

博士論文

コイの呼吸循環生理機能に関する研究

平成9年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科  
生物生産学専攻

半田岳志

## 目次

	緒論	1
第1章	安静時の呼吸循環機能特性	3
	第1節 循環機能に及ぼす背大動脈カニキュレーションの影響	3
	第2節 安静時の血液性状と循環機能	12
第2章	急性窒息時の呼吸循環機能	20
	第1節 急性窒息時の心拍動調節機構	20
	第2節 急性窒息時の血圧調節機構	29
第3章	急性失血時の呼吸循環機能	33
	第1節 急性失血時の心拍数と背大動脈血圧の変動	33
	第2節 急性失血時の血圧調節機構	38
	第3節 急性失血時の心拍動調節機構	46
第4章	総合考察	53
	要約	58
	謝辞	60
	引用文献	61

## 緒 論

魚類の様々な生理変動を知り、そのメカニズムを解明するのに最も基本的でかつ重要なことは、対象魚の安静状態もしくは正常状態の内部環境の恒常性を把握することである。特に心機能は、血液のガス性状、pH、そしてホルモンレベルに影響を受けやすいため、呼吸循環系の生理機能を評価する際には、血液のガス性状の変動や、それらの相互関係を知ることが必要不可欠となる。硬骨魚の血液のガス性状に関して、淡水魚、海水魚それぞれ4種についてまとまった報告がなされている（ニジマス, *Oncorhynchus mykiss*, Cameron and Davis, 1970; ヨーロッパウナギ, *Anguilla anguilla*, Peyraud Waitzenegger and Soulier, 1989; コイ, *Cyprinus carpio*, Takeda, 1990; アメリカウナギ, *Anguilla rostrata*, Perry and Reid, 1992; ヌマガレイ, *Platichthys stellatus*, Wood *et al.*, 1979a; ブリ, *Seriola quinqueradiata*, Yamamoto *et al.*, 1981; カツオ, *Katsuwonus pelamis*, キハダマグロ, *Thunnus albacares*, Bushnell and Brill, 1992)。しかしながら、血液のガス性状と、循環カテコールアミン濃度、心拍数および血圧等を相互に関連づけた検討はなされていない。

魚類の心臓機能は、神経性と液性の機構によって二重に調節されている（Farrell, 1984）。液性調節系は、主に循環カテコールアミンによって行われ、神経性調節は脊髄神経由来の交感神経系と、延髄由来の副交感神経系によって行われる。循環カテコールアミンや交感神経による循環機能調節は adrenergic control、副交感神経による循環機能調節は cholinergic control と呼ばれる。一般に cholinergic control は抑制的に、adrenergic control は促進的に働くといわれているが、その程度は魚種によって大きく異なる。副交感神経の活動は低酸素条件下で亢進し、心拍動を抑制して徐脈を引き起こす場合もあるが（ニジマス, Holeyton and Randall, 1967; Bamford, 1974; Daxboeck and Holeyton, 1978; 大西洋タラ, *Gadus morhua*, Fritsche and Nilsson, 1989）、一方で、低酸素時の徐脈が微弱な魚種（sea raven, *Hemitripterus americanus*, Saunders and Sutterlin, 1971）、あるいは徐脈を示さない魚種（rockpoolfish, *Gobius cobitis*, Berschick *et al.*, 1987）も確認されている。硬骨魚類における交感神経の役割について、*in vivo* でなされた研究は限られているが、交感神経の心機能を修飾する作用は微弱（大西洋タラ, Axelsson and Nilsson, 1986）、あるいはほとんど無い（ニジマス, Smith *et al.*, 1985）と考えられている。液性調節機構については、主に循環カテコールアミンによる調節が調べられており、心拍数、心収縮力、および心拍出量の増大、また鰓血管の拡張や末梢血管系の収縮などが、アドレナリン性  $\alpha$  および  $\beta$  受容体を介して起こることが確認されている（詳細は、Farrell and Jones, 1992; Bushnell *et al.*, 1992）。

魚類の心血管系に關与する神経調節、液性調節機構が明らかになりつつあるが、各調節機構 (cholinergic, adrenergic control) が内的、外的ストレスに対して互いになんのようにかかわり合っている、心臓機能にどのように關与するのかという点について定量的に研究された例は少ない。特に、硬骨魚が窒息し始めてから斃死に至るまでの呼吸循環機能の一連の変化を、心拍数や血圧の変動機構と、それに深く關わる血液性状とを關連づけて詳細に研究した報告はきわめて少ない。さらに硬骨魚が、内部環境の維持に大きな役割を果たす循環体液を喪失した時、すなわち失血状態に陥った時の、心拍数や血圧の変動機構と、それに深く關わる血液性状と關連づけて詳細に研究した報告は見当たらない。

本論文では、コイの呼吸循環生理機能の解明を進めるにあたり、安静時の循環機能特性について知ることを第一の目的とした。さらに、コイを急性窒息状態あるいは急性の失血状態に導入し、血液性状や心血管系の一連の変化から、神経性と液性の二重調節機構と心臓の内因的機能を解明することを第二の目的とした。

## 第1章 安静時の呼吸循環機能特性

### 第1節 循環機能に及ぼす背大動脈カニューレーションの影響

#### 緒 言

魚類の循環機能に関する実験では、血管にカテーテルを装着する手術を施し、採血や血圧測定を行う場合が多い。魚類へのカニューレーションの際には、麻酔薬として MS222 (メタアミノ安息香酸エチル・スルホン酸塩) が広く用いられている。

MS222 麻酔は、魚類の血液の化学的性状に大きな影響を及ぼすことが明らかにされている。すなわち、MS222 麻酔下でニジマス の血中乳酸濃度は上昇し (Black and Connor, 1964; Soivio *et al.*, 1977)、ニジマス (Soivio *et al.*, 1977)、テラピア *Sarotherodon mossambicu* (Smit *et al.*, 1979)、コイ (Smit *et al.*, 1979)、カワマス *Salvelinus fontinalis* (Houston *et al.*, 1971) および splake *Salvelinus fontinalis* X *Salvelinus namaycush* (Nieminen *et al.*, 1982) の血漿中のグルコース濃度が上昇することが知られている。さらに、MS222 麻酔下および麻酔後のニジマス 血漿中の電解質において、特にカリウム、マグネシウムイオン濃度は上昇し (Soivio *et al.*, 1977)、クロライドイオン濃度は低下すると報告されている (Houston *et al.*, 1971)。ニジマス 血漿中の循環カテコールアミン濃度は MS222 麻酔時に顕著に上昇し (Iwama *et al.*, 1989)、ヨーロッパウナギの血漿中の循環カテコールアミン濃度は、ethyl carbamate 麻酔の後に上昇することも報告されている (LeBras, 1982)。

一方、心拍数、血圧、血液ガスに及ぼす MS222 麻酔の影響に関する報告もいくつか見られる。テンチ *Tinca tinca* (Randall, 1962) とカワマス (Houston *et al.*, 1971) は MS222 麻酔初期に頻脈を示すが、麻酔がすすむと徐脈となり、時間経過にしたがって徐々に背大動脈血圧は低下する (Houston *et al.*, 1971)。MS222 麻酔下のニジマス において、麻酔期の鰓換水量の低下により (Iwama *et al.*, 1987)、動脈血酸素分圧と pH は低下するが、動脈血二酸化炭素分圧は上昇する (Soivio *et al.*, 1977; Iwama *et al.*, 1987; 1989)。

しかし、カニューレーションの際に施す麻酔や手術そのものが、供試魚の循環機能や血液性状にどのような影響を及ぼすのか、また、その影響からどのように回復するのかという過程を詳細に検討した報告は少ない。MS222 麻酔・カニューレーション後の、血液のガス性状、化学性状、ホルモンレベルの変動や、それらの相互の関連を明らかにすることは、供試魚の麻酔、手術時からの回復の程度を把握するために非常に有用である。

そこで、本節では、コイ成魚に MS222 麻酔を施し、背大動脈および口腔にカニューレーションを行った後の背大動脈血圧、心拍数、呼吸数、血液ガス、血液の化学性状、循環カテコールアミン濃度を測定し、術後の血液性状および心血管系の状態について検討した。

## 材料と方法

### 供試魚

実験に供試したコイ 31 個体の体長 (BL) は  $310 \pm 22.8$  mm、体重 (BW) は  $552 \pm 109.6$  g であった。肥満度 (C) は、 $C = BW \text{ (kg)} / BL^3 \text{ (m)}$  から算出し、 $19 \pm 4.1$  であった。実験に先立ち、コイを 500L の屋内循環濾過水槽に移し、水温 25℃で 2 週間以上飼育し実験温度に順化させた。飼育中は配合飼料 (No. 7P、日本配合飼料) を毎日一回飽食量与え、カニューレーションの 24 時間前から全測定が終了するまで絶食させた。

### カニューレーション

麻酔液には、水温 25℃の条件下で、炭酸水素ナトリウム (Nacalai Tesque Inc.) を添加して中和した 200 mg/l の MS222 (ethyl *m* aminobenzoate methanesulfonate, Crescent Research Chemicals) を用いた。麻酔により鰓蓋運動を停止したコイを手術台に乗せ、背大動脈に外径 1 mm のポリエチレン細管 (No.3, Hibiki)、および口腔に外径 1.4 mm のポリエチレン細管 (No.4, Hibiki) を装着する手術を施した。手術後のコイを恒暗条件の流水式呼吸室に移した。実験水温は  $25.1 \pm 0.1$  °C、呼吸室への流入水量は 600~700 ml/min、流入水の酸素分圧は  $147 \pm 3.2$  mmHg であった。

### 実験条件と採血法

#### 実験1：カニューレーション後の循環機能の経時変化

手術後のコイを呼吸室に収容した時点をも 0 時間とした。カニューレーション後 1、6、12、18、24、36、48 時間に心拍数、背大動脈血圧、呼吸数を測定した後、採血を 0.5 ml ずつ行い血液性状を測定した。心拍数、背大動脈血圧、呼吸数の測定は 0 時間にも行った ( $n=21$ )。

#### 実験2：カニューレーション 24 時間後の循環機能

カニューレーション後 24 時間を経過させたコイの背大動脈血圧、心拍数、呼吸数を測定後、0.7ml 採血し、血液性状を分析した ( $n=10$ )。

採血は、100 IU/ml のヘパリンリチウム (Heparin Lithium Salt, Sigma Chemical Co.) 生理食塩水で死腔の部分 (約 0.01 ml) を満たした注射筒を用い、背大動脈カニューラより行った。

## 心拍数と呼吸数

背大動脈と口腔に装着したカニューラを、ひずみ圧測定用トランスデューサー (MPU-0.5-290、日本光電) に接続し、これからの信号をひずみ圧力アンプ (AP-601G、日本光電) と熱書記録計 (WT-625G、日本光電) を用いて記録した。心拍数 (HR、beats/min) と呼吸数 (BF、cycles/min) は、記録した背大動脈血圧 (収縮期 (BPS)、弛緩期血圧 (BPD)、mmHg) と口腔内圧波形から算出した。

## 血液性状

全血 pH (pHa)、実験水と動脈血の酸素分圧 ( $P_{wO_2}$ 、 $P_{aO_2}$ 、mmHg)、酸素含量 ( $C_{aO_2}$ 、ml/dl) および全炭酸含量 ( $T_{aCO_2}$ 、mM/l) は、毛細管 pH 電極 (G299A、Radiometer)、酸素電極 (E5047-0、Radiometer)、二酸化炭素電極 (E5037-0、Radiometer)、Blood gas monitor (PHM73、Radiometer) および実験水温

(25.0°C) に保った Blood micro system

(BMS3 Mk2、Radiometer) を用いて測定した。

$C_{aO_2}$  と  $T_{aCO_2}$  の測定は、それぞれ Tucker (1967) と Cameron

(1971) の方法に従った。動脈血の酸素飽和度 ( $S_{aO_2}$ 、%) は動脈血の酸素

容量、酸素溶解量および  $C_{aO_2}$  から、

二酸化炭素分圧 ( $P_{aCO_2}$ 、mmHg) は、

Henderson-Hasselbalch の式より算出した。

ヘモグロビン濃度 (Hba、g/dl)、

カルシウムイオン濃度 ( $Ca^{2+}$ 、

mEq/l) は、それぞれオキシヘモグロビン法、

クレゾールフタレインコンプレクソン法 (DRI-CHEM SYSTEM

5500、富士メディカルシステム) で

測定した。ナトリウムイオン、カリ

Table 1-1-1. HPLC-ECD analysis of plasma catecholamine concentration.

Pump :	TSKD-CCPM II, flow rate 1.0 ml/min; analysis, 0.1 ml/min; maintenance
Thermocontroller :	TSK-CO-8020, temperature 40 °C
Detector :	TSK-EC-8020, 700 mV, 8 nA full scale
Colum :	TSK-Gel ODS 80TS 15 cm
aging :	0.1 M $KH_2PO_4$ (pH 3.5 by $H_3PO_4$ , EDTA-2Na 10 mg/l)
Eluent :	0.1 M $KH_2PO_4$ (15 % MeOH/ $H_2O$ , pH 3.5 by conc $H_3PO_4$ , SOS <sup>1)</sup> 2.5 mM; 540 mg/l, EDTA-2Na 20 $\mu$ mol ; 7.44 mg/l)
Chromatograph analysis :	SIC-Chromatocorder 21
Chromatocorder setting :	ATTENUATION 2, CHART FEED 1.00, END TIME 15
<b>&lt;Sample preparation&gt;</b>	
Whole blood 0.3 ml in test tube chilled with ice water	
plasma separation;	centrifusion (2-4 °C, 3500 rpm, 15min) and plasma 0.2 ml in test tube [stocked under -85 °C with 0.2 M reduced form glutathion <sup>2)</sup>
presipitation of plasma total protein ;	+0.4 M HClO <sub>4</sub> , 0.3 ml, centrifusion (2-4 °C, 3000 rpm, 15 min)
supernatant	+ 0.1 M EDTA 100 $\mu$ l
Internal St.;	+ DHBA <sup>3)</sup> 100 $\mu$ g/100 $\mu$ l (pH 5.3-5.5) ; Internal standard
alumina absorption;	+ alumina <sup>4)</sup> 100 mg (120 °C, 2 hr aging)
pH adjustment;	+ 1 M $CH_3COONH_4$ , 1.0 ml (pH 9.5)
mixing;	shake 200 rpm with RECIPRO shaker 20 min
washing;	+EDTA water (0.1 M EDTA 0.5 ml/ 500 ml $H_2O$ ) 8 ml twice
transration;	aspiration into SEPACOL MINI
washing(1);	+EDTA water 8 ml twice
washing(2);	+MetOH 0.5 ml, Chloroform 0.25 ml, Hexn 0.5 ml, Mix 2 min, 3 min after , aspiration
washing(3);	+EDTA water 2 ml three times
dehydration;	centrifusion (2-4 °C, 2000 rpm, 2 min)
elution ;	+0.4 N $CH_3COOH$ , 250 $\mu$ l Mix 5 min and 10 min after centrifusion (2-4 °C, 2000 rpm, 2 min)
filtration;	0.22 $\mu$ m Millipore Filter
HPLC injection:	100 $\mu$ l

1) sodium 1-Ocissnesulfonate (SOS, Nacalai Tesque, Inc.)

2) glutathione reduced form (Sigma Chemical Co.)

3) 3,4-Dihydroxybenzylamine hydrobromide (DHBA, Sigma Chemical Co.)

4) Alumina activated (ICN Alumina B-Super I, ICN Biochemicals)

ウムイオンおよびクロライドイオン濃度 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , mEq/l) は、イオン選択電極法 (DRI-CHEM SYSTEM 800、富士メディカルシステム) で測定した。マグネシウムイオン濃度 ( $\text{Mg}^{2+}$ , mEq/l) はマグネシウム B-テスト (和光純薬工業) を、乳酸濃度 (LA, mg/dl) はデータミナーLA (協和メディクス) を使い、分光光度計 (Spectronic 20A、Shimadzu) で測定した。ノルアドレナリン、アドレナリン濃度 (NOR, ADR, nM/l) は、Woodward (1982) と Fujita *et al.* (1992) の方法の一部を改変し、HPLC-ECD 法で分析した。内部標準液として 3,4-Dihydroxybenzylamine hydrobromide (DHBA, Sigma Chemical Co.) を用いた。アドレナリン、ノルアドレナリンおよび DHBA の分離には、サーモコントローラー (TSK-CO-8020, Tosoh, Co.) により 40°C に保った逆相カラム (TSK-Gel ODS 80TS, Tosoh, Co.) を使い、電気化学検出器 (TSK-EC-8020, Tosoh, Co.) の印加電圧を 700mV に設定した。なお、NOR、ADR および DHBA 抽出のための、コイ血漿の具体的な前処理方法は、Table 1-1-1 に示した。

有意差の検定

全てのデータを、平均値±標準偏差で示した。各測定項目の経時変動の検定には一元配置分散分析法を用いた。また、実験1と実験2の各測定値の比較には対応の無い二組のt検定を用いた。

結 果

本実験に用いたコイは、麻酔液に浸漬してから約5分で速やかに鰓蓋運動を停止した。供試魚へのカニューレーション開始から呼吸室に収容するまでに要した時間は約20分、コイが体平衡を回復して維持し始めるまでに要した時間は約10分間であった。カニューレーション直後とカニューレーションから24時間経過後の背大動脈血圧 (Pda, mmHg) と口腔内圧 (Pbu, mmHg<sub>0</sub>) の実際の記録例を Fig. 1-1-1 に示した。

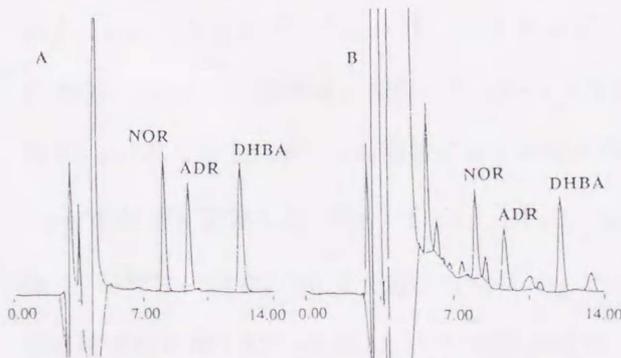


Fig. 1-1-2. Chromatographic recordings over time (minutes) obtained from injection of 100  $\mu$ l of external standard containing 125 pg each noradrenaline (NOR), adrenaline (ADR), and 3,4-dihydroxybenzylamine (DHBA) (chromatogram A); and injection of 100  $\mu$ l of an extracted plasma sample containing 100 pg of internal standard, DHBA (chromatogram B).

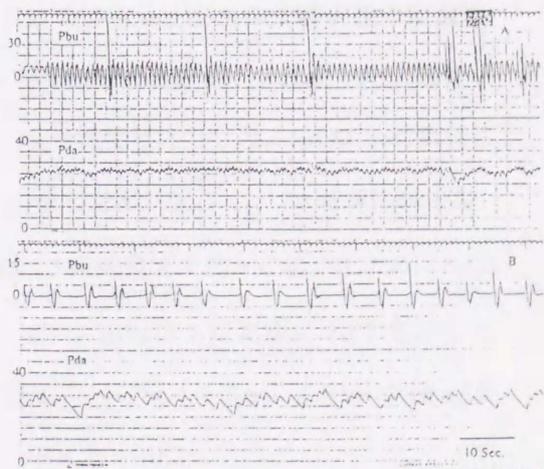


Fig. 1-1-1. Continuous recordings of buccal pressure (Pbu, mmHg<sub>0</sub>) and dorsal aortic blood pressure (Pda, mmHg) of carp (female) at 0 hr (A) and 24 hr (B) after cannulation. Body size: (TL) 390 mm, (BL) 315 mm, (BW) 680 g. Experimental condition: (WT) 25.1°C, (P<sub>aO<sub>2</sub></sub>) 151 mmHg.

Table 1-1-2. Cardiovascular-respiratory parameters (0h) and blood properties (1h) of carp after cannulation.

	Mean	SD	n
(0h)			
HR (beats/min)	67 ± 15.3	21	
BPS (mmHg)	26.7 ± 2.3	21	
BPD (mmHg)	22.0 ± 1.7	21	
BF (cycles/min)	48 ± 24.2	21	
(1h)			
[Hba] (g/dl)	10.9 ± 1.4	11	
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	40.4 ± 10.9	11	
CaO <sub>2</sub> (ml/dl)	12.0 ± 1.4	11	
SaO <sub>2</sub> (%)	78.4 ± 7.7	11	
pHa	7.565 ± 0.090	11	
TaCO <sub>2</sub> (mM/l)	9.1 ± 0.6	11	
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	5.9 ± 1.5	11	
[NOR] (nM/l)	4.8 ± 3.6	10	
[ADR] (nM/l)	4.3 ± 2.9	10	
[Na <sup>+</sup> ] (mEq/l)	134 ± 2.6	11	
[K <sup>+</sup> ] (mEq/l)	4.3 ± 0.7	11	
[Cl <sup>-</sup> ] (mEq/l)	106 ± 3.5	11	
[Ca <sup>2+</sup> ] (mEq/l)	5.0 ± 0.5	10	
[Mg <sup>2+</sup> ] (mEq/l)	5.9 ± 1.0	10	
[LA] (mg/dl)	77.4 ± 15.1	10	

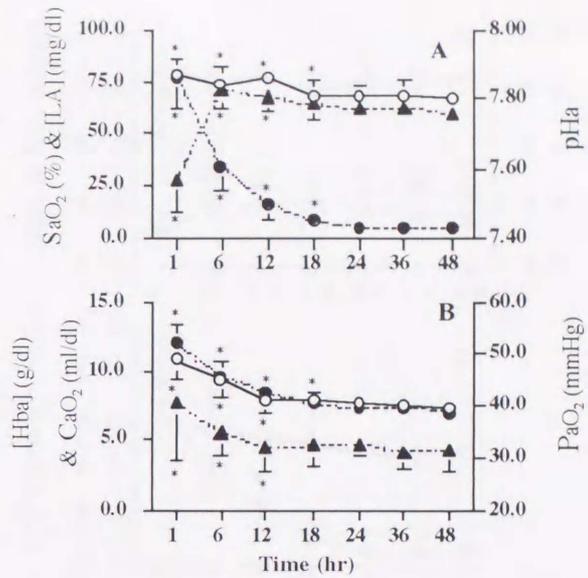


Fig. 1-1-3. The effects of anaesthesia and cannulation on aortic blood properties: (A) oxygen saturation (SaO<sub>2</sub>, open circles), lactic acid concentration ([LA], solid circles) and pH (pHa, solid triangles); (B) haemoglobin concentration ([Hba], open circles), oxygen contents (CaO<sub>2</sub>, solid circles) and oxygen partial pressure (PaO<sub>2</sub>, solid triangles). Values shown are means ± SD (n=10-11). Asterisks indicate a statistically significant variation (P < 0.05).

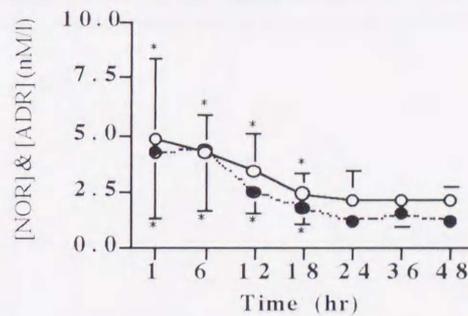


Fig. 1-1-4. The effects of anaesthesia and cannulation on plasma noradrenaline ([NOR], open circles) and adrenaline ([ADR], solid circles) levels. Values shown are means ± SD (n=10). Asterisks indicate a statistically significant variation (P < 0.05).

カニューレ直後の血圧、心拍数および呼吸数、またカニューレ直後1時間後の血液性状を Table 1-1-2. に示した。NOR、ADR および DHBA 抽出例を、Fig. 1-1-2 に示した。血漿中の NOR、ADR の回収率は、添加した DHBA より 75~85 %程度と算出した。LA は 1 時間後に約 80 mg/dl を示したが、6 時間後には 1 時間後の約 1/2 まで急激に低下し、24 時間以降では 5 mg/dl 付近で安定した (Fig. 1-1-3A.)。PaO<sub>2</sub>、CaO<sub>2</sub> は 12 時間後まで徐々に低下したが、SaO<sub>2</sub> は 18 時間後に約 80 %にまで低下した ( Fig. 1-1-3A, B.)。pHa は 1 時間後に 7.57 を示したが 6 時間後には 7.82 へ上昇し、ついで約 pH 7.77 で安定した ( Fig. 1-1-3A.)。Hba は 11 g/dl を示し、その後 Hba は 18 時間後まで有意に低下した ( Fig. 1-1-3B.)。

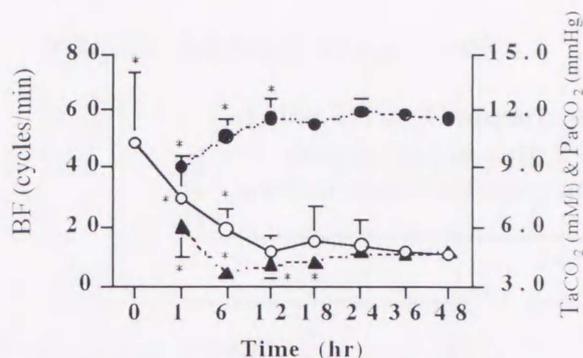


Fig. 1-1-5. The effects of anaesthesia and cannulation on breathing frequency (BF, open circles, n=21), total carbon dioxide (TaCO<sub>2</sub>, solid circles, n=11), and carbon dioxide partial pressure (PaCO<sub>2</sub>, solid triangles, n=11). Values shown are means ± SD. Asterisks indicate a statistically significant variation (P<0.05).

