ギンザケの血漿化学成分、鰓および腎臓の ATP 関連化合物および Na^+-K^+ ATPase 活性に及ぼす強制失血性貧血の影響

舞田正志^{*1}・潮 秀樹^{*2}・岡本信明^{*1}

(^{*1} 東京水産大学資源育成学科, ^{*2} 東京水産大学食品生産学科)

(1996 年 7 月 15 日受付)

The Effects of Anemia Artificially Induced by Bleeding on Blood Constituents, Concentration of ATP-Related Compounds and Na^+-K^+ ATPase Activity in Gill and Kidney of Coho Salmon

Masashi Maita^{*1}, Hideki Ushio^{*2} and
Nobuaki Okamoto^{*1}

^{*1} Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of
Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108, Japan

^{*2} Department of Food Sciences and Technology,
Tokyo University of Fisheries, Konan,
Minato, Tokyo 108, Japan

(Received July 15, 1996)

Coho salmon were bled at a rate of 2% of the body weight and physiological parameters were examined after 14 days.

Hematocrit values in anemic and control fish were 12.8 ± 3.2 , $31.0 \pm 0.7\%$, respectively. In anemic fish, plasma phospholipid, total cholesterol, free cholesterol, and alkaline phosphatase activity were significantly lower ($p < 0.01$) than those of controls. The concentration of ATP was reduced by approximately 46% in the gill, and by 37% in the kidney of anemic fish, compared to control values. The amount of ATP-related compounds were also significantly lower in both the gill ($p < 0.01$) and kidney ($p < 0.05$) in anemic fish. No significant difference was observed in Na^+-K^+ ATPase activities in both tissues.

Key words: coho salmon, anemia, bleeding, plasma component, ATP, Na^+-K^+ ATPase

魚の貧血に関する研究は、貧血の特徴や貧血に至る経過に関するものが多く、貧血が魚の生理状態にどのような影響を及ぼすかについての研究はほとんどない。本研究では、貧血状態におかれた魚の生理状態の変化について基礎的な知見を得るため、強制的に失血性貧血を起こしたギンザケの血液成分、鰓と腎臓の ATP 関連化合物量および Na^+-K^+ ATPase 活性を調べた。

材料および方法

平均体重 20.9 g のギンザケ *Oncorhynchus kisutch* を用

いた。強制的に貧血状態を作出するために、尾部血管から 1 ml ツベルクリン注射器で 0.4 ml ずつ採血した供試魚 10 尾 (貧血区) と、その対照とするため穿刺のみで採血はしなかった 10 尾 (対照区) をそれぞれ水量 70 l の水槽に収容し、水温 10°C、溶存酸素量 9.6 mg/l、注水量 12 l/min、無給餌で 14 日間飼育したのち、各区 5 尾ずつを取り上げ、ヘパリン処理した注射器で尾部血管から採血した。ヘマトクリット (Ht) 値を微量毛細管法で測定した後、血液を $1,000 \times g$, 10 分間遠心分離して得た血漿を自動生化学分析装置 CL-7100 (島津製作所) で測定した。統計処理は Student あるいは Welch の t -検定により行った。

供試魚から、鰓弁と腎臓を摘出し、淡水魚用リンゲル液で数回洗浄した。鰓弁は鰓弓を除去してから、腎臓はそのままで重量を測定して SEI 溶液 (0.3 M sucrose; 0.02 M ethylenediamine-tetraacetic acid; 0.1 M imidazole, pH 7.1) 1 ml を入れたチューブに移し、メカニカルホモジナイザーで 10 秒間、5 回ずつホモジナイズした。3,900 × g, 10 分間、4°C で遠心分離し、その上清 0.5 ml に 5% 濃度の過塩素酸を加えた後、KOH で pH 3.0 に調整し、5,000 rpm, 10 分間遠心分離して得られた上清を ATP 関連化合物測定用試料とした。沈殿物に SEID 溶液 (0.3 M sucrose; 0.02 M ethylenediamine-tetraacetic acid; 0.1 M imidazole; 0.1% sodium deoxycholate) 2 ml を加え、再度ホモジナイズした後、3,900 × g, 6 分間、4°C で遠心分離して得られた上清を Na^+-K^+ ATPase 活性測定用試料とした。これらの操作は全て氷冷しながら行った。

ATP 関連化合物の測定は、Asahipak GS-320 HQ (Asahi Chemical Industry Co.) を充填した 7.6 × 300 mm のカラムを用いた他は、Matsumoto and Yamanaka¹⁾ に従い、高速液体クロマトグラフ (島津製作所) で測定した。結果は、測定用試料のタンパク含量を Lowry *et al.* の方法²⁾ で定量し、単位タンパクあたりの含有量で示した。鰓および腎臓の Na^+-K^+ ATPase 活性は Pagliarani *et al.*^{3,4)} に従って行った。KCl の存在下と非存在下で酵素反応を行ったときの遊離した無機リン量を Fiske and SubbaRow⁵⁾ の方法で定量して、組織タンパク 1 mg 当たり遊離した無機リン量の差を酵素活性とした。

結果および考察

貧血区のギンザケは鰓が褪色しており、Ht 値は $12.8 \pm 3.4\%$ と対照区の $30.9 \pm 2.1\%$ より有意に低く ($p < 0.01$)、貧血状態を呈していた。

鰓の ATP は貧血区が有意に低く ($p < 0.05$)、対照区の約 46% であった。ヒポキサンチン (Hx) も有意に低かった ($p < 0.05$)。ADP, AMP, IMP およびイノシン (HxR) には有意差はなかった。ATP, ADP, AMP および IMP

