

マダイ摘出組織標本におけるグルコースおよび 脂肪酸遊離に与える各種ホルモンの影響

石岡 宏子

Effects of Epinephrine, Glucagon, Cortisol and Insulin on Hepatic Glucose Release and Free Fatty Acid Release in Isolated Tissues of the Red Sea Bream, *Pagrus major* (TEMMINCK *et* SCHLEGEL)

Hiroko ISHIOKA

In vitro studies were conducted on the metabolic effects of epinephrine, glucagon extracted from a mixture of bovine and porcine pancreas, cortisol and bovine insulin on isolated tissue samples of the red sea bream, *Pagrus major* (TEMMINCK *et* SCGLEL).

Liver slices incubated for one hour in Krebs' bicarbonate ringer blown with 95% O₂ and 5% CO₂ gas at 25°C released some amounts of glucose. Epinephrine (10μg/ml) and glucagon (17μg/ml) enhanced the glucose release from liver slices while cortisol (10μg/ml) and insulin (10μg/ml) suppressed partially the glucose output.

Epinephrine, glucagon and insulin were without effect on free fatty acid release from slices of liver, fin muscle and adipose tissue even after 3-hour incubation. Cortisol slightly stimulated free fatty acid release from liver slices.

In vitro, epinephrine, glucagon and insulin in red sea breams induced similar effects on carbohydrate metabolism to those in warm blooded animals.

魚類においても、ストレス反応時の特徴は血中エピネフリンやコーチゾール等のホルモン増加と血液中グルコースの増加にあることはよく知られている。

魚類のストレス反応時の血中グルコース増加は肝臓グリコーゲンに由来すると Demaël *et* Garin (1974, 1978) は述べているが、グルコースがこれらのホルモンによって肝臓よりどのように遊離されるか、また、魚類ではあまり研究されていない肝臓、その他の組織からの脂肪酸の遊離がホルモンによって制御されるかどうかを知ることはストレス反応時の代謝機構を明らかにするために重要なことである。ホルモンと血中グルコース増加の関係は主に in vivo 系の実験で観察されてきた。しかし、魚類の場合には、石岡 (1984) の報告にみられるように、in vivo 実験に際して、種々な“取り扱い”が強いストレッサーとなるので in vivo 実験系による現象

の解析は容易でない。

そのため、本報では摘出しスライスした肝臓、筋肉、腹腔内脂肪組織について、エピネフリン、グルカゴン、コーチゾール、インスリンが、グルコースおよび脂肪酸遊離に与える影響を *in vitro* 実験系で調べたのでその結果を報告する。

材 料 と 方 法

供試魚：マダイは、養殖三年魚を用いた。広島湾内養殖業者から購入し、船舶輸送した魚を水産研究所の1トンコンクリート水槽で生ガキを餌料として与え約1ヶ月間飼育した。水温は自然海水温で21.0～25.5℃の範囲にあった。実験前24時間は無投餌とした。

組織標本の調整：マダイを飼育水槽から取り上げ、直ちにキュビエ氏管より採血しできるだけ血液を除いた。その後体長、体重を測定し、開腹し、肝臓を取り出し、5mm程度の厚さのブロックとして切り出し、これを氷冷したカルシウム不含クレブス氏緩衝液に入れた。スタディ・リグス型スライサーを用いて常法により肝スライス標本を作製した。肝臓組織の比重を1として計算すると肝スライス標本の厚さは約0.45mmであった。

筋肉組織標本は、石岡(1983)の方法により、胸鱗骨上体表側筋肉を剝離して用いた。

腹腔内脂肪組織標本は卵巣や腸管の周辺から採取し、血管や腸間膜組織が入らないように注意して、これを50mg程度の細片としたものを用いた。

組織標本は氷冷したカルシウム不含クレブス氏緩衝液中に保存した後、培養緩衝液に入れ実験に供したが脂肪組織のみは氷冷の取り扱いを行わなかった。1回の実験では1個体の各組織標本を同一条件で同時に扱い、対照としては同一個体のものを用いた。

培養方法：培養液は肝臓からのグルコース遊離実験にはクレブス氏重炭酸緩衝液(pH 7.4)を用い、脂肪酸遊離実験にはクレブス氏磷酸緩衝液(pH 7.4)を用いた。20mlゴム栓付きフラスコにそれぞれの緩衝液を3mlずつ分注し、一定量のホルモンを添加した。対照区は緩衝液のみで、実験区には Epinephrine (30 μ g), Glucagon (50 μ g), Cortisol (30 μ g), Insulin (30 μ g), を添加した。用いたホルモンはいずれも Sigma 社の (-) Epinephrine No-E-4250, Glucagon No. G-4250 Hydrocortisone No. I-1-4001, Insulin No. I-5500であった。

組織標本は25℃の緩衝液中で15分間予備培養を行なった後、0.2～0.5mgの範囲で組織片を取り上げ、酸素95%炭酸ガス5%を吸き込みながら培養フラスコに入れ、クレブス氏重炭酸緩衝液中の組織標本は1時間、クレブス氏磷酸緩衝液中の組織標本は3時間の振盪培養を行なった。正確に規定時間後、培養フラスコを氷水中に入れて反応を停止させ、直ちに中の組織片を取り除いた。

