	114.05	30.44	100.44	30.44	-13.6037	0.7550
うろこOG	1	OGうろこの量	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00253	0.4644
	1	OGうろこ当たりの重量	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00006	0.5232
	3	OGうろこの量	0.03	0.00	0.03	0.00	0.00093	0.7586
	3	OGうろこ当たりの重量	0.00	0.00	0.00	0.00	-0.00015	0.1199
	1	OGうろこ当たりのコルチゾール	0.03	0.01	0.03	0.01	-0.00178	0.8070
	1	OGうろこ当たりのコルチゾン	0.04	0.01	0.05	0.01	0.01826	0.2297
	1	OGうろこ当たりのライヒシュタインU	0.05	0.01	0.04	0.01	0.01630	0.0441
	3	OGうろこ当たりのコルチゾール	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00710	0.2944
	3	OGうろこ当たりのコルチゾン	0.08	0.02	0.04	0.02	0.04097	0.1581
3	OGうろこ当たりのライヒシュタインU	0.04	0.00	0.03	0.00	-0.00913	0.0967	

30

40

【 0 0 6 3 】

参考文献

A . 背景技術の参考文献

## 【表 9 - 1】

1. Baker, M R, Gobush K S, Vynne C H (2013) Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife. *J Nat Conserv* 21, 309-318.
2. Boonstra R (2013) The ecology of stress: a marriage of disciplines. *Funct Ecol* 27, 7-10.
3. O'Connor C M, Norris D R, Crossin G T, Cooke S J (2014) Biological carryover effects: linking common concepts and mechanisms in ecology and evolution. *Ecosphere*, 5, art 28. 10
4. Richardson K (2013) Anthropogenically-induced changes in the environment: effect of fisheries. <ftp://ftp.fao.org/fi/document/reykjavik/pdf/16Richardson.pdf>.
5. Consensus. Towards sustainable aquaculture in Europe. (2013) [http://www.learneurope.eu/files/5813/7456/5881/Towards sustainable aquaculture in Europe.pdf](http://www.learneurope.eu/files/5813/7456/5881/Towards_sustainable_aquaculture_in_Europe.pdf).
6. Bush S R, Belton B, Hall D, Vandergeest P, Murray F J, et al. (2013) Certify Sustainable Aquaculture? *Science* 341: 1067-1068. 20
7. Diggles B K, Cooke S J, Rose J D, Sawynok W (2011) Ecology and welfare of aquatic animals in wild capture fisheries. *Rev Fish Biol Fisheries* 21: 739-765.
8. EFSA (2008). Scientific report of EFSA on Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed common carp (Question No EFSA-Q-2006-148). Annex I to the EFSA Journal 843: 1-81.
9. Bergqvist J, Gunnarsson S (2013) Finfish Aquaculture: Animal Welfare, the Environment, and Ethical Implications. *J Agric Environ Ethics* 26: 75-99. 30
10. Anderson P A, Berzins I K, Fogarty F, Hamlin H J, Guillette Jr L J (2011) Sound, stress, and seahorses: the consequences of a noisy environment to animal health. *Aquaculture* 311: 129-138.
- 11 Anderson P A (2013) Acoustic characterization of seahorse tank environments in public aquaria: A citizen science project. *Aquacult Engineering* 54: 72-77. 40
12. The Research Council of Norway (2009) Fish in research - environmental requirements and welfare indicators for fish. A review of research needs.

