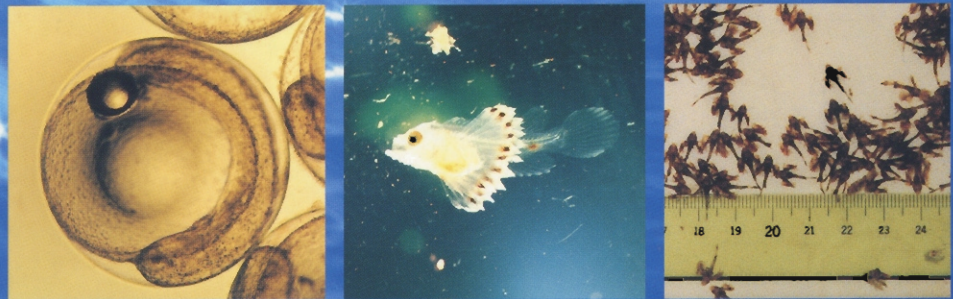


Bulletin of Ishikawa Prefecture Fisheries Research Center No.4
March 2005

石川県水産総合センター研究報告 第4号



石川県水産総合センター

〒927-0435 石川県鳳珠郡能登町宇出津新港3-7

Ishikawa Prefecture Fisheries Research Center
Ushitsu-shinko, Noto, Housu, Ishikawa 927-0435, Japan

二、三の真骨魚におけるカルシウムホメオスタシスのホルモンの調節 —特にカルシトニンの役割に関して—

戒田 典久

Hormonal regulation of calcium homeostasis in some teleosts :with special references to the role of calcitonin

Norihisa Kaida

目 次

緒 言	1
第 I 章 オニオコゼにおけるカルシトニン分子領域の塩基配列	
1. はじめに	2
2. 材料	2
3. 方法	2
(1) 鰓後腺の摘出	
(2) total-RNA の抽出	
(3) total-RNA の抽出精製度の確認	
(4) プライマーの設計：位置および塩基配列	
(5) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法	
(6) 増幅された PCR 産物のゲルからの回収とシーケンス	
4. 結果	4
5. 考察	7
第 II 章 鰓後腺の形態	
1. はじめに	9
2. オニオコゼ 3 倍体および 2 倍体の鰓後腺の形態の比較	9
(1) 材料	
(2) 方法	
① 鰓後腺の摘出	
② 鰓後腺の固定	
③ 組織切片の作製	
④ 組織切片の染色	
(3) 結果	
(4) 考察	

3. オニオコゼの3倍体および2倍体の消化管へ高カルシウム液を投与した時の 鰓後腺の形態と血漿カルシウム濃度に及ぼす影響	11
(1) 材料	
(2) 方法	
①高カルシウム液の投与	
②採血	
③カルシウム濃度の測定	
④鰓後腺の摘出、固定、組織切片の作製および染色	
⑤統計処理	
(3) 結果	
(4) 考察	

第Ⅲ章 オニオコゼとメジナの血漿カルシウム濃度に及ぼす消化管への高カルシウム液投与の影響

1. はじめに	14
2. オニオコゼとメジナの血漿カルシウム濃度に及ぼす胃への高カルシウム液投与の影響	14
(1) 材料	
(2) 方法	
①高カルシウム液の投与	
②採血	
③胃内容液の採取	
④直腸液および尿の採取	
⑤カルシウム濃度の測定	
⑥胃内容液のpHの測定	
⑦統計処理	
(3) 結果	
(4) 考察	
3. メジナの血漿カルシウム濃度に及ぼす直腸への高カルシウム液投与の影響	18
(1) 材料	
(2) 方法	
①手術	
②高カルシウム液の投与	
③採血	
④胃内容液の採取	
⑤カルシウム濃度の測定	
⑥統計処理	
(3) 結果	
(4) 考察	

第Ⅳ章 オニオコゼの血漿カルシウム濃度およびカルシトニン濃度に及ぼす消化管への高カルシウム液投与の影響

1. はじめに	20
2. 材 料	20
3. 方 法	20
(1) 手術	

(2) 高カルシウム液の投与	
(3) 採血	
(4) カルシウム濃度の測定	
(5) カルシトニン濃度の測定	
(6) 統計処理	
4. 結果	21
(1) 実験1	
(2) 実験2	
5. 考察	23
第V章 総合考察	27
謝 辞	28
引用文献	29
ABSTRACT	32
要 旨	33

緒 言

カルシトニン (calcitonin) は、1960年代初頭に Copp らによってイヌの甲状腺・副甲状腺を灌流していた時に、血中カルシウム濃度低下物質として初めて見いだされた比較的新しいホルモンである (Copp *et al.*, 1962)。また、これとは別に Hirsch らがヒツジの甲状腺から同様の作用を持つ物質を見だし、これをカルシトニンと区別する意味でサイロカルシトニン (thyrocalcitonin) と名づけた (Hirsch *et al.*, 1964)。当初、Copp らはカルシトニンを副甲状腺由来のホルモンと考えていたが、Foster ら (1964) の実験によりカルシトニンは甲状腺由来の物質であることが分かった。さらに、カルシトニンとサイロカルシトニンは、生化学的にも同一の物質であることが明らかになった。その後、カルシトニンの構造が決定され、これは32個のアミノ酸からなるペプチドで (Potts, 1968)、哺乳類においては強力な血中カルシウム濃度の低下作用を有し、カルシウム代謝にとって重要なホルモンであることが知られた。

哺乳類においてカルシトニンは、甲状腺の傍濾胞細胞 (いわゆる C 細胞) から分泌されるのに対し、鳥類、爬虫類、両生類および魚類においては、甲状腺とは独立した内分泌器官である鰹後腺から分泌される。この鰹後腺は、発生学的に第6鰹嚢に由来する。また、哺乳類の甲状腺の C 細胞も発生学的には胎児の時の鰹後腺実質細胞が甲状腺の発達とともに甲状腺に取り込まれて内部で拡散したものである (平野, 1984; 会田ら, 1991)。したがって、C 細胞と鰹後腺の実質細胞は発生学的に相同である。

哺乳類におけるカルシトニンの生理的役割は、血中カルシウム濃度の過度な上昇を抑制し、そのレベルを正常な範囲内に保つことである。また、この作用は骨吸収抑制作用による骨の保護作用や腎臓からのカルシウムの排出および消化管からのカルシウムの吸収抑制作用と連動している。最近、カルシトニンはホルモンとしての作用以外にも中枢神経系において、パラクリンや神経分泌によって食欲抑制や痛覚の抑制、躁状態の抑制など、他の神経細胞に対して神経修飾物質としての役割も有することが明らかにされつつある (折茂, 1998)。

鳥類におけるカルシトニンの生理的役割は、哺乳類におけるのと同様に、カルシウム代謝に関与していると考えられている。Waggener (1930) は、ヒナドリを高カルシウム食で飼育すると鰹後腺の肥大が起こることを見出し、Ziegler ら (1969) は、ニワトリおよびシチメンチョウの鰹後腺を高カルシウム血で灌流すると、血中カル

シトニン濃度が上昇することを報告している。

爬虫類におけるカルシトニンの生理的役割は、カルシウム代謝に関与していることを示唆する報告もあるが、不定する結果もあり、一定の結論は得られていない。低カルシウム食を与えたウミガメに対して、カルシトニンを投与した時に成長遅延が防止されたという報告 (Copp *et al.*, 1971) があるが、高カルシウム食を与えたウミガメでは効果は認められないという。

両生類におけるカルシトニンの生理的役割は、血中カルシウム濃度を一定に保つ働きが明らかにされているばかりでなく、骨代謝にも関係があることが証明されている。Robertson (1969) は、ヒョウモンガエルの鰹後腺を除去すると血中カルシウム濃度が上昇し、それに伴って尿カルシウムの濃度が増加することを報告している。これは、鰹後腺の除去手術によって骨からカルシウムが溶出し、血中カルシウム濃度の上昇に続いて、腎臓でカルシウムを再吸収しきれなくなったためと考えられている。また、ウシガエルのオタマジャクシの鰹後腺を除去すると、変態前に内リンパ嚢へのカルシウムの沈着が悪くなり、変態後に骨格の発達が貧弱なカエルになることが報告されている (Robertson, 1971)。すなわち、これらの事実は、カルシトニンが少なくとも無尾両生類において硬組織の石灰化を促す様に働くことを示唆している。

魚類においてもカルシトニンは、カルシウム代謝に関与していると考えられるいくつかの証拠がある。また、魚類はカルシウムに富んだ卵黄を含む卵を産むことから、生殖生理にも密接な関係を有することが示唆されている (笹山, 1998)。しかしながら、これまでの研究は、主として生活史の中で淡水と海水を往復するウナギやサケなど広塩魚に関する知見が蓄積されているのみで、純粋な海産魚についての知見は全くないといって過言ではない。わずかにキンギョについて検討されているが (Okuda *et al.*, 1999)、キンギョは高カルシウム環境に晒されることがない淡水魚である。一方、海産魚は、血中カルシウム濃度の4倍もの高いカルシウム濃度を持つ海水に常時晒されており、血中カルシウム濃度を一定に保つ必要を常に要求されている。本研究では、純粋な海産魚で肉食性のオニオコゼ *Inimicus japonicus* (CUVIE R) と、雑食性のメジナ *Girella punctata* GRAY を用いて (写真1)、それらの消化に伴うカルシウムホメオスタシスを特にカルシトニンの役割の観点から検討した。

第I章 オニオコゼにおけるカルシトニン分子領域の塩基配列

1. はじめに

これまで海産魚においては、イワシ(Suzuki *et al.*, 1994), アンコウ, ウミタナゴ, カワハギ, コモンフグおよびホンベラのカルシトニンが, ペプチドの精製手法あるいは遺伝子工学的手法を用いて, その一次構造が明らかにされている(Suzuki *et al.*, 1999). しかしながら, 実際にこれらの魚種の大部分を実験魚として扱おうとすると, ハンドリングに弱かったり, 実験のために数多くの尾数を得ることが困難であったり, 手術が難しいなど, 様々な問題が生じる. これに対し, オニオコゼは著者が直接1対の親魚から養殖したため, 実験のために数多く尾数を得ることが容易であり, 体が背腹に平たいため手術もしやすく, また遺伝的にも野生種の寄せ集めより, はるかに均一であるという重要な長所すら有する. またオニオコゼは完全な魚食性のため, 魚を消化する過程でカルシウムを高濃度に含んだ餌料を摂取する時とよく似た状態が起こると想像される. したがって, 本種を海産魚のカルシウム代謝の実験魚として用いることは, 生理学的観点からも意義があると考えられる.

本研究ではまず, 鰓後腺の免疫組織化学染色や血中カルシトニン濃度を測定するうえで不可欠な抗体を作製するために, オニオコゼのカルシトニン分子の塩基配列を決定し, それに基づいてカルシトニンを合成し, 最終的に抗体を作製することにした.

2. 材料

材料は, 石川県水産総合センターで生物餌料や配合飼料を給餌して種苗生産し, 生育させたオニオコゼ1尾を用いた. その全長は168mmで体重は106.5gであった.

3. 方法

(1) 鰓後腺の抽出

オニオコゼの鰓後腺は, 体のどこに存在するかが正確には知られていない. したがって, シロザケ(Sasayama *et al.*, 1989), メダカ(Sasayama *et al.*, 1995)およびリュウキュウアユ(Sasayama *et al.*, 2001)を参考にして, 心臓と内臓を分けた鰓後腺が含まれると思われる横中隔壁およびそれが連なる消化管の腹部側と, さらに肝門脈の心臓側の部分を大きく切り取り(写真2), 直ちに液体窒素で凍結させて, total-RNA抽出まで -80°C で保存した.

(2) total-RNAの抽出

total-RNA抽出のための詳細なプロトコルを図1に示した.

抽出した鰓後腺を含む組織片を乳鉢に入れ, 液体窒素を加えながら, それが粉末状になるまで破碎した. それにISOGEN(ニッポンジーン, 東京)を加え, RNaseを失活させると同時に細胞のタンパク質を可溶化させた. 続いて, それにクロロホルムを加えて, タンパク質の変性作用を高めた. この溶液を遠心分離して得られた最上層の水層を別のチューブへ移し, 採取した水層と同量のイソプロパノールを加え, RNAを塩析させた. その後, 塩析したRNAを遠心し沈殿させた. 上澄み液を取り除いた後, 75%エタノールを加え, 沈殿物をリンスし乾燥させた. その後, diethyl pyrocarbonate処理によりRNase-freeにした蒸留水(DEPCwater)を50 μl 加え, 加温したウォーターバスによりRNAを溶解させた. 続いて, これまでの操作を繰り返すことによってRNAを精製した. 得られた溶液を最終的なtotal-RNA溶液とした.

(3) total-RNAの抽出精製度の確認

total-RNA溶液の一部を使って, RNA量と精製度を図2に示した方法で調べた. さらに, アガロースゲル電気泳動法で, RNAのバンドを検出して, コンタミネーションの割合を確認した(図3).

(4) プライマーの設計: 位置および塩基配列

カルシトニン分子をコードしているゲノムDNAの構造および用いたプライマーの位置を図4に示した.

プライマーは, 既に知られているサケ(Pöschl *et al.*, 1987), ニワトリ(Lasmoles *et al.*, 1985), ヒツジ(Cumaraswamy *et al.*, 1993, イヌ(Mol *et al.*, 1991)およびヒト(Craig *et al.*, 1982)のカルシトニン遺伝子の中で, 共通性が高い塩基配列に注目して設計を試みた. 最終的には, これらのカルシトニン遺伝子の塩基配列の5'-末端側では, エクソン4の始まりからカルシトニン分子をコードしている塩基配列の1bp前までが, 共通の塩基配列を含む割合が高かった. したがって, ヒトのカルシトニン分子の塩基配列を基にして5'末端側の1bpを除く24merを基本とし, これにサケに特異的に見られる塩基をランダムにミックスしたミックスプライマー(5'-CCT GGA (C/T) AG (C/A) CC CA (G/T) (A/G) TC (T/C) AA (G/A) CG-3')を合成した. これをN-1プライマーとした. 一方, C末端側には, 共通性の高い領域はなかった. したがって, サケのカルシトニン分子をコードしている塩基配列のすぐ後ろの領域の30merをプライマー(5'-GTT GCT CTC AGG CAG GCT GCG TTT CTT GCC-3')として合成した. これをC-1プライマーとした.

