

窒息死およびシアン中毒死したコイの 赤血球抵抗力について

村地四郎・難波憲二・引田敦也*

広島大学水畜産学部水産学科・*クレマツ KK

1978年4月28日 受理

Blood Corpuscle Resistance of Carp Died of Environmental Hypoxia and of Cyanide Poisoning

Shiro MURACHI, Kenji NANBA and Atsunari HIKITA

Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Animal Husbandry,
Hiroshima University, Fukuyama

* Kurematsu Co., Ltd., Kure

(Figs. 1-5, Tables 1-2)

低張食塩水に対する赤血球の溶血の度合で表わされる、いわゆる赤血球抵抗力が動物の生理状態を良く反映することは周知の事実であり、医学においては特に遺伝性球状赤血球症の診断上、赤血球抵抗力の検査が重要であるとされている。¹⁾

魚類の赤血球抵抗力に関する報告はあまり多くないが、柴田²⁾が淡水魚では一般に血色素量の大である魚種ほど赤血球抵抗力は弱いことを、また斉藤³⁾は海産魚は淡水魚よりも赤血球抵抗力が弱いことをみている。

魚の生理状態や斃死原因、死後時間の経過の相違によって赤血球抵抗力が変動することも報告されている。即ち、狩谷⁴⁾は窒息状態にあるコイの赤血球抵抗力は弱くなり、逆に硫酸銅中毒で斃死したコイのそれは強くなることを、斉藤⁵⁾は苦悶魚、死魚の体内赤血球の抵抗力が釣獲直後のものよりも時間の経過と共に弱くなることを、さらに田村ら⁶⁾は1%食塩水中にコイを入れると赤血球抵抗力が弱まることをそれぞれ報告している。また著者ら⁷⁾は赤潮によって斃死した養殖ハマチの赤血球抵抗力が弱くなることを報告した。

本研究においては水中の溶存酸素不足による窒息死と内窒息による斃死とされているシアンイオンによって中毒死したコイの赤血球抵抗力が斃死原因の相異によってどのように異なるか、また死後時間の経過によりどのように変動するかを検討した。

材料および方法

実験に用いたコイ *Cyprinus carpio* L. の体重は 146 ± 39.3 g であり、実験期間中のコイの飼育水温は 14°C から 8°C まで徐々に低下した。

窒息死の場合は魚体重の5倍容の、充分にエアレーションした水が入っているビニール袋の中にコイを1尾ずつ入れて密封し斃死させた。またシアン中毒死の場合は KCN を用いて CN^{-} イオン濃度 10 ppm に調製した溶液の中にコイを入れて斃死させた。鰓蓋運動をはじめ魚体のあらゆる外見上の運動の停止した時点

斃死と定めた。斃死 24 時間後の赤血球抵抗力は、それぞれの条件下で斃死を確認し、さらにそのまま 24 時間放置した後に測定した。

正常魚からの採血は、コイを MS-222 (100 ppm) で麻酔し、胸部を切開して心臓を露出させ、注射針を先端にとりつけたヘマトクリット毛細管 (Fig. 1) を動脈球に突き刺し、心臓の拍動とともに流出する血液の約 1~2 ml を抗凝固剤 (Anglot) を添加した遠沈管に受けて行なった。また斃死魚からの採血は胸部を切開することなく体外から心室に注射器を直接に穿刺して行なった。赤血球原液の調製法は狩谷⁴⁾の方法によった。即ち、採取した血液に約 10 ml の 0.8% 食塩水を加えてゆるやかに攪拌し、次にこの稀釈した血液を漏斗に粗くつめた硝子綿を通して濾過し、凝固した血餅等を除いた後にこの濾液を 1500 rpm で 3 分間遠心分離し濾液の上澄みを捨て血球のみを残す。この血球に 0.8% 食塩水を約 10 ml 加え再度 1500 rpm で 3 分間遠心分離した後に上澄みを捨て赤血球の洗浄を完了する。洗浄の済んだ赤血球に 3 倍容の 0.8% 食塩水を加え、これを赤血球原液とした。低張食塩水系列は 1% 食塩水を蒸留水で稀釈し、0.30% から 0.70% まで 0.05% の等差で作製した。この低張食塩水系列の食塩水を各 5 ml と、別に蒸留水 5 ml をそれぞれ遠沈管にとり、これに赤血球原液を 0.02 ml 加え十分に混和した後、30 分間室温で静置した。30 分静置後再び十分に混和した後、2500 rpm で 5 分間遠心分離し、その上澄みの吸光度を分光光度計 (島津 Spectronic 20) を用い波長 425 m μ で測定した。