重炭酸緩衝液は遊離グルコース量の定量に供した。一方、磷酸緩衝液中の取り出した組織片は重量測定後緩衝液と共に遊離脂肪酸の定量に供した。

分析方法：グルコースの定量は酵素法によった(藤沢メディカル：ニューグルコースタット「フジサワ」)。

脂肪酸定量は、重量測定後の組織標本を Dole 試薬でホモジナイズし、培養緩衝液と合わせ、

50mlの遠沈管に移した後、Dole 液で抽出し、Trout (1960) の方法により行なった。

結 果

重炭酸緩衝液中の肝臓組織標本からのグルコース遊離の結果を Table 1 に示した。in vitro 実験系へのホルモンの添加は肝臓組織からのグルコース遊離に影響を与えることが明らかとなった。対照区 (100%とする) に対してエピネフリン添加は、171.3%、グルカゴン添加は、165.7%とグルコース遊離量の増加を起した。これに対して、コーチゾールは93.3%、インスリンは86.8%となり、明らかに肝臓からのグルコース遊離を抑制する効果が認められた。

リン酸緩衝液中の肝臓、筋肉、脂肪組織からの脂肪酸遊離の結果を対照に対する%値で Table 2 に示した。この値からみると個体差が非常に大きく、一定の傾向はみられず、肝臓、脂肪組織、

Table 1. The effect of epinephrine, glucagon, cortisol and insulin on the glucose release from the sliced liver of the red sea bream in Krebs's bicarbonate ringer.

Fish number	Released glucose (mg/h/g tissue)				
	Control	Epinephrine* (10 μ g/ml)	Glucagon* (17 μ g/ml)	Cortisol** (10 μ g/ml)	Insulin* (10 μ g/ml)
1	5.74	6.64	6.30	5.17	4.82
2	5.77	9.34	9.30	5.61	4.43
3	10.46	14.32	14.34	9.93	8.69
4	6.27	15.00	13.54	5.56	5.76
5	8.81	13.97	12.80	7.83	6.71
6	8.47	10.59	9.14	8.20	7.36
7	7.53	8.79	9.43	7.80	7.17
8	0.53	0.63	0.75	0.50	0.65
9	6.94	14.76	15.60	4.99	4.88
10	2.73	8.95	7.87	2.92	2.22
mean \pm S. D. (%)	100.0	171.3 \pm 21.92	165.7 \pm 18.56	93.3 \pm 3.04	86.8 \pm 4.62

* Significantly different from controls ($p \leq 0.01$)

** Significantly different from controls ($p \leq 0.05$)

Table 2. The effect of epinephrine, glucagon, cortisol and insulin on free fatty acid release from isolated tissues of the red sea bream. The values are relative percents to the controls (mean \pm S. D.).

Tissue Preparation	Epinephrine (10 μ g/ml)	Glucagon (17 μ g/ml)	Cortisol (10 μ g/ml)	Insulin (10 μ g/ml)
Liver	118.8 \pm 25.24 (8)	113.2 \pm 22.09 (6)	116.9 \pm 13.76* (7)	119.3 \pm 40.89 (7)
Adipose tissue	103.9 \pm 25.12 (8)	109.4 \pm 36.63 (8)	100.1 \pm 22.07 (8)	90.05 \pm 18.24 (8)
Fin muscle	110.2 \pm 13.58 (8)	116.6 \pm 28.33 (7)	112.7 \pm 24.59 (6)	119.4 \pm 26.71 (8)

* Significantly different from controls ($p \leq 0.05$)

筋肉いずれの場合にもエピネフリン、グルカゴン、インスリンの統計的に有意な効果は認められなかった。ただし、コーチゾールは、肝臓における脂肪酸遊離を増加させる傾向があるらしい。しかしこの実験の値のばらつきから考えると実験例数をさらに増加してみる必要があろう。統計的に有意ではないが、平均値で比較する限り脂肪組織からの脂肪酸遊離が肝臓、筋肉におけるよりも、どのホルモンによっても小さな値を示した。

考 察

魚類の物質代謝におけるホルモンの作用機構に関する研究は哺乳動物に比べて非常に遅れている。その理由の一つは各魚種のホルモンの化学的構造の相違と活性の種特異性にあると考えられる。今回の実験で用いたホルモン4種類のうちグルカゴンとインスリンは、蛋白性ホルモンで哺乳類から抽出されたものを用いており、魚類のものとは化学的構造に一部分違いがある。ステロイドホルモンであるコーチゾールは多くの硬骨魚の血液中に存在する主たる Corticosteroid であることが確認されており、コルチコステロイドの実験においてよく用いられている。マダイについても、血液のジクロルメタン抽出物の中にコーチゾールが存在することを薄層クロマトグラフで確認することができた(石岡・石岡, 1978)。エピネフリンについては NAKANO AND TOMLINSON (1967) が鮭科魚類で哺乳類のものと同じであることを確認し、ストレス時の血液中エピネフリン変動に関する報告もみられる (MAZEAUD *et al.* 1977)。