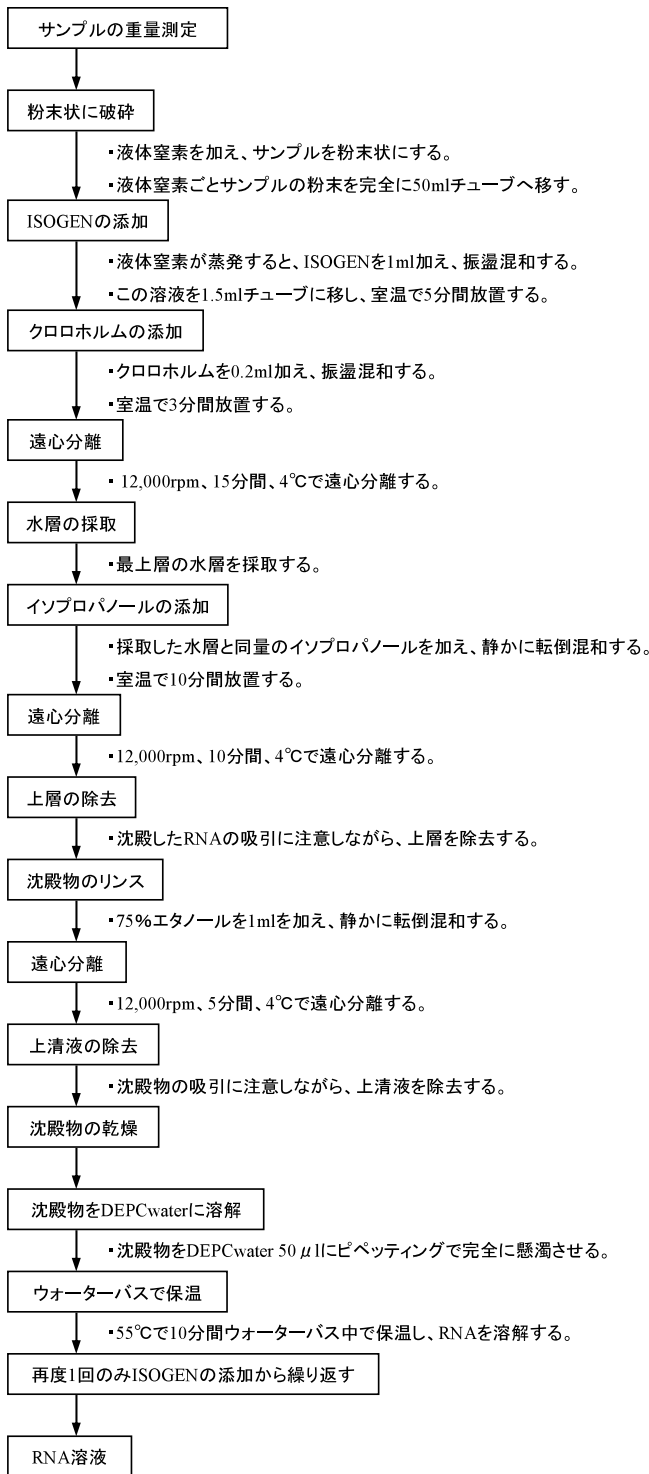


図1. Total - RNA の抽出方法

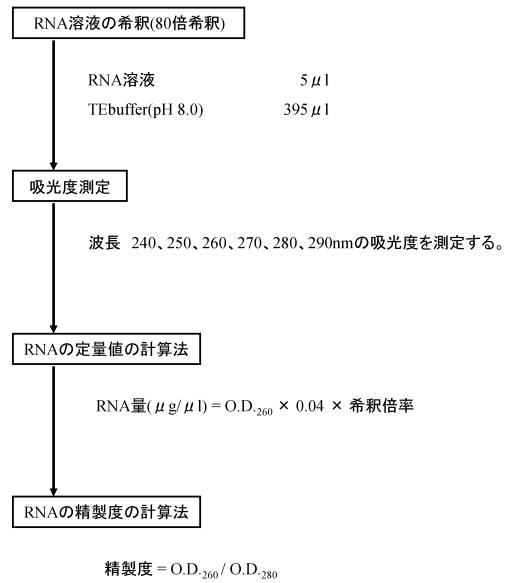


図2. Total - RNA の定量と精製度の測定法

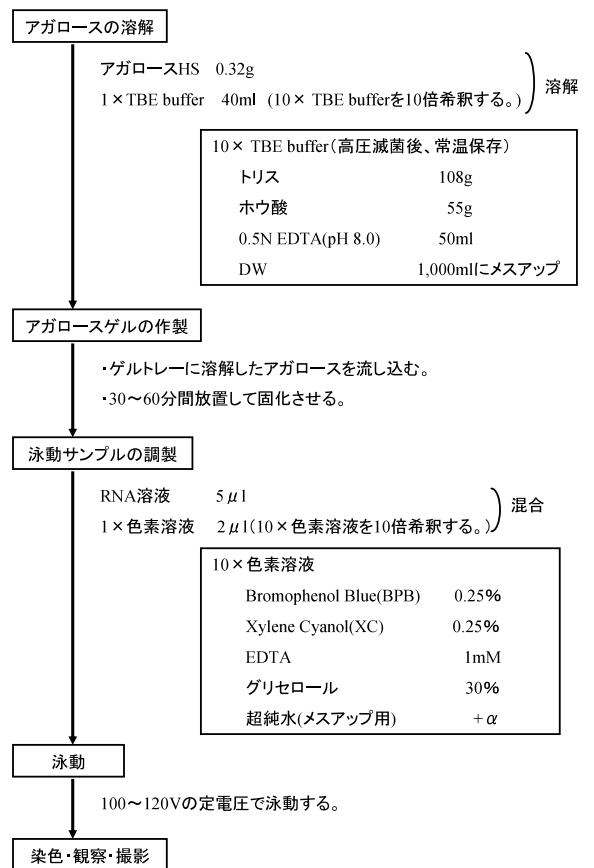


図3. アガロースゲル電気泳動法により抽出された total - RNA のコンタミネーションの確認法

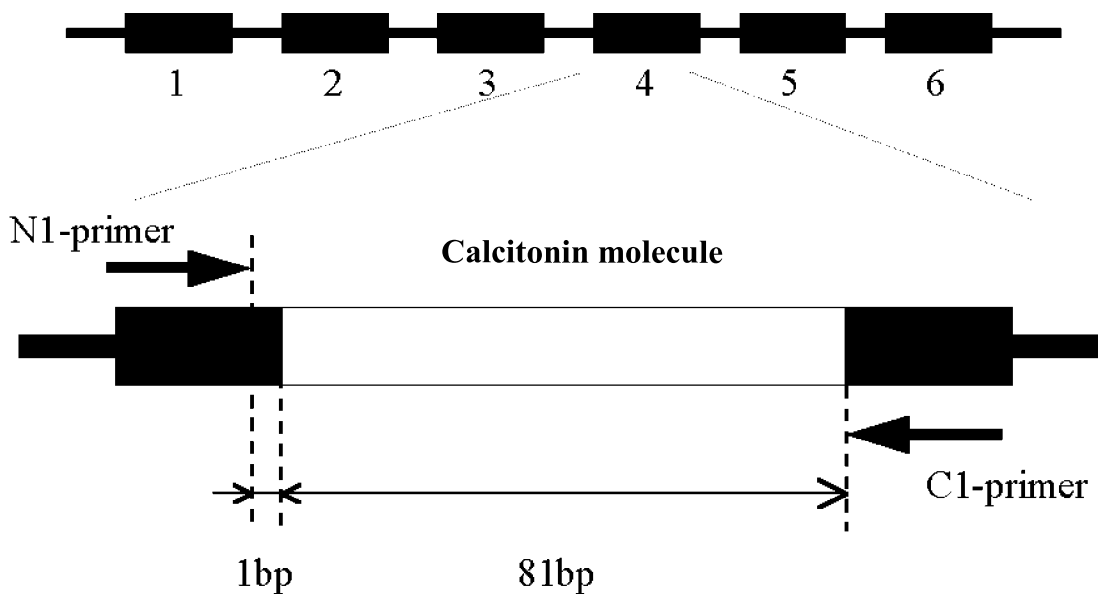


図4. カルシトニン分子をコードするゲノムDNAの構造とプライマーの位置

これら N-1と C-1プライマーで増幅される断片の全長は、151bpである。

(5) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法

RT-PCR 法による cDNA 断片の増幅のための詳細なプロトコルを図5に示した。

RT-PCR 法は、Iwami *et al.* (1996)の方法にしたがい、プライマーに Oligotex-dT30 Super (日本ロシユ、東京)を用いた。Oligotexの調製方法を図6に示した。また、cDNAの合成には、RNA PCR KIT (AMV Ver. 2) (TaKaRa、京都)を用いた。その反応液の組成を表1に示した。さらに、逆転写反応は、42°Cで60分間保温し、アニーリングとcDNA鎖の伸張を行った。次に99°Cで5分間加熱し、酵素を失活させた。その後、Oligotex-cDNA複合体を鋳型としてPCR反応を行った。

PCR法によるカルシトニン遺伝子の増幅方法の詳細なプロトコルを図7に、表2にPCRの反応液の組成を示した。

反応は、95°Cで2分間1サイクルを行い、その後、95°Cで45秒間、55°Cで30秒間、72°Cで1分間の一連の反応を35サイクル繰り返した。その後、72°Cで10分間1サイクルを行い、反応終了後4°Cに保った。

PCR法によりカルシトニン分子を含む領域が増幅されたか否かをアガロースゲル電気泳動法で確認した。

(6) 増幅されたPCR産物のゲルからの回収とシーケンス

PCR産物をアガロースゲルから回収するための詳細

なプロトコルを図8に示した。

DNAサイズのマーカーとして用いた151bpのサケのカルシトニン塩基配列と同じ位置に検出されたバンドよりDNA断片を抽出し、pGEM[®]-T Easy Vector (3018bp) (図9)に組み込み、さらに、このベクターを大腸菌へ組み込んでサブクローニングした。その後、ABI PRISM[®] 377 Sequencer (アプライド・バイオシステムズ・ジャパン、東京)でDNAのシーケンスを行い、塩基配列を決定した。

4. 結果

total-RNAの抽出精製度は、RNA量で1.08 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 、RNA精製度は、1.942であった。また、アガロースゲル電気泳動法によると、抽出したRNAにコンタミネーションはなかった(図10)。このRNAを鋳型としてPCR法でカルシトニン遺伝子を増幅させたところサケ・カルシトニン遺伝子と同じサイズの151bpのところにDNA断片が増幅された(図11)。これをシーケンスした結果を図12に示す。その塩基配列の特徴は、明らかに魚のカルシトニンを示すものであり、これをオニオコゼのカルシトニンと結論した。

図13にオニオコゼと他の魚類とのカルシトニン遺伝子の塩基配列を比較した。オニオコゼのカルシトニン分子の塩基配列は、マコガレイとウミタナゴに近く、配列の92% (88/96bp)が一致した。次いでメダカ84% (81/96bp)とキンギョ72-80% (77/96bp)が近かった。続いて、コ

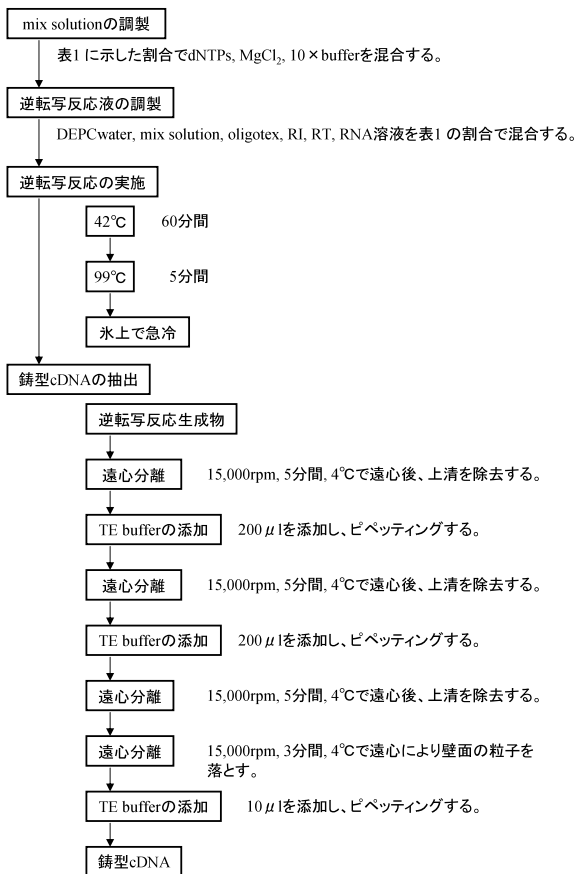


図 5. RT-PCR 法による cDNA 断片の増幅方法

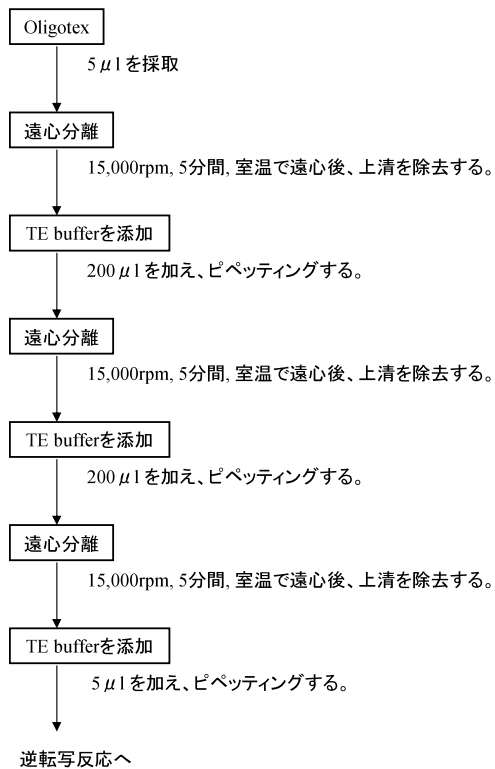


図 6. Oligotex の調整

表 1. cDNA 合成反応の反応液組織

試薬名	容量
Total RNA	1.5 μg
10 × RNA PCR buffer	2 μl
dNTP Mixture	20 nmol
MgCl ₂	100 nmol
RNase Inhibitor(RI)	20 units
Oligotex-dT30 Super	1 μl
Reverse Transcriptase(RT)	10 units
DEPCwater	全量を20 μlにメスアップ

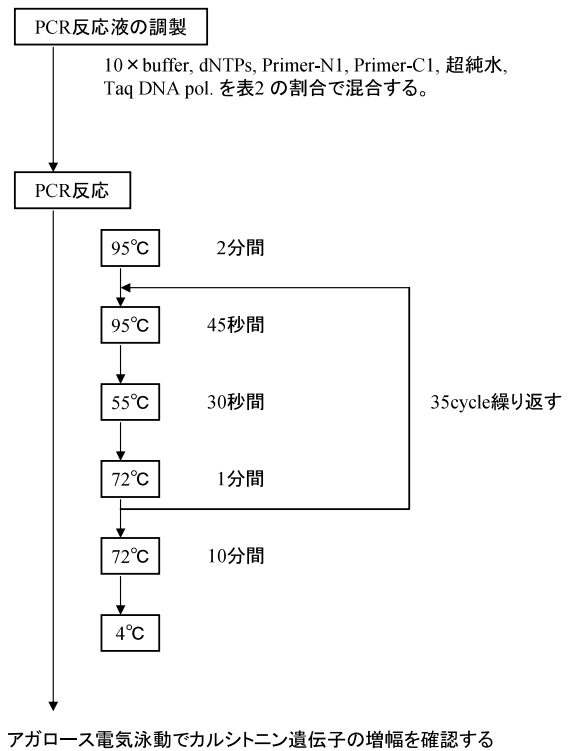


図 7. PCR 法によるカルシトニン遺伝子の増幅

表 2. カルシトニン遺伝子増幅 PCR 反応液組織

試薬名	容量
cDNA solution	1 μl
10 × PCR buffer	2 μl
dNTP Mixture	1.5 nmol
N primer	10 pmol
C primer	10 pmol
Taq polymerase	1 units
H ₂ O	全量を20 μlにメスアップ

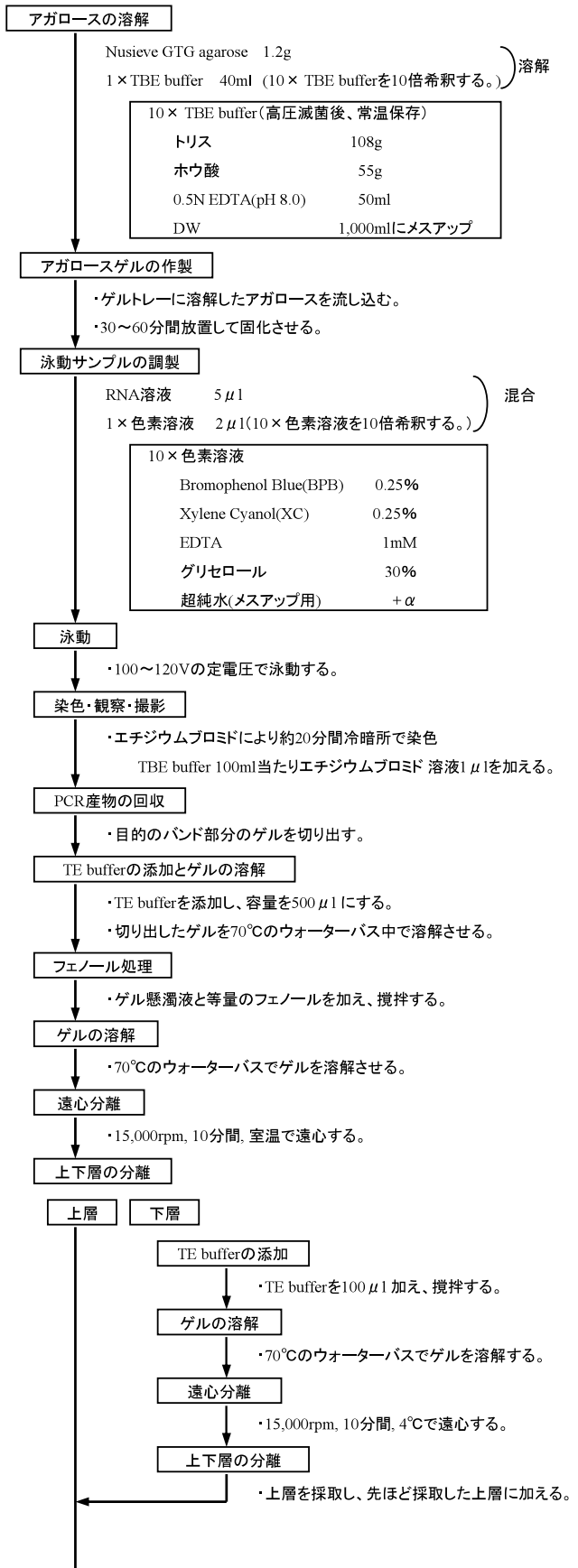


図8. RT-PCRにより増幅されたカルシトニン分子の回収方法

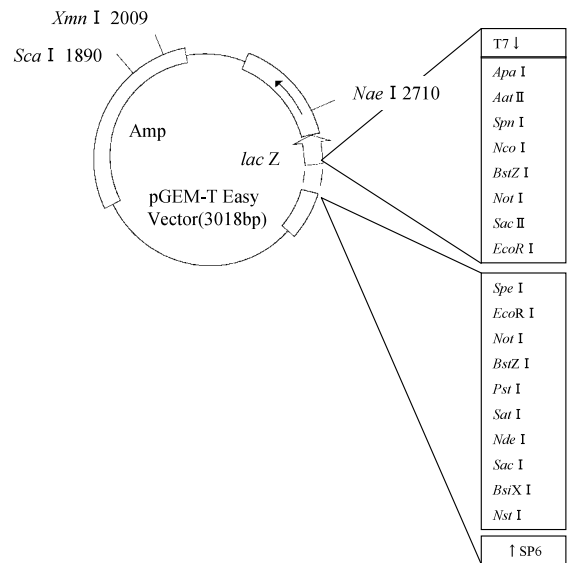
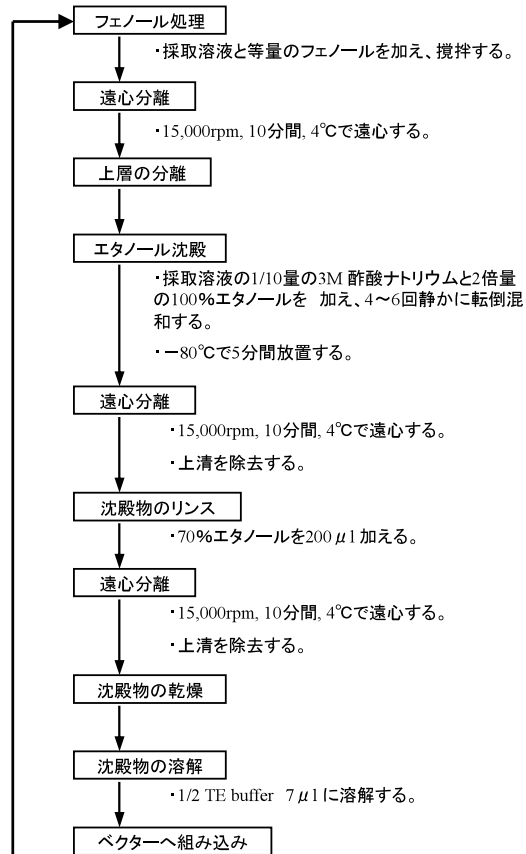


