

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658151

研究課題名(和文)サケ産卵時の心拍停止・再開機構に関する研究

研究課題名(英文)Studies on cardiac arrest and restart mechanisms during gamete release in salmon

研究代表者

上田 宏 (UEDA, HIROSHI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：00160177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：サケの産卵時の心拍停止・再開機構を解明するため、カルボシアニン色素(Dil)を用いてサケ心臓の刺激伝導系の解析し、迷走神経(副交感神経)が、内蔵枝より心臓枝へ分岐していることが確認された。多回産卵するニジマスニジマスに心電図ロガーを装着して放精時の雄における心電図を取得し、放精時の雄ニジマスにおいて心室細動が観察され、多回産卵のニジマスでも放精時に心停止することが確認された。サケ産卵時の心拍停止は、人間において強い疼痛などの刺激が迷走神経求心枝を介して、脳幹血管運動中枢を刺激し、心拍数の低下などを引き起こす迷走神経反射に相当することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify cardiac arrest and restart mechanisms during gamete release in salmon, carbocyanine fluorescent dyes (Dil) was used to observe electrical conduction system of the chum salmon heart. It was found that the vagus nerve (parasympathetic nervous) was innervated from the visceral branch to the cardiac branch. During sperm release of male rainbow trout, which is a multiple spawner species, the ventricular fibrillation was recorded by electrocardiogram data-logger suggesting that the cardiac arrest occur not only semelparous species but also polytelic species. The cardiac arrest during gamete release in salmon was considered to the similar phenomena of the vasovagal response in human being that was caused by strong pain stimulating the vasomotor center in the brain via the afferent branch of the vagus nerve, and then decreased the heart rate.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：サケ 産卵行動 口開け行動 心停止 刺激伝導系 ランゲンドルフ還流 脳幹血管運動中枢 迷走神経反射

1. 研究開始当初の背景

シロザケが産卵する時に、数秒間心停止することは報告されていた (Uematsu et al, 1983)。近年開発された心電図ロガーを用いて、シロザケの産卵行動を詳細に観察し、雌雄が大きく口を開けて (gaping) 同期して放卵・放精する時に雌で 7 秒・雄で 5 秒間、心停止することを見出し、また副交感神経阻害剤 (アトロピン) を投与した雌は、gaping して放卵するが心停止は起こらないため、放卵時の心停止は副交感神経が制御していることを明らかにした (Makiguchi et al, 2009)。高等脊椎動物の副交感神経が制御する心停止は、アセチルコリン (ACh) およびカリウムイオン (K) が関与することが報告されている。ヒトの心拍は、心臓マッサージ・自動体外式除細動器 (AED)・薬剤投与などにより、外部から刺激を与えなければ再開しないが、サケは放卵・放精後に自発的に心拍が再開するため、心拍が停止し再開するメカニズムを研究する絶好の研究材料となる

2. 研究の目的

本研究の目的は、我国の重要な水産資源であるシロザケの産卵時の心拍停止・再開機構を解明することであるが、多回産卵するニジマス、およびシロザケの産卵期が限定されるため北大洞爺湖臨湖実験所で飼育しているヒメマスを用いて、下記の 5 点に着目して解析する。

- (1) サケ心臓の刺激伝導系の解析: カルボシアニン色素 (DiI) を用いて、サケ心臓の神経走行を順行性・逆行性にトレーシングし、刺激伝導系 (興奮系伝達) を形態学的に解析する。
- (2) ACh・K 濃度の測定: サケの腹大動脈から血液を採集できるカニューレーション手法を開発し、サケの心拍停止・再開に伴う ACh 濃度と K 濃度の変化を解析する。
- (3) ニジマス産卵時の心臓機能の解析: 多回産卵のニジマスの産卵行動に伴う心電図の変化、神経阻害剤の投与、ACh 濃度と K 濃度の変化を解析し、一回産卵のシロザケの場合と比較検討する。
- (4) サケの心停止と生殖腺成熟の関連解析: サケの心停止が生殖腺成熟とどのように関連しているかを調べるため、生殖腺の成熟を促進するホルモンを投与し、サケの心電図の変化を解析する。
- (5) ラングンドルフ還流実験: サケの心臓を取り出し生体外で拍動させるランゲンドルフ還流実験手法を開発し、種々薬品の投与、およびイオン濃度を変化させた場合に、心拍がどのように変化するかを解析する。また、生体外で実験的に心拍を停止させたサケの心臓が、ヒトの不整脈治療に用いられるような薬物により拍動が再開するかを解析する。