エピネフリンの生理学的作用については、魚類に関しても鱗の色素胞の収縮と拡散、血管の運動性や血圧の変化、血中白血球数の変動等が研究されている。炭水化物代謝に与える影響については特に *in vivo* 実験でエピネフリンを注射した後の血液中のグルコース量増加の報告例が多い。MAZEAUD (1964) はコイに100 μ g/kg体重のエピネフリンを投与し、20 $^{\circ}$ Cで3時間後に、10 $^{\circ}$ Cでは10時間後に有意な血糖上昇を起したと報告した。BENTLEY AND FOLLETT (1965) は *Lampetra fluviatilis* にアドレナリン (0.2mg/個体) を注射して1時間後に有意な血液グルコース増加を、また LARSSON (1973) はウナギ *Anguilla anguilla* L. に0.5mg/kg体重、5mg/kg体重の L-epinephrine bitartrate を腹腔内注射した時には1時間後から始まって24時間以上継続する高血糖が認められたとしている。THORPE AND INCE (1974) は、*Esox lucius* L. の血管にカニューレーションを施しこれから直接血管内に投与する方法で0.05, 1, 5mg/kg体重の量のエピネフリン投与後30分から顕著な高血糖を認め INCE AND THORPE (1977) はウナギで同様な方法でアドレナリン25, 50 μ g/kgの投与が顕著な高血糖を起し、これの15分後から6時間に至る持続を観察している。MURAT (1976), MURAT AND SERFATY (1975) はコイに100 μ g/100g体重のエピネフリン注射で1時間後に6 $^{\circ}$ C低温時にも高血糖の傾向がみられることを観察したが、最大値に達する時間とその値は温度によって大きく異なることを報告している。また PERRIER *et al.* (1971) はニジマスに0.5mg/kg体重のエピネフリンを筋注し5時間後の血糖値増加を報告している。DEROOS AND DEROOS (1978) は、板鰓類 *Scyliorhinus stellaris* に75 μ g/kg体重のエピネフリンの動脈内直接注入により15分後から12時間以上にわたって続く高血糖を報告している。また、MORATA *et al.*

(1982 a, b) はニジマスにエピネフリンを腹腔内に注射した時に2時間後に高血糖を観察した。これらの諸報告は、投与方法、エピネフリンの化学的形態の相違には関係なく、エピネフリンは、円口類から板鰓類、硬骨魚類に至る魚類で哺乳類で認められたのと同じ高血糖を起すことを示しており、この高血糖の程度と持続時間や経時変化パターンは、投与量との関係が大きいことを示唆している。温度による差はあるものの反応の起り方(高血糖)が早いという点も共通しており、先に引用したように早い場合には投与後15分で明瞭な血糖上昇がみられる場合すらある。

魚類の *in vitro* 実験における肝臓からのグルコース遊離に関してはウナギで HAYASHI AND OOSHIRO (1975 a, b) が0.5 mM のエピネフリンが60分間でコントロールの約2倍のグルコースを遊離させたと報告し、同一魚種の灌流肝を用いた実験でも、エピネフリン 10^{-2} mM の添加は顕著なグルコース遊離を起したと報告している。UMMINGER AND BENZIGER (1975) は *Ictalurus nebulosus* 肝の5 mm厚さの組織片を3 mlの緩衝液に入れ、これに20 μ g/mlのエピネフリンを加えた時、30分間培養後のグルコース遊離が増大すると報告した。BIRNBAUM *et al.* (1976) はキンギョの遊離肝細胞で0.05 μ Mのエピネフリンが2時間にわたって直線的にグルコース遊離を増大させ続けると報告している。

このグルコース遊離に関するエピネフリンの効果は *in vivo* 実験系と *in vitro* 実験系で同一の傾向を示している。今回のマダイの肝スライス標本についても、個体差は大きいだが、10 μ g/mlのエピネフリンはグルコース遊離を促進する効果を持つことを示した。

エピネフリンの脂肪酸動員作用に関する報告例は少なく、今回のマダイ実験結果のように顕著な効果のみられなかった例もある。Farkas (1967) はコイに2 mg/fishのエピネフリンを注射した後2時間して血液および、腹腔内脂肪を採取し、それぞれの遊離脂肪酸量を定量し、哺乳類とは異なり、この成分の増加は認められなかったとしており、腹腔内脂肪を用いた *in vitro* 実験でも、エピネフリンによる脂肪酸遊離の効果は認められなかったとし、hormone sensitive lipase が存在しないのではないかと推論している。一方、先に述べた LARSSON (1973) によるウナギの *in vivo* 実験例では、高濃度(5 mg/kg)の注射では、1時間から24時間以上にわたる高脂肪酸血症が報告されている。MINICK AND CHAVIN (1973) はキンギョに10 μ g/kg体重のエピネフリンを筋注射した後15分後に初まる血清脂肪酸の低下を報告し、INCE AND THORPE (1975) は *Esox lucius* でカニューレーションによりエピネフリン0.05 mg/kg体重を注入して Minick AND Chavin と同様な血液中遊離脂肪酸の低下を報告した。このようにエピネフリンが血漿遊離脂肪酸量に対して全く相反する効果を持つと報告されている理由は明らかではない。今回の実験で用いたエピネフリン投与量は各魚種の *in vitro* 実験例で用いられた濃度の範囲内にあり、特に高い濃度ではないが、魚の生理学的攪乱時にみられる血中濃度よりは高い値である(MAZEUD *et al.* (1977))。また、反応時間は1時間および3時間で *in vivo* 実験で行なわれるような長時間ではない。これらを考え合わせると、魚類ではエピネフリンはグルコース遊離には強い作用を持つが、緊急時に、短時間のうちに脂肪酸を動員する反応系は確立されていないのではないかと考えられる。

グルカゴンに関する魚類での研究はあまり進んでいない。EPPLÉ (1969) は魚類におけるグルカゴン存在の報告をまとめ、さらに、哺乳類グルカゴンの効果に関して総括しているが、その

