

# 生活環境の違いに着目したヘビ類胸 大動脈の薬理学的特徴に関する研究

鹿児島大学大学院共同獣医学研究科 獣医学専攻

大田和朋紀

2023年11月

## 目次

第1章 緒論 .....	1
第2章 実験方法 .....	15
2-1 標本作製 .....	15
2-2 平滑筋の収縮・弛緩反応の測定 .....	17
2-3 試薬 .....	18
2-4 実験結果の解析と統計的評価 .....	20
2-5 図表 .....	21
第3章 地上性ハブの胸大動脈における血管反応性の特徴および奄美大島と徳之島の 個体間における種内比較 .....	23
3-1 序文 .....	23
3-2 方法 .....	25
3-3 結果 .....	26
3-4 考察 .....	27
3-5 図表 .....	32
第4章 半樹上性トカラハブの胸大動脈における血管反応性の特徴 .....	35
4-1 序文 .....	35
4-2 方法 .....	36
4-3 結果 .....	38
4-4 考察 .....	41
4-5 図表 .....	49
総合考察 .....	57
総括 .....	64
引用文献 .....	66
謝辞 .....	74

## 第1章 緒論

へビ類は進化の過程で様々な環境に適応し、その適応に関するメカニズムが解明できれば進化学や生態学に寄与できる可能性がある。へビ類は環境適応の一例として生活環境ごとに頭部への血流を維持するために内臓の形態（心臓と頭部の相対的な距離）が異なることが報告される、興味深い分類群である。しかし、その環境適応に関する研究は臓器の位置など肉眼的所見によるものがほとんどであった。本研究では、血流を維持するために心臓の位置が異なるのであれば、血管反応性にも違いが生じている可能性があると考えた。そこで、へビ類の血管反応性の実態を把握することで環境適応に関するメカニズム解明に寄与し得る知見を収集することを目指した。へビ類はその環境適応能に加えて外部形態が基本的に同一（四肢を欠き、体躯が細長く、全身が鱗で覆われる等）であるため、系統群内の種間変異を研究するのにも適した分類群であり、異なる生活環境のへビ類の血管反応性を比較することで様々な生活環境に適応する生理的なメカニズムの実態を把握出来る可能性がある。

へビ類は約1億7千年前に出現したといわれており[18]、その起源はトカゲ類が地中や水中に進出・適応進化した結果、四肢が退化し生じた生物とされている[6,16,17,74]。系統樹もトカゲ類の一部からへビ類が分化したことを示しておりトカゲ類やへビ類を含む有鱗目のうち、へビ類はオオトカゲ下目やイグアナ下目も含めて有毒有鱗類（Toxicofera）を形成し、へビ類のみでへビ下目（Serpents）を形成している[77,93]（図1-1）。へビ類は進化する過程で様々な環境に進出した結果、現存するへビ

類は空中を除くほぼすべての環境に目（order）レベルで適応しており、環境への適応能力が高いと言える。

現生のへび類は地上、地中、樹上、水中といった異なる環境に適応した結果、生活環境により肺の長さ、心臓と頭部の相対的な位置といった臓器の形態、さらに血圧まで異なることが報告されている[55]。このように様々な環境に進出していることと、へび類の四肢がないというその身体の構造から、頭部、心臓、尾端まで一直線と捉えられ重力、静水圧の影響を受けやすく[54]、古くから重力に関する実験モデルとして選択されてきた歴史がある[3,22]。

へび類の心臓の位置は生活環境により異なるが、脊椎動物について全身への血液循環を考慮した場合、理論的には心臓は体内の中心部に位置するのが効率的である。だが、血流の循環先である臓器や器官の重要度は一律ではなく、その中でも重要な臓器の一つとして脳が挙げられる。脳への血流が滞ること、すなわち脳貧血になると行動不能になり、生理的・捕食-被食の側面からも致死的な状況に陥る。そのため、四肢の先端や尾部と比較すると頭部（脳）への血流確保は重要であり心臓は身体の前方に位置することがほとんどである。たとえば脳への血流確保が重要な例として、ヒトは直立し頭部が心臓よりも上部に位置するため、重力に逆らい血液を頭部に運搬するため高い血圧と高いポンプ機能を有している[79]。さらに起立性低血圧のように、起立という日常動作であっても血圧が低下し脳への血流量が低下すれば意識を消失する場合

もある[79]。ほかにも頭部への血流確保が重要であることを示す例として、キリンは心臓と頭部に物理的な距離が生じ、かつ心臓よりもはるかに高い位置に頭部があるため、通常の血圧では脳に血液を送ることができない。そのため、脳への血流量を確保するために生理的に高血圧であることが知られている[1,62]。このように頭部への血流を維持することは陸生の動物にとって至上命題の一つといえる。

頭部への血流確保以外にも血液と重力（静水圧）の関係として、血液は重力に従い、身体の下部：四肢の末端に溜まる傾向にあるが、心臓の拍動のみで下半身の血液を心臓まで戻すことは困難である。そのため下腿三頭筋などの収縮による血液を戻す仕組み（筋肉ポンプ）などが存在する[87]。対して水中や宇宙空間では重力がないもしくは少ないため静水圧が消失し、身体の頭側に通常よりも多くの血液が循環する結果、頭部浮腫“moon-face”を起こすことが知られている[92]。このように、重力や生活環境と血流・血圧は密接に関係しており、それらは重力生物学や宇宙生物学として生物学の一部門を形成している[23,103]。

血流と血圧を決定する要因として、血圧は血液量と血管抵抗の積により決定し、血管抵抗は血管径と血液の粘性に依存する[76]。そして、血管径は血管反応性（血管収縮と血管拡張）により調節されている。血管反応性は血管作動性物質（循環するホルモンや自律神経末端から分泌されるノルアドレナリン（NA）やアセチルコリン（ACh）などの物質）により調節される[76]。つまり、血流や血圧だけではなく血管反

応性と生活環境にも関連がある可能性はあるものの、それを研究・解明した研究例はほぼない。そのため、本研究では生活環境と血管反応性の関係性に着目して、異なる生活環境のへび類の血管反応性を比較することで生活環境と血管反応性の関係性を把握することを目的とした。ただし、血管反応性に差異が生じていた場合でも系統的な視点から考察する必要性には留意した。

血管反応性の比較に係るテーマとして、反応の方向性（収縮か弛緩か、または無反応）、関連する受容体の種類、薬物感受性（ $pEC_{50}$ 、 $pD_2$  など）、受容体の発現部位（血管平滑筋か血管内皮細胞）、発現する遺伝子やタンパク質の同定、細胞内メッセンジャー（cAMP、関連する G 蛋白質）の推定などが挙げられる。本研究では、生活環境の異なる種における血管反応性に違いが生じているかを検証するため反応の方向性、関連する受容体の種類、薬物感受性に重点を置き、それ以外の検証については血管作動性物質ごとに適宜行う事とした。対象動物としては先に述べたように、古くから重力に関する実験動物として用いられてきた歴史があること、さらに生活環境の比較においても有用な動物であるへび類を対象とした。

使用する血管としては全身循環において主だった血管の一つであり心臓に直結することで血圧・血流の影響を多く受ける胸大動脈を選択した。哺乳類はもちろんへび類を始めとする爬虫類、ひいては両生類や魚類まで胸大動脈を扱った先行研究が比較的多いため、へび類の種間における比較に加えて、進化・系統的な視点からも他の種群

との比較も行いやすいと考えた。ただし、ヘビ類を始めとして爬虫類では横隔膜がなく、胸腔と腹腔といった境界が存在しない[54]。そのため、厳密には下降大動脈が正確な表現となる[54]が、先行研究や哺乳類との比較考察のため、本研究では胸大動脈として記述する。

血管反応性の測定にはオルガンバス装置による血管張力の測定を主に用いた。オルガンバス装置は単離された臓器や組織に薬物の投与や電気刺激を与えるなどによりその機能を測定するための装置である。オルガンバス装置は本研究のように血管平滑筋の張力測定だけでなく、回腸、結腸、精管、気管、膀胱、海綿体の平滑筋の収縮に関する研究に用いられてきた[4,14,15,26,31,87]。平滑筋組織の収縮はミオグラフで容易に測定することができるため、平滑筋の生理学的反応は他の組織よりも容易に定量化できる。オルガンバス装置は神経組織や筋肉などの興奮性組織に対する作動薬や拮抗薬の研究をするために、19世紀末ごろから用いられ、平滑筋以外にも上皮などの研究にも適応されてきた[52]。ただし、近年ではコンビナトリアルケミストリーにおける受容体に対する薬物の作用を研究するために、ハイスループットスクリーニング、ウルトラハイスループットスクリーニング、ハイコンテンツスクリーニング、ゲノム薬理学、プロテオーム解析などの技術に取って代わられている[99]。しかし、現在でもオルガンバスによる張力測定の研究は行われており、例えば発現する受容体が推定でき

た場合でも、反応の有無・その方向性は実際に適したアゴニストを作用させるまでは不明であることから血管反応性を観察する手法としては優れているためである。

前述したヘビ類の生活環境に適応した内臓の形態差について、樹上性のヘビ類では重力に逆らい、頭部（脳）への血流量を確保するため頭部と心臓の距離が相対的に近くなる。対して、水中性のヘビ類では浮力により重力による静水圧をほとんど相殺できるため、心臓はより中央部に位置する[55]。地上性のヘビでは樹上性よりも心臓は頭部に近くないが、水中性ほどは中心部に近くなく、両者の中間に位置している[55]。また、血圧なども首の向きなどで変化し、首の向きが0度、45度、90度になると心拍、血圧が上昇することが報告されている[53]。このように、ヘビ類は生活環境に応じて臓器の形態や血圧まで変化させている。

ヘビ類の血管反応性に関する先行研究はほとんどが単独ないし2種類の血管作動性物質に対する反応性を検討しており[49,102,105]、複数の血管作動性物質を調査した例は Conklin et al (1992) [22]のみである。加えて、複数種のヘビ類の血管反応性を比較した例やレビューはない。これまでの先行研究の報告から、ヘビ類の血管反応性の傾向を可能な限り血管作動性物質ごとにまとめると NA（収縮）[22,105]、アンジオテンシン（Ang）II（収縮）[22,28,105]、ヒスタミン（His）（収縮）[22]、イソプロテレノール（Isop）（収縮）[38]、ACh（弛緩）[22,49]となり、研究例は多くない。また報告されている種は系統的に異なるが（図 1-1）、それにもかかわらず観察された種では同



様の結果が得られているため、ヘビ類における血管反応性は異なる系統に関わらず類似したものである可能性があった。

過去に報告されている血管作動性物質のうち唯一弛緩反応を示す ACh に着目してみると進化系統学的に爬虫類において反応の変化が生じた可能性が考えられた。この理由としては ACh の反応は魚類[7,69]、両生類[50,58]では収縮反応であり、爬虫類（トカゲ、カメ）では収縮[58,71]、ヘビでは弛緩[22,49]、鳥類、哺乳類では弛緩[71,78]と、種間による差異が認められ系統進化によって変化したように思われる。これは、進化の過程で完全に陸上進出した結果、重力に適応する必要があり、血管内皮細胞の機能も変化した可能性がある。とくに前述したようにトカゲ類の一部から進化したものがヘビ類であるため[77,93]（図 1-1）、ACh の弛緩反応すなわち血管内皮細胞の機能の発達などは爬虫類（特にヘビ類）にて新たに生じたのではないかと考えた。

ACh が弛緩反応を示したヘビ類、レッドサイドガータースネーク (*Thamnophis sirtalis infernalis*) [49]とイエローラットスネーク (*Pantherophis obsoletus*) [22]は進化的にみて比較的新しく分化したヘビであるため（図 1-1）、この 2 種では ACh が弛緩反応を示す、すなわち血管内皮細胞の機能が発達していたのかもしれない。過去に報告されたヘビの種と系統的關係を考えると、クサリヘビ科 (Viperidae) は ACh の検証はされていないが、NA、Ang II、Isop に対する血管反応性が報告されている[22,28,36]。さらに先の 2 種の系統の外群を形成しているので（図 1-1）、クサリヘビ科のヘビは ACh

に関わらず血管反応性を把握することは血管内皮細胞や血管平滑筋の進化的考察にも有用であると考えた。加えて、後述するように生活環境の違いと系統的要因の考察する点からもクサリヘビ科のヘビ類が対象種として適当と考えた。

科レベルではクサリヘビ科のヘビは対象種として適当と思われるが、サンプル調達の側面からも対象種としての妥当性を検討した。日本国内ではウミヘビを含めて46種のヘビが生息している[38]が、系統的に姉妹群を形成しながら生活環境が異なる種を含む属 (Genus) (ここではより近縁であることを考慮して属レベル) で検討した。特に樹上性、半樹上性の種を有する属が少なく、かつ樹上性、半樹上性の定義が難しく野外観察などにより定量的にデータを記録した研究例はほとんどないため、主に文章として樹上性、半樹上性という記述に基づき判断した。その結果、日本産ヘビ類で樹上性もしくは半樹上性としてトカラハブ、サキシマバイカダ、イワサキセダカヘビが候補に挙げられた。それぞれハブ属 (*Protophrops*) やオオカミヘビ属 (*Lycodon*)、セダカヘビ属 (*Pareas*) に属するが、同属内に異なる生活環境の種を有するのはハブ属とオオカミヘビ属であるため、セダカヘビ属は候補から除外した。

ハブ属、オオカミヘビ属のそれぞれ科としてはクサリヘビ科 (*Viperidae*) とナミヘビ科 (*Colubridae*) に属する。トカラハブやサキシマバイカダは環境省レッドリスト[60]の準絶滅危惧種に指定されており可能な限り野生個体を採取・安楽死せずに済む方法を模索した。上記の候補種のうち、ハブ属の各種 (特にハブ) は咬傷により最悪

の場合、死に至る可能性もある毒蛇であることから沖縄県、鹿児島県および十島村が有害動物として買取・駆除を行っている[48,68]。その歴史は古く、1860年代には薩摩藩が買取を開始したとされる[68]。このような背景から、駆除個体の活用を図ることとした。先に述べたクサリヘビ科のヘビが血管反応性を比較する上でも適切であることから、本研究においてはクサリヘビ科のハブ属を対象とすることにした。次に具体的な種を検討した。

ハブ属のヘビは外来種も含めて日本に4種；トカラハブ (*Protobothrops tokarensis*)、ハブ (*Protobothrops flavoviridis*)、タイワンハブ (*Protobothrops mucrosquamatus*)、サキシマハブ (*Protobothrops elegans*) 生息している[38]。これら4種の系統的な関係はまずトカラハブとハブ (奄美群島の個体群) が姉妹群を形成し、ハブ (沖縄諸島個体群) を含めた系統群を形成する。そして、サキシマハブとタイワンハブはそれらで単系統を形成し、ハブ、トカラハブの系統とは側系統を形成する[98] (図 1-2)。以上を勘案の上、生活環境の比較対象としてはハブ (奄美群島個体群) とトカラハブを用いることとした。

さらに生活環境と血管反応性の比較する上で、ハブには興味深い通説が存在する。それは奄美大島と徳之島に生息するハブの生活環境および行動性について、両島のもの同種であるにもかかわらず、徳之島のハブは樹上によくおり、奄美大島のハブは地上によくいるというものである[68,80]。加えて、徳之島のハブは他の島のハブと比

べて気性が荒いすなわち凶暴であるとする通説も存在する[68,80]。ヒトでは血圧や血管反応は気性や行動性とも関係があるとする報告も存在することからも[67,73]、ハブ、トカラハブの種間比較に加えて、ハブにおいては種内変異にも着目することにした。このため系統的に近縁で生活環境が異なるハブとトカラハブを用いた血管反応性の比較に加えて、奄美大島と徳之島のハブの血管反応性も比較することにした。

通常、同種であれば個体差を除き血管反応性を含めた生理的な機能は同様のものである。しかし、例えばヒトの鎌状赤血球の例のように本来は貧血を起こす劣勢形質で生存に不利であってもマラリアに抵抗性をもつため一定数の人がその形質を保持している場合や、ヤギの高標高地の個体群と低標高地の個体群で遺伝子の発現が異なる例もある [56,85]。このように同種であっても環境要因などにより変異が生じることがある。ハブにおいても、島嶼個体群において何らかの差異が生じている可能性は否定できない。同種でありながら形質に差異が生じるのは進化の過程として一般的であり、それは上記のように特定の疾病に抵抗性を持つ場合、異なる環境（高地における低酸素状況）に順応する場合、地理的な隔離により遺伝的な隔離が起きる場合など様々である。

血管反応性について、当研究室ではこれまで様々な種や血管における血管反応性に関する研究を行ってきた[40-46,64-66,70,101,104]。その結果、種が異なる系統的な要因以外に血管反応性が異なるのは血管が異なる場合がある[64,66,70]。これは例えば、運

動時と食事時などで血液が必要な器官は異なるため血流量を調整するために同じ血管作動性物質に対しても異なる反応を示すのは当然である。他の要因として個体の栄養状況[43,65]や病的状況[45]により血管反応が異なることを報告されている。もし、血管反応性に違いが生じていた場合には、環境要因以外のこういった要因も考慮が必要である。

仮に血管反応性と生活環境の関係性が得られた場合は、生態学や行動学にも大きく寄与できる可能性がある。たとえば、ハブの生活環境および行動に関する島嶼間の違いが通説でしかないのは、従来の生態学・行動学の調査では証明しにくいためと考えられた。その理由として、地上と樹上ではハブの見つけやすさが異なるため、発見率にバイアスがかかることが予想される。同様の例は、同じく樹上で行動する霊長類に関する調査では樹上の個体を観察するためにカメラトラップといった、従来の目視観察以外の方法が用いられ始めていることから推測できる[12,41]。環境ごとの発見率の違いに加えて、ヘビ類に関する研究は、その隠遁的な生態から個体の発見が困難である種が多いため調査が難しく、絶滅危惧種の保全といった緊急性の高い分野だけでなく 基礎的な研究分野さえ進みにくいのが実情である[13,95,96]。これらの背景から、上記のハブに関する通説にこれまで言及した学術的な報告は見当たらず、ひとつの通説として扱われてきた。

以上のことから、本研究において、未だ基礎研究も少ないへビ類の血管反応性の基礎的データを収集し、系統分類学的な側面と生活環境の側面からへビ類の血管反応性に係る比較・考察を試みた。

