コイにおける血液凝固と栓球の関連性

藤 方 明・池 田 弥 生

(1985 年 2 月 14 日受理)

Relation between Blood Coagulation and Thrombocyte in Carp

Akira FUJIKATA* and Yayoi IKEDA*

To investigate the mechanism that the blood coagulation time in stressed fish decreases below normal level, relation between blood coagulation and thrombocyte was studied in carp *Cyprinus carpio* (body weight: about 300 g). Blood samples were collected from caudal vessels of un-anesthetized fish with a syringe tipped with 20-gauge needle.

One ml of the citrated blood was added with 0.1 ml of adrenaline (1, 10 and 100 μ M) or nor-adrenaline (0.3, 3.0 and 30 μ M) and incubated at 23°C for 10 min. Ten and 100 μ M adrenaline decreased plasma recalcification time (PRT). Noradrenaline had less effect than adrenaline.

When 0.1 ml of the α -adrenergic receptor antagonist: phentolamine (0.1, 1.0, 10 and 100 μ M) or the β -adrenergic receptor antagonist: propranolol (0.1, 1.0, 10 and 100 μ M) were added to citrated blood before adding 10 μ M adrenaline, the effect of 10 μ M adrenaline was blocked by the phentolamine (1.0, 10 and 100 μ M) but not by the propranolol. Ten μ M adrenaline was effective to decrease PRT on thrombocyte-rich plasma, but not on thrombocyte-poor plasma and blood samples from stressed fish.

PRT decreased with the increase of thrombocyte number. Prothrombin time was not affected by these catecholamines.

These results suggest that thrombocyte participates in the intrinsic blood coagulation with the increase of its number and blood catecholamine level, particularly adrenaline, in the blood of stressed fish reacting to the adrenergic α -receptor.

哺乳類ではアドレナリンによって血小板が一次及び二次凝集を起こし、その際、凝集した血小板から血液中に種々の凝固促進物質が放出され、また血小板第3因子が膜表面に露出、活性化されることが広く認められている。魚類でも高濃度のアドレナリンにより栓球が凝集を起こすこと¹⁾が知られており、更にストレス時には血中のアドレナリン濃度の上昇^{2,3)}と栓球数の増加⁴⁻⁷⁾が起こることも報告されている。先に報告⁸⁾したように、著者らはコイに取り扱いストレスを加えた時、血漿の凝固時間が短縮することをみている。これらのことから、魚類でも血中のカテコールアミンが栓球と反応し、血液凝固時間に影響を及ぼしていることが考えられる。

本報では *in vitro* において、栓球とカテコールアミンとの関係を検討した。

材料及び方法

供試魚には体重 300 g 前後のコイ *Cyprinus carpio* を用い、実験期間中の水温は 23~27°C の範囲であった。取り扱いストレスを最小限に抑えるよう注意して、麻酔

せずに速やかに尾部血管から注射器を用いて採血し、直ちに血液凝固防止剤として、3.8% クエン酸ナトリウム溶液を血液9容に対して1容の割合で加えた。この血液より得られた血漿を試料として実施した凝固検査は血漿カルシウム再加時間 (PRT と略す)、プロトロンビン時間 (PT と略す)、及び活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT と略す) の3種で、測定条件等は前報⁹⁾に記した通りである。検査した項目及び方法を次に述べる。

アドレナリン及びノルアドレナリンの影響 クエン酸ナトリウム溶液を加えた全血を均等に 1 ml ずつ4本のシリコン処理を施した試験管に分け、1, 10 及び 100 μ M のアドレナリン溶液を 0.1 ml ずつ上記の試験管のうちの3本に加えた。残りの試験管には対照として淡水魚用リンゲル液 0.1 ml を加えた。ノルアドレナリンの場合には全血を 1 ml ずつ5本の試験管に分け、3本には 0.3, 3 及び 30 μ M ノルアドレナリン溶液を 0.1 ml ずつ加え、残りの2本にはリンゲル液と、10 μ M アドレナリン溶液をそれぞれ 0.1 ml ずつ加えた。これらの試験管を 23°C で 10 分間放置した後、3,000 rpm, 10 分間の

* 東京水産大学 (Tokyo University of Fisheries, 5-7, Konan 4, Minato, Tokyo 108, Japan).