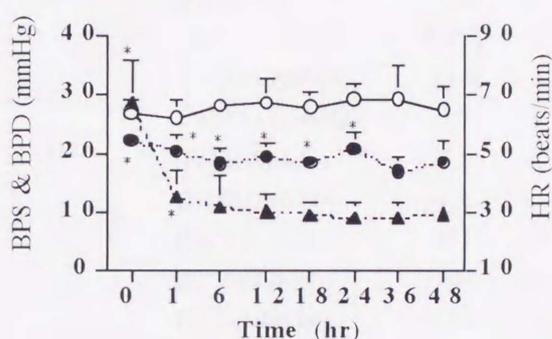


Fig. 1-1-7. The effects of anaesthesia and cannulation on dorsal aortic systolic blood pressure (BPS, open circles), diastolic blood pressure (BPD, solid circles), and heart rate (HR, solid triangles). Values shown are means ± SD (n=21). Asterisks indicate a statistically significant variation (P<0.05).

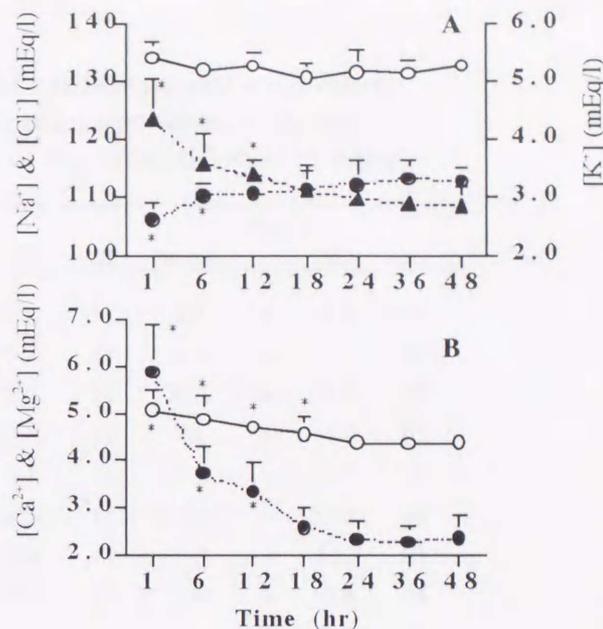


Fig. 1-1-6. The effects of anaesthesia and cannulation on plasma electrolyte concentrations: (A) [Na<sup>+</sup>] (open circles), [Cl<sup>-</sup>] (solid circles) and [K<sup>+</sup>] (solid triangles); (B) [Ca<sup>2+</sup>] (open circles) and [Mg<sup>2+</sup>] (solid circles). Values shown are means ± SD (n=10-11). Asterisks indicate a statistically significant variation (P<0.05).

NORとADRは、18時間後に約2~3 nM/lとなるまで徐々に低下した (Fig. 1-1-4.)。TaCO<sub>2</sub>は1時間後に約9 mM/lを示した後、徐々に上昇して12時間後には約12 mM/lとなり、以後12 mM/l程度で推移した (Fig. 1-1-5.)。PaCO<sub>2</sub>は1時間後の6 mmHgから6時間後の3.6 mmHgまで一時的に低下し、18時間後には4 mmHgまで上昇後、24時間以降は安定した (Fig. 1-1-5.)。BFは0時間目の48回/分から6時間後には19回/分、さらに12時間後には12回/分程度で推移した (Fig. 1-1-5.)。Na<sup>+</sup>は術後48時間後まで有意に変動しなかったが、K<sup>+</sup>は術後12時間で3.5 mEq/lにまで低下し、Cl<sup>-</sup>は術後6時間で110 mEq/lにまで有意に上昇した (Fig. 1-1-6A.)。Ca<sup>2+</sup>は24時間後まで徐々に低下し、Mg<sup>2+</sup>は6時間後に急激に低下した後、18時間後には安定した (Fig. 1-1-6B.)。HRは1時間後まで、BPDは24時間後まで有意に変動したが、BPSは24時間後まで有意な変動は認められなかった (Fig. 1-1-7.)。

実験1のコイのLA、BPDは、実験2のコイよりも有意に低く、Mg<sup>2+</sup>は実験2のコイよりも

有意に高い値を示した (Table 1-1-3.)。

Table 1-1-3. Comparison of cardiovascular-respiratory parameters in carp 24 hr after operation with and without repeated sampling of the arterial blood in carp .

	Exp. 1				Exp. 2			
	Mean	±	SD	n	Mean	±	SD	n
Hta (%)	24.0	±	1.4	11	25	±	2.2	10
[Hba] (g/dl)	7.7	±	0.3	11	8.0	±	0.9	10
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	32.7	±	2.2	11	30.1	±	4.8	10
CaO <sub>2</sub> (ml/dl)	7.3	±	0.7	11	7.1	±	0.7	10
SaO <sub>2</sub> (%)	67.3	±	6.2	11	63.3	±	8.7	10
pHa	7.770	±	0.020	11	7.770	±	0.042	10
TaCO <sub>2</sub> (mM/l)	11.9	±	0.8	11	9.9	±	2.17	10
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	4.7	±	0.4	11	3.9	±	0.8	10
[NOR] (nM/l)	2.2	±	1.2	10	1.5	±	0.8	10
[ADR] (nM/l)	1.2	±	0.4	10	1.3	±	0.4	10
[Na <sup>+</sup> ] (mEq/l)	131	±	2.6	11	130	±	8.7	10
[K <sup>+</sup> ] (mEq/l)	3.0	±	0.2	11	3.3	±	0.6	10
[Cl <sup>-</sup> ] (mEq/l)	112	±	4.1	11	107	±	9.3	10
[Ca <sup>2+</sup> ] (mEq/l)	4.4	±	0.2	10	4.9	±	1.2	10
[Mg <sup>2+</sup> ] (mEq/l)	2.3	±	0.4	10	1.8	±	0.2	10 *
[LA] (mg/dl)	4.9	±	1.4	10	10.1	±	4.6	10 *
HR (beats/min)	28	±	5.0	21	30	±	6.5	10
BPS (mmHg)	29	±	2.6	21	26	±	3.0	10
BPD (mmHg)	21	±	2.8	21	15	±	1.8	10 *
BF (cycles/min)	14	±	8	21	12	±	3.4	10
TL (mm)	383	±	57	31	360	±	13	10
BL (mm)	310	±	23	31	300	±	11	10
BW (g)	552	±	110	31	562	±	52	10
C	19	±	4	31	21	±	2	10

EXP. 1: the parameters of 24h after cannulation with repeated sampling.

EXP. 2: the parameters of 24h after cannulation without repeated sampling.

Asterisks indicate significant differences compared with corresponding mean values of EXP.1 (P < 0.01).

## 考 察

本実験に用いたコイが麻酔導入約 5 分で速やかに鰓蓋運動を停止したのは、pK 値の低い MS222 麻酔液 (Wedemeyer, 1970) を炭酸水素ナトリウムで中和したため、麻酔導入に要する時間が短縮されたためであろう (Ohr, 1976; Smit and Hattingh, 1979; Smit *et al.*, 1979)。MS222 麻酔下のニジマスの鰓換水量は低下するため (Iwama *et al.*, 1987)、動脈血酸素分圧と動脈血

pHは低下、動脈血二酸化炭素分圧は上昇し (Soivio *et al.*, 1977; Iwama *et al.*, 1989)、血中乳酸濃度は増加する (Black and Connor, 1964; Soivio *et al.*, 1977) ことが知られている。本実験に用いたコイは、麻酔による鰓蓋運動停止から手術終了まで人為的な鰓換水をしておらず、また、18時間後までの血中乳酸濃度は有意に高いので、コイは麻酔・手術時に窒息状態となっており、嫌氣的代謝が行われていたと考えられる。したがって、手術時のコイ動脈血は、呼吸性と代謝性双方による複合性アシドーシスの状態にあったと考えられる。

DHBAの70~85%という高い回収率から、コイ成魚の血漿中のNORとADRの分析は、Table 1-1-1.で示した方法を用いれば、高い精度で可能であると判断される。

カニューレシオン12時間後あるいは18時間後までの $P_{aO_2}$ 、 $CaO_2$ および $SaO_2$ は、24時間以降の値よりも高い値を示していた。動脈血の酸素容量は18時間後までのHbaにより増大し、赤血球の酸素親和力は6~12時間後のpHaの上昇(逆Bohr効果)により増強されていたと考えられる。また、血液中の循環カテコールアミン濃度が上昇すると、赤血球の酸素親和力が増大することが報告されているので (Nikinmaa, 1983; Nikinmaa and Jensen, 1986; Baroin *et al.*, 1984; Borgese *et al.*, 1986; Nikinmaa and Tufts, 1989; Perry and Reid, 1992; Thomas and Perry, 1992)、本実験に供試したコイの麻酔手術後の赤血球の酸素親和力は、18時間後までの高濃度のNORとADRにより増大していたと考えられる。これらのことから、麻酔手術後のコイ動脈血は、ヘモグロビン濃度、カテコールアミン濃度および動脈血pHの上昇によって、血液の酸素運搬能を向上させ、酸素債の補償を行っていたことが判明した。

Itazawa and Takeda (1978)は、窒息時のコイは呼吸数を増加させ過呼吸を行うと報告している。本実験に供試したコイにおいて、麻酔・手術1時間後にBFが多いにもかかわらず $P_{aCO_2}$ が有意に高いのは、麻酔手術時に蓄積した二酸化炭素と乳酸分解によって生じる二酸化炭素が非常に多く、コイが過呼吸を行っていても、手術後1時間では二酸化炭素が十分に排出されていなかったことを示している。6時間後の $P_{aCO_2}$ が一時的に有意に低下したのは、過呼吸により二酸化炭素の排出が過剰に行われていたことに起因する。これらのことから、麻酔手術後の動脈血の二酸化炭素分圧の回復には過呼吸が大きな影響を及ぼしていることが確認された。

$Na^+$ は術後48時間まで安定していたことから、細胞外液の電解質として最も多量に存在する $Na^+$ は、カニューレシオンによっても有意に変動するほどの影響を受けないことが明らかとなった。 $K^+$ 、 $Cl^-$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ は術後有意に変動し、特に $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ および $Cl^-$ の変動は、MS222

麻酔後のニジマスの $K^+$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Cl^-$ の変動傾向 (Wedemeyer, 1970; Houston *et al.*, 1971; Soivio *et al.*, 1977) と一致した。代謝性のストレス時に見られる血漿中の $K^+$ の上昇は、ATP 依存性のカリウムチャネルを介して引き起こされるとされており (Weiss *et al.*, 1989)、哺乳類では、心筋中のATPが不足すると、ATP 依存性のカリウムチャネルが開き、細胞内の $K^+$ が細胞外へ放出されると考えられている (Findlay *et al.*, 1989; Streeby and McKean, 1994)。これらのことから、本実験において $K^+$ が術後12時間目まで徐々に低下し18時間後に安定したのは、好氣的代謝によりATPが産生され、カリウムチャネルが本来の働きを回復し、細胞内に $K^+$ を保持できるようになったためであろう。 $Cl^-$ は、赤血球内外の陰イオンバランスを保つため、赤血球と血漿の間を移動すること(クロライドシフト)が知られている (Cameron, 1978; Claiborne and Heisler, 1984; Heisler, 1984; Randall and Daxboeck, 1984; Fuchs and Albers, 1988; Tufts *et al.*, 1988)。12時間以降に $Cl^-$ が安定したのは、麻酔・手術時に生ずる血漿中の $Cl^-$ の赤血球内への過剰な流入が解消されたためであると推察される。血漿中の $Mg^{2+}$ と $Ca^{2+}$ が術後に徐々に低下した。 $Mg^{2+}$ は再び細胞内に取り込まれたためと推測されるが、 $Ca^{2+}$ の調節機構については不明である。

麻酔手術後の頻脈から、手術直後の心拍出量は増大していたと考えられる。循環カテコールアミン濃度や血漿中の $Ca^{2+}$ の上昇は、心臓に正の変力性と変時性の影響を及ぼすことが報告されている (Farrell, 1984; Farrell *et al.*, 1986; Axelsson, 1988)。よって、麻酔手術後の濃度が高まることが確認された循環カテコールアミンと $Ca^{2+}$ は、心拍出量を増大させていたと考えられ、この心拍出量の増大は血液による物質運搬を促進し、酸素債の解消に役立っているものと推定される。

実験1のコイのLA、BPDは、実験2のコイよりも有意に低く、 $Mg^{2+}$ は実験2のコイよりも有意に高い値を示したことから、麻酔手術後のコイから実験1のような条件で連続採血を行うと、 $Mg^{2+}$ 、LA、BPDへ有意な影響を与えることが判明した。連続採血の影響下にあっても、24時間以降の各測定値は有意には変動しなかった。

今回確認された各測定項目の有意な変動は、コイが受けた麻酔、手術によるものであり、麻酔と手術の影響が消失するのは、呼吸循環機能と血液性状の各測定項目が有意に変動しなくなった時点である判断される。よって、本実験に用いたコイの場合、麻酔と手術の影響が消失し安定状態に達するのは、カニューレーション後18から24時間であると結論される。

## 第2節 安静時の血液性状と循環機能

### 緒言

魚類の生理状態の変動や異常を判定する際には、基準となる血液性状を知る必要がある。特に、安静状態での血液性状を把握することは、魚類の内部環境の恒常性が具体的にどのような範囲に保たれているかを知る上で極めて重要である。normoxic, hypoxic and hyperoxic conditionにおけるコイの血液ガス性状については、Itazawa and Takeda (1978, 1982)、Takeda (1990, 1993) に詳しい。しかし、安静状態の血液のガス性状に加え、血液の化学性状、心拍数および血圧と、それらの相互関係について詳細に検討した報告はない。

本節では、コイ成魚より採取した動脈血を用い、血中のガス性状と化学性状、および心拍数と背大動脈血圧を測定し、安静状態での各パラメーターの値と各パラメーター間の相互関係について検討した。

### 材料と方法

#### 供試魚

実験には、全長 (TL)  $M366 \pm 25$ 、 $F361 \pm 26$  mm (平均値  $\pm$  標準偏差)、体長 (BL)  $M299 \pm 23$ 、 $F298 \pm 22$  mm および体重 (BW)  $M649 \pm 114$ 、 $F658 \pm 111$  g のコイを 92 個体 (雄 (M), 49 個体; 雌 (F), 43 個体) 供試した。肥満度 (C) は、 $C = BW \text{ (kg)} / BL^3 \text{ (m)}$  から算出した。実験は 7 月から 10 月の間に行った。なお、供試魚の購入先および飼育方法は、第 1 章第 1 節、材料と方法—供試魚—と同様である。

#### カニューレーションと採血

コイの背大動脈と口腔へのカニューレーションは、第 1 章第 1 節、材料と方法—カニューレーション—と同様の方法で行った。手術後のコイを、実験水温 (WT)  $25.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、呼吸室への流入水量 600~700 ml/min および流入水の酸素分圧 ( $P_{wO_2}$ , mmHg)  $150.0 \pm 2.1$  mmHg のもとで、24 時間回復させた。手術 24 時間後にコイの背大動脈血圧と口腔内圧を測定し、背大動脈カニューラから魚体重あたり 0.1 % の割合で動脈血を採取した。採血には、100 IU/ml のヘパリンリチウム (Heparin Lithium Salt, Sigma Chemical Co.) 生理食塩水で死腔の部分 (約 0.01 ml) を満たした注射筒を用いて行った。

### 心拍数と呼吸数

背大動脈血圧（収縮期／弛緩期血圧、BPS／BPD、mmHg）と口腔内圧の測定、および心拍数（HR、beats/min）と呼吸数（BF、cycles/min）の算出は、第1章第1節、材料と方法—心拍数と呼吸数—と同様である。

### 血液性状

血液性状の分析・算出方法は、第1章第1節、材料と方法—血液性状—と同様である。なお、分析項目は、動脈血のpH（pHa）、動脈血酸素分圧（PaO<sub>2</sub>、mmHg）、酸素含量（CaO<sub>2</sub>、ml/dl）、全炭酸含量（TaCO<sub>2</sub>、mM/l）、ヘモグロビン濃度（Hba、g/dl）、カルシウムイオン濃度（Ca<sup>2+</sup>、mEq/l）、ナトリウムイオン濃度（Na<sup>+</sup>、mEq/l）、カリウムイオン濃度（K<sup>+</sup>、mEq/l）、クロライドイオン濃度（Cl<sup>-</sup>、mEq/l）、マグネシウムイオン濃度（Mg<sup>2+</sup>、mEq/l）、アドレナリン濃度（NOR、nM/l）、ノルアドレナリン濃度（ADR、nM/l）、動脈血酸素飽和度（SaO<sub>2</sub>、%）、および二酸化炭素分圧（PaCO<sub>2</sub>、mmHg）であった。さらに、血漿総タンパク濃度（T. pro.、g/dl）の測定は、ビュレット法で比色酵素アナライザ（DRI-CHEM SYSTEM 5500、富士メデイカルシステム）を用いて測定した。また、ヘマトクリット値（Hta、%）は、毛細管法で12000 rpm × 5 min 遠心分離して算出した。

### 統計処理

測定、算出された各値を雌雄間で二標本t検定（two sample t test）を行った。また、標本相関係数（sample correlation coefficient）の検定と雌雄の標本相関係数の差の検定（comparison of two correlation coefficients）を行った。有意水準は、P<0.01とした。

## 結 果

24時間後の血液性状をTable 1-2-1に示した。本実験に用いたコイの全長、体長、体重および肥満度に有意な雌雄差は認められなかった。また、各血液性状、心拍数、血圧および標本相関係数の雌雄差は有意ではなかった。pHa、Na<sup>+</sup>およびCl<sup>-</sup>の変動係数は4%以下と、他の測定項目の変動係数に対してきわめて小さかった（Table 1-2-1）。pHaから算出した水素イオン濃度（[H<sup>+</sup>]、M/l）とHba、CaO<sub>2</sub>およびSaO<sub>2</sub>の間には、有意な相関が認められなかった。Hbaの高い個体は、HtaやCaO<sub>2</sub>も高く、SaO<sub>2</sub>は低くなる傾向を示し、有意な相関が確認された（Fig. 1-2-1.）。また、Na<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>の間にも正の相関が確認された（Fig. 1-2-2.）。NORとADR、およ

び NOR、ADR と  $CaO_2$ 、 $SaO_2$  の間には有意な相関が認められなかった。HR、BPS および BPD と、血液ガス、ADR および NOR の間に、有意な相関は認められなかった。

**Table 1-2-1. Cardio-respiratory parameters and blood properties of carp under resting conditions.**

	M/F <sup>1)</sup>	Mean	SE	SD	CV <sup>2)</sup>	n
WT (C)		25.0 ±	0.0	0.1	0.4	92
$PwO_2$ (mmHg)		150.0 ±	0.2	2.1	1.4	92
TL (mm)	M	366 ±	4.0	26	7.1	49
	F	366 ±	3.6	23	6.3	43
BL (mm)	M	299 ±	3.6	23	7.7	49
	F	298 ±	3.3	22	7.4	43
BW (mm)	M	649 ±	18.3	114	17.6	49
	F	658 ±	17.1	111	16.9	43
C	M	24 ±	0.4	2.0	8.3	49
	F	25 ±	0.5	3.0	12.0	43
-----						
Hta (%)	M	24 ±	0.4	3.1	12.8	49
	F	25 ±	0.6	3.8	15.3	43
[Hba] (g/dl)	M	8.0 ±	0.2	1.4	17.5	49
	F	8.0 ±	0.2	1.4	17.5	43
$PaO_2$ (mmHg)	M	30.0 ±	0.7	5.2	17.3	49
	F	30.8 ±	0.9	6.2	20.1	43
$CaO_2$ (ml/dl)	M	8.1 ±	0.2	0.9	11.1	35
	F	8.1 ±	0.2	0.9	11.1	32
$SaO_2$ (%)	M	74.9 ±	1.3	7.9	10.5	35
	F	72.0 ±	1.4	7.9	11.0	32
pHa	M	7.779 ±	0.008	0.053	0.7	49
	F	7.776 ±	0.002	0.007	0.1	43
$TaCO_2$ (mM/l)	M	10.4 ±	0.2	1.3	12.5	34
	F	10.5 ±	0.3	1.5	14.3	30
$PaCO_2$ (mmHg)	M	4.0 ±	0.1	0.6	15.0	34
	F	4.0 ±	0.1	0.7	17.5	30
[NOR] (nM/l)	M	2.4 ±	0.2	1.0	41.7	25
	F	2.2 ±	0.2	0.8	36.4	24
[ADR] (nM/l)	M	1.7 ±	0.1	0.7	41.2	25
	F	1.7 ±	0.1	0.7	41.2	24
[T. prot.] (g/dl)	M	2.7 ±	0.1	0.5	18.5	21
	F	2.7 ±	0.1	0.4	14.8	17
[Na <sup>+</sup> ] (mEq/l)	M	134 ±	0.5	3.6	2.7	42
	F	135 ±	0.6	3.3	2.4	32
[K <sup>+</sup> ] (mEq/l)	M	3.2 ±	0.1	0.5	15.6	42
	F	3.1 ±	0.1	0.6	19.4	32
[Cl <sup>-</sup> ] (mEq/l)	M	111 ±	0.7	4.5	4.1	42
	F	112 ±	0.8	4.7	4.2	32
[Ca <sup>2+</sup> ] (mEq/l)	M	4.3 ±	0.1	0.7	15.6	38
	F	4.6 ±	0.1	0.7	14.1	30
[Mg <sup>2+</sup> ] (mEq/l)	M	1.7 ±	0.1	0.3	17.6	19
	F	2.0 ±	0.2	0.9	45.0	14
HR (beats/min)	M	32 ±	0.9	6.4	20.0	42
	F	31 ±	0.9	5.7	18.6	38
BPS (mmHg)	M	26.7 ±	0.5	2.8	10.5	30
	F	25.8 ±	0.7	4.3	16.7	31
BPD (mmHg)	M	17.1 ±	0.8	4.4	25.7	30
	F	16.4 ±	0.6	3.6	22.0	31
BF (cycles/min)	M	13 ±	0.9	4.6	34.8	29
	F	14 ±	0.9	4.6	32.2	29

1) M: male, F: female. 2) coefficient variation (%)

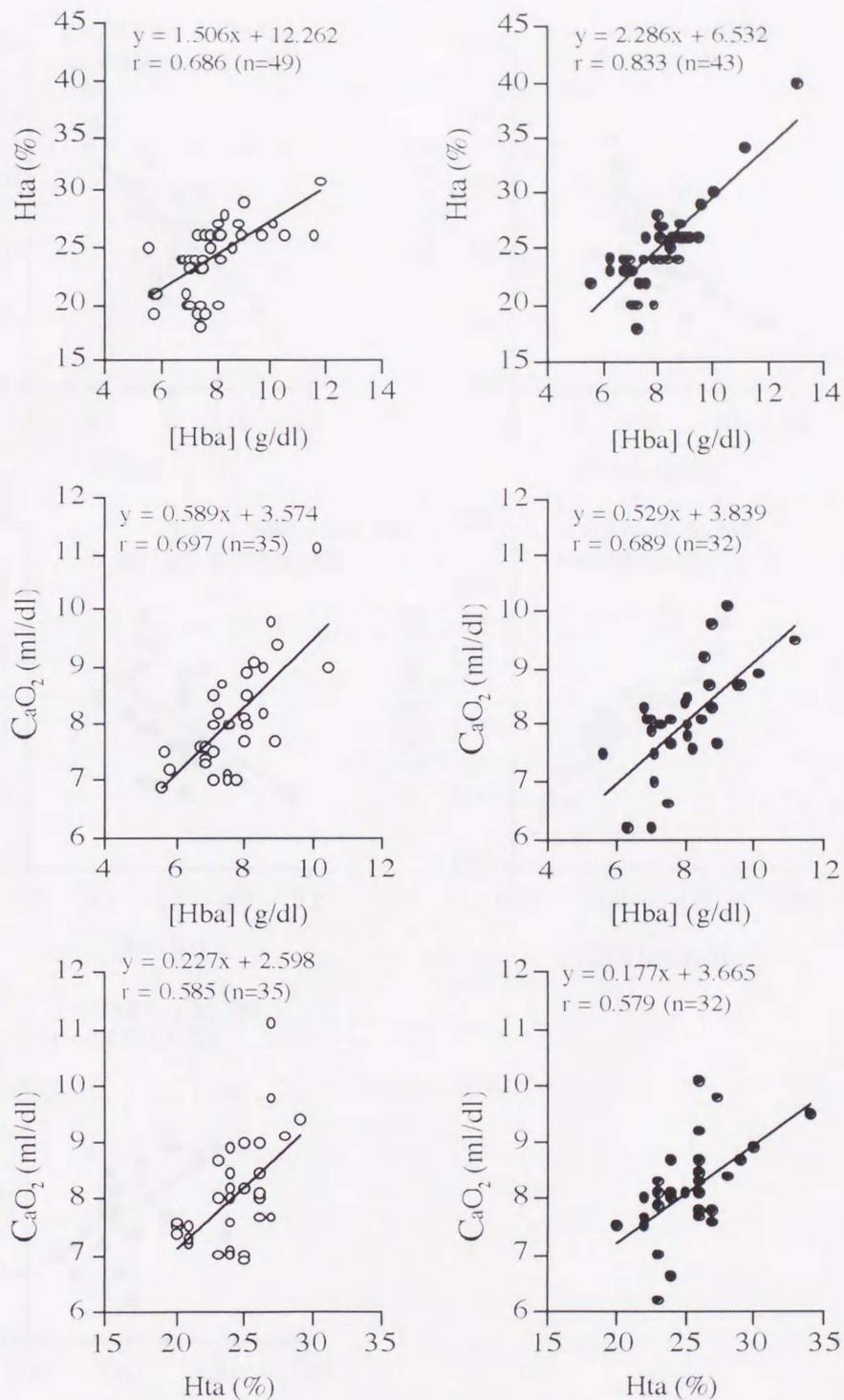


Fig. 1-2-1. Relationships between arterial blood paramters: hematocrit value (Hta), hemoglobin concentration ([Hba]), and oxygen contents ( $CaO_2$ ) of male (open circles) or female (solid circles) under resting conditions. Each correlation coefficient (r) is significant ( $P < 0.01$ ). There is not statistically significant between the correlation coefficeints of male and those of female.