作用は未だ明確でないとしている。このホルモンは、種特異性がかなり高いが、一般的には哺乳動物のグルカゴン投与で、魚は高血糖を起すとされている。THORPE AND INCE (1974) は 1 mg/kg, 2 mg/kg の哺乳類グルカゴンの動脈内注入によって、Esox で高血糖を観察したが、血漿アミノ酸、コレステロールには変動をみていない。また彼ら (1977) は、ウナギ *Anguilla anguilla* に同じ処理をして15分後に最大血糖上昇を観察した。UMMINGER *et al.* (1975) は *Fundulus heteroclitus* を用いた *in vitro* 実験で、グルカゴンが肝臓のグリコーゲン・フォスホリラーゼ活性の減衰を抑制することを確認し、このホルモンがグリコーゲン分解に大きく影響することを報告している。また CHAN AND WOO (1978 a), INUI AND YOKOTE (1977) はウナギで 0.1 mg/kg の筋注、50~500 μ g/kg 腹腔内注射で有意な血糖値上昇を観察した。CARNEIRO AND AMARAL (1983) は *Pimelodus maculatus* で 2.5 mg/kg のグルカゴン腹腔内注射が15分後の有意な血糖上昇を示したとしている。これらはすべて硬骨魚において哺乳類のグルカゴンが血糖上昇作用を有することを示している。板鰐類に関しては、BENTLEY AND FOLLETT (1965), MURAT AND PLISETSKAYA (1977) によるとこの作用はみられない。グルカゴンの作用は硬骨魚においては反応の速度や血糖値の大きさ等エピネフリンの場合と類似している。今回の実験で哺乳類のグルカゴンを用いたマダイ肝スライスからのグルコース遊離増加はこれら諸報告と同一現象を示すものと考えられる。

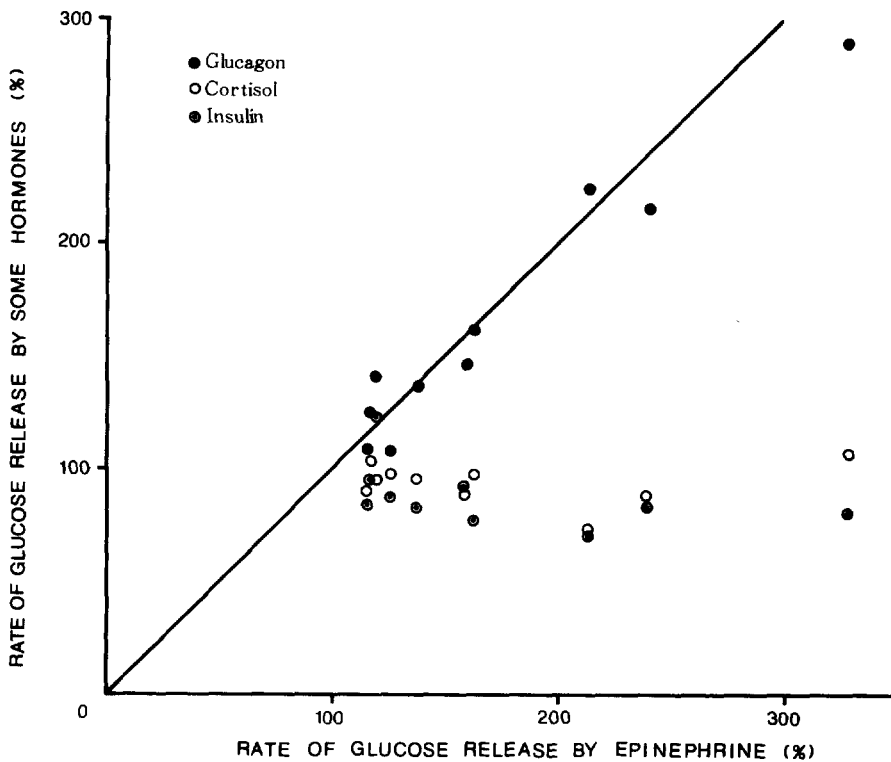


Fig. 1. The relationship between the relative rates of glucose release by epinephrine and those by glucagon, cortisol and insulin from the liver slices.

Fig. 1 にエピネフリンの効果とグルカゴンの効果を比較するために対照区に対するグルコース生成率を%で示し、両者の関係を示した。濃度はエピネフリン10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, グルカゴン17 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で異なるが、グルコース遊離に与える影響は類似しており、この現象は基質としてアミノ酸も乳酸も添加していないこと、およびグルコース遊離量が肝体重比が0.8以下の個体では小さいことから UMMINGER *et al.* (1975) の示すように、グリコーゲン分解によるグルコース遊離の促進であろうと推察される。MORATA *et al.* (1982 a, b) は、ニジマスにおける *in vivo*, *in vitro* 実験でアドレナリン、グルカゴン、cyclic-AMP 添加が肝スライスからのグルコース遊離を促進したにもかかわらず、肝組織のグリコーゲン含量に変化が認められなかったことから、このグルコース遊離は組織に内在する基質からの糖新生に由来するとしている。しかし遊離グルコース濃度とグリコーゲン重量を比較する場合には組織と血液の分布の量的検討が必要であろう。この点に厳密に焦点をあてた実験系を確立しないと判断は下せない。

グルカゴンと血液中遊離脂肪酸に関して TASHIMA AND CAHILL (1964), LARSSON AND LEWANDER (1972), CHAN AND WOO (1978 a) はそれぞれ *Opsanus tau*, *Anguilla anguilla*, *Anguilla japonica* でグルカゴン注射は遊離脂肪酸には変化を与えないとしているが、INCE AND THORPE (1975) は *Esox lucius* で投与後6時間して有意な上昇を認めている。今回の *in vitro* 実験からみると、グルカゴンは直接緊急に脂肪酸遊離に作用するとは考えられないが、この物質の作用についてはなお究明すべき問題点が残されている。