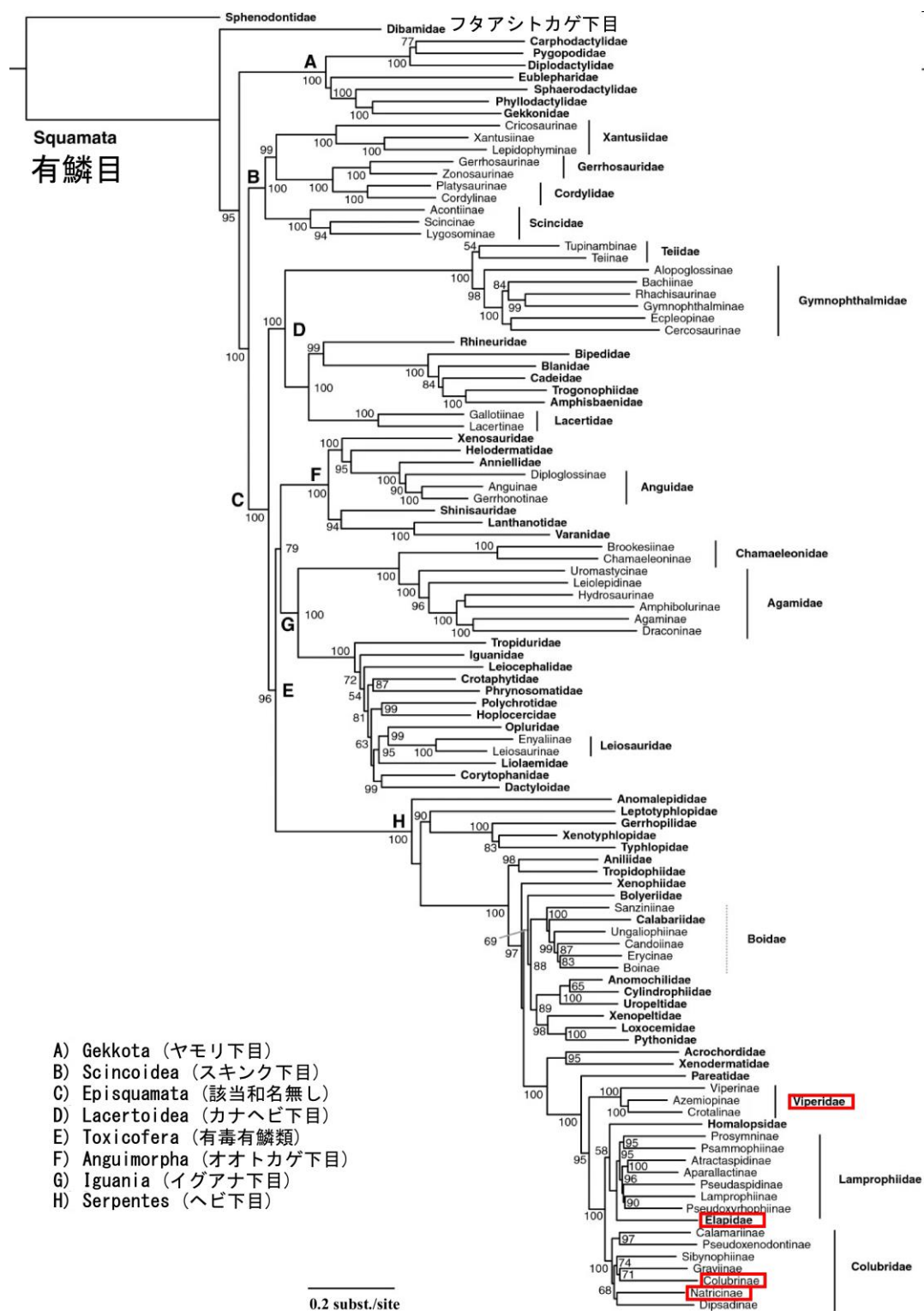


図1-1. 有鱗目の系統樹 (Pyron et al. 2013[77]の Figure 1 を一部改変)

12 の遺伝子の最尤度解析から得られた有鱗目 4161 種の系統樹。先端は科もしくは亜科を示す。節の数字は 50%以上の SHL 値を示す。赤枠は血管反応性の報告がある科を示す。

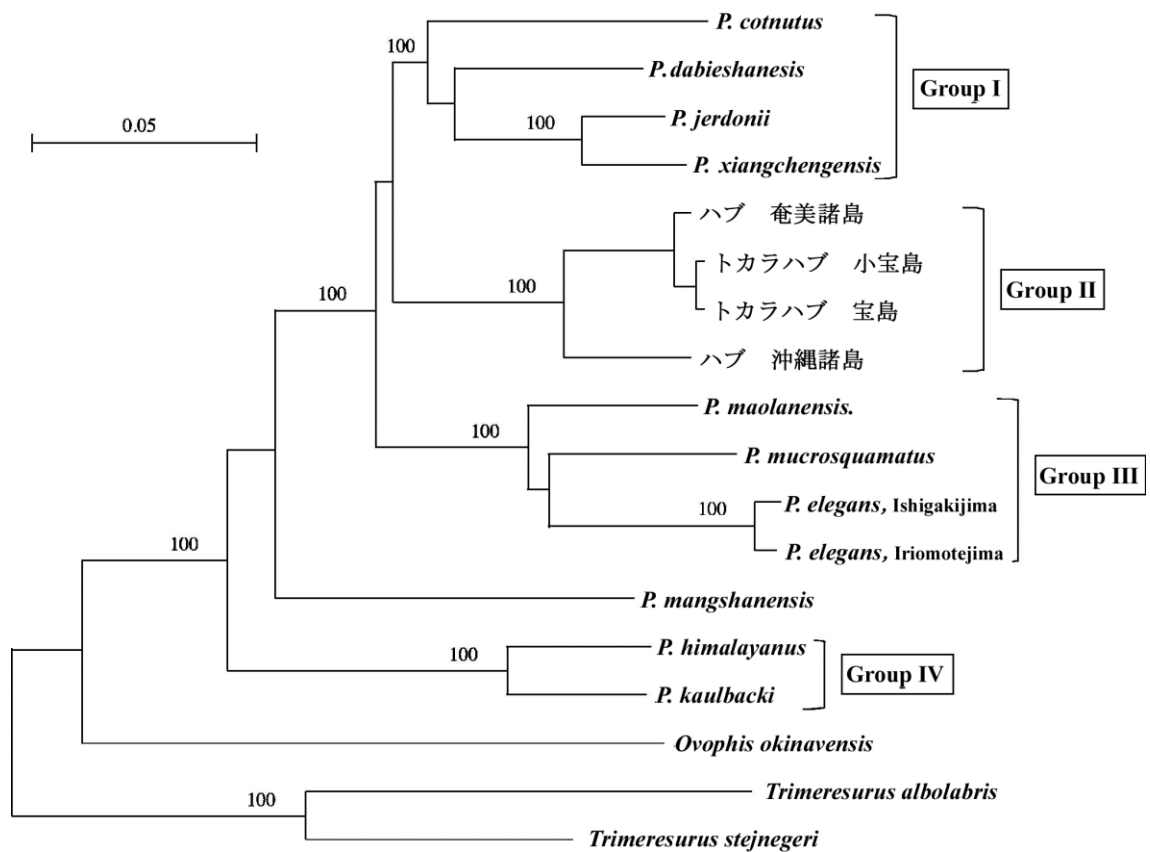


図 1-2. 日本産クサリヘビ科を含めたアジア産クサリヘビ科 15 種の系統樹 (Shibata et al. 2016 [82]の Figure1 を一部改変)。

ミトコンドリア全ゲノムから得られた最尤系統樹。系統樹は部位ごとの置換数でスケールして描かれている。部位ごとの置換数と 1000 回の反復におけるブートストラップの比率が 100%の枝についてのみ記す



## 第2章 実験方法

本研究では共通の手法として血管平滑筋の収縮・弛緩反応を張力変化として測定する手法を用いており、血管張力の測定方法を本章でまとめることにする。なお、章別に固有の手法を用いた場合はその章内で記述する。

### 2-1 標本作製

#### 2-1-1 使用動物

<ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) >

ハブは鹿児島県奄美群島から沖縄県沖縄本島およびその属島に生息するクサリヘビ科ハブ属のヘビであり日本南西諸島の固有種である (図 2-1 A)。頭胴長 800~1600 mm、体色は黄色に網目模様を基調とし黒色、赤色、銀色など体色のバリエーションが豊富である。生息環境は原生林からサトウキビ畑まで幅広く観察され、主食のネズミを追って家屋に浸入する例もある。食性は哺乳類から爬虫類・両生類などを主食とし繁殖期は7月頃で冬眠はしない。基本的には地上生活を行うが時折木の上で観察される例もある[38]。

本種の奄美大島、加計呂麻島および徳之島を含む奄美諸島の個体群は、同種とされる沖縄島、渡嘉敷島、久米島、伊平屋島および伊江島を含む沖縄諸島の個体群と分子遺伝学的にかなり離れており、前者は後者よりトカラハブにより近いことから、ハブは単系統群とならず分類学的な再検討が必要とされる[38]。

本研究では鹿児島県により有害駆除された個体をそれぞれ、奄美大島の名瀬保健所と之島の徳之島保健所（図 2-2）からそれぞれ 10 個体（雄 8 個体、雌 2 個体、体重  $784.5 \pm 46.2$  g; 全長:  $1.65 \pm 0.06$  m）と 12 個体（雄 9 個体、雌 3 個体、体重  $620.8 \pm 69.5$  g; 全長:  $1.56 \pm 0.05$  m）の計 22 個体を提供いただいた。

<トカラハブ (*Protobothrops tokarensis*) >

トカラハブは鹿児島県トカラ列島の小宝島と宝島の 2 島だけに生息するクサリヘビ科ハブ属のヘビであり日本の固有種である（図 2-1B）。体長は 600~1000 mm とハブと比べて小柄である。体色は白と黒の 2 パターンが観察される。生活環境は海岸林から二次的林中で幅広い。食性は爬虫類や両生類を主食とし、海鳥の渡りの季節には好んで海鳥を捕食する[94]。

前述したように本種は奄美諸島産のハブと単系統群をなし、沖縄諸島産のハブはそれらの外群になるため、ハブを含めた分類学的な再検討が必要とされる[38]。

本研究では十島村により有害駆除された小宝島（図 2-2）のトカラハブ 22 個体（雄 15 個体、雌 7 個体、体重  $156.0 \pm 37.6$  g、全長  $0.75 \pm 0.01$  m）を十島村役場小宝島出張所より提供いただいた。

## 2-1-2 リング標本の作製方法

安楽殺されたヘビの頸部を切断し、頭部より 15 cm 程度の位置に心臓が位置するのでそこまで鉈をもちいて開腹した。心臓より湾曲して尾側に走る 5~8 cm 程度の胸大動脈を尾側でモスキート鉗子を用いて止血し、上部に牽引しながら約 10 cm 採取した。クレブスリンゲル液（組成：19 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 mM glucose, pH 7.4）で満たれた容器に入れ氷で満たしたクーラーボックス中（4 °C）に保管し、速やか鹿兒島大学に輸送した。クレブスリンゲル液中で脂肪組織や結合織を丁寧に除去し管を 3 mm 程度に細断しリング標本作製した。血管内皮細胞を保持するため血管内腔面に物理的に接触しないよう十分な注意を払って作製した。

## 2-2 平滑筋の収縮・弛緩反応の測定

### 2-2-1 張力変化の測定

リング標本は、2 つの L 字型ステンレス製ホルダーの間に水平に取り付け、一方を等尺性力変換器に固定し、 $28 \pm 0.5$  °C (pH7.4) の混合ガス（95% 酸素ガス+5% 二酸化炭素ガス）で通気しクレブスリンゲル液酸素添加塩溶液を含む 5 mL の水ジャケット付きオルガンバス装置（Easy Magnus UC-5A、岩石屋岸本医科器械、京都、日本）に浸した。

平滑筋標本の等尺性張力変化はアンプ（AP-621G；日本光電工業、東京、日本）に接続し張力トランスデューサーにて測定しアナログ・デジタル変換器（PowerLab/8SP、AD Instruments Co）を介してデータ取り込みソフト（Lab Chart 8 for

Windows: AD Instruments, Australia) で Windows PC に記録した。作製した標本は静止張力下 (ハブでは 7.8 mN, トカラハブでは 2.4 mN) で少なくとも 120 分間平衡化させた。静止張力の測定は[63]に従い、60 mM KCl による収縮反応が最大となる濃度に決定した。収縮の振幅が一定値に達するまで KCl を 30 分ごとに加えた。生理食塩水の KCl 濃度の変化は、NaCl 濃度の等モル比調整によって補正した。その後、各種血管作動物質を累積投与することにより収縮もしくは弛緩反応の濃度反応曲線を得た。

#### 2-2-2 拮抗薬を用いた受容体の推定

各種拮抗薬の効果を検証する際、対照実験 (拮抗薬未処置群) の記録と拮抗薬の効果を検討する実験 (拮抗薬処置群) の記録を同一血管から作製した異なるリング標本を用いて比較した。非選択的もしくはサブタイプ選択的受容体拮抗薬存在下で血管作動薬を累積投与することにより収縮もしくは弛緩反応の濃度反応曲線を得た。各種受容体拮抗薬は、血管作動薬を累積投与する 30 分前に栄養液中に投与した。

#### 2-3 試薬

本研究で用いた試薬は以下のとおりである。

- 5-hydroxytryptamine (5-HT; Merck, Darmstadt, Germany)
- acetylcholine (ACh; Daiichi-Sankyo Co., Tokyo, Japan)
- angiotensin II (Ang II; Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA)
- atenolol ( $10^{-6}$  M, LKT Laboratories, Tokyo, Japan)

- butoxamine hydrochloride ( $10^{-6}$  M, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- histamine hydrochloride (His; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- isoproterenol hydrochloride (Isop; Sigma-Aldrich)
- ketanserin tartrate (Merck, Darmstadt, Germany)
- L-nitro arginine (L-NNA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- methiothepin maleate (Merck, Darmstadt, Germany)
- methocitramine hydrate (Merck, Darmstadt, Germany)
- Noradrenaline (NA; Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)
- hexahydro-sila-difenidol hydrochloride, p-fluoroanalog (pfHHSiD; Research Biochemicals, Natick, MA)
- phentolamine mesylate (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan)
- pirenzepine dihydrochloride (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)
- propranolol hydrochloride (ICI, London, UK)
- rattlesnake bradykinin ([Val<sup>1</sup>,Thr<sup>6</sup>]-BK, rattlesnake BK; Shimadzu Co. Kyoto, Japan),
- SB269970 ((R)-3-(2-(2-(4-methylpiperidin-1-yl)-ethyl)pyrrolidine-1-sulphonyl) (Shimadzu Co. Kyoto, Japan)
- sodium nitroprusside (SNP; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan)
- The NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-FX (Dojindo, Kumamoto, Japan)

上記の薬物は SB266970 のみジメチルスルホキシド (DMSO) ( $10^{-3}$  M) に溶解し、最終的な DMSO の濃度を 0.1%未満とした。その他の薬物は、全て蒸留水に溶解した。また、薬物の希釈はすべて蒸留水で行った。

## 2-4 実験結果の解析と統計的評価

### 2-4-1 実験結果の解析

収縮反応および弛緩反応における血管張力の絶対値 (N) では個体および血管径の大きさによるばらつきが生じるため、その影響を除去するため、60 mM KCl による収縮反応を 100%、SNP による弛緩反応を-100%とした相対値として算出した。

### 2-4-2 統計的評価

結果は平均値  $\pm$  標準誤差で示した。また、統計的有意差検定には Student t 検定または一元配置分散分析後の Bonferroni 検定 (Stat View J-4.5, Abacus Concepts Inc.) にて評価した。有意性の判定は  $p < 0.05$  の場合に有意差ありと判定した。

2-5 図表



図 2-1. [A]ハブ（奄美大島にて撮影）。[B]トカラハブ（小宝島にて撮影）。

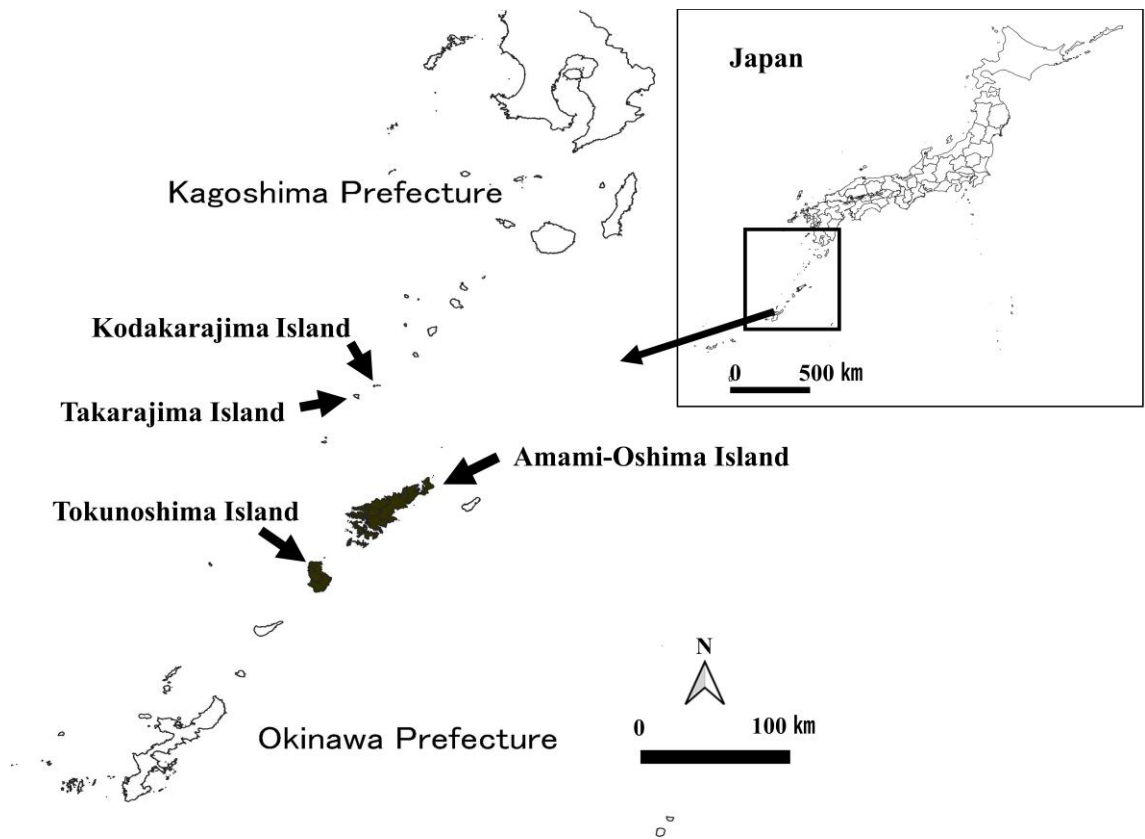


図 2-2. 奄美諸島および宝島、小宝島の位置図。この地図は国土地理院タイルを加工して作製[33]