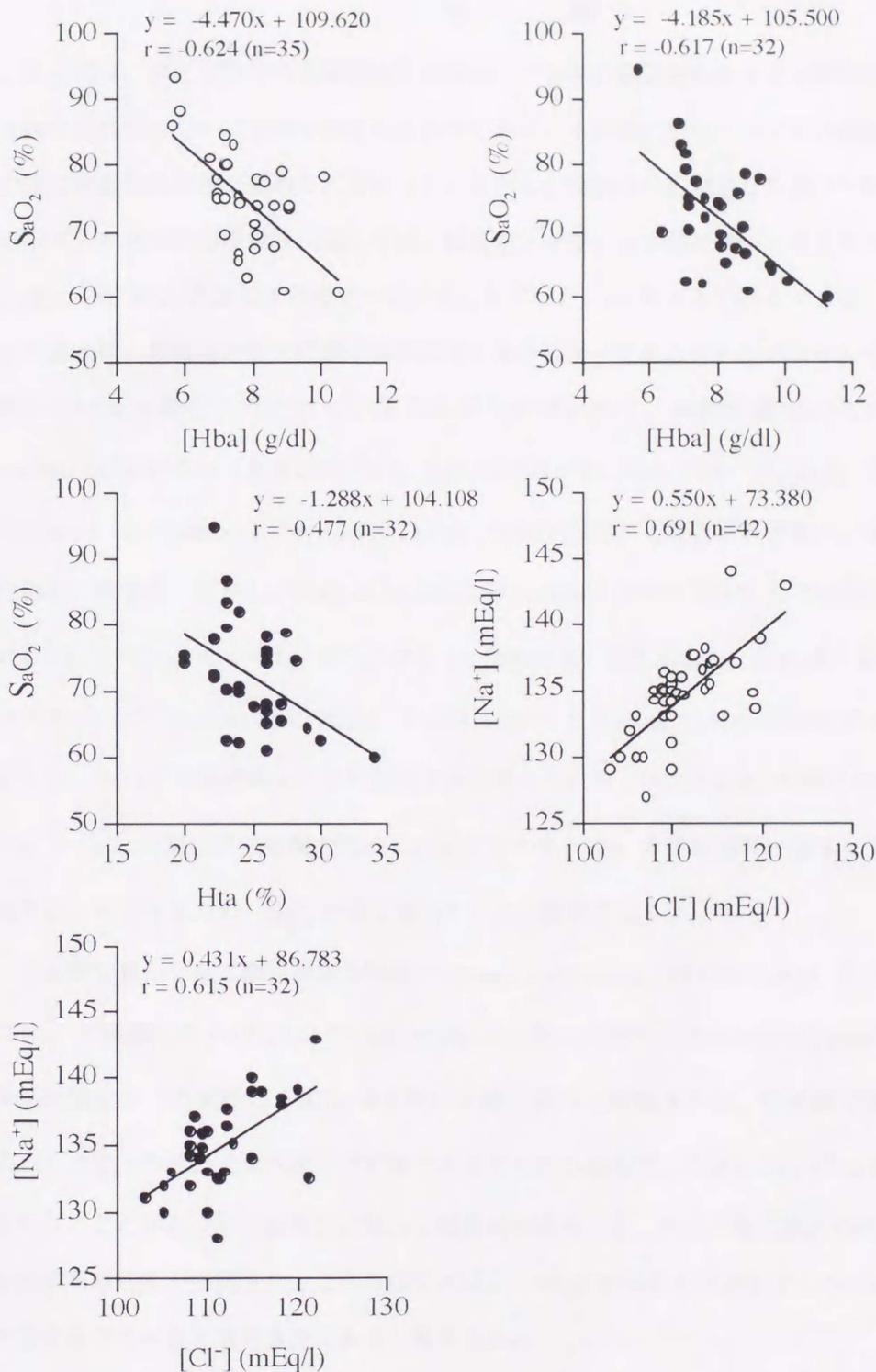


Fig. 1-2-2. Relationships between arterial blood parameters: oxygen saturation ( $S_{aO_2}$ ), hemoglobin concentration ([Hba]), hematocrit value (Hta), plasma  $[Na^+]$  and  $[Cl^-]$  of male (open circles) or female (solid circles) under resting conditions. Each correlation coefficient ( $r$ ) is significant ( $P < 0.01$ ). There is not statistically significant between the correlation coefficients of male and those of female.

## 考 察

本研究は、コイ安静時の循環機能と血液性状の各値の範囲を提示すると同時に、それらの相互関係の程度について詳細に検討したものである。本実験に用いたコイの各測定値、または算出値に有意な雌雄差が認められなかったことから、性別は今回測定した項目へ影響を及ぼしておらず、本実験の血液性状に関しては、雌雄差を考慮する必要は無いと考えられる。

pHa、 $\text{Na}^+$ およびClはきわめて一定に保たれていた。pHやナトリウムイオン、クロライドイオン濃度は、酸塩基平衡や浸透圧調節に深く関わる因子であることから、それらの制御は安静時においても厳密に行われていることがうかがわれた。実験水温 23~26 °C、normoxic conditionにおけるコイ動脈血の $\text{PaO}_2$ 、 $\text{SaO}_2$ はそれぞれ、 $\text{PaO}_2=24\sim26$  mmHg、 $\text{SaO}_2=68\sim80\%$  (Itazawa and Takeda, 1978, 1982; Takeda, 1990, 1993) と報告されており、本実験で得られた値と一致する。しかし、 $\text{CaO}_2$ はItazawa and Takeda (1978, 1982)、Takeda (1990, 1993) の $\text{CaO}_2=5\sim7$  ml/dl よりも、約 1.3 から 1.5 倍程度高い値を示した。これは、本実験に用いたコイのHbaが、Itazawa and Takeda (1978, 1982) と Takeda (1990, 1993) の $\text{Hba}=5\sim6$  g/dl よりも 1.3~1.5 倍程度高いことに起因すると考えられる。Hbaと $\text{CaO}_2$ の間には正の相関が、Hbaと $\text{SaO}_2$ の間に負の相関が認められたことから、Hbaの比較的高い個体は血液の酸素運搬能力に余裕があるため、 $\text{SaO}_2$ が低くなっていたと推測される。

本実験で算出した二酸化炭素分圧は、Itazawa and Takeda (1978, 1982) と Takeda (1990, 1993) が実測した $\text{PaCO}_2=3.7\sim4.5$  mmHgと一致しており、Henderson-Hasselbalchの式による算出値はコイの実際の $\text{PaCO}_2$ を十分に反映し得ると判断される。本実験で得られたコイの $\text{TaCO}_2$ はヒトのそれと比べ約半分程度であるにもかかわらず、 $\text{PaCO}_2$ は約1/10程度であった。これらのことからコイの血液には強力な緩衝能があること、また二酸化炭素の排出が非常に速やかであることが推測され、これらのことはコイがpHや溶存ガスが変化しやすい環境水中で生活するための合目的特性であると考えられる。

血液の酸素飽和度と、酸素親和力は、血液pHや二酸化炭素分圧に大きな影響を受けることが知られている(ボーア効果)。しかし、pHaの変動の範囲内では、pHaの変動がHba、 $\text{CaO}_2$ および $\text{SaO}_2$ へ顕著な影響を及ぼさなかったことから、pHaの変動が安静時の範囲内であれば、安静時のコイ動脈血の酸素親和力はほぼ一定であると考えられる。同様に $\text{CaO}_2$ と $\text{SaO}_2$ は、

$\text{PaCO}_2$ の変動に影響されてはいなかったことから、安静時の生理的範囲内で変動する  $\text{PaCO}_2$  は、赤血球の酸素親和力にほとんど影響を与えないと考えられる。本実験で得られた、NOR と ADR は、水温  $20^\circ\text{C}$  の normoxic condition におけるコイ (Kakuta and Murachi, 1992) で示された濃度、 $1.5\sim 3.0\text{ nM/l}$  に一致した。この濃度は、多くの硬骨魚の NOR、ADR ( $1.5\text{ nM/l}$ ) とも一致する (Randall and Perry, 1992)。血液中の循環カテコールアミン濃度が上昇すると、赤血球の酸素親和力が増大することが、ニジマス (Nikinmaa, 1983; Primmatt et al., 1986; Perry and Kinkead, 1989; Perry and Reid, 1992) やアメリカウナギ (Perry and Reid, 1992) で報告されている。NOR および ADR と  $\text{CaO}_2$  および  $\text{SaO}_2$  の間には、有意な相関が認められなかったもので、安静時の循環カテコールアミン濃度  $n$  の変動内では、赤血球の酸素親和力に有意に影響を及ぼさないと考えられる。以上のことから、安静状態のコイ動脈血は、今回測定した範囲内の  $\text{pHa}$  や  $\text{PaCO}_2$  であれば、それらによる影響を受けず、さらに、循環カテコールアミンによる赤血球の酸素親和力への顕著な修飾は無いと判断され、安静時の動脈血酸素親和力はほぼ一定であることが *in vivo* で明らかになった。

本実験のコイ血漿中の電解質濃度は、コイ (水温  $20^\circ\text{C}$ ) で報告されている値 ( $\text{Na}^+=135.4$ ,  $\text{K}^+=3.97$ ,  $\text{Cl}^-=117.6$ ,  $\text{Ca}^{2+}=4.4\sim 4.8$ ,  $\text{Mg}^{2+}=1.7$  (平均値,  $\text{mEq/l}$ ) とほぼ同様であった (Houston and Koss., 1982; Fuchs and Albers., 1988)。種々の血漿成分によって血漿浸透圧が決定されるが、その主な成分である  $\text{Na}^+$  と  $\text{Cl}^-$  は互いに極めて一定に保たれていることが、コイでも確認された。

循環カテコールアミン濃度の上昇は魚類心機能を増強させることが知られている (sea raven, ocean pout, *Macrozoarces americanus*, Farrell et al., 1983; ニジマス, Farrell and Milligan, 1986; Farrell et al., 1986; *Anguilla australis*, *A. diffebachii*, Forster, 1981)。コイの HR、BPS および BPD は、NOR と ADR、さらに  $\text{pHa}$  と  $\text{PaO}_2$  の間に有意な相関が認められなかったもので、コイ安静時の心機能は、安静時の生理的範囲内で変動する  $\text{pH}$ 、 $\text{PaO}_2$ 、NOR、ADR にほとんど影響されないと考えられる。よって、血液ガスや循環カテコールアミンが本実験で得られた値の範囲内であれば、これらの要素によって、HR は有意に変動しないことが *in tact* な状態で明白となった。

血漿総タンパク濃度は、栄養状態を示す重要な項目の一つである。本実験で得られた血漿総タンパク濃度は、ビュレット法 (colorimetric techniques) で分析しており、同様の方法で得ら

れたニジマスの値である2~3 g/dlと一致した (Fellows *et al.*, 1980)。refractometry で得られた血漿総タンパク濃度は、colorimetric techniques で得られた結果の約2倍の値を示すと報告されていることから (striped bass, *Morone saxatilis*, Humm and Greer, 1990)、本実験に用いたコイも同様に、血漿総タンパク濃度が refractometry の結果に対し 1/2 程度低い値を示している可能性がある。

## 材料と方法

## 第2章 急性窒息時の呼吸循環機能

### 第1節 急性窒息時の心拍動調節機構

#### 緒言

低酸素条件下における硬骨魚類の心拍数変動に関する報告は多い。一般に硬骨魚は、窒息時に強い徐脈を引き起こす（ニジマス, Holeton and Randall, 1967; Bamford, 1974; Daxboeck and Holeton, 1978; 大西洋タラ, Fritsche and Nilsson, 1989, 1990）。しかし、低酸素時の徐脈が微弱（sea raven, Saunders and Sutterlin, 1971）、あるいは認められない魚種（rock pool fish, Berschick *et al.*, 1987）も確認されている。テンチ (Randall and Shelton, 1963) やニジマス (Wood and Shelton, 1980) において、アトロピンを注入すると低酸素時の徐脈が消失することから、低酸素時の徐脈は、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する迷走神経活動の亢進であることが示された。

心臓へのカテコールアミンの効果は、キンギョ *Carassius auratus* (Cameron, 1979)、大西洋タラ (Axelsson, 1988; Butler *et al.*, 1989; Fritsche and Nilsson, 1990) および Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*, *P. bernacchii* (Axelsson *et al.*, 1992) などで調べられており、大西洋タラでは、遊泳時の心臓への adrenergic control の増強が確認されている。*in vitro* の研究から、心拍動の正の変時性は、アドレナリン性  $\beta$  受容体 (ニジマス, Ask *et al.*, 1980, 1981; キンギョ, Cameron and Brown, 1981; コイ, Temma *et al.*, 1986; 1989)、特に  $\beta_2$  subtype (ニジマス, Ask *et al.*, 1980, 1981; コイ, Temma *et al.*, 1986) を介するのではないかと考えられている。

心臓へのコリン性およびカテコールアミン性支配のそれぞれの働きについてなされた報告は多いが、低酸素状態にある硬骨魚の心臓への二重調節機構について *in vivo* で研究された報告は少なく、特にコイにおいては少ない。本節では、コイ窒息時の神経性と液性による心拍動調節機構を明らかにすることを目的とした。

#### 材料と方法

##### 供試魚

実験にはコイを供試した。供試した80個体の全長 (TL) は  $375 \pm 17$  mm (平均値  $\pm$  標準偏差)、体長 (BL) は  $308 \pm 14$  mm および体重 (BW) は  $680 \pm 110$  g であった。肥満度 (C) は、 $C = BW$  (kg) /  $BL^3$  (m) から算出し、 $23 \pm 3.6$  であった。なお、供試魚の購入先と飼育方

法は、第1章第1節、材料と方法—供試魚—と同様である。

### カニューレーション

コイの背大動脈と口腔へのカニューレーションは、第1章第1節、材料と方法—カニューレーション—と同様の方法で行った。手術後のコイを恒暗条件の流水式の呼吸室に移し、実験水温 (WT)  $25.1 \pm 0.1$  °C、流入水の酸素分圧 ( $P_{wO_2}$ , mmHg)  $147 \pm 3.2$  mmHg のもとで24時間回復させた。背大動脈カニューラを少なくとも1日に1回生理食塩水で洗浄し、さらに10 IU/ml のヘパリンナトリウム (Nacalai Tesque Inc.) 生理食塩水でカニューラ内を満たした。

### 実験状態

#### Series 1: 低酸素時の心機能と呼吸機能の調整

低酸素状態へは、窒素ガスでバブリングし溶存酸素分圧 ( $P_{wO_2}$ , circulating hypoxic water) を約6 mmHgにした実験水を呼吸室へ流入させ、導入した ( $n=20$ )。このSeriesは、Series2~4のプロプラノロール (D,L-Propranolol hydrochloride, Nacalai Tesque Inc.)、あるいはアトロピン (Atropine sulfate, Nacalai Tesque Inc.) による処理を行ったコイのshamとするため、低酸素水を流入させる20分前あるいは2時間前に、対照としてpH7.78に調整した生理食塩水0.2 mlを背大動脈カニューラより注入した。カニューラ内に残留した生理食塩水を魚体内へ完全に注入するために、10 IU/ml のヘパリンナトリウム (Nacalai Tesque Inc.) 生理食塩水を0.2 ml注入した。

#### Series 2: 低酸素時の心機能と呼吸機能の調整に及ぼすアドレナリン性 $\beta$ 受容体遮断の影響

プロプラノロールによるアドレナリン性 $\beta$ 受容体の遮断作用を十分に行うため、低酸素水を流入させる2時間前に (Nilsson, 1983)、pH7.78に調整したプロプラノロール ( $7 \mu$  M/kg.BW) 生理食塩水をSeries1と同様の方法で注入した ( $n=20$ )。なお、プロプラノロールの投与量は、Kinkead *et al.* (1993) に従った。

#### Series 3: 低酸素時の心機能と呼吸機能の調整に及ぼすムスカリン性アセチルコリン受容体遮断の影響

低酸素水を流入させる20分前にpH7.78に調整したatropine生理食塩水 ( $1 \mu$  M/kg.BW) をSeries1と同様の方法で注入した ( $n=23$ )。なお、アトロピンの投与量は、Wood *et al.* (1979c) に従った。

#### Series 4: 低酸素時の心機能と呼吸機能の調整に及ぼすアドレナリン性 $\beta$ 受容体とムスカリン

性アセチルコリン受容体遮断の影響

低酸素水を流入させる2時間前にプロプラノロールを、20分前にアトロピンをそれぞれ0.1 mlずつ Series 1~3と同様の方法で注入した (n=17)。窒息状態への導入は、Series 1と同様の方法で行った。

**採 血**

採血は、カニューレション24時間後 (Control)、神経薬による作用が安定した窒息開始直前 (Pre-Hy: pre-hypoxia)、窒息による横転時 (Loss: loss of equilibrium)、鰓蓋運動停止時 (Stop: stop of breathing) に背大動脈血圧と口腔内圧を測定後、それぞれ魚体重の0.1%の割合で採血を行った。全ての採血は、100 IU/mlのヘパリンリチウム (Sigma Chemical Co.) 生理食塩水で死腔の部分を満たしたガラスシリンジで行った。

**心拍数および呼吸数**

背大動脈血圧と口腔内圧の測定、および心拍数 (HR, beats/min) と呼吸数 (BF, cycles/min) の算出は、第1章第1節、材料と方法—心拍数および呼吸数—と同様である。

**血液性状**

血液性状の分析・算出方法は、第1章第1節、材料と方法—血液性状—と同様である。分析・算出項目は、動脈血のpH (pHa)、動脈血酸素分圧 ( $P_{aO_2}$ , mmHg)、酸素含量 ( $C_{aO_2}$ , ml/dl)、全炭酸含量 ( $T_{aCO_2}$ , mM/l)、ヘモグロビン濃度 (Hba, g/dl)、アドレナリン濃度 (ADR, nM/l)、ノルアドレナリン濃度 (NOR, nM/l)、乳酸濃度 (LA, mg/dl)、動脈血酸素飽和度 ( $S_{aO_2}$ , %) および二酸化炭素分圧 ( $P_{aCO_2}$ , mmHg) であった。

**統計および計算**

Series 1-4の群間、群内比較には、二元配置分散分析法、一元配置分散分析法を用い、必要であれば、Scheffe's multiple range test ( $P < 0.05$ ) を行った。

Controlの、コイ心臓へのcholinergic tonus、adrenergic tonusは、Cameron (1979) によって示された計算法に従い算出した。Cameron (1979) はキングヨを用い、ムスカリン性アセチルコリン受容体を遮断した時の心拍数と、引き続き同一個体のアドレナリン性 $\beta$ 受容体を遮断した時の心拍数、および神経薬を使用する前の心拍数からcholinergic、adrenergic tonusを算出した。本実験において、窒息時のコイ心臓へのcholinergic、adrenergic tonusの算出は、Series 1の心拍数とSeries 3の心拍数差、そしてSeries 3の心拍数とSeries 4の心拍数差から、窒息時

の adrenergic、cholinergic tonus を算出した。

### 結 果

呼吸室内の PwO<sub>2</sub> は、低酸素水を流入させてから6分から8分で約6 mmHg に急激に低下し、実験終了時まで 5.2 ± 1.3 mmHg であった。横転までに要した時間は、Series 1~4 で 15 ± 3 分であった。鰓蓋運動停止までに要した時間は、Series 1, 2, 4 で 65 ± 16 分、Series 3 で 90 ± 20 分であった。

#### 血液性状

横転時と鰓蓋運動停止時の PaO<sub>2</sub>、CaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub> は、著しく低下しており、LA の上昇が確認された (Table 2-1-1)。横転時の TaCO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub> は低下し、Series 3 の pHa は一時的に上昇した (Table 2-1-1)。pHa は鰓蓋運動停止時に pH 7 付近にまで低下した (Table 2-1-1)。Series 1, 2, 4 の PaCO<sub>2</sub> は鰓蓋運動停止時に上昇するものの、Series 3 では Control よりも依然低い値を示した (Table 2-1-1)。Control の ADR と NOR は 2~3 nM/l を示し、各神経薬を注入

**Table 2-1-1. Blood and respiratory parameters of carp during normoxic and severe hypoxic conditions**

		Control		Loss of equilibrium		Stop of breathing	
PwO <sub>2</sub> (mmHg)		147.0 ± 3.2	6.1 ± 2.1	5.2 ± 1.3			
[Hba] (g/dl)	Series 1	9.5 ± 0.5	10.5 ± 0.8	9.5 ± 0.3	0.3	10.7 ± 1.0 *	1.0 *
	Series 2	8.1 ± 0.3	10.6 ± 0.3 *	10.7 ± 1.0 *	0.3 *	10.7 ± 1.0 *	1.0 *
	Series 3	7.5 ± 0.2	8.0 ± 0.2	7.7 ± 0.2	0.2	7.7 ± 0.2	0.2
	Series 4	8.3 ± 0.4	9.1 ± 0.4	9.2 ± 0.3	0.4	9.2 ± 0.3	0.3
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	Series 1	31.6 ± 0.8	0.9 ± 0.1 *	0.9 ± 0.6 *	0.1 *	0.9 ± 0.6 *	0.6 *
	Series 2	32.6 ± 1.1	1.0 ± 0.3 *	1.1 ± 0.3 *	0.3 *	1.1 ± 0.3 *	0.3 *
	Series 3	30.8 ± 1.0	1.7 ± 0.3 *	0.7 ± 0.2 *	0.3 *	0.7 ± 0.2 *	0.2 *
	Series 4	33.3 ± 1.3	1.1 ± 0.2 *	1.0 ± 0.2 *	0.2 *	1.0 ± 0.2 *	0.2 *
CaO <sub>2</sub> (ml/dl)	Series 1	8.7 ± 0.3	a)	a)		a)	
	Series 2	8.5 ± 0.2	-	-		-	
	Series 3	7.9 ± 0.3	-	-		-	
	Series 4	8.2 ± 0.2	-	-		-	
SaO <sub>2</sub> (%)	Series 1	65.7 ± 2.5	- a)	- a)		- a)	
	Series 2	75.3 ± 2.9	-	-		-	
	Series 3	74.5 ± 2.4	-	-		-	
	Series 4	70.2 ± 2.8	-	-		-	
pHa	Series 1	7.759 ± 0.018	7.793 ± 0.025	7.042 ± 0.082 *	0.025	7.042 ± 0.082 *	0.082 *
	Series 2	7.774 ± 0.005	7.723 ± 0.038	6.852 ± 0.040 *	0.038	6.852 ± 0.040 *	0.040 *
	Series 3	7.791 ± 0.015	7.929 ± 0.032 *	7.099 ± 0.047 *	0.032 *	7.099 ± 0.047 *	0.047 *
	Series 4	7.751 ± 0.018	7.683 ± 0.098	6.946 ± 0.032 *	0.098	6.946 ± 0.032 *	0.032 *
TaCO <sub>2</sub> (mM/l)	Series 1	10.0 ± 0.4	1.9 ± 0.3 *	1.9 ± 0.3 *	0.3 *	1.9 ± 0.3 *	0.3 *
	Series 2	9.9 ± 0.5	1.4 ± 0.2 *	1.5 ± 0.2 *	0.2 *	1.5 ± 0.2 *	0.2 *
	Series 3	11.1 ± 0.4	2.6 ± 0.3 *	1.0 ± 0.1 *	0.3 *	1.0 ± 0.1 *	0.1 *
	Series 4	10.1 ± 0.3	1.3 ± 0.2 *	1.4 ± 0.2 *	0.2 *	1.4 ± 0.2 *	0.2 *
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	Series 1	4.2 ± 0.5	0.6 ± 0.1 *	4.1 ± 0.4	0.1 *	4.1 ± 0.4	0.4
	Series 2	3.8 ± 0.5	0.6 ± 0.1 *	2.2 ± 0.4 *	0.1 *	2.2 ± 0.4 *	0.4 *
	Series 3	4.2 ± 0.3	0.7 ± 0.1 *	5.3 ± 0.6	0.1 *	5.3 ± 0.6	0.6
	Series 4	4.2 ± 0.3	0.6 ± 0.1 *	4.9 ± 1.0	0.1 *	4.9 ± 1.0	1.0
[LA] (mg/dl)	Series 1	12.2 ± 1.0	32.0 ± 1.5 *	63.1 ± 3.6 *	1.5 *	63.1 ± 3.6 *	3.6 *
	Series 2	14.0 ± 0.9	32.8 ± 1.5 *	49.6 ± 3.4 *	1.5 *	49.6 ± 3.4 *	3.4 *
	Series 3	15.4 ± 1.3	38.3 ± 3.2 *	63.0 ± 3.0 *	3.2 *	63.0 ± 3.0 *	3.0 *
	Series 4	12.6 ± 1.1	35.2 ± 2.2 *	62.3 ± 1.6 *	2.2 *	62.3 ± 1.6 *	1.6 *

Data shown are means ± SEM.