遠心分離により血漿を採取し、PRT, PT を測定した。

ストレスの加わった供試魚より得られた試料に対するアドレナリン添加の影響 供試魚を飼育槽 (400 l) より 40 l 水槽に移し、2 分間網で軽く追い廻した後、4 分間休ませた。この供試魚より得られた血液を試料として先と同様な方法で 10 μ M アドレナリン溶液及びリンゲル液を添加し、PRT, PT 及び APTT を測定した。

フェントラミン及びプロプラノロールの影響 クエン酸ナトリウム溶液を加えた全血を均等に 6 本の試験管に 1 ml ずつ分け、2 本にはリンゲル液 0.1 ml を加えた。他の 4 本の試験管には α 遮断剤のフェントラミン、あるいは β 遮断剤のプロプラノロールの 0.1, 1, 10 及び 100 μ M 溶液を 0.1 ml ずつ加えた。次にこれらをそれぞれ 25°C で 1 分間放置した後、先にリンゲル液を添加した 2 本の試験管のうちの 1 本にリンゲル液を 0.1 ml 更に加え、他の 5 本の試験管には全て 10 μ M アドレナリン溶液 0.1 ml を加えた。これらを 25°C で 10 分間放置した後、遠心分離を行い得られた血漿を試料として PRT 及び PT を測定した。

Thrombocyte-rich plasma におけるアドレナリン添加の影響 クエン酸ナトリウム溶液を加えた全血を 1,200 rpm, 5 分間遠心分離し血漿を得た。この中には未だ 1 μ l 中約 1,100 個の血球が残されており、その多くは鏡検により栓球であると推測された。この Thrombocyte-rich plasma (TRP と略す) を 1 ml ずつ 2 本の試験管に分け、一方にはリンゲル液、他方には 10 μ M アドレナ

リン溶液をそれぞれ 0.1 ml ずつ加えた。次にこれらを 25°C で 10 分間放置した後、冷却遠心器により更に 10,000 rpm, 10 分間遠心分離して栓球をも含まない血漿を作成し、PRT 及び PT を測定した。対照として、別に 10,000 rpm, 10 分間の遠心分離により栓球を含まない血漿を採取し、TRP の代わりにこの血漿を用いて同様な実験を行なった。

栓球数の影響 TRP を栓球を含まない血漿で希釈し、栓球数を変えた時の PRT を測定した。

以上、いずれの実験においても 3~4 個体ずつ調べた。

なお、今回使用した薬品はアドレナリン (第一製薬 K. K. 製)、ノルアドレナリン (三共 K. K. 製)、フェントラミン: メシル酸フェントラミン (日本チバガイギー K. K. 製)、プロプラノロール: 塩酸プロプラノロール (住友化学工業 K. K. 製) であり、いずれも実験当日淡水魚用リンゲル液で必要濃度に希釈し使用した。

結果及び考察

アドレナリン及びノルアドレナリンの影響 アドレナリンを全血に添加した時の PRT, PT の変動を Fig. 1 に示した。PRT はリンゲル液を添加した A では凝固時間の平均が 34.0 秒であり、1 μ M アドレナリン溶液を添加した B とほとんど差はないが、10 μ M を添加した C では 23.5 秒と短縮し、100 μ M を添加した D もこれとほぼ同じ結果となった。PT はいずれも 28 秒前後であり特にアドレナリンの影響は見られなかった。次にノルア

Fig. 1. Effect of adrenaline on plasma recalcification time (PRT) and prothrombin time (PT). A: control, B: 1 μ M, C: 10 μ M, D: 100 μ M. The values are mean $\pm$ SD (n=3).

Fig. 2. Effect of noradrenaline on PRT and PT. A: control, B: 0.3 μ M, C: 3.0 μ M, D: 30 μ M, E: 10 μ M adrenaline. The values are mean $\pm$ SD (n=3).