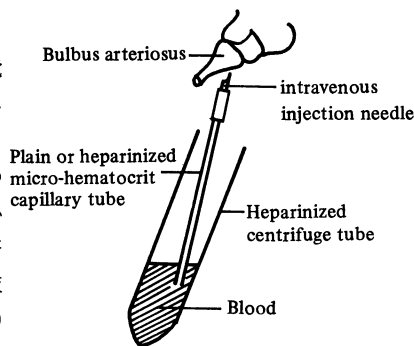


Fig. 1 Instruments for collecting blood from normal carp.

溶血度は次式によって求めた。

$$\text{溶血度}(\%) = \frac{\text{低張食塩水中の溶血量}}{\text{蒸留水中の溶血量}} \times 100$$

なお、低張食塩水系列中に赤血球原液を添加し 30 分間静置する際の室温が溶血に及ぼす影響をみるために、0.5% 食塩水 5 ml 中に 0.02 ml の赤血球原液を加え 5°C 及び 30°C でそれぞれ 30 分間静置し、その際の溶血度を比較したところ、5°C で静置した方が 30°C で静置したよりも溶血度にして僅かに $0.7 \pm 0.36\%$ 高くなったのみであり、コイの赤血球の場合はヒトの赤血球で言われている⁸⁾ほど静置時の室温を考慮しなくても良いことが判明した。

Table 1. Osmotic fragility of blood corpuscle in carp died of environmental hypoxia and of cyanide poisoning

Conc. NaCl soln. (%)	Hemolysis (%)				
	Normal	A	B	C	D
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
0.30	100	100	100	100	100
0.35	91.5 \pm 8.87	98.5 \pm 1.84	99.3 \pm 1.00	90.8 \pm 4.91	99.3 \pm 0.97
0.40	56.2 \pm 20.72	97.0 \pm 1.58	96.3 \pm 4.93	56.8 \pm 18.82	91.7 \pm 10.07
0.45	16.7 \pm 9.61	94.3 \pm 2.37	83.5 \pm 18.06	15.2 \pm 7.38	68.8 \pm 29.16
0.50	9.6 \pm 5.98	85.4 \pm 11.99	61.7 \pm 24.76	7.8 \pm 2.97	37.9 \pm 20.30
0.55	6.6 \pm 1.99	64.5 \pm 27.62	37.9 \pm 19.84	6.5 \pm 2.82	17.1 \pm 5.26
0.60	5.9 \pm 2.30	42.6 \pm 28.9	21.0 \pm 12.73	6.2 \pm 3.00	10.1 \pm 1.95
0.65	4.9 \pm 2.07	19.7 \pm 14.80	12.8 \pm 7.83	5.0 \pm 2.67	7.7 \pm 1.80
0.70		8.4 \pm 3.80	9.0 \pm 3.86	4.5 \pm 2.68	6.8 \pm 1.76

- A: Hemolysis immediately after death of environmental hypoxia.
 B: Hemolysis 24 hours after death of environmental hypoxia.
 C: Hemolysis immediately after death of cyanide poisoning.
 D: Hemolysis 24 hours after death of cyanide poisoning.

結果および考察

各条件下のコイ赤血球の溶血度の平均値および標準偏差を各濃度の低張食塩水について求め Table 1 に示した。また、溶血曲線は、Table 1 の Mean ± SD の幅をもって表示する事とし (Blood corpuscle resistance belt), 正常魚, 窒息死直後および窒息死後 24 時間経過したものについては Fig. 2 に, シアン中毒死直後とシアン中毒死後 24 時間を経過したものについては Fig. 3 に示した。

さらに実験に用いた全個体についてそれぞれ溶血曲線を描いたところ、溶血曲線の溶血度 20% から 80% の部分は全ての個体ではほぼ直線と見なし得たので、この溶血曲線から溶血度が 80%, 50% および 20% である食塩水の濃度を讀取った。低張食塩水系列の管内での溶血状態を肉眼で判定する Giffin - Sanford 変法⁸⁾ では食塩水が微赤色を呈する最初の管が溶血開始で、その食塩水濃度を最小抵抗値、管底に全く赤血球を認めない管が溶血完結で、その食塩水濃度を最大抵抗値、最小抵抗値と最大抵抗値の差を抵抗幅としているが、本実験では溶血度 80% の食塩水濃度を最大抵抗値、また溶血度 20% の食塩水濃度を最小抵抗値、溶血度 20% と 80% の食塩水の濃度差を抵抗幅とし、得られた結果を Table 2 に掲げた。