【 0 0 6 4 】

## 【表 9 - 2】

13. Wendelaar Bonga S E (1997) The stress response in fish. *Physiol Rev* 77: 591-626.
14. Barton B A (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol* 42: 517-525.
15. Blas J, Bortolotti G R, Tella J L, Baos R, Marchant T A (2007) Stress response during development predicts fitness in a wild, long lived vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 8880-8884. 10
16. Sapolsky R M, Romero L M, Munck A U (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21: 55-89.
17. Cockrem J F (2013) Individual variation in glucocorticoid stress responses in animals. *Gen Comp Endocrinol* 181: 45-58.
18. McEwen B S, Wingfield J C (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav* 43: 2-15. 20
19. Korte S M, Koolhaas J M, Wingfield J C, McEwen B S (2005) The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* 29: 3-38.
20. Øverli Ø, Sørensen C, Pulman K G T, Pottinger T G, Korzan W, et al. (2007) Evolutionary background for stress coping styles: Relationships between physiological, behavioral, and cognitive traits in non-mammalian vertebrates. *Neurosci Biobehav Rev* 31: 396-412.
21. Tellis M S, Alsop D, Wood C M (2012) Effects of copper on the acute cortisol response and associated physiology in rainbow trout. *Comp Biochem Physiol Part C: Pharmacol Toxicol Endocrinol* 155: 281-289. 30
22. Toorchi M, Bani A, Alizadehsabet H (2012) Effects of salinity on osmoregulation and plasma cortisol levels of juvenile Caspian trout, *Salmo trutta caspius* Kessler, 1877. *J Appl Ichthyol* 28: 130-134.
23. Oliveira C C V, Blanco R A B, Chereguini V O, Martín I, Sánchez-Vazquez F J (2013) Endocrine (plasma cortisol and glucose) and behavioral (locomotor and self-feeding activity) circadian rhythms in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) exposed to light/dark cycles or constant light. *Fish Physiol Biochem* 39: 479-487. 40
24. Romano M C, Rodas A Z, Valdez R A, Hernández S E, Galindo F, et al. (2010) Stress in wildlife species: noninvasive monitoring of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation* 17: 209-212.

## 【表 9 - 3】

25. Cook N J (2012) Review: Minimally invasive sampling media and the measurement of corticosteroids as biomarkers of stress in animals. *Can J Anim Sci* 92: 227-259.
26. Small B C (2003) Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 218: 177-185.
27. Palić D, Herolt D M, Andreasen C B, Menzel B W, Roth J A (2006) Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). *Aquaculture* 254: 675-685. 10
28. Simontacchi C, Poltronieri C, Carraro C, Bertotto D, Xiccato G, et al. (2008) Alternative stress indicators in sea bass *Dicentrarchus labrax*, L. *J Fish Biol* 72: 747-752.
29. Bertotto D, Poltronieri C, Negrato E, Majolini D, Radaelli G, et al; (2010) Alternative matrices for cortisol measurement in fish. *Aquacult Res* 41: 1261-1267. 20
30. Lupica S J, Turner J W Jr (2009) Validation of enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of fecal cortisol in fish. *Aquacult Res* 40: 437-441.
31. Ellis T, James J D, Stewart C, Scott A P (2004) A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *J Fish Biol* 65: 1233-1252. 30
32. Takahara T, Yamanaka H, Suzuki A A, Honjo M N, Minamoto T, et al. (2011) Stress response to daily temperature fluctuations in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Hydrobiologia* 675: 65-73.
33. Close D A, Yuna S-S, McCormick S D, Wildbill A J, Weiming L (2010) 11-Deoxycortisol is a corticosteroid hormone in the lamprey. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 13942-13947.
34. Cadrin S X, Kerr L A, Mariani S (2013) *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science*. Academic Press. 40
35. Tserpes G, Tsimenides N (1995) Determination of age and growth of swordfish, *Xiphias gladius* L., 1758, in the eastern Mediterranean using anal-fin spines. *Fish Bull* 93: 594-602.
36. Kawajiri M, Yamahira K (2011) Genetic and thermal effects on the latitudinal variation in the timing of fin development of a fish *Oryzias latipes*. *Environ Biol Fishes* 92: 285-293.

## 【表 9 - 4】

37. Payan P, De Pontual H, Edeyer A, Borelli G, Boeuf G, et al. (2004) Effects of stress on plasma homeostasis, endolymph chemistry, and check formation during otolith growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can J Fish Aquat Sci* 61: 1247-1255.
38. Bortolotti G R, Marchant T A, Blas J, Cabezas S (2009a) Tracking stress: localisation, deposition and stability of corticosterone in feathers. *J Exp Biol* 212, 1477-1482.
39. Cirimele V, Kintz P, Dumestre V, Gouille J P, Ludes B. 2000. Identification of ten corticosteroids in human hair by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry. *Forensic Sci. Int.* 107: 381-388. 10
40. Schönböörner A A, Boivin G, Baud C A (1979) The mineralization processes in teleost fish scales. *Cell Tissue Res* 202: 203-212.
41. Metz J R, De Vrieze E, Lock E J, Schulten I E, Flik G (2012) Elasmoid scales of fishes as model in biomedical bone research. *J Appl Ichthyol* 28: 382-387. 20
42. Persson P, Shrimpton J M, McCormick S D, Björnsson B T (2000) The presence of high-affinity, low-capacity estradiol-17 $\beta$  binding in rainbow trout scale indicates a possible endocrine route for the regulation of scale resorption. *Gen Comp Endocrinol* 120, 35-43.
43. Pinto P I S, Estevao M D, Redruello B, Socorro S M, Canario A V, Power D M (2009) Immunohistochemical detection of estrogen receptors in fish scales. *Gen Comp Endocrinol* 160, 19-29. 30