図9. ベクターマップ

モンブグとシロザケ79% (76/96bp), カワハギ78% (75/96bp)の順となった。他の海産魚では、ベラ76% (73/96bp), ウナギ75% (72/96bp), アンコウおよびイワシ73% (70/96bp), さらにアカエイ71% (68/96bp)が近かった。

図14に塩基配列から演繹されるアミノ酸配列を示した。オニオコゼのカルシトニン分子は、これまで知られているカルシトニンと同じく32個のアミノ酸からなり、1番目と7番目がシステインであることから、これらがジスルフィド結合(S-S結合)していると考えられる。さらに、C末端にプロリンがくることから、他のカルシトニンの様にアミド化されている可能性が高い。

塩基配列より演繹されるアミノ酸配列はマコガレイおよびウミタナゴのそれに100%一致した。また、メダカ94%, キンギョ78-88%と塩基配列の相同性と同一順になった。続いて、ウナギ, カワハギ, コモンブグ, テラピア, ベラが84%で、原始硬骨魚類のポリプテルスも84%のアミノ酸が相同であった。他の海産魚では、シロザケ, アンコウ, イワシが81%, アカエイが72%の一致を示した。

5. 考察

現在、形態に基づく真骨魚類の系統樹では、カレイ目とフグ目が最も上位で、その次にウミタナゴを含むズキ目の魚が位置する(Nelson, 1984)。オニオコゼはカサゴ目であり、そのカルシトニンのアミノ酸配列は、ホモロジーパーセントにおいて、その上位に位置するカレイ目のマコガレイのそれと100%同じであることが分かった。しかしながら、原始硬骨魚類のポリプテルスとも84%の相同があった。マコガレイは、オニオコゼと同じく沿岸域に生息し、魚食性が強いという共通点はあるものの、カルシトニンの作用に同じでなければならないという必然性は認められない。一方、淡水に生息するが広塩性のメダカともアミノ酸配列で94%の相同性があった。ColbertとMorales (1991)によると、真骨魚は中生代末期から現在に至る短い期間に急速に分化し、新しい環境に適応分散した動物群である。しかしながら、本章の結果は、カルシトニンは急速に分化した真骨魚の中においても、おそらくカルシウム代謝において重要な役割を果たしているため保存性が高く、構造の変化に抑制が掛かっている分子であることを示唆している。

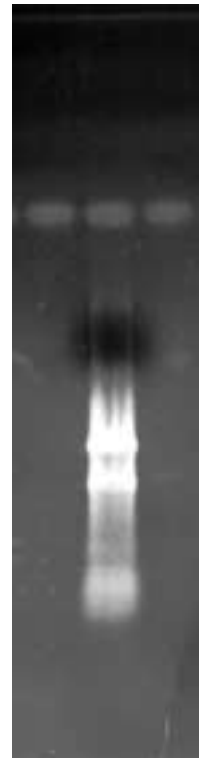


図10. 抽出したRNAの電気泳動

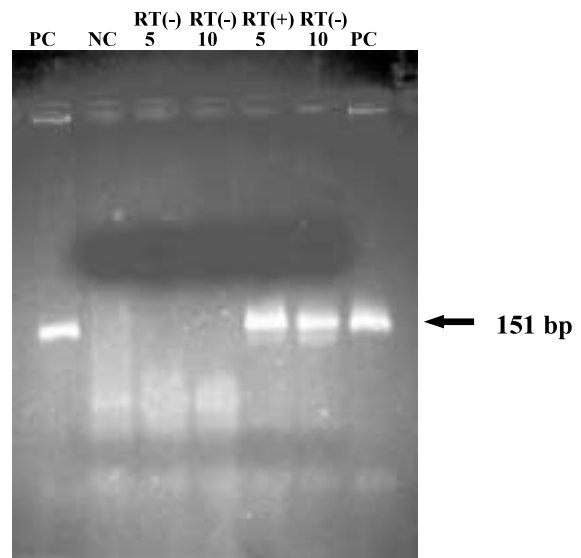


図11. PCR法で増幅したDNA断片の電気泳動像
 PC ポジティブコントロール
 NC ネガティブコントロール
 RT (-) 逆転写酵素フリーコントロール
 RT (+) サンプル
 RT (-)およびRT (+)の数字は、容量(μ l)を示す。

第Ⅱ章 鰓後腺の形態

1. はじめに

一般に、大黃卵を産む脊椎動物においては、将来の胚発生に備えて、硬組織からカルシウムを取り出し卵へ移行させる。この時、カルシウムは、血液を経由するので、

一時的に血中のカルシウム濃度が上昇する。しかしながら、硬組織からカルシウムの過度の動員は、母体の骨格に影響が出るため鰓後腺が活性化し、カルシトニンが分泌される結果、カルシウムが過度に動員されない様になっている(Azria, 1989)。したがって、鰓後腺は特に下等脊椎動物の生殖生理において重要な役割を担っている。

これまでいくつかの有用魚種において、3倍体の作製が行われてきた。3倍体は不妊化しており、生殖巣の発達が抑えられるため(Benfey *et al.*, 1984; Wolters *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 2000)、2倍体よりも成長が早く(Wolters *et al.*, 1982; Krasznai *et al.*, 1986)、生残率も良い(Guo *et al.*, 1990)などの水産学上の利点がある。しかしながら、3倍体の研究は、主に成長速度について行われており(Cassani. *et al.*, 1986)、その生理的な面については、性ホルモンに関する研究が中心であった(Withler *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1999)。したがって、これまで3倍体のミネラル代謝については、ほとんど研究がされていない。本章では、3倍体と通常の2倍体の鰓後腺の形態に違いがあるか否かを検証した。また、消化管へ高カルシウム液を投与して、高カルシウム血症を引き起こし、その時の3倍体と2倍体の鰓後腺の形態も調べた。

2. オニオコゼ3倍体および2倍体の鰓後腺の形態の比較

(1) 材料

材料は、石川県水産総合センターにおいて生物餌料や配合飼料を給餌して種苗生産した非生殖期の3倍体6尾および2倍体12尾を用いた。3倍体の全長は205±15mm(以後すべてmean±S.E.)、体重は194±33.5g、2倍体の全長は187±11mm、体重は150±20.6gであった。

(2) 方法

①鰓後腺の摘出

鰓後腺を摘出するために魚体をMS222(1/3,000)(三共、東京)で麻酔した。麻酔液は、同量の重炭酸ナトリウムを入れ中性にした後用いた。

心嚢と内臓を分けており、鰓後腺が含まれると思われる横中隔壁およびそれが連なる消化管の腹部側の部分を大きく切り出した。

②鰓後腺の固定

摘出した組織片は、後で鰓後腺の位置が分かる様に横中隔壁が変形しない様に、形を整え、免疫組織化学染色のために、酢酸を入れずにブアン液(飽和ピクリン酸：中性ホルマリン=3:1)に一晩固定した。その後、70%エタノールに移して、切片作製まで保存した。

③組織切片の作製

組織片は、通常のパラフィン切片法により厚さ10 μ mの連続切片とした。それらは、スライドガラスへ貼り付ける時に、ヘマトキシリン・エオシンを用いた通常染色とカルシトニン抗体を用いた免疫組織化学染色を行うために、切片3~4枚ごとに2群のスライドガラスに振り分けた。

④組織切片の染色

2群に振り分けた切片の一方は、図15の要領でサクラ自動染色装置DRS-601(サクラ精機、東京)を使って、マイヤーのヘマトキシリン・エオシン染色を施した。もう一方は、図16に示した方法で、免疫組織化学法の1つであるラベルド・ストレプト・アビジン・ビオチン法に供した。

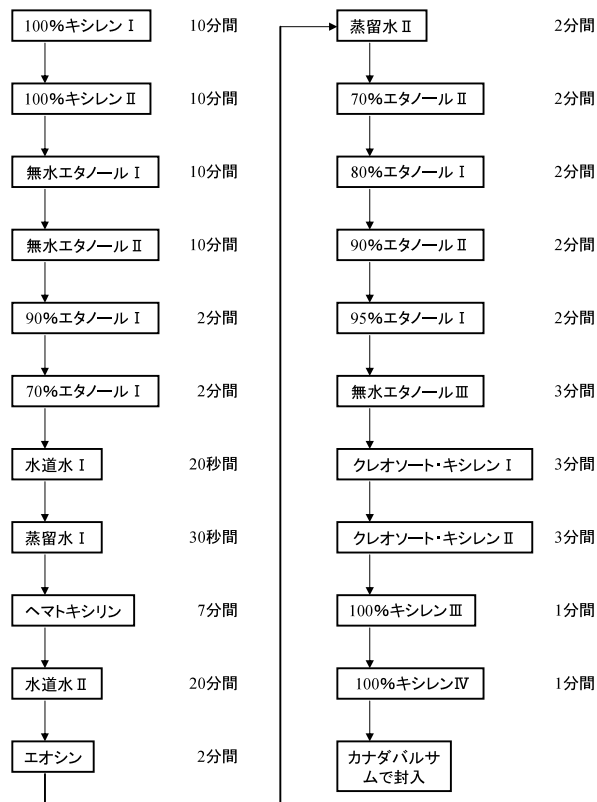


図15. 自動染色装置によるヘマトキシリン・エチシン染色

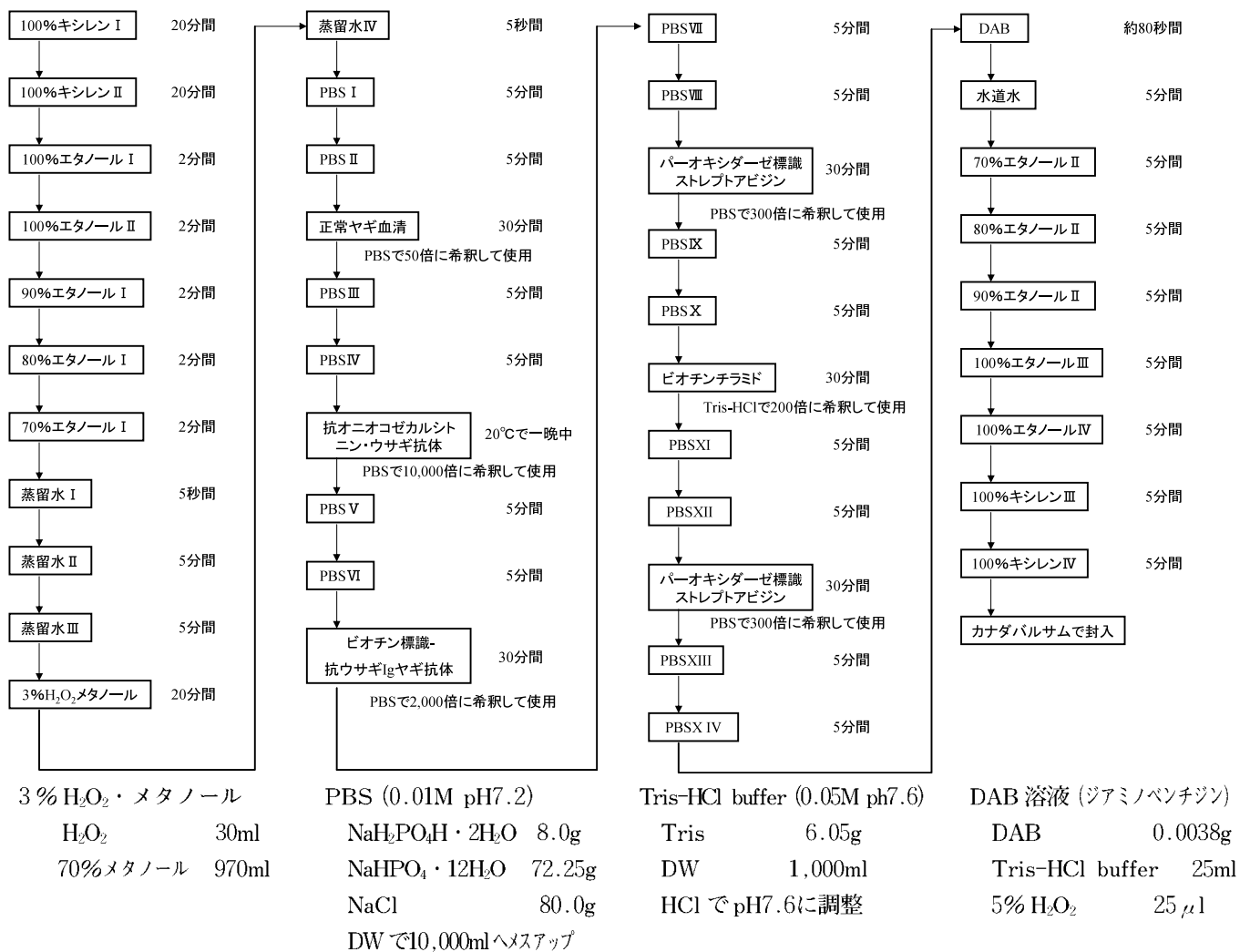


図16. 免疫組織化学染色法

免疫組織化学染色に用いた抗オニオコゼカルシトニン抗体は、合成オニオコゼカルシトニンをウサギに感作し、精製して得た。その作製方法を図17に示した。

免疫組織化学染色に先立ち、切片を3%H₂O₂-メチルアルコールで処理し、組織の内因性パーオキシダーゼを失活させた。次に、正常ヤギ血清(DAKO, DENMARK)で非特異的活性部分をブロッキングした。一次抗体として抗オニオコゼカルシトニン・ウサギ抗体を反応させた。続いて、二次抗体としてビオチン標識-抗ウサギ免疫グロブリン・ヤギ抗体を反応させ、さらにビオチン・チラミド(TSA™ Biotin System: NEN™ Life Science Products, BOSTON)を反応させて増感した。最後にパーオキシダーゼ標識-ストレプトアビジンを反応させ、ジアミノベンチジン溶液により発色を促した。

(3) 結果

鰓後腺はヘマトキシリン・エオシンの2重染色により

暗紫色に染まり、他の組織と区別できた。3倍体と2倍体のいずれとも、鰓後腺は心嚢と内臓を分ける横中隔壁の内臓側の結合組織中にあり、左右の肝門脈の間より食道腹部側の筋肉に接着する部分で扁平に広がって認められた(写真3)。3倍体と2倍体とも鰓後腺は、不規則な形をした扁平な袋状の構造をしていた。ただし、内腔はほとんど認められず、実質部を構成する細胞の核は、多くの場合、基底部に位置し、細胞質は極めて伸張していた。また、濾胞構造の他に細胞索構造もあった。鰓後腺の周囲には毛細血管がよく発達していた(写真4)。両者の鰓後腺を比べても、特に組織学的に差は認められず、他の魚種と比べても際立った特徴があるわけでもなかった。しかしながら、高倍率で詳細に比較すると、3倍体鰓後腺の単位面積当たりの核の数は、2倍体より少ない様に見受けられた(写真5)。

免疫組織化学染色においても、3倍体と2倍体に大き

オニオコゼカルシトニン合成ペプチド

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
5-TGC	ACC	GGC	TTA	AGC	ACT	TGT	GTG	CTG	GGC	AAA	CTC	TCC	CAG	GAT	ATT
Cys	Thr	Gly	Leu	Ser	Thr	Cys	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Ser	Gln	Asp	Ile
17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
CAC	AAA	CTA	CAA	ACC	TAT	CCC	CGC	ACC	AAC	GTG	GGA	GCA	GGG	ACG	CCT-
³ His	Lys	Leu	Gln	Thr	Tyr	Pro	Arg	Thr	Asn	Val	Gly	Ala	Gly	Thr	Pro

・32番目のProのアミド化、1,7番目のCysをS-S結合した
 ・ペプチドにカルボシמיד法でBSAをコンジュゲーションした

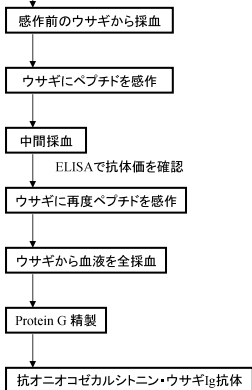


図17. 抗オニオコゼカルシトニン・ウサギ抗体の作製

な違いは見られず、両者とも毛細血管がとりまく基底部が頂端部よりもやや強く染色された(写真6)。

(4) 考察

多くの硬骨魚類で鰓後腺は、食道直下の囲心腔と腹膜腔の境をなす横隔壁にあり、ウナギ、ニジマスでは左右1対、コイでは左右が融合していることが知られている(笹山ら,1987; 会田ら,1991)。オニオコゼの鰓後腺は、コイやキンギョと同じく左右が融合した1個からなっていた。しかしながら、オニオコゼの鰓後腺は、コイやキンギョのそれよりかなり大きく広がっていた。このことは、あるいはカルシウム代謝能が優れていることをうかがわせる。さらに鰓後腺自体が、キンギョなどに比べて心臓に近い位置にあることも、分泌したカルシトニンを素早く全身に行き渡らせることができ、血漿カルシウム濃度の上昇に対処するうえで有利であるかも知れない(Sasayama *et al.*, 1999)。

オニオコゼの鰓後腺の構造は、3倍体と2倍体では、3倍体の方が左右に大きく伸張している様に見えた。また、3倍体の鰓後腺における単位面積当たりの核の数は、2倍体より少ない様に思えた。3倍体は、核のゲノム数の増加により個々の細胞のサイズは肥大するが、細胞数自体は減少することが知られており(Swarup,1959)、ニジマスの3倍体と2倍体の間に見られる赤血球の核の大きさと赤血球数の関係についても、同様なことが証明されている(山本ら,1994)。カルシトニンの抗体を用いて

免疫組織化学染色を施すと、毛細血管と密接している細胞の基底部側で強い反応を示した。このことは1個の細胞においても、この部分にカルシトニンの顆粒があることを示しており、必要に応じてカルシトニンを毛細血管へ分泌するうえで理屈にかなっている。また、血中カルシウム濃度をモニタリングするうえでも都合が良いのかも知れない。

