

学 位 論 文 題 名

キンギョ (*Carassius auratus*) の
カルシウム代謝におけるカルシトニンの
生理作用に関する研究

学位論文内容の要旨

硬骨魚類の耳石、鱗、骨などの硬組織は、水産資源学上有用な年齢形質として資源解析に重用されている。しかし、硬組織の形成、成長および代謝などに関する基礎研究は少なく、これらの組織は経験的に年齢査定に利用されている例が多い。

魚類ではカルシウムは硬組織（骨および鱗）の主成分として体の支持や保護機能を担っているが、その他にも筋収縮や細胞内情報伝達など生命活動に必須である。そのため、骨組織と血液との間では常にカルシウム交換が行われ、これにより血中カルシウム濃度は約 2.5mM に維持されている。これら組織間でのカルシウム交換はカルシウム関連ホルモンの作用により調節されているが、詳細は不明である。

魚類のカルシウム代謝関連ホルモンとしては、プロラクチン、スタニオカルシン（STC）およびカルシトニン（CT）が考えられている。このうちプロラクチンは血中カルシウム濃度を上昇させ、STC は低下させる。CT については、魚類でも哺乳類で知られている血中カルシウム濃度低下作用が推察される。しかし、魚類では種や条件で実験結果が異なり、また魚類硬組織に対する CT の作用を調べた研究が少ないため、魚類で CT の作用は明確にされていない。したがって、魚類のカルシウム代謝調節様式を明らかにし、硬組織の形成機構を明らかにするためには、CT の生理作用を明確にする必要がある。そこで本研究では、硬骨魚類のカルシウム代謝調節機構解明の一助として、キンギョ

(*Carassius auratus*) を用いて、CT の生理作用を調べた。

第 I 章では CT の血漿カルシウム濃度調節について、通常の個体と STC の影響を小さくするためにカルシウム負荷をした個体で、CT 投与および抗 CT 抗体を投与し内因性の CT を阻害する受動免疫法で調べた。その結果、通常個体では CT 投与量 10ng/g で血漿カルシウム濃度は減少した。また、カルシウム負荷個体では CT 投与量が 10ng/g 体重で低下し、50ng/g 体重で上昇した。抗 CT 抗体投与 (0.1μg/g 体重) ではカルシウム負荷個体で血漿カルシウム濃度が上昇した。したがって、CT は血漿カルシウム濃度の変化に応じて血漿カルシウム濃度を上昇または減少させる作用があると示唆された。

近年、CT が索餌後の消化管からのカルシウム吸収を調節することが報告されているが、魚類のカルシウム代謝に重要な器官である鰓や硬組織に関して CT と餌との相乗的効果を調べた研究はない。第 II 章では環境水からのカルシウム摂取に及ぼす CT の影響を ^{45}Ca を用いて調べた。CT 投与は一回あたり 10ng/g 体重として、1 回または反復投与 (一日おきに 4 回) した。また飢餓条件は 1 回投与では CT 投与前 10 日間飢餓にし、反復投与では実験期間中飢餓にした。なお、給餌条件では一日一回給餌した。その結果、餌の有無に関わらず、また 1 回または反復投与のいずれも CT の影響は認められなかったので、少なくとも本実験条件では CT の鰓に対する作用はないと考えられた。

第 III 章では、CT の硬組織 (耳石、肋骨、咽頭骨、鱗) への作用について、カルシウム沈着および溶出に対する影響を ^{45}Ca を用いて調べた。餌の条件および CT 投与は、カルシウム沈着実験では第 II 章の反復投与と同様に行い、カルシウム溶出実験では ^{45}Ca プレラベル後から同様に行った。カルシウム沈着量は CT により飢餓条件で肋骨、咽頭骨および鱗への増加したが、給餌条件では影響が認められなかった。次に、 ^{45}Ca でプレラベルした個体の硬組織からのカルシウム溶出に対する CT の影響を調べたが、いずれの条件でも肋骨、咽頭骨および鱗で影響は認められなかった。したがって、CT は飢餓条件で骨や鱗へのカルシウム沈着を促進すると示唆された。

第 VI 章では、第 III 章の結果を骨関連細胞レベルで調べるため、第 III 章と同様の実験を行い、骨代謝が活発であることが知られている咽頭骨を用いて組

組織観察および骨形態計測を行った。組織観察では、給餌の有無に関わらず骨芽細胞には目立った変化は観察されなかった。しかし、破骨細胞は給餌条件および飢餓条件ともに対照群では骨表面に接着しているものが多数観察されたのに対し、CT 投与群では破骨細胞が付着していない吸収腔が多く見られ、また破骨細胞が畏縮し骨表面から遊離している像が観察された。次にこれらの切片について骨形態計測を行い、類骨面（形成部位の相対的割合）、骨芽細胞面-1（骨芽細胞の付着している部位の相対的割合）、骨芽細胞面-2（形成部位のうち、特に形成活性の高い部位の割合）、吸収面（吸収部位の相対的割合）、破骨細胞面-1（破骨細胞の付着している部位の相対的割合）、破骨細胞面-2（吸収部位のうち、特に吸収活性の高い部位の割合）を算出した。給餌条件は飢餓条件よりも形成に関する項目が高い傾向が見られたが、CT の影響はいずれの条件でも認められなかった。吸収に関する項目では給餌の有無に関わらず破骨細胞面-2 が減少した。さらに類骨層の厚さおよび骨芽細胞の高さを測定したところ、CT は類骨層の厚さには影響していなかったが、飢餓条件で骨芽細胞の高さを増した。したがって、CT は破骨細胞活性を抑制するとともに、骨芽細胞の活性を上昇させると考えられた。

