

氏 名(本籍) お尾 がた 形 ひろし 博

学位の種類 農 学 博 士

学位記番号 農 第 348 号

学位授与年月日 昭 和 63 年 3 月 10 日

学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当

学位論文題目 コイの血中アミノ酸関連物質の動態に関する研究

論文審査委員 (主 査)

教授 野村 正

教授 竹内 昌昭

教授 藤尾 芳久

論 文 内 容 要 旨

魚類の給餌養殖は、近年急速に発展し、水産業に占める比重を高めてきたが、養殖に用いる飼料の適正投与量や必要成分量については、今もって不明な点も多く、養殖魚類の飼養標準を整備することが必要となってきた。このような状況のもとで、養殖魚類の栄養学的特性を解明する試験研究の一環として、飼料アミノ酸組成と魚体の遊離アミノ酸 (F A A) 組成との関連性が検討されてきたが、赤血球の F A A 動態については、ほとんど検討されていない状態にあり、赤血球に存在するアミノ酸の栄養学的・生理学的意義については不明な点が多い。そこで、本研究では、種々の条件下においた試験魚の血漿と赤血球の F A A 動態について比較検討し、アミノ酸の生体内輸送における赤血球の役割について解明することを目的とした。

第 1 章 血漿および赤血球の遊離アミノ酸組成の比較

コイ、ギンザケ、ニジマスおよびアメリカナマズを用いて、赤血球 F A A の定量法について吟味したのち、血漿および赤血球の F A A 組成を明らかにし、両者における F A A の分布特性について検討した。

生理食塩水で洗浄した赤血球 F A A レベルは、Hagenfeldt & Arvidsson (1980) の式で求めた F A A レベルよりも低いことが明らかとなった。また、生理食塩水洗浄による各アミノ酸の減少率は必ずしも一様ではなく、アミノ酸の種類や魚種によって特異性がみられた。すなわち、減少率の大きいアミノ酸は、コイでは Phe, Tyr, Trp (Fig. 1)、ギンザケでは Trp、ニジマスでは Phe, Tyr, Lys, Arg、アメリカナマズでは Lys, His, Arg, P-Ser, Met, Cit であった。一方、減少率の小さいアミノ酸は、コイでは Asp (Fig. 1)、ギンザケでは Pro, Tyr、ニジマスでは Asp、アメリカナマズでは Asp であった。多くのアミノ酸の赤血球レベルは血漿レベルに比べて若干高い傾向にあり、また、各アミノ酸は両者の間に均等に分布していないことも明らかとなった。赤血球に特に偏在しているアミノ酸は、供試魚種に共通して、Tau, Asp, Glu (Fig. 2) で、これらの赤血球/血漿濃度比は、それぞれ、6.7~30.0、13.1~19.4、10.7~28.4 であった。また、アンモニアの赤血球/血漿濃度比も 7.4~22.3 と大きかった (Fig. 2)。

第 2 章 摂餌後および絶食状態におけるコイの血中遊離アミノ酸の動態

コイを用いて、摂餌後 3 週間にわたり、血漿と赤血球の F A A レベルの経時変化について解析し、アミノ酸輸送における両者の役割について検討した。

摂餌後および絶食期間の血中 F A A レベルの経時変化には 3 種類の型があると考えられた。Met, Lys, Arg (Fig. 3) は血漿レベルのみが著明に変動し、約 80 % 以上が血漿に偏在していたことから、これらのアミノ酸は、主として血漿により運搬されていると考え

られた。Tyr, Phe (Fig. 4), Trp は、摂餌後血漿ばかりでなく赤血球レベルも上昇し、両者は付随的な変化を示した。全血レベルのうち赤血球レベルの占める割合は、Tyr で 36.9~50.0%、Phe で 27.5~43.5%、Trp で 31.6~50.0%であった。芳香族アミノ酸の生体内輸送には赤血球も部分的に関与していると考えられた。Asp, Glu, Tau に関しては、血漿および赤血球レベルともに著明な変化はみられなかったが、全血レベルのうち赤血球レベルの占める割合は高く、常に赤血球に偏在する傾向がみられた。従って、これらのアミノ酸の生体内輸送において、赤血球の役割は血漿よりも大きいと考えられた。また、アンモニア (Fig. 5) も、赤血球レベルの占める割合は常に高く、全血レベルのピーク時にはその 63.7%が赤血球に偏在していた。