### 第3章 地上性ハブの胸大動脈における血管反応性の特徴および奄美大島と徳之島の個体間における種内比較

#### 3-1 序文

ハブ (*Protobothrops flavoviridis*) は日本南西諸島の固有種で攻撃的な気性をもつ毒蛇である。特に奄美諸島に生息する個体には行動学者や爬虫類学者にとって興味深い通説が存在する。それは徳之島と奄美大島は互いに 45 km ほどしか離れていないが、2つの島に生息するハブでは、徳之島のハブが奄美大島のハブより気性が荒いというものである[68,80]。奄美大島と徳之島はその地史的な背景から進化学上重要な意味を持つ地域であり、現在の南西諸島に生息する種はユーラシア大陸から陸橋を渡って現在の南西諸島に移動し、独自の進化を遂げており、固有の生態系を構築している。その結果、奄美大島と徳之島は 2021 年にユネスコに世界自然遺産に登録されている[98]。

さらにこの2つの島では、長い間同種と考えられてきたトゲネズミ類が比較的最近、別種になった(トクノシマトゲネズミ (*Tokudaia tokunoshimensis*) とアマミトゲネズミ (*Tokudaia osimensis*)) こと[97]なども考慮すると、生物地理学的な要因による2島間に種内変異が生じる可能性は高いと考えられる。加えて徳之島と奄美大島のハブでは、毒のアミノ酸配列が異なることが判明している[21,82]。このように2つの島は種内変異や種分化が生じやすい地域と考えられるため、地域の動物個体群内の変異に関する科学的知識を得ることは、これらの固有種の保全にとっても有益と思われる。

血管反応性の種間および種内変異について過去の研究から、病的要因 [45] や栄養

不足 [43,65] の動物における、アンジオテンシン (Ang) II、アセチルコリン (ACh)、ノルアドレナリン (NA)、5-ヒドロキシトリプトタミン (5-HT) などに対する反応において、健康個体と非健康個体の血管反応性の違いを報告した。さらに、爬虫類、鳥類、哺乳類において、動物種間の血管反応性の違いを報告している [44,46,64,104,101]。これらの研究から、血管反応性は、何らかの外的要因 (病気、栄養、環境など) の影響により同種であっても血管反応性が異なることが示された。これらの要因に加えてヒトにおいては、心血管系の反応と性格や攻撃的行動と関連していると報告されており [67]、性格と血圧は関連している可能性もある [24,73]。血圧は心拍数に加えて血管径により決定し、血管径は血管反応性に依存する [76]。さらに気性が荒く攻撃性が高い時、個体は興奮状態や緊張状態にあると言い換えることができる。興奮状態や緊張状態では交感神経が優位になり、交感神経が優位であると血管が収縮し血圧が上がる [76]。言い換えると攻撃性が高いということは、興奮しやすい、またはその興奮の度合いが高いと考えることが出来、血管反応性も相応の状態にあると考えられる。これらの背景から、ヘビ類の気性 (攻撃性) も血管反応性と関与している可能性があると考え、徳之島のハブが奄美大島のハブよりも (血管作動性物質による反応の傾向は同じではあるが) 強い、あるいはより敏感な血管反応を示すという仮説を立てた。この血管反応性に関する仮説の証明は、2つの島のハブの島嶼個体群における生理学的な差異を理解するのに有用と思われ、ハブの胸大動脈における血管

反応性の基礎的な情報の収集を行い、奄美大島と徳之島の個体群間で血管反応性を比較し、その実態を把握することを目的とした。

仮説通りに2つの島のハブにおいて、血管反応性にも違いが生じていることを示すことができ、生理学的変異についての理解が深まれば、ハブだけでなく、複数の種における行動学的・生理学的研究の今後の新たなアプローチが促進されるかもしれない。

## 3-2 方法

### 3-2-1 倫理的承認

実験はすべて鹿児島大学動物実験指針に従って行った。組織の採取に先立ち、鹿児島県庁大島支庁保健福祉部に実験計画書とハブ払い下げ申請書を提出し、承認を得た(承認番号 H290223)。本実験では、鹿児島県が有害鳥獣駆除のために駆除したハブから分離した大動脈を用いたため、鹿児島大学による個別の倫理・動物実験承認は不要である。本学の動物実験施設およびプログラムは、2017年より AAALAC International の認定を受けて実施している。

### 3-2-2 血管平滑筋の張力測定

第2章実験方法 2-2に基づき奄美大島と徳之島のハブ摘出胸大動脈における NA、Ang II、5-HT、ACh に対する血管反応性を測定し、ACh においては受容体選択的拮抗薬を用いて関与する受容体の推定を実施した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 ハブ胸大動脈に対する Ang II, ACh, NA, 5-HT の影響

奄美大島と徳之島のハブの血管反応性の種内差を明らかにするために、両島のハブから分離した胸大動脈の Ang II、ACh、NA、5-HT に対する血管反応を評価した。こうして得られた濃度反応曲線を図 3-1 に示す。最大応答 (Emax) および Emax の半分を生じる濃度の負の対数 (pEC<sub>50</sub>) を表 3-1 にまとめた。

使用した血管作動性物質はすべて、静止張力下で濃度依存的に収縮を誘発した。

Ang II は 10<sup>-8</sup> から 10<sup>-5</sup> M の範囲で収縮を誘発し、いずれの濃度でも徳之島のハブは奄美大島のハブより有意に強く収縮し、さらに pEC<sub>50</sub> 値も有意に高かった (P < 0.05)。

ACh の pEC<sub>50</sub> 値は奄美大島より徳之島の方が有意に高く、10<sup>-7</sup> および 10<sup>-6</sup> M での ACh 誘発収縮は奄美大島より徳之島の方が有意に強かった (P < 0.05) が、10<sup>-5</sup> M での収縮の差は有意ではなかった。ACh は NA (10<sup>-6</sup> M) による前収縮条件下でも、弛緩することなくさらなる収縮を誘発した (データ未掲載)。NA は徳之島のハブと奄美大島ハブの間で最大反応や pEC<sub>50</sub> 値に有意差はなかったが、10<sup>-6</sup> M の濃度において徳之島ハブは有意に強く収縮を誘発した (P < 0.05)。5-HT は 10<sup>-6</sup> M と 10<sup>-5</sup> M で弱い収縮を誘発したが、これは徳之島と奄美大島のハブの間で有意差はなかった。

本研究で適用した 4 種類の血管作動性物質のうち 3 種類では、徳之島のハブの方が奄美大島のハブよりも強い血管反応が得られた。

### 3-3-2 AChによる血管収縮反応に関わるムスカリン受容体サブタイプの薬理的な同定

次に、アトロピン（非選択的 M 受容体拮抗薬）、ピレンゼピン（M<sub>1</sub> 受容体拮抗薬）、メトクトラミン（M<sub>2</sub> 受容体拮抗薬）、pfHHSiD（M<sub>3</sub> 受容体拮抗薬）を用いて、ACh による収縮に関与するムスカリン受容体サブタイプの解明を試みた。アトロピン投与は ACh（10<sup>-6</sup>M）誘発収縮を完全に消失させた。ピレンゼピン（10<sup>-6</sup> M）と pfHHSiD（10<sup>-6</sup> M）による処置は、ACh による収縮を有意に阻害した（P<0.01）が、メトクトラミン（10<sup>-6</sup> M）はそれに対して有意な効果を示さなかった（図 3-2）。

### 3-4 考察

#### *血管反応性と行動、環境、進化の関係*

本研究では、ハブの血管反応性の実態を把握すること、および徳之島と奄美大島における種内変異が生じている可能性から 2 つの島のハブの血管反応性を把握することを目的とした。その結果、Ang II、ACh、NA、5-HT はいずれもハブの胸大動脈に収縮を誘発したが、Ang II、ACh、NA は奄美大島のハブよりも徳之島のハブの方が有意に強い反応を誘発した。このことは、ハブは血管作動性物質に対して同様の反応を示すが、徳之島のハブではその反応がより強い、あるいはより敏感であるという我々の仮説を支持するものであった。

ヒトにおける血管反応性と気質を関連付けた過去の報告 [[24,67,73]を考慮すると、この血管反応性の違いも気質と関連している可能性があるかと推測されるが、本研究で

は両者の気性および血管反応性との相関については考慮していない。このハブ個体群における違いを説明する要因を考慮する。

血管反応性に影響を及ぼす要因には、栄養状態、健康状態などがある。栄養に関しては、ハブの餌生物種に関する調査は本研究の範囲外であった。しかし、徳之島の水は硬度が高いことが知られており[88]、これは徳之島の地層がサンゴ礁質の石灰岩であるためである（奄美大島の地質には石灰岩はほとんど存在しない）[51]。このため、奄美大島と徳之島の生物では、ミネラルの摂取量に差が生じ、血管反応性を含む何らかの生物地理学的影響がある可能性がある。なぜなら血管平滑筋の収縮には、細胞外腔から細胞間環境へのカルシウムイオンに依存し調節されるためである [42]。健康状態および寄生虫感染に関して、本研究で標本として使用した個体は、安楽死およびサンプル採集の時点で、肉眼で身体的損傷、病気の徴候、寄生虫がない、見た目上良好な個体を選んだ。しかし、病理学的検査は行わなかったため、個体群間の健康状態や寄生虫感染に関する結論は出せない。さらに、血管反応性と自律神経系の関連も否定できず、血中 NA 濃度などについての今後の研究が必要である。

もうひとつの環境要因として、生息環境の違いが挙げられる。徳之島のハブは木の枝など高いところにいることが多いが、奄美大島のハブは草むら（地面）を好むといった通説も存在する[68,80]。これらを間接的に表すものとして、奄美大島では「足元に注意」、徳之島では「木の上注意、頭上に注意」と、へビとの遭遇を避けるためのポ

スターに使われる標語が異なって広報活動が行われている。ハブの生息環境の違いも、血管反応性や血圧に影響を与える可能性がある。へび類では生活環境の違い（地上性や樹上性、水中性）と頭部と心臓の相対的距離および血圧に関係があると報告されている[53,55]。奄美大島と徳之島でも、通説の通りハブ類の生活環境が異なる可能性はあるが、本研究では島嶼間で血管反応性に差が生じることを示すに留まった。今後、さらに野外観察や飼育実験などを経て行動観察や生活環境の違いを検証することが望まれる。

#### 薬理学的反応

島嶼間の種内比較に加えて、ハブの血管反応性の実態の把握は、種間比較の点においても興味深いものであった。Ang II による収縮は、他のへび種、具体的には、インドコブラ, *Naja naja* [105], ジャララカ, *Bothrops jararaca* [28]、イエローラットスネーク, *Pantherophis obsoletus* [22]でも示されており、徳之島のハブの pEC<sub>50</sub> 値は、*Naja naja* と同様であった (8.09 vs. 8.00 - 9.45)。これらの結果は、他のへび種と同様に、ハブにおいてもレニン-アンジオテンシン系が血管反応に重要であることを示している。本研究における NA 誘発の収縮 (pEC<sub>50</sub> 値: 6.13 または 6.32) は、*Naja naja* で報告されたもの (6.04) と類似していた[105]。

へび類の種間における血管反応性に関して2つの新しい知見を得た。第一に、他のへび種では報告されていない5-HTによる胸大動脈の収縮をハブで確認した。過去に

はヤスリヘビの一種で肺動脈に 5-HT 受容体が分布していることは報告されているが [25]、胸大動脈における血管反応性の報告はない。本研究におけるハブの 5-HT 誘発性収縮は、これまでに他の種で報告されている 5-HT 誘発性収縮よりもはるかに弱いものであった。本研究では、5-HT によってハブの胸大動脈に 23.1%の収縮 ( $10^{-5}$  M ; 図 3-1D) を認めたが、以前に報告されたいくつかの哺乳類の胸大動脈における反応の値 {ウサギの 74%[72]、ラットの 120%[8]、モルモットの 47%[19]} とは対照的である。第二に、他のヘビ類で報告されている弛緩反応とは対照的に、ACh に対する収縮反応を発見した[22,49]。ACh による収縮はトカゲやカメ[58,71]、カエル[50,58]、魚類[58,69]で報告されているが、ACh による弛緩は鳥類や哺乳類で報告されている[36,71,78]。ACh 誘発性弛緩は、両生類や爬虫類のレベルで、おそらく水生生物から陸上生物への移行時に進化的に出現したと考えられている。したがって、地理的に孤立したこの爬虫類であるハブにおける収縮反応の存在は、進化の歴史を解釈する上で有用であろう。

ACh に対する血管反応には、少なくとも 3 つのムスカリン受容体 ( $M_1$ 、 $M_2$ 、 $M_3$ ) が関与している可能性があり[10,20]、哺乳類の胸大動脈では、ACh による弛緩は  $M_2$  および  $M_3$  受容体を介して誘発される[20]。今回のハブにおける ACh による胸大動脈の収縮は、 $M_1$  および  $M_3$  受容体の関与が示唆されており、トカゲでも同様の受容体の関与が



報告されている[71]。これらの受容体はミナミガラガラヘビ (*Crotalus durissus*) の肺動脈の ACh 誘発性収縮にも最も関与している可能性が高いと報告されている[29]。

ここまで血管反応性の比較について考察してきたが、われわれの研究は、単離した胸大動脈を用いた血管反応性の実態把握に留まった。過去の研究ではアメリカマムシ cottonmouth snakes (*Agkistrodon piscivorus*) の噛みつき行動についてストレスホルモンのコルチゾールの定量が試みられたように[39]、ヘビ自身の循環ホルモンレベルの定量は試みなかったため、今後のさらなる研究に期待する。

3-5 図表

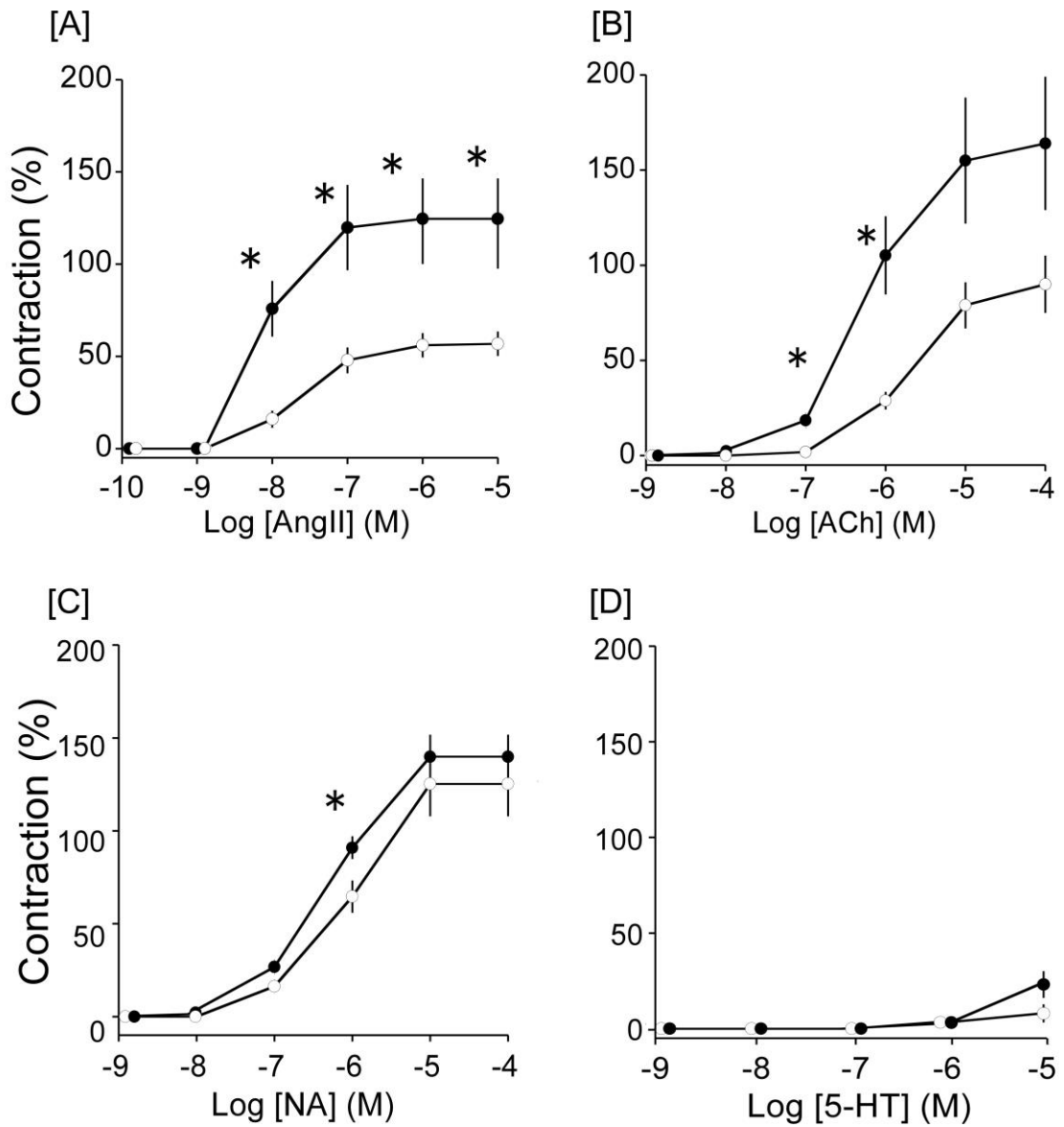


図3-1. 徳之島 (●) および奄美大島 (○) に生息するハブから抽出した胸大動脈における[A] Ang II、[B]ACh、[C]NA、[D]5-HTの濃度反応曲線。60 mMのKClによる収縮を100%とした。各プロットは [A]は6匹、[B-D]は10匹の平均値±SEMを表す。\*P<0.05、vs 奄美大島。