3. オニオコゼの3倍体および2倍体の消化管へ高カルシウム液を投与した時の鰓後腺の形態と血漿カルシウム濃度に及ぼす影響

(1) 材料

材料は、石川県水産総合センターにおいて、生物餌料や配合飼料を給餌して種苗生産した非生殖期の3倍体および2倍体を15尾ずつ用いた。これらの供試魚は、実験開始3週間前から絶食させた。3倍体の全長は172±2.5mm、体重は98.3±3.83g、2倍体の全長は171±3.0mm、体重は101.4±5.43gであった。

(2) 方法

①高カルシウム液の投与

笹山らの方法(Sasayama *et al.*, 1996)を参考にし、塩化カルシウムでカルシウム濃度を1.25Mに調製した高カルシウム液を作製した。また、この液には、カルシウムの吸収を良くするために各種アミノ酸を含有するコンソメ(味の素,東京)を1g/100mlの割合で添加した。さらに、食用紅(小倉食品化T.KK,大阪)で赤色に着色し、口から高カルシウム液が漏れた場合、すぐに分かる様にした。写真7に示した様に、この高カルシウム液をカニューレを通して、実験開始時に体重100g当たり1mlの割合で胃の中へ注入した。

②採血

採血は、高カルシウム液投与直前、1時間後、3時間後および12時間後に、2-フェノキシエタノールで(1/5,000)麻酔を掛け、尾部血管よりヘパリンNaで処理をした1mlシリンジを用いて行った。それらのサンプルはヘパリンNaで処理をしたヘマトクリット管へ移し、11,000rpm、5℃、2分間の遠心分離によって、血漿成分を採取した。得られた血漿は、分析するまで-80℃で保存した。採血する時間以外の魚体は、海水が入れかわるが魚体の自由な活動は抑制される容器へ1尾ずつ収容し、水温20℃で保持した。

③カルシウム濃度の測定

カルシウム濃度測定のためのプロトコルを図18に示した。血漿のカルシウム濃度は、o-Cresolphthalein complexion (OCPC)法(Gitelman,1967)を用いてマイクロプレートリーダーによって測定した(Sasayama *et al.*, 1996)。

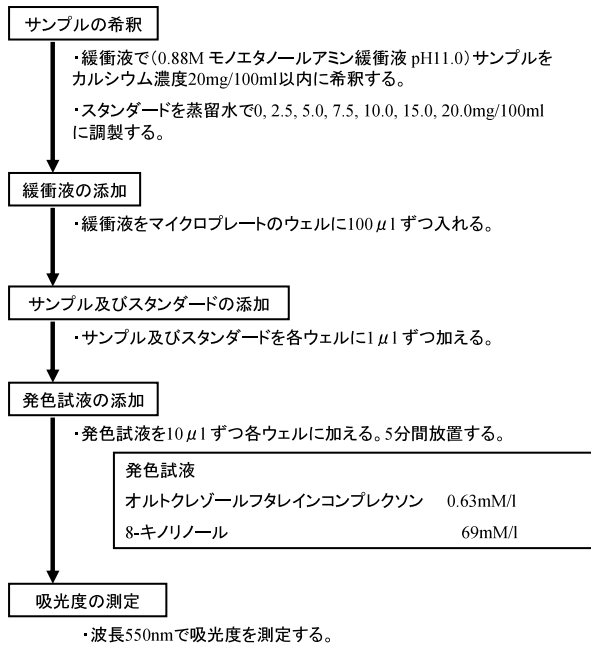


図18. カルシウム濃度の測定法 (Sasayama et al., 1996)

なお、分析には、ヒト用カルシウムキット (C-テストワコー (WAKO, 大阪)) を用いた。

④ 鰹後腺の摘出、固定、組織切片の作製および染色

高カルシウム液投与12時間後の採血終了時に、鰹後腺を摘出し、固定した。鰹後腺の摘出、固定、組織切片の作製、そして組織切片の染色は、第II章2(2)の方法に準じた。

⑤ 統計処理

3倍体と2倍体のそれぞれの時系列における、血漿カルシウム濃度の平均値の比較は、ANOVAとFisherのPLSD検定を用い、時間的に対応した血漿カルシウム濃度の平均値の比較には、Mann-WhitneyのU検定を用いて統計処理を行った。

(3) 結果

図19に3倍体と2倍体の胃へ高カルシウム液を投与した時の血漿カルシウム濃度の変化を示した。

3倍体の血漿カルシウム濃度は、高カルシウム液投与前に 2.4 ± 0.14 mMであったのが、高カルシウム液投与1時間後に有意に上昇し ($p < 0.01$)、投与前の約3倍の濃度に当たる 7.3 ± 0.49 mMになった。投与3時間後でもその値はほとんど変わらず、 8.4 ± 0.47 mMであった。その後、血漿カルシウム濃度は、徐々に低下したが、投与12時間を過ぎても投与前より高い 5.5 ± 0.37 mMを示した ($p < 0.01$)。

一方、2倍体の血漿カルシウム濃度も、3倍体の血漿カルシウム濃度の上昇と同じく、高カルシウム液投与前

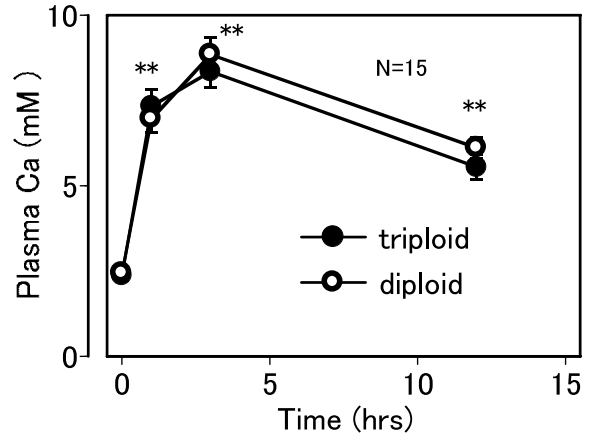


図19. オニオコゼの3倍体及び2倍体の血漿カルシウム濃度に及ぼす胃への高カルシウム液投与の影響

データは mean \pm S.E. を示し、N は個体数を示す。
 ** $p < 0.01$. 高Ca液投与前に対する有意差を示す。

に 2.4 ± 0.15 mMであったのが、投与1時間後に有意に上昇し ($p < 0.01$)、 7.0 ± 0.40 mMとほぼ3倍の濃度になった。2倍体では、投与3時間後でもさらに有意に上昇し、 8.8 ± 0.50 mMを示した ($p < 0.01$)。その後、徐々に低下したが、3倍体と同じく投与12時間後では、投与前よりも高い 6.1 ± 0.30 mMを示した ($p < 0.01$)。この間、血漿カルシウム濃度の変化において、3倍体と2倍体の間に統計的に有意な差は見られなかった。

3倍体と2倍体の鰹後腺は、いずれも高カルシウム液を投与しない鰹後腺より、ヘマトキシリン・エオシンの染色性が良かった。また両者とも、免疫組織化学法で染色すると基底部が強く染色された。しかしながら、3倍体と2倍体とでは、染色の強さや構造が多少異なっている様に見えた。3倍体の方がやや染色性が良く(写真8)、構造的には2倍体の方が複雑に見えた(写真9)。すなわち、2倍体では、鰹後腺が活性化された時に形成される小さな濾胞状の内腔が多数見られたが、3倍体は少数の大きな濾胞が観察されただけであった(写真10)。

(4) 考察

3倍体と2倍体のいずれにおいても、胃へ高カルシウム液が投与されると、直ちに血漿カルシウム濃度が有意に上昇した。これと同じ現象が、キンギョとウナギで報告されている (Sasayama et al., 1996; Suzuki et al., 1999; Sasayama et al., 2002)。本実験では、血漿カルシウム濃度を調べていないので、血漿カルシウム濃度が上昇した後の低下は、カルシトニンの作用によるものか否かは言及できないが、その可能性は高いと想像している。

3倍体と2倍体の鰓後腺を比較すると、3倍体の鰓後腺の方が横隔壁上に伸張している一方、鰓後腺単位面積当たりの核の数では3倍体が少ない様に見えるなど両者で若干の異なる形態を呈していた。また、キンギョ(Oguri, 1973)やサクラマス(Yamane and Yamada, 1997)においては、鰓後腺が大きな濾胞を形成している時は活性が低く、小さな濾胞を多数形成している時や濾胞が内腔に複雑に折れ込んでいる時は、活性が高いことが知られている。今回の実験において、3倍体より2倍体の鰓後腺の方が、小さな濾胞の形成や複雑な構造が見られた。

したがって、上記の知見に基づく限り、3倍体より2倍体において鰓後腺の活性が高いと考えられた。しかしながら、免疫組織化学染色は、3倍体の方がやや強く染まった。これを血漿カルシウム濃度の変化が両者で同じであったことをあわせて考えると、鰓後腺の活性は、内腔に複雑に入り込んだ小さな濾胞が多数形成されている2倍体の方が強く、一方、カルシトニンの生産量は、免疫染色が極め濃く染まった3倍体の方が多いと考えられる。しかしながら、結論を出す前に、より詳細な形態計測学的研究が必要であろう。

第三章 オニオコゼとメジナの血漿カルシウム濃度に及ぼす消化管への高カルシウム液投与の影響

1. はじめに

ラットへ一定量のカルシトニンを投与すると、血中カルシウム濃度は、30分間以内に急激に低下する。これは、カルシトニンが破骨細胞の活性を減少させ、骨からカルシウムを溶出させる機構を抑制するからである(Azria, 1989)。魚類においてもカルシトニンは、同様な機能を持つと考えられ、多少の研究がなされてきた。

正常に摂餌させたウナギと絶食させたウナギでは、後群より前群の血中カルシウム濃度の方が有意に高く、血中カルシトニン濃度も有意に高いことが報告されている(Sasayama *et al.*, 1996)。また、消化管へ高カルシウム液を投与されたキンギョでは、生理食塩水を投与された群より血中カルシウム濃度が有意に高く、血中カルシトニン濃度も高い傾向にあることが示されている(Sasayama *et al.*, 1996)。さらに、再びウナギにおいても同様な実験がされており、消化管へ高カルシウム液を投与すると血中カルシウム濃度が有意に上昇し、やや遅れてカルシトニン濃度も有意に上昇することが報告されている(Suzuki *et al.*, 1999)。これらの事実は、これらの魚種においてカルシトニンは、血中カルシウム濃度の上昇を抑制する上で役立っていることを示唆している。しかしながら、これまでの研究で用いられてきた真骨魚は、淡水と海水を往復する広塩性の魚種や、高カルシウム環境に晒されることのない淡水魚などであった。本章では、常に海に棲み、魚食性のオニオコゼと雑食性のメジナを用いて、消化管へ高カルシウム液を投与した時に、血漿カルシウム濃度がどのように変化するかを調べることとした。これまで純粋の海産真骨魚のカルシウム代謝についての知見は全く知られていない。

そこで、本章における2において、オニオコゼとメジナの胃へ高カルシウム液を投与した時の血漿カルシウム濃度に加えて、胃から採取された液(以下、胃内容液)のカルシウム濃度および胃内容液pHを経時的に調べた。さらに、オニオコゼについては、直腸から採取された液(以下、直腸液)のカルシウム濃度および尿カルシウム濃度の変化も調べた。その結果、胃内容液カルシウム濃度に興味深い変化が見られたので、本章の3としてメジナの胃の幽門部を結紮し、高カルシウム液が胃へ逆流するのを防ぐ処理をした後、高カルシウム液を直腸へ投与し、血漿カルシウムと胃内容液カルシウム濃度を調べた。

2. オニオコゼとメジナの血漿カルシウム濃度に及ぼす胃への高カルシウム液投与の影響

(1) 材料

材料は、石川県水産総合センターにおいて、同一親魚から採卵し、生物餌料や配合飼料を給餌して種苗生産したオニオコゼ35尾および天然のメジナ10尾を用いた。これらの実験魚は、実験開始3週間前から絶食させた。オニオコゼの体重は 40.2 ± 3.70 g、メジナの体重は 86.9 ± 6.05 gであった。

(2) 方法

①高カルシウム液の投与

高カルシウム液の投与量は、オニオコゼに対しては魚体重100g当たり1mlの割合で、メジナに対しては魚体重100g当たり0.5mlの割合で胃へ投与した。高カルシウム液の調製方法およびその投与方法は、第II章3(2)①に示した方法に準じた。

②採血

2-フェノキシエタノール(1/5,000)で麻酔を掛け、オニオコゼの血液を高カルシウム液投与直前、1時間後、3時間後、9時間後および33時間後にそれぞれ異なる個体の尾部血管からヘパリンNaで処理をした1mlシリンジを用いて採血した。また、メジナの血液は、高カルシウム液投与直前、3時間後、9時間後および33時間後に、同一個体の尾部血管からヘパリンNaで処理をした1mlシリンジを用いて経時的に採血した。血漿採取に関する方法は、第II章3(2)②に準じた。

③胃内容液の採取

オニオコゼとメジナの両魚種より、採血と同じ時間に胃内容液を採取した。各回の採血を終えた後に、シリンジの先に付けたカニューレを口腔から胃へ向けて挿入した。カニューレが胃へ到達したのを確認した後に、シリンジのピストンを軽く吸引しながら、カニューレを徐々に引き抜き胃内容液を採取した。採取した胃内容液は、11,000rpm、5℃、2分間の遠心分離を行い、上澄み液を採取し、カルシウム濃度およびpHの測定に用いた。

④直腸液および尿の採取

オニオコゼより直腸液および膀胱に貯留している尿をシリンジで採取し、カルシウム濃度の測定に用いた。

⑤カルシウム濃度の測定

カルシウム濃度の測定に関する方法は、第II章3(2)③に準じた。

⑥胃内容液のpHの測定

pHは、pH Indicator Paper pH0-14(Whatman Inter-

national Ltd, Germany) を用いて測定した。

⑦統計処理

オニオコゼとメジナのそれぞれの時系列における、各種体液カルシウム濃度の平均値の比較は、ANOVA と Fisher の PLSD 検定を用いて統計処理を行った。

(3)結果

オニオコゼにおける血漿カルシウム濃度の変化および胃内容液カルシウム濃度の変化を、それぞれ図20、図21に示した。

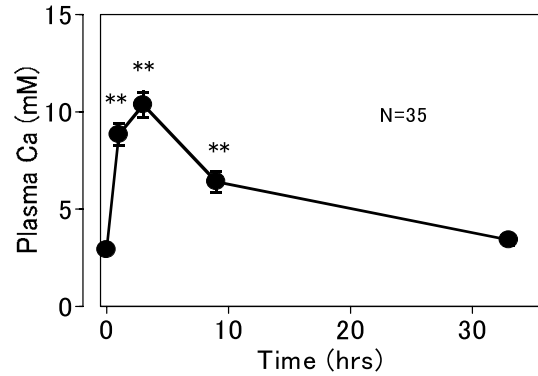


図20. オニオコゼの血漿カルシウム濃度に及ぼす胃への高カルシウム液投与の影響

データは mean ± S.E. を示し、N は個体数を示す。
** p < 0.01, 高 Ca 液投与前に対する有意差を示す。

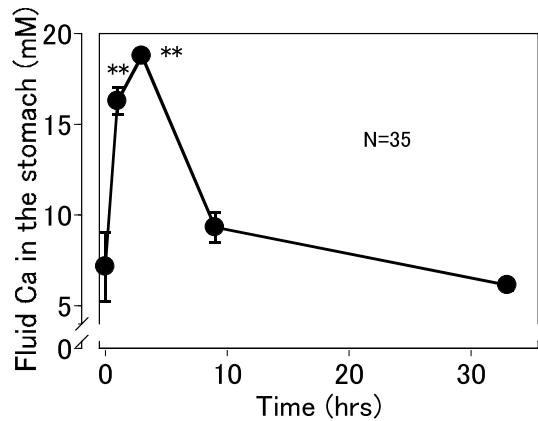


図21. オニオコゼの胃内容液カルシウム濃度に及ぼす胃への高カルシウム液の投与の影響

データは mesn ± S.E. を示し、N は個体数を示す。
** p < 0.01, 高 Ca 液投与前に対する有意差を示す。

血漿カルシウム濃度は、高カルシウム液投与前に2.9 ± 0.06mM であったのが、投与後急激に上昇して、1時間後に8.8 ± 0.58mM となり、その上昇は有意であった (p < 0.01)。血漿カルシウム濃度はその後も上昇を続け、投与3時間後にピークに達し、10.4 ± 0.66mM を示した。しかしながら、時間が経過すると、投与9時間後に6.4 ± 0.55mM となり、徐々に低下した。ただし、この値は依然として投与前より高いレベルにあった (p < 0.01)。その後、投与33時間後には、投与前のレベルに戻り、3.4 ± 0.26mM を示した。

胃内容液カルシウム濃度は、高カルシウム液投与前にすでに7.2 ± 1.89mM を示し、血漿カルシウム濃度の約3倍の値であった。胃内容液カルシウム濃度も血漿カルシウム濃度と同様に、高カルシウム液投与直後に急激に有意に上昇し、投与1時間後で16.3 ± 0.73mM を示した (p < 0.01)。しかしながら、投与3時間後にピークに達し、18.8 ± 0.27mM (p < 0.01) を示した後、急激に低下し、投与9時間後には、9.3 ± 0.82mM となり、有意差は認められなくなった。投与33時間後には開始時の値とほぼ同じ6.1 ± 0.29mM になった。

この様に血漿カルシウム濃度と胃内容液カルシウム濃度の変化は、ほとんど同じ傾向を示した。そこで、図22に示した様にこれらの関係を調べたところ、血漿カルシウム濃度と胃内容液カルシウム濃度は、相関係数0.84 (p < 0.01) で強い相関が認められた。