Asterisks indicate significant differences (P<0.05) from control values.

Series 1: saline injection (n=10); Series 2: propranolol injection (n=10).

Series 3: atropine injection (n=11); Series 4: propranolol+atropine injection (n=10).

a): trace amount

しても有意には変動しなかった (Table 2-1-2)。ADR と NOR は横転時には 30~100 nM/l に上昇し、鰓蓋運動停止時では、全ての Series において Control の約 500 倍に有意に上昇した (Table 2-1-2)。また、プロプラノロールを注入したコイ (Series 2) あるいはプロプラノロールとアトロピンを注入したコイ (Series 4) の横転時の NOR と、プロプラノロールのみを注入したコイ (Series 2) の鰓蓋運動停止時の NOR は、Series 1 に対し有意に高い値を示した (Table 2-1-2)。

**Table 2-1-2. Plasma catecholamine concentrations of carp during normoxic and severe hypoxic conditions.**

		Control	Pre-Hypoxia	Loss of equilibrium	Stop of breathing
PwO <sub>2</sub>	(mmHg)	147.0 ± 3.2	147.0 ± 3.2	6.1 ± 2.1	5.2 ± 1.3
[NOR]	(nM/l)				
	Series 1	2.2 ± 0.5	2.2 ± 0.5	32.2 ± 4.6	215.4 ± 47.3 *
	Series 2	2.7 ± 0.4	4.9 ± 1.2	210.5 ± 70.2 *†	520.1 ± 164.5 *†
	Series 3	2.7 ± 0.3	2.9 ± 0.9	29.3 ± 1.2	478.2 ± 87.6 *
Series 4	3.3 ± 0.5	2.9 ± 0.9	120.0 ± 45.3 *†	398.1 ± 58.1 *	
[ADR]	(nM/l)				
	Series 1	2.5 ± 0.7	2.5 ± 0.7	13.5 ± 4.4	262.8 ± 56.2 *
	Series 2	2.2 ± 0.6	4.9 ± 1.1	46.7 ± 23.6	693.5 ± 177.1 *
	Series 3	1.8 ± 0.6	1.1 ± 0.1	10.1 ± 1.7	586.7 ± 89.1 *
Series 4	2.0 ± 0.2	4.8 ± 1.9	17.4 ± 3.2	275.4 ± 7.5 *	

Data shown are means ± SEM.

Asterisks indicate significant differences (P<0.05) from control values.

Daggers indicate significant differences (P<0.05) from the values of Series 1.

Series 1: saline injection (n=9); Series 2: propranolol injection (n=10).

Series 3: atropine injection (n=13); Series 4: propranolol+atropine injection (n=7).

**心拍数と呼吸数**

Series 1 と 2 の HR は、Control 時に約 32 回/分を示し、横転時と鰓蓋運動停止時では Control 時の約 60% の徐脈を示した (Fig. 2-1-1)。Series 3 の HR は、アトロピンを注入後に Series 1 の約 360%、横転時では徐脈を示した Series 1 の HR の約 500% を示し、鰓蓋運動停止時では Control の HR の 75% にまで減少した (Fig. 2-1-1)。Series 4 の HR は、窒息開始直前では Control の約 295%、横転時では約 110%、鰓蓋運動停止時には Series 1、2 の値にまで減少した

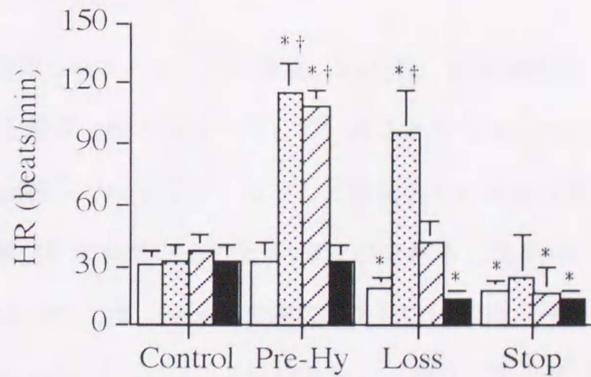


Fig. 2-1-1. Heart rate (HR) of carp during hypoxia following pre-treatment with saline (open columns, n=20), atropine (stippled columns, n=23), propranolol + atropine (hatched columns, n=17) and propranolol (solid columns, n=20). Pre-Hy: pre-hypoxia; Loss: loss of equilibrium; Stop: stop of breathing. Data are shown as means ± SD. Asterisks indicate the statistically different mean values from those of Control. Daggers indicate the statistically different mean values from those of the correspondence in saline treated fish (P<0.05).

(Fig. 2-1-1)。Controlと窒息時のadrenergic tonusとcholinergic tonusを算出した結果をTable 2-1-3. に示した。BFは、横転時に全グループで有意に増加し、特にSeries 3のBFは他のSeriesのBFの約2倍の値を示した (Fig. 2-1-2)。

Table 2-1-3. Heart rate (beats/min) of carp during normoxic and hypoxic condition, and calculated cholinergic and adrenergic tonus ratios.

Rest			
Control	37 ± 8	(n=17)	
+Propranolol	33 ± 6	(n=17)	
Change	4		
(+Propranolol)+Atropine	109 ± 8	(n=17)	
Change	76		
Cholinergic tonus (%)	69.7		
Adrenergic tonus (%)	3.7		
Hypoxia - Loss of equilibrium			
Saline (S1)	19 ± 5	(n=20)	
Atropine (S3)	95 ± 21	(n=23)	
Change	76		
Atropine+Propranolol (S4)	41 ± 11	(n=17)	
Change	54		
Cholinergic tonus (%)	185.4		
Adrenergic tonus (%)	131.7		

Values are means ± SD.

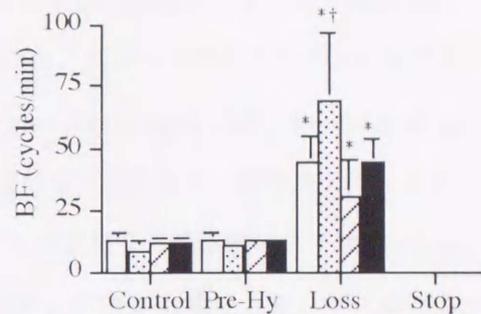


Fig. 2-1-2. Breathing frequency (BF) of carp during hypoxia following pre-treatment with saline (open columns, n=20), atropine (stippled columns, n=23), propranolol + atropine (hatched columns, n=17) and propranolol (solid columns, n=20). Data are shown as means ± SD. Pre-Hy: pre-hypoxia; Loss: loss of equilibrium; Stop: stop of breathing. Asterisks indicate the statistically different mean values from those of Control. Daggers indicate the statistically different mean values from those of the correspondence in saline treated fish (P<0.05).

## 考 察

### 血液性状

カニューレシオン 24 時間後の血液ガス、循環カテコールアミン濃度、心拍数、背大動脈血圧および呼吸数が第 1 章第 2 節で示したコイ安静時の値とほぼ一致していることから、Control 時のコイは安静状態にあったと判断される。横転時ではすでに、ほとんど酸素のない血液が循環し、鰓蓋運動停止時まで盛んに嫌氣的代謝が行われていることが明らかである。横転時の LA は Control 時の約 2 倍に上昇しているにもかかわらず、pHa が有意に低下しないのは、呼吸数の増加が引き起こす過呼吸 (Itazawa and Takeda, 1978) により血液中の二酸化炭素が急速に排出されたためと考えられる。鰓蓋運動停止時には、血液中に過剰な乳酸が蓄積し、加えて二酸化炭素の排出が停止したため pHa が 7 付近にまで低下したのであろう。

各溶液注入後、すなわち窒息開始直前の ADR は 1.1~4.5 nM/l、NOR は 2.1~4.8 nM/l と、Control 時の値に対し有意に変動せず、また、硬骨魚で言われている安静時の循環カテコールアミン濃度 (1-5 nM/l) の範囲内にあったので (Randall and Perry, 1992)、生理食塩水と各

神経薬の注入は循環カテコールアミン濃度に影響を及ぼしていなかったと判断される。硬骨魚類の場合、血液中へ放出されるカテコールアミンの主な供給源は、後主静脈壁のクロマフィン細胞（ニジマス, Nakano and Tomlison 1967; アメリカウナギ, Hathaway and Epple 1989; コイ, Imagawa *et al.*, 1996）であり、ニコチン性アセチルコリン受容体が活性化することで放出される（Reid and Perry 1995）。環境水の溶存酸素濃度の低下は、ニジマスの血中カテコールアミンを増加させる刺激となる（Fievet *et al.*, 1990; Tetens and Christensen, 1987; Boutilier *et al.*, 1988）。大西洋タラの場合、低酸素時の低酸素血症が直接的な刺激となり、循環カテコールアミン濃度は上昇すると報告されている（Perry *et al.*, 1991）。窒息による横転時のコイは、acidosisを伴っていない低酸素血症であることから、横転時に NOR と ADR が有意に上昇しているのは、大西洋タラ同様、低酸素血症が直接の刺激となり、クロマフィン細胞からカテコールアミンが放出されたためであろう。Series 2 と 4 の循環カテコールアミン濃度は、窒息開始直前から鰓蓋運動停止時まで Series 1、3 よりも高い傾向を示したが、その理由は不明である。

#### 安静時の心拍数

Temma *et al.* (1989) はコイ心筋標本を用い、添加するノルアドレナリンが高濃度（1000 nM/l）の場合、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介して負の変時性が生じ、低濃度（100 nM/l）の場合、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介して正の変時性が生じることを報告している。本実験に供試したコイの安静時の NOR は 5 nM/l 以下であるため、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する安静時の心拍動調節は極めて小さいものと考えられる。よって、Series 4 の窒息開始直前の HR は、今回の実験条件におけるコイの内因性心拍数であり、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した迷走神経の強い心拍動抑制作用と、アドレナリン性  $\beta$  受容体を介する交感神経系や循環カテコールアミンの弱い心拍動促進作用によって安静時の心拍数は決定されているものと考えられる。

コイ心臓への adrenergic tonus は、大西洋タラの 1/5、sea raven の 1/8（水温 10-12℃）であり、Antarctic fish（*P. bernacchii*, Axelsson *et al.*, 1992）の 3.2 %（水温 0-0.5℃）と同程度で非常に小さいことがわかる。また、コイ心臓への cholinergic tonus は大西洋タラ（Axelsson 1988）、sea raven（Axelsson *et al.*, 1989）の約 2 倍で、Antarctic fish（*P. bernacchii*, Axelsson, 1992）の 80.4 % に近い。コイと同様な環境（水温: 20~25℃）に生息するキンギョの場合、cholinergic tonus と adrenergic tonus は、各々 66.0 % と 22.0 % と報告されているが（Cameron, 1979）、adrenergic tonus はコイと大きく異なる。これらのことから、コイ心臓への cholinergic

tonus と adrenergic tonus の様式はコイ特有のものであると考えられる。Series 2 のプロプラノロール処理後の HR が処理前に対し有意に変動しなかったのは、Control 時の心臓への cholinergic tonus が adrenergic tonus よりも非常に大きく、プロプラノロールの作用がマスクされてしまったためであろう。

### 窒息時の心拍数

$P_{wO_2} = 5 \sim 6$  mmHg、 $P_{aO_2} < 3$  mmHg のもとでは、体平衡維持に関与する各神経・筋肉系は約 15 分で機能低下し、鰓蓋運動に関わる各神経・筋肉系は 60～90 分で機能低下すると考えられる。

低酸素時に心臓への迷走神経活動が亢進することは、テンチ (Randall and Shelton, 1963)、ニジマス (Wood and Shelton, 1980) および大西洋タラ (Fritsche and Nilsson, 1990) ですでに確認されている。Series 3、4 の結果から、コイにおいても、テンチ、ニジマスおよび大西洋タラと同様の結果が確認された。体平衡が維持できなくなるような低酸素条件下における adrenergic tonus と cholinergic tonus は、Control 時に対して 35 倍、2.6 倍に増大していた。adrenergic tonus が Control 時に対し顕著に増加していた一つの要因として、ノルアドレナリンとアドレナリンがクロマフィン細胞から (ニジマス, Nakano and Tomlison 1967; アメリカウナギ, Hathaway and Epple 1989; コイ, Imagawa *et al.*, 1996) 低酸素血症を契機とし放出され、血漿中の濃度が 30～60 倍に著しく上昇したことが挙げられる。横転時の adrenergic tonus が Control 時の 35 倍にまで増大しているにもかかわらず徐脈を呈したのは、hypoxemia により内因性の心機能が低下し、cholinergic tonus が Control 時よりもさらに増強したため、コイは窒息時に徐脈を呈したと考えられる。鰓蓋運動停止時の HR は Series 1～4 までほぼ同様であり、Series 1 と 2 のコイの一部に、鰓蓋運動停止時にアトロピンを注入したところ、心拍数に変化はなかった (データは示さない)。よって、鰓蓋運動が停止するような、すなわち中枢神経系が機能しなくなるような厳しい低酸素条件下では、cholinergic control や adrenergic control が低下しており、鰓蓋運動停止時の HR は低酸素血症・酸性血症によって機能低下した内因的な心拍動によるものと判断される。Series 4 の横転時の HR は窒息開始直前の約 38 %に、鰓蓋運動停止時では Pre-Hy. の約 15 %にまで減少した。これらは低酸素血症や酸性血症によって洞房間にあるペースメーカー細胞の機能の低下、すなわちペースメーカー細胞の脱分極が遅延し (Saito, 1973)、ペースメーカー細胞の歩調取り機能が横転時では約 38 %にまで、鰓蓋運動停止時では 15 %にまで低下したことを示している。

Temma *et al.* (1989) はコイ心筋標本を用いてアドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する正と負の変時性を示している。*in vivo* と心臓標本の違いがあるので、直接当てはめることはできないが、窒息時の NOR と ADR は Control 時の 15~500 倍となることから、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する正と負の変時性の可能性は否定できない。Fritsche and Nilsson (1990) は、adrenergic and cholinergic blockade を施した大西洋タラの心拍数が、hypoxia ( $PwO_2=4.0-5.3$  kPa, 30-40 mmHg) 条件下で増加することから、NANC-control (non-adrenergic and non-cholinergic control) の可能性を指摘している。本実験の hypoxic condition は  $PwO_2=5\sim6$  mmHg と severe hypoxia であったが、NANC-control の可能性を含め、中程度の低酸素条件あるいは進行性の低酸素条件での心拍数調節機構を検討する必要がある。

## 第2節 急性窒息時の血圧調節機構

## 緒 言

鰓血管抵抗や体血管抵抗は、血圧を決定する重要な因子の一つである。ムスカリン性アセチルコリン受容体を介したアセチルコリンの働きにより、ニジマスの出鰓動脈は収縮する (Wood and Shelton, 1975)。また、アドレナリンによる出鰓動脈の拡張と、アセチルコリンによる鰓血管抵抗の増大 (Booth, 1979) も報告されている。さらに、出鰓弁動脈の括約筋は、交感神経由来のアドレナリン作動性神経と、副交感神経由来のコリン作動性神経による二重支配を受けており、交感神経系は副交感神経系の血管収縮を修飾していると示唆されている (perch, *Perca fluviatilis*, ニジマス, Bailly and Dunel-Erab, 1986; Dunel-Erab and Bailly, 1986)。一方、入鰓弁動脈は、鰓血管抵抗の主要な部分であることも報告されている (ling cod, *Ophiodon elongatus*, Farrell *et al.*, 1979)。また、体血管では、アドレナリン性 $\alpha$ 受容体とアドレナリン性 $\beta$ 受容体が確認されているが、アドレナリン性 $\alpha$ 受容体が優位であることが示されている (Bushnell *et al.*, 1992)。

低酸素条件下 ( $PwO_2 = 30 \sim 40$  mmHg) の大西洋タラは、徐脈を呈するものの、一回拍出量の増加により心拍出量は維持されており、体血管抵抗は増大、鰓血管抵抗は僅かに低下し、腹大動脈血圧と背大動脈血圧は上昇する (Fritsche and Nilsson, 1989)。プレチリウム (adrenergic blocking agent) によって、低酸素条件下の大西洋タラの背大動脈血圧と腹大動脈血圧は低下したことから、低酸素時の動脈血圧の上昇は、主にアドレナリン作動性神経の活動の増大に起因していると結論されている (Fritsche and Nilsson, 1990)。低酸素条件下 ( $PwO_2 = 70 \sim 80$  mmHg) の ling cod は、背大動脈血圧、腹大動脈血圧および心拍出量は有意に変動しないが、さらに厳しい低酸素条件下 ( $PwO_2 = 25 \sim 45$  mmHg) では、心拍出量、鰓血管コンダクタンスおよび体血管コンダクタンスが低下し、背大動脈血圧と腹大動脈血圧は低下する (Farrell, 1982)。魚種や実験条件によって差が見られるものの、窒息時の血圧調節に cholinergic、adrenergic control 双方の影響を受けることは明らかである。

窒息時には、コイ心臓への adrenergic、cholinergic control の双方がともに増強されているものの、cholinergic tonus が adrenergic tonus を上回るため、コイは窒息時に徐脈を呈することが明らかとなったが (第2章第1節)、血圧変動機構については解明されていない。本節では、

コイ急性窒息時の血圧調節機構について検討した。

## 材料と方法

### 供試魚

第2章第1節 材料と方法—供試魚—と同様である。

### カニューレション

第2章第1節 材料と方法—カニューレション—と同様である。

### 実験状態

第2章第1節 材料と方法—実験方法—と同様である。

### 背大動脈血圧

背大動脈血圧の測定は、カニューレション24時間後（Control）、神経薬による作用が安定した窒息開始直前（Pre-Hy: pre hypoxia）、窒息による横転時（Loss: loss of equilibrium）および鰓蓋運動停止時（Stop: stop of breathing）に行った。背大動脈血圧の測定は、第1章第1節と同様である。背大動脈の平均血圧（DAP、mmHg）は、 $DAP = (\text{収縮期血圧} + 2 \times \text{弛緩期血圧}) / 3$ より算出した（Axelsson and Nilsson, 1986）。

### 統計処理

第2章第1節 材料と方法—統計処理と計算—と同様である。

## 結 果

### 背大動脈血圧

DAPの変動を、Fig. 2-2-1に示した。sham（Series 1）のDAPは、横転時ではControlの約110%にまで上昇し、鰓蓋運動停止時ではControlの約70%にまで低下した。アトロピンのみを注入したコイ（Series 3）の窒息開始直前のDAPは、Controlに対し約130%にまで、横転時において、Controlの約140%にまで上昇し、鰓蓋運動停止時ではControlの約70%にまで低下した。プロ

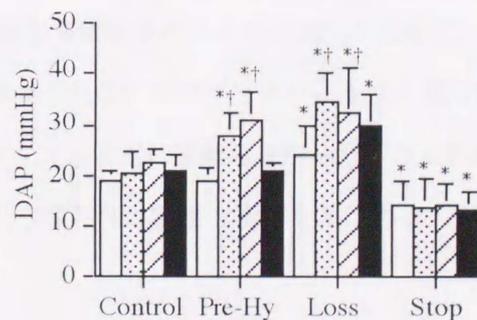


Fig. 2-2-1. Dorsal aortic mean blood pressure (DAP) of carp during hypoxia following pre-treatment with saline (open columns, n=20), atropine (stippled columns, n=23), propranolol + atropine (hatched columns, n=17) and propranolol (solid columns, n=20). Pre-Hy: pre-hypoxia; Loss: loss of equilibrium; Stop: stop of breathing. Data are shown as means  $\pm$  SD. Asterisks indicate the statistically different mean values from those of Control. Daggers indicate the statistically different mean values from those of the correspondence in saline treated fish ( $P < 0.05$ ).

プラノロールとアトロピンを注入したコイ (Series 4) の窒息開始直前の DAP は、アトロピンのみを注入したコイ (Series 3) の DAP とほぼ同じ程度にまで上昇した。プロプラノロールとアトロピンを注入したコイの横転時の DAP は、Control に対して有意に上昇しており、鰓蓋運動停止時には Control の約 70% にまで低下した。プロプラノロールのみを注入したコイ (Series 2) の窒息開始直前の DAP は、注入前に対し有意に変動しなかった。プロプラノロールのみを注入したコイの DAP は、横転時に約 130% にまで上昇し、鰓蓋運動停止時では Control の約 70% にまで低下した。アトロピンのみ、あるいはプロプラノロールとアトロピンを注入したコイの窒息開始直前と横転時の DAP は、sham に対し有意に高い値を示した。

## 考 察

### 安静時の背大動脈血圧

鰓灌流標本を用いた実験から、アドレナリンによる出鰓動脈の流量増加は (ニジマス, Booth, 1979)、アドレナリン性  $\beta$  受容体を介する入鰓弁動脈と出鰓弁動脈の血管拡張 (ling cod, Farrell *et al.*, 1979) に起因すると考えられている。アセチルコリンによる出鰓動脈の流量の減少は (ニジマス, Booth, 1979)、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した出鰓動脈の収縮作用 (Wood, 1975) により生じる鰓血管抵抗の増大に起因する (Booth, 1979)。アトロピン注入後に窒息開始直前のコイの DAP が上昇したのは、心拍数増加 (第 2 章第 1 節) による心拍出量の上昇と、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介する出鰓動脈の収縮作用が抑制されたためであると推察される。プロプラノロールとアトロピンを注入したコイの窒息開始直前の DAP は、sham に対して有意に高い値を示したものの、アトロピンのみを注入したコイの DAP の間に有意な差は認められなかった。よって、窒息開始直前のコイの DAP の上昇に、アドレナリン性  $\beta$  受容体はほとんど関与していないと考えられる。プロプラノロール注入後の窒息開始直前の DAP は、注入前に対し、また sham に対しても有意に変動しなかった。以上の結果から、安静時のコイ DAP の変動にアドレナリン性  $\beta$  受容体は顕著な影響を及ぼさないことが明らかである。

### 窒息時の背大動脈血圧

窒息時のコイの循環カテコールアミン濃度は、Control に対し著しく上昇しており (第 2 章第 1 節)、窒息時の血圧変動にアドレナリン性  $\alpha$  受容体やアドレナリン性  $\beta$  受容体が関与することが予想される。低酸素条件下の大西洋タラでは、背大動脈血圧や腹大動脈血圧の上昇は、

adrenergic vasomotor fibers による体血管抵抗の増大に起因すると考えられている (Fritsche and Nilsson, 1990)。本節のコイの場合、sham の DAP が横転時で上昇したのは、Control に対して 5~15 倍にまで上昇した循環カテコールアミンによるアドレナリン性  $\alpha$  受容体を介した体血管抵抗の増大に加え、アドレナリン作動性神経による、窒息時の血圧上昇機構が存在している可能性が考えられる (Fritsche and Nilsson, 1990)。

プロプラノロールを注入したコイの循環カテコールアミン濃度は、sham あるいはアトロピンのみを注入したコイの循環カテコールアミン濃度に対し、著しく高い値を示した (第2章第1節)。プロプラノロールによる、循環カテコールアミン濃度の上昇機構については不明であるが、sham やアトロピンを注入したコイよりも、循環カテコールアミンの DAP への顕著な影響が考えられる。プロプラノロールを注入したコイの横転時の DAP は、統計的には有意ではないものの、sham の横転時の DAP に対し高くなる傾向を示した。このことは、Control に対して 10~100 倍にまで上昇した循環カテコールアミンが、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介し、体血管抵抗の増大を引き起こしたためであろう。プロプラノロールとアトロピンを注入したコイの横転時の DAP は、注入前に対し有意に上昇しているが、アトロピンのみを注入したコイの横転時の DAP とほぼ同じであった。これらのことから、窒息による横転時の背大動脈血圧の上昇に、アドレナリン性  $\beta$  受容体は顕著には関与していないと結論される。

鰓蓋運動停止時の DAP は、全てのコイで、Control の約 70 %にまで低下した。鰓蓋運動が停止するほどの著しい低酸素血症・酸性血症では、一様に血管拡張・収縮の維持機能が著しく低下することが明らかである。