第3章 アンモニアを腹腔内投与したコイの血中遊離アミノ酸の動態

魚類血液において、アンモニアは赤血球に偏在していることが明らかとなったが、排泄性窒素化合物の主要成分であるアンモニアの赤血球における動態については、ほとんど検討されていない。そこで、アンモニアを腹腔内投与したコイの赤血球ならびに血漿のアンモニアおよびFAAレベルの経時変化について検討した。

コイの腹腔内に NH_4Cl を投与すると、赤血球および血漿のアンモニアレベルは1分後に既に上昇がみられ、3分後に最高値に達し、以降徐々に減少して120分後に当初のレベルに戻った (Fig. 6)。赤血球アンモニアレベルの経時変化は、血漿とまったく同一の傾向を示し、また、全血アンモニアレベルに対して、赤血球アンモニアレベルの占める割合は 36.9~67.1%であった。これらのことから、血漿と同様に赤血球もアンモニアの生体内輸送に関与していると考えられた。アンモニアの腹腔内投与の影響について、Glu および Gln に関しては特に変化はみられず、多くのアミノ酸に関しても変化はみられなかった。

第4章 コイの血中遊離アミノ酸レベルに対する飼育水アンモニア濃度の影響

アンモニアを負荷した飼育水にコイを入れて、その血漿ならびに赤血球のアンモニアおよびFAAレベルの変化について検討した。

飼育水のアンモニア濃度を高くするに従い、血漿および赤血球のアンモニアレベルも上昇した。全血アンモニアレベルのうち赤血球アンモニアレベルが占める割合は約60%であった。飼育水にアンモニアを負荷した場合、血中に存在するアンモニアのうち、半分以上が赤血球に保持されて、体内を循環していると考えられた。飼育水のアンモニア濃度を上昇させた場合、血中アンモニアレベルが著明に増加していたにもかかわらず、血漿および赤血球 Gln レベルは減少した。この結果から判断すると、アンモニアキャリアーとし

での Gln の意義は小さいと推察された。

第5章 コイにおける鰓通過後の赤血球および血漿遊離アミノ酸レベルの変化

赤血球がアンモニアキャリアーとして機能しているなら、排泄器官である鰓を通過する間に、血漿はもちろんのこと赤血球アンモニアレベルも低下することが予想される。そこで、コイの動脈球（入鰓血）と背大動脈（出鰓血）にカニューレーションして採血し、血漿ならびに赤血球のアンモニアおよび F A A レベルについて比較検討した。

鰓を通過する間に、血漿はもちろんのこと、赤血球アンモニアレベルも減少することが明らかとなった (Fig. 7)。全血におけるアンモニアの減少量のうち、赤血球アンモニアの減少量と血漿アンモニアの減少量の占める割合はおよそ等しく、このことから、鰓から排泄されるアンモニアの約 50% は赤血球に由来すると考えられた。鰓を通過すると、赤血球の F A A レベルは増加する傾向にあり、一方、血漿 F A A レベルは低下する傾向にあった (Fig. 7)。鰓を通過する間の血漿と赤血球 F A A レベルの変化に関しては、およそ正反対の現象がみられた。

第6章 飼料必須アミノ酸組成とコイの血液、肝臓または骨格筋の遊離必須アミノ酸組成との関連性

血漿 F A A 組成を指標として、飼料タンパク質の栄養価を評価する試みがなされているが、これまでに本論文で得られた結果から推察すると、赤血球に含まれているアミノ酸の分だけ過小評価することになると考えられる。そこで、カゼイン-ゼラチン飼料の必須アミノ酸組成と、それを給餌したコイの全血、血漿、赤血球、肝臓または骨格筋の遊離必須アミノ酸組成との関連について検討した。

全血、血漿または赤血球のアミノ酸組成の飼料アミノ酸組成に対する相関は、摂餌後 4 時間目に最も強くなり、その相関係数は、それぞれ、0.8961, 0.8273 および 0.7382 (Table 1) であった。同様に、肝臓も 4 時間後に最も強い相関 ($r=0.9142$) を示した。一方、骨格筋と飼料との間に相関はみられなかった。全血分析の場合、血漿分析に比べて若干大きい相関係数が得られたが、これは前者の場合、血漿と赤血球の両者に含まれているアミノ酸が反映された結果であると考えられる。従って、血液におけるアミノ酸動態を定量的に解析する場合、赤血球に含まれているアミノ酸も合わせて考慮し、検討する必要があると考えられる。