本実験で得られた正常なコイの赤血球の最小抵抗値は $0.431 \pm 0.028\%$ 、最大抵抗値は $0.376 \pm 0.029\%$ 、抵抗幅は $0.056 \pm 0.009\%$ 、中間抵抗値は $0.403 \pm 0.028\%$ 、直線部分の傾斜は 1094 ± 160 であった。本実験で得た最大抵抗値を柴田²⁾の報告した 0.30% 、齊藤⁵⁾の報告した $0.34 \sim 0.32\%$ と比較するとやや高い値である。また中間抵抗値も田村ら⁶⁾の報じた $0.345 \pm 0.031\%$ に比して高い値であった。これらは材料として用いたコイの相異の他に赤血球抵抗力の測定方法の相異に起因するのであろう。

窒息死直後のコイ赤血球は Table 2 に示すように正常なコイの赤血球よりも最大抵抗値、最小抵抗値、抵抗幅および中間抵抗値が著るしく増大しており、そのため溶血曲線は食塩水の高濃度の方へ移動し、しかもその傾斜は緩やかになった (Fig. 2)。これらの結果は窒息死直後の赤血球抵抗が正常時に比べると極めて弱くなっていることを示しており、符谷⁴⁾、齊藤⁵⁾の報告と一致する傾向を示した。

窒息死後 24 時間を経過したコイ体内の赤血球は窒息死直後のものに比べ最小抵抗値、最大抵抗値は小さくなり、抵抗幅のみ増大した。そのため溶血曲線は食塩水の低濃度の方へ移動し、窒息したコイでは死後 24 時間を経過すると、その赤血球抵抗力は弱くならないでむしろ逆にやや強くなることを表わしている。この

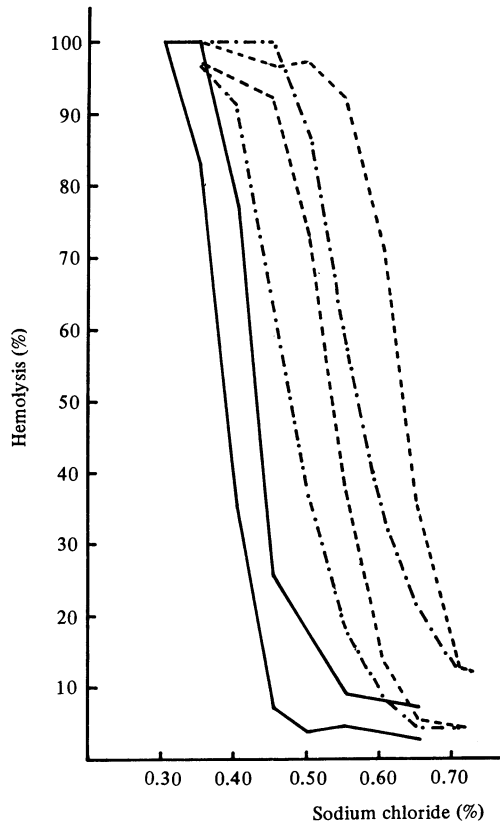


Fig. 2 Blood corpuscle resistance belts (Mean ± SD) of normal carp and of carp died of environmental hypoxia. Normal (—); immediately (---) and 24 hours (-.-) after death of environmental hypoxia.

結果は窒息による赤血球抵抗力の低下が単に赤血球自身の酸素欠乏のみに起因するのではなく、赤血球を囲んでいる血漿の性状の変化にも起因することを示唆している。齊藤⁵⁾は空中に放置して斃死させた魚の最大抵抗値が斃死直後、24時間後、48時間後と死後時間の経過と共に次第に増大し、赤血球抵抗力が弱くなると述べている。この本実験の結果との相異は、斃死および斃死後の放置を空中で行なったか、或いは水中で行なったかという条件の違いに由来するであろう。