以上のことから、体平衡の維持に関わる機能が喪失するような低酸素状態では、背大動脈血圧はアドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する adrenergic control の増強によって上昇し、アドレナリン性  $\beta$  受容体は殆ど関与していないことが明らかとなった。また、窒息により呼吸運動を司る中枢神経の機能が低下するような状態では、少なくともアドレナリン性  $\beta$  受容体やムスカリン性アセチルコリン受容体が関与するような血圧の調節機能は低下し、そのため血圧は著しく低下するものと考えられる。

## 第3章 急性失血時の呼吸循環機能

### 第1節 急性失血時の心拍数と背大動脈血圧の変動

#### 緒言

窒息時や運動時における、魚類の血圧調節や心拍数調節については多数の報告がなされているものの、失血時の血圧や心拍数調節に関する研究は少ない。ヌマガレイにおいて、貧血時の動脈血酸素分圧は上昇し、動脈血 pH、酸素含量、背大動脈血圧および体血管抵抗は低下すると報告されている (Wood *et al.*, 1979b)。貧血時のニジマスの酸素含量は低下し、酸素分圧は上昇することが確認されている (Perry *et al.*, 1989)。また、貧血時のニジマスの背大動脈血圧は低下し、心拍数は増加することも報告されている (Wood *et al.*, 1979c)。Wood and Shelton (1980) は、低酸素条件下のニジマスを失血状態に導入した時の心拍数、心拍出量および血圧から、心血管系の機能に chemoreceptor と baroreceptor が関与することも示唆している。

失血時の心血管系の調節機構を検討するにあたり、始めに失血、すなわち大量の赤血球と循環体液の喪失が心血管系に及ぼす影響を把握する必要がある。そこで本節では、コイ成魚の背大動脈血圧、心拍数および血液ガス性状を測定し、失血時の背大動脈血圧と心拍数の変動について検討した。

#### 材料と方法

##### 供試魚

実験にはコイを 20 個体、体長 (BL)  $302 \pm 21$  mm (平均値  $\pm$  標準偏差)、体重 (BW)  $686 \pm 93$  g を用いた。肥満度 (C) は、 $C = BW \text{ (kg)} / BL^3 \text{ (m)}$  から算出し、 $25 \pm 3$  であった。なお、供試魚の購入先および飼育方法は、第1章第1節、材料と方法—供試魚—と同様である。

##### カニューレション

背大動脈へのカニューレションは、第1章第1節、材料と方法—カニューレション—と同様の方法で行った。手術後のコイを恒暗条件の流水式の呼吸室に移し、実験水温 (WT)  $25.1 \pm 0.1$  °C、呼吸室への流入水量 600~700 ml/min、流入水の酸素分圧 ( $P_{wO_2}$ , mmHg)  $148 \pm 2.5$  mmHg のもとで 24 時間経過させた。術後のカニューラの洗浄は、第2章第1節と同様の方法で行った。

### 失血状態への導入と採血

カニューレシオン 24 時間後 (Control) に背大動脈血圧および血液性状を測定した後、100 IU/ml のヘパリンナトリウム (Nacalai Tesque Inc.) 生理食塩水を含むガラスシリンジで、体重当り 1 % の割合で背大動脈カニューラより採血し、失血状態へ導入した (n=10)。失血導入のため採取した血液を遠心分離 (6000 rpm × 10 分) し、得られた血漿のみを 25.1 ± 0.1 °C で保存した。失血導入 30 分後の背大動脈血圧を測定した後、血漿を背大動脈カニューラを通して再びコイに注入した。カニューラ内に残った血漿を完全に魚体内へ戻すため、10 IU/ml のヘパリンナトリウム生理食塩水を 0.2 ml 注入した。血液性状分析用の血液は、カニューレシオン 24 時間後 (Control)、失血後 30 分 (H-30M: 30 min after hemorrhage)、血漿注入 30 分後 (P-30M: 30 min after plasma re-infusion) の血圧測定を行ってから、100 IU/ml のヘパリンナトリウム (Sigma Chemical Co.) 生理食塩水で死腔の部分を満たしたガラスシリンジで、0.4ml ずつ採取した。失血に導入したコイの対照として、Control の測定終了後に失血状態には導入しないコイ (n=10) から、失血状態のコイの H-30M、P-30M の採血に合わせ、同様に 0.4ml ずつ採血した。

### 血圧と血液性状

背大動脈血圧の測定は、第 1 章第 1 節—心拍数と呼吸数—と同様の方法で行った。背大動脈の平均血圧 (DAP, mmHg) は、第 2 章第 2 節—背大動脈血圧と同様の方法で算出した。心拍数 (HR, beats/min) は記録された血圧波形より算出した。

全血 pH (pHa)、実験水と動脈血酸素分圧 ( $P_{wO_2}$ 、 $P_{aO_2}$ , mmHg)、酸素含量 ( $CaO_2$ , ml/dl)、ヘモグロビン濃度 (Hba, g/dl) および酸素飽和度 ( $SaO_2$ , %) は、第 1 章第 1 節—血液性状—と同様の方法で測定・算出した。

### 統計処理

群間、群内変動の比較には、二元配置、一元配置分散分析法を用い、必要であれば Fisher の最小有意差法による多重比較を行い、 $P < 0.05$  で有意とした。

## 結 果

失血状態に導入しないコイの、H-30M、P-30M の血液性状、HR、DAP は、Control に対し有意に変動しなかった (Table 3-1-1、Fig. 3-1-1A, B)。 $P_{aO_2}$ 、 $SaO_2$ 、pHa は、実験終了時まで安定していた (Table 3-1-1)。失血導入 30 分後の Hba は 7.5g から 5.6 g/dl へ、 $CaO_2$  は

7.4 から 5.3 ml/dl へ有意に低下し、失血に導入していないコイの Hba、CaO<sub>2</sub> より低い値を示した (Table 3-1-1)。失血に導入すると DAP は約 80% にまで低下し、HR は Control の約 200% の頻脈を示し、失血に導入していないコイとの間に著しい有意差が認められた (Fig. 3-1-1A, B)。血漿注入 30 分後の DAP と HR は Control のレベルにまで回復した (Fig. 3-1-1A, B)。

**Table 3-1-1. The effects of hemorrhage and plasma re-infusion in normoxic carp on the arterial blood parameters.**

	Control	n	H-30M	P-30M	n	
[Hba] (g/dl)	7.5 ± 0.5	20 (N) (H)	7.3 ± 0.6 5.6 ± 0.8*†	(N) (P)	7.3 ± 0.6 4.7 ± 1.2*†	10 10
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	29.9 ± 5.2	20 (N) (H)	31.4 ± 4.3 31.7 ± 4.8	(N) (P)	30.2 ± 4.5 32.7 ± 3.8	10 10
CaO <sub>2</sub> (ml/dl)	7.4 ± 0.3	20 (N) (H)	7.2 ± 0.7 5.3 ± 0.9*†	(N) (P)	7.1 ± 0.8 4.5 ± 1.1*†	10 10
SaO <sub>2</sub> (%)	70.2 ± 4.1	20 (N) (H)	69.6 ± 6.4 67.0 ± 9.7	(N) (P)	68.9 ± 7.2 68.2 ± 10.1	10 10
pHa	7.768 ± 0.05	20 (N) (H)	7.761 ± 0.036 7.749 ± 0.047	(N) (P)	7.752 ± 0.049 7.752 ± 0.033	10 10

All values shown are means ± SD.

Control: resting condition; H-30M: 30 minutes after hemorrhage; P-30M: 30 minutes after plasma re-infusion. N: normal. H: hemorrhage. P: plasma re-infusion.

Asterisks indicate significant differences (P<0.05) compared with control values.

Daggers indicate significant differences (P<0.05) compared with corresponding mean values of normal (N).

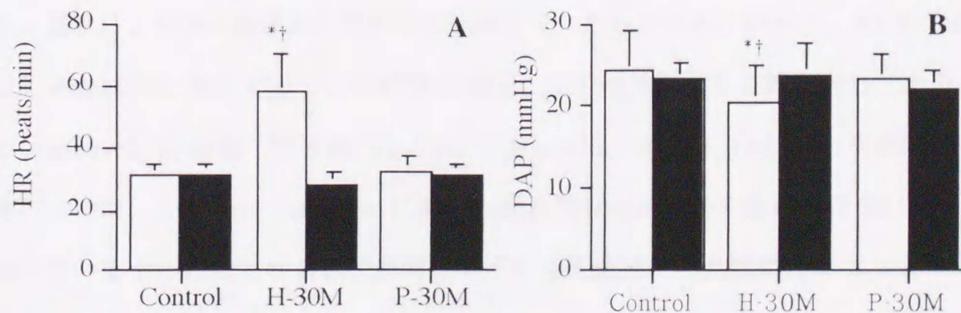


Fig. 3-1-1. The effects of hemorrhage and plasma re-infusion in normoxic carp on the heart rate (HR, A) and dorsal aortic mean blood pressure (DAP, B). Measurements were taken at 24 hr after cannulation (Control), at 30 min after hemorrhage (H-30M) and at 30 min after plasma re-infusion (P-30M). Filled columns: normal carp (n=10); Open columns: hemorrhagic and plasma re-infused carp (n=10). Asterisks indicate statistical differences from the Control mean values (P<0.05). Daggers indicate statistical differences from the corresponding normal fish (P<0.05).

## 考 察

貧血時の動脈血のガス性状についていくつか報告がある。Wood *et al.* (1979b) は、ヌマガレイから連続採血を行い、さらに血漿と生理食塩水の再注入を繰り返して貧血（ヘマトクリット値、1.2～8.2%）に導入すると、動脈血酸素分圧は上昇し、動脈血 pH と酸素含量は低下することを示している（Control のヘマトクリット値、20.3%）。Perry *et al.* (1989) はニジマスを用い、採血と生理的塩類溶液の注入を繰り返し、ヘモグロビン濃度を採血前の約 20%（ヘモグロビン濃度、1.3 g/dl）にまで低下させた時の、動脈血酸素含量の低下と動脈血酸素分圧の上昇を報告している。失血時のコイの場合、貧血時のニジマスやヌマガレイ同様、Hba の低下に伴い、CaO<sub>2</sub> も低下したが、pHa や PaO<sub>2</sub> は有意に変動しなかった。失血時のコイの PaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub> および pHa が失血前に対し顕著に変動しなかったのは、ニジマスやヌマガレイの貧血への導入方法や、貧血の程度が異なるためであろう。コイ失血時の pHa と SaO<sub>2</sub> が有意に変動しなかったことから、動脈血のガス交換の機能や酸塩基平衡は正常に機能していたと考えられる。よって失血時のコイに生じた HR の増加と DAP の低下は、動脈血のガス性状の変動によるものでないことが明らかである。

失血により生じたコイの DAP の低下と HR の増加は、血漿注入後に解消された。血漿注入後の Hba と CaO<sub>2</sub> は血漿注入前に対し低下傾向を示したが、その他の項目は有意に変動しなかったため、血漿注入後の HR と DAP の変動にも、動脈血のガス性状は顕著な影響を及ぼしていないと考えられた。以上の結果から、血漿注入後の血圧および心拍数の回復には、循環体液量の回復が（赤血球分の volume は不足しているものの）重要な働きをしていることが判明した。窒息により背大動脈血圧の上昇と徐脈を呈したニジマスにおいて、0.5%/BW の割合で採血し失血状態に導入すると、心拍数は増加し血圧は低下すると報告されており、baroreceptor と chemoreceptor の相互関連が示唆された（Wood and Shelton, 1980）。失血時および血漿注入後のコイは、normoxic condition にあり、血液性状の結果から赤血球喪失による低酸素血症に陥っていなかったことから、失血時のコイの血圧変動や心拍数変動には chemoreceptor は関与しないと判断される。

以上のことから、体重あたり 1% の割合で採血し、急性の失血状態に導入したコイ成魚で確認された血圧の低下と心拍数の増加は、循環体液量の減少による血圧の低下を、動脈血管壁に存在するであろう機械受容器すなわち圧受容器（baroreceptor, Burlison *et al.*, 1992）が感知し

て、心拍数の変動を引き起こしていると結論される。

## 第2節 急性失血時の血圧調節機構

## 緒言

急性失血時のコイでは血圧変動や心拍数変動に、chemoreceptor よりも baroreceptor が重要な役目を果たすことが示された（第3章第1節）。しかし、急性失血時のコイの血圧がどの様に調節されているのか、その詳細な機構については未だ検討されていない。

血圧を決定する重要な因子の一つに、血管抵抗が挙げられる（Nilsson, 1994）。血管抵抗は、血管収縮や拡張によって決まる（Buslmell *et al.*, 1992）。硬骨魚の内臓動脈の平滑筋に、adrenergic vasomotor fibers の存在が確認されている（Nilsson, 1973; Holmgren and Nilsson, 1974; Holmgren, 1978）。体血管には、アドレナリン性  $\alpha$  受容体とアドレナリン性  $\beta$  受容体が存在し、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する血管収縮機構は、アドレナリン性  $\beta$  受容体を介する血管拡張機構より優位であることが知られている（Wood, 1976; Farrell, 1981; Nilsson and Holmgren, 1985）。

低酸素条件下におけるニホンウナギ、大西洋タラおよび ling cod の体血管抵抗は上昇し、ヨーロッパウナギの体血管抵抗は変化しないことが報告されている（ling cod, Farrell, 1982; ニホンウナギ, Chan, 1986; ヨーロッパウナギ, Peyraud Waitznegger and Soulier, 1989; 大西洋タラ, Fritsche and Nilsson, 1990）。大西洋タラの場合、低酸素条件下の心拍出量は変化しないものの、neural adrenergic tone の働きにより体血管抵抗が上昇し、動脈血圧が上昇すると説明されている（Fritsche and Nilsson, 1990）。運動時では、心拍出量と、動脈血圧は上昇し、体血管抵抗は低下することが観察されている（Randall and Daxboeck, 1982; Axelsson *et al.*, 1989; Axelsson and Fritsche, 1991）。失血時の循環機能調節に関する研究は非常に少なく、ニジマス の背大動脈血圧は失血導入後、あるいはヨヒンビン（アドレナリン性  $\alpha$  受容体遮断剤）注入後に低下することが示された（Wood and Shelton, 1980）。また、厳しい貧血条件下（Ht < 5%）におけるヌマガレイの動脈血酸素分圧は上昇し、動脈血 pH と体血管抵抗は低下することも報告されている（Wood *et al.*, 1979b）。

失血時の血圧変動機構はもとより、失血時の循環機能に及ぼす adrenergic control の役割について詳細に検討した例はない。本節では、失血時の血圧変動機構を解明するため背大動脈血圧、心拍数、血液ガスおよび循環カテコールアミン濃度を測定し、急性失血時のコイ血圧の変動機構と血液の機能について検討した。

## 材料と方法

### 供試魚

実験には、コイを42個体、体長 (BL)  $297 \pm 26$  mm (平均値 $\pm$ 標準偏差)、体重 (BW)  $637 \pm 118$  gを用いた。肥満度 (C) は、 $C = BW \text{ (kg)} / BL^3 \text{ (m)}$  から算出し、 $24 \pm 3$  であった。なお、供試魚の購入先および飼育方法は、第1章第1節、材料と方法—供試魚—と同様である。

### カニューレーション

コイの背大動脈へのカニューレーションは、第1章第1節、材料と方法—カニューレーション—と同様の方法で行った。手術後のコイを恒暗条件の流水式呼吸室に移して、水温 (WT)  $25.1 \pm 0.1$  °C、流入水の酸素分圧 ( $P_{wO_2}$ , mmHg)  $149 \pm 2.1$  mmHg のもとで24時間回復させた。背大動脈カニューラを少なくとも1日に1回生理食塩水で洗浄し、10 IU/ml のヘパリンナトリウム (Nacalai Tesque Inc.) 生理食塩水でカニューラ内を満たした。

### 実験方法

#### Series 1: 心拍数と血圧に及ぼすプレチリウムおよびフェントラミンの作用

adrenergic neuron blocking agent であるプレチリウムや、アドレナリン性  $\alpha$  受容体の遮断剤であるフェントラミンは、心血管系への神経性および液性の adrenergic control を検討する上で有用な chemical tools である (Smith *et al.*, 1985)。一方、プレチリウムやフェントラミンの、adrenergic nerve やアドレナリン性  $\alpha$  受容体以外への非特異的な作用も報告されている (大西洋タラ, Smith *et al.*, 1985)。よって、コイにプレチリウムやフェントラミンを使用する場合にも、それら神経薬の特異的・非特異的な作用を確認する必要がある。

カニューレーション後24時間経過したコイ ( $n=12$ ) に、アドレナリン性  $\alpha$  受容体の遮断剤であるフェントラミン (2 mg/kgBW, Sigma Chemical Co.) を、あるいは adrenergic neuron blocking agent であるプレチリウム (10 mg/kgBW, Reserch Biochemicals Internaltional) を生理食塩水に溶解して pH 7.78 に調整した後、背大動脈カニューラより注入した。カニューラ内に残った各溶液を完全に供試魚内に注入するため、さらに10 IU/ml のヘパリンナトリウム (Nacalai Tesque Inc.) 生理食塩水 0.2 ml を背大動脈カニューラより注入した。心拍数と血圧の測定は、注入前と注入4時間あるいは5時間後まで1時間毎に行った。プレチリウムを注入したコイでは注入24時間後にも測定した。なお、プレチリウムとフェントラミンの投与量は Smith *et al.* (1985) に従った。

Series 2: 心拍数と血圧に及ぼす失血と神経薬の影響

カニューレシオン 24 時間後の背大動脈血圧、血液性状を測定した後、フェントラミン (n=10)、あるいはブレチリウム (n=10) を背大動脈カニューラより注入した。各神経薬の調製と注入の方法は、Series 1 と同様の方法で行った。対照として生理食塩水のみを 0.2 ml/kgBW の割合で背大動脈カニューラより注入した (sham、n=10)。神経薬による作用が安定した後、体重あたり 1 %の割合で採血し失血状態に導入した。なお、神経薬による作用が安定するのに要する時間は、Series 1 の心拍数および血圧変動の結果から判断した。採血は、カニューレシオン 24 時間後 (Control)、失血直前 (Pre-H: pre-hemorrhage)、失血状態導入 1 時間後 (H-1H: 1 hr after hemorrhage) および失血導入 4 時間後 (H-4H: 4 hr after hemorrhage) に背大動脈血圧を測定後、それぞれ 0.1%/BW の割合で行った。全ての採血は、100 IU/ml のヘパリンリチウム (Sigma Chemical Co.) 生理食塩水で死腔の部分を満たしたガラスシリンジで行った。

**血圧および血液性状**

背大動脈血圧の測定と心拍数 (HR、beats/min) の算出方法は、第 1 章第 1 節、材料と方法—心拍数と呼吸数—と同様である。また、背大動脈の平均血圧 (DAP、mmHg) は、第 2 章第 2 節、材料と方法—背大動脈血圧—に従った。全血 pH (pHa)、実験水と動脈血酸素分圧 ( $P_{wO_2}$ 、 $P_{aO_2}$ 、mmHg)、酸素含量 ( $CaO_2$ 、ml/dl)、全炭酸含量 ( $TaCO_2$ 、mM/l)、ヘモグロビン濃度 (Hba、g/dl)、酸素飽和度 ( $SaO_2$ 、%)、二酸化炭素分圧 ( $PaCO_2$ 、mmHg) およびアドレナリンとノルアドレナリン濃度 (ADR, NOR、nM/l) は、第 1 章第 1 節、材料と方法—血液性状—と同様の方法で測定・算出した。

**統計処理**

全てのデータを、平均値±標準偏差で表した。各測定値の群間、群内の比較には二元配置分散分析法、繰り返しのある一元配置分散分析法を用いた。必要であれば分散分析法の後、Fisher の最小有意差法を用い多重比較を行った。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

**結 果****Series 1.**

ブレチリウム注入後の HR は一時的に増加したが、24 時間後の HR は注入前と有意な差が認められなかった (Fig. 3-2-1A)。ブレチリウム注入後の DAP は徐々に低下し、24 時間後に

は注入前の約 70%にまで有意に低下した (Fig. 3-2-1B)。フェントラミン注入後、DAP は低下し HR は増加したが、5 時間後の HR は注入前のレベルにまで減少した (Fig. 3-2-1C, D)。

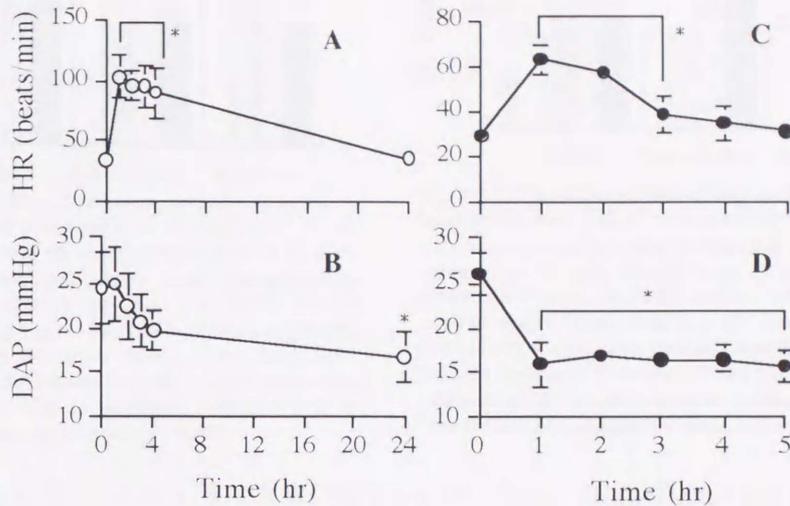


Fig. 3-2-1. The effect of bretylium (n=7, open circles) and phentolamine (n=5, solid circles) injected into carp on heart rate (HR, A and C) and dorsal aortic mean blood pressure (DAP, B and D). Values shown are means  $\pm$  SD. Asterisks indicate statistical significances from the mean values at 0 hr ( $P < 0.05$ ).

Series 2.

フェントラミンを注入して5時間後、あるいはプレチリウムを注入して24時間後の血液性状、すなわち Pre-H の血液性状は、各溶液注入前に対し有意な変動を示さなかった (Table 3-2-1)。神経薬を注入したコイの Pre-H の血液性状は、sham に対し有意な変動を示さなかった (Table 3-2-1)。コイを失血状態に導入すると、H-4H では Hba が約 5.5 g/dl にまで有意に低下した (Table 3-2-1)。

Table 3-2-1. The effects of hemorrhage and chemicals on the arterial blood parameters in normoxic carp.

		Control	Pre - H	H-4H
[Hba] (g/dl)	Sal.	7.8 $\pm$ 1.4	7.7 $\pm$ 1.2	5.7 $\pm$ 0.9*
	Phe.	7.6 $\pm$ 1.0	7.6 $\pm$ 0.9	5.3 $\pm$ 0.7*
	Bre.	7.8 $\pm$ 1.3	7.7 $\pm$ 1.2	5.4 $\pm$ 1.3*
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	Sal.	29.7 $\pm$ 5.4	31.8 $\pm$ 3.9	28.5 $\pm$ 7.6
	Phe.	29.1 $\pm$ 8.9	29.4 $\pm$ 9.0	30.8 $\pm$ 5.6
	Bre.	28.5 $\pm$ 7.7	26.6 $\pm$ 11.5	30.6 $\pm$ 3.6
CaO <sub>2</sub> (ml/dl)	Sal.	8.4 $\pm$ 1.9	8.2 $\pm$ 1.5	6.5 $\pm$ 1.34*
	Phe.	7.9 $\pm$ 1.4	7.8 $\pm$ 1.1	5.8 $\pm$ 0.80*
	Bre.	7.6 $\pm$ 0.8	7.4 $\pm$ 0.8	5.7 $\pm$ 1.08*
SaO <sub>2</sub> (%)	Sal.	75.9 $\pm$ 9.9	74.1 $\pm$ 8.7	78.6 $\pm$ 10.6
	Phe.	73.9 $\pm$ 10.4	72.2 $\pm$ 14.0	77.0 $\pm$ 6.3
	Bre.	69.4 $\pm$ 8.7	69.3 $\pm$ 7.4	78.4 $\pm$ 17.1
pHa	Sal.	7.810 $\pm$ 0.050	7.800 $\pm$ 0.051	7.787 $\pm$ 0.031
	Phe.	7.793 $\pm$ 0.068	7.792 $\pm$ 0.056	7.768 $\pm$ 0.057
	Bre.	7.804 $\pm$ 0.054	7.763 $\pm$ 0.098	7.797 $\pm$ 0.051
TaCO <sub>2</sub> (mM/l)	Sal.	12.1 $\pm$ 3.0	12.0 $\pm$ 2.5	11.1 $\pm$ 1.9
	Phe.	11.1 $\pm$ 2.9	11.1 $\pm$ 2.1	10.7 $\pm$ 2.0
	Bre.	11.0 $\pm$ 1.7	11.2 $\pm$ 1.1	10.6 $\pm$ 1.3
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	Sal.	4.3 $\pm$ 0.9	4.4 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.7
	Phe.	4.0 $\pm$ 1.0	4.2 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 0.8
	Bre.	4.0 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 1.1	3.9 $\pm$ 0.6

All values shown are means  $\pm$  SD  
 Pre-H: pre-hemorrhage; H-4H: 4 hours after hemorrhage.  
 Sal.: saline injection (n=10); Phe.: phentolamine injection (n=10).  
 Bre.: bretylium injection (n=10)  
 Asterisks indicate significant differences compared with control values ( $P < 0.01$ ).