第 V 章では、鱗の形成および吸収に対する CT の影響を骨芽細胞のマーカーであるアルカリ性ホスファターゼ（ALPase）および破骨細胞のマーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TR-ACPase）活性を指標として調べた。まず毎日給餌を受けた無処理の個体で調べたところ、ALPase 活性は主に鱗の縁辺部に帯状に検出されたが、TR-ACPase 活性は検出されなかった。次に、2 週間飢餓状態にし鱗吸収を誘起した個体に、飢餓を継続しながら一日置きに合計 4 回 CT 投与を行った後に酵素活性を調べた。その結果、ALPase 活性は飢餓により低下する傾向であったが、CT 投与により鱗表面の ALPase 活性を示す染色が強くなった。また、鱗の縁辺部の TR-ACPase 活性は CT により変化しなかったが、条溝部では CT により活性が減少した。したがって、CT は鱗の骨芽細胞を活性化する一方で、破骨細胞活性を抑制することが示された。

以上の結果から、キンギョにおいて CT は血漿カルシウム濃度調節機能を有し、その作用は投与量により異なることが示された。また、CT は骨や鱗の骨

芽細胞活性を上昇させ、カルシウム沈着を促進するとともに、破骨細胞活性を抑制することが明らかになった。さらにこれらの作用は飢餓個体で効果的に機能することがわかった。

これらのことから、キンギョにおける CT の機能の一つは、主に飢餓などカルシウム（およびリン）を必要とする際に、鱗や骨から過剰なカルシウム溶出を防ぎ、これらを保護することであると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 麦 谷 泰 雄

副 査 教 授 山 内 皓 平

副 査 助 教 授 清 水 幹 博

学 位 論 文 題 名

キンギョ (*Carassius auratus*) の カルシウム代謝におけるカルシトニンの 生理作用に関する研究

カルシトニン (CT) は動物界に広く存在するホルモンで、高等脊椎動物ではパラサイロイドホルモンと拮抗して血中Ca濃度の低下や、骨組織からのCa溶出抑制などに働いている。しかし、必要とするCaの大部分を鰓を通じて環境水から摂取し、さらにパラサイロイドホルモンが存在しない魚類では、CTの機能は未だ明らかでない。本研究は、魚類におけるCTの生理機能を明らかにするために、キンギョを用いて血液と硬組織の両面から調べたものであり、得られた結果の概要は下記の通りである。

1. 外因性CTの投与 (10ng/g体重) は血中Ca濃度を低下させたが、環境水からのCa摂取には影響がなかった。またスタニオカルシン (Ca低下ホルモン) を枯渇させるためにCa負荷をかけた個体では、10ngCT/gで血中Caは低下し、50ng/gで上昇した。さらに抗CT抗体投与による受動免疫法では、Ca負荷をかけた個体に抗体を投与することにより血中Ca濃度は上昇した。したがってCTは血漿Ca濃度の変化に応じて、血漿Ca濃度を上昇または減少させる作用があることが示され、感受性の異なる複数のCTレセプターの存在が示唆された。

2. CTは飢餓個体で肋骨、咽頭骨 (骨代謝の活発な組織) および鱗の⁴⁵Caの沈着を促進したが、給餌個体ではCTの影響はなかった。また⁴⁵Caでプレラベルした硬組織からのCaの溶出を調べたが、給餌、飢餓いずれの条件でもCTの影響は認められなかった。

3. CT投与により、咽頭骨で破骨細胞が付着していない吸収腔が多数出現し、

破骨細胞が萎縮して骨表面から遊離していた。

4. 咽頭骨の骨形態計測により、CTは破骨細胞面-2（吸収部位のうち、特に吸収活性が高い部位）を減少させ、また同時に骨芽細胞高を増し、骨形成活性を上昇させた。

5. 鱗の形成および吸収に対するCTの影響を、骨芽細胞のマーカー酵素であるアルカリフォスファターゼおよび破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性を指標として調べた。その結果、CTにより飢餓個体の鱗表面のアルカリフォスファターゼ活性が増し、反対に、特に条溝部で酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ活性が顕著に減少した。

以上の結果から、CTは血中Ca濃度の調節機能を有するが、主な生理機能は硬組織からのCa溶出を抑制し、同時に石灰化の促進に働くことが明らかになった。またこれらの作用は飢餓条件で効果的に機能することが分かった。これらの成果は、魚類のCTの機能に関する研究を大きく前進させたものであり、審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。