

学 位 論 文 題 名

クルマエビ (*Peneus japonicus*) のプロスタグランジン
測定系の開発とその生理作用に関する研究

学位論文内容の要旨

現在、海産エビ養殖に不可欠な種苗の供給は、天然産の成熟した親エビを用いて行われている。しかし、エビ養殖事業の発展に伴う親エビ需要の増大、天然産親エビの漁獲量の減少、ウィルス病の蔓延などにより、親エビの安定した確保が困難な状況にある。クルマエビは人工飼育下において、雄は体長12センチ以上になれば成熟するのに対し、雌は容易に成熟しない。そのため、人工飼育下で雌親エビを養成するための人為成熟・産卵誘発技術が切望されているが、*Penaeus*属の生殖に関する内分泌機構および卵形成機構についての研究は少ない。

これまで水槽で成熟した雌親エビを養成するためには、多毛類を補助的に給餌することが*Penaeus*属の卵巣の成熟に効果的であることが知られている。このことは、多毛類に多量に含まれている必須脂肪酸であるリノール酸やリノレン酸の高度不飽和脂肪酸を前駆体とするプロスタグランジン (PG) が生殖と何らかの関係を有することを示唆している。PGは、多くの生物の生殖に関与し、分娩のみならず、性周期とも密接な関係があることが知られている。近年、淡水産甲殻類においても、卵形成にプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) およびプロスタグランジン E_2 (PGE $_2$) が関与していることが示され、PG類は卵の最終成熟および産卵のみならず、卵黄形成過程全般に関与している事が示唆されている。しかし、海産甲殻類であるクルマエビでは、PGと卵成熟の関係を調べた研究はない。

本研究では、クルマエビの人工成熟技術を確立するための一助として、次の3項目について調べた。

I. プロスタグランジン測定系の開発

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と2抗体法を用いたラジオイムノアッセイ (RIA) によるPGF $_{2\alpha}$ およびPGE $_2$ 測定系を確立するために、HPLCおよびRIA

の最適条件の検討を行った。はじめにPG類をHPLCで分離する条件を検討した結果、 μ -Bondasphere C18分析カラム(3.9 mm内径 x 15 cm)を用い、17 mM リン酸：アセトニトリル(70:30)を移動相として、流速1.25 ml/min. で分離を行うのが最適であった。さらに、PGF_{2 α} およびPGE₂のRIA測定系の反応液組成を検討した結果、正常ウサギ血清を含まないEDTA-PBSで希釈した第1抗体0.1 ml、1% BSA-PBSで希釈したトレーサーおよびアッセイバッファー0.1 mlを用いるのが最適であった。また、PGF_{2 α} 測定系では第1抗体希釈率10倍および第2抗体希釈率60倍とし、2-12 hrの反応条件下で、またPGE₂測定系では、第1抗体希釈率10倍および第2抗体希釈率40倍とし、2-2-12 hrの反応条件下で測定を行うこととした。これらの反応条件で標準曲線を作成し、測定系を評価した結果、本法は十分な測定精度および感度を有していることがわかった。以上のことから、常法に従い測定試料から固相抽出カートリッジでPG類を抽出後、HPLCでPGF_{2 α} およびPGE₂画分を回収し、2抗体法によるRIAでPGF_{2 α} およびPGE₂を定量することとした。

II. 卵巣発達に伴うプロスタグランジンの変動

前章で確立されたPG測定方法を用いて、実際にクルマエビ血リンパおよび卵巣のPG類の測定を行い、同時に卵巣におけるPG前駆体の高度不飽和脂肪酸をガスクロマトグラフィーで測定し、PGおよび前駆脂肪酸と卵成熟との関係を調べた。はじめに、前処理の有効性を検討するために、クルマエビ血リンパおよび卵巣試料の平行性試験および回収試験を行った。その結果、前処理を行った血リンパおよび卵巣の測定サンプルの希釈系列曲線は、PGF_{2 α} およびPGE₂いずれの測定系においても標準曲線との平行性が認められた。また、PG回収試験の結果、前処理を行った測定サンプルでは、添加した既知量の標準物質を正確に測定することができた。以上の結果から、クルマエビ血リンパおよび卵巣のPG測定には、本実験の前処理法が有効であることが確認された。

次に、卵巣の発達段階を、卵巣の色調を基にステージIからVに分類し、異なる成熟段階における血リンパおよび卵巣のPG量を測定した。その結果、クルマエビ卵巣および血リンパ中にPGF_{2 α} とPGE₂の存在が確認され、血リンパのPGF_{2 α} およびPGE₂量は、いずれも卵黄合成期初期のステージIIに有意に増加した。また、卵巣においても未成熟または卵黄合成初期に相当するステージIでPGF_{2 α} およびPGE₂含有量は顕著に増加し、卵黄合成期には減少した。さらに、卵巣中の高度不飽和脂肪酸含量を調べた結果、PGF_{2 α} およびPGE₂の前駆体であるn-6系のリノール酸およびアラキドン酸の含有量は、卵巣の発達に伴い増加することが分かった。以上のことから、リノール酸およびアラキドン酸の変動パターンは、卵

巢内PGの変動パターンと相反していたことから、この時期に前駆体であるアラキドン酸からのPG類の合成が活発に行われ、増加したPG類が卵巣発達に機能していることが示唆された。

Ⅲ. プロスタグランジンによる卵巣発達促進効果

はじめにPGのクルマエビ卵巣発達効果を明らかにするために、PG類およびアラキドン酸を多く含むオゴノリ脂質抽出物を飼料に添加し、未成熟雌クルマエビに投与し、成熟促進効果を検討した。その結果、オゴノリ脂質抽出物を与えた実験群では、ビテロジェニン (VTG) 合成を行う肥大した濾胞細胞の出現率が増加した。