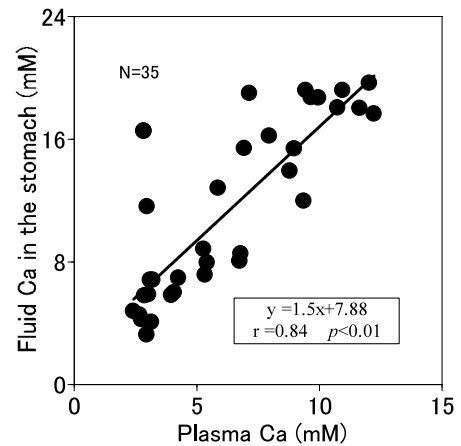


図22. オニオコゼの胃に高カルシウム液を投与したときの血漿カルシウム濃度と胃内容液カルシウム濃度の相関関係

N は個体数を示す。

胃内容液 pH の変化を図23に示した。胃内容液 pH は、高カルシウム液投与前に $pH3 \pm 0.2$ を示して強酸性であったが、投与1時間後に酸性度は急速に弱まり、 $pH5 \pm 0.3$ を示した。この変化は、有意であった ($p < 0.01$)。その後も有意に上昇し続け、投与3時間後に $pH6 \pm 0.3$ と中性近くになり ($p < 0.01$)、投与9時間後でも胃内容液の pH は、この値近くであった。投与33時間後では、再び投与前のレベルまで戻り、 $pH4 \pm 0.5$ を示した。

胃内容液は、終始、粘性を持っていたが、高カルシウム液投与前より、投与後の方が粘性が高かった。

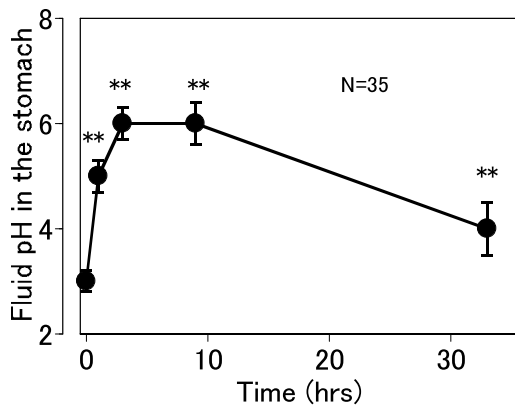


図23. オニオコゼの胃内容液カルシウム濃度に及ぼす高カルシウム液投与の影響

データは mean ± S.E. を示し、N は個体数を示す。
** $p < 0.01$ 、高 Ca 液投与前に対する有意差を示す。

直腸液および尿カルシウム濃度の変化をそれぞれ図24と図25に示した。

直腸液カルシウム濃度は、高カルシウム液投与前に $7.4 \pm 0.60 \text{ mM}$ であったのが、投与1時間後に有意に上昇し ($p < 0.05$)、 $12.5 \pm 2.22 \text{ mM}$ になった。投与3時間後に低下し、 $8.3 \pm 2.62 \text{ mM}$ となったが、その後、再び上昇を始め、投与9時間後に $22.5 \pm 2.63 \text{ mM}$ になった ($p < 0.01$)。投与33時間後には、 $4.3 \pm 1.20 \text{ mM}$ になり、投与9時間後より有意に低下 ($p < 0.01$) し、高カルシウム投与前と有意差は認められなかった。

尿カルシウム濃度は、高カルシウム液投与前に $4.8 \pm 0.58 \text{ mM}$ であったが、投与1時間後でも全く変化がなく、 $4.8 \pm 0.79 \text{ mM}$ であった。しかしながら、投与3時間後には、 $11.7 \pm 1.20 \text{ mM}$ と急激に上昇し ($p < 0.01$)、投与33時間後までそのレベルより低下することはなかった。

メジナにおいても同じ実験を行った。血漿カルシウム濃度および胃内容液のカルシウム濃度の変化を、それぞれ図26、図27に示した。

高カルシウム液投与前の血漿カルシウム濃度は、 $2.5 \pm 0.16 \text{ mM}$ であったが、投与3時間後に $3.6 \pm 0.35 \text{ mM}$ にまで急激に上昇した。この変化は、有意であった ($p < 0.01$)。投与9時間後には、投与前のレベルにまで戻り、 $2.3 \pm 0.30 \text{ mM}$ を示した。投与33時間後においても、そのレベルは変わらず、 $2.5 \pm 0.05 \text{ mM}$ であった。

一方、胃内容液のカルシウム濃度は、高カルシウム液投与前にすでに $8.4 \pm 0.31 \text{ mM}$ を示し、オニオコゼの場合と同じく、血漿カルシウム濃度の約3倍であった。胃内容液カルシウム濃度も高カルシウム液投与3時間後に有意に上昇し、 $13.7 \pm 1.00 \text{ mM}$ を示した。その後は、血漿カルシウム濃度と同じ変化を示し、投与9時間後に投与前のレベルに戻った。その時の値は、 $7.6 \pm 0.36 \text{ mM}$ であった。投与33時間後においても、その値はほとんど変わらず、 $7.0 \pm 0.42 \text{ mM}$ であった。また、オニオコゼと同様にメジナにおいても血漿カルシウム濃度と胃内容液カルシウム濃度の変化は、同じ傾向を示した。これらの間の関係は、図28に示した様に相関係数 0.62 ($p < 0.01$) で高い相関が認められた。

メジナの胃内容液 pH の変化を図29に示した。メジナの胃内容液 pH も、オニオコゼの pH 変化と同じ傾向を示した。高カルシウム液投与前には $pH3 \pm 0.3$ を示して強酸性であったが、投与1時間後に酸性度は急激に弱まり、 $pH6 \pm 0.5$ を示した。この変化は有意であった ($p < 0.01$)。投与9時間後でも胃内容液の pH は、この値の近くであった。投与33時間後では、再び投与前のレベルまで戻り $pH4 \pm 0.6$ を示した ($p < 0.01$)。

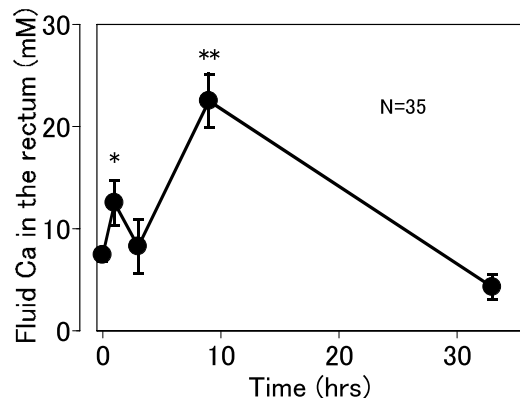


図24. オニオコゼの直腸液カルシウム濃度に及ぼす胃への高カルシウム液投与の影響

データは mean ± S.E. を示し、N は個体数を示す。
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 、高 Ca 液投与前に対する有意差を示す。

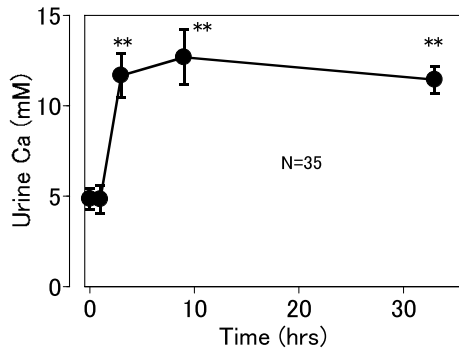


図25. オニオコゼの尿カルシウム濃度に及ぼす胃への高カルシウム液投与の影響

データは mean ± S.E. を示し, N は個体数を示す.
** $p < 0.01$, 高 Ca 液投与前に対する有意差を示す.

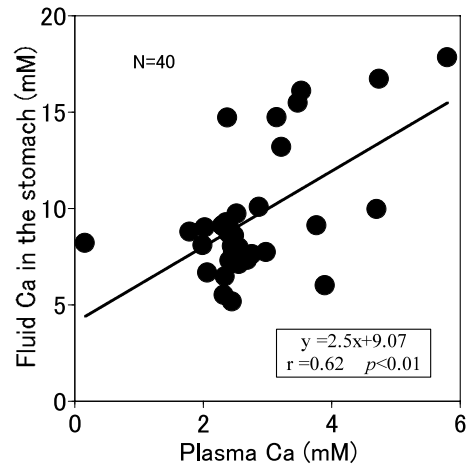


図28. メジナの胃へ高カルシウム液を投与したときの血漿カルシウム濃度と胃内容液カルシウム濃度の相関関係
N は個体数を示す.

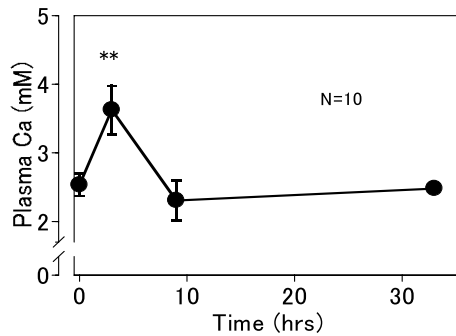


図26. メジナの血漿カルシウム濃度に及ぼす高カルシウム液投与の影響

データは mean ± S.E. を示し, N は個体数を示す.
** $p < 0.01$, 高 Ca 液投与前に対する有意差を示す.

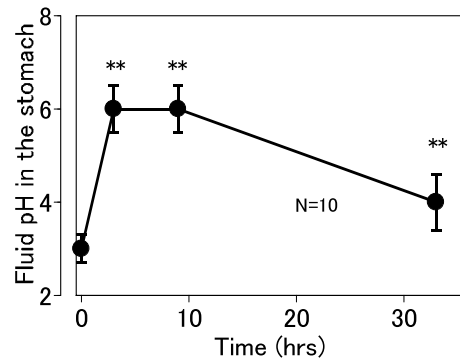


図29. メジナの胃内容液 pH に及ぼす高カルシウム液投与の影響

データは mean ± S.E. を示し, N は個体数を示す.
** $p < 0.01$, 高 Ca 液投与前に対する有意差を示す.

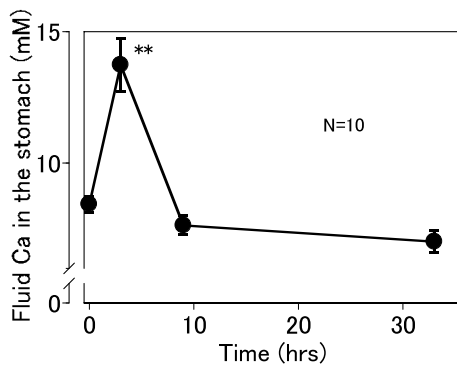


図27. メジナの胃内容液カルシウム濃度に及ぼす胃への高カルシウム液投与の影響

データは mean ± S.E. を示し, N は個体数を示す.
** $p < 0.01$, 高 Ca 液投与前に対する有意差を示す.

(4) 考察

オニオコゼとメジナの両魚種において, 血漿カルシウム濃度と胃内容液カルシウム濃度に正の相関関係が見られたことから, 血漿カルシウム濃度の上昇に伴って胃内容液カルシウム濃度も上昇し, その逆も真であることが明らかになった. このような結果になった理由として, 4つの可能性が考えられる. すなわち, 投与された高カルシウム液が, 飲水された海水によって希釈された可能性. 次に, 投与された高カルシウム液が投与後に腸へ移送されたが, その後再び胃へ逆流した可能性. また, 投与された高カルシウム液の大部分は吸収されたのだが, 飲水された海水の1価イオンや水が, 食道や胃で吸収さ

れたため、2価イオンが濃縮された可能性。さらに、体液中のカルシウムが胃へ分泌された可能性である。

第一の可能性について考察する。海水を飲むことによって胃の中の高カルシウム液が希釈されたならば、図21において胃内容液カルシウム濃度は、高カルシウム液投与1時間後よりも3時間後で低い値となっていなければならない。しかしながら、実際は投与1時間後より3時間後の方が有意($p < 0.05$)に高いため、この一点を見る限り、高カルシウム液が海水により希釈されたという可能性は考えにくい。

次に高カルシウム液が胃へ逆流したという可能性については、高カルシウム液投与3時間後に有意差はなかったものの、直腸液カルシウム濃度が低下した。したがって、腸へ移送された高カルシウム液が再び胃へ逆流したため、胃内容液カルシウム濃度が上昇し、その反面に直腸液カルシウム濃度が低下したとも考えられ、高カルシウム液が腸から胃へ逆流したという可能性は除外できない。

次に、飲み込まれた海水が濃縮されたという可能性を論ずる。通常の海水のカルシウム濃度は、約10mMである。高カルシウム液を胃へ投与する前の胃内容液カルシウム濃度は 7.2 ± 1.89 mMであるので飲み込まれた海水が胃に留まっている様にも見える。しかしながら、胃内容液のpHは高カルシウム液投与前でpH3を示しており、普段、単に海水が貯まっているのであればpH8前後であるはずである。このことは、海水が飲まれた後、胃より強酸が分泌され、胃内容液はいわゆる胃液として強い酸性を示していることを意味する。したがって、本実験では、高カルシウム液投与後に海水が飲まれ、その影響でpHが若干中性に傾いたとも解釈でき、pHの変化から海水が飲み込まれた可能性を除外できない。

さらに体液から胃へカルシウムが分泌された可能性について考察する。多くの魚種において、餌を円滑に飲み込むために食道部に存在する粘液腺から、体液を分泌するとともに消化酵素が分泌される(池田,1989; 竹内,1991; 小栗,1994)。また胃腺からは、消化液として胃酸とペプシノーゲンが分泌されることも知られている(岩井,1994)。本実験で得られた胃内容液は、pH3の強酸で、終始、粘性を持っていた。さらに、胃内容液pHの変化は、竹内(1991)が示したニジマスやテラピアへ給餌した時の胃酸のpH変化に類似していた。したがって、胃内容液として採取された高カルシウム濃度の体液は、胃酸などの消化液とも考えられる。哺乳類においては、消化液中にカルシウムが分泌されることが報告されている(千勝,松本,1999)。したがって、仮に魚類においても、それと同じ現象が起っているとすれば興味深い。現段階では証拠がないものの、この可能性は除外できない。

オニオコゼから採取した直腸液カルシウム濃度は、高カルシウム液投与9時間後で最も高く、血漿や胃内容液カルシウム濃度より時間的にずれが見られた。このことは、高カルシウム液が胃から腸へと移動したことを示している。一方、尿カルシウム濃度は、高カルシウム液投与1時間後まで変化がなく、投与3時間後に上昇した。投与1時間後まで尿カルシウム濃度に変化が見られなかったのは、腸から吸収されたカルシウムが腎臓へ移送され、尿として膀胱へ排出されるまでに時間が掛かったと考えられる。高カルシウム液を投与する実験においては、飼育水が高カルシウム液投与後に急激に汚濁した。このことから、投与3時間後以降に高カルシウム液を糞として排出するとともに、尿としても体外へ徐々に排出したためと考えられる。

したがって、本実験の結果から、胃に高カルシウム液が投与されて血漿カルシウム濃度が上昇すると、過剰のカルシウムの一部は、直腸へ移送されるとともに腎臓を介して膀胱へも移送され、その後尿として体外へ排出されることが示唆された。

これらの事実、血中カルシウム濃度が上昇すると、それを低下させるために様々な経路が働き、余剰のカルシウムを体外へ排出すると考えられる。

3. メジナの血漿カルシウム濃度に及ぼす直腸へ的高カルシウム液投与の影響

(1) 材料

材料は、体重 50.5 ± 1.83 gの天然のメジナ10尾を用いた。これらの魚は、実験開始3週間前から絶食させた。

(2) 方法

①手術

高カルシウム液を胃へ投与するのではなく、直腸へ投与するために写真11に示した手術を魚に施した。すなわち、腹部を切開し、胃の幽門部の後ろ2カ所を縫合糸で結紮し、再び腹部を縫い合わせた。

②高カルシウム液の投与

高カルシウム液の投与量は、魚体重100g当たり0.5mlの割合で直腸へ注入した。その他に関する高カルシウム液の調製方法およびその投与方法は、第II章3(2)①に準じた。

③採血

2-フェノキシエタノール(1/5,000)で麻酔を掛けた同一個体の尾部血管より、高カルシウム液投与直前および3時間後にヘパリンNaで処理した1mlシリンジを用いて採血した。血漿採取に関するその他の方法は、第II章3(2)②に準じた。

④胃内容液の採取

胃内容液の採取に関する方法は、第Ⅲ章2(2)③に準じた。

⑤カルシウム濃度の測定

カルシウム濃度の測定に関する方法は、第Ⅱ章3(2)③に準じた。

⑥統計処理

血漿カルシウム濃度と胃内容液カルシウム濃度のそれぞれの時系列における、平均値の比較は、Mann-WhitneyのU-検定を用いて統計処理を行った。

(3) 結果

血漿カルシウム濃度と胃内容液カルシウム濃度の変化をそれぞれ図30に示した。

血漿カルシウム濃度は、高カルシウム投与前に $2.5 \pm 0.19 \text{mM}$ であったが、直腸へ投与した3時間後に $5.4 \pm 0.65 \text{mM}$ へと有意に上昇した($p < 0.01$)。一方、高カルシウム液投与前の胃内容液カルシウム濃度は、血漿カルシウム濃度の約4倍の濃度 $10.1 \pm 0.45 \text{mM}$ であった。しかしながら、高カルシウム液投与3時間後でもその値に変化がなく、 $9.0 \pm 1.13 \text{mM}$ を示した。