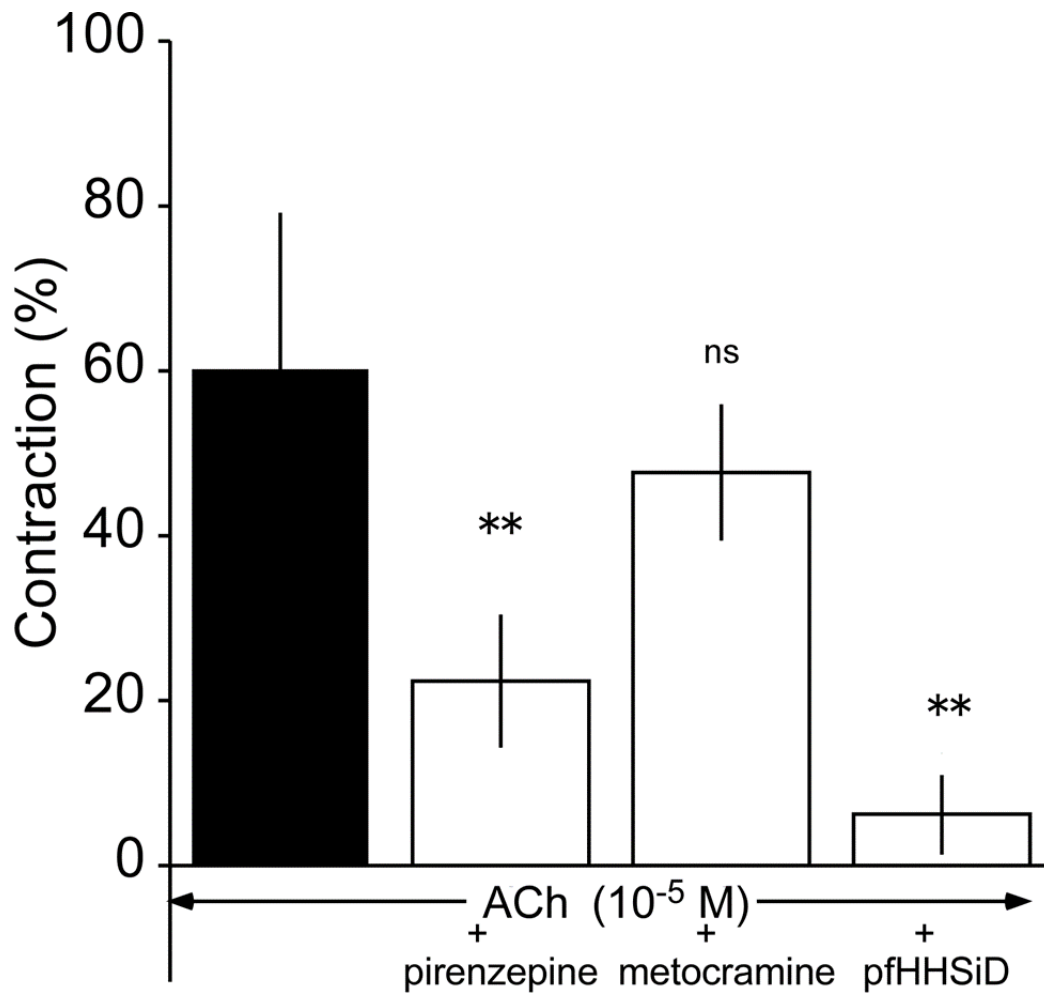


図3-2. 静止張力下の胸大動脈におけるACh誘発性収縮（黒：10<sup>-6</sup> M、Control）に対する選択的ムスカリン受容体拮抗薬ピレンゼピン（10<sup>-6</sup> M、M<sub>1</sub>選択的）、メトクラミン（10<sup>-6</sup> M、M<sub>2</sub>選択的）、pfHHSiD（10<sup>-6</sup> M、M<sub>3</sub>選択的）の影響。60 mMのKClで誘発された収縮を100%とした。各バーは徳之島のハブ6匹の平均±SEMを表す。\*\* P < 0.01 vs. control. ns: 有意差なし。

表 3-1. 徳之島と奄美大島のハブにおける血管反応性の最大値 ( $E_{max}$ ) と感受性 ( $pEC_{50}$ ) の比較

Agonists	n	Tokunoshima		Amami-Oshima	
		$pEC_{50}$	Max (%)	$pEC_{50}$	Max (%)
Angiotensin II	6	8.09±0.09*	124.5±24.5*	7.62±0.11	56.9±6.6
Acetylcholine	10	6.31±0.06*	155.0±33.1	5.70±0.14	79.0±12.2
Noradrenaline	10	6.32±0.08	139.9±11.9	6.13±0.10	125.3±17.4
5-Hydroxytrptamine	10	5.50±0.01	23.1±7.0	5.50±0.01	8.0±4.7

収縮反応は KCl (60 mM) で誘発された収縮を 100%とした。

$pEC_{50}$  は最大収縮の半分を誘発する濃度の負の対数である。

\* \* $P < 0.05$ , vs 奄美大島. n: 島ごとのハブ個体数。

## 第4章 半樹上性トカラハブ胸大動脈における血管反応性の特徴

### 4-1 序文

へビ類は1億7,400万年前から1億6,300万年前に進化して以来、環境的に多様なニッチを開拓してきた[18]。へビ類の生息環境への適応は、他の多くの脊椎動物と比べて高いと考えられている[75]。生息環境に適応した分類群の例としては、哺乳類では樹上性の霊長類、様々な陸生の四足動物、水棲のクジラ類、鳥類では多くの鳥類が空を飛び樹上生活を営み、ダチョウなどの陸生鳥類、半水棲性のペンギンなどが挙げられる。へビ類が分類群として特徴的なのは、陸上、樹上、地中、水中の環境に生息し、鳥類や哺乳類が網レベルでそのような生活環境に適応しているのとは異なり、目レベル（正確にはへビ亜目）で適応している点である。へビ類はこのように、さまざまな生息環境に対する適応を理解する上で有用な動物であると考えられる。しかし、こうした生活環境に適応する根底にあるメカニズムはまだほとんど解明されておらず[3]、その解明は進化学的研究に大きく寄与できると思われる。

へビ類は大きさが多少異なるが、その形状は基本的に共通している。そのため、彼らの心臓血管系は種を問わず類似の構造をもつが、全身循環を実現する上で異なる生息環境に関連した問題も抱える。その主な例は重力であり、重力は理論上、樹上種、水棲種、陸棲種に異なる影響を及ぼし、異なるレベルの静水圧を発生させるが、循環はこれに対応する必要がある[3,81,100]。へビ類がどのように全身循環を実現しているかを理解するのに方法のひとつとして、血管反応性を調べることである。

地上性のヘビ類の胸大動脈における血管反応性については、コブラ科、ユウダ科、クサリヘビ科の3種のヘビで研究されている [28,49,102,105]。これらの報告に共通する特徴は、3種中2種でNA誘発性収縮 [102,105]、3種中2種でAng II誘発性収縮 [28,105]、3種中1種でACh誘発性弛緩 [49]であった。半樹上性のヘビでは、イエローラットスネーク (*Pantherophis obsoletus*) [22]でのみ血管反応性が研究されており、陸生ヘビとの類似点と相違点が見られた。大まかには、基本的な血管反応性は同じような生息域に棲息する種で類似している可能性を示唆しているかもしれないが、これまでの半樹上性のヘビの報告が1種のみであるため、他の半樹上性ヘビ類が同様の血管反応性を示すかどうかわからない。そのため、他の半樹上性ヘビにおける調査が必要であると考えた。

トカラハブ (*Protobothrops tokarensis*) は、日本の南西諸島に隣接する2つの小さな島 (宝島と小宝島) にのみ生息するクサリヘビ科の毒ヘビであり、進化生理学者にとって興味深い半樹上性種のヘビである [94]。この島嶼性の種は、奄美大島などに生息する陸生種のハブ (*Protobothrops flavoviridis*) [90]と系統的に非常に近縁である [82]が、トカラハブはトカラ列島が奄美諸島から分離した後、比較的短期間で別種として進化し、生息環境を半樹上性に適応したため、環境適応能力を考察する観点から非常に興味深く、学術的にも貴重な種である [94]。そのため、本実験の対象種とした。

#### 4-2 方法

#### 4-2-1 倫理的承認

トカラハブの採集に先立ち、十島村役場住民課に実験計画書を提出し、許可を得た（許可番号 2260、2930、2163）。実験はすべて鹿児島大学動物実験指針に則って行われた。本実験では、駆除したヘビから分離した動脈を用いたため、鹿児島大学における個別の倫理・動物実験承認は不要である。AAALAC インターナショナルは、2017 年より本学の動物実験施設およびプログラムを全面的に認定しています。

#### 4-2-2 血管平滑筋の張力測定

2 章実験方法 2-2 に基づき、NA、Ang II、His、rattlesnake BK、5-HT、Isop、ACh に対する血管反応性の特徴の把握を実施した。NA、5-HT、Isop、ACh についてはアンタゴニストを用いて関与する受容体の推定も行った。

#### 4-2-3 弛緩反応における NO 産生量の定量

摘出した胸大動脈から脂肪組織と結合織を丁寧に除去後、約 4 mm の長さに切断した。5 個体分の切断した血管（合計：1.20 ± 0.05 mg 湿潤重量）を混合ガスで通気し、28 ± 0.5 °C に保温したクレブスリンゲル液（組成：119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM glucose, pH 7.4）を 500 μL 含むサンプルチューブ内でインキュベートした。120 分インキュベートした後、標本を各種弛緩薬で刺激した。用いた弛緩薬は ACh、Isop、5-HT であり、刺激時間は一律に 30 分とした。NO 合成阻害薬の L-NNA は、各種弛緩薬を投与する 30 分前に栄養液中に投与した。

各々の血管弛緩薬処置後、血管標本を取り出し、インキュベート液を  $2.000 \times g$  で 20 分間遠心分離し、上澄みを用いて  $\text{NO}^2^-/\text{NO}^3^-$  Assay Kit-FX（同仁化学研究所、熊本）に従い硝酸塩と亜硝酸塩（NO の生成物）として測定した。2,3-ジアミノナフタレンに基づく蛍光法を用いて NO を測定した。溶液中の硝酸塩はすべて硝酸還元硬度で亜硝酸塩に変換され全亜硝酸塩はマイクロプレートリーダー（Tecan, Mannedorf, Switzerland）を用いてその蛍光強度（ $\lambda_{\text{ex}} = 360 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$ ）で測定された。湿潤組織 1 mgあたりの硝酸塩と亜硝酸塩の合計量を NO の産生量として計算した。

#### 4-2-4 野外における樹上性頻度の観察

トカラハブは半樹上性と言われているが、実際に樹上にいる頻度・高さに関しては情報がないため、参考として野外で観察した結果を記録した。野外においてトカラハブを見つけた際、その場所（地面や木の上）と地面からの高さ（メートル）を記録した。観測は 2021 年 9 月と 2022 年 10 月の各 1 日間、小宝島全域（面積：0.98  $\text{km}^2$ ）で昼夜を問わず行った。

### 4-3 結果

#### 4-3-1 トカラハブ胸大動脈に対する NA, Ang II, ACh, 5-HT, Isop, His, rattlesnake BK の影響

トカラハブから単離した胸大動脈において、NA、Ang II、His、rattlesnake BK、Isop、5-HT、ACh の濃度反応曲線を作成した（図 4-1）。NA と Ang II は濃度依存的に



収縮を誘発した。Isop、5-HT、AChは、静止時張力において、低濃度（ $10^{-9}$  M- $10^{-7}$  または  $10^{-6}$  M）で弛緩を誘発し、高濃度（ $10^{-6}$  –  $10^{-5}$  または  $10^{-5}$  Mのみ）で収縮を誘発した。His と rattlesnake BK は、静止時張力と NA（ $10^{-6}$  M）による前収縮状態には影響を及ぼさなかった。NA と Ang II に対する最大収縮反応、Isop、5-HT、ACh に対する最大弛緩反応、それに対する pEC<sub>50</sub> 値を表 4-1 に示す。

#### 4-3-2 NAによる血管反応に対するフェントラミンの影響

NA 誘発性収縮に対するフェントラミン（ $10^{-6}$ M、非選択的  $\alpha$  アドレナリン受容体拮抗薬）の効果を調べた。フェントラミンは NA の濃度反応曲線を平行して右にシフトさせた（図 4-2）。

#### 4-3-3 Isopによる血管反応に関わる $\beta$ 受容体サブタイプの薬理的同定

プロプラノロール（ $10^{-7}$  M、非選択的  $\beta$  アドレナリン受容体拮抗薬）、アテノロール（ $10^{-6}$  M、 $\beta_1$  アドレナリン受容体拮抗薬）、ブトキサミン（ $10^{-6}$  M、 $\beta_2$  アドレナリン受容体拮抗薬）の、静止張力状態での Isop 誘発弛緩に対する影響を調べた（図 4-3）。プロプラノロールは Isop 誘発弛緩反応を完全に消失させた。アテノロールとブトキサミンも Isop の誘発弛緩を収縮反応にさせたが、プロプラノロールと同程度であった。フェントラミンは、プロプラノロールの存在下で、Isop による収縮を右に平行移動させた。

#### 4-3-4 5-HTによる血管反応に関わる 5-HT 受容体サブタイプの薬理的同定

L-NNA (NO 合成酵素阻害剤)、メチオセピン (5-HT<sub>1</sub> および 5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗剤)、ケタンセリン (5-HT<sub>2</sub> 受容体拮抗剤) および SB269770 (5-HT<sub>7</sub> 受容体拮抗剤) の 5-HT 誘発弛緩に対する効果を検討した。それぞれの拮抗薬または阻害薬は、5-HT 誘発弛緩を有意に減少させなかった。次に、これらの物質を併用した場合の効果を調べた結果、L-NNA、SB269770、メチオセピンまたはケタンセリンを併用した場合、10<sup>-9</sup> および 10<sup>-8</sup> M では 5-HT 誘発性弛緩を消失させたが、10<sup>-7</sup> および 10<sup>-6</sup> M では有意な効果は認められなかった (図 4-4A)。図 4-1 の Δ が示すように、5-HT は 10<sup>-5</sup> M で収縮を誘発した。そこで、メチオセピンとケタンセリンの効果を調べ、図 4-4B のように示した。メチオセピンは有意に 5-HT (10<sup>-5</sup> M) 誘発収縮を抑制したが、ケタンセリンは抑制しなかった (P < 0.01)。

#### 4-3-5 ACh による弛緩反応に関わるムスカリン受容体サブタイプの薬理学的同定

ACh は 10<sup>-9</sup>-10<sup>-7</sup> M と低濃度で弛緩を誘発した。この弛緩に関与する受容体サブタイプと NO の関与を明らかにするために、いくつかのムスカリン (M) 受容体拮抗薬と L-NNA を用いた。図 4-5 に示すように、ACh (10<sup>-7</sup> M) で誘発された弛緩は、アトロピン (非選択的 M 受容体拮抗薬)、L-NNA、ピレンゼピン (M<sub>1</sub> 受容体拮抗薬)、pfHHSiD (M<sub>3</sub> 受容体拮抗薬) で消失したが、メトクラミン (M<sub>2</sub> 受容体拮抗薬) では消失しなかった。

#### 4-3-6 L-NNA 前処置下での ACh による収縮反応に関わるムスカリン受容体サブタイプの薬理学的同定

ACh は  $10^{-6}$  および  $10^{-5}$  M で収縮を誘発した (図 4-1 の●)。ACh による弛緩は L-NNA によって消失した (図 4-5) ので、L-NNA 存在下での ACh による収縮に対する M 受容体拮抗薬の効果を検討した (図 4-6)。アトロピンによる処置は ACh ( $10^{-5}$  M) による収縮を完全に消失させた。ピレンゼピン ( $10^{-6}$  M) と pfHHSiD ( $10^{-6}$  M) による処置は ACh 誘発収縮を有意に阻害した ( $P < 0.01$ ) が、メトクトラミン ( $10^{-6}$  M) は有意な効果を示さなかった。

#### 4-3-7 NO の弛緩反応への関与

5-HT、ACh、Isop によって誘発される弛緩反応に NO が関与しているかどうかを調べるため、胸大動脈標本を 5-HT、ACh、Isop で処理し、NO 産生を測定した (図 4-7)。5-HT ( $10^{-6}$  M) と Isop ( $10^{-6}$  M) により誘発された NO 産生量は、コントロール (未処理群) と有意差はなかった。対照的に、ACh ( $10^{-7}$  M) ではコントロールに対して有意な増加が観察され、NO 産生の増加は L-NNA 処理によって完全に消失した。

#### 4-3-8 野外観察における樹上性の頻度の検証

2 回の現地調査により合計 18 個体のトカラハブを確認した。18 匹のうち 15 匹が樹上で発見され (83.3%)、発見時の平均高さは  $1.3 \pm 0.1$  m (最小: 0.5m、最大: 1.8m) であった。

### 4-4 考察

我々の知る限り、これはトカラハブの NA、Ang II、His、rattlesnake BK、Isop、5-HT、ACh に対する胸大動脈反応に関する初めての報告である。特に興味深いのは、Isop、5-HT、ACh に対する反応で、弛緩とそれに続く収縮を伴い、他のへび類ではこれまで報告されていない。したがって、トカラハブの血管作動性の特徴的なパターンであると考えられる。

NA は濃度依存的に収縮を誘発し、フェントラミンは NA の濃度反応曲線を並行して右に平行移動させた (図 4-2)。トカラハブの NA の  $pEC_{50}$  値は、 $\alpha_1$  アドレナリン受容体を介した反応であるウシの正中尾動脈 (6.16) [40] に類似しており、インドコブラ (*Naja naja*; 6.04) [105]、ジャララカ (*Bothrops jararaca*; 6.63) [102]、イエローラットスネーク (*Pantherophis obsoletus*; 6.72) [22] などの他のへびにおける反応と同様であった。また、フェントラミンはジャララカとインドコブラにおいても同様の効果を示すことが報告されている [22,105]。これらの結果から、トカラハブの NA による収縮は  $\alpha_1$  アドレナリン受容体を介することが示唆された。

へび類には 2 種類の Ang II が存在することが明らかになっており、ひとつはヒトのものと同じであり、もう 1 つはアミノ酸配列が 1 か所異なる [11]。Ang II はトカラハブの胸大動脈を濃度依存性に収縮した。他のへびにおいても、Ang II は大動脈の収縮を誘発した [14,22,28]。レニンまたはレニン様物質は、硬骨魚類から哺乳類まで多くの脊椎動物の腎臓に存在し、血圧調節を担っており [91]、へび類においても血圧調節に重

要な役割を果たしている可能性がある。半樹上性のヘビであるトカラハブとイエローラットスネークに関連する  $pEC_{50}$  値は、それぞれ 7.39 と 6.50 [22]であり、地上性のヘビであるインドコブラとジャララカの  $pEC_{50}$  値は、それぞれ 8.73 と 6.76 であった [28,105]。