## 【 0 0 6 7 】

B . 発明の概要の参考文献

## 【表 9 - 5】

- (44) Bury N. R., Sturm A. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2007**, 153, 47–56.
- (45) <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5932.html>
- (46) Cirillo N., Prime S. S. *J. Cell. Biochem.* **2011** 112, 1499–1505.
- (47) Raul J-S., Vincent Cirimele V., Bertrand Ludes B., Pascal Kintz P. *Clin. Biochem.* **2004**, 37, 1105–1111.
- (48) Gow R., Thomson S., Rieder M., Van Uum S., Koren G. *Forensic Sci. Int.* **2010**, 196, 32–37. 10
- (49) Sugawara E. K., Verreschi L. *Quim. Nova* **2010**, 33, 447-450.
- (50) Yajie Xiao Y., Chan S. W., Hu M., Chu T. T. W., Fok B. S. P., Poon E. W. M., Tomlinson B  
*Chromatographia* **2012**, 75, 169–173
- (51) Gao W, Xie Q, Jin J., Qiao T., Wang H., Chen L., Deng H., Lu Z *Clin. Biochem.* **2010**, 43, 677–682.
- (52) Shibata N., Hayakawa T., Takada K., Hoshino N., Minouchi T., Yamaji A. *J. Chromatogr B* **1998**, 706, 191–199.
- (53) Shibasakia H., Nakayamaa H., Furutaa T., Kasuyaa Y., Tsuchiyab M., Soejimab A., Yamadab,  
Nagasawab T. *J. Chromatogr. B* **2008**, 870, 164–169. 20
- (54) Ahmadkhaniha R., Shafiee A., Rastkari N., Khoshayand M. R., Kobarfard F. *J. Chromatogr B* **2010**, 878, 845–852.
- (55) O'Connor E. A., Pottinger T. G., Sneddon L. U. *Fish Physiol. Biochem.* **2011**, 37, 461–469.
- (56) Benjamín Costas B., Conceição L. E. C., , Aragão C., Martos J. A., Ruiz-Jarabo I. Mancera J. M.,  
Afonso A. *Aquaculture* **2011**, 316, 68-76.
- (57) Tellis M. S., Alsop D., Wood C. M., *Comp. Bioch. Fysiol.* **2012**, 155, 281-289.
- (58) Toorchi M., Bani A., Alizadehsabet H. *J. Appl. Ichthyol.* **2012**, 28, 130–134 30
- (59) Sun K., Ramgir N., Bhansali S. *Sens. Actuators, B* **2008**, 133, 533–537.
- (60) Mitchell J. S., Lowe T. E., Ingram J. R. *Analyst* **2009**, 134, 380–386

## 【 0 0 6 8 】

## 【表 9 - 6】

## C. 例1の参考文献

- (61) Commission Decision No. 2002/657/EC, Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* **2002**.
- (62) EN ISO/IEC 17025:2005, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. *CEN/CENELEC*, **2005**.
- (63) ISO/DIS 5725:1994, Accuracy of Measurement Methods and Results., **1994**. 10
- (64) Barnett V.; Lewis T. *Outliers in Statistical Data*; 3rd ed., **1994**.
- (65) Ellis, T.; Sanders, M. B.; Scott, A. P. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **2013**, 100, 255-269.
- (66) McWhinney B.C., Ward G., Hickman P.E. *Clin. Chem.* **1996**, 42 (6), 979-981.
- (67) Flor, S. Lucangioli S., Contin M., Tripodi V. *Electrophoresis* **2010**, 31, 3305-3313.
- (68) Heistermann M., Palme R., Ganswindt A. *Am. J. Primatol.* **2006**, 68, 257-273.