ま と め

1. 魚類血液に存在するアミノ酸は血漿と赤血球の両者に分布し、また、赤血球に偏在するアミノ酸がある。生理食塩水洗浄による赤血球アミノ酸の減少率は必ずしも一様ではなく、このことから、赤血球膜の透過性にアミノ酸特性が存在すると考えられる。

2. コイにおけるアミノ酸生体内輸送機構は3つの型に分類されると考えられる。1)主として血漿により運搬されているアミノ酸、2)血漿および赤血球により運搬されているアミノ酸、3)主として赤血球により運搬されているアミノ酸。

3. 摂餌後、絶食下およびアンモニア負荷により、血漿のみならず赤血球アンモニアレベルも上昇することから、赤血球はアンモニアキャリアーとしての機能を有していると考えられる。

4. 赤血球アンモニアレベルは鰓を通過して減少し、鰓から排泄されるアンモニアの約半分は赤血球に由来すると考えられる。

5. 血液が鰓を通過すると、血漿アミノ酸レベルは減少し、赤血球アミノ酸レベルは増加する傾向がみられたことから、鰓組織でのアミノ酸交換に関して、血漿と赤血球は異なる役割を演じていると考えられる。これらの結果から、アミノ酸動態研究における赤血球アミノ酸分析の意義を指摘した。

6. 血漿のアミノ酸分析では、赤血球に含まれるアミノ酸の分だけ過小評価することになるので、血中アミノ酸を指標として、魚類栄養・飼料学的資料にこれを利用しようとする場合には、赤血球に含まれているアミノ酸を合わせて考慮することが必要と考えられる。

Table 1. Correlations of essential amino acid patterns between the dietary protein and the blood, hepatopancreas, or skeletal muscle of carp

Hours after feeding	Correlation coefficients				
	Whole blood	Plasma	Erythrocyte	Hepatopancreas	Muscle
0	0.5701	0.5455	0.3715	0.4573	-0.2710
1	0.8374* ³	0.7749* ¹	0.5493	0.8298* ²	-0.2812
2	0.8395* ³	0.8049* ²	0.6025	0.7853* ¹	-0.2819
4	0.8961* ³	0.8273* ²	0.7382* ¹	0.9142* ⁴	-0.2724
6	0.7362* ¹	0.6937* ¹	0.6514	0.7793* ¹	-0.2634
8	0.5853	0.5538	0.5377	0.6502	-0.2831
12	0.7157* ¹	0.6970* ¹	0.6803* ¹	0.8106* ²	-0.2853
24	0.4944	0.4666	0.4737	0.5651	-0.2724
72	0.4495	0.4424	0.2917	0.5278	-0.2604

*1 p<0.05. *2 p<0.01. *3 p<0.005. *4 p<0.001.