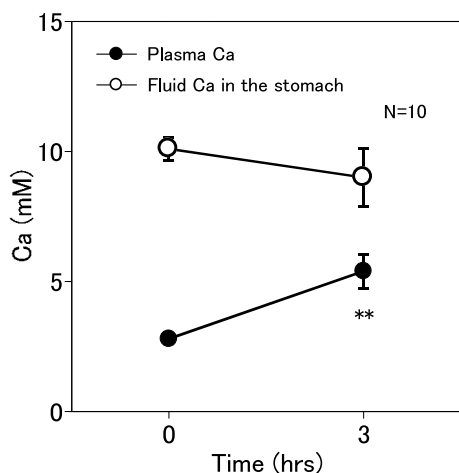


図30. メジナの血漿カルシウム濃度に及ぼす直腸への高カルシウム液投与の影響

データは mean \pm S.E.を示し、Nは個体数を示す。

** $p < 0.01$. 高Ca液投与前に対する有意差を示す。

(4) 考察

本実験においては、高カルシウム液が胃へ逆流したことによって、胃内容液カルシウム濃度が上昇した可能性が真か否かを調べるため、胃の幽門部を結紮して直腸へ高カルシウム液を投与し、胃内容液カルシウム濃度を調べた。その結果、高カルシウム液を投与した後、血漿カルシウム濃度が上昇しているにも係わらず、胃内容液カルシウム濃度の上昇は見られなかった。この結果と本章2において見られた胃内容液カルシウム濃度の様相から幾つかの可能性が考えられた。その可能性として、投与された高カルシウム液が胃から腸へ移送されたが、その後再び腸から胃へ逆流した可能性、あるいは、飲み込んだ海水の二価イオンが濃縮した可能性、さらに胃へカルシウムが分泌された可能性が考えられた。これらの可能性を本実験の結果と合わせて考察する。一つ目の腸から胃へ高カルシウム液が逆流した可能性は、本実験で幽門部を結紮し、高カルシウム液を投与したが、胃内容液カルシウム濃度は、全く上昇しなかった。したがって、この可能性は、本章2で考察したのと同じく除外できない。次に、飲み込んだ海水の二価イオンが濃縮されたという可能性は、もしこの要因で胃内容液カルシウム濃度が上昇したのであれば、幽門部を結紮しても胃内容液カルシウム濃度は上昇すると考えられる。しかしながら、本実験では上昇しなかった。したがって、この可能性は除外できる。さらに、胃からカルシウムが分泌されたという可能性は、飲水された海水の濃縮の時と同様に、胃へカルシウムが分泌されているならば、幽門部を結紮しても、胃へカルシウムが分泌され、胃内容液カルシウム濃度は、上昇するはずである。しかしながら、本実験では上昇しなかった。したがって、この可能性は除外できる様にも思える。だが、高カルシウム液が直接胃へ投与されるという刺激がないと胃内容液のカルシウム濃度が上昇しないのであれば、この可能性は除外できない。

以上のように、高カルシウム液投与後に胃内容液カルシウム濃度が上昇する様相が起こるのは、二つ可能性が除外できずに残った。したがって、実際に胃内容液カルシウム濃度が上昇するのは、これら二つの可能性のいずれによるものか、今後さらに実験を行い明らかにする必要がある。

第IV章 オニオコゼの血漿カルシウム濃度およびカルシトニン濃度に及ぼす消化管への高カルシウム液投与の影響

1. はじめに

オニオコゼは海にしか棲まず、魚を常食とし、しかも餌を丸飲みにする。したがって、消化の過程で胃内容液のカルシウム濃度は一過性に上昇し、これが血漿カルシウム濃度に影響を与えると考えられる。

一般に、海産真骨魚類の血漿カルシウム濃度の制御は、スタニウム小体から分泌されるスタニオカルシンと鰹後腺から分泌されるカルシトニンの2つのホルモンによる影響が議論されている。スタニオカルシンは、海水適応に際して鰹、腸および腎臓から体内にカルシウムが流入するのを抑制する一方、硬組織にカルシウムの沈着を促す(Sasayama, 1999)。したがって、スタニオカルシンは、海水適応時に血漿カルシウム濃度を低下させるホルモンである。スタニオカルシンのこの働きは研究者の間で一致して支持されている。

それに対して、カルシトニンの役割についてはまだ議論の余地がある。淡水ウナギを直接海水へ移行させると、血漿カルシウム濃度は上昇するが、血漿カルシトニン濃度は変化しない(Suzuki *et al.*, 1999)。したがって、カルシトニンはウナギにおいては海水適応のための調節ホルモンではないとされている。一方、雌の硬骨魚類においては、成熟時に血漿カルシウム濃度が上昇するのに伴って、血漿カルシトニン濃度も上昇する。それゆえ、Björnrson ら(1986)は、カルシトニンは、生殖生理に関係するホルモンと示唆している。

一方、Sasayama ら(1996)は、カルシトニンは消化管前方部から血漿へ吸収されたカルシウムを調節するホルモンであり、血漿カルシウム濃度の過度な上昇を抑制する役割を担っていると主張している。すなわち、淡水ウナギにおいて、給餌した群の血漿カルシウム濃度と血漿カルシトニン濃度は、飢餓させた群のそれらより高かった。胃へ高カルシウム液を投与されたキンギョにおいては、血中カルシウム濃度は上昇するが、その時、血漿カルシトニン濃度は、対照群より高い傾向にあった。これら二つの事実は、カルシトニンが、高カルシウム血症に対応して分泌されることを示唆している(Sasayama *et al.*, 1999)。しかしながら、自然環境において、キンギョの血漿カルシウム濃度を急激に上昇させる様な餌はない。淡水ウナギにおいても、胃へ高カルシウム液を投与することによって、血中カルシウム濃度が上昇し、それに続けて血漿カルシトニン濃度も上昇した(Suzuki *et al.*, 1999)。したがって、この結果も、カルシトニンが高カルシウム血症の発症に伴って分泌されることを示し

ている。しかしながら、この実験において採取された血液は、尾動脈と尾静脈が走っている尾部からシリンジを用いて得られたものである。したがって、尾動脈と尾静脈血管のどちらの血管から血液が採取されたのか、不明である。カルシトニン濃度は、動脈と静脈の間で異なるに違いないので、これは重要なポイントである。最近、Sasayama ら(2002)は、淡水ウナギにおいて鰹静脈を経由させて、鰹後腺へ高カルシウム液を直接注入し、高カルシウム血症を引き起こさせた場合でも、カルシトニンが分泌されることを示した。しかしながら、これまで述べてきたすべての報告では、実験処理後、最初の3時間の血液のみ分析されている。この期間は、血漿カルシトニン濃度が徐々に上昇し始めた時期にあたる。したがって、血漿カルシウム濃度がピークに達し、その後低下し始めた時、鰹後腺からカルシトニンの分泌が停止するか否かは調べられたことがなかった。本実験においては、カルシトニン濃度を正しく測定するために、鰹後腺を通過した直後の血液が集まる動脈球より採血することにした。

2. 材料

材料は、石川県水産総合センターで、同一親魚から採卵し、生物餌料や配合飼料を給餌して養殖したオニオコゼを用いた。これらの魚は、試験開始3週間前から絶食させた。実験は、2回行った。実験1の高カルシウム液投与群10尾の体重は、 $85.2 \pm 4.05\text{g}$ 、対照群4尾の体重は、 $56.0 \pm 7.83\text{g}$ で、実験2の11尾の体重は、 $83.3 \pm 1.58\text{g}$ であった。

3. 方法

(1) 手術

動脈球から直接採血するために、写真12に示した手術を実験魚に施した。注射針(25G テルモ、東京)を鉤状に加工し、根元にカニューレとしてポリエチレンチューブ(PE50; クレイアダムス)を取り付けたものを用意した。カニューレには、血液の凝固防止のためにヘパリン Na 100IU/ml を含む1.35%NaCl をあらかじめ封入しておき、魚体の下顎中央部を切開し、針を動脈球へ取り付け、再び縫合した。針とカニューレは、実験終了までそのままにしておき、経時的採血に用いた。なお、カニューレの末端にはピンで封をし、採血の時はシリンジに置き換えた。

(2) 高カルシウム液の投与

高カルシウム液の投与量は、魚体重100g 当たり0.5ml

の割合で胃の中へ注入した。高カルシウム液の調製方法およびその投与方法は、第Ⅱ章3(2)①に準じた。実験1の対照群には、食紅で着色したコンソメ溶液のみを実験群と同じ割合投与した。

(3) 採血

血液は、実験1において高カルシウム液投与直前、1時間後、3時間後、9時間後および33時間後に2-フェノキシエタノール(1/5,000)で麻酔を掛けて、ヘパリンNaで処理したヘマトクリット管に採った。実験2においては、高カルシウム液投与直前、9時間後、33時間後および81時間後に実験1と同様に、採血した。採血する時間以外の魚体は、海水が入れかわるが自由な活動は抑制される容器へ1尾づつ収容し、水温20°Cで保持した。

血漿採取に関するその他の方法は、第Ⅱ章3(2)②に準じた。

(4) カルシウム濃度の測定

カルシウム濃度の測定に関する方法は、第Ⅱ章3(2)③に準じた。

(5) カルシトニン濃度の測定

カルシトニン濃度測定のためのプロトコルを図31に示した。

測定には Calcitonin (Salmon) Enzyme Immunoassay Kit:High Sensitivity (PENINSURA LABORATORIES,INC.)を用いた。なお、本実験に先立ち、オニオコゼの血漿サンプルが、サケのカルシトニンによって得られる標準曲線と平行になることを確認している。

(6) 統計処理

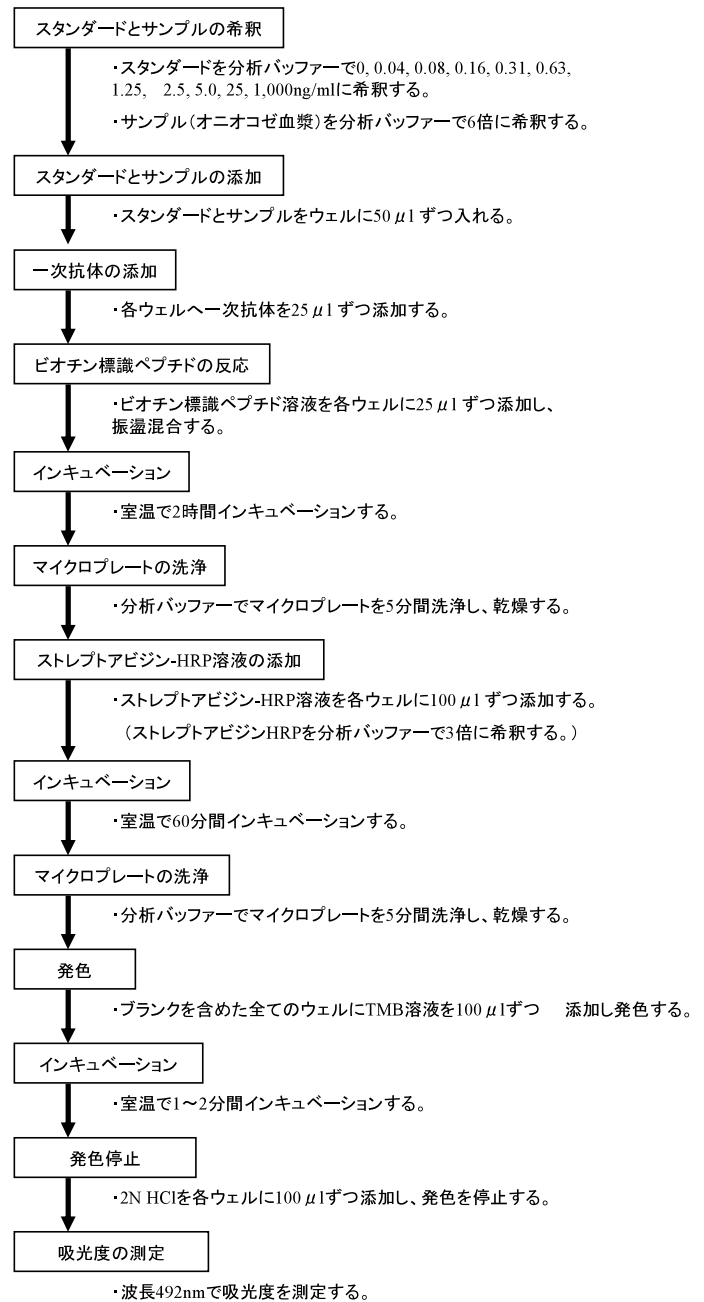
時系列における、血漿カルシウム濃度およびカルシトニン濃度の平均値の比較は、ANOVAとFisherのPLSD検定を用い、時間的に対応した平均値の比較には、Mann-WhitneyのU検定を用いて統計処理を行った。

4. 結果

(1) 実験1

血漿カルシウム濃度の変化を図32に示した。

血漿カルシウム濃度は、高カルシウム液投与前に 2.2 ± 0.25 mMであったのが投与1時間後と3時間後に有意に上昇し、それぞれ 3.5 ± 0.32 mM ($p < 0.05$)と 4.6 ± 0.48 mM ($p < 0.01$)になった。投与9時間後のカルシウム濃度は、投与3時間後と変化がなく 4.5 ± 0.49 mMであった。投与33時間後に血漿カルシウム濃度は、有意に低下し、 3.2 ± 0.27 mMになった($p < 0.05$)。この値は、投与前の値と統計的に有意差がなかった。それに対し、対照群の高カルシウム液投与前の血漿カルシウム濃度は、 2.8 ± 0.32 mMで、この値は実験時間を通してほとんど変わらず、有意な変化は見られなかった。



血漿カルシトニン濃度の変化を図33に示した。血漿カルシトニン濃度は、高カルシウム液投与前に 440.2 ± 43.78 pg/mlであったのが、投与1時間後と3時間後に、それぞれ 684.8 ± 136.44 と 631.9 ± 136.45 pg/mlへとわずかに変化を示した。しかしながら、投与9時間後に血漿カルシトニン濃度は、上昇し、 878.5 ± 210.49 pg/mlになった。さらに、投与33時間後でも血漿カルシトニン濃度は、上昇を続け、 1993.3 ± 411.06 pg/mlに達した($p < 0.05$)。対照群の血漿カルシトニン濃度は、高カルシウム液投与前に 541.8 ± 129.85 pg/mlで、この値は実験

時間を通してほとんどかわらず、有意な変化は見られなかった。

(2) 実験 2

血漿カルシウム濃度の変化を図34に示した。

高カルシウム液投与33時間後までの変化は、実験1の結果と同じ傾向を示した。投与前の血漿カルシウム濃度は、 3.0 ± 0.12 mMであったが、投与9時間後に有意に上昇し、 4.7 ± 0.33 mMになった ($p < 0.01$)。その後、投与33時間後に 3.8 ± 0.20 mMに低下したが投与前の濃度より有意に高かった ($p < 0.05$)。しかしながら、81時間後に血漿カルシウム濃度は、さらに低下して $3.1 \pm$

0.18 mMになり、投与前の値と有意差は見られなかった。

血漿カルシトニン濃度の変化を図35に示した。

血漿カルシトニン濃度の変化も投与33時間後まで、実験1で得られた結果とほぼ同じであった。血漿カルシトニン濃度は、高カルシウム液投与前と投与9時間後に、それぞれ 320.7 ± 18.41 pg/mlと 685.2 ± 95.44 pg/mlであった。投与33時間後の血漿カルシトニン濃度は、9時間後の値よりさらに上昇を続け 3221.8 ± 755.54 pg/mlになった ($p < 0.01$)。しかしながら、投与81時間後の血漿カルシトニン濃度は、投与33時間後のレベルの約半分にまで有意に低下し、 1508.9 ± 326.21 pg/mlであった ($p < 0.05$)。

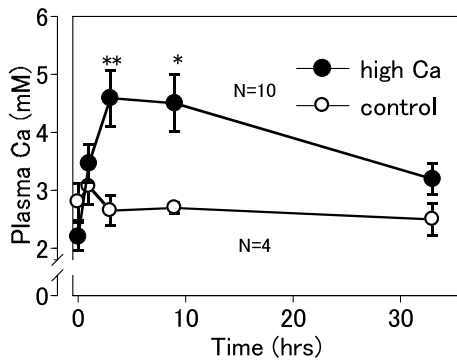


図32. オニオコゼの血漿カルシウム濃度に及ぼす高カルシウム液投与の影響

データは mean \pm S.E.を示し、Nは個体数を示す。
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, control に対する有意差を示す。

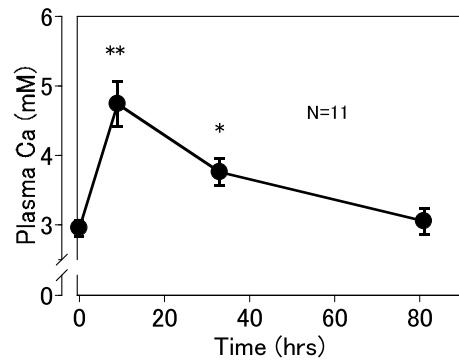


図34. オニオコゼの血漿カルシウム濃度に及ぼす高カルシウム液投与の影響

データは mean \pm S.E.を示し、Nは個体数を示す。
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, 高Ca液投与前に対する有意差を示す。

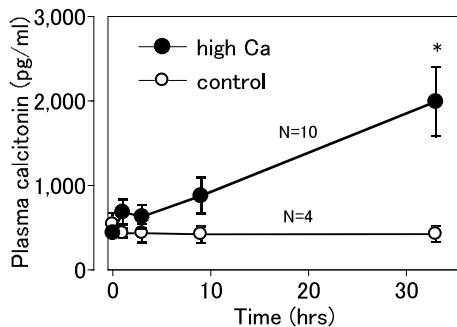


図33. オニオコゼの血漿カルシトニン濃度に及ぼす高カルシウム液投与の影響

データは mean \pm S.E.を示し、Nは個体数を示す。
* $p < 0.05$, control に対する有意差を示す。

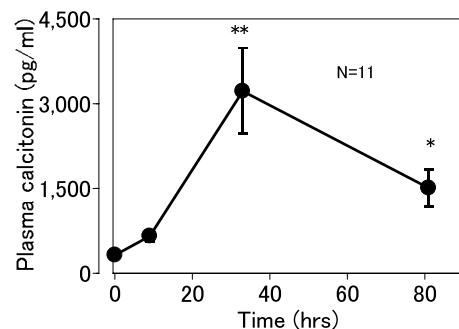


図35. オニオコゼの血漿カルシトニン濃度を与える高カルシウム液投与の影響

データは mean \pm S.E.を示し、Nは個体数を示す。
* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, 高Ca液投与前に対する有意差を示す。