## D) 例2の参考文献

- (69) Gorissen M., Bernier N. J., Manuel R., de Gelder S., Metz J. R., Huising M. O., Flik G. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2012, 178, 75-81. 20

## E) 例3の参考文献

- (69). Gorissen M, Bernier N J, Manuel R, de Gelder S, Metz J R, et al. (2012) Recombinant human leptin attenuates stress axis activity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Gen Comp Endocrinol* 178: 75-81.

## 【 0 0 6 9 】

## 【表 9 - 7】

(70). Schram E, Roques J A C, Abbink W, Spanings T, de Vries P, et al. (2010) The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 306: 108-115.

(71). Cohen S A, Sideman L (1979) Modification of the *o*-cresolphtalein complexone method for determining calcium. *Clin Chem* 25: 1519-1520.

(72). De Vrieze, E. *et al.* Prednisolone induces osteoporosis-like phenotype in regenerating zebrafish scales. *Osteoporosis Int.*, **25**, 567-578 (2014).

(73). Nash R D M, Valencia A H, Geffen A J (2006) The origin of Fulton's condition factor - setting the record straight. *Fisheries* 31: 236-238.

74. Dang Z C, Balm P H M, Flik G, Wendelaar Bonga S E, Lock R A C (2000) Cortisol increases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. *J Exp Biol* 203: 2349-2355.

(75). Metz J R, De Vrieze E, Lock E J, Schulten I E, Flik G (2012) Elasmoid scales of fishes as model in biomedical bone research. *J Appl Ichthyol* 28: 382-387.

## F) 例4の参考文献

(69). Gorissen M, Bernier N J, Manuel R, de Gelder S, Metz J R, et al. (2012) Recombinant human leptin attenuates stress axis activity in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Gen Comp Endocrinol* 178: 75-81.

(70). Schram E, Roques J A C, Abbink W, Spanings T, de Vries P, et al. (2010) The impact of elevated water ammonia concentration on physiology, growth and feed intake of African catfish (*Clarias gariepinus*). *Aquaculture* 306: 108-115.

(71). Cohen S A, Sideman L (1979) Modification of the *o*-cresolphtalein complexone method for determining calcium. *Clin Chem* 25: 1519-1520.

(73). Nash R D M, Valencia A H, Geffen A J (2006) The origin of Fulton's condition factor - setting the record straight. *Fisheries* 31: 236-238.