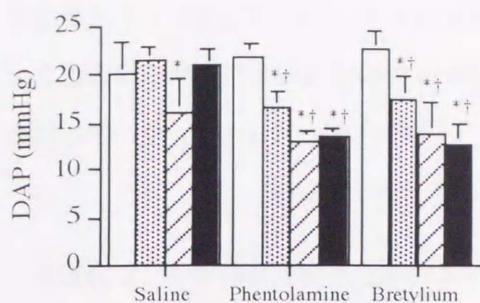


Fig. 3-2-2. The effect of hemorrhage and chemicals on dorsal aortic mean blood pressure of carp. DAP of carp administrated chemicals were measured at 24 hr after cannulation (Control, open columns, n=10), pre-hemorrhage (Pre-H, stippled columns, n=10), at 1 hr (H-1H, hatched columns, n=10) and 4 hr (H-4H, filled columns, n=10) after hemorrhage. Data shown are means  $\pm$  SD. Asterisks indicate statistical differences from the Control mean values ( $P < 0.01$ ). Daggers indicate statistical differences from the corresponding saline mean values ( $P < 0.01$ ).

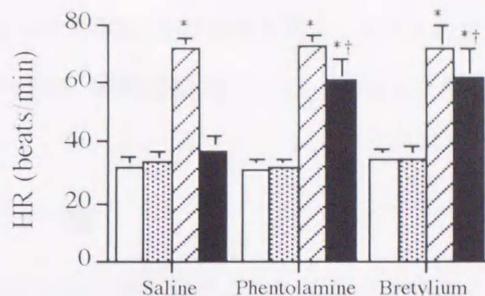


Fig. 3-2-3. The effect of hemorrhage and chemicals on heart rate of carp. HR of carp administrated chemicals were measured at 24 hr after cannulation (Control, open columns, n=10), pre-hemorrhage (Pre-H, stippled columns, n=10), at 1 hr (H-1H, hatched columns, n=10) and 4 hr (H-4H, filled columns, n=10) after hemorrhage. Data shown are means  $\pm$  standard deviation. Asterisks indicate statistical differences from the Control mean values ( $P < 0.01$ ). Daggers indicate statistical differences from the corresponding saline mean values ( $P < 0.01$ ).

CaO<sub>2</sub>はH-4Hに約6 ml/dlにまで有意に低下したが、PaO<sub>2</sub>、pHa、TaCO<sub>2</sub>およびPaCO<sub>2</sub>は有意に変動しなかった (Table 3-2-1)。また、血液ガス性状への神経薬による影響は認められなかった。

生理食塩水を注入したコイのDAPは、H-1HでControlの約80%にまで低下したが、H-4HではControlの値にまで回復した (Fig. 3-2-2)。それに対し、神経薬処理をしたコイのDAPは、Pre-HにControlの約65%にまで、H-1HでControlの約50%にまで低下し、その後DAPの回復は認められなかった (Fig. 3-2-2)。また、神経薬処理をしたコイのDAPは、生理食塩水を注入したコイのDAPに対し、有意に低い値を示した (Fig. 3-2-2)。フェントラミン、あるいはブレチリウムを注入したコイの失血時のDAPの間に、有意な差は認められなかった (Fig. 3-2-2)。

NORとADRは、ControlからH-4Hまで有意な変動をしなかった (Table 3-2-2)。フェントラミン、あるいはブレチリウムを注入したコイの、Pre-HのHRはcontrolに対し有意な変動を

**Table 3-2-2. The effects of hemorrhage and chemicals on the plasma catecholamine levels in normoxic carp .**

		Control	Pre - H	H-1H	H-4H
[NOR] (nM/l)	Sal.	1.53 $\pm$ 0.56	1.23 $\pm$ 0.43	1.84 $\pm$ 1.15	1.57 $\pm$ 0.37
	Phe.	1.54 $\pm$ 0.54	1.65 $\pm$ 0.59	1.81 $\pm$ 0.76	1.41 $\pm$ 0.53
	Bre.	2.17 $\pm$ 0.94	1.59 $\pm$ 0.86	1.49 $\pm$ 0.86	1.52 $\pm$ 0.86
[ADR] (nM/l)	Sal.	1.45 $\pm$ 0.39	1.50 $\pm$ 0.70	2.05 $\pm$ 0.87	2.03 $\pm$ 0.99
	Phe.	1.77 $\pm$ 0.82	1.88 $\pm$ 1.00	2.03 $\pm$ 0.96	1.78 $\pm$ 0.99
	Bre.	1.71 $\pm$ 0.84	1.97 $\pm$ 1.24	1.92 $\pm$ 0.92	1.85 $\pm$ 0.96

All values shown are means  $\pm$  SD.

Pre-H: pre-hemorrhage; H-1H: 1 hour after homorrhage; H-4H: 4 hours after hemorrhage.

Sal.: saline injection (n=10); Phe.: phentolamine injection (n=10); Bre.: bretylium injection (n=10).

示さなかった (Fig. 3-2-3.)。H-1H の HR は Control の約 2 倍の頻脈を示し、H-4H の生理食塩水を注入したコイの HR は Control の値に近づいたが、神経薬処理したコイの HR は依然頻脈を維持していた (Fig. 3-2-3)。

## 考 察

本研究は、安静時と急性失血時のコイ背大動脈の血圧調節機構について焦点をあてた。プレチリウムは、交感神経終末からのカテコールアミン放出を阻害する adrenergic neuron blocking agent である (Boura *et al.*, 1961; Boura and Green, 1965)。Smith *et al.* (1985) は、大西洋タラの灌流心臓標本を用い、プレチリウムの adrenergic nerve 以外への非特異的な作用、すなわち副交感神経活動への抑制作用と、フェントラミンの心拍動へ与える非特異的な作用を併せて報告している。さらに、大西洋タラにプレチリウムあるいはフェントラミンを注入し、それぞれ 24 時間あるいは 5 時間経過させると、各神経薬の非特異的な作用が消失することも報告している (Smith *et al.*, 1985)。本実験に用いたコイの場合、神経薬注入後に心拍数の増加が確認されたことから、プレチリウムとフェントラミンには、心拍数を増加させる様な非特異的な作用が存在することが確認された。コイの場合、プレチリウムによる非特異的な作用は、大西洋タラと同様、プレチリウムが副交感神経の心拍動抑制作用を阻害したためであろう。フェントラミン注入 5 時間後、あるいはプレチリウム注入 24 時間後のコイの HR は、注入前のレベルにまで減少し、DAP は注入前に対し有意に低下していたことから、プレチリウムを注入後約 24 時間、フェントラミン注入後約 5 時間経過すると、各神経薬の非特異的な作用は消失し、特異的な作用が十分に安定することが判明した。これらの結果をふまえ、Series 2 では、コイをプレチリウム注入後 24 時間、あるいはフェントラミン注入後 5 時間経過させ、失血前と失血後の循環機能の測定を行った。Series 2 のフェントラミンあるいはプレチリウムを注入したコイの Pre-H の HR は Control に対して、また、生理食塩水を注入したコイに対して有意差が認められなかった。よって、Pre-H 以降の HR 変動は、各神経薬の非特異的な作用によるものではないといえる。

Control の DAP、HR、そして血液性状は、第 1 章第 2 節で確認されたコイ安静時の値と一致した。よって、Control のコイは安静状態にあったといえる。Pre-H の血液性状は Control に対し有意な変動をしなかったため、プレチリウムとフェントラミンは Pre-H の血液性状に顕著な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

ブレチリウムあるいはフェントラミンを注入したコイの Pre-H の DAP 低下から、安静時の背大動脈血圧の維持に、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する adrenergic control が関与していることは明らかである。フェントラミンは血管にある交感神経シナプス末端のアドレナリン性  $\alpha$  受容体と、シナプス外の血管内腔に近い部位に存在するアドレナリン性  $\alpha$  受容体を遮断する (Smith *et al.*, 1985)。アドレナリン性  $\alpha$  受容体を遮断した時と交感神経の機能を阻害した時の DAP が同じレベルであることから、コイ血管への adrenergic control は、液性よりも神経性の方がメインであると考えられる。安静時のコイ血圧の維持に neural adrenergic control が大きく貢献していることは、ニジマス (Smith, 1978) と大西洋タラ (Smith *et al.*, 1985; Axelsson and Nilsson, 1986) の結果と一致する。

ヌマガレイを貧血 ( $Ht \leq 1 \sim 8\%$ ) に導入すると、動脈血の酸素含量と pH は低下し、酸素分圧は上昇する (Wood *et al.*, 1979b)。ニジマスでは、貧血状態 ( $Ht \leq 5\%$ ) で、動脈血酸素含量は低下し、酸素分圧は上昇すると報告されている (Perry *et al.*, 1989)。本実験に供試したコイの場合、ヌマガレイやニジマス同様、失血時に  $CaO_2$  の低下が確認された。失血時のコイの  $PaO_2$  と pHa がほぼ Control のレベルであったのは、ヌマガレイやニジマスで行われた貧血条件が本実験の失血条件と異なっていることや、ヘモグロビン喪失の程度も本実験よりも大きかったことに起因するのであろう。これらのことから急性失血時には Hba の低下と共に  $CaO_2$  は低下するものの、コイ動脈血のガス交換の機能は顕著な障害を受けていなかったと判断される。よって、失血時に生じた DAP や HR の変動は ( $O_2$ ,  $CO_2$ ,  $H^+$  sensitive) chemoreceptor を介しておらず、循環体液量の減少が招く baroreceptor を介した現象であると考えられる (第3章第1節)。

sham での DAP は、H-1H で低下し、H-4H では安静時のレベルにまで回復した。それに対し、フェントラミンあるいはブレチリウムを注入したコイの DAP が、H-4H に至っても依然 hypotension を示したのは、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する神経性の adrenergic control が阻害されたことに起因すると考えられる。これらのことから、失血時の血圧の回復にはアドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する交感神経系の働きが重要であると考えられる。

ニジマスのヘマトクリット値が5%以下、また、ヘモグロビン濃度が2 g/d以下となるような貧血状態において、NOR と ADR はそれぞれ約 5~15 nM/l と 100~200 nM/l に上昇し (Perry *et al.*, 1989)、また、連続採血によりニジマスのヘマトクリット値が約6%にまで低

下した時の NOR と ADR は、それぞれ約 20, 26 nM/l にまで上昇した (Iwama *et al.*, 1987)。本節において、NOR と ADR は H-4H まで有意に変動せず (1~4 nM/l)、ニジマス失血時に確認されたレベルに対し著しく低い。循環カテコールアミンは、動脈血酸素飽和度の低下や動脈血 pH の低下により上昇すると報告されている (Randall and Perry, 1992)。コイ失血時の NOR と ADR が顕著に増加しなかったのは、 $\text{SaO}_2$  や pH<sub>a</sub> が失血時に顕著に低下しなかったためであろう。よって、安静時や失血時の血管への humoral adrenergic control は、ほとんど無いもしくは微弱であると考えられる。

生理食塩水を注入したコイの HR、DAP の変動から、失血時の頻脈は、DAP の回復と共に徐々に解消されると考えられる。このことは、フェントラミンあるいはプレチリウムを注入したコイにおいては、失血時の血圧回復がなされず頻脈が持続したことからも理解される。失血時や貧血時の頻脈はニジマスやヌマガレイでも確認されており (Wood and Shelton, 1980; Wood *et al.*, 1979b, c)、貧血時のニジマスの頻脈は心臓への迷走神経の緊張が弱まったためと考えられている (Wood *et al.*, 1979c)。また、H-1H の HR は、生理食塩水、フェントラミン、プレチリウムを注入したコイの間で有意な差が認められなかった。これらのことから、失血時の心拍数変動にはアドレナリン性  $\alpha$  受容体や交感神経系が直接関与しておらず、血圧変動を baroreceptor が感知し、迷走神経やアドレナリン性  $\beta$  受容体を介する液性の心拍数調節機構により調節されていると考えられる。

### 第3節 急性失血時の心拍動調節機構

#### 緒言

窒息時や運動時の心拍数変動に関する研究は多数みられ、急性窒息時のコイの徐脈は cholinergic tonus と adrenergic tonus の双方が増強されることにより決定されることが示されている（第2章第1節）。

失血時あるいは貧血時の心拍数調節に関する報告は数少ない。貧血状態（Hb  $\leq$  5.9 or 3.7 g/dl）の pinfish の心拍数は増加するが、酸素消費量はほとんど変わらないことが報告されている（Cameron and Wohlschlag, 1969）。貧血時（Ht  $\leq$  6 %）のニジマスの心拍数が増加するのは、cholinergic tone が弱くなった（removal of cholinergic tone）ためであり、貧血時の心拍動へのアドレナリン性の寄与は小さいと報告されている（Wood *et al.*, 1979c）。また、窒息により徐脈を呈したニジマスを失血状態に導入すると、心拍数は増加することから、chemoreceptor と baroreceptor の関与が示唆されている（Wood and Shelton, 1980）。

魚種や、失血あるいは貧血条件の違いにより、心拍数の変動傾向は異なるが、失血時の心拍動の変動機構について詳細に検討した例はない。これまでに、急性失血状態のコイでは、baroreceptor が血圧の低下を感知し、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する交感神経系の働きにより、失血時の血圧低下が改善されることを明らかにした（第3章第1節、2節）。しかし、急性失血時に確認されたコイの頻脈が、どのような機構によって引き起こされるのか、また、失血時の頻脈が解消される機構については未だ説明されていない。本節では、急性失血時のコイ心臓への cholinergic control と adrenergic control による心拍動の変動機構を解明することを目的とし、そのときの血液の性状についても併せて検討した。

#### 材料と方法

##### 供試魚

実験には、コイを 40 個体、体長（BL） $286 \pm 23$  mm（平均値  $\pm$  標準偏差）、体重（BW） $599 \pm 104$  g を用いた。肥満度（C）は、 $C = BW$  (kg) /  $BL^3$  (m) から算出し、 $26 \pm 4$  であった。なお、供試魚の購入先および飼育方法は、第1章第1節、材料と方法—供試魚—と同様である。

##### カニューレーション

コイの背大動脈へのカニューレーションは、第1章第1節、材料と方法—カニューレーション—

と同様の方法で行った。手術後のコイを恒暗条件の流水式呼吸室に移して、水温 (WT)  $25.1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、流入水の酸素分圧 ( $\text{PwO}_2$ , mmHg)  $150.1 \pm 2.5$  mmHg のもとで24時間回復させた。背大動脈カニューラは、少なくとも1日に1回生理食塩水で洗浄し、10 IU/ml のヘパリンナトリウム (Nacalai Tesque Inc.) 生理食塩水でカニューラ内を満たした。

### 実験方法

カニューレーション24時間後の背大動脈血圧と血液性状を測定した後、体重あたり1%の割合で採血し、失血状態に導入した。失血時の心臓への adrenergic control、cholinergic control を検討するため、アドレナリン性  $\beta$  受容体の遮断剤であるプロプラノロールとムスカリン性アセチルコリン受容体の遮断剤であるアトロピンを用いた。なお、各神経薬の投与量と注入方法は、第2章第1節、材料と方法—実験状態—に従った。失血導入15分後の背大動脈血圧、心拍数および血液性状を測定した後、20個体のコイにプロプラノロールを、他の20個体のコイに生理食塩水を注入した。プロプラノロールあるいは生理食塩水を注入したコイ10個体ずつに、アトロピンを失血導入2時間後に注入し、残りのコイ20個体に生理食塩水を注入した。なお、投与量および注入方法は、第2章第1節、材料と方法—実験状態—と同様である。失血導入15分後と2時間後に生理食塩水を注入したコイ10個体は、他の30個体のコイの対照とした。失血2.5時間後と4時間後に、背大動脈血圧、心拍数および血液性状を測定した。血液性状分析のための血液は、カニューレーション24時間後 (Control)、失血導入15分後 (H-15M: 15 min after hemorrhage) および失血4時間後 (H-4H: 4 hr after hemorrhage) に体重 kg あたり 0.1 % ずつ採取して、血液ガスと循環カテコールアミン濃度を測定した。また、循環カテコールアミン濃度は失血2.5時間後 (H-2.5H) にも測定した。全ての採血は、100 IU/ml のヘパリンリチウム (Sigma Chemical Co.) 生理食塩水で死腔の部分を満たしたガラスシリンジで行った。

### 血圧および血液性状

背大動脈血圧の測定と心拍数 (HR, beats/min) の算出方法は、第1章第1節、材料と方法—心拍数と呼吸数—と同様の方法で行った。また、背大動脈の平均血圧 (DAP, mmHg) は、第2章第2節、材料と方法—背大動脈血圧—に従い算出した。全血 pH (pHa)、実験水および動脈血酸素分圧 ( $\text{PwO}_2$ 、 $\text{PaO}_2$ 、mmHg)、酸素含量 ( $\text{CaO}_2$ 、ml/dl)、全炭酸含量 ( $\text{TaCO}_2$ 、mM/l)、ヘモグロビン濃度 (Hba、g/dl)、酸素飽和度 ( $\text{SaO}_2$ 、%)、二酸化炭素分圧 ( $\text{PaCO}_2$ 、mmHg) およびアドレナリンとノルアドレナリン濃度 (ADR, NOR, nM/l) は、第1章第1節、

材料と方法—血液性状—と同様の方法で測定・算出した。

統計と計算

全てのデータを、平均値±標準偏差で表した。各パラメーターの群間、群内比較には、二元配置分散分析法、繰り返しのある一元配置分散分析法を用い、必要であれば Fisher の最小有意差法を用い多重比較を行った。有意水準は P<5 % とした。

失血時の心臓への adrenergic、cholinergic tonus の算出には、Cameron (1979) を参考にし、生理食塩水のみを注入したコイの心拍数とプロプラノロールのみを注入した時の心拍数差、およびプロプラノロールを注入した時の心拍数とプロプラノロールとアトロピンを注入したコイの心拍数差から、失血時の adrenergic、cholinergic tonus を算出した。

結 果

体重あたり 1% の割合で採血し失血状態に導入すると、Hba と CaO<sub>2</sub> は Control の約 70% にまで有意に低下した (Table 3-3-1)。PaO<sub>2</sub>、SaO<sub>2</sub>、pHa、TaCO<sub>2</sub>、PaCO<sub>2</sub> は失血導入 4 時間後まで有意な変動をしなかった (Table 3-3-1)。

HR は、Control で約 30 回/分を示したが、失血に導入すると H-15M では、どのグループのコイも Control 時の約 2 倍の頻脈を呈した (Fig. 3-3-1)。生理食塩水のみを注入したコイの失血時の HR は徐々に減少し、H-4H ではほぼ Control の HR にまで回復

Table 3-3-1. The effects of hemorrhage and chemical on the arterial blood parameters in normoxic carp.

		Rest	H-15M	H-4H
[Hba] (g/dl)	Pro.	9.2 ± 2.3	5.9 ± 1.5*	5.5 ± 1.3*
	Atr.	8.5 ± 1.6	5.9 ± 1.4*	5.0 ± 1.3*
	Pro.+Atr.	8.9 ± 2.0	5.8 ± 1.6*	5.0 ± 1.4*
	Sal.	8.7 ± 1.8	5.7 ± 1.8*	5.5 ± 1.0*
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	Pro.	30.6 ± 8.4	32.1 ± 5.2	28 ± 4.7
	Atr.	32.4 ± 8.3	32.6 ± 6.1	30.1 ± 4.2
	Pro.+Atr.	31.8 ± 9.2	31.5 ± 4.9	31.4 ± 5.1
	Sal.	30.3 ± 5.7	30.6 ± 5.7	30.4 ± 5.7
CaO <sub>2</sub> (ml/dl)	Pro.	8.5 ± 1.1	5.7 ± 1.0*	5.4 ± 1.0*
	Atr.	8.2 ± 0.8	5.9 ± 0.6*	5.7 ± 0.4*
	Pro.+Atr.	8.4 ± 0.9	5.7 ± 0.9*	4.7 ± 1.4*
	Sal.	8.3 ± 0.9	5.6 ± 1.1*	5.4 ± 1.1*
SaO <sub>2</sub> (%)	Pro.	67.0 ± 7.1	69.2 ± 6.4	70.0 ± 5.5
	Atr.	69.0 ± 5.4	72.1 ± 7.1	75.1 ± 5.8
	Pro.+Atr.	67.9 ± 6.4	70.9 ± 8.0	66.5 ± 10.6
	Sal.	68.3 ± 5.7	70.2 ± 7.5	69.3 ± 7.6
pHa	Pro.	7.773 ± 0.066	7.773 ± 0.045	7.775 ± 0.046
	Atr.	7.768 ± 0.047	7.764 ± 0.039	7.756 ± 0.045
	Pro.+Atr.	7.791 ± 0.050	7.789 ± 0.045	7.768 ± 0.033
	Sal.	7.759 ± 0.051	7.755 ± 0.056	7.753 ± 0.046
TaCO <sub>2</sub> (mM/l)	Pro.	10.7 ± 1.1	11.0 ± 0.8	11.2 ± 1.0
	Atr.	11.3 ± 1.9	11.1 ± 1.4	11.0 ± 1.1
	Pro.+Atr.	10.5 ± 1.3	10.6 ± 0.7	10.6 ± 1.1
	Sal.	10.6 ± 1.4	11.8 ± 1.8	11.4 ± 2.8
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	Pro.	4.2 ± 0.8	4.2 ± 0.5	4.3 ± 0.6
	Atr.	4.4 ± 0.6	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.5
	Pro.+Atr.	3.9 ± 0.9	4.0 ± 0.6	4.2 ± 0.8
	Sal.	4.3 ± 1.1	4.8 ± 1.1	4.6 ± 1.0

All values shown are means ± SD.  
 H-15M: 15 minutes after hemorrhage; H-4H: 4 hours after hemorrhage.  
 Pro.: Propranolol injection (n=10); Atr.: Atropine injection (n=10).  
 Pro.+Atr.: Propranolol + Atropine injection (n=10); Sal.: Saline injection (n=10).  
 Asterisks indicate significant differences compared to control values (P<0.01).

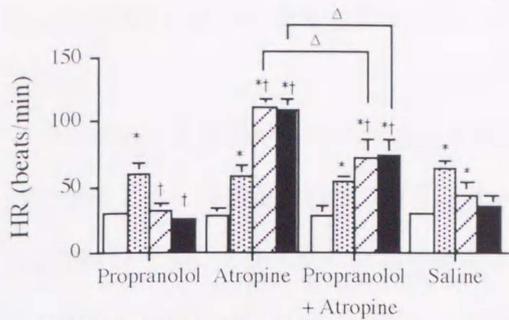


Fig. 3-3-1. The effects of hemorrhage and chemicals on heart rate of carp. Measurements were taken for carp under the administration of chemicals before hemorrhage (Control, open columns, n=10), at 15 min after hemorrhage (H-15M, stippled columns, n=10), 2.5 hr (H-2.5H, hatched columns, n=10) and 4 hr (H-4H, filled columns, n=10) after hemorrhage. Data shown are means  $\pm$  SD. Asterisks indicate the statistical differences from the Control mean values. Daggers indicate the mean values significantly different from the corresponding saline mean values. Open triangles indicate the statistical differences ( $P < 0.05$ ).

した (Fig. 3-3-1)。失血により頻脈を呈しているコイにアトロピンを注入すると、H-2.5H、H-4H の HR は、Control の約 4 倍の頻脈となったが、プロプラノロールのみを注入したコイでは、頻脈が解消され、H-2.5H、H-4H では Control の HR にまで減少した (Fig. 3-3-1)。また、プロプラノロールあるいはアトロピンを注入したコイの H-2.5H、H-4H の HR は、生理食塩水のみを注入したコイの HR に対し有意な差が認められた (Fig. 3-3-1)。プロプラノロールとアトロピンを注入したコイの HR は、H-2.5H、H-4H で Control の 2.6 倍にまで増加したが、アトロピンのみを注入したコイの H-2.5H、H-4H における HR よりも有意に低く、また、sham あるいはプロプラノロールのみを注入したコイの HR よりも有意に高い値を示した (Fig. 3-3-1)。

DAP は、Control で約 20 mmHg 付近であったが、失血に導入すると H-15M では Control 時の約 80% にまで低下した (Fig. 3-3-2)。プロプラノロールを注入したコイと sham の DAP は、徐々に上昇し、H-4H ではほぼ Control の DAP にまで回復した (Fig. 3-3-2)。それに対し、プロプラノロールとアトロピン双方を注入したコイの失血時の DAP は、H-2.5H、H-4H において

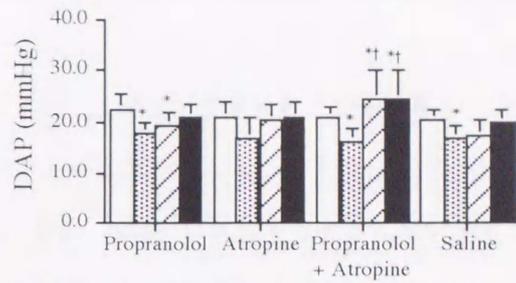


Fig. 3-3-2. The effect of hemorrhage and chemicals on dorsal aortic mean blood pressure (DAP) of carp. Measurements were taken for carp under the administration of chemicals before hemorrhage (Control, open columns, n=10), at 15 min after hemorrhage (H-15M, stippled columns, n=10), 2.5 hr (H-2.5H, hatched columns, n=10) and 4 hr (H-4H, filled columns, n=10) after hemorrhage. Data shown are means  $\pm$  SD. Asterisks indicate the statistical differences from the Control mean values. Daggers indicate the mean values significantly different from the corresponding saline mean values ( $P < 0.05$ ).