魚類における Corticosteroid の研究は IDLER AND TRUSCOTT (1972) の総説にあるように化学的性質に関してはかなり多くの論文がみられる。一般的に血中には条件によって変動はあるがコーチゾールの多いことはよく知られている。しかし、コーチゾールの生物学的作用に関しては糖新生に関するもの以外には報告が少ない。CHESTER-JONES *et al* (1972) は硬骨魚肝における糖新生へのコーチゾールの関与は基本的には哺乳類におけるものと変わらないとしたが、脂肪酸や、アミノ酸代謝にかかわる報告は極めて少ない。

Hill and Fromm (1968) はニジマス腹腔内にコーチゾールペレットを移植して1~2週間後に採血したところ血糖値は上昇していなかったとしている。

BUTLER (1968) はウナギ *Anguilla rostrata* に5 mg/kg体重のコーチゾールの腹腔内注射を10日から3週間続けた時、血中グルコース濃度が増加し、同時に筋肉、肝臓でグリコーゲンが増加したとしている。また、UMMINGER AND GIST (1973) はキンギョにコーチゾール1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 体重を2回注射し、2回目の注射後2時間して有意な血糖上昇を認めており、MURAT (1976) はコイにコーチゾール2.5mg/kg体重を注射し12時間後に血糖値は増加したと報告した。INUI AND YOKOTE (1975 a, b) はウナギ *Anguilla japonica* に2,10mg/kg体重のコーチゾールを5日~10日注射を続けた時、血糖値、肝グリコーゲン量、肝GOT、肝FDP、肝PFK 活性が増加したとし、さらに肝臓を除去したウナギにコーチゾールを注射(1回、10mg/kg体重、筋肉内)した後、血中グルコースは検出できず、血漿アミノ酸量の増加もみられなかったとしている。CHAN AND WOO (1978 b) は同じ種類のウナギに1 mg/kg体重のコーチゾールを筋肉注射し、酸素消費量増加、血清グルコース量増加、血清アミノ酸量増加、肝臓の蛋白質、グリコーゲン、脂質の増加等を見ており、これ

らの変化は2時間後から始まり、変動することを示している。彼等はコーチゾールが末梢組織の蛋白質や脂肪を分解し、肝臓でそれらからの糖新生を促進すると結論づけている。LIDMAN *et al.* (1979) はウナギ *Anguilla anguilla* に5 mg/kg体重のコーチゾールを腹腔内注射し1, 4, 14日後に取り上げ血清中グルコースの増加や肝グリコーゲンの増加を観察している。同時に血清中脂肪酸も測定しているが、変化はなかったとしている。一方、同じ実験で DAVE *et al.* (1979) はコーチゾール注射によって血液の脂肪酸組成が長期飢餓時のものと似てくることから、中性脂肪の分解と脂肪酸代謝がコーチゾールによって促進されるだろうと推論している。また、LEACH AND TAYLOR (1980) はコーチゾールブロック剤を水槽に加えておいて、魚にストレスを与えた時の血中コーチゾール、グルコース量を測定し、血液グルコースの増加の初期(1~3時間)はグリコーゲン分解により、6時間後の増加は糖新生によるものと推論した。さらに LEACH AND TAYLOR (1982) は *Fundulus heteroclitus* にコーチゾール200 μ g/尾を5日間注射し高血糖を認めており、この実験の際、それぞれの注射後には数時間以内にピークを作る高血糖の時期があることを認めている。

これらのコーチゾールの代謝に与える影響については、すべて *in vivo* 実験によるものであり、血糖値増加の現象はホルモン投与量が違っても同じように認められるが、それ以外の反応については、一致していない。特に CHAN AND WOO (1978) が指摘しているように、コーチゾール投与後の採血時間が影響するとすれば、結果に混乱が生じるのも無理はないと考えられる。

ところで、*in vivo* 実験ではコーチゾールの糖新生に関しては、基質がアミノ酸その他複数個存在していたこと、糖新生現象が現われるまでに6時間以上の *time lag* がみられること等が特徴的である。今回の実験では組織は神経支配、血流を通じての基質補給や他ホルモンの共存がない等の状態に置かれ、さらに1時間の初期の反応をみているという点で *in vivo* 実験とは大きく異なる。供試魚マダイの肝臓は、明らかに肝臓であり、Table 1の対照区の値にみられるように、培養液中に基質がなくとも、対照組織からのグルコース遊離はかなり大きい。これに対してコーチゾールを添加した時にはグルコース遊離が明らかに抑制されている。この抑制機構については全く不明である。また、3時間の振盪培養時に肝臓での脂肪酸遊離量は対照区に比べて多かったが、その値は個体差が大きく、今後さらに検討の必要があると考えられた。

インスリンの硬骨魚に対する血糖低下作用は比較的よく研究されている。LEIBSON AND PLISETSKAYA (1968) は *Scorpaena porcus*, *Spicara smaris*, *Trachurus mediterraneus*, *Gobiidae sp.*, *Cyprinus carpio* 等の淡水魚と海産魚で、30~80 IU/kg体重のインスリン腹腔内注射で、低血糖がみられたとし、TASHIMA AND CAHILL (1968) は *Opsanus tau* への100 IU/kgの牛豚インスリンの静脈注射によって、INUI AND YOKOTE (1975 C) は *Anguilla japonica* に5 IU/kg体重の量の豚インスリン注射によって、INCE AND THORPE (1976) は *Esox lucius* に2 IU/kgの cod insulin の動脈内注射によって、LEWANDER *et al.* (1976) は *Anguilla anguilla* に牛豚混合インスリンの腹腔内注射によって、OTTOLENGHI *et al.* (1982) は *Ictalurus melas* に60 IU/kgの牛インスリンの腹腔内注射によってそれぞれ顕著な低血糖を観察している。魚に投与したインスリンが血中遊離脂肪酸に与える影響については、血糖ほど一定の傾向は得られていない。TASHIMA AND CAHILL