つぎに生体外で卵巣組織片を培養し、PGの卵巣発達に対する促進効果を検討した。その結果、PGE₂添加群の一部では、著しく肥大した濾胞細胞塊の出現が確認された。以上より、PG類またはその前駆脂肪酸が、卵巣の濾胞細胞の肥大化に関与していることが明らかとなった。

以上の結果から、本研究では重要な増養殖対象種であるクルマエビのPG測定法を確立し、クルマエビ卵巣の濾胞細胞におけるVTG合成にPGF_{2α}およびPGE₂を含むPG類が関与していることを示唆し、*Penaeus*属の卵成熟機構に新たな知見を提唱した。また、オゴノリを利用したクルマエビ配合飼料による成熟促進効果を明らかにし、オゴノリ脂質抽出物が成熟促進添加物として有効であることを示した。

学位論文審査の要旨

主査	教授	麦谷泰雄
副査	教授	原彰彦
副査	教授	板橋豊
副査	教授	矢野勲
副査	助教授	清水幹博

学位論文題名

クルマエビ (*Peneus japonicus*) のプロスタグランジン 測定系の開発とその生理作用に関する研究

クルマエビは重要な栽培漁業の対象種であるが、種苗生産はすべて天然から捕獲された成熟エビに依存している。しかし近年、エビ養殖事業の発展に伴う親エビ需要の増大、親エビの漁獲量の減少、ウイルス病の蔓延などにより、安定した種苗の供給が困難な状況にあり、人為的に良質の成熟卵を得、大量の種苗生産を行うことが強く望まれている。

本研究はクルマエビの人為催熟技術を確認するための一助として行われたものであり、申請者は、生理活性物質の一つであり、高度不飽和脂肪酸を前駆体として合成されるプロスタグランジン (PG) の作用に着目し、卵巣発達に伴う血リンパと卵巣の PG 量の変動を解析し、また合せて PG を多量に含有するオゴノリ抽出物を飼料に添加して未成熟雌エビを飼育し、PG の卵成熟促進効果を検証した。得られた結果の概要は次の通りである。

1. 高速クロマトグラフィ (HPLC) とラジオイムノアッセイの諸条件を検討し、最適条件を組み合わせることにより、また試料 (血リンパと卵巣) の夾雑物を除去するなど前処理を的確に行うことにより、血リンパと卵巣の PG 類 (PGF_2 および PGE_2) を迅速かつ正確に測定することが可能であった。なお得られた最適条件は次の通りである。まず試料の PG 類を固相カートリッジで抽出し、 μ -Bondasphere C18 カラムを用いて、17 mM リン酸：アセトニトル (70:30) を移動相として流速 1.25 ml/min で分離し、正常ウサギ血清を含まない EDTA-PBS で希釈した第 1 抗体 0.1 ml、1% BSA-PBS で希釈したトレーサーおよびアッセイバッファー 0.1 ml を使用する。また PGF_2 、 PGE_2 測定系では、第 1 希釈抗体の希釈率を 10 倍および第 2 抗体の希釈率を 60 倍 (40 倍) とし、2-12 hr (2-2-12 hr) の条件下で反応を行う。
2. 異なる成熟段階における血リンパと卵巣 PG の回収率を検討した。卵黄顆粒期では 56%~60%、未成熟期および卵黄合成初期では 66%~73%であった。また HPLC による回収率は全ステージを通して約 85%であった。これらの値を用いて血リンパと卵巣の PG 濃度を補正し、各個体の PG 濃度を算出した。
3. 血リンパの PGF_2 および PGE_2 量はいずれも前卵黄合成期~卵黄合成初期に増加

することが明らかになった。また卵巣でも前卵黄合成期および卵黄合成初期に PGF_2 と PGE_2 の含有量が顕著に増加し、卵黄合成期にはむしろ減少した。生殖腺指数と血リンパまたは卵巣の PG 量との間にいずれも相関はなかった。

4. 卵巣の高度不飽和脂肪酸である n-6 系のリノール酸およびアラキドン酸含有量は、卵巣の成熟が進むにつれて増加し、卵黄合成期に最高値を示した。この様に PG 類の前駆物質の変動パターンは、卵巣内の PG 類の変動パターンと相反していたことから、前卵黄合成期～卵黄合成初期にアラキドン酸などから PG 類が合成され、増加した PG 類が卵の成熟に関与していることが示唆された。
5. アラキドン酸などを多く含むオゴノリ脂質抽出物を飼料に添加し、未成熟雌エビを 21～25 日間飼育することにより、顕著な卵成熟促進効果が認められ、93% の個体（対象群 46%）でピテロゲニンの合成を行う肥大濾胞細胞の出現が認められた。
6. 次に生体外で卵巣組織片を培養し、PG 類の卵巣発達に対する促進効果を検討した。その結果、培地に PGF_2 。または PGE_2 を添加しても排卵を含む最終成熟を誘導できなかったが、0.1 ppm PGE_2 添加群の一部の個体に著しく肥大した濾胞細胞塊が出現した。

以上の研究成果は、重要な増養殖対象種であるクルマエビの PG 類の測定法を確立し、クルマエビの卵成熟に PG 類が関与していることを種々の手法により初めて明らかにしたものであり、今後の本種の人為催熟技術の開発に貢献するものである。よって審査員一同は、本研究の申請者が博士（水産科学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると判定した。