ドレナリンによる影響 (Fig. 2) を PRT でみると、リンゲル液を添加した A と比較して、0.3 及び 3.0 μ M のノルアドレナリンを添加した B, C ではその効果はほとんど見られなかったが、30 μ M の D ではわずかに短縮した。しかし、その効果は 10 μ M アドレナリンを添加した E と比較すると、僅かであった。PT にはノルアドレナリンの影響は見られなかった。以上の結果から PRT にはノルアドレナリンよりも アドレナリンの効果の方が強く現われたが、その作用は血球の持つ受容体を介して現われるものと推測される。よって次の実験を試みた。

ストレスの加わった供試魚より得られた試料に対するアドレナリン添加の影響 結果を Table 1 に示した。休息時における PRT はアドレナリン添加によってその効果が見られるが、ストレスが加わっている場合には対照区でも PRT が 17.0 秒、PT が 20.3 秒と低値を示し、且つアドレナリンの効果は見られなかった。これらの結果より、ストレスの加わった供試魚で凝固時間が短縮する理由として、ストレス下において増加したカテコ

ールアミン、特にアドレナリンが血球の持つアドレナリン性 α あるいは β 受容体を介してその作用を発現したことが推測される。この点を確認する為、次の実験を行った。

フェントラミン及びプロプラノロールの影響 フェントラミンで前処理した時のアドレナリン添加効果を Fig. 3 に示した。PRT はリンゲル液だけを添加した A では 30.1 秒であるが、10 μ M アドレナリン溶液を添加した B では 23.1 秒に短縮しておりその効果がみられた。しかし、10 μ M アドレナリン溶液を加える前にフェントラミン 0.1 μ M 溶液を加えた C ではわずかに、また 1.0 ~ 100 μ M 溶液を加えた D, E, F ではその効果は見られなかった。PT はいずれも 18 秒前後で、その効果は見られなかった。次に同様な実験をプロプラノロールについて行ない Fig. 4 に示した。PRT は先と同様に B でアドレナリン添加の効果が見られた。しかしプロプラノロールをアドレナリンを添加する前に加えた C, D, E, F にはその影響は見られなかった。また、PT についても特に効果は見られなかった。以上より PRT においてア

Table 1. Effects of adrenaline on plasma clotting times of blood samples from stressed fish. The values are mean $\pm$ S.D. (n=3)

Fish sample	Blood sample treatment	Plasma recalcification time (s)	Prothrombin time (s)	Activated partial thromboplastin time (s)
Resting	Control	34.0 $\pm$ 3.1	28.0 $\pm$ 7.4	—
	Adrenalinized (10 μ M)	23.5 $\pm$ 1.3	28.5 $\pm$ 5.3	—
Stressed	Control	17.0 $\pm$ 4.0	20.3 $\pm$ 0.8	9.3 $\pm$ 1.3
	Adrenalinized (10 μ M)	16.8 $\pm$ 3.5	20.8 $\pm$ 0.9	9.1 $\pm$ 1.2

Fig. 3. Inhibition of the effects of adrenaline by phentolamine on PRT and PT. A: control, B: 10 μ M adrenaline, C, D, E and F: phentolamine (0.1, 1.0, 10 and 100 μ M, respectively) plus 10 μ M adrenaline. The values are mean $\pm$ SD (n=3).

Fig. 4. Inhibition of the effects of adrenaline by propranolol on PRT and PT. A: control, B: 10 μ M adrenaline, C, D, E and F: propranolol (0.1, 1.0, 10 and 100 μ M, respectively) plus 10 μ M adrenaline. The values are mean $\pm$ SD (n=3).

ドレナリン添加の効果は α 遮断剤であるフェントラミンによって阻害され、 β 遮断剤であるプロプラノロールによっては影響されないことから、血球のもつアドレナリン性 α 受容体を介して現れるものと考えられる。次に、アドレナリン効果が見られる血球が哺乳類の血小板に相当する栓球であることを確認する為に、次の実験を行った。

Thrombocyte-rich plasma におけるアドレナリン添加の影響 結果を Fig. 5 に示した。PRT は通常の 3,000 rpm, 10 分間の遠心分離と比較して、10,000 rpm, 10 分間の遠心分離を行った為、いずれも延長した。しかし、TRP にリンゲル液を添加した A と比較して、10 μ M アドレナリン溶液を添加した B では全血の場合と同様に、アドレナリン添加の効果が見られた。これに対して

Fig. 5. Effect of adrenaline on PRT and PT of thrombocyte-rich plasma (TRP) and thrombocyte-poor plasma (TPP). A: control on TRP, B: 10 μ M adrenaline on TRP, C: control on TPP, D: 10 μ M adrenaline on TPP. The values are mean $\pm$ SD (n=4).

Fig. 6. Effect of number of thrombocytes on PRT. Each line with marks: ●, ■, ▲ in the figure indicates different samples.