シアン中毒死直後のコイでは抵抗幅がやや大きいことを除き、最小抵抗値、最大抵抗値、中間抵抗値は正常に生きているコイの値とほとんど等しく (Table 2)、コイが斃死しているのにもかかわらず、その赤血球抵抗力は正常に生きているコイのそれに等しいことを示している (Fig.3)。何故そのような赤血球抵抗力を示すかは不明であるが、溶存酸素不足により斃死したコイの血液性状に比べシアン中毒死したコイの血液性状は正常に生きているコイの血液性状により近い⁹⁾¹⁰⁾ことから、血漿の性状も正常な状態に近いことが類推され、そのような血漿の性状が正常と等しい赤血球抵抗力を赤血球にとらせる一因となっているのかも知れない。

シアン中毒死後24時間を経過すると最小抵抗値、最大抵抗値、中間抵抗値は中毒死直後に比べ明らかに増大し、赤血球抵抗力は弱まったが窒息死後24時間経過のものよりはやや強い。

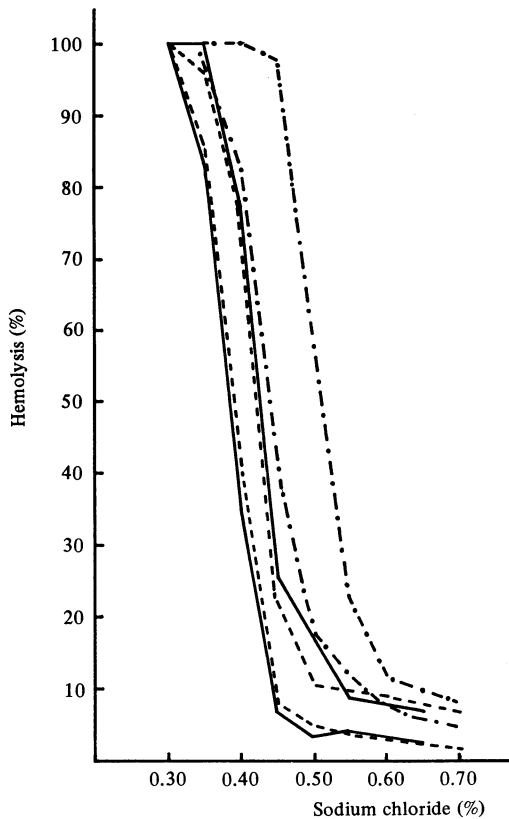


Fig. 3 Blood corpuscle resistance belts (Mean \pm SD) of normal carp and of carp died of cyanide poisoning. Normal (—); immediately (---) and 24 hours (-.-) after death of cyanide poisoning.

Table 2. Blood corpuscle resistance of carp died of environmental hypoxia and of cyanide poisoning

Condition	Resistance (NaCl %)		Difference* (NaCl %)	Mean resistance** (NaCl %)	Body weight (g)
	Minimal	Maximal			
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Normal	0.431 \pm 0.028	0.376 \pm 0.029	0.056 \pm 0.009	0.403 \pm 0.028	167 \pm 32.7
A	0.621 \pm 0.046	0.542 \pm 0.047	0.079 \pm 0.003	0.580 \pm 0.048	114 \pm 40.7
B	0.584 \pm 0.054	0.474 \pm 0.041	0.110 \pm 0.021	0.523 \pm 0.048	159 \pm 34.0
C	0.436 \pm 0.017	0.374 \pm 0.018	0.061 \pm 0.006	0.406 \pm 0.017	100 \pm 3.2
D	0.519 \pm 0.043	0.443 \pm 0.033	0.076 \pm 0.013	0.476 \pm 0.036	135 \pm 25.1

* Difference between the minimal and the maximal resistances.