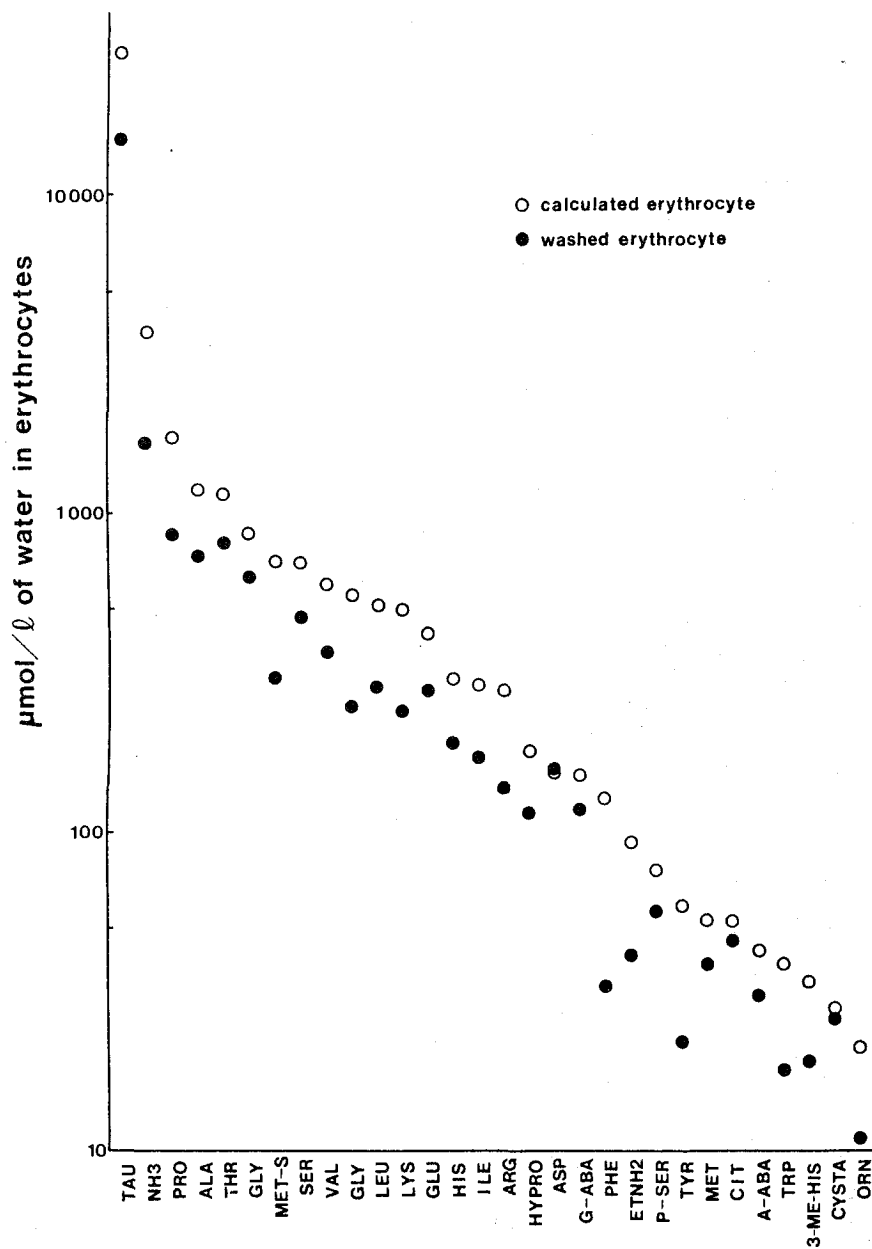


Fig. 1. Comparison between free amino acid levels in the calculated erythrocytes and those in the washed erythrocytes of carp.

MET-S: methionine sulfoxide. G-ABA: γ -aminobutyric acid. ETNH₂: ethanolamine.
 P-SER: phosphoserine. A-ABA: α -amino-n-butyric acid. 3-ME-HIS: 3-methyl-histidine. CYSTA: cystathionine. CIT: citrulline. ORN: ornithine.