3. 研究の方法

- (1) サケ心臓の刺激伝導系の解析: DiI を用いて、サケ心臓の神経走行を順行性・逆行

性に染色し、サケの刺激伝導系 (興奮系伝達) を形態学的に解明観察する。

- (2) ACh・K 濃度の測定: サケの心臓から拍動される血液を採集するため腹大動脈からのカニューレーション手法を開発し、サケの心停止時の ACh 濃度と K 濃度の変化を連続的に解析する。
- (3) ニジマス産卵時の心臓機能の解析: 多回産卵するニジマスの産卵行動に伴う心電図の変化を解析する。
- (4) サケの心停止と生殖腺成熟の関連解析: サケの生殖腺成熟を促進する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) アゴニスト (GnRHa)、および卵巣・精巣の最終成熟誘起ステロイド (DHP) を投与し、サケの心電図の変化を解析する。
- (5) ラングンドルフ還流実験: サケの心臓を取り出し生体外で拍動させるランゲンドルフ還流実験手法を開発する。

4. 研究成果

- (1) サケ心臓の刺激伝導系の解析: カルボシアニン色素 (DiI) を用いてサケ心臓の刺激伝導系の解析する目的で、延髄から心臓への順行性染色、および心臓から中枢神経系への逆行性染色を行い、迷走神経 (副交感神経) は、内臓枝より心臓枝へ分岐していることが確認された。
- (2) ACh・K 濃度の測定: サケの心停止時の ACh 濃度と K 濃度を測定する目的で、ヒメマス心臓から拍出される血液を採集するため、腹大動脈からのカニューレーション手法を開発したが、心停止時の血液を採集することができなかった。
- (3) ニジマス産卵時の心臓機能の解析: 多回産卵するニジマスの産卵時の心臓機能の解析する目的で、ニジマスに心電図ロガーを装着して放精時の雄における心電図を取得したところ、放精時の雄ニジマスにおいて心室細動が観察され、多回産卵のニジマスでも放精時に心停止することが確認された。
- (4) サケの心停止と生殖腺成熟の関連解析: サケの心停止と生殖腺成熟との関連を解析するため、ヒメマスに生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンアナログを投与し成熟促進を試みたが、放卵・放精する個体が出現しなかった。
- (5) ラングンドルフ還流実験: ラングンドルフ還流実験による心拍再開刺激の検討する目的で、ヒメマスの心臓を取り出し生体外で拍動させるランゲンドルフ還流実験法を開発し、生体外で心臓を拍動させることに成功したが、種々薬剤を投与しても心臓が停止し再開する機構を解明することができなかった。

以上の結果、サケ産卵時の心拍停止は、人間において強い疼痛などの刺激が迷走神経求心枝を介して、脳幹血管運動中枢を刺激し、心拍数の低下などを引き起こす迷走神経反射に相当することが明らかになった。迷走神経反射は、生命維持のための防衛反応である

ため、心拍停止・再開機構を解析するための良いモデルではないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Ueda H: Homing ability and migration success in Pacific salmon: mechanistic insights from biotelemetry, endocrinology, and neurophysiology. *Marine Ecology Progress Series*, 496: 219-232 (2014). Doi: 10.3354/meps10636 (査読有)
2. Yu JN, Ham SH, Lee SL, Jin HJ, Ueda H and Jin DH: Cloning and characterization on the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 gene from chum salmon, *Oncorhynchus keta* (Walbaum, 1792). *Springer Plus*, 3: 9 (2014). Doi: 10.1186/2193-1801-3-9 (査読有)
3. Fukaya K, Amano M and Ueda H: Diurnal changes in salmon GnRH secretion in the brain of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *General and Comparative Endocrinology*, 192: 77-80 (2013). DOI: 10.1016/j.ygcen.2013.02.027 (査読有)
4. Yamamoto Y, Shibata H and Ueda H: Olfactory homing of chum salmon to stable compositions of amino acids in natal stream water. *Zoological Science*, 30: 607-612 (2013). DOI: 10.2108/zsj.30.607 (査読有)
5. Kim NN, Shin HS, Choi YJ, Yamamoto Y, Fukaya K, Ueda H and Choi CY: Effect of hypo-osmotic environmental changes on the expression of gonadotropin-releasing hormone, its receptor, and gonadotropin hormone subunit mRNA in adult chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 45 (6), 397-410 (2013). DOI: 10.1080/10236244.2013.777215 (査読有)
6. Hayashida K, Nii H, Tsuji T, Miyoshi K, Hamamoto S and Ueda H: Effects of anesthesia and surgery on Ucrit performance and MO₂ in chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39, 907-915 (2013). DOI: 10.1007/s10695-012-9750-x (査読有)
7. Lee S and Ueda H: Effects of aggressive interaction on downstream movement and olfactory function in masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Aquaculture*, 362-363, 167-171 (2012). DOI: 10.1016/j.aquaculture.2010.09.012 (査読有)
8. Ueda H: Physiological mechanisms of imprinting and homing migration in Pacific salmon *Oncorhynchus* spp. *Journal of Fish Biology*, 81, 543-558 (2012). DOI: 10.1111/j.1095-8649.2012.03370.x (査読有)
9. Makiguchi Y, Konno Y, Konishi K, Miyoshi K,