10

20

30

40



【 図 5 】

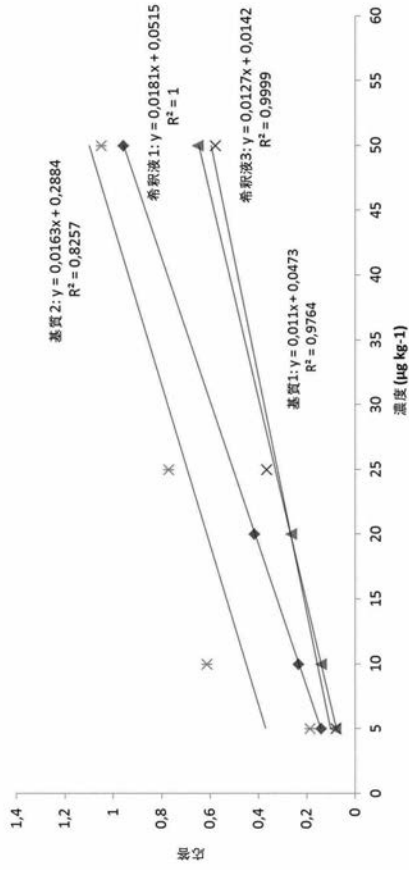


図5

【 図 6 a b 】

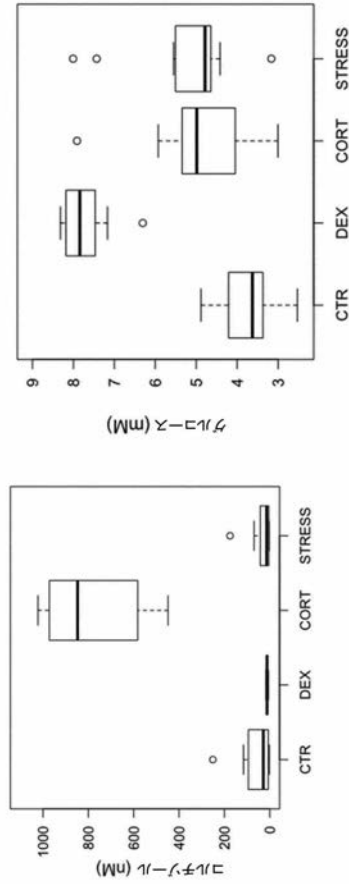


図 6 b

図 6 a

【 図 6 c d 】

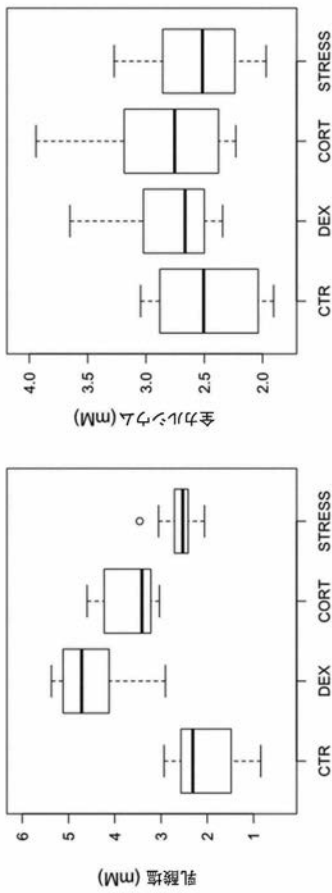


図 6 d

図 6 c

【 図 6 e 】

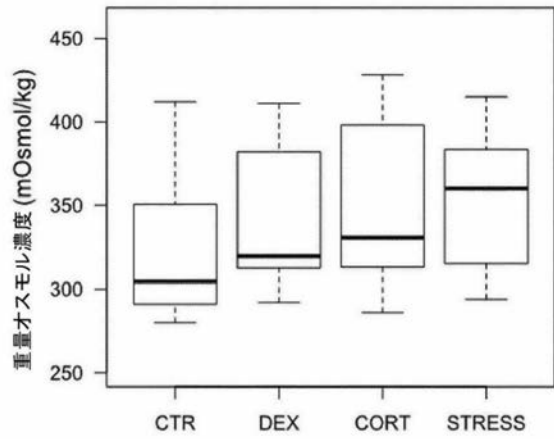


図 6 e

【 図 7 】

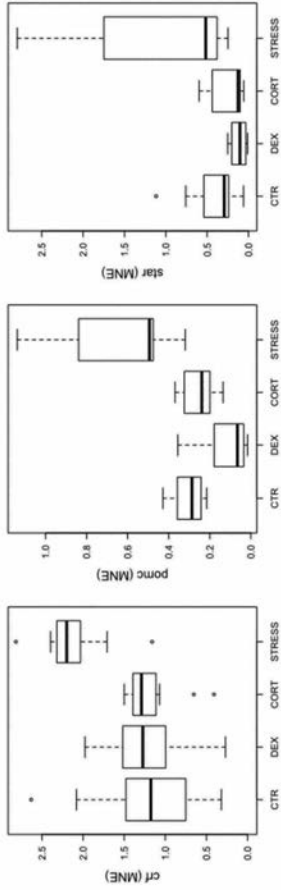


図 7

【 図 8 】

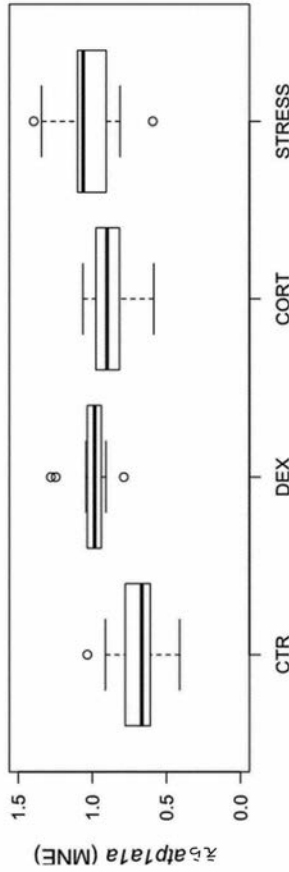


図 8

【 図 9 】

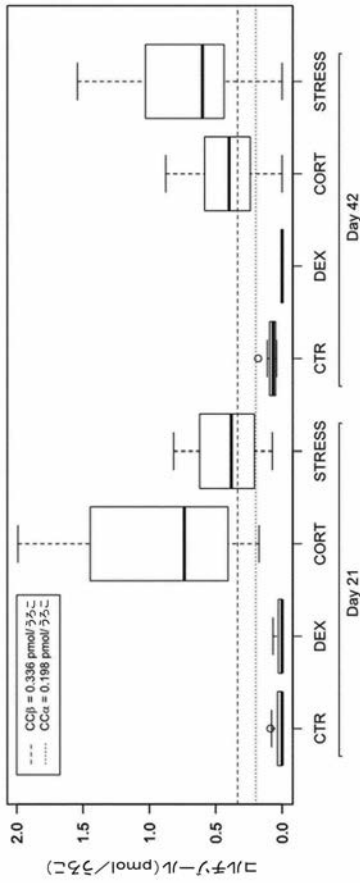


図 9

【 図 10 】

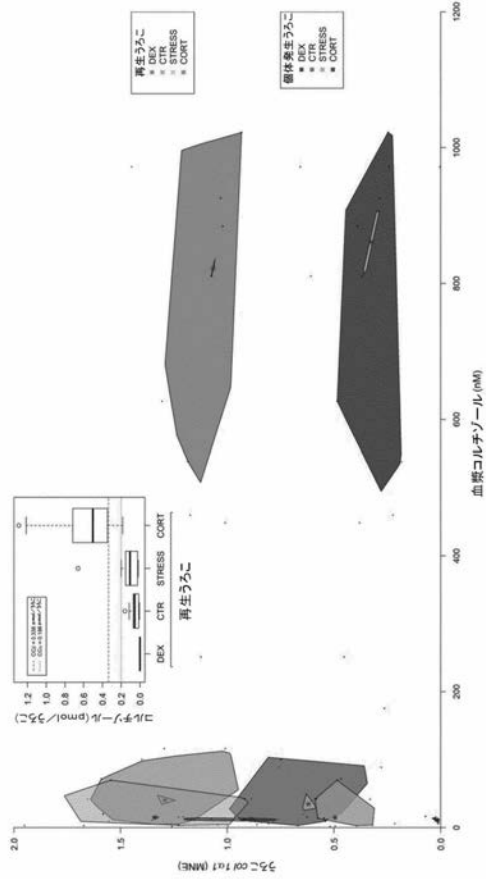


図 10

【 図 1 1 】

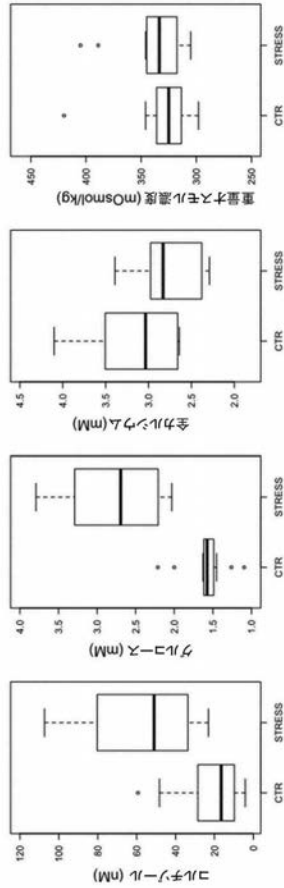


図 11

【 図 1 2 】

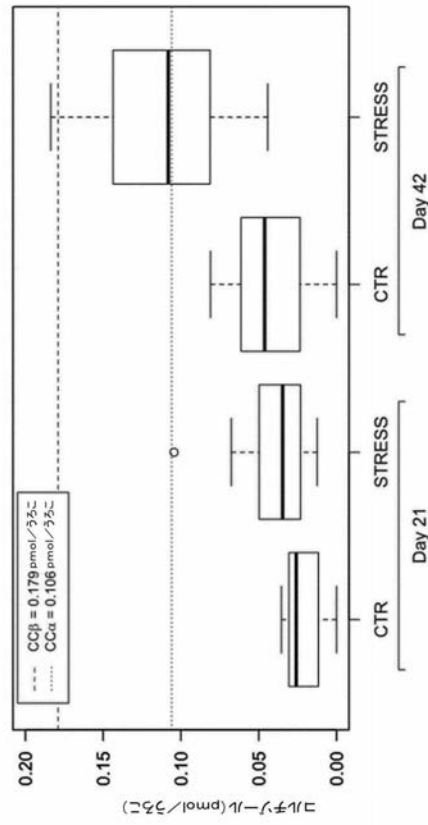


図 12

【 図 1 3 】

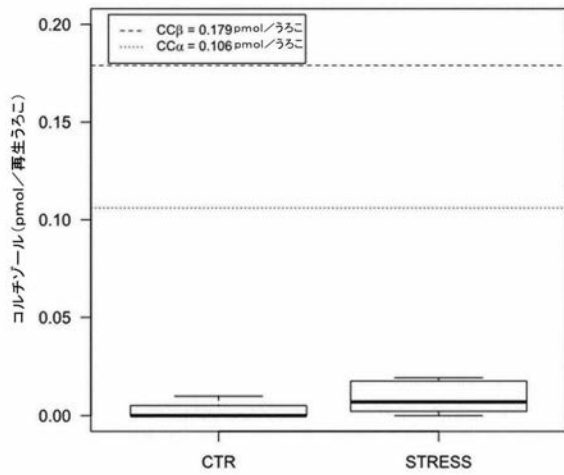


図 13

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/078117
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 G01N33/68 G01N33/74 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DANIELA BERTOTTO ET AL: "Alternative matrices for cortisol measurement in fish", AQUACULTURE RESEARCH, 1 November 2009 (2009-11-01), XP055109866, ISSN: 1355-557X, DOI: 10.1111/j.1365-2109.2009.02417.x abstract ----- -/--	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 6 March 2015		Date of mailing of the international search report 19/03/2015