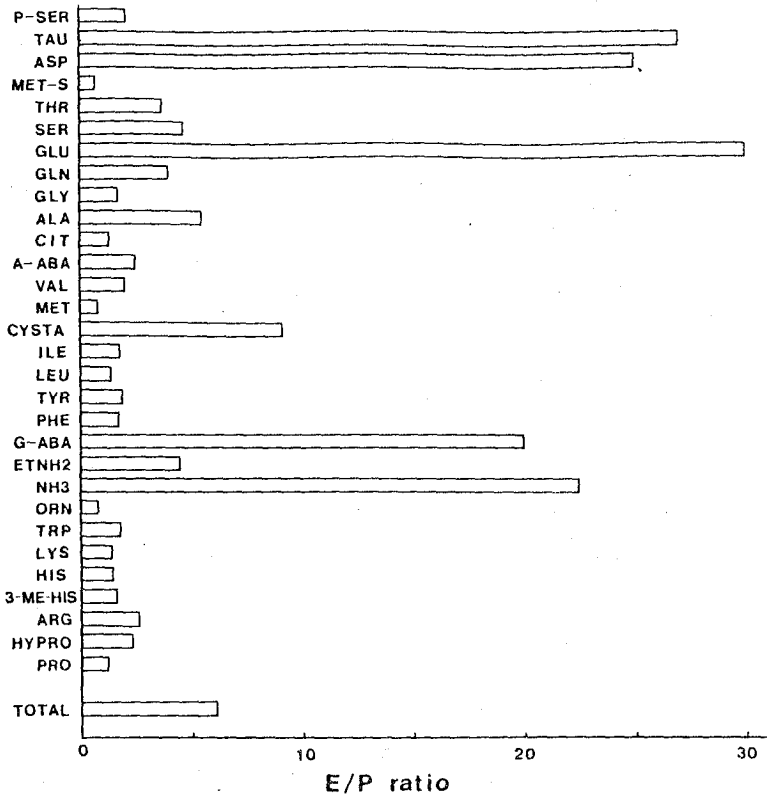


Fig. 2. Ratios of amino acids in the erythrocytes to those in the plasma of carp

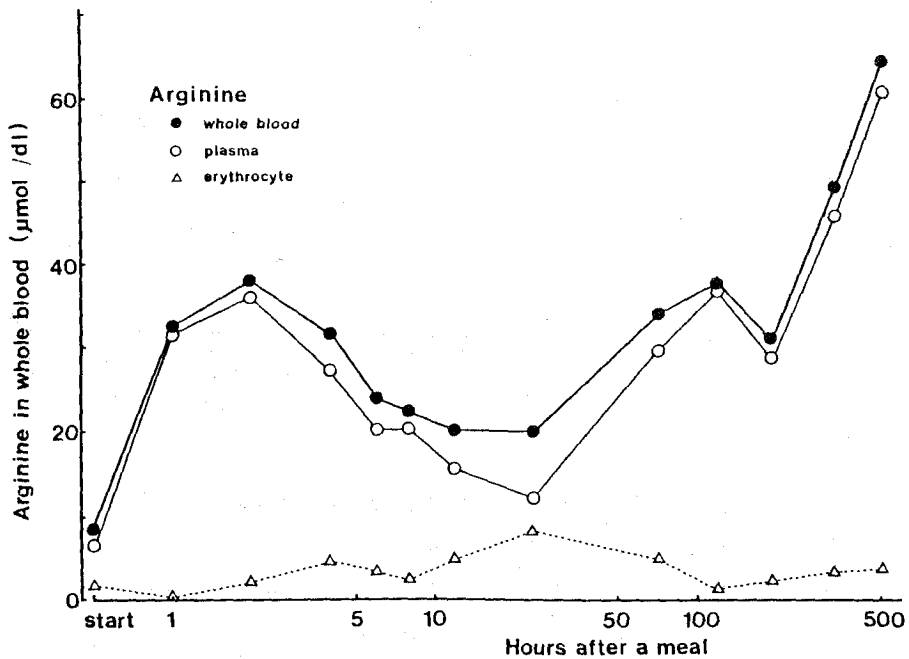


Fig. 3. Changes of arginine levels in the whole blood, plasma, and erythrocytes of carp after feeding a casein-gelatin diet.