(1968) は *Opsanus tau* で100U/kgのインスリン静脈注射で4時間後の血中遊離アミノ酸は変動しなかったと報告したが、INCE AND THORPE (1975) は *Esox lucius* に2IU/kg体重のインスリンを投与して著しい遊離脂肪酸の低下を観察した。さらに、MINICK AND CHAVIN (1972), LEWANDER et al. (1976) は、キンギョ、ウナギ *Anguilla anguilla* でインスリン投与後の血中遊離脂肪酸低下を報告している。これらの報告はインスリンが哺乳類のものでも魚類のものでも、また、投与方法が異なっても同様に(血糖)低下作用を起すことを示している。経時的なサンプリングを行なったデータからは1時間後にすでに低血糖効果は認められており、この反応の現われ方は早い。魚類の筋肉におけるグルコースの取り込み増大やグリコーゲン合成増加へインスリンが大きな効果を持つという報告は多いが、肝臓でのインスリンの炭水化物代謝に与える影響についての *in vitro* 研究は少ない。HAYASHI AND OOSHIRO (1975 b) は灌流肝でインスリン添加がグルコース遊離を抑制したと報告し、DE VLAMING AND PARDO (1975) は *Notemigonus crysoleucus* における *in vitro* 実験で温度条件によってインスリンによる肝グリコーゲン蓄積効果が変わることを報告した。

インスリン注射による血糖値低下は今回のマダイにおける *in vitro* 実験結果や他の *in vitro* 実験の報告にもみられるが、肝からのグルコース遊離抑制と、肝以外の組織(筋肉等)によるグルコース取り込み増大の相乗効果によるものではないかと考えられる。

Fig. 1 にみられるように対照に対するグルコース遊離割合はコーチゾールとインスリン添加時にはエピネフリンのそれとは無関係で100%以下の値で一定している。このことがどのような代謝機構上の意義を持つのか今のところ明らかではないが、コーチゾールとインスリンは、その作用機序においてエピネフリンやグルカゴンとは異質なものであることを示唆していると考えられる。

今回の *in vitro* 実験系に用いた肝臓は肝臓であること、グルコースを添加しない条件であること、反応温度25℃はマダイの生息範囲内であるが、やや高い温度であること、15分間の予備反応以後1時間の短時間の反応の結果を測定していること等、実験の反応系はいくつかの特徴を持っている。これらはストレス時のホルモン放出が代謝に与える直接的影響を考えるために設定した条件である。肝臓からのグルコース遊離はエピネフリンによって大きく促進されることが確認されたにもかかわらず、哺乳類で定説となっているホルモンによる脂肪酸遊離の制御は不明のままに残された。ストレス反応の中心的考え方である緊急なエネルギー動員の機構は変温動物である魚では哺乳類ほど質的、量的に進化していないと考えることもできる。これらの諸点に関しては他魚種との比較研究も必要であろう。今後、さらに、*in vivo*, *in vitro* 実験による魚類のストレス反応機構解明のための研究を積み重ねてゆく必要がある。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、御校閲と御鞭撻をいただいた東京水産大学教授、尾崎久雄博士、京都大学教授、池田静徳博士に感謝いたします。

摘 要

マダイのスライスした肝組織標本, 胸鰭骨上剝離筋肉および腹腔内脂肪組織細切片を用いた *in vitro* 実験で, 各種ホルモンが肝臓組織からのグルコース遊離, 及び肝, 筋, 脂肪組織からの脂肪酸遊離に与える影響を調べた。

クレブス重炭酸緩衝液 3 ml にスライス肝組織標本 200~500mg を入れ酸素 95% 炭酸ガス 5% の混合ガスを吹き込み 25°C で 1 時間振盪培養し, 緩衝液中に遊離されてくるグルコースを酵素法で定量した。ホルモンを添加しない同一魚体の対照区との比較で, エピネフリンとグルカゴンは肝からのグルコース遊離を促進し, コーチゾールとインスリンは肝からのグルコース遊離を抑制した。

クレブス磷酸緩衝液中で各種組織の振盪培養 3 時間を行なった後, 組織と緩衝液を Dole 液で振盪抽出を行ない, Trout の方法により, 脂肪酸の定量を行なった。エピネフリン, グルカゴン, インスリンは, どの組織についても特定の効果は認められなかった。コーチゾールは肝臓の遊離脂肪酸を増加させる傾向が認められたがその量は大きくなく, 今後の検討が必要と考えられた。