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Jacques, Patrice

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/078117
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOHN W TURNER ET AL: "Measurement of fecal glucocorticoids in parrotfishes to assess stress", GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, vol. 133, no. 3, 1 October 2003 (2003-10-01), pages 341-352, XP055109800, ISSN: 0016-6480, DOI: 10.1016/S0016-6480(03)00196-5 abstract</p> <p>-----</p>	1-13
A	<p>SCOTT ET AL: "Measurement of fish steroids in water-a review", GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY, ACADEMIC PRESS, US, vol. 153, no. 1-3, 29 July 2007 (2007-07-29), pages 392-400, XP022176280, ISSN: 0016-6480, DOI: 10.1016/J.YGCEN.2006.11.006 abstract</p> <p>-----</p>	1-13
A	<p>ELLIS T ET AL: "A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout", JOURNAL OF FISH BIOLOGY, vol. 65, no. 5, November 2004 (2004-11), pages 1233-1252, XP002722242, ISSN: 0022-1112 abstract</p> <p>-----</p>	1-13
A	<p>BARTON BRUCE A: "Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids.", INTEGRATIVE AND COMPARATIVE BIOLOGY, vol. 42, no. 3, June 2002 (2002-06), pages 517-525, XP002722243, the whole document</p> <p>-----</p>	1-13
A	<p>TIM ELLIS ET AL: "Cortisol and finfish welfare", FISH PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, vol. 38, no. 1, 24 November 2011 (2011-11-24), pages 163-188, XP55172434, ISSN: 0920-1742, DOI: 10.1007/s10695-011-9568-y the whole document</p> <p>-----</p>	1-13
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/078117
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>DANIEL A. ISERMANN ET AL: "Estimating Black Crappie Age: An Assessment of Dorsal Spines and Scales as Nonlethal Alternatives to Otoliths", NORTH AMERICAN JOURNAL OF FISHERIES MANAGEMENT, vol. 30, no. 6, 1 December 2010 (2010-12-01), pages 1591-1598, XP55172429, ISSN: 0275-5947, DOI: 10.1577/M10-133.1 the whole document -----</p>	1-13