5. 考察

本研究の結果は、オニオコゼもキンギョや淡水ウナギで見られた様に、鰹後腺は血漿カルシウム濃度の過度な上昇に対し、カルシトニンを分泌する能力を有することを示している (Sasayama *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1999). しかしながら、血漿カルシウム濃度とカルシトニン濃度の変化を詳細に見ると、それぞれの様相は異なっていた。血漿カルシウム濃度は、高カルシウム液投与後直ちに反応して投与1時間後に上昇したが、血漿カルシトニン濃度は、血漿カルシウム濃度が上昇した後に、上昇し始めた。この事実は、鰹後腺が血漿カルシウム濃度の上昇に正確に反応したことを示している。しかしながら、血漿カルシウム濃度は投与33時間後に低下し始めたにもかかわらず、投与33時間後の血漿カルシトニン濃度は、投与9時間後の濃度より、さらに上昇し続けた。これらの変化は、2つの可能性を示すものである。すなわち、血漿カルシウム濃度の上昇に対してカルシトニンの分泌が

オーバーシュートした可能性が考えられる。もう1つは、カルシトニンの消費が血漿中のカルシウム濃度の低下に相関して減少したため、カルシトニンが血漿にオーバーフローした可能性である。ブラウントラウト (*Salmo trutta*) においては、血漿カルシウム濃度自身は安定している様に見えても、環境水に含まれるカルシウム量に応じて、血漿中のカルシトニンは消費されることが報告されている (Oughterson *et al.*, 1995). しかしながら、高カルシウム液投与81時間後に血漿カルシウム濃度が投与前の濃度に戻った時、血漿カルシトニン濃度は、ピークの値より低下した。この結果は、真骨魚において血漿カルシウム濃度の上昇と低下の連続変化に伴うカルシトニン分泌の動態を示した最初の報告である。自然環境に生息するオニオコゼにおいても、小魚を胃へ飲み込んだ時、血漿カルシウム濃度とカルシトニン濃度に同様の変化が起きている可能性がある。



写真1 海産真骨魚
 a. オニオコゼ, *Inimicus japonicus* (CUVIER)
 b. メジナ, *Girella punctata* GRAY

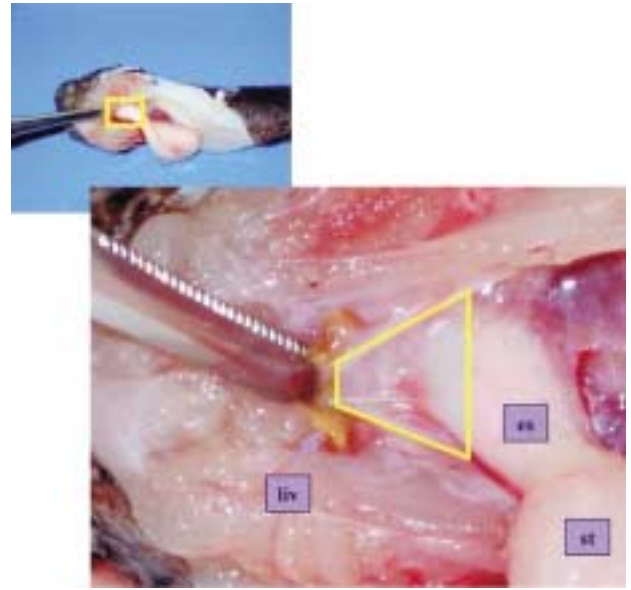


写真3 鰓後腺の観察できた部位
 枠内の部位で鰓後腺が観察された。
 es: 食道, liv: 肝臓摘出痕, st: 胃

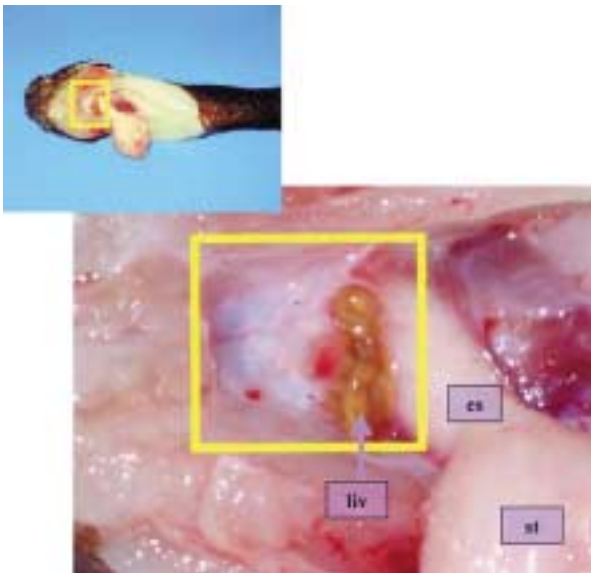


写真2 オニオコゼにおける鰓後腺を含む部分の拡大写真
 黄色枠内を摘出。es: 食道, liv: 肝臓摘出痕, st: 胃

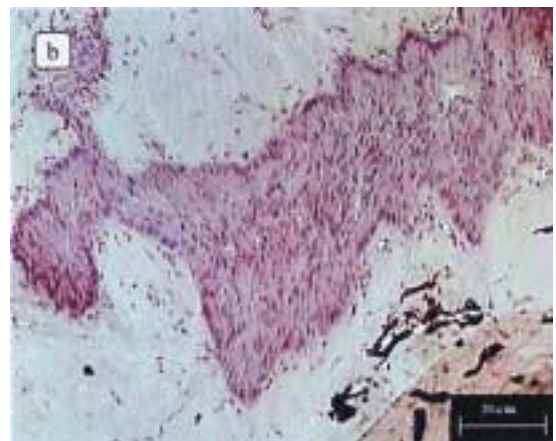
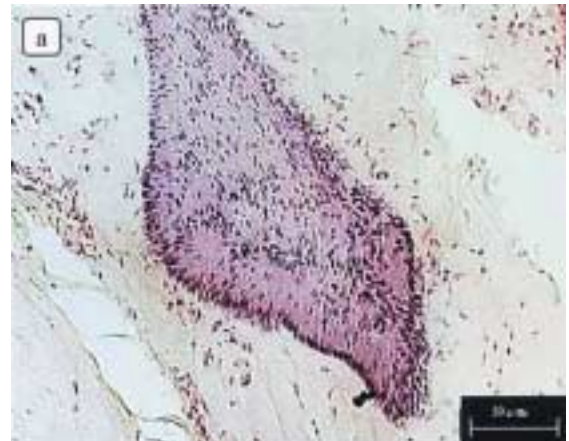


写真4 3倍体と2倍体の鰓後腺(HE染色)
 a. 3倍体, b. 2倍体

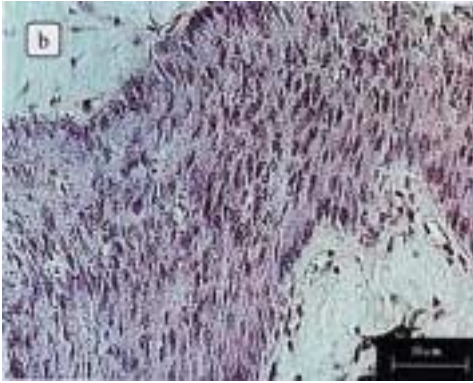
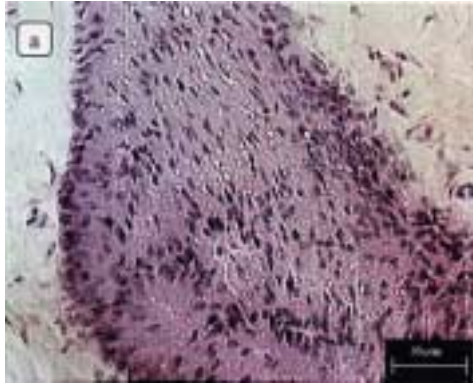


写真5 3倍体と2倍体の鰓後腺(HE染色)
a. 3倍体, b. 2倍体



写真7 オニオコゼの消化管への高カルシウム投与
シリンジ内の赤色溶液は、高カルシウム液。

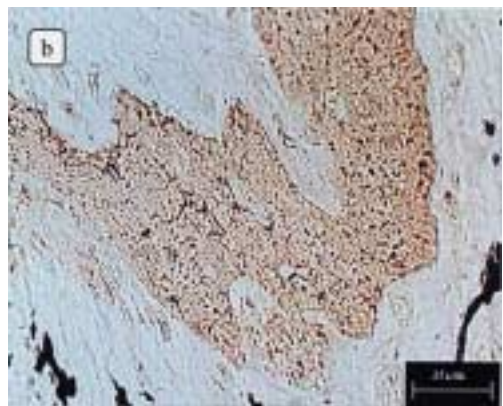
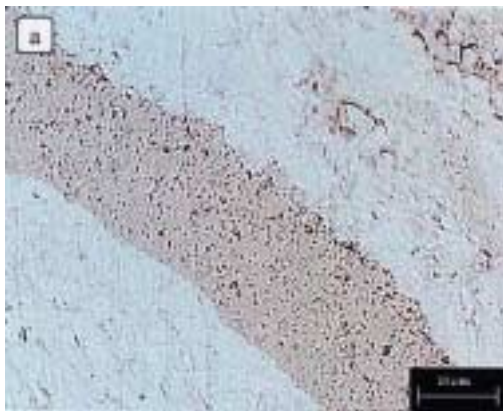


写真6 3倍体と2倍体の鰓後腺(免疫染色)
a. 3倍体, b. 2倍体

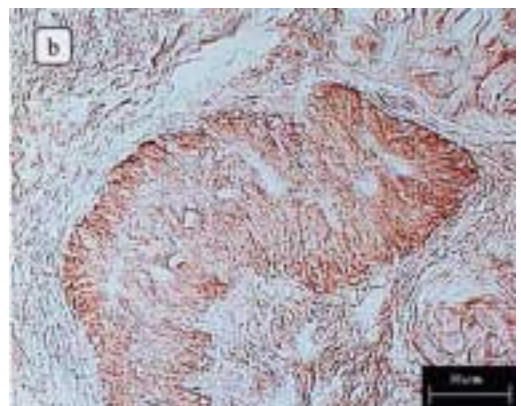
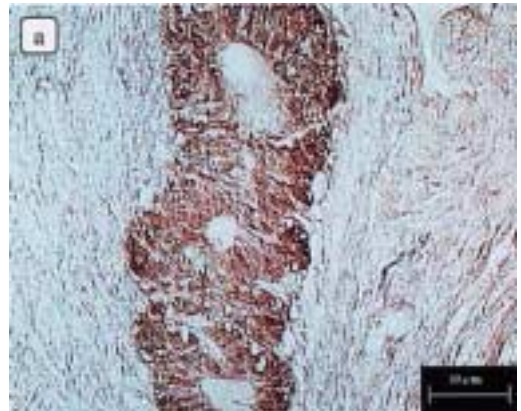


写真8 高カルシウム液投与後の3倍体と2倍体の鰓後腺
(免疫組織化学的染色)
a. 3倍体, b. 2倍体

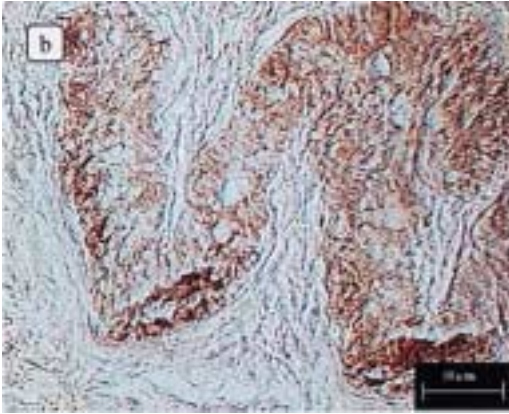
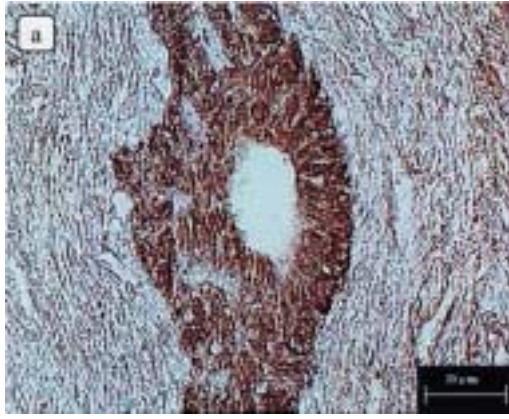


写真9 高カルシウム液投与後の3倍体と2倍体の鰓後腺
(免疫組織化学的染色)
a. 3倍体, b. 2倍体

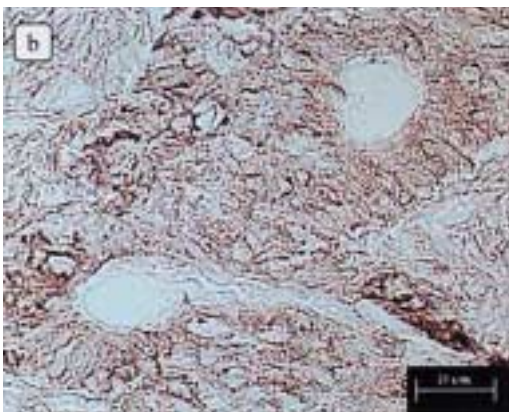
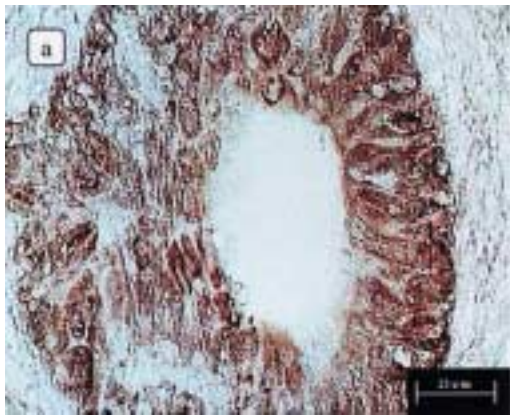


写真10 高カルシウム液投与後の3倍体と2倍体の鰓後腺
(免疫染色)
a. 3倍体, b. 2倍体



写真11 メジナの幽門部の結紮
太矢印は、手術糸で結紮した部位を示す。

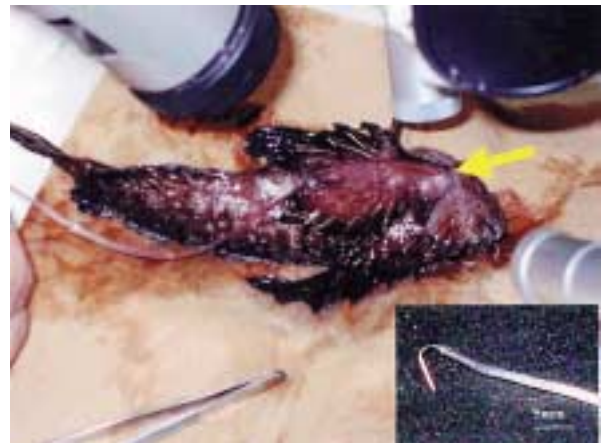


写真12 動脈球へカニューレの挿入
矢印部を切開し、右下写真のカニューレを動脈球へ挿入する。

第V章 総合考察

哺乳類における血中カルシウム濃度は、副甲状腺ホルモンが過度な低下を防ぎ、逆に甲状腺のC細胞より分泌されるカルシトニンが過度な上昇を防ぐことによって一定に保たれている。一方、魚類に副甲状腺はないが、脳下垂体のプロラクチンが血中カルシウム濃度の上昇をもたらすことが知られている。さらに、ビタミンDも上昇に働くことが報告されている。しかしながら、一般的にホルモンの作用は、冷血動物である魚類よりも、哺乳類の方がはるかに素早くその有効性を発揮するイメージがある。また、ホメオスタシスの仕組みも哺乳類では高度に発達し、魚類においては未発達と見なされているかも知れない。しかしながら、本研究の結果は、魚類においてもカルシウムホメオスタシスのホルモ的な調節は哺乳類に比して厳密に行われているとすることができることを示唆している。すなわち、哺乳類において重要な役割を果たしているカルシトニンは、硬骨魚においてもその重要性は変わらず、硬骨魚の間で分子の保存性すら高い。

哺乳類においてC細胞は甲状腺において豊富な血液の供給を受けるが、魚類においてもカルシトニンを分泌する鰓後腺は、毛細血管によって豊富な血液の供給を受けている。また、甲状腺と同じく鰓後腺も心臓の近くに位置し、血中カルシウム濃度のモニターやホルモンの分泌に都合が良いと考えられる。

オニオコゼの3倍体と2倍体の高カルシウム液に対する反応に差は認められなかった。3倍体の鰓後腺の実質細胞は、2倍体の鰓後腺の実質細胞と比べると数において少ないが、大きさにおいて勝っているため、全体の機

能としては2倍体の鰓後腺と変わらないであろう。3倍体の魚類のカルシウムホメオスタシスを調べたのは本研究が初めてである。

オニオコゼとメジナの胃に高カルシウム液を投与した場合、カルシウムは消化管から急激に吸収された。しかしながら、一部は吸収されずに消化管後部へ移送された。おそらく消化管上皮細胞は、高濃度のカルシウム液に対して、一定以上の吸収を行わない自律的な機構があると考えられる。これまで筋肉系においては、高濃度のカルシウムに対してカルシウムチャンネルがブロックされる結果、収縮を止めてしまうことが知られている。また、哺乳類においては消化管からカルシウムが分泌されることが知られているので、魚類でも血中カルシウム濃度が過度に上昇した場合、胃液にカルシウムを分泌する可能性があるが、今後の問題であろう。さらに、オニオコゼにおいて、カルシトニンは血中カルシウム濃度の上昇が起きた後、分泌が始まり、血中カルシウム濃度が低下した後も、そのレベルは高かった。したがって、鰓後腺からカルシトニンの分泌は停止しているが、血中カルシウム濃度を低い状態に保つには、しばらく血中カルシトニン濃度を高くしておく必要があるかも知れない。哺乳類においては、血中カルシウム濃度の低下と平行して、血中カルシトニン濃度も低下することが知られている。この相違は、哺乳類と魚類における消化の速度の違いかも知れない。しかしながら、血中カルシウム濃度が完全に低下した後は、血中カルシトニン濃度も明らかに低下した。この事実は、基本的に魚類のカルシトニンの働きが哺乳類と同じであることを示している。