文 献

- BENTLEY, P. J. AND B. K. FOLLETT, 1965: The effects of hormones on the carbohydrate metabolism of the Lamprey, *Lampetra fluviatilis*. J. Endocr., 31, 127-137.
- BIRNBAUM, M. J., J. SCHULTZ AND J. N. FAIN, 1976: Hormone-stimulated glycogenolysis in isolated goldfish hepatocytes. American Journal of physiology, 231 (1), 191-197.
- BUTLER, D. G., 1968: Hormonal control of gluconeogenesis in the north American eel (*Anguilla rostrata*). Gen. & Comp. Endocrinol., 10, 85-91.
- CARNEIRO, N. M. AND A. D. AMARAL, 1983: Effects of insulin and glucagon on plasma glucose levels and glycogen content in organs of the fresh water teleost, *Pimelodus maculatus*. Gen. & Comp. Endocrinol., 49, 115-121.
- CHAN, D. K. O. AND N. Y. S. WOO, 1978a: Effect of glucagon on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. Gen. & Comp. Endocrinol., 35, 216-225.
- CHAN, D. K. O. AND N. Y. S. WOO, 1978b: Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. Gen. & Comp. Endocrinol., 35, 205-215.
- CHESTER-JONES, I., D. BELLAMY, D. K. O. CHAN, B. K. FOLLETT, I. M. HENDERSON, L. G. PHILLIPS, AND R. S. SNART, 1972: Biological actions of steroid hormones in nonmammalian vertebrates in Steroids in Nonmammalian Vertebrates (edited by Idler, D. R.) PP 415-480, Academic Press, New York and London.
- DAVE, G., M-L. JOHANSSON-SJÖBECK, A. LARSSON, K. LEWANDER AND U. LIDMAN, 1979: Effects of cortisol on the fatty acid composition of the total blood plasma lipids in the European eel, *Anguilla anguilla* L. Comp. Biochem. Physiol., 64A, 37-40.
- DEMAËL, A. et D. GARIN, 1974: Etude *in vitro* du métabolisme hydrocarboné du poisson au cours du choc thermique. Cahiers du Laboratoire de Montereau, N° 1, 27-32.
- DEMAËL, A. et D. GARIN, 1978: Effets du choc thermique de 10°C (15-25°C) sur certains paramètres métaboliques de la Tanche adaptée à des eaux diversement oxygénées. Cahiers du Laboratoire de Montereau, N°7, 15-26.

- DEROOS, R. AND C. C. DEROOS, 1978: Elevation of glucose levels by catecholamines in elasmobranch fish. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **34**, 447-452.
- DE VLAMING, V. L. AND R. J. PARDO, 1975: *In vitro* effects of insulin on liver lipid and carbohydrate metabolism in the teleost, *Notemigonus crysoleucas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **51B**, 489-497.
- EPPLE, A., 1969: The Endocrine Pancreas in Fish Physiology (Hoar & Radall Edit.) vol. 2, 275-319.
- EPPLE, A. AND T. L. LEWIS, 1977: Metabolic effects of pancreatectomy and hypophysectomy in the yellow american eel, *Anguilla rostrata* LeSueur. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **32**, 294-315.
- FARKAS, T., 1967: The effect of catecholamines and adrenocorticotrophic hormone on blood and adipose tissue FFA levels in the fish, *Cyprinus carpio* L. *Progr. biochem. Pharmacol.*, **3**, 314-319.
- HAYASHI, S. AND Z. OOSHIRO, 1975a: Glycogenolysis and gluconeogenesis by eel liver slices. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, **24**, 119-122.
- HAYASHI, S. AND Z. OOSHIRO, 1975b: Gluconeogenesis and glycolysis in isolated perfused liver of the eel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 201-208.
- HILL, C. W. AND P. O. FROMM, 1968: Response of the interrenal gland of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to stress. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **11**, 69-77.
- IDLER, D. R. AND B. TRUSCOTT, 1972: Corticosteroids in Fish, in *Steroids in Nonmammalian Vertebrates* (edited by D. R. Idler), 127-252, Academic Press, New York and London.
- INCE, B. W. AND A. THORPE, 1975: Hormonal and metabolite effects on plasma free fatty acids in the northern pike, *Esox lucius* L. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **27**, 144-152.
- INCE, B. W. AND A. THORPE, 1976: The *in vivo* metabolism of ¹⁴C-glucose and ¹⁴C-glycine in insulin-treated northern pike (*Esox lucius* L.). *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **28**, 481-486.
- INCE, B. W. AND A. THORPE, 1977: Plasma insulin and glucose responses to glucagon and catecholamines in the European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **33**, 453-459.
- INUI, Y. AND M. YOKOTE, 1975a: Gluconeogenesis in the eel-IV Gluconeogenesis in the hydrocortisone administered eel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 973-981.
- INUI, Y. AND M. YOKOTE, 1975b: Gluconeogenesis in the eel-V Effects of alloxan and hydrocortisone on amino acid mobilization in the hepatectomized eel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 1101-1104.
- INUI, Y. AND M. YOKOTE, 1975c: Gluconeogenesis in the eel-III. Effects of mammalian insulin on the carbohydrate metabolism of the eel. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **41**, 965-972.
- INUI, Y. AND M. YOKOTE, 1977: Effects of glucagon on amino acid metabolism in Japanese eels, *Anguilla japonica*. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **33**, 167-173.
- 石岡清英・石岡宏子, 1978: コーチゾールラジオイムノアッセイの標準曲線のあてはめに関する検討. 南西海区水産研究所報告, (11), 65-74.
- 石岡宏子, 1983: *In vitro* 代謝研究のためのマダイの摘出筋肉標本. 日水誌, **49**(10), in print.
- 石岡宏子, 1984: 麻酔および取り扱いストレス時の血液性状変化. 南西水研報告, (16), 53-62.
- LARSSON, A. AND K. LEWANDER, 1972: Effects of glucagon administration to eels (*Anguilla anguilla* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, **43A**, 831-836.
- LARSSON, Å. L., 1973: Metabolic effects of epinephrine and norepinephrine in the eel, *Anguilla anguilla* L. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **20**, 155-167.
- LEACH, G. L. AND M. H. TAYLOR, 1980: The role of cortisol in stress-induced metabolic changes in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **42**, 219-227.
- LEACH, G. J. AND M. H. TAYLOR, 1982: The effects of cortisol treatment on carbohydrate and protein metabolism in *Fundulus heteroclitus*. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **48**, 76-83.
- LEIBSON, L. AND E. M. PLISETSUKAYA, 1968: Effect of insulin on blood sugar level and glycogen content in organs of some cyclostomes and fish. *Gen. & Comp. Endocrinol.*, **11**, 381-392.