とそれらの分解産物である Hx および HxR の含有量をすべて加えた ATP 関連化合物の総量は組織における ATP プールの大きさを示すが、その値は貧血区の方が対照区と比べて有意に低かった ($p < 0.05$)。腎臓でも鰓と同様に ATP は貧血区が有意に低く ($p < 0.01$)、対照区

Fig. 1. Concentration of ATP, ADP, AMP, IMP, inosine (HxR), and hypoxanthine (Hx) of gill and kidney in coho salmon. The homogenate of each tissue was prepared from five fish. Analysis was carried out by the method of Matsumoto and Yamanaka (1990) with a slight modification: Asahipak GS-320HQ (Asahi Chemical Industry Co.) column (7.6 × 300 mm). Data are shown as mean with the standard deviations. Significant differences between control and anemic groups were based on Student's or Welch's *t*-test (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

Table 1. Effects of anemia on plasma constituent levels and enzyme activity in coho salmon

Parameter	Control	Anemia* ¹
Hematocrit value (%)	31.0 ± 0.7* ²	12.8 ± 3.2
Total protein (g/100 ml)	2.7 ± 0.2	2.6 ± 0.1
Glucose (mg/100 ml)	56 ± 7	64 ± 7
Urea nitrogen (mg/100 ml)	2.7 ± 0.3	2.1 ± 0.2 ^a
ALP (IU/l)	125 ± 28	57 ± 11 ^a
Total cholesterol (mg/100 ml)	269 ± 15	180 ± 34 ^a
Free cholesterol (mg/100 ml)	94 ± 7	64 ± 13 ^a
Triglyceride (mg/100 ml)	134 ± 41	110 ± 17
Phospholipid (mg/100 ml)	567 ± 47	366 ± 72 ^a

*¹ Ten fish weighing 20.9 g in average were bled at 2% of the body weight prior to experiment. Five fish were examined after 14 days. *² Data obtained from five fish are shown as mean ± standard deviation. ^a Differences between control and anemia were examined by Student's or Welch's *t*-test ($p < 0.01$).

の約 37% であった。ATP 関連化合物の総量も貧血区が対照区と比較して有意に低かった ($p < 0.01$, Fig. 1)。貧血は血液の酸素運搬能を低下させるため、組織への酸素供給量が不足することが推測される。早川ら⁶⁾は、重篤な貧血に陥った EIBS 病魚の心筋や肝臓で膨化したミトコンドリアの増加を認めており、貧血に起因する低酸素による組織機能障害が起こっていることを示唆した。また、低酸素に曝露された mudskipper *Periophthalmus* *cgrysospilo* の筋肉⁷⁾ やニジマスおよびコイの赤血球中⁸⁾ の ATP 量は減少することが報告されている。本研究では、貧血魚の鰓と腎臓の ATP およびその関連化合物の総量が有意に低下していたことから、これら組織でも、貧血により酸素供給量が不足し、低酸素状態にあったことが示唆される。

血漿化学成分では、対照魚と比較して、総タンパク、ブドウ糖およびトリグリセリドには有意差はなかったが、貧血魚の尿素窒素、ALP、リン脂質、総コレステロールおよび遊離コレステロールは有意に低かった ($p < 0.01$, Table 1)。EIBS で貧血に陥った魚では血漿中のリン脂質、総コレステロールおよび遊離コレステロールが低下しており⁹⁾、本結果は、それら所見が貧血による影響である可能性を示唆している。

鰓および腎臓における $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase 活性は、対照区 (鰓: 8.14 $\mu\text{mol Pi/mg protein/h}$, 腎臓: 16.21) と貧血区 (鰓: 8.23, 腎臓: 16.05) の間に差は見られず、14 日間の貧血では影響を受けないことがわかった。失血性貧血によって血漿 Na^+ , K^+ 濃度は影響を受けないとの報告もあり¹⁰⁾、このことは ATP の消費を急激に増加させる要因がなければ、貧血自体の影響として浸透失調を起こすことはないことを示しているかもしれない。

文 献

- 1) Matsumoto, M. and H. Yamanaka (1990): *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1145–1149.
- 2) Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951): *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- 3) Pagliarani, A., V. Ventrella, F. Trombetti, G. Trigari and A. R. Borgatti (1988): *Comp. Biochem. Physiol.*, **90B**, 41–52.
- 4) Pagliarani, A., V. Ventrella, R. Ballestrazzi, F. Trombetti, M. Pirini and G. Trigari (1991): *Comp. Biochem. Physiol.*, **100B**, 229–236.
- 5) Fiske, C. and Y. SubbaRow (1925): *J. Biol. Chem.*, **66**, 375–400.
- 6) 早川 穰・原田隆彦・山本雅一・畑井喜司雄・窪田三郎・文谷俊雄・星合愿一 (1989): *魚病研究*, **24**, 203–210.
- 7) Ip, Y. K., S. F. Chew and W. P. Low (1991): *J. Fish Biol.*, **38**, 621–623.
- 8) Smit, G. L. and J. Hattingh (1981): *Comp. Biochem. Physiol.*, **68A**, 519–521.
- 9) Maita, M., N. Okamoto, K. Takahashi, A. Kumagai, S. Wada and Y. Ikeda (1996): *Fish Pathol.*, **31**, 151–155.
- 10) Wood, C. M. and D. J. Randall (1971): *Comp. Biochem. Physiol.*, **39A**, 391–402.