栓球を含まない血漿にリンゲル液を添加した C と、10 μ M アドレナリン溶液を添加した D を比較するとその効果は見られなかった。本実験では栓球とアドレナリンを反応させた後、血漿中の栓球を除去している為、ここで見られた PRT の短縮は栓球の放出反応によるものと推測される。PT には特に差異は見られなかった。

栓球数の影響 血漿中の栓球数による PRT の変動を Fig. 6 に示した。いずれの個体においても栓球数の増加と共に PRT は短縮した。PRT は遠心分離条件によ

て影響を受けること⁹⁾から本実験の結果もこれを裏付けるものと考えられる。

以上の結果から、魚類がストレスを受けた時に見られる PRT の短縮原因として、血中に増加したアドレナリンはアドレナリン性 α 受容体を介して栓球に作用し、その結果栓球から血中に凝固促進物質が放出される為と考えられる。アドレナリンによる人間の血小板凝集は α 遮断剤により完全に阻止されるが、 β 遮断剤では影響を受けないと報告¹⁰⁾されており、コイの栓球も血小板と類似

した機構を備えていると考えられる。しかし、コイの栓球が高濃度のアドレナリンで凝集を起こすか否かは明らかではなく、魚類の栓球でもニジマスのように凝集を起こすもの¹⁾と、板鰓類の一種のように起こさない魚種¹¹⁾もあり、栓球の性質にも魚種間に相違があることが考えられる。アドレナリンと血液凝固の関連は、栓球では凝集と放出反応にあると言えるが、その他に血管内皮にも影響を及ぼすことが考えられる。人間の血管内皮には多量のプラスミノゲンアクチベータと第Ⅷ因子が含まれており、これらは内皮に存在するアドレナリン性受容体が刺激されると血中に放出される。¹²⁾ 血中に増加した第Ⅷ因子は凝固を促進させる方向に働くと考えられ、魚類においてもこの一連の反応が起こることも推察される。次に栓球数の影響であるが、栓球数が血液凝固に影響を与えることは過去の報告^{13,14)}に加えて本実験からも明らかである。問題となるのはストレス下における栓球数の変動であろう。しかし、その機構を説明した報告は見当なく、この点はリンパ球のストレスに対する反応も含めて包括的な検討が必要である。今回の実験ではストレス時のPTの短縮は栓球との関連においては説明できなかったが、栓球の凝集塊が血管内皮に傷害を与えることも推測される為、*in vivo* では間接的に栓球がPT短縮の原因となっていることも考えられ、さらに検討を必要とする。

文 献

- 1) J. J. WOODWARD, L. SMITH, and E. CASILLAS: *Comp. Biochem. Physiol.*, **68A**, 457-466 (1981).
- 2) T. NAKANO and N. TOMLINSON: *J. Fish. Res. Board Can.*, **24**, 1701-1715 (1967).
- 3) M. M. MAZEAUD, F. MAZEAUD, and E. M. DONALDSON: *Trans. Am. Fish. Soc.*, **106**, 201-212 (1977).
- 4) E. CASILLAS and L. S. SMITH: *J. Fish. Biol.*, **10**, 481-491 (1977).
- 5) G. K. IWAMA, G. L. GREEN, and P. A. LARKIN: *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 285-289 (1976).
- 6) J. HATTINGH and A. J. J. VAN PLETZEN: *Comp. Biochem. Physiol.*, **49A**, 607-609 (1974).
- 7) E. CASILLAS, L. S. SMITH, and B. G. D'Aoust: *Undersea Biomed. Res.*, **3**, 273-281 (1976).
- 8) 藤方 明・池田弥生: 日水誌, **51**, 1093-1096 (1985).
- 9) 藤方 明・池田弥生: 日水誌, **51**, 933-939 (1985).
- 10) D. C. B. MILLS and G. C. K. ROBERTS: *J. Physiol.*, **193**, 443-453 (1967).
- 11) F. A. BELAMARICH, M. H. FUSARI, D. SHEPRO, and M. KIEN: *Nature*, **212**, 1579-1580 (1966).
- 12) M. BROZOVIC: *Br. Med. Bull.*, **33**, 231-238 (1977).
- 13) R. F. DOOLITTLE and D. M. SURGENOR: *Am. J. Physiol.*, **203**, 964-970 (1962).
- 14) A. K. SRIVASTAVA: *Anat. Anz. Bd.*, **124**, 368-374 (1969).