$\beta$  アドレナリン受容体は  $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 、 $\beta_3$  のサブタイプに分類され、3 つとも平滑筋で発現している [89]。本研究では、Isop は低濃度では弛緩を誘発するが、高濃度では収縮を誘発した。プロプラノロール ( $10^{-7}$  M) によって弛緩反応は消失した (図 4-3) ことから、弛緩は  $\beta_1$  アドレナリン受容体および/または  $\beta_2$  アドレナリン受容体を介して誘発されたことが示唆された。これは、プロプラノロールが  $\beta$  アドレナリン受容体の古典的な非選択的拮抗薬であり、高濃度 ( $10^{-6}$  以上) でのみ  $\beta_3$  アドレナリン受容体を遮断することが知られていることに基づく [5,30,89]。アテノロールとブトキサミンによる前処置は Isop によって誘発される弛緩反応を有意に抑制した。したがって、トカラハブの胸大動脈には  $\beta_1$  および  $\beta_2$  アドレナリン受容体が存在すると考えられる。図 4-7 に示すように、Isop で処理した胸大動脈では NO が産生されなかったことから、Isop によって誘発される弛緩反応は NO を介さないことが示唆された。フェントラミンは、プロプラノロール存在下で Isop 処理によって得られた収縮反応曲線を右に平行移動させ (図 4-3)、収縮が  $\alpha$  アドレナリン受容体を介して媒介されたことを示唆した。別のヘビ類の例として、ジャララカ (トカラハブと同じクサリヘビ科) では、Isop は  $\alpha$  ア

ドレナリン受容体を介した収縮のみを誘発し、弛緩は誘発しなかった[102]。このように Isop による収縮反応は  $\alpha$  受容体を介した反応であると考えられる。

5-HT 受容体には 5-HT<sub>1</sub> から 5-HT<sub>7</sub> までの複数のクラスが存在し、さらにそれぞれがいくつかのサブタイプが存在する [35]。ヘビ類における 5-HT に対する血管反応性はハブの脳底動脈で 5-HT<sub>1</sub> 受容体を介した収縮を誘発し[104]、ヤスリヘビの一種 *Acrochordus granulatus* では肺血管反応（受容体を介さない研究）に関与したと報告されているのみである[25]。5-HT に対する血管反応性の多くは収縮性[35]であるが、ラット頸静脈 [9,27]、ブタ肺動脈 [34,47]、ウマ冠動脈 [70] における弛緩反応も報告されている。5-HT による弛緩反応は動物種や血管によって異なるが、5-HT<sub>1</sub>、5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>7</sub> 受容体と内皮細胞由来の NO が関与しているようである [9,27,34,35,47,70]。これらの研究から 5-HT 誘発性の弛緩反応に効果があったアンタゴニストおよび阻害剤を用いた結果、L-NNA、SB269970、メチオセピンまたはケタンセリンの組み合わせは、低濃度では 5-HT 誘発性弛緩を阻害したが、高濃度では阻害しなかった（図 4-4A）。また、5-HT で処理した胸大動脈から NO の産生は観察されなかった（図 4-7）。これらの結果から、トカラハブの胸大動脈における 5-HT による弛緩には NO は関与しておらず、5-HT<sub>2</sub> および 5-HT<sub>7</sub> 受容体に加えて他の弛緩因子が関与している可能性が示唆されるが、詳細は不明であり、分子学的手法などを含めさらなる検討が必要である。10<sup>-5</sup> M の 5-HT によって誘発される収縮は、メチオセピンによって有意に抑制されたが、

ケタンセリンでは抑制されなかった (図 4-4B)。この結果から、5-HT<sub>1</sub> 受容体を介して収縮が誘発されることを示唆している。

ACh による弛緩と収縮の両反応とも、ピレンゼピンと pfHHSiD によって有意に抑制された (図 4-5、4-6)。さらに、弛緩反応は L-NNA によっても消失し、ACh によって誘発された NO 産生は、無処置群に対して有意に増加した (図 4-5、4-7)。これらの結果から、ACh による弛緩反応は M<sub>1</sub> および M<sub>3</sub> 受容体を介し、血管内皮細胞で NO が産生されることが示唆された。さらに、トカラハブの ACh による胸大動脈の弛緩反応は他のヘビよりも強いと考えられる。他のヘビ類では ACh による弛緩反応が NA による前収縮条件でのみ誘発されるためである [49]。これまでの研究で、ACh や他の薬剤では、前収縮がなければ弛緩反応は通常観察できないか、非常に小さいことが示されている [44,57,104]。要約すると、ACh は低濃度では血管内皮細胞において M<sub>1</sub> および M<sub>3</sub> 受容体を介して分泌される NO を介した弛緩を、高濃度では血管平滑筋において M<sub>1</sub> および M<sub>3</sub> 受容体を介した収縮を誘発したことが示唆された。

His はトカラハブの胸大動脈には作用せず、これはハブの脳底動脈で観察された反応と一致するが [104]、イエローラットスネークの胸大動脈で収縮を誘発した反応とは一致しなかった [22]。他のヘビ (ガラガラヘビやニシキヘビ) で報告されている例には、麻酔下で H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> 受容体を介して誘発される強い頻脈があるため [83,84]。へ

ヒ類においては His に対する反応性は種差が大きいのかもしれない。ただトカラハブの胸大動脈の血管反応には His が関与していないと思われる。

ブラジキニンは、ヘビ類と哺乳類でアミノ酸配列が2箇所異なることが報告されている[32]。ヘビでは、BK の血管作動作用は、NO または血管内皮由来弛緩因子を介した弛緩を誘発すると報告されている。[32,104]。本研究では、ガラガラヘビのブラジキニンは静止時張力や前収縮に影響を及ぼさなかった。したがって、ガラガラヘビのブラジキニンはトカラハブの胸大動脈血管反応性には関与していないと考えられる。

興味深いことに、トカラハブの胸大動脈は複数の血管作動性物質に対する反応で弛緩と収縮を示し、これは他のヘビ[22,28,49,102,105]で見られた反応とは異なっていた。トカラハブは半樹上性の生態をもつことが報告されており[38,94]、今回の野外調査の結果もこれを裏付けるものであった。観察されたハブの 83.3% (15/18) が樹上にいることが観察された。トカラハブとイエローラットスネークには、両種が同様の木登り行動を示すにもかかわらず、前者は His に反応性がなく、後者は収縮を誘発するように、いくつか生理学的な違いがあるようであるが、この現象はまだ説明できず、さらなる研究が必要である。複数の先行研究は、単一の陸生ヘビ類における個々の血管作動性物質に焦点を当て [28,49,102,105]、収縮または弛緩のどちらか一方のみを調査してきた。しかし、半樹上性のヘビ（今回調査したトカラハブと、別に報告された



イエローラットスネーク[22])では複数の血管作動性物質が関与していると思われ、陸生ヘビ類より複雑な血管反応性をもつようである。

陸生のヘビと比較すると、トカラハブはより多様で強い弛緩反応を示した。最初の大きな違いは ACh による弛緩反応で、前述したように地上性ヘビでは前収縮がない場合には起こらない反応である。第二の大きな違いは、トカラハブの  $\beta$  アドレナリン受容体を介した Isop 誘発弛緩に関するもので、対照的に陸生ヘビであるジャララカでは Isop は収縮のみを誘発し、弛緩は誘発しなかった。トカラハブとジャララカはともにクサリヘビ科に属するため、この血管反応の生理的な違いは、トカラハブが樹上環境への適応した影響を反映している可能性があると考えられる。

トカラハブは、木登り運動（特に心臓からの血液供給に関して、頭部尾までの体軸に大きな変化がある）を行うため、血圧の柔軟な調整を必要とし複数の弛緩メカニズムを発達させた可能性がある。心血管系に対する重力の影響に対処してきたと代表的な種のひとつにキリンが挙げられる。キリンは頭部にある脳に血液を送るため、自然かつ健康的に高血圧であることが報告されている [1,62]。ただし、高血圧は通常、ほとんどの動物に様々な障害を引き起こす[59]。したがって、トカラハブとイエローラットスネークには、木登り時の血圧上昇に対抗するメカニズムが必要であり、そのメカニズムとして血圧調節の一部に弛緩反応が関与しているのではないかと推測した。しかし、単一のメカニズムだけでは血圧を調節できないかもしれないため、さまざま

な弛緩メカニズムとして ACh における NO を介した反応や、Isop や 5-HT における NO 非介在性の反応といった多様な機構が発達した可能性がある。へビは生息環境によって血圧や心臓の位置が異なることが知られており[23,24,75]、私たちがトカラハブで示した ACh、Isop、5-HT に対する二相性の胸大動脈反応は、へビの頭部と心臓が垂直に並ぶようになり、木登りの際に起こる血圧の大きな変化への適応を反映しているのかもしれない。

結論としてトカラハブの胸大動脈では、NA と Ang II は収縮を誘発し、ACh、Isop、5-HT は収縮に続く弛緩を誘発した。陸生へビの単調な血管作動性とは異なり、トカラハブの血管作動性は、半樹上性の生活環境に適応したへビに特徴的な多様な調節機構によって支配されている可能性がある。

4-5 図表

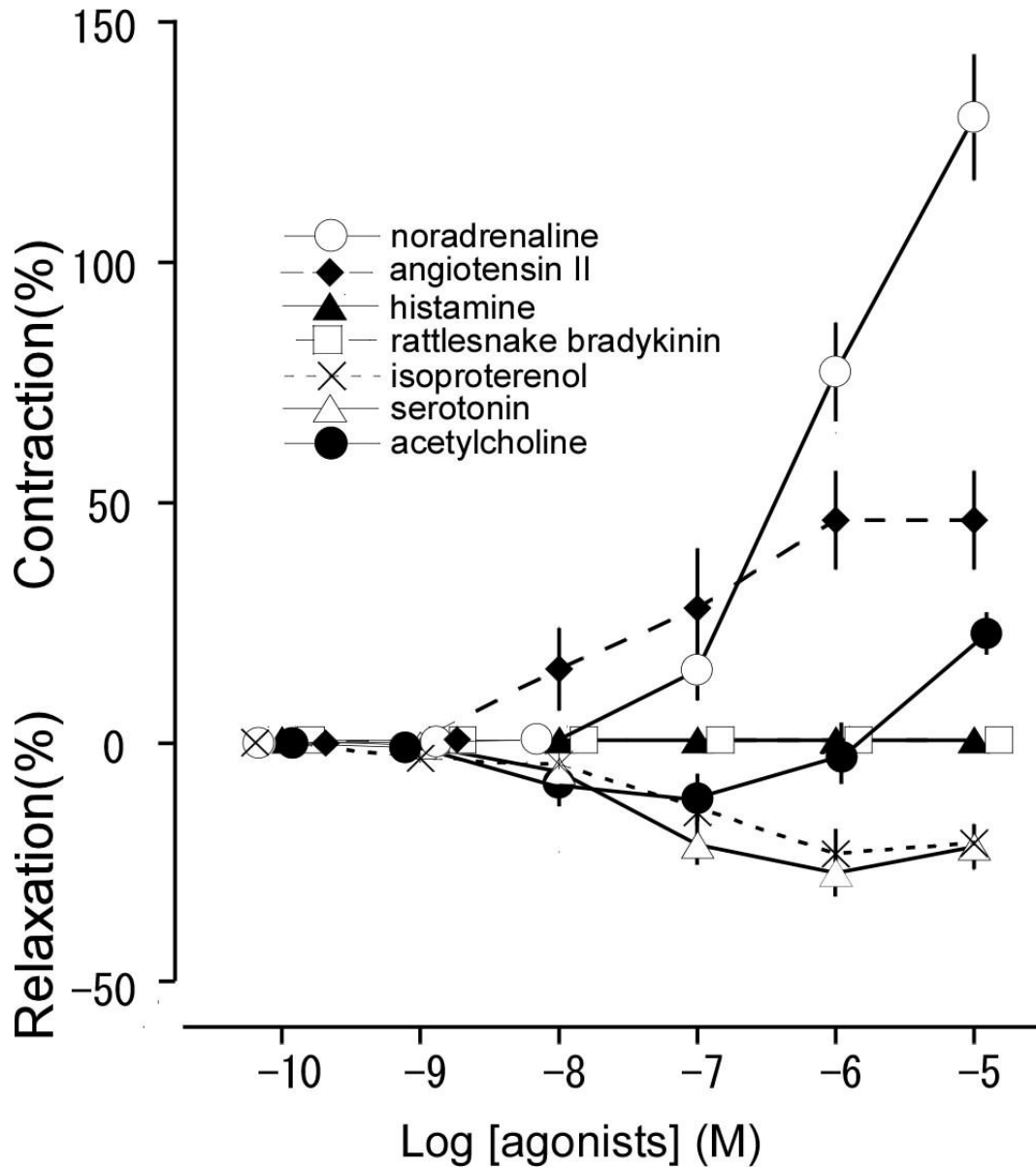


図 4-1. トカラハブ摘出胸大動脈における静止張力下の NA (○)、Ang II (◆)、His (▲)、rattlesnake BK (□)、Isop (×)、5-HT (△)、ACh (●) に対する反応性。60mM の KCl による収縮を 100% とした。SNP (10<sup>-4</sup> M) による弛緩を 100% とした。各プロットは 12 匹の平均値 ± SEM を示す。

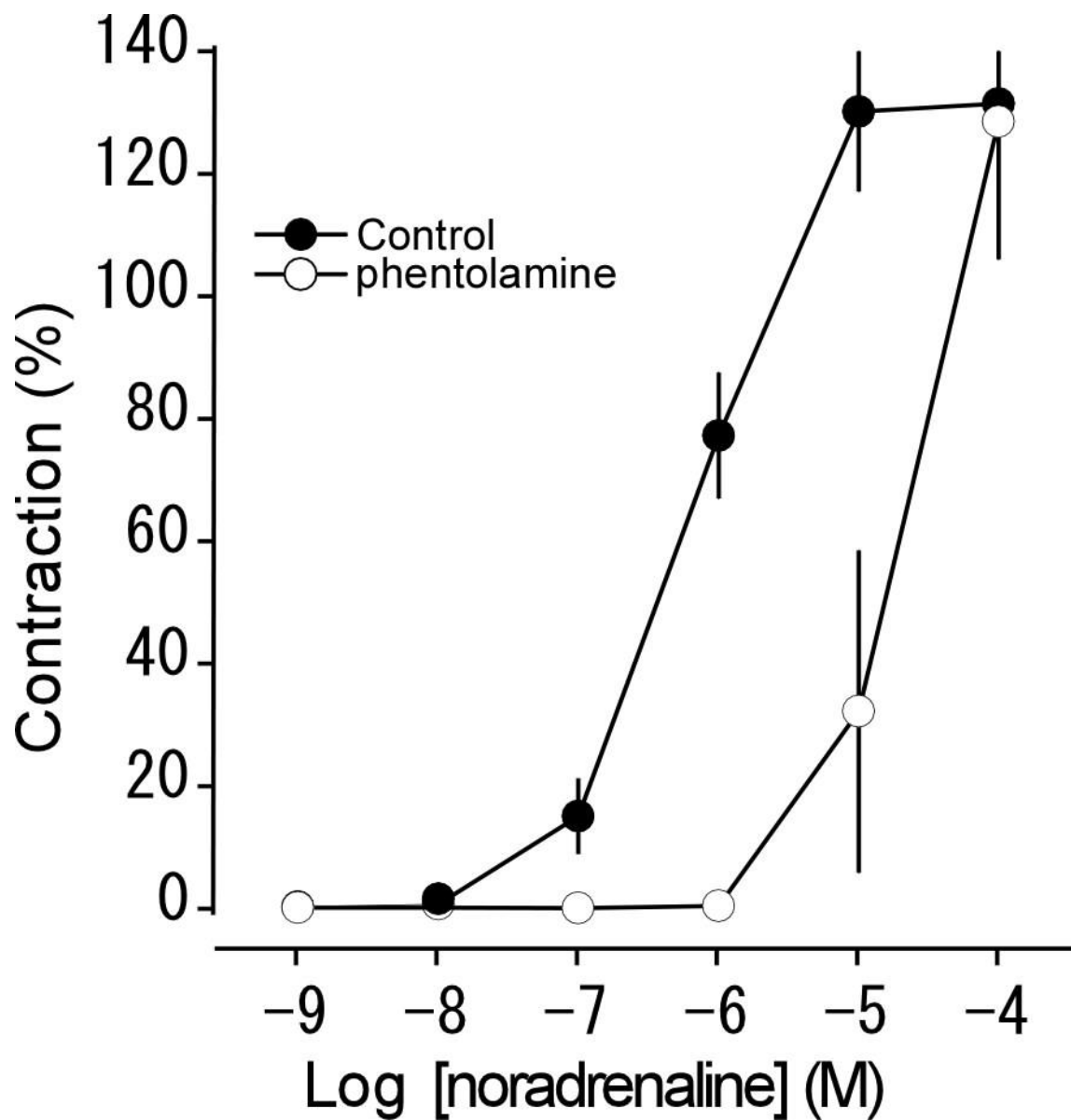


図 4-2. 摘出胸大動脈における NA 誘発収縮 (● : コントロール) に対するフェントラミン (○ : 非選択的  $\alpha$  アドレナリン受容体拮抗薬、 $10^{-6}$  M) の効果。60mM の KCl で誘発された収縮を 100%とした。各プロットは 6 匹の平均値  $\pm$  SEM を表す。