謝辞

本研究を進めるに当たり、終始懇篤な御指導いただいた金沢大学大学院自然科学研究科 笹山雄一教授に深く感謝を致します。また、研究する上で色々ご協力いただいた金沢大学自然計測応用研究センター臨海実験施設の職員の方々ならびに学生の方々にも感謝を致します。さらに、本研究を実施する機会を与えていただいた、石

川県水産総合センター 元所長 高橋稔彦氏、田島迪生博士、および現所長 伊藤勝昭氏に合わせて感謝の意を表します。

最後に、オニオコゼの飼育を手伝って頂いた、石川県水産総合センター技術開発部の職員の方々にもお礼申し上げます。

引用文献

- 会田勝美, 小林牧人, 金子豊二 : 7. 内分泌. 「魚類生理学」(板沢靖男, 羽生功 編). 恒星社厚生閣, 東京, pp.167-241, 1991.
- Azria M : The calcitonins. Physiology and pharmacology. Chapter 2. Endogenous calcitonin. Karger, Basel, pp.21-66, 1989.
- Benfey TJ, Sutterlin AM : Growth and gonadal development in triploid landlocked atlantic salmon (*Salmo salar*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 41, 1387-1392, 1984.
- Björnsson BTH, Haux C, Bern HA, Deftos LJ: 17β -estradiol increases plasma calcitonin levels in salmonid fish. *Endocrinology*, 125, 1754-1760, 1989.
- 千勝典子, 松本俊夫 : 第 I 章 5. カルシウム代謝とその調節「カルシウム その基礎・臨床・栄養」(西沢良記, 白木正孝, 江澤郁子, 広田孝子 編). 全国牛乳普及協会(ライフサイエンス出版 制作), 東京, pp.61-67. 1999
- Cassani JR, Caton WE : Growth comparisons of diploid and triploid grass carp under varying conditions. *Prog. Fish-Cult.*, 48, 184-187, 1986.
- Colbert EH and Moales : Evolution of the vertebrates, Fourth ed., Wilkey-Liss, New York, pp.41-58, 1991.
- Copp DH, Cameron EC, Cheney BA, Davidson, AGF, Henze KG : Evidence for calcitonin—a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology*, 70, 638-649, 1962.
- Copp DH, Brooks CE, Low B, Newsome F, O'Dor RK, Parkes CO, Walker V, Watts EG : Calcitonin and ultimobranchial function in lower vertebrates. In "Calcitonin 1969. Proc. Second Internat. Symp." eds. Taylor S, Foster GV. London Heinemann, pp.281-294, 1970.
- Craig RK, Hall L, Edbrooke MR, Allison J, MacIntyre I : Partial nucleotide sequence of human calcitonin precursor mRNA identifies flanking cryptic peptides. *Nature*, 28, 345-347, 1982.
- Cumaraswamy A, Borges M, Tamir H, Nelkin BD : Cloning of a cDNA encoding sheep calcitonin from a thyroid C-cell library. *Gene*, 126, 269-273, 1993.
- Dix MW, Pang PK, Clark NB : Lizard calcium metabolism: lack of effect of mammalian calcitonin on serum calcium or phosphate levels in normal and parathyroidectomized lizards, *Anolis carolinensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 14, 243-247, 1970.
- Foster GV, Baghdiantz A, Kumar MA, Slack E, Soliman HA, MacIntyre I : Thyroid origin of calcitonin. *Nature*, 202, 1303-1305, 1964.
- Guo X, Hershberger WK, Myers JM : Growth and survival of intrastrain and interstrain rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) triploids. *J. World Aquacult. Soc.*, 21, 250-256, 1990.
- 平野哲也 : 1. 基礎編 一般生理用 カルチトニンの比較内分泌. 「カルチトニン」(藤田拓男, 折茂肇 編). ライフサイエンス出版, 東京, pp.70-79, 1984.
- Hirsch, PF, Voelke, EF, Munson, PL : Thyrocalcitonin. *Science*, 146, 412-413, 1964.
- 池田静徳 : 2・2 消化酵素. 「新水産学全集14 魚類の栄養と飼料」(荻野珍吉 編). 恒星社厚生閣, 東京, pp.26-36, 1989.
- 岩井保 : 7. 摂食と消化系. 「新水産学全集4 水産脊椎動物Ⅱ魚類」. 恒星社厚生閣, 東京, pp.96-119, 1985.
- 岩井保 : 9. 摂食と消化器. 「魚学概論 第二版」. 恒星社厚生閣, 東京, pp.64-78, 1994.
- Iwami M, Tanaka A, Hano N, Sakurai S : Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and *in situ* hybridization. *Experientia*, 52, 882-887, 1996.
- Krasznai Z, Marian T : Shock-induced triploidy and its effect on growth and gonad development of the european catfish, *Silurus glanis* L., *J. Fish. Biol.*, 29, 519-527, 1986.
- Lasmoles F, Jullienne A, Day F, Minvielle S, Milhaud G, Moukhter MS : Elucidation of the nucleotide sequence of chicken calcitonin mRNA: Direct evidence for the expression of a lower vertebrate calcitonin-like gene in man and rat. *EMBO J.*, 4, 2603-2607, 1985.
- Mol JA, Kwant MM, Arnold ICJ, Hazewinkel HAW : Elucidation of the sequence of canine (pro)-calcitonin: A molecular biological and protein chemical approach. *Regul. Pept.*, 35, 189-195, 1991.
- Nelson JS : Fish of the world, 2nd., John Wiley & Sons, New York, 1984.
- 小栗幹郎 : 第4章 消化と吸収. 「魚類生理学概論」(田村保 編). 恒星社厚生閣, 東京, pp.84-103, 1994.
- Oguri M : Seasonal histologic changes in the ultimobranchial gland of goldfish. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 39, 851-858, 1973.

- Okuda R, Sasayama Y, Suzuki N, Kambegawa A, Srivastava AK : Calcitonin cells in the intestine of goldfish and a comparison of the number of cells among saline-fed, soup-fed, or high Ca souped Fishes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113, 267-273.
- 折茂肇 : 序 生物におけるカルシトニンの生理的意義. 「カルシトニン-基礎と臨床-」(折茂肇, 須田立雄 監, 山本逸雄, 高橋直之 編). ライフサイエンス出版, 東京, pp.1-9, 1998.
- Oughterson SM, Munoz-Chapuli R, De Andres V, Lawson R, Heath S, Davies DH : The effects of calcitonin on serum calcium levels in immature brown trout, *Salmo trutta*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 97, 42-48, 1995.
- Poschl E, Lindley I, Hofer E, Seifert JM, Brunowsky W, Besemer, J : The structure of procalcitonin of the salmon as deduced from its cDNA sequence. *FEBS Lett.*, 226, 96-100, 1987.
- Potts JT, Niall HD, Keutmann HT, Brewer HB, Deftos LJ : The amino sequence of porcine thyrocalcitonin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 59, 1321-1328, 1968.
- Robertson DR : The ultimobranchial body of *Rana pipiens*. IV. Hypercalcemia and glandular hypertrophy. *Z. Zellforsch.*, 85, 441-452, 1968.
- Robertson DR : The ultimobranchial body of *Rana pipiens*. X. Effect of glandular extirpation on fracture healing. *J. Exp. Zool.*, 172, 425-441, 1969.
- Robertson DR : Cytological and physiological activity of the ultimobranchial glands in the permetamorphic anuran *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 16, 329-341, 1971.
- 笹山雄一, 小黒千足 : 鰓後腺. 「内分泌器官のアトラス 脊椎動物・無脊椎動物」(日本比較内分泌学会 編). 講談社. 東京, pp.66-71, 1987.
- 笹山雄一 : 8. カルシトニンと受容体. 「ホメオスタシス」(日本比較内分泌学会 編) 学会出版センター, 東京, pp.159-178, 1997.
- 笹山雄一 : 1 基礎的所見 1. カルシトニンの構造と活性 A. カルシトニンの比較内分泌-天然物の構造と生理作用. 「カルシトニン-基礎と臨床-」(折茂肇, 須田立雄 監, 山本逸雄, 高橋直之 編). ライフサイエンス出版, 東京, pp.13-22, 1998.
- Sasayama Y, Matsuda K, Oguro C, Kambegawa A : Immunohistochemical study of the ultimobranchial gland in chum salmon fry. *Zool. Sci.*, 6, 607-610, 1989.
- Sasayama Y, Suzuki N, Magtoon W : The location and morphology of ultimobranchial gland in medaka, *Oryzias latipes*. *Fish. Biol. J. MEDAKA*, 7, 43-46, 1995.
- Sasayama Y, Abe I, Suzuki N, Hayakawa T : Plasma calcium and calcitonin levels at food intake in eels and goldfish. *Zool. Sci.*, 13, 731-735, 1996.
- Sasayama Y, Matsubara T, Takano K : Topography and immunohistochemistry of the ultimobranchial glands in some subtropical fishes. *Ichthyol. Res.*, 46 (2) , 219-222, 1999.
- Sasayama Y, Takemura M, Takano K : Ultimobranchial glands in the teleost (*Plecoglossus altivelis ryukyuensis*) ; special references to changes of gland volume with maturation. *Okajima. Folia. Anat. Jpn.*, 78, 101-106, 2001.
- Sasayama Y, Takei Y, Hasegawa S, Suzuki D : Direct raises in blood Ca levels by infusing a high-Ca solution into the blood stream accelerate the secretion of calcitonin from the ultimobranchial gland in eels. *Zool. Sci.*, 19, 1039-1043, 2002.
- Smith DY, Benfey TJ : Effects of long term estradiol-17 beta treatment on the growth and physiology of female triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Reprod. Physiol. Fish*, pp.499, 1999.
- Smith DY, Benfey TJ : Reproductive physiology of three age classes of female diploid and triploid brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture Canada 2000: Proceedings of the 17th Annual Meeting of the Aquacultural Association of Canada*, 2000.
- Suzuki N, Nose Y, Kase Y, Sasayama Y, Takei Y, Nagasawa H, Watanabe TX, Nakajima K, Sakakibara S : Amino acid sequence of sardine calcitonin and its hypocalcemic activity in rats. *Zool. Sci.*, 11, 713-716, 1994.
- Suzuki N, Ueda K, Sakamoto H, Sasayama Y : Fish calcitonin genes: primitive bony fish genes have been conserved in some lower vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 113, 369-373, 1999.
- Swarup H : Effect of triploidy on the body size, general organization and cellular structure in *Gasterosteus aculeatus* (L). *J. Gen.*, 56, 143-155, 1959.
- 竹内俊郎 : 3. 消化と栄養. 「魚類生理学」(板沢靖男, 羽生功 編). 恒星社厚生閣, 東京, pp.67-101.
- Waggener RA : An experimental study of the parathyroids in the Anura. *J. Exp. Zool.*, 57, 13, 1991.
- Withler RE, Beacham TD, Solar II, Donaldson EM : Freshwater growth, smolting, and marine survival and growth of diploid and triploid coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Aquaculture*, 136, 91-107, 1995.

Wolters WR, Libey GS, Chrisman CL : Effect of triploidy on growth and gonad development of channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 111, 102-105, 1982.

山本淳, 飯田貴次 : 三倍体ニジマスの血液性状. *魚病研究* 29(4), 239-243, 1994.

Yamane S, Yamada J : Histological changes of the

ultimobranchial gland through the life history of the Masu Salmon. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 43, 375-386, 1977.

Ziegler R, Telib M, Pfeiffer EF : The secretion of calcitonin by the perfused ultimobranchial gland of the hen. *Horm. Metab. Res.*, 1, 39-40, 1969.

ABSTRACT

Calcitonin is a hypocalcemic hormone in mammals. In marine teleosts, however, roles of the calcitonin have been not known so far. In stonefish, changes in plasma Ca and calcitonin levels were examined after administration of a high-Ca solution into the stomach. Blood was taken successively at 0, 1, 3, 9, 33, and 81 hrs from a fine tube cannulated into the aortic bulb. Plasma Ca levels increased acutely at 1 hr and attained the peak after 3-9 hrs of the administration. Although plasma calcitonin levels did not exhibit conspicuous changes for 1-3 hrs, those began to rise significantly at 33 hrs. The plasma Ca level began to decline significantly at 33 hrs, although the level was still significantly higher than the initial level. At 33 hrs, however, the plasma calcitonin level still continued to increase. At 81 hrs, the plasma Ca level had returned to the initial level. At that time, the plasma calcitonin level was also significantly lower than that at 33 hrs. These results suggest that, in marine teleosts, the ultimobranchial gland has the ability to respond physiologically to rises in

plasma Ca levels, to secrete calcitonin, and to cease the secretion when the plasma Ca levels return to the initial level.

要 旨

これまでカルシトニンとは、哺乳類において骨折に伴う骨の再生時に緊急ホルモンとして、また、女性ホルモンに対抗して骨を守るホルモンとして知られてきた。さらに、このホルモンは普段、摂餌後の一過性の高カルシウム血症を防ぐ役割を担っていることも明らかにされている。しかしながら、下等脊椎動物において、カルシトニンの役割は、無尾両生類を除くと必ずしも明らかでない。特に血中カルシウム濃度の4倍のカルシウム濃度に棲む海産真骨魚類に関する知見はほとんどない。

本研究においては、完全に海産のオニオコゼ (*Inimicus japonicus*) とメジナ (*Girella punctata*) を用いて、海産真骨魚類のカルシウム代謝におけるカルシトニンの役割を摂餌に伴う生理的観点から検討した。

オニオコゼのカルシトニンの塩基配列とアミノ酸配列は、真骨魚類の中でも系統的に高位にあるカレイ目のマコガレイと最も近かったが、原始硬骨魚類であるポリプテルスのそれとも高い相同性があった。このことは、硬骨魚類の中でカルシトニン分子は、高い保存性があり、重要な役割を担っていることを示唆している。

オニオコゼにおいて、カルシトニンの分泌器官である鰹後腺は、食道直下の囲心腔と腹腔の間を分けている横隔壁の腹腔側に扁平な袋状の形態をとり、1個見つかった。鰹後腺周囲には、毛細血管が発達しており、カルシトニンの抗体を用いた免疫組織化学染色では、その毛細血管に接した基底側部の細胞質が強く反応した。オニオコゼの2倍体と3倍体の間で、鰹後腺の形態に大きな違いは認められなかった。また、2倍体と3倍体のオニオコゼの胃に高カルシウム液を投与すると血漿カルシウム濃度は直ちに上昇し、その後、低下した。2倍体と3倍体の間で、その上昇の大きさや時間的な挙動に有意な変化は認められなかった。これらの事実は、水産学上、有用な3倍体のオニオコゼにおいても、飼育時のカルシウム代謝に特に注意を払う必要がないことを示唆している。

海産真骨魚類の摂餌後におけるカルシウムの挙動を調べるために、オニオコゼとメジナの胃へ高カルシウム液を投与して、血漿カルシウム濃度、胃内容液カルシウム濃度および胃内容液pHの変化を調べた。さらにオニオコゼについては、直腸液と尿のカルシウム濃度の変化についても調べた。両種において胃へ高カルシウム液を投与すると、まず血漿カルシウム濃度が上昇し、その後、時間の経過とともに低下した。また、胃内容液カルシウム濃度の変化も血漿カルシウム濃度の変化と同じ様な変化を示した。この時の胃内容液pHは、摂餌時に伴う胃液pHの変化に似ていた。オニオコゼにおいて直腸液カルシウム濃度と尿カルシウム濃度は、血漿カルシウム濃度や胃内容液カルシウム濃度の上昇より時間的に遅れて上昇した。これらの結果は、胃へ投与された高カルシウム液はすべてが消化管で吸収されるのではなく、一部は直腸へ移送されること、また、他の一部は腎臓を経由して尿へと移送された後、排泄されることを示している。

一方、これまで下等脊椎動物において、血漿カルシウム濃度の変化に伴う血漿カルシトニン濃度の動態をその上昇から低下まで調べた報告はない。本研究においては、オニオコゼの胃へ高カルシウム液を投与した時の血漿カルシウム濃度とカルシトニン濃度の変化を調べた。血漿カルシウム濃度は、高カルシウム液投与後、直ちに反応して上昇した。しかしながら、血漿カルシトニン濃度は、カルシウム濃度の上昇より遅れてゆっくりと上昇し始めた。さらに血漿カルシウム濃度が低下し始めたにも係わらず、カルシトニン濃度は上昇を続け、血漿カルシウム濃度が完全に正常値へ戻った後で、初めて低下し始めた。これらの事実は、オニオコゼにおいて、鰹後腺が血漿カルシウム濃度の上昇と低下に反応して生理的にカルシトニンを分泌し、また分泌を停止したことを示唆している。

以上の結果は、海産真骨魚においてカルシトニンは、血漿カルシウム濃度の上昇に伴って分泌され、血漿カルシウム値を生理的レベルに抑える役割を担っていることを強く示唆している。

石川県水産総合センター研究報告第4号

発行年月 2005年3月

編集・発行者 石川県水産総合センター
〒927-0435 鳳珠郡能登町字宇出津新港3丁目7番地
TEL 0768-62-1324 FAX 0768-62-4324

印刷所 株式会社 ハクイ印刷
〒925-0053 羽咋市南中央町ㇿ83-51
TEL 0767-22-1243 FAX 0767-22-6161

Bulletin of Ishikawa Prefecture Fisheries Research Center

No.4

March 2005

Hormonal regulation of calcium homeostasis in some teleosts
:with special references to the role of calcitonin

Norihisa Kaida