** NaCl concentration at which fifty per cent of blood corpuscles hemolyze.
For further details see Table 1

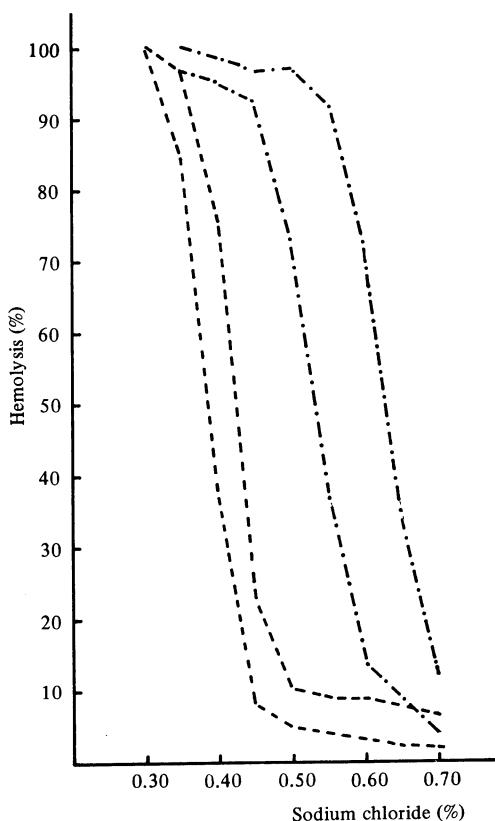


Fig. 4 Blood corpuscle resistance belts (Mean \pm SD) of carp immediately after death of environmental hypoxia (---) and of cyanide poisoning (---).

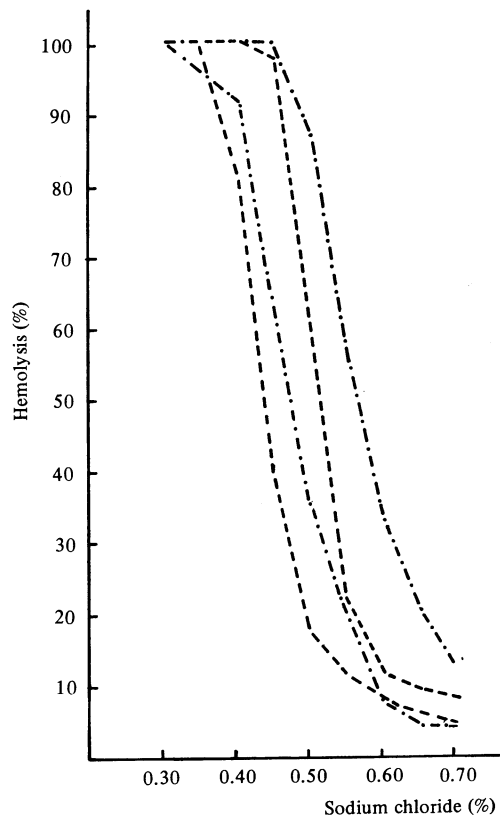


Fig. 5 Blood corpuscle resistance belts (Mean \pm SD) of carp 24 hours after death of environmental hypoxia (---) and of cyanide poisoning (---).

以上の諸結果から、斃死直後のコイの赤血球の溶血曲線を描き、赤血球抵抗力を測定することにより、その死因が溶存酸素不足による窒息であるのか、或いはシアニオンのように内窒息を惹き起す毒物であるのかをかなり正確に推定することが可能であると言えよう (Fig. 4)。しかし、死後 24 時間を経過するとそのような推定は困難であろう (Fig. 5)。また、死因が判明している場合には赤血球抵抗力を測定することによって大略の死後経過時間を知ることができよう。

引用文献

- 1) 山本きよみ・三輪史朗・末原ヤス子：臨床検査，**22**，125-133 (1978)
- 2) 柴田玉城：水研誌，**30**，21-26 (1935)
- 3) 齋藤 要：日水会誌，**20**，881-884 (1955)
- 4) 狩谷貞二：日水会誌，**15**，728-734 (1950)
- 5) 齋藤 要：日水会誌，**20**，885-887 (1955)
- 6) 田村 修・保田正人・藤木哲夫：日水会誌，**28**，504-509 (1962)
- 7) 高山晴義・大内 晟・難波憲二・村地四郎：魚病研究，**8**，119-126 (1974)
- 8) 金井 泉・金井正光：臨床検査法提要，第 27 版，p.113-116，金原出版，東京 (1975)

- 9) 村地四郎・難波憲二・国重泰生：昭和 47 年度日本水産学会春季大会講演要旨集， p. 46 (1972)
- 10) 村地四郎・難波憲二・八橋忠良・渡辺一典・大内 晟・高山晴義：昭和 48 年度日本水産学会講演要旨集， p. 41 (1973)

Summary

Blood corpuscle resistance (BCR) of carp significantly lowered immediately after death of environmental hypoxia from its normal level, while it remained at the same level as the normal one, when the fish was dead of cyanide poisoning.

However, 24 hours after the fish was dead, the BCR decreased in the case of death of cyanide poisoning, whereas it increased in the case of death of environmental hypoxia, compared with its level immediately after the fish died.

The results indicate that the measurement of BCR of fish within several hours after death may be applicable to judge whether the cause of fish death was the environmental hypoxia or not.