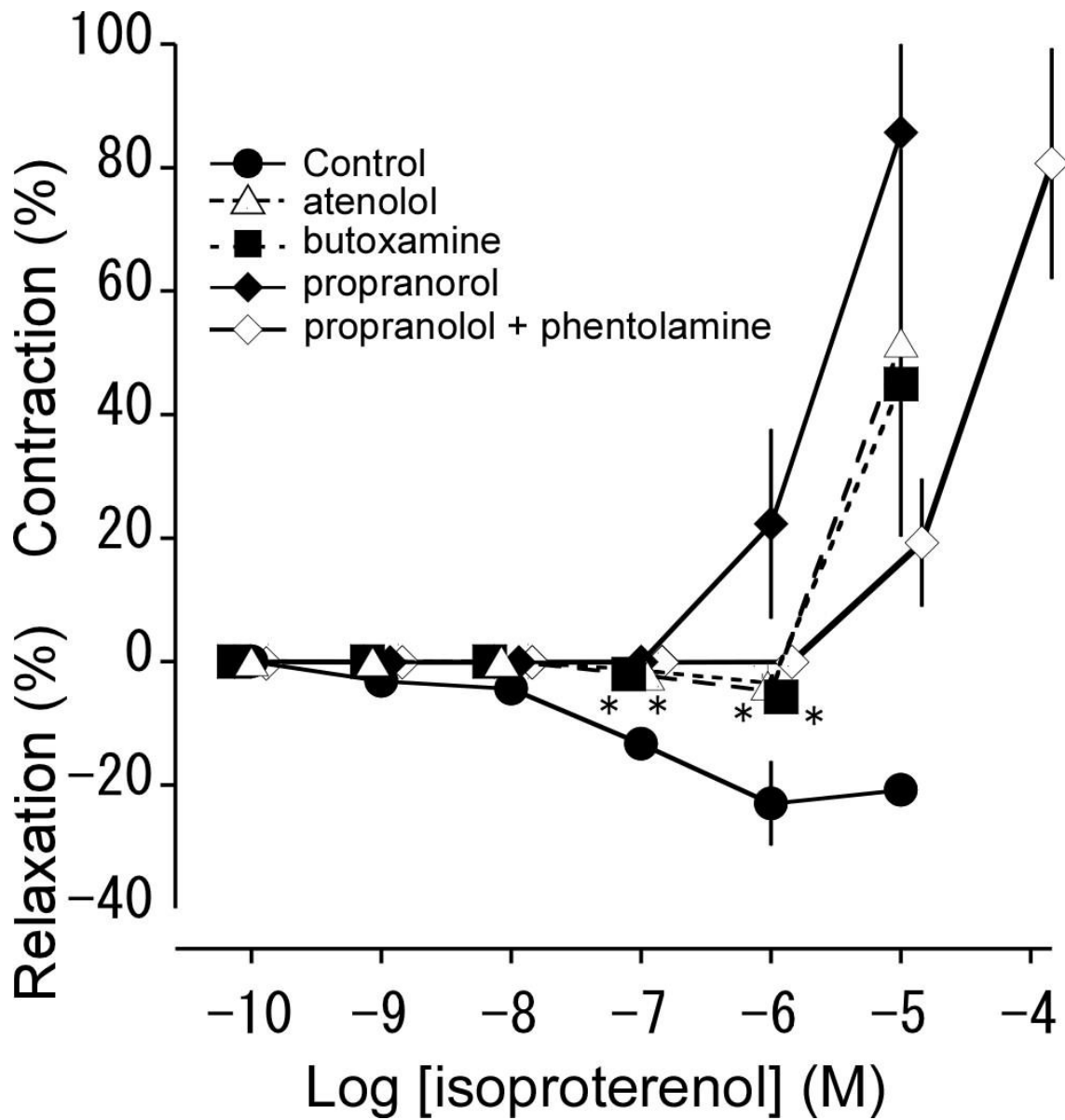


図4-3. プロプラノロール (◆:  $10^{-7}$  M、 $\beta_1$ および $\beta_2$ アドレナリン受容体拮抗薬)、アテノロール ( $\Delta$ :  $10^{-6}$  M、選択的 $\beta_1$ 受容体拮抗薬)、ブトキサミン (■:  $10^{-6}$  M、選択的 $\beta_2$ 受容体拮抗薬)、およびプロプラノロール ( $10^{-6}$  M) + フェントラミン ( $10^{-6}$  M) (◇) が、Isop誘発弛緩および収縮 (●: Control) に及ぼす影響。60mMのKClによる収縮を100%とした。SNP ( $10^{-4}$  M) による弛緩を100%とした。各プロットは6匹の平均値 $\pm$ SEM。\* $P < 0.05$  vs. Control。

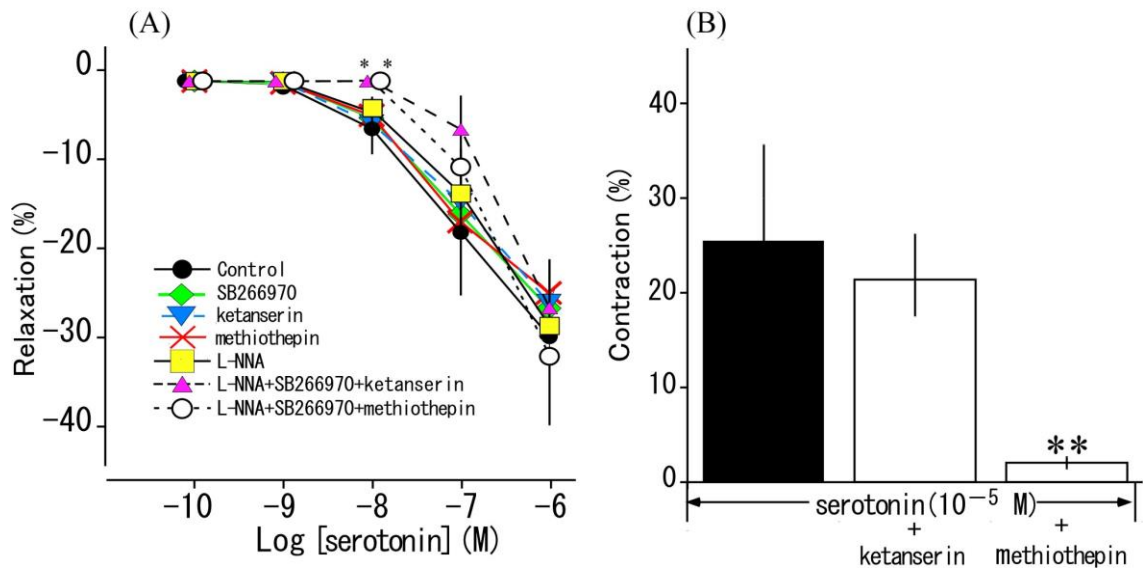


図 4-4. SB269970、メチオセピン、ケタンセリンおよび L-NNA による 5-HT 誘発性弛緩または収縮に対する効果。(A): 5-HT 誘発弛緩 (●: Control, n=12) に対する SB269970 (◇: 10<sup>-7</sup> M, n=6)、ケタンセリン (×: 10<sup>-6</sup> M, n=6)、メチオセピン (×: 10<sup>-8</sup> M, n=6)、L-NNA (□: 10<sup>-4</sup> M, n=6)、L-NNA (10<sup>-4</sup> M) + SB269970 (10<sup>-7</sup> M) + メチオセピン (10<sup>-8</sup> M) (△, n=4)、L-NNA (10<sup>-4</sup> M) + SB269970 (10<sup>-7</sup> M) + ケタンセリン (10<sup>-6</sup> M) (○, n=4) の影響。10<sup>-4</sup> M の SNP で誘発された弛緩を 100% とする相対強度で示した。各プロットは平均値 ± SEM を表す。\*Control と比較した P < 0.05。

(B): 5-HT 誘発収縮に対するメチオセピン (10<sup>-8</sup> M) とケタンセリン (10<sup>-6</sup> M) の効果 (黒: 10<sup>-5</sup> M, Control)。60 mM KCl による収縮を 100% とした。各バーは 6 匹の平均 ± SEM を表す。\*\*P < 0.01。

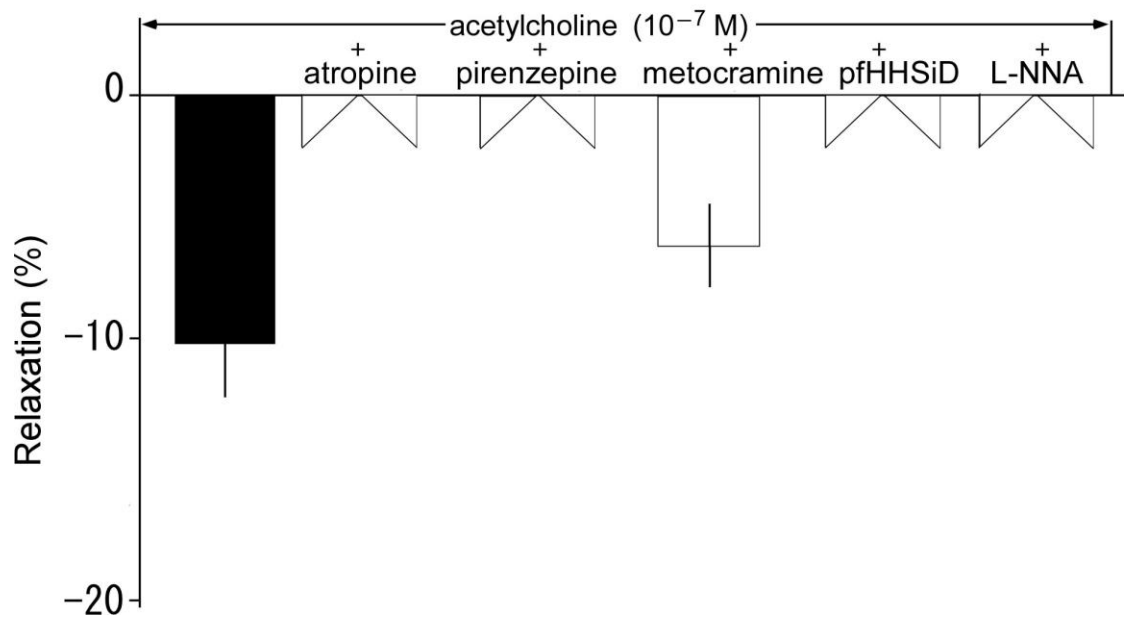


図 4-5. 静止張力状態の胸大動脈における ACh 誘発弛緩 (黒 :  $10^{-7}$  M) に対するアトロピン ( $10^{-6}$  M、非選択的ムスカリン受容体拮抗薬)、ピレンゼピン ( $10^{-6}$  M、 $M_1$  受容体拮抗薬)、メトクトラミン ( $10^{-6}$  M、 $M_2$  受容体拮抗薬)、pfHHSiD ( $10^{-6}$  M、 $M_3$  受容体拮抗薬) および L-NNA ( $10^{-4}$  M) の効果。SNP ( $10^{-4}$  M) による弛緩を 100%とした。各バーは 6 匹の平均値  $\pm$  SEM を示す。

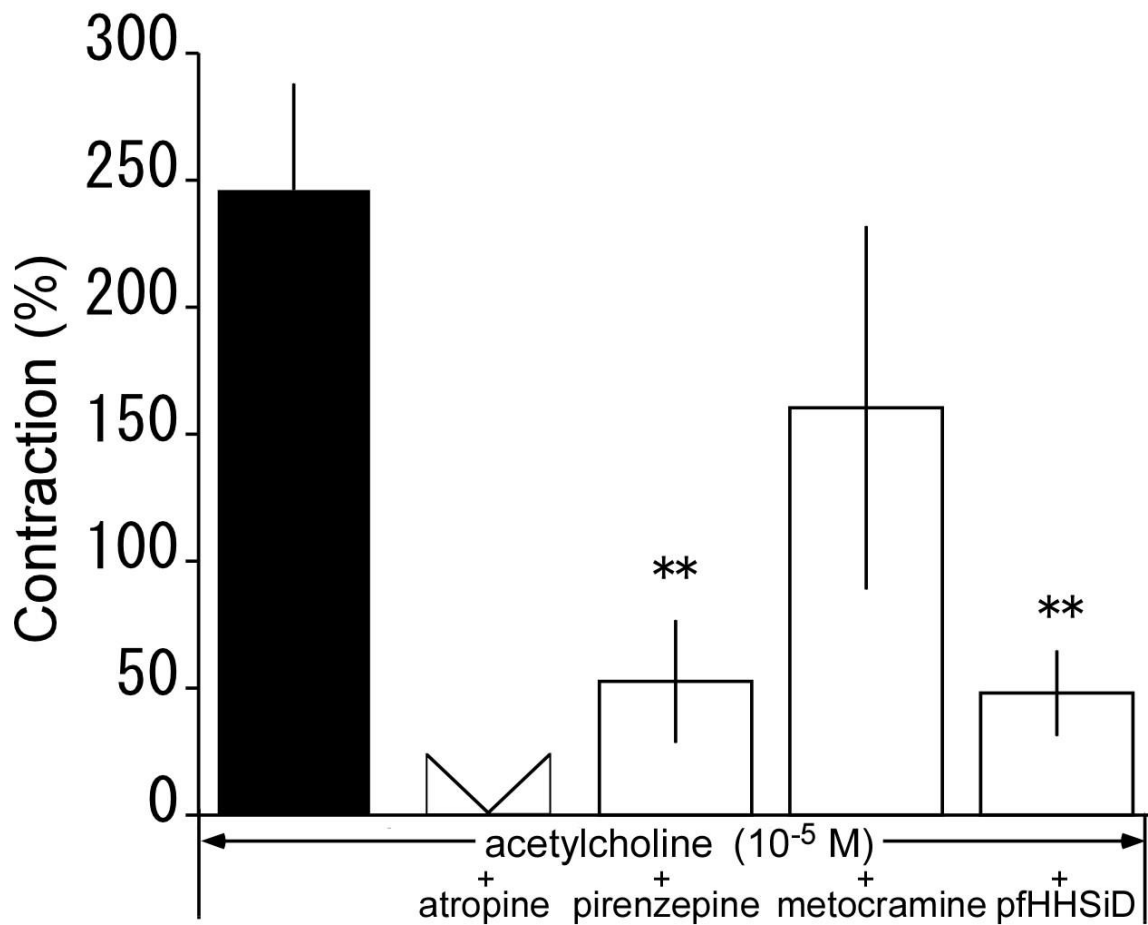


図 4-6. L-NNA (10<sup>-4</sup> M) 存在下での胸大動脈における ACh 誘発収縮 (黒 : 10<sup>-5</sup> M、Control) に対するアトロピン (10<sup>-6</sup> M、非選択的 M 受容体拮抗薬)、ピレンゼピン (10<sup>-6</sup> M、M<sub>1</sub> 再受容体拮抗薬)、メトクトラミン (10<sup>-6</sup> M、M<sub>2</sub> 受容体拮抗薬)、pfHHSiD (10<sup>-6</sup> M、M<sub>3</sub> 受容体拮抗薬) の効果。60mM の KCl で誘発された収縮を 100% とした。各バーは 5 匹の平均 ± SEM を表す。\*\*P < 0.01 は Control の値と比較した。



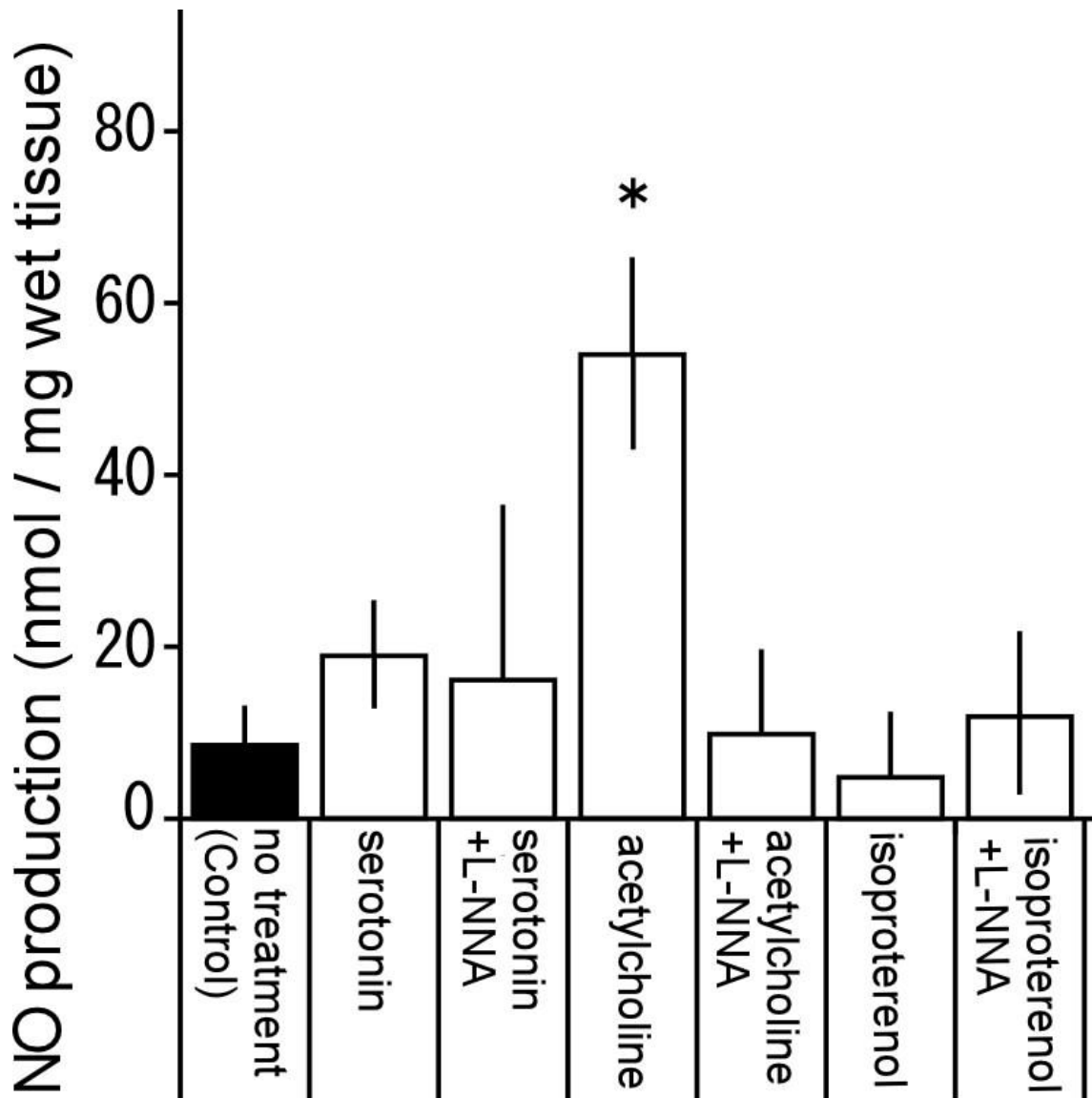


図 4-7. 5-HT ( $10^{-6}$  M)、ACh ( $10^{-7}$  M)、Isop ( $10^{-6}$  M) によって誘発される一酸化窒素 (NO) 産生 ( $[\text{NO}^2^-] + [\text{NO}^3^-]$ ) と、その結果生じる NO 産生に対する L-NNA ( $10^{-4}$  M) の効果。Control: 無処置群。各バーは 10 匹のヘビの動脈の平均  $\pm$  SEM を表す。\* $P < 0.05$  vs. Control。

表 4-1. トカラハブ胸大動脈における各種血管作動性物質に対する反応強度 (E<sub>max</sub>)、感受性 (pEC<sub>50</sub>)

Agonists (n=12)	pEC <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%) (reactivity)
Resting condition (2.4 mN)		
Noradrenaline	6.04 ± 0.14	130.2 ± 13.0 (contraction <sup>a</sup> )
Angiotensin II	7.39 ± 0.06	46.4 ± 10.3 (contraction <sup>a</sup> )
Histamine	–	0 (no response)
Rattlesnake bradykinin	–	0 (no response)
Isoproterenol	7.11 ± 0.07	22.9 ± 0.3 (relaxation <sup>b</sup> )
Serotonin	7.41 ± 0.28	27.6 ± 4.9 (relaxation <sup>b</sup> )
Acetylcholine	8.25 ± 0.19	10.2 ± 3.1 (relaxation <sup>b</sup> )

<sup>a</sup> KCl (60 mM) による収縮を 100%とした.

<sup>b</sup> 60 mM の SNP (10<sup>-4</sup> M) による収縮を 100%とした.