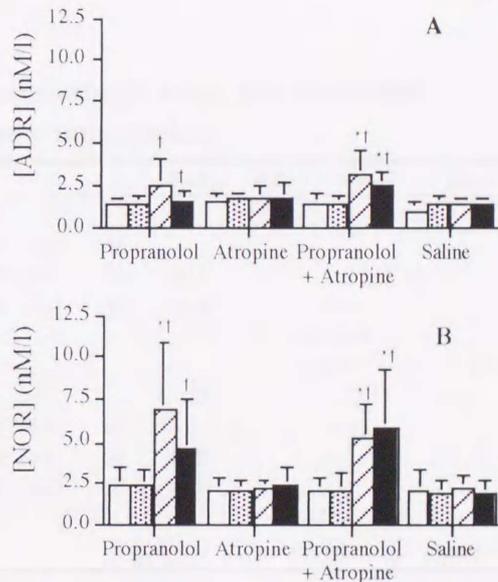


Fig. 3-3-3. The effects of hemorrhage and chemicals on plasma adrenaline and noradrenaline concentrations of carp under the administration of chemicals, (A) plasma adrenaline concentrations ([ADR]) and (B) plasma noradrenaline concentrations ([NOR]) before hemorrhage (Control, open columns, n=10), at 15 min after hemorrhage (H-15M, stippled columns, n=10), 2.5 hr (H-2.5H, hatched columns, n=10) and 4 hr (H-4H, filled columns, n=10) after hemorrhage with chemicals treated. Data shown are means  $\pm$  SD. Asterisks indicate statistical differences from the Control mean values. Daggers indicate mean value significantly different from the corresponding saline mean values ( $P < 0.05$ ).

Control の約 110 %にまで上昇し、他のグループの DAP に対し有意に高い値を示した (Fig. 3-2)。

アトロピンを注入したコイと sham の NOR と ADR は、H-4H まで有意に変動しなかったが、プロプラノロールあるいはプロプラノロールとアトロピンを注入したコイの NOR と ADR は、H-2.5H と H-4H で注入前に対し有意に上昇し、また、sham に対しても有意に高い濃度を示した (Fig. 3-3-3)。

H-2.5H の心臓への cholinergic tonus と adrenergic tonus を、プロプラノロールとアトロピンを注入したコイの心拍数に対する相対値で表すと、各々 57.8 %と 42.2 %となり、その比は 1 : 0.7 であった。同様に H-4H の cholinergic tonus と adrenergic tonus は、各々 65.4 %と 14.5 %となり、その比は 1 : 0.2 であった (Table 3-3-2)。

**Table 3-3-2. Heart rate (beats/min) of hemorrhagic carp, and calculated cholinergic and adrenergic tonus ratios.**

	Mean	S.D.	n	Change	Relative Value	Ratio
at 2.5 hours after hemorrhage						
(Hemorrhage) +Saline	62.8 ± 7.8		10			
(Hemorrhage) +Propranolol	31.0 ± 8.8		10	31.0		
(Hemorrhage+Propranolol) +Atropine	73.4 ± 12.2		10	42.4		
Adrenergic tonus					42.2%	
Cholinergic tonus					57.8%	1:0.7
at 4 hours after hemorrhage						
(Hemorrhage) +Saline	36.8 ± 8.4		10			
(Hemorrhage) +Propranolol	25.9 ± 4.2		10	10.9		
(Hemorrhage+Propranolol) +Atropine	74.9 ± 10.7		10	49.0		
Adrenergic tonus					14.5%	
Cholinergic tonus					65.4%	1:0.2

Values shown are means ± SD.

## 考 察

失血時のコイの hypotension の回復にはアドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する交感神経系の機能が重要であることを示した (第3章第2節)。しかし、急性失血時の心拍数変動機構について詳細な検討がなされていない。本研究では、急性失血時の心拍数変動機構について検討した。

Control の DAP、HR および血液性状は、第1章第2節で示されたコイ安静時の値と一致した。よって、Control のコイは、安静状態にあったといえる。

コイを失血状態に導入すると、貧血状態のヌマガレイやニジマス同様、Hba の減少に伴い  $\text{CaO}_2$  も低下したが、ヌマガレイやニジマスの様な動脈血酸素分圧の上昇、あるいは動脈血 pH の低下 (ヌマガレイ, Wood *et al.*, 1979b; ニジマス, Perry *et al.*, 1989) は認められなかった。

コイの  $\text{PaO}_2$  や  $\text{pHa}$  が有意に変動しなかったのは、ヌマガレイやニジマスで行われた貧血条件よりも、本実験条件の方が苛酷でなかったことに起因するかもしれない（ヌマガレイ,  $\text{Ht} < 8\%$ ; rainbow trout,  $\text{Ht} < 5\%$ ）。H-15Mのコイ動脈血の  $\text{PaO}_2$ 、 $\text{SaO}_2$ 、 $\text{TaCO}_2$ 、 $\text{pHa}$  および  $\text{PaCO}_2$  は、失血前是对し有意に変動をしなかったことから、動脈血のガス交換の機能は顕著な障害を受けていなかったことがうかがえる。また、血液ガスや Hba に及ぼす神経薬の影響は、control から H-4H まで確認できなかったことから、今回観察された心拍数や血圧の変動は、動脈血のガス性状や Hba に顕著な影響を受けないと判断された。

生理食塩水のみを注入したコイの失血時の頻脈は、循環体液量の喪失によってもたらされる DAP の低下（第3章第1節）が解消されるのに伴い回復した。失血時のコイにアトロピンを注入すると、さらに HR は増加することから、コイは失血時に頻脈を呈しているも、迷走神経による心拍動抑制作用が存在していることが明らかである。また、その頻脈は少なくとも H-4H まで持続することから、失血時に生じた頻脈を解消するには迷走神経活動 (vagal cholinergic activity) による心拍動抑制作用が必要であると理解される。貧血により頻脈を呈したニジマスにアトロピンを注入しても、心拍数は有意に増加しなかった (Wood *et al.*, 1979c)。しかし、貧血時のニジマスが呈した頻脈のレベルは、貧血導入前にアトロピンを注入したときの頻脈のレベルとほぼ同じであったという結果から、ニジマス貧血時の頻脈は、cholinergic tonus が弱まったためであると考えられている (Wood *et al.*, 1979c)。失血状態のコイと、貧血状態のニジマスの心拍数調節は異なるものの、失血時の心拍数調節に cholinergic control が関与するという点では一致する。

プロプラノロールを注入したコイあるいはプロプラノロールとアトロピンを注入したコイの HR 変動から、失血時の心拍数調節に adrenergic control が関与していることが明らかである。プロプラノロールあるいはプロプラノロールとアトロピンを注入したコイの NOR、ADR は上昇しているものの、窒息時のコイで確認されているような  $10\sim 700\text{ nM/l}$  (第2章第1節) ではなく、control の 2~3 倍の濃度であり、これは Control の濃度に近い。さらに、生理食塩水のみを注入したコイの NOR と ADR は、H-4H まで有意に変動しなかった。これらのことから、失血状態にあるコイの心臓への humoral adrenergic control は、ほぼ安静時の循環カテコールアミン濃度によってなされていると考えられる。

プロプラノロールあるいはプロプラノロールとアトロピンを注入したコイの H-2.5H と H-4H で確認された NOR、ADR の上昇は、DAP の上昇に関与していたと考えられるが、アドレナリ

ン性 $\beta$ 受容体を遮断したことにより生じる NOR、ADR の上昇機構、および cholinergic control と adrenergic control が抑制されたコイにおける血圧の上昇機構は不明である。

コイ安静時の心臓への cholinergic tonus と adrenergic tonus の比は、1 : 0.1 と算出される（第2章第1節）。よって、H-2.5H の adrenergic control は、安静時に対して相対的に増強されていると考えられる。プロプラノロールのみを注入したコイの H-2.5H の HR は、頻脈を示さず、生理食塩水のみを注入したコイに対して有意に低い値を示した。交感神経系による adrenergic control や、アドレナリン性 $\alpha$ 受容体を介する adrenergic control は、失血時の心拍数変動に直接影響しないことが示唆されているので（第3章第2節）、失血時の心臓への adrenergic control の増強は、液性由来（循環カテコールアミン由来）である可能性が高い。ニジマスにおいて、貧血時（ $H_t \leq 6\%$ ）の心拍動へのアドレナリン性の寄与は小さいと報告されている（Wood *et al.*, 1979c）。また、水温が高くなるほど、貧血前や貧血時の心拍動に寄与するアドレナリン性の刺激（adrenergic stimulation, adrena line 10 nM/100g BW）は、相対的に大きくなることも報告されている（Wood *et al.*, 1979c）。貧血時のニジマスの、cholinergic、adrenergic tonus は算出されていないが、コイ失血時の心拍動調節に関与する adrenergic control は、微弱でないと判断される。

交感神経系の働きによる血圧改善（第3章第2節）の結果、H-4Hにおいて頻脈が解消されているのは、失血時に抑制されていた cholinergic control が、H-2.5H よりも上昇したことに由来すると考えられる。すなわち、H-4Hの心臓への cholinergic control が H-2.5H よりも増強し、さらに、心臓への adrenergic control が相対的に抑制されたために、心拍数が失血前のレベルにまで低下したと考えられる。また、H-2.5H と同様、H-4Hの失血時に抑制された adrenergic control は、humoral adrenergic control である可能性が高い。

以上のことから、失血時の頻脈は、心臓への cholinergic control の低下が主な要因であり、cholinergic control の低下を契機とした adrenergic control の増強が第二の要因となって、失血時の頻脈は引き起こされることが明白となった。そして、抑制されていた cholinergic control と、増強されていた adrenergic control が失血前のレベルにまで近づくことで、失血時の頻脈は解消されることも明らかとなった。

## 第4章 総合考察

魚類の様々な生理変動を知り、そのメカニズムを解明するのに最も基本的でかつ重要なのは、対象魚の安静状態もしくは正常状態の内部環境を把握することである。本論文は、コイの呼吸循環生理機能を解明していくにあたり、まず安静時のコイの循環機能特性について知ることを第一の目的とした。

魚類安静時の体内環境を知る上で、動脈血を得ることは必要不可欠であり、そのための手段として背大動脈カニューレションが挙げられる。カニューレションは、供試魚を麻酔に導入し、鰓蓋運動を停止させてから水から取りあげ、カニューラを装着、固定するため、供試魚に対し大きな負担となることが予想される。よって麻酔・手術時に供試魚へ与える影響を考慮しなければ、より正確な魚類の生理機能を把握することはできない。

そこで、呼吸循環機能に及ぼす背大動脈カニューレションの影響について検討した結果、手術直後のコイは、代謝性のアシドーシスを示しており、麻酔・手術時に受けた酸素債を解消することが必要であったと理解された。麻酔・手術時に負った酸素債は、ヘモグロビン濃度、循環カテコールアミン濃度、そして動脈血 pH の上昇が引き起こす血液の酸素容量の増大と赤血球の酸素親和力の増強により補償されていた。また、カニューレション後のアシドーシスが解消され、動脈血 pH が安定するのに、呼吸数の増加による鰓換水量の増加が大きな役割を果たすと考えられた。第1章第1節で測定した血液性状、心拍数、背大動脈血圧および呼吸数の変動から判断すると、麻酔・手術後の循環機能が安定状態を維持し始めるのに要する時間は手術後18~24時間であることが明らかになった。背大動脈カニューレションに際し、コイ頭部を下方へ傾斜させ口蓋部からカテーテルの挿入を行うため、鰓への人工灌流は容易ではないが、手術時に空気あるいは酸素を添加した低濃度の麻酔液で鰓を灌流することで、麻酔・手術時に負う酸素債はある程度軽減されるだろう。

背大動脈カニューレション後24時間経過させた、安静時のコイの血液のガス性状、血液の化学性状、心拍数および血圧等を Table 1-2-1 に提示した。それらの測定値の変動の範囲から外れるような場合は、異常値として判断され、得られた安静時のデータをもとにコイの体内環境や、生息する水域の環境を評価することが可能であると考えられる。各パラメーターの相互関係について検討した結果、コイ安静時の動脈血は、生理的範囲内の pH 変動ではボーア効果を受けず、動脈血の酸素親和力はほぼ一定であることが判明した。コイの全炭酸含量はヒトの1/2程度であるのに対し、二酸化炭素分圧は1/10程度であることから、コイの血液には強

力な緩衝能があり、二酸化炭素の排出が速やかであると推測される。これらのことは、コイが pH や溶存ガスが変化しやすい環境で生活するための合目的的特性であると推察される。また、今回得られた血液性状が安静時の範囲内であれば、心拍数や背大動脈血圧は有意に変動しないことも明らかとなった。

安静時のコイの背大動脈血圧維持機構について検討した結果、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介する交感神経系の働きにより 20~25 mmHg に維持されており（第3章第2節）、アドレナリン性  $\beta$  受容体は背大動脈血圧の維持にほとんど関与していないこと（第2章第2節）が明らかとなった。安静時のコイの心拍数の維持機構について検討した結果、内因的心拍動の約 70 % を cholinergic control が抑制し、約 4 % を adrenergic control が促進させていることが明らかとなった（第2章第1節）。すなわち、ムスカリン性アセチルコリン受容体を介した迷走神経による強い抑制作用と、循環カテコールアミンと交感神経による弱い促進作用によって、安静時の心拍動が維持され、毎分約 30 回という心拍数が決定されると考えられる。アドレナリン性  $\alpha$  受容体や交感神経による有意な心拍動促進作用が確認されなかったことから（第3章第2節）、安静時の心拍動の促進に寄与する adrenergic tonus は、アドレナリン性  $\beta$  受容体を介した循環カテコールアミンが主体であろう。

硬骨魚類の心臓への cholinergic、adrenergic tonus は、Farrell and Jones (1992) に詳しく、*Pagothenia borchgrevinki*, *P. bernacchii* (Axelsson et al., 1992), *Gadus morhua* (Axelsson, 1988) および *Carassius auratus* (Cameron, 1979) では cholinergic tonus が優位であり、*Pollachius pollachius*, *Ciliata mustela*, *Raniceps raninus*, *Zoarces viviparus*, *Myoxocephalus scorpius* (Axelsson et al., 1987) および *Hemirhamphus americanus* (Axelsson et al., 1989) では、adrenergic tonus が優位である。cholinergic tonus、adrenergic tonus および内因性心拍数は魚種により異なり、同種であっても水温に強く影響されることが知られている。よって、内因性心拍数や心臓への cholinergic、adrenergic control を議論する際は、魚種や水温について考慮する必要がある。実験水温の違いはあるものの、コイ心臓への adrenergic control の cholinergic control に対する比 0.1 は、どの魚種の様式にも当てはまらない。安静時のコイの cholinergic control の強さ、adrenergic control の微弱さはコイ特有の様式であろう。

コイが生息する水域では、環境水の溶存酸素量が変動しやすい。また、養魚場や飼育施設では高密度飼育が行われており、飼育水の適正な溶存酸素量の設定は重要課題の一つである。よって、魚類が低酸素状態を経験し始めてから、窒息による横転を経て、鰓蓋運動停止に至るま

での循環機能に生ずる一連の変化を、心臓への液性と神経性の二重調節機構、さらに、それらに深く関わる血液性状と関連づけて検討することは、魚類の生息環境の評価や、健全な育成を進めていくために有用な資料となる。環境水の溶存酸素量の変動や、血中の酸素分圧、酸素濃度は、酸素受容器 ( $O_2$  sensitive chemoreceptor) で感知されると考えられている (Burleson *et al.*, 1992)。酸素受容器の正確な存在部位に関する組織学的な知見はないが、解剖学および電気生理学的知見から延髄、入鰓動脈、動脈、静脈あるいは偽鰓にあると報告されている。なお、酸素受容器の詳細は Burleson *et al.* (1992) に詳しい。

窒息状態のコイでは、ほとんど酸素の無い血液が循環し、嫌氣的代謝が盛んに行われており、横転時では過呼吸によって pHa の低下は免れていたが、鰓蓋運動停止時では著しい代謝性アシドーシスを示した。窒息時の循環カテコールアミンの濃度上昇により、心臓への adrenergic control は増大し心拍動促進作用に関与していたが、それを上回る cholinergic control の増大により、横転時の心拍数は結果的に徐脈となり、毎分 20 回前後に低下していた。鰓蓋運動が停止するまで窒息が進行すると、少なくともムスカリン性アセチルコリン受容体やアドレナリン性  $\beta$  受容体を介する cholinergic control と adrenergic control、および心機能は著しく低下することが明白となった。窒息時の血圧調節機構について検討した結果、窒息による横転時の背大動脈血圧の上昇には、アドレナリン性  $\beta$  受容体を介する adrenergic control は関与していないことが明らかとなった。コイは、大西洋タラと同様、アドレナリン性  $\alpha$  受容体を介した adrenergic control によって、窒息時の背大動脈血圧の上昇を引き起こしていると推察された。窒息時の血圧調節機構をより詳細に把握するために、交感神経系を考慮に入れた実験系を組み、入鰓動脈あるいは腹大動脈へカニューレションを施し、入鰓動脈血圧や腹大動脈血圧を観察していく必要がある。

第2章第1節、2節を通し、平衡感覚を司る中枢神経は、急性窒息状態で15分以内で機能が低下し、呼吸運動を司る中枢は、急性窒息状態で1時間から2時間の間に機能が停止すると考えられた。しかしながら、長時間低酸素状態にあっても心拍動を停止せず、約2時間近く心拍動を持続させるコイの事例は、きわめて興味深い現象であり、コイの低酸素耐性に加え、哺乳類とは異なったエネルギー獲得の手段がコイ心臓に存在する可能性を示唆している。

様々な原因により外傷を負って失血した場合、魚類はどのような調節を行い循環機能を維持しているのだろうか。失血は、赤血球喪失によるガス交換機能の低下や酸塩基平衡障害を、あるいは循環体液量の喪失による血圧不均衡を引き起こす可能性がある。失血時の呼吸循環機能を

調節する際、前者は化学受容器 (chemoreceptor) を介し、後者は圧受容器 (baroreceptor) を介すると予想される。

そこで第3章では、設定した失血条件が、baroreceptor と chemoreceptor のいずれが大きく関与するのか明らかにするとともに、失血時の血圧調節機構、心拍動調節機構、そのときの血液の機能について検討した。体重あたり1%の割合で採血すると、背大動脈血圧は採血前の約80%にまで低下し、同時に心拍数は採血前の2倍にまで増加した。失血へ導入するために採取した血液のうち、血漿のみを供試魚に戻すと、低下していた血圧は回復し、頻脈も解消されたので、失血時の血圧の低下や心拍数の増加は、赤血球喪失によるガス運搬能や酸塩基平衡の障害によるものでなく、循環体液量の減少に起因することが明らかとなった。これは、baroreceptor が血圧の低下を感知し、失血時の血圧・心拍数の変動が引き起こされることを示している。失血時には、ヘモグロビン濃度の低下に伴う酸素含量の低下が確認されたが(第3章第1節~3節)、動脈血酸素分圧、酸素飽和度、pH、全炭酸含量、二酸化炭素分圧は、失血前に対し有意に変動しなかった(第3章第2節、3節)。これは、失血時の血圧、心拍数変動は、血液ガス性状の変動に顕著に影響を受けていないことを示している。

安静状態のコイに、交感神経阻害剤やアドレナリン性 $\alpha$ 受容体遮断剤による処理を施すと、どちらの場合にも背大動脈血圧は処理前の約7割にまで低下した。失血状態に導入するとさらに背大動脈血圧の低下と心拍数の増加が確認され、血圧の回復が見られず頻脈を持続していた。また、交感神経系を阻害したコイと、アドレナリン性 $\alpha$ 受容体を遮断したコイの背大動脈血圧間に、有意な差が認められなかった。さらに、失血前、失血後の循環カテコールアミン濃度は顕著に変動しなかった。よって失血時には、アドレナリン性 $\alpha$ 受容体を介した交感神経の働きにより、血圧の改善がなされることが明らかとなった。失血時のコイの心拍数は、安静時の約2倍の頻脈を呈しているにもかかわらず、迷走神経による心拍動抑制作用が存在していることも明らかとなった。失血2.5時間後の心臓への cholinergic、adrenergic tonus の比は、1:0.7と算出された。安静時の cholinergic、adrenergic tonus の比は、1:0.1と算出されるので(第2章第1節)、失血時の adrenergic control は安静時の7倍にまで相対的に増強され、毎分60回程度の心拍数に決定されていた。また、失血4時間後の cholinergic と adrenergic tonus の比は1:0.2と算出されたことから、失血4時間後に頻脈が解消されたのは、失血時に抑制されていた cholinergic control と増強されていた adrenergic control が、失血前のレベルにまでほぼ回復したためであった。

以上のことから、失血時の頻脈は、cholinergic controlの低下が主な要因であり、cholinergic controlの低下をきっかけとしたadrenergic controlの増強が第二の要因となって、引き起こされることが明白となった。そして、抑制されていたcholinergic controlと、増強されていたadrenergic controlが失血前のレベルにまで近づくことで、失血時の頻脈は解消されることが明らかとなった。失血時の心拍動調節に交感神経系やアドレナリン性 $\alpha$ 受容体は直接関与しない可能性が高く（第3章第2節）、失血時の循環カテコールアミンは安静時にきわめて近い濃度で推移したので、失血時のadrenergic controlは、安静時に近い濃度の循環カテコールアミンにより増強されると考えざるを得ない。

硬骨魚の呼吸循環機能は、カテコールアミンやアセチルコリン以外に、セロトニン、各種ペプチド、エンドセリンなど、いわゆるNANC-Control (Non-Adrenergic, Non-Cholinergic Control)も大きく関与することが指摘されている (Nilsson and Holmgren, 1992)。本論文は、心拍数および血圧の調節機構を、cholinergic、adrenergic controlを中心に検討を行ったが、今後呼吸循環機能調節に果たすNANCの役割を検討する必要がある。

## 要 約

本研究は、コイの呼吸循環機能の調節機構と血液の恒常性維持機構を明らかにするために行った。

これらの研究の一環として、第1章ではコイの生理状態の変動や異常を判定する際に、極めて重要な基準となる内部環境の正常範囲内を把握することを目的とした。

第1章第1節では、呼吸循環機能に及ぼす背大動脈カニューレーションの影響を、第1章第2節ではコイ安静時の呼吸循環機能特性について詳細に検討した。第1章第1節の結果、麻酔・手術時に負った酸素債は、ヘモグロビン濃度、循環カテコールアミン濃度、そして動脈血 pH の上昇が引き起こす酸素容量と赤血球の酸素親和力の増大により補償されることが明らかとなった。また、術後の血液性状、心拍数、背大動脈血圧、呼吸数が安定するのに18～24時間を要したことから、少なくとも術後24時間を経過させれば、コイの循環機能は安定状態に達すると結論された。

第1章第2節の結果、コイ安静時の血液性状、心拍数、背大動脈血圧、呼吸数が掌握できた (Table 1-2-1)。コイ動脈血の特性としての安静状態の酸素親和力は一定であり、強力な緩衝能を備えていることが判明した。そして、今回得られた血液性状が安静状態の範囲内で変動する限り、心拍数や背大動脈血圧は有意に変動しないと結論された。

第2章では、急性窒息時の呼吸循環機能の特性を解明するため、第2章第1節では急性窒息時の心拍数調節機構を、第2章第2節では血圧調節機構について検討した。

第2章第1節の結果、安静時のコイの心臓は、内因的心拍数の約70%を cholinergic control が抑制し、約4%を adrenergic control が促進させ、安静時の心拍数を毎分30回程度に維持していることが明白となった。安静時のコイ心臓への cholinergic control の強さ、adrenergic control の微弱さは、他魚種で報告されている値とは異なり、コイ特有の様式であると考えられた。窒息による横転時では、コイ心臓の内因的な機能は低下しており、窒息時の心臓自身の持つ心拍動の約85%を cholinergic control が抑制し、約32%を adrenergic control が促進させ、横転時の徐脈(約20回)を決定すると結論された。さらに、鰓蓋運動が停止するほど窒息が進行すると、少なくともムスカリン性アセチルコリン受容体やアドレナリン性 $\beta$ 受容体を介する cholinergic、adrenergic control の働きや、心機能は著しく低下することが明白となった。

第2章第2節の結果、窒息時のコイで確認された背大動脈血圧の上昇には、adrenergic control の増強により引き起こされるが、アドレナリン性 $\beta$ 受容体の関与はないか、もしくは非常に小