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(71)出願人 516183314

インスティテュート ブール ランドバウ - エン ヴィセリジョンダーゾエック (アイエル  
ブイオー)

INSTITUUT VOOR LANDBOUW - EN VISSERIJ ONDERZOEK (ILVO)

ベルギー王国 ビー - 9820 メレルベーク、バス 1、プルゲメーステル ファン ガンスペ  
ルゲラーン 96

Burgemeester Van Gansbergelaan 96, bus 1, B - 98  
20 Merelbeke, Belgium

(74)代理人 100102842

弁理士 葛和 清司

(72)発明者 アエルツ, ヨハン

ベルギー王国 ビー - 2970 スヒルデ、プレヒツェハイデウエヒ 8

(72)発明者 デ セファー, サラ

ベルギー王国 ビー - 9300 アールスト、デ フィッセレストラート 28

Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ02 QQ75 QQ79 QR48 QR72 QS14 QS36 QX01

专利名称(译)	量化鱼鳞中的糖皮质激素作为慢性应激的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2017503185A</a>	公开(公告)日	2017-01-26
申请号	JP2016559682	申请日	2014-12-17
[标]申请(专利权)人(译)	UNI-DF贝尔根特 根特大学 教练, 红茶主题ユート布尔乐园バアウエンヴィセリジョンダーゾエックアイエルブイオー SET农业和渔业研究ILVO		
申请(专利权)人(译)	Yuniberushiteito根特 インステテユート布尔ランドバアウ-遇ヴィセリジョンダーゾエック (アイエルブイオー)		
[标]发明人	アエルツヨハン デセファーサラ		
发明人	アエルツ,ヨハン デセファー,サラ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N30/88 C12Q1/60		
CPC分类号	G01N33/5085 G01N33/5091 G01N33/68 G01N33/6893 G01N33/74 G01N33/743 G01N2800/00 G01N2333/4603 G01N2800/7004		
FI分类号	G01N33/53.A G01N33/543.545.A G01N30/88.E C12Q1/60		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ02 4B063/QQ75 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QS14 4B063/QS36 4B063/QX01		
优先权	2013198450 2013-12-19 EP 2014172747 2014-06-17 EP		
其他公开文献	JP6348186B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及确定鱼随时间经历的压力水平, 其可用于评估鱼的健康状况。更具体地说, 本发明涉及从鱼中取样的鱼鳞, 以及钙化组织如耳石, 刺和软鳍造口的使用, 以量化鱼鳞/基质中糖皮质激素的水平。所述糖皮质激素例如皮质醇或皮质酮的水平随时间在鳞片增加, 这是鱼在其生存期间经历的长期应激状态并影响其应激水平。反映出来。因此, 本发明是一种用于量化鱼类中慢性应激水平的体外方法, 其包括用于逻辑上可行的, 非侵入性的底物, 用于精确和准确地定量应激激素。公开了使用秤的上述方法。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 公表特許公報 (A)	(11) 特許出願公表番号 特表2017-503185 (P2017-503185A) (43) 公表日 平成29年1月26日 (2017.1.26)
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考) 4B063
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	A
GO1N 33/543 (2006.01)	GO1N 33/543	545A
GO1N 30/88 (2006.01)	GO1N 30/88	E
C12Q 1/60 (2006.01)	C12Q 1/60	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-559682 (P2016-559682)	(71) 出願人 514185611	
(8) (22) 出願日 平成28年12月17日 (2014.12.17)		
(8) 優先出願日 平成28年8月19日 (2016.8.19)		
(8) 国際出願番号 PCT/EP2014/078117		
(8) 国際公開番号 W02015/091591		
(8) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)		
(31) 優先権主張番号 13198450.2		
(32) 優先日 平成25年12月19日 (2013.12.19)		
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		
(31) 優先権主張番号 14172747.9		
(32) 優先日 平成26年6月17日 (2014.6.17)		
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)		
		ユニベルシテイット ゲント UNIVERSITEIT GENT ベルギー王国 ビー9000 ゲント、シ ント-ピーテルスニウストラート 25 Sint-Pietersnieuwst raat 25, B-9000 Gen t, Belgium

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 慢性ストレスのバイオマーカーとしての魚のうろこにおけるグルココルチコイドの定量化