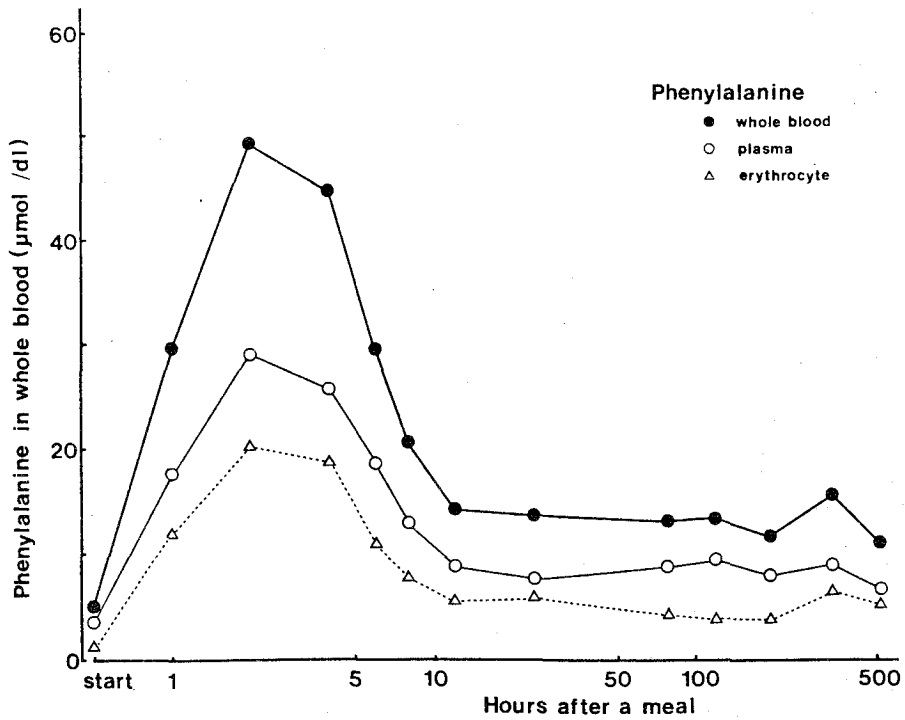


Fig. 4. Changes of phenylalanine levels in the whole blood, plasma, and erythrocytes of carp after feeding a casein-gelatin diet.

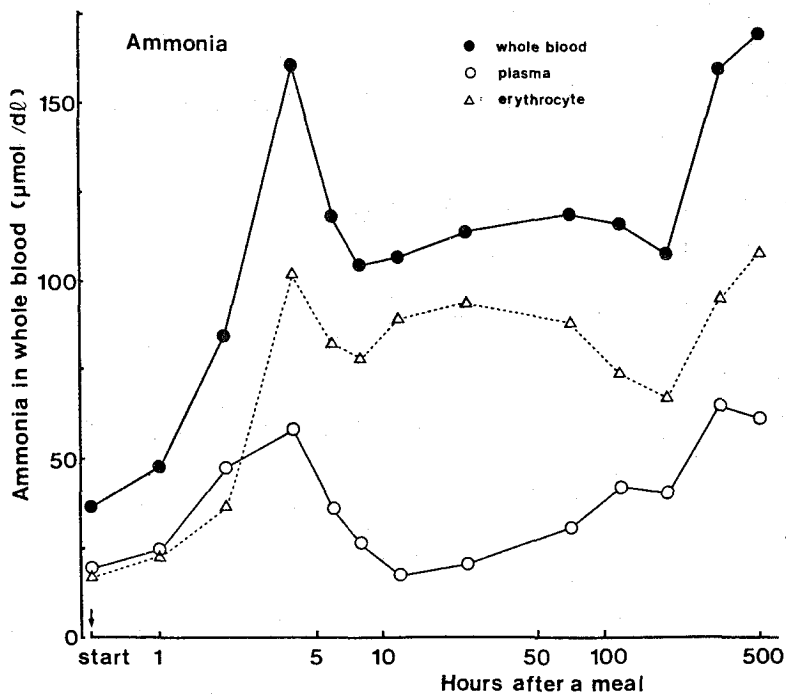


Fig. 5. Changes of ammonia levels in the whole blood, plasma, and erythrocytes of carp after feeding a casein-gelatin diet.