## 総合考察

へビ類の血管反応性が系統に関わらず一定である可能性があること、および生活環境が血管反応性に影響を及ぼす可能性について検証した結果、へビ類の血管反応性は生活環境および系統の両方により変化が生じていることが示された。本研究の結果を踏まえて、へビ類の胸大動脈における血管反応性を脊椎動物群間、へビ類の科、属、種レベルで考察した。

生活環境が血管反応性に及ぼす影響を比較するだけであれば生活環境が異なる種の先行研究は存在したが（地上性へビ 4 例[[28,49,102,105]、半樹上性へビ：1 例[22]）、研究例は少なく半樹上性の種は 1 種のみであった。さらに、序文でも述べたように過去の報告は分類群が多岐にわたり、同じ系統群の血管反応性に関する報告がないため系統的要因を含めた考察をすることが出来なかった。ただし、上記の先行研究の報告から、へビ類の血管反応性の傾向はある程度把握することは可能性あり、報告された血管作動性物質ごとにまとめると NA（収縮）[22,102,105]、Ang II（収縮）[22,28,105]、His（収縮）[22]、Isop（収縮）[102]、ACh（弛緩）[22,49]と、系統的に異なる種であっても同様の結果が報告されているため系統的要因に関わらず血管反応性に差がない可能性があった。

そこで本研究では系統的に近縁かつ生活環境が異なる地上性のハブ（第 3 章）と半樹上性のトカラハブ（第 4 章）の胸大動脈の血管反応性の特徴を把握し比較した。地上性のハブでは検証した血管作動性物質 4 種（NA、Ang II、ACh、5-HT）がすべて静

止張力下において濃度依存性に収縮反応を誘発した。対して、半樹上性のトカラハブでは NA、Ang II は収縮反応を誘発し、5-HT、ACh、Isop は弛緩反応とそれに続発する弛緩反応を示し His と rattlesnake BK は静止張力に影響を及ぼさなかった。両種とも、過去の報告および互いに異なる血管反応性を示した。すなわち、過去の報告例が同様の傾向を示していたのは単に研究した種数が少ないためであり系統により血管反応性が異なることが示された。特に ACh の収縮反応、Isop の弛緩反応、5-HT の弛緩反応はへビ類の胸大動脈で初の報告である。

特に先行研究のへビ類、ハブ、トカラハブでそれぞれ異なる反応が見られた AChACh に着目すると、ACh の反応は魚類[7,69]、両生類 [50,58]では弛緩反応であり、爬虫類のトカゲやカメでは収縮[58,71]、へビでは弛緩[22,49]、鳥類、哺乳類では弛緩である[71,78]。このことから、進化の過程として爬虫類から完全に陸上進出した結果、重力に適応する必要があり、血管内皮細胞の機能も変化した可能性がある。血管内皮細胞は魚類からすでに存在しているが、上記に参照した魚類（トラウト）やトカゲ類やカメ類では内皮細胞の有無による AChACh に対する反応は変化なかった[58,71]。このことから、AChACh による収縮は血管内皮細胞が関与していないことが示されている。また序文でも述べたようにへビ類はトカゲ類の一部から生じた生物であるため[74,77]、トカゲ類の方が系統的には古い生物となり、両生類や魚類と同じく収縮反応を示したと思われる。このように ACh による反応は脊椎動物の系統間で変異

が生じていることが分かる。次にヘビ類の血管反応性を系統的に考察すると、AChACh が収縮反応を示した、ハブ、トカラハブの2種はクサリヘビ科 (Vaiperdae) であり、ACh が弛緩反応のみを示したレッドサイドガータースネークとイエローラックトスネークより系統的に先に生じた古いタイプのヘビ類と考えることができる (図 1-1)。血管反応性を検証したヘビ類が少ないため断定できないが、ACh の弛緩反応はクサリヘビ科付近に出現したヘビ類から発現した形質なのかもしれない。なぜなら興味深いことにトカラハブでは ACh により弛緩反応と収縮反応の両方を示し、AChACh の反応が変化していることを確認したためである。これを検証するためにはクサリヘビ科よりも系統的に古いヘビ類の検証が必要である。さらに、この ACh の反応の変化はトカラハブがハブから分化する過程で樹上性に適応し、血管内皮細胞の機能が発達する過程を示している可能性もあり、進化学的な中間種であると考えられ、進化学上でも貴重な標本であると思われる。すなわち、クサリヘビ科付近に分化した種より血管内皮細胞の機能が発達し M 受容体を介して NO を産生するようになったのではと考察する。

Isop に対する血管反応性すなわち  $\beta$  受容体の関与について、トカラハブでは弛緩反応を示した。それに対して、ジャララカでは弛緩反応を示さなかったことからジャララカの胸大動脈では  $\beta$  受容体が関与していないと考えられる [102]。第 4 章でも述べた通り、トカラハブとジャララカは、属は異なるがともにクサリヘビ科のヘビであり系

統的には近い種である。前者は半樹上性、後者は地上性であることが $\beta$ 受容体の血管反応性に関与している可能性があると考えた。へび類の $\beta$ 受容体の関与については、血管以外に心臓と肺における $\beta$ 受容体の発現が報告されており、 $\beta_1$ と $\beta_2$ ともに発現し、 $\beta_1$ の割合が多いことが報告されている[2]。トカラハブの胸大動脈においても割合は不明であるが $\beta_1$ と $\beta_2$ ともに発現していた。へび類の血管反応性において $\beta$ 受容体の関与を研究した例は本研究を含めてもいまだ2例のみであり、かつ反応性を確認できたのは1例のみであるため、生活環境の影響を含めた異なる系統のへび類の血管反応性の検討が必要である。

5-HT は、過去にハブの脳底動脈における収縮反応（5-HT<sub>1</sub>受容体に関与）[104]と、ヤスリへビにおける肺動脈における関与（受容体については未検証）[25]が報告されているのみで、胸大動脈における血管反応性は不明であった。しかし、ハブの脳底動脈では最も強く収縮反応を示すこと[104]、哺乳類においても、47-120%と一定の強度で収縮反応を示すこと[8,19,72]から、へび類の胸大動脈においても一定強度の収縮反応を示すことが予想された。しかし、ハブでは微弱に胸大動脈を収縮させるのみであり、トカラハブでは弛緩反応とそれに続発する収縮反応を示し予想と大きく異なっていた。ハブの胸大動脈における受容体は不明であるが、脳底動脈における収縮反応が5-HT<sub>1</sub>受容体を介した反応であること、トカラハブの胸大動脈の収縮反応（5-HT<sub>1</sub>受容体に関与）も同様に微弱な反応（約20%）であることから、ハブの胸大動脈における収

縮反応も 5-HT<sub>1</sub> 受容体を介したものであると考察する。トカラハブの胸大動脈における弛緩反応については 5-HT<sub>2</sub> と 5-HT<sub>7</sub> 受容体の関与が示唆されたが、これまで 5-HT による弛緩反応を抑制した報告がある受容体拮抗薬では、弛緩反応を消失させるもしくは反応曲線を平行移動させることはなかった。したがって、その他の因子が関係している可能性が高いが、5-HT 受容体は有するファミリーとサブタイプが多様であるため [35]、現在の受容体拮抗薬を用いた容量飯能曲線の変化を観察する手法ではなく、遺伝子の発現状況など分子学的手法を用いた研究を行う事が求められる。しかし、ハブでは観察されなかった弛緩反応が見られたことは樹上性のヘビ類の特徴である可能性がある。

以上のように、ヘビ類は血管反応性が多様であるが、トカラハブは系統的に近縁なハブやジャララカと比較しても弛緩を誘発する物質が多様でありその強度が大きかった。これはトカラ列島と奄美群島が分離して、ハブから分化し急速に小型化、樹上生活への適応の結果 [94]、血圧を調整するために血管を弛緩させる血管作動性物質が多く必要になったためと考えられ、半樹上性のヘビ類は弛緩を調整する機構が多様であると考えられる。樹上生活では、木登り運動のため、頭部が心臓より上部もしくは下部へと目まぐるしく変化し、その静水圧に適応する必要があるためである [3,90,100]。血管反応性以外では生活環境の違いにより血圧、頭部と心臓の相対的な距離の違いが生じており血管反応性の種変異とも関係しているかもしれない。ただし、ヘビ類の血

管反応性は未解明の点も多く、より詳細に検証するためには、他の系統のヘビ類、たとえばクサリヘビ科よりも系統的に古いヤスリヘビ科 (Acrochordidae) やセダカヘビ科 (Pareatidae) のヘビ類の血管反応性を研究することが必要になる。

次に種内比較として、同種のハブで奄美大島と徳之島に生息する個体群で血管反応性を比較した場合、血管の収縮強度、感受性において徳之島のハブの方が強い反応を示すものもあり、島間での種内変異が生じることが示された。これらの要因としてひとつに島を構成する土壌 (岩盤) の違いによる水の硬度の差、生活環境、気性が異なる可能性を示したが、そのほかの要因についても議論の余地は多分にある。たとえば、食性の違いなどである。奄美諸島個体群と沖縄諸島個体群では毒の遺伝子が異なり、奄美大島と徳之島の個体群間も全くの同一ではないことが示されている[21]。

Chijima et al. (2003) [21]は食性の違い (奄美諸島個体群は哺乳類、沖縄諸島個体群はカエル類を主に捕食している) によると考察している。奄美大島のハブは主に小型哺乳類を捕食しておりことが報告されている[61]。徳之島のハブの食性に関する研究報告はこれまでないが、上記のように同じハブでも地域により食性が異なる可能性が報告されていることから、たとえば徳之島のハブは鳥類を好んで捕食する傾向にあれば、生活環境ひいては血管反応性が異なることを示す手掛かりになるかもしれない。今後それぞれの島のハブの食性や環境選択性の違いなどの検討が必要である。このように多面的な視点から検証すべき事例は無数にあるが、いずれの要因にしろ、奄美大



島と徳之島は分離してから短い期間であるが、同種であっても血管反応に違いが生じるほど、血管反応性は環境要因に敏感な形質といえる。

ここまで、脊椎動物、ヘビ類の科、属、種レベルで考察してきたが系統的な近縁種もしくは同種であっても生活環境・島が異なれば血管反応性が異なるほど、血管反応性は環境要因に敏感であることが示された。今後、血管反応性を比較することで、さらにヘビ類が様々な環境に適応したメカニズムが解明させることを期待する。さらに現状、動物を使用した実験系は超えるべきハードルが多いが、今後、血管平滑筋や血管内皮細胞の受容体の発現状況などについて分子学的手法を用いて確認しつつ、必要に応じて血管反応性も比較することでこれまで、野外観察では難しかった種における生態学的や行動学的知見の収集に役立つ可能性があると考えられる。

## 総括

ハブおよびトカラハブの胸大動脈平滑筋の血管反応性の特徴を把握する研究を行い、ハブ類の種間および種内における比較を行い、以下の新知見を得た。

1. ハブの胸大動脈は、NA、ACh、Ang II、5-HT により濃度依存性に収縮作用を示した。
2. ACh による弛緩反応は  $M_1$ 、 $M_3$  受容体を介した反応であり、ACh によりヘビ類の胸大動脈が収縮反応を示したのは初の報告と考えられる。
3. 奄美大島と徳之島のハブは同種であるが、徳之島の個体の方が血管の収縮強度が強く、感受性が高い。
4. トカラハブの胸大動脈は NA、Ang II に対しては収縮反応を示し、ACh、Isop、5-HT に対しては低濃度では弛緩反応、高濃度では収縮反応を示し、His、rattlesnake BK に対しては反応を示さなかった。
5. ACh、Isop、5-HT が誘発する弛緩反応に続発する収縮反応はこれまでのヘビ類では報告がなく、この二相性反応はトカラハブの血管反応性の特徴と思われる。
6. ACh、Isop、5-HT は静止張力下で弛緩を誘発するほど弛緩反応の強度が高かった。過去に報告されたヘビ類の反応では前収縮状況でのみ弛緩反応は確認された。

7. NA は  $\alpha_1$  受容体、ACh は  $M_1$ 、 $M_3$  受容体、Isop は  $\beta_1$ 、 $\beta_2$  受容体の関与が示唆され、5-HT は反応に関与するすべての受容体を推定することが出来なかったが少なくとも 5-HT<sub>1</sub>、5-HT<sub>2</sub>、5-HT<sub>7</sub> 受容体が関与していることが示唆された。
8. トカラハブの胸大動脈に弛緩反応を誘発する ACh、Isop、5-HT について、ACh は NO を介した機構であるが、Isop と 5-HT は NO が関与しない機構であり、トカラハブの胸大動脈には複数の弛緩反応を誘発する機構が存在した。
9. 系統的に最も近縁であるが、生活環境が異なる半樹上性のトカラハブと地上性のハブを比べると、樹上性のトカラハブは血管調整機構が発達し複数の血管弛緩機構が備わっていると思われる。また、弛緩強度も地上性のヘビと比較して強い。
10. 結論。ヘビ類は生息する環境、地域により血管反応性が異なり、特に樹上性のヘビでは多様な弛緩作用により血管張力を調整していると思われる。

## 引用文献

1. Aalkjær C, Wang T. 2021. The Remarkable Cardiovascular System of Giraffes. *Ann Rev Physiol* **83**: 1-15.
2. Abdurashid FA, Oluwafemi FA, Hussaini SJ, Daniel IB, Isah B, Ademu A, Dumbiri CO. 2020. Environment on Astronauts' Physiology.
3. Abraham G, Hoffmann S, Hochheim I, Pees M. 2019. Distribution and properties of cardiac and pulmonary  $\beta$ -adrenergic receptors in corn snakes (*Pantherophis guttatus*) and Boa constrictor (*Boa constrictor*). *Comp Biochem Physiol; A Molecul Integr Physiol* **233**: 17-23.
4. Adamopoulos K, Koutsouris D, Zaravinos A, Lambrou GI. 2021. Gravitational influence on human living systems and the evolution of species on earth. *Molecules* **26**: 2784.
5. Albuquerque AAS, Carvalho MTM, Evora PM, De Nadai TR, Celotto AC, Evora PRB. 2016. In vitro reactivity ("organ chamber") of guinea pig tracheal rings—methodology considerations. *Ann Transl Med* **4**.
6. Bardou M, Loustalot C, Cortijo J, Simon B, Naline E, Dumas M, Esteve, S, Croci, T, Chalon, P, Frydman, R, et al. 2000. Functional, biochemical and molecular biological evidence for a possible  $\beta_3$ -adrenoceptor in human near-term myometrium. *Br J Pharmacol* **130**:1960-1966.
7. Bellairs AdA, Underwood G. 1951. The origin of snakes. *Biol Rev* **26**: 193-237.
8. Bergman HL, Olson KR, Fromm PO. 1974. The effects of vasoactive agents on the functional surface area of isolated-perfused gills of rainbow trout. *J Comp Physiol B* **94**: 267-286.
9. Bhaskaran S, Zaluski J, Banes-Berceli A. 2014. Molecular interactions of serotonin (5-HT) and endothelin-1 in vascular smooth muscle cells: in vitro and ex vivo analyses. *Am J Physiol-Cell Physiol* **306**: C143-C151.
10. Bodelsson M, Törnebrandt K, Arneklo-Nobin B. 1993. Endothelial relaxing 5-hydroxytryptamine receptors in the rat jugular vein: similarity with the 5-hydroxytryptamine<sub>1C</sub> receptor. *J Pharmacol Exp Ther* **264**: 709-716.
11. Bonner TI, Young AC, Bran MR, Buckley NJ. 1988. Cloning and expression of the human and rat m5 muscarinic acetylcholine receptor genes. *Neuron* **1**: 403-410.
12. Borgheresi RA, Dalle Lucca, J, Carmona, E, Picarelli, ZP. 1996. Isolation and identification of angiotensin-like peptides from the plasma of the snake *Bothrops jararaca*, *Comp Biochem Physiol, Part B: Biochem Mol Biol* **113**:467-473.
13. Bowler MT, Tobler MW, Endress BA, Gilmore MP, Anderson MJ. 2017. Estimating mammalian species richness and occupancy in tropical forest canopies with arboreal camera traps. *Remote Sens Ecol Conserv* **3**: 146-157.

14. Braz HB, Kasperoviczus KN, Almeida-Santos SM. 2014. Reproductive ecology and diet of the fossorial snake *Phalotris lativittatus* in the Brazilian Cerrado. *Herpetol J* **24**: 49-57.
15. Briejer M, Akkermans L, Schuurkes J 1995. Interactions of serotonin with multiple receptors and neurotransmitters in the guinea-pig isolated colon. *Arc Int Pharmacodyn Ther* **329**: 121-133.
16. Burnstock G, Verkhatsky A. 2010. Vas deferens—a model used to establish sympathetic cotransmission. *Trends Pharmacological sciences* **31**: 131-139.
17. Caldwell MW. 1999. Squamate phylogeny and the relationships of snakes and mosasauroids. *Zool J Linn Soci* **125**: 115-147.
18. Caldwell MW, Lee MS. 1997. A snake with legs from the marine Cretaceous of the Middle East. *Nature* **386**: 705-709.
19. Campos-Bedolla P, De-La-Cruz-Negrete R, Vargas MH, Torrejón-González EG, Mendoza-Mejia D, Islas-Hernandez A, Sefura-Medina P, Cordoba-Rodriguez G, Orozco-Suarez S, Arreola-Ramírez JL. 2020. Allergic sensitization increases contractile responses to 5-HT in guinea pig aorta. *Physiol Res* **69**: 191-197.
20. Carlson AB, Kraus GP. 2022. Physiology, cholinergic receptors. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.
21. Chijiwa T, Yamaguchi Y, Ogawa T, Deshimaru M, Nobuhisa I, Nakashima K, Ohno M. 2003. Interisland evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom phospholipase A2 isozymes. *J Mol Evol* **56**: 286-293.
22. Conklin DJ, Lillywhite HB, Olson KR, Ballard RE, Hargens AR. 1996. Blood vessel adaptation to gravity in a semi-arboreal snake. *J Comp Physiol, B* **165**: 518-526.
23. Des Marais DJ, Nuth III JA, Allamandola LJ, Boss AP, Farmer JD, Hoehler TM, Runnegar, B. 2008. The NASA astrobiology roadmap. *Astrobiol* **8**: 715-730.
24. Diamond EL. 1982. The role of anger and hostility in essential hypertension and coronary heart disease. *Psychol Bull* **92**: 410.
25. Donald J, Lillywhite H. 1989. Adrenergic nerves and 5-hydroxytryptamine-containing cells in the pulmonary vasculature of the aquatic file snake *Acrochordus granulatus*. *Cell Tissue Res* **256**: 113-118.
26. Dong Q, Deng S, Wang R, Yuan, J. 2011. In vitro and in vivo animal models in priapism research. *J Sex Med* **8**: 347-359.
27. Ellis ES, Byrne C, Murphy OE, Tilford NS, Baxter GS. 1995. Mediation by 5-hydroxytryptamine<sub>2B</sub> receptors of endothelium-dependent relaxation in rat jugular vein. *Br J Pharmacol* **114**: 400-404.