- LEWANDER, K., G. DAVE, SJÖBECK, M-L. J., A. LARSSON AND U. LIDMAN, 1976: Metabolic effects of insulin in the European eel, *Anguilla anguilla* L. Gen. & Comp. Endocrinol., 29, 455-467.
- LIDMAN, U., G. DAVE, M-L. JOHANSSON-SJÖBECK, A. LARSSON AND K. LEWANDER, 1979: Metabolic effect of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* (L). Comp. Biochem. Physiol., 63A, 339-344.
- MAZEAUD, F., 1964: Vitesse de production de l'hyperglycémie en fonction de la température chez la carpe. Intensité de la réponse en fonction de la dose d'hormone. C. R. Soc. Biol., 158, 36-40.
- MAZEAUD, M. M., F. MAZEAUD AND E. M. DONALDSON, 1977: Primary and secondary effects of stress in fish: Some new data with a general review. Trans. Am. Fish. Soc., 106 (3), 201-218.
- MINICK, M. C. and W. CHAVIN, 1972: Effects of vertebrate insulins upon serum FFA and phospholipid levels in the goldfish, *Carassius auratus* L. Comp. Biochem. Physiol., 41A, 791-804.
- MINICK, M. C. and W. CHAVIN, 1973: Effects of catecholamines upon serum FFA levels in normal and diabetic goldfish, *Carassius auratus* L. Comp. Biochem. Physiol., 44A, 1003-1008.
- MORATA, P., A. M. VARGAS, M. L. PITA AND F. SANCHEZ-MEDINA, 1982a: Hormonal effects on the liver glucose metabolism in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Comp. Biochem. Physiol., 72B, 543-545.
- MORATA, P., A. M. VARGAS, M. L. PITA AND F. SANCHEZ-MEDINA, 1982b: Involvement of gluconeogenesis in the hyperglycemia induced by glucagon, adrenalin and cyclic-AMP in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol. 73A (3), 379-381.
- MURAT, J. C. et A. SERFATY, 1975: Effets de l'adrenaline, du glucagon et de l'insuline sur le métabolisme glucidique de la Carpe: influence de la température. C. R. Soc. Biol., 169, 228-232.
- MURAT, J. C., 1976: Recherches sur la mobilisation des glucides tissulaires chez la carpe. These présentée à l'université Paul Sabatier Toulouse, 1-164.
- MURAT, J. C. et E. M. PLISETSKAYA, 1977: Effets du glucagon sur la glycémie, le glycogène et la glycogène-synthetase hépatique chez la Carpe et la Lamproie. C. R. Soc. Biol., 171, 1302-1305.
- NAKANO, T. AND N. TOMLINSON, 1967: Catecholamine and carbohydrate concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to physical disturbance. J. Fish. Res. Bd. Canada, 24 (8), 1701-1715.
- OTTOLENGHI, C., C. PUVIANI, A. BARUFFALDI AND L. BRIGHTI, 1982: "in vivo" effects of insulin or carbohydrate metabolism of catfish (*Ictalurus melas*). Comp. Biochem. Physiol., 72A, 35-41.
- PERRIER, H., C. PERRIER et J. GRAS, 1971: Etude l'hyperglycémie adréalinique chez la Truite arc-en-ciel d'élevage (*Salmo gairdnerii* RICHARDSON): action des substances adréolytiques. C. R. Soc. Biol., 165, 2141-2144.
- TASHIMA, L. AND G. F. CAHILL JR., 1964: Role of glucagon and insulin in the carbohydrate metabolism of the toadfish. Excerpta Medica: International congress Series, 74, 140.
- TASHIMA, L. AND G. F. CAHILL JR., 1968: Effects of insulin in the Toadfish, *Opsanus tau*. Gen. & Comp. Endocrinol., 11, 262-271.
- THORPE, A. AND B. W. INCE, 1974: The effects of pancreatic hormones, catecholamines and glucose loading on blood metabolites in the northern pike (*Esox lucius*). Gen. & Comp. Endocrinol., 23, 29-44.
- TROUT, D. L., E. HARVEY ESTES, JR., AND J. SAMUEL, 1960: Titration of free fatty acids of plasma: a study of current methods and a new modification. J. Lipid Research. 1, (3), 199-202.
- UMMINGER, B. L. AND D. H. GIST, 1973: Effects of thermal acclimation on physiological responses to handling stress, cortisol and aldosterone injections in the goldfish, *Carassius auratus*. Comp. Biochem. Physiol. 44A, 967-977.
- UMMINGER, B. L. AND D. BENZIGER, 1975: In vitro stimulation of hepatic glycogen phosphorylase activity by epinephrine and glucagon in the brown bullhead, *Ictalurus nebulosus*. Gen. & Comp. Endocrinol., 25, 96-104.
- UMMINGER, B. L., D. BENZIGER AND S. LEVY, 1972: In vitro simulation of hepatic glycogen phosphorylase activity by epinephrine and glucagon in the killifish, *Fundulus heteroclitus*. Comp. Biochem. Physiol., 51C, 111-115.