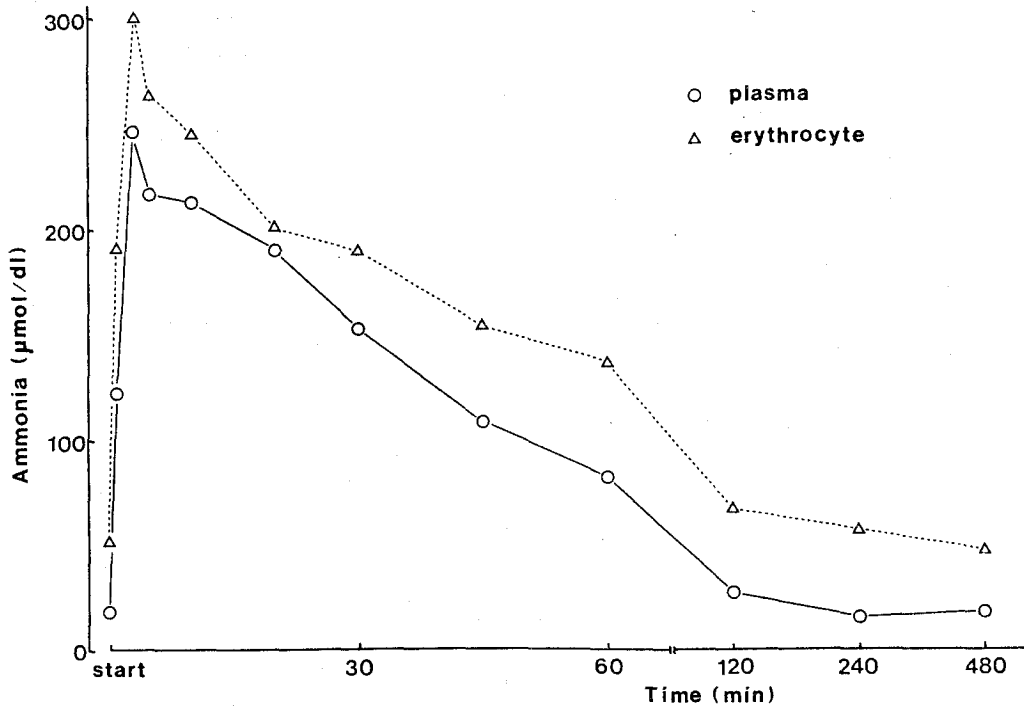


Fig. 6. Changes of ammonia levels in the erythrocytes and plasma of carp after intraperitoneal injection of ammonium chloride.

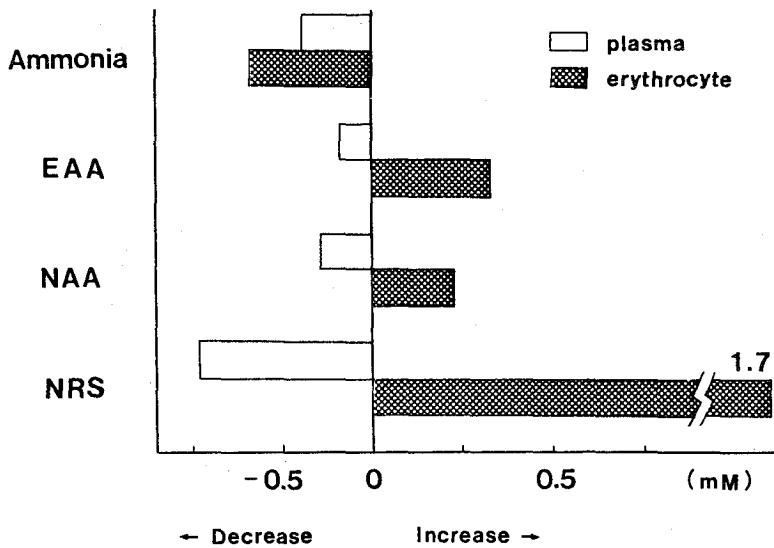


Fig. 7. Dorsal aorta - aortic bulb differences in ammonia and free amino acid levels in the erythrocytes and plasma of carp.

EAA: essential amino acids. NAA: nonessential amino acids. NRS: ninhydrin reactive substances.

審査結果の要旨

栽培漁業における給餌養殖技術の寄与は徐々に大きくなっている。魚類飼料の適正投与については、魚類の栄養生理的特性と経済的側面からとくにたんぱく飼料について関心が払われ、そのアミノ酸組成について従来から研究が行われている。しかし、魚類の赤血球の遊離アミノ酸の動態については、ほとんど研究されておらず、赤血球に存在するアミノ酸の栄養学的、生理学的意義については不明な点が多かった。

著者はまずコイを主として、ギンザケ、ニジマス、アメリカナマズを材料とし、血漿および赤血球のアミノ酸分析を行い、アミノ酸の種類上魚種による特性があること、多くのアミノ酸の赤血球でのレベルは血漿のそれにくらべて高い傾向があり、両者には均等に分布しているものではないことを認めている。赤血球にとくに偏在する傾向のアミノ酸があり、血球内にはアンモニアも意外に多量保持していることを明らかにした。鰓から排泄されるアンモニアのほぼ半分は赤血球に由来し、鰓組織におけるアミノ酸交換に関して、血漿と赤血球はそれぞれ異なる生理的役割を分担していると考え、従来行われているように飼料アミノ酸の指標として血漿のアミノ酸分析値のみをもって行うことがあれば、好ましくないことを主張した。

本研究で行われた上記の新知見は、単に栄養および飼料学上貢献するところが大きいばかりでなく、魚類生理学上、とくに赤血球の生理学の分野において新知見を新たに加えたもので、審査委員は著者に農学博士の学位を取得せしむる値充分ありと判定した。