28. Esteves CA, Burckhardt PL, Breno MC. 2012. Presence of functional angiotensin II receptor and angiotensin converting enzyme in the aorta of the snake *Bothrops jararaca*. *Life Sci* **91**: 944-950.
29. Filogonio R, Sartori MR, Morgensen S, Tavares D, Campos R, Abe AS, Talor EW, Rodrigues GJ, Nucci GD, Simonsen U, Leite CAC, Wang T. 2020. Cholinergic regulation along the pulmonary arterial tree of the South American rattlesnake: vasoreactivity, muscarinic receptors, and vagal innervation. *Am J Physiol: Regul, Integr Comp Physiol* **319**: R156-R170.
30. Flacco N, Segura V, Perez-Aso M, Estrada S, Seller J, Jiménez-Altayó F, Noguera M, D'Ocon P, Vila E, Ivorra M. 2013. Different  $\beta$ -adrenoceptor subtypes coupling to cAMP or NO/cGMP pathways: implications in the relaxant response of rat conductance and resistance vessels. *Br J Pharmacol* **169**: 413-425.
31. Fry C. 2004. Experimental models to study the physiology, pathophysiology, and pharmacology of the lower urinary tract. *J Pharmacol Toxicol Met* **49**: 201-210.
32. Galli GL, Skovgaard N, Abe AS, Taylor EW, Conlon JM, Wang T. 2005. Cardiovascular actions of rattlesnake bradykinin ([Val<sup>1</sup>, Thr<sup>6</sup>] bradykinin) in the anesthetized South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. *Am J Physiol-Regul, Integr Comp Physiol* **288**: R456-R465.
33. Geospatial Information Authority of Japan. 2023. *Maps & Geospatial Information*. Available online: [https://www.gsi.go.jp/ENGLISH/page\\_e30031.html](https://www.gsi.go.jp/ENGLISH/page_e30031.html) (accessed on 22 September 2023).
34. Glusa E, Pertz HH. 2000. Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT<sub>2B</sub> receptors. *Br J Pharmacol*. **130**: 692-698.
35. Hannon J, Hoyer D. 2008. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behav Brain Res* **195**: 198-213.
36. Hasegawa K, Nishimura H. 1991. Humoral factor mediates acetylcholine-induced endothelium-dependent relaxation of chicken aorta. *Gen Comp Endocrinol* **84**: 164-169.
37. Harrington SM, De Haan JM, Shapiro L, Ruane S. 2018. Habits and characteristics of arboreal snakes worldwide: arboreality constrains body size but does not affect lineage diversification *Biol J Linn Soc* **125**: 61-71.
38. 日本爬虫両棲類学会編. 2021. 新 日本両生爬虫類図鑑 (編集代表 松井正文・森哲). サンライズ出版. 滋賀.
39. Herr MW, Graham SP, Langkilde T. 2017. Stressed snakes strike first: Hormone levels and defensive behavior in free ranging cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*). *Gen Comp Endocrinol* **243**: 89-95.

40. Hill BJ, Dyer DC. 1997. Pharmacological characterization of  $\alpha$ -adrenoceptors in the bovine median caudal artery. *Eur J Pharmacol* **339**: 147-151.
41. 本郷峻. 2018. 霊長類学におけるカメラトラップ研究. *霊長類研究* **34**:53-64.
42. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. 1996. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* **76**: 967-1003.
43. Ishiguro S, Matsuyama T, Sakoda T, Sakaguchi H, Miyamoto A, Nishio A. 1997. Ex vivo study of the effects of dietary magnesium deficiency on the formation and release of NO from endothelial cells and the sensitivity to NO of smooth muscle cells of thoracic aortas isolated from rats. *Magnes Res* **10**: 11-20.
44. Islam MZ, Kojima S, Sameshima M, Obi T, Yamazaki-Himeno E, Shiraishi M, Miyamoto A. 2021. Vasomotor effects of noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, angiotensin II, bradykinin, histamine, and acetylcholine on the bat (*Rhinolophus ferrumequinum*) basilar artery. *Comp Biochem Physiol, Part C: Toxicol Pharmacol* **250**: 109190.
45. Islam MZ, Van Dao C, Miyamoto A, Shiraishi M. 2017. Rho-kinase and the nitric oxide pathway modulate basilar arterial reactivity to acetylcholine and angiotensin II in streptozotocin-induced diabetic mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **390**: 929-938.
46. Islam MZ, Watanabe Y, Nguyen HTT, Yamazaki-Himeno E, Obi T, Shiraishi M, Miyamoto A. 2014. Vasomotor effects of acetylcholine, bradykinin, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, histamine and angiotensin II on the mouse basilar artery. *J Vet Med Sci* **76**: 1339-1345.
47. ählichen S, Glusa E, Pertz HH. 2005. Evidence for 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs. *Naunyn-Schmiedeb'rg's Arch. Pharmacol* **371**: 89-98.
48. 鹿児島県. 2023a. 年度・保健所・市町村・業者別ハブ買上状況（最近10年間）. URL [http://www.pref.kagoshima.jp/ae10/kenko-fukushi/yakuji-eisei/habu/documents/4349\\_20230417104734-1.pdf](http://www.pref.kagoshima.jp/ae10/kenko-fukushi/yakuji-eisei/habu/documents/4349_20230417104734-1.pdf). (accessed on May 11, 2023).
49. Knight GE, Burnstock G. 1993. Acetylcholine induces relaxation via the release of nitric oxide from endothelial cells of the garter snake (*Thamnophis sirtalis parietalis*) aorta. *Comp Biochem Physiol, Part C: Pharmacol, Toxicol Endocrinol* **106**: 383-388.
50. Knight GE, Burnstock G. 1996. The involvement of the endothelium in the relaxation of the leopard frog (*Rana pipiens*) aorta in response to acetylcholine. *Br J Pharmacol* **118**: 1518-1522.
51. 小林嵩, 品川昭夫. 1966. 南西諸島の土壌に関する研究: 2. 奄美大島及び徳之島の土壌の一般理化学的性質について. 鹿児島大学農学部學術報告 **17**: 43-72.

52. Langton P. 2012. who taught me to respect the potential in dedication and hard work and the value of integrity; attributes that no research scientist should ignore. Lastly to Alice, Polly and Jess who just wanted to see their names in print. *Essential Guide to Reading Biomedical Papers*.
53. Lillywhite HB. 1988. Snakes, blood circulation and gravity. *Sci Am* **259**: 92-99.
54. Lillywhite HB. 2014. *How snakes work: structure, function and behavior of the world's snakes*. Oxford University Press.
55. Lillywhite HB, Albert JS, Sheehy CM, Seymour RS. 2012. Gravity and the evolution of cardiopulmonary morphology in snakes. *Comp Biochem Physiol, Part A: Mol Integr Physiol* **161**: 230-242.
56. Luzzatto L. 2012. Sick cell anaemia and malaria. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **4**.
57. Matsumoto F, Watanabe Y, Obi T, Islam M, Yamazaki-Himeno E, Shiraishi M, Miyamoto A. 2012. Characterization of 5-hydroxytryptamine-induced contraction and acetylcholine-induced relaxation in isolated chicken basilar artery. *Poult Sci* **91**: 1158-1164.
58. Miller VM, Vanhoutte PM. 1986. Endothelium-dependent responses in isolated blood vessels of lower vertebrates. *J Vasc Res* **23**: 225-235.
59. Mills KT, Stefanescu A, He J. 2020. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol* **16**: 223-237.
60. 環境省. 2020. 環境省レッドリスト. <https://www.env.go.jp/content/900515981.pdf>
61. 三島章義. 1966. ハブに関する研究: I. 奄美群島産ハブの食性について. *衛生動物*, **17**: 1-21.
62. Mitchell, G, Skinner, JD. 2009. An allometric analysis of the giraffe cardiovascular system. *Comp Biochem Physiol Part A: Mol Integr Physiol* **154**: 523-529.
63. Miyamoto A, Ito K, Nishio A. 1993. Characterization of  $\beta$ -adrenoceptors in pig basilar artery from functional and radioligand binding studies. *Jpn J Pharmacol* **61**: 93-99.
64. Miyamoto A, Kanda J, Nishio A. 1995. Responsiveness of equine basilar artery to transmural nerve stimulation differs from that of porcine and bovine basilar arteries in vitro. *J Vet Med Sci* **57**: 365-366.
65. Miyamoto A, Moriki H, Ishiguro S, Nishio A. 2005. In vitro application of endotoxin enhances nitric oxide production in thoracic aortas from Mg-deficient rats. *Magnes Res* **18**: 155-162.
66. Miyamoto A, Obi T, Nishio A. 1996. The vasomotor effects of 5-hydroxytryptamine on equine basilar arteries in vitro. *Vet Res Commun* **20**: 61-70.
67. Murray-Close D, Crick NR. 2007. Gender differences in the association between cardiovasoreactivity and aggressive conduct. *Int J Psychophysiol* **65**: 103-113.



- 68.中井穂瑞領. 2020. 毒蛇ハブー生態から対策史。文化まで、ハブのすべてを詳説  
ー 初版. 株式会社南方新社. 鹿児島.
- 69.Nilsson S, Holmgren S, Grove DJ. 1975. Effects of drugs and nerve stimulation on the spleen and arteries of two species of dogfish, *Scyliorhinus canicula* and *Squalus acanthias*. *Acta Physiol Scand* **95**: 219-230.
- 70.Obit T, Kabeyama A, Nishio A. 1994. Equine coronary artery responds to 5-hydroxytryptamine with relaxation in vitro. *J Vet Pharmacol Ther* **17**: 218-225.
- 71.Ogundahunsi OA, Tayo FM. 1988. Comparative effects of acetylcholine on the reptilian and mammalian aortae. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **293**: 127-133.
- 72.Ozsarlak-Sozer G, Sevin G, Ozgur HH, Yetik-Anacak G, Kerry Z. 2016. Diverse effects of taurine on vascular response and inflammation in GSH depletion model in rabbits. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **20**: 1360-1372.
- 73.Pavek K, Taube A. 2009. Personality characteristics influencing determinacy of day and night blood pressure and heart rate. *Blood Press* **18**: 30-35.
- 74.Peng C, Wu DD, Ren JL, Peng ZL, Ma Z, Wu W, Lv Y, Wang Z, Deng C, Jiang K, Parkinson CL, Qi Y, Zhang ZY, Jiang, K. 2023. Large-scale snake genome analyses provide insights into vertebrate development. *Cell* **186**: 2959-2976
- 75.Perez D, Sheehy III CM, Lillywhite HB. 2019. Variation of organ position in snakes. *J Morphol* **280**: 1798-1807.
- 76.Pocock G, Richards CD, Richards DA. 2016. Human physiology, 4th ed., Oxford University Press, Oxford.
- 77.Pyron RA, Burbrink FT, Wiens JJ. 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol Biol* **13**: 1-54.
- 78.Rapoport M, Murad F. 1983. Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* **52**: 352-357
- 79.斎藤能彦. 2008. 「心腎連関の主因は何か」. 日本心臓病学会誌 **2**: 208-213.
- 80.鮫島正道, 中村正二, 中村麻理子. 2014. 鹿児島島の陸生へビ類の分布と生態. *Nature of Kagoshima* **40**: 247-256.
- 81.Seymour RS, Hargens AR, Pedley TJ. 1993. The heart works against gravity. *Am J Physiol: Regul, Integr Comp Physiol.* **265**: R715-R720.
- 82.Shibata H, Chijiwa T, Hattori S, Terada K, Ohno M, Fukumaki Y. 2016. The taxonomic position and the unexpected divergence of the Habu viper Protobothrops among Japanese subtropical islands. *Mol Phylogenet Evol* **101**: 91-100.
- 83.Skovgaard N, Abe AS, Taylor EW, Wang T. 2018. Cardiovascular effects of histamine in three widely diverse species of reptiles. *J Comp Physiol B* **188**: 153-162.

84. Skovgaard N, Møller K, Gesser H, Wang T. 2009. Histamine induces postprandial tachycardia through a direct effect on cardiac ACh<sub>2</sub>-receptors in pythons. *Am J Physiol: Regul, Integr Comp Physiol* **296**: R774-R785.
85. Song S, Yao N, Yang M, Liu X, Dong K, Zhao Q, Pu Y, He X, Guan W, Yang N, Ma Y, Jiang L. 2016. Exome sequencing reveals genetic differentiation due to high-altitude adaptation in the Tibetan cashmere goat (*Capra hircus*). *BMC Genom* **17**: 1-12.
86. Spina D. 2002. Airway nerves: neurotransmitter release. *Curr Opin Pharmacol* **2**: 283-285.
87. Stegall HF. 1966. Muscle pumping in the dependent leg. *Circ Res* **19**: 180-190.
88. Suzuki M, Wu S, Ootawa T, Smith H, Shiraishi M, Miyamoto A, Matsuoka Y, Sawa S, Mori M, Mori H, Yamori Y. 2023. Relationship between Regional Distribution of Centenarians and Drinking Water Hardness in the Amami Islands, Kagoshima Prefecture, Japan. *Nutrients* **15**: 1539.
89. Tanaka Y, Horinouchi T, Koike K. 2005. New insights into  $\beta$ -adrenoceptors in smooth muscle: Distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **32**: 503-514.
90. Tashiro Y, Goto A, Kunisue T, Tanabe S. 2021. Contamination of habu (*Protobothrops flavoviridis*) in Okinawa, Japan by persistent organochlorine chemicals. *Environ Sci Pollut Res* **28**: 1018-1028
91. Taylor A. 1977. Comparative physiology of the renin-angiotensin system. *Fed. Proc* **36**: 1776-1780.
92. 寺田昌弘. 2022. 第 9 章 宇宙環境滞在中に生じる人体への影響. *J Integr Creat Stud.* **2022**:1-12.
93. Reeder TW, Townsend TM, Mulcahy DG, Noonan BP; Wood PL, Sites JW, Wiens JJ. 2015. "Integrated Analyses Resolve Conflicts over Squamate Reptile Phylogeny and Reveal Unexpected Placements for Fossil Taxa". *Plos One* **10**: e0118199.
94. Toda M. 2014. Red Data Book 2014.- Threatened Wildlife of Japan -: Reptilia /Amphibia, Ministry of Environment (ed.); GYOSEI Corporation: Tokyo, Japan, 2014, pp. 82.
95. Todd BD, Willson JD, Winne CT, Gibbons JW. 2008. Aspects of the Ecology of the Earth Snakes (*Virginia valeriae* and *V. striatula*) in the Upper Coastal Plain. *Southeast Nat* **7**: 349-358.
96. Todd BD, Willson JD, Winne CT, Semlitsch RD, Gibbons JW. 2008. Ecology of the southeastern crowned snake, *Tantilla coronata*. *Copeia*, **2008**: 388-394.
97. Tsuchiya K, Wakana S, Suzuki H, Hattori S, Hayashi Y. 1989. Taxonomic Study of Tokudaia (Rodentia: Muridae): I (in Japanese). Genetic Differentiation. *Mem Nati Mus Nat Sci* **22**: 227-234. (In Japanese with English summary).

98. UNESCO. 2021. Decisions adopted at the 44th extended session of the World Heritage Committee. UNESCO World Heritage Centre. <https://whc.unesco.org/archive/2021/whc-21-44com-18-en.pdf> (accessed 25 March, 2023).
99. Vogel HG. 2008. Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays (3 ed.). pp. 9–10 / Springer Science & Business Media, Berlin.
100. White CR, Seymour RS. 2014. The role of gravity in the evolution of mammalian blood pressure. *Evol* **68**: 901-908.
101. Wu S, Ootawa T, Sekio R, Smith H, Islam MZ, Uno Y, Shiraishi M, Miyamoto A. 2023. Involvement of beta<sub>3</sub>-adrenergic receptors in relaxation mediated by nitric oxide in chicken basilar artery. *Poult Sci* **102**: 102633.
102. Yamanouye N, Picarelli Z. 1992. Characterization of postjunctional alpha-adrenoceptors in the isolated aorta of the snake *Bothrops jararaca*. *Comp Biochem Physiol Part C: Pharmacol, Toxicol Endocrinol* **103**: 615-618.
103. 山下雅道, 内藤富夫. 2002. 両生類の重力生物学の展望. *Biol Sci Space* **16**: 245-270.
104. Yoshinaga N, Okuno T, Watanabe Y, Matsumoto T, Shiraishi M, Obi T, Yabuki A, Miyamoto A. 2007. Vasomotor effects of noradrenaline, acetylcholine, histamine, 5-hydroxytryptamine and bradykinin on snake (*Trimeresurus flavoviridis*) basilar arteries. *Comp Biochem Physiol Part C: Toxicol Pharmacol* **146**: 478-483.
105. Yung WH, Chiu KW. 1985. Contractile response of the isolated dorsal aorta of the snake to angiotensin II and norepinephrine. *Gen Comp Endocrinol* **60**: 259-265.

## 謝辞

本研究は、鹿児島大学大学院共同獣医学研究科 薬理学教室において、宮本篤教授のご指導のもとに行われました。

終始、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました宮本篤教授に謹んで深謝申し上げます。

本研究に際し、数々の貴重な御助言、御指導、御討論をいただきました、宇野泰広准教授、白石光也教授、内藤清惟准教授をはじめとした鹿児島大学共同獣医学基礎獣医学講座の皆様に深く感謝申し上げます。

学部生時代から含めて同研究室の Md. Zahorul Islam、Ha Thi Thanh Nguyen、鈴木舞、呉思遠、島村昇吾、関尾涼哉、木村日花莉、には適宜実験のフォローや実験中の議論などで大変助けられました。

論文執筆に際する英語校正については、ヘンリー・スミスに非常にお世話になり誠に深謝いたします。

また、研究を行う上で試料提供にご協力いただいた名瀬保健所、徳之島保健所、十島村役場の皆様、小宝島の岩下英之氏にお礼申し上げます。

最後に、職場の一般財団法人自然環境研究センターの久保田利秀本部長、安齊友巳部長、中山文仁、邑井徳子部長代理（当時）には大学院への進学を認めていただき、所内での対応を講じていただき誠にありがとうございます。同じく自然環境研究センターの戸田光彦、高橋洋生、猿田朝久、村上勇樹には、同じチームとして適宜アドバ

イスをいただきました、学業を進める上で様々なフォローをしていただき感謝いたします。