Sakashita T, Nii H, Nakao K and Ueda H: EMG telemetry studies on upstream migration of chum salmon in the Toyohira River, Hokkaido, Japan. *Fish Physiology and Biochemistry*, 37, 273-284 (2011). Doi: 10.1007/s10695-011-9495-y. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

1. Ueda H: Current status and future prospects of Pacific salmon propagation systems in Japan. *Aquaculture 2013 (Celebrating 40 years of Aquaculture)*, Palacio de Congresos de Canarias Convention Centre, Gran Canaria, November 4, 2013.
2. 上田 宏: サケの嗅覚による母川記銘・回帰行動. 日本学術会議公開シンポジウム「ここまで分かった水生動物行動の謎」, 日本学術会議(東京都), 2013年9月29日.
3. Ueda H: Olfactory imprinting during smoltification in Pacific salmon. 9th International Workshop on Salmonid Smoltification, Grand Hotel in Reykjavik and Holar University College, Iceland, August 17, 2013.
4. 上田 宏: サケの母川回帰の不思議. 平成25年度北海道大学水産学部公開講座, 北海道大学水産学部(函館市), 2013年7月27日.
5. 上田 宏: 石狩川とサケ: 河川改修とサケの遡河行動. 第7回石狩川フォーラム, 紀伊國屋書店札幌本店 sappor55ビル1階インターガーデン(札幌市), 2013年7月26日.
6. Hayashida K, Nii H, Miyoshi K, Hayama H and Ueda H: Biotelemetry studies on the upstream migratory behavior of masu salmon along the Pirika Dam in Hokkaido, Japan. 10th International Congress on the Biology of Fish, Monoa Terrace Community and Convention Center, Madison, Wisconsin, USA, July 18, 2012.
7. Ueda H: Physiological mechanisms of olfactory imprinting and homing in salmon. 10th International Congress on the Biology of Fish, Monoa Terrace Community and Convention Center, Madison, Wisconsin, USA, July 17, 2012.
8. Ueda H: Mechanisms of olfactory imprinting and homing migration in salmon. *Chemical Signals in Vertebrates XII*. Zoo and Wildlife Research, Berlin, Germany, August 30, 2011.
9. Ueda H: Physiological researches on imprinting and homing migration in Pacific salmon. 2nd International Conference on Fish Telemetry, Rhodes University, Grahamstown, South Africa, July 16, 2013.

[図書] (計 4 件)

1. Ueda H and Tsukamoto K ed. "Physiology and Ecology of Fish Migration", CRC Press, Boca

- Raton, pp.1-188 (2013).
2. 上田 宏:サケの母川記銘・回帰メカニズム, pp.87-90 “サケ学大全”(帰山雅秀・永田光博・中川大介編著), 北海道大学出版会, 札幌市(2013)
 3. Hayashida K, Fukaya K, Palstra AP and Ueda H: Salmonid reproductive migration and effects on sexual maturation. “Swimming Physiology of Fish” (eds. Palstra AP and Plans JV), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 3-17 (2012). Doi 10.1007/978-3-642.31049-2.
 4. 牧口祐也, 新居久也, 中尾勝哉, 上田 宏: 蛇行復元がサケ科魚類の遡上行動およびエネルギー消費に与える影響. “川の蛇行復元”(中村太士編), 技報堂出版, 東京都, pp. 141-163 (2011).

[その他]

ホームページ等

上田研究室

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~k15499/Ueda%20Laboratory%202013.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 宏 (UEDA HIROSHI)

北海道大学・北方生物圏フィールド科学センター・教授

研究者番号：00160177

(2) 研究分担者：無

(3) 連携研究者

山本 雄三 (YAMAMOTO YUZO)

(公財) 海洋生物環境研究所・研究員

研究者番号：60532405