さいことが明らかとなった。第2章第1節、2節を通し、急性窒息時の平衡感覚を司る中枢神経系は15分以内で機能が低下し、呼吸運動を司る中枢神経系は1時間から2時間の間に機能が停止することが判明した。

第3章では、急性失血時の呼吸循環機能の特性を解明するために、第3章第1節では急性失血時の心拍数および背大動脈血圧の変動を、第3章第2節では急性失血時の血圧調節機構を、第3章第3節では急性失血時の心拍数調節機構について検討した。

第3章第1節の結果、失血条件下で確認された頻脈は赤血球喪失によるのではなく、循環体液量の減少による血圧の低下に起因していることが明らかとなった。これは、baroreceptor が血圧の低下を感知し、失血時の心拍数の変動を引き起こすことを示している。

第3章第2節の結果、安静時の背大動脈血圧は、アドレナリン性 $\alpha$ 受容体を介する交感神経系の働きによって維持されていることが明らかとなった。また、失血時の血圧の低下は、アドレナリン性 $\alpha$ 受容体を介する交感神経系の増強により改善がなされることが明白となった。さらに、失血時の心拍数調節に交感神経系やアドレナリン性 $\alpha$ 受容体は直接関与しない可能性が示唆された。

第3章第3節の結果、失血時の頻脈は、心臓への cholinergic control の低下が主な要因であり、cholinergic control の低下をきっかけとした adrenergic control の増強が第二の要因となって、引き起こされることが明白となった。加えて、抑制されていた cholinergic control と、増強されていた adrenergic control が失血前のレベルにまで近づくことで、失血時の頻脈は解消されることが確かめられた。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜った、広島大学生物生産学部教授難波憲二博士に、深甚なる謝意を表します。

本論文の御校閲と研究内容について御助言を賜った、広島大学生物生産学部教授植松一眞博士、同総合科学部教授安藤正昭博士に謹んで感謝の意を表します。

さらに、広島大学生物生産学部教授藤田正範博士には、本論文の御校閲とカテコールアミン分析技術の御教示を賜わり、心から感謝の意を表します。

また、広島大学生物生産学部助教授吉田将之博士には、有益な様々の示唆に富んだ御助言を頂き、厚く御礼申し上げます。

以上の方々に加え、広島大学生物生産学部水産動物生理学研究室、水族生理学研究室の先輩諸氏と後輩諸氏に感謝の意を表します。

## 引用文献

- Ask, J. A., Stene-Larsen, G. and Helle, K. B. (1980). Atrial B<sub>2</sub>-adrenoceptors in the trout. *J. Comp. Physiol.* **139**, 109-115.
- Ask, J. A., Stene-Larsen, G. and Helle K. B. (1981). Temperature effects on the B<sub>2</sub>-adrenoceptors of trout atrium. *J. Comp. Physiol.* **143**, 161-168.
- Axelsson, M. (1988). The importance of nervous and humoral mechanisms in the control of cardiac performance in the Atlantic cod *Gadus morhua* at rest and during non-exhaustive exercise. *J. exp. Biol.* **137**, 287-303.
- Axelsson, M. and Nilsson, S. (1986). Blood pressure control during exercise in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. exp. Biol.* **126**, 225-236.
- Axelsson, M., Davison, W., Forster, M. E. and Farrell, A. P. (1992). Cardiovascular responses of the red-blooded Antarctic fishes *Pagothenia bernacchii* and *P. borchgrevinkii*. *J. exp. Biol.* **167**, 179-201.
- Axelsson, M., Driedzic, W. R., Farrell, A. P. and Nilsson, S. (1989). Regulation of cardiac output and gut blood flow in the sea raven. *Hemitripterus americanus*. *Fish. Physiol. Biochem.* **6**, 315-326.
- Axelsson, M., Ehrenstrom, F. and Nilsson, S. (1987). Cholinergic and adrenergic influence on the teleost heart *in vivo*. *Exp. Biol.* **46**, 179-186.
- Axelsson, M. and Fritsche, R. (1991). Effects of exercise, hypoxia and feeding on the gastrointestinal blood flow in the Atlantic cod *Gadus morhua*. *J. exp. Biol.* **158**, 181-198.
- Bailly, Y. and Dunel-Erabb, S. (1986). The sphincter of the efferent filament artery in teleost gills: I. Structure and parasympathetic innervation. *J. Morphol.* **187**, 219-237.
- Bamford, O. S. (1974). Oxygen reception in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, **48A**, 69-76.
- Baroin, A., Garcia-Romeu, F., Lamarre, T. and Motais, R. (1984). A transient sodium-hydrogen exchange system induced by catecholamines in erythrocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Physiol.* **356**, 21-31.
- Berschick, P., Bridges, C. R. and Grieshaber, M. K. (1987). The influence of hyperoxia, hypoxia and temperature on the respiratory physiology of the intertidal rockpool fish *Gobius cobitis* Pallas. *J. exp. Biol.* **130**, 369-387.
- Black, E. C. and Connor, A. R. (1964). Effects of MS 222 on glycogen and lactate levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Canada.* **21**, 1539-1542
- Booth, J. H. (1979). The effects of oxygen supply, epinephrine, and acetylcholine on

- the distribution of blood flow in trout gills. *J. exp. Biol.* **83**, 31-39.
- Borgese, F., Garcia-Romeu, F. and Motais, R. (1986). Catecholamine-induced transport systems in trout erythrocytes. *J. Gen. Physiol.* **87**, 551-566.
- Boura, A. L. A., Duncombe, W. G. and McCoubrey, A. (1961). The distribution of some quaternary ammonium salts in the peripheral nervous system of cats in relation to the adrenergic blocking action of bretylium. *Brit. J. Pharmacol.* **17**, 92-100.
- Boura, A. L. A. and Green, A. F. (1965). Adrenergic neurons blocking agents. *Annu. rev. Pharmacol.* **5**, 183-212.
- Boutilier, R. G., Dobson, G., Hoeger, U. and Randall, D. J. (1988). Acute exposure to graded levels of hypoxia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): metabolic and respiratory adaptations. *Respiration Physiology*. **71**, 69-82.
- Burleson, M. L., Smatresk, N. J. and Milsom, W. K. (1992). Afferent inputs associated with cardioventilatory control in fish. Pages 389-426. in Hoar, W. S., Randall, D. J. and Farrell, A. P., eds. *Fish physiology*. Vol. **12B**, Academic Press.
- Bushnell, P. G. and Brill, R. W. (1992). Oxygen transport and cardiovascular responses in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) exposed to acute hypoxia. *J. Comp. Physiol. B.* **162**, 131-143.
- Bushnell, P. G., Jones, D. R. and Farrell, A. P. (1992). The arterial system. Pages 89-139. in Hoar, W. S., Randall, D. J. and Farrell, A. P., eds. *Fish physiology*. Vol. **12A**, Academic Press.
- Butler, P. J., Axelsson, M., Ehrenstrom, F., Metcalfe, J. D. and Nilsson, S. (1989). Circulating catecholamines and swimming performance in the Atlantic cod, *Gadus morhua*. *J. exp. Biol.* **141**, 377-387.
- Cameron, J. N. (1971). Rapid method for determination of total carbon dioxide in small blood samples. *J. Appl. Physiol.* **31**, 632-634.
- Cameron, J. N. (1978). Chloride shift in fish blood. *J. Exp. Zool.* **206**, 289-295.
- Cameron, J. S. (1979). Autonomic nervous tone and regulation of heart rate in the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **63C**, 341-349.
- Cameron, J. S. and Brown, S. E. (1981). Adrenergic and cholinergic responses of the isolated heart of the goldfish, *Carassius auratus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **70C**, 109-115.
- Cameron, J. N. and Davis, J. C. (1970). Gas exchange in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) with varying blood oxygen capacity. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* **27**, 1069-1085.
- Cameron, J. N. and Wohlschlag, D. E. (1969). Respiratory response to experimentally induced anaemia in the pinfish (*Lagodon rhomboides*). *J. exp. Biol.* **50**, 307-317.

- Chan, D. K. O. (1986). Cardiovascular, respiratory, and blood adjustments to hypoxia in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish. Physiol. Biochem.* **2**, 179-193.
- Claiborne, J. B. and Heisler, N. (1984). Acid-base regulation and ion transfers in the carp (*Cyprinus carpio*) during and after exposure to environmental hypercapnia. *J. exp. Biol.* **108**, 25-43.
- Daxboeck, C. and Holeton, G. F. (1978). Oxygen receptors in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Zool.* **56**, 1254-1259.
- Dunel-Erab, S. and Bailly, Y. (1986). The sphincter of the efferent filament artery in teleost gills: II. sympathetic innervation. *J. Morphol.* **187**, 239-246.
- Farrell, A. P. (1981). Cardiovascular changes in the lingcod (*Ophiodon elongatus*) following adrenergic and cholinergic drug infusions. *J. exp. Biol.* **91**, 293-305.
- Farrell, A. P. (1982). Cardiovascular changes in the unanaesthetized lingcod (*Ophiodon elongatus*) during short-time, progressive hypoxia and spontaneous activity. *Can. J. Zool.* **60**, 933-941.
- Farrell, A. P. (1984). A review of cardiac performance in the teleosts heart: intrinsic and humoral regulation. *Can. J. Zool.* **62**, 523-536.
- Farrell, A. P., Daxboeck, C. and Randall, D. J. (1979). The effect of input pressure and flow on the pattern and resistance to flow in isolated perfused gills. *J. Comp. Physiol.* **133**, 233.
- Farrell, A. P. and Jones, D. R. (1992). The Heart. Pages 1-88. in Hoar, W. S., Randall, D. J. and Farrell, A. P., eds. *Fish physiology*. Vol. **12A**, Academic Press.
- Farrell, A. P., MacLeod, K. R. and Chancey, B. (1986). Intrinsic mechanical properties of the perfused rainbow trout heart and the effects of catecholamines and extracellular calcium under control and acidotic conditions. *J. exp. Biol.* **125**, 319-345.
- Farrell, A. P., MacLeod, K. R., Driedzic, W. R. and Wood, S. (1983). Cardiac performance in the *in situ* perfused fish heart during extracellular acidosis: interactive effects of adrenaline. *J. exp. Biol.* **107**, 415-429.
- Farrell, A. P. and Milligan, C. L. (1986). Myocardial intracellular pH in a perfused rainbow trout heart during extracellular acidosis in the presence and absence of adrenaline. *J. exp. Biol.* **125**, 347-359.
- Fellows, F. C. I., Hird, F. J. R., McLean, R. M. and Walker, T. I. (1980). A survey of the non-esterified fatty acids and binding proteins in the plasma of selected animals. *Comp. Biochem. Physiol.* **67B**, 593-597.
- Fievet, B., Caroff, J. and Motais, R. (1990). Catecholamine release controlled by blood oxygen tension during deep hypoxia in trout: effect on red blood cell Na/H

- exchanger activity. *Respiration Physiology*, **79**, 81-90.
- Findlay, I. Deroubaix, E., Guiraudou, P. and Corabœuf, E. (1989). Effects of activation of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in mammalian ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* **257** (*Heart Circ. Physiol.* 26): H1551-H1559.
- Forster, M. E. (1981). Effects of catecholamines on the hearts and ventral aortas of the eels *Anguilla australis schmidtii* and *Anguilla dieffenbachii*. *Comp. Biochem. Physiol.* **70C**, 85-90.
- Fritsche, R. and Nilsson, S. (1989). Cardiovascular responses to hypoxia in the Atlantic cod, *Gadus Morhua*. *Exp. Biol.* **48**, 153-160.
- Fritsche, R. and Nilsson, S. (1990). Autonomic nervous control of blood pressure and heart rate during hypoxia in the cod, *Gadus morhua*. *J. Comp. Physiol. B.* **160**, 287-292.
- Fuchs, D. A. and Albers, C. (1988). Effect of adrenaline and blood gas conditions on red cell volume and intra-erythrocytic electrolytes in the carp, *Cyprinus carpio*. *J. exp. Biol.* **137**, 457-477.
- Fujita, M., Nishibori, M. and Yamamoto, S. (1992). Changes in plasma catecholamine, free fatty acid, and glucose concentrations, and plasma monoamine oxidase activity before and after feeding in laying hens. *Poultry Science*. **71**, 1067-1072.
- Hathaway, C. B. and Epple, A. (1989). The sources of plasma catecholamines in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **31**, 121-132.
- Heisler, N. (1984). Acid-base regulation in fishes. Pages 315-410. in Hoar, W. S. and Randall, D. J. eds. *Fish physiology*. Vol. **10A**, Academic Press.
- Holeton, G. F. and Randall, D. J. (1967). Changes in blood pressure in the rainbow trout during hypoxia. *J. exp. Biol.* **4**, 297-305.
- Holmgren, S. (1978). Sympathetic innervation of the coeliac artery from a teleost, *Gadus morhua*. *Comp. Biochem. Physiol.* **60C**, 27-32.
- Holmgren, S. and Nilsson, S. (1974). Drug effects on isolated artery strips from two teleosts, *Gadus morhua* and *Salmo gairdneri*. *Acta. Physiol. Scand.* **90**, 431-437.
- Houston, A. H. Madden, J. A., Woods, R. J. and Miles, H. M. (1971). Some physiological effects of handling and tricaine methanesulphonate anaesthetization upon the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *J. Fish. Res. Bd. Canada*. **28**, 625-633.
- Houston, A. H., and Koss, T. F. (1982). Water-electrolyte balance in goldfish *Carassius auratus*, under constant and diurnally cycling temperature conditions. *J. exp. Biol.* **97**, 427-440.
- Hunn, J. B. and Greer, I. E. (1990). Colorimetric and refractometer estimates of total plasma protein in striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum). *J. Fish. Biol.* **36**,

- 617-618.
- Imagawa, T., Kitagawa, H. and Uehara, M. (1996). The innervation of the chromaffin cells in the head kidney of the carp, *Cyprinus carpio*; regional differences of the connections between nerve endings and chromaffin cells. *J. Anat.* **188**, 149-156.
- Itazawa, Y. and Takeda, T. (1978). Gas exchange in the carp gills in normoxic and hypoxic condition. *Respiration Physiology.* **35**, 263-269.
- Itazawa, Y. and Takeda, T. (1982). Respiration of carp under anesthesia induced by mixed bubbling of carbon dioxide and oxygen. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **48**, 489-493.
- Iwama, G. K., Boutilier, R. G., Heming, T. A., Randall, D. J. and Mazeaud, M. (1987). The effects of altering water flow on gas transfer in rainbow trout. *Can. J. Zool.* **65**, 2466-2470.
- Iwama, G. K., McGeer, J. C. and Pawluk, M. P. (1989). The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Can. J. Zool.* **67**, 2065-2073.
- Kakuta, I. and Murachi, S. (1992). Renal response to hypoxia in carp, *Cyprinus carpio*: changes in glomerular filtration rate, urine and blood properties and plasma catecholamines of carp exposed to hypoxic conditions. *Comp. Biochem. Physiol.* **103A**, 259-267.
- Kinkead, R., Aota, S., Perry, S. F. and Randall, D. J. (1993). Propranolol impairs hyperventilatory response to acute hypercapnia in rainbow trout. *J. exp. Biol.* **175**, 115-126.
- LeBras, Y. M. (1982). Effects of anaesthesia and surgery on levels of adrenaline and noradrenaline in blood plasma of the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **72C**, 141-144.
- Nakano, T. and Tomlison, N. (1967). Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbances. *J. Fish. Res. Bd Canada.* **24**, 1701-1715.
- Nieminen, M., Laitinen, M. and Pasanen, P. (1982). Effects of anaesthesia with tricaine (MS 222) on the blood composition of the splake (*Salvelinus fontinalis* x *Salvelinus namaycush*). *Comp. Biochem. Physiol.* **73C**, 271-276.
- Nikinmaa, M. (1983). Adrenergic regulation of haemoglobin oxygen affinity in rainbow trout red cells. *J. Comp. Physiol. B.* **152**, 67-72.
- Nikinmaa, M. and Jensen, F. B. (1986). Blood oxygen transport and acid-base status of stressed trout (*Salmo gairdneri*): pre- and postbranchial values in winter fish. *Comp. Biochem. Physiol.* **84A**, 391-396.
- Nikinmaa, M. and Tufts, B. L. (1989). Regulation of acid and ion transfer across the

- membrane of nucleated erythrocytes. *Can. J. Zool.* **67**, 3039-3045
- Nilsson, S. (1973). Fluorescent histochemistry of the catecholamines in the urinary bladder of a teleost (*Gadus morhua*). *Comp. gen. Pharmacol.* **4**, 17-21.
- Nilsson, S. (1994). Evidence for adrenergic nervous control of blood pressure in teleost fish. *Physiol. Zool.* **67**, 1347-1359.
- Nilsson, S. and Holmgren, S. (1985). D- and L-isoprenaline have different effects on adrenoceptors in the systemic vasculature of the cod, *Gadus morhua*. *Comp. Biochem. Physiol.* **80C**, 105-107.
- Nilsson, S. and Holmgren, S. (1992). Cardiovascular control by purines, 5-hydroxyptamine, and neuropeptides. Pages 301-341. in Hoar, W. S., Randall, D. J. and Farrell, A. P., eds. *Fish physiology*. Vol. **12A**, Academic Press.
- Ohr, E. A. (1976). Tricaine methanelfonate-I. pH and its effects on anesthetic potency. *Comp. Biochem. Physiol.* **54C**, 13-17.
- Perry, S. F. and Kinkead, R. (1989). The role of catecholamines in regulating arterial oxygen content during acute hypercapnic acidosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respiration Physiology.* **77**, 365-378.
- Perry, S. F. and Reid, S. D. (1992). Relationship between blood O<sub>2</sub> content and catecholamine levels during hypoxia in rainbow trout and American eel. *Am. J. Physiol.* **263** (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 32): R240-R249.
- Perry, S., Fritsche, R., Kinkead, R. and Nilsson, S. (1991). Control of catecholamine release *in vivo* and *in situ* in the Atlantic cod (*Gadus morhua*) during hypoxia. *J. exp. Biol.* **155**, 549-566.
- Perry, S. F., Kinkead, R., Gallagher, P. and Randall, D. J. (1989). Evidence that hypoxemia promotes catecholamine release during hypercapnic acidosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Respiration Physiology.* **77**, 351-364.
- Peyraud-Waitzenegger, M. and Soulier, P. (1989). Ventilatory and circulatory adjustments in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) exposed to short term hypoxia. *Exp. Biol.* **48**, 107-122.
- Primmett, D. R. M., Randall, D. J., Mazeaud, M. and Boutilier, R. G. (1986). The role of catecholamines in erythrocyte pH regulation and oxygen transport in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exercise. *J. exp. Biol.* **122**, 139-148.
- Randall, D. J. (1962). Effect of an anaesthetic on the heart and respiration of teleost fish. *Nature.* **195**, 506.
- Randall, D. J. and Daxboeck, C. (1982). Cardiovascular changes in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) during exercise. *Can. J. Zool.* **60**, 1135-1140.
- Randall, D. J. and Daxboeck, C. (1984). Oxygen and carbon dioxide transfer across fish gills. Pages 263-314. in Hoar, W. S. and Randall, D. J. eds. *Fish physiology*.

- Vol. **10A**. Academic Press.
- Randall, D. J. and Perry, S. F. (1992). Catecholamines. Pages 255-300 in Hoar, W. S., Randall, D. J. and Farrell, A. P., eds. *Fish physiology*. Vol. **12B**. Academic Press.
- Randall, D. J. and Shelton, G. (1963). The effects of changes in environmental gas concentrations on the breathing and heart rate of a teleost fish. *J. exp. Biol.* **9**, 229-239.
- Reid, S. G. and Perry, S. F. (1995). Cholinceptor-mediated control of catecholamine release from chromaffin cells in the American eel, *Anguilla rostrata*. *J. Comp. Physiol. B.* **165**, 464-470.
- Saito, T. (1973). Effects of vagal stimulation on the pacemaker action potentials of carp heart. *Comp. Biochem. Physiol.* **44A**, 191-199.
- Saunders, R. L. and Sutterlin, A. M. (1971). Cardiac and respiratory responses to hypoxia in the sea raven, *Hemitripterus americanus*, and an investigation of possible control mechanisms. *J. Fish. Res. Bd. Canada.* **28**, 491-503.
- Smit, G. L. and Hattingh, J. (1979). Anaesthetic potency of MS 222 and neutralized MS 222 as studied in three freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* **62C**, 237-241
- Smit, G. L. Hattingh, J. and Burger, A. P. (1979). Haematological assessment of the effects of the anaesthetic MS 222 in natural and neutralized from in three freshwater fish species: interspecies differences. *J. Fish. Biol.* **15**, 633-643.
- Smith, D. G. (1978). Neural regulation of blood pressure in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Can. J. Zool.* **56**, 1678-1683.
- Smith, D. G., Nilsson, S., Wahlqvist, I. and Eriksson, B. (1985). Nervous control of the blood pressure in the Atlantic cod. *J. exp. Biol.* **117**, 335-347.
- Soivio, A. Nyholm, K. and Huhti, M. (1977). Effects of anaesthesia with MS 222, neutralized MS 222 and benzocaine on the blood constituents of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Fish. Biol.* **10**, 91-101.
- Streeby, D. R. and McKean, T. A. (1994). The effect of ATP-sensitive potassium channel modulation on heart rate in isolated muskrat and guinea pig hearts. *J. exp. Biol.* **197**, 101-118.
- Takeda, T. (1990). Ventilation, cardiac output and blood respiratory parameters in the carp, *Cyprinus carpio*, during hyperoxia. *Respiration Physiology.* **81**, 227-240.
- Takeda, T. (1993). Effects of exercise-stress on ventilation, cardiac output and blood respiratory parameters in the carp, *Cyprinus carpio*. *Comp. Biochem. Physiol.* **106A**, 277-283.
- Temma, K., Kishi, H., Kitazawa, T., Kondo, H., Ohta, T. and Katano Y. (1986).

- Beta-2 adrenergic receptors are not only for circulating catecholamines in ventricular muscles of carp heart (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* **83C**, 265-269.
- Temma, K., Komazu, Y., Shiraki, Y., Kitazawa, T. and Kondo, H. (1989). The role of A- and B-adrenoceptors in the chronotropic responses to norepinephrine in carp heart (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol.* **92C**, 149-153.
- Tetens, V. and Christensen, N. J. (1987). Beta-adrenergic control of blood oxygen affinity in acutely hypoxia exposed rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.* **157**, 667-675.
- Thomas, S. and Perry, S. F. (1992) Control and consequence of adrenergic activation of red blood cell Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange on blood oxygen and carbon dioxide transport in fish. *J. Exp. Zool.* **263**, 160-175.
- Tucker, V. A. (1967) Method for oxygen content and dissociation curves on microliter blood samples. *J. Appl. Physiol.* **23**, 410-414.
- Tufts, B. L., Ferguson, R. A. and Boutilier, R. G. (1988). *In vivo* and *in vitro* effects of adrenergic stimulation on chloride/bicarbonate exchange in rainbow trout erythrocytes. *J. exp. Biol.* **140**, 301-312.
- Wedemeyer, G. (1970). Stress of anesthesia with M.S. 222 and benzocaine in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Bd. Canada.* **27**, 909-914.
- Weiss, J. N., Scott T. L. and Kenneth, I. S. (1989). Cellular K<sup>+</sup> loss and anion efflux during myocardial ischemia and metabolic inhibition. *Am. J. Physiol.* **256** (*Heart circ. Physiol.* 25): H1165-1175.
- Wood, C. M. (1976). Pharmacological properties of the adrenergic receptors regulating systemic vascular resistance in the rainbow trout. *J. Comp. Physiol. B.* **107**, 211-228.
- Wood, C. M. and Shelton, G. (1975). Physical and adrenergic factors affecting systemic vascular resistance in the rainbow trout: A comparison with branchial vascular resistance. *J. exp. Biol.* **63**, 503-523.
- Wood, C. M. and Shelton, G. (1980). The reflex control of heart rate and cardiac output in the rainbow trout: Interactive influences of hypoxia, haemorrhage, and systemic vasomotor tone. *J. exp. Biol.* **87**, 271-284.
- Wood, C. M., McMahon, B. R. and McDonald, D. G. (1979a). Respiratory gas exchange in the resting, *Platichthys stellatus*: a comparison with other teleosts. *J. exp. Biol.* **78**, 167-179.
- Wood, C. M., McMahon, B. R. and McDonald, D. G. (1979b). Respiratory, ventilatory, and cardiovascular responses to experimental anaemia in the starry flounder, *Platichthys stellatus*. *J. exp. Biol.* **82**, 139-162.
- Wood, C. M., Pieprzak, P. and Trott, J. N. (1979c). The influence of temperature and

- anaemia on the adrenergic and cholinergic mechanisms controlling heart rate in the rainbow trout. *Can. J. Zool.* **57**, 2440-2447.
- Woodward, J. J. (1982). Plasma catecholamines in resting rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, by high pressure liquid chromatography. *J. Fish. Biol.* **21**, 429-432.
- Yamamoto, K., Itazawa, Y. and Kobayashi, H. (1981). Gas exchange in the gills of yellow tail, *Seriola quinqueradiata* under resting and normoxic condition. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **47**, 447-451.