

平成 21 年 3 月 27 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590217  
 研究課題名 (和文) 前脳のADH分泌制御機構における興奮性・抑制性アミノ酸伝達物質の機能的連関の解明  
 研究課題名 (英文) Elucidation of functional correlation between excitatory and inhibitory amino-acid transmitters in the forebrain ADH-releasing mechanism  
 研究代表者  
 山口 賢一 (Yamaguchi Ken'ichi)  
 新潟大学・医歯学系・講師  
 研究者番号：50108023

## 研究成果の概要：

基礎状態において、AV3VのGABA神経は、A受容体(-R)を介して、ADH分泌を緊張的に抑えているが、この働きが弱まると、NMDA-Rや非NMDA-Rを介するGlu神経の作用が増大し、ADH分泌が刺激される。高浸透圧や低容量/低血圧環境に曝されると、AV3VのGABA神経の働きが衰え、それに伴って、Glu神経の働きが強まり、上記の向イオン性Glu-Rを介し、ADH分泌が刺激されると考えられる。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	630,000	4,130,000

## 研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：第三脳室前腹側部(AV3V), GABA, グルタミン酸, ADH, Vasopressin, 高浸透圧, 低容量

## 1. 研究開始当初の背景

体液浸透圧や血液量/血圧の変化は、第三脳室前腹側部(AV3V)の神経構造により、直接的に感受されるか、或いはその情報が神経路を通じて間接的にAV3Vに伝えられ、ADH分泌や心血管機能などにホメオスタシス反応が惹起される。AV3Vにある正中視索前核(MnPO)は、浸透圧感受野と見なされているAV3Vの終板器官(OVLT)や近隣の脳弓下器官(SFO)から、興奮性のグルタミン酸(Glu)神経の入力とともに、抑制性のγ-アミノ酪酸(GABA)神経の

入力を受けている。MnPOのGlu神経の終末や細胞体には、向イオン性のGABA(A)受容体(-R)並びに向代謝性のGABA(B)-Rが分布している。容量減少刺激は、脳幹部から伸びる神経路を通じてSFOやMnPOに伝わり、AV3Vの神経活動に影響する。ADH神経分泌細胞の位置する視床下部室傍核(PVN)や視索上核(SON)は、OVLTやSFOから直接、或いはMnPOを経由して、神経情報を得ている。従って、これ迄の私の研究が明らかにしたように、AV3VのGlu神経が種々の環境下で、ADH分泌

その他の自律機能の調節に係わるとすれば、その調節には GABA 神経も関与することが強く推察される。GABA は脳内で Glu から生合成され、その放出は、海馬では、Glu 神経の興奮によって高まる。さらに、SFO、OVLTA、或いは MnPO を電気刺激すると、PVN や SON の大細胞の電氣的活動が抑制された、とも報告されている。これらの観察も、先の推察の妥当性を支持している。しかし、これ迄、GABA 系が、AV3V の ADH 分泌調節機構に対し、単独で、或いは Glu 系と関連して、どのような影響を及ぼすのかという問題を追求した報告は存在しない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、AV3V の GABA-R が、基礎状態および ADH 分泌の主な制御因子、体液浸透圧や血液量などが変化する状況下で、ADH 分泌、血糖、心血管系などの自律機能の調節に果たす役割を解明することだった。そして、AV3V における GABA-R の働きと Glu-R の働きには、ADH 分泌調節を巡って、機能的連関のあることを実証することだった。

## 3. 研究の方法

(1) 基礎状態にある覚醒・無拘束ラットの脳内に、15 分間隔で GABA-R や Glu-R の活性薬や阻害薬、又はそれらの溶媒を投与した (0.5 または 1  $\mu$ l/min)。

その他の群では、GABA-R、Glu-R の活性薬または阻害薬を脳内に注入後、高張 (2.5 M) NaCl または等張 (0.15 M) NaCl の大腿静脈内持続注入を行うか (0.1 ml/kg/min で 30 分間)、体重の 1% に相当する血液量を 10 分間隔で二度、大腿動脈から吸引除去するか (約 40 秒で)、或いは偽脱血操作を行った。

(2) 動脈圧 (SAP)、心拍数 (HR) を全実験時間中、連続記録しつつ、血液サンプルを適当な時間間隔で採取した。血液サンプルからは、血漿 ADH (PAVP), angiotensin II、血漿浸透圧 (POsm)、電解質濃度 (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>)、グルコース濃度 (PGlc) を測定した。

(3) 実験終了後、脳内の薬物注入部位に色素を注入し、脳を取り出した。これをホルマリンで固定した後、凍結連続切片を作り、クレシル紫で染色した。これを顕微鏡観察し、注入部位を決定した。

(4) 本研究に用いた GABA-R、Glu-R の活性薬と阻害薬は以下の通りである。

GABA-R 活性薬=muscimol (Mus: A-R 選択的)、baclofen (B-R 選択的); GABA-R 阻害薬=bicuculline (Bic: A-R 選択的)、phaclofen (B-R 選択的)。

Glu-R 活性薬=NMDA (NMDA-R 選択的)、(S)-(-)-5-Fluorowillardiine (FWD: 非 NMDA-R 選択的); Glu-R 阻害薬=MK-801 (NMDA-R 選択的)、1,2,3,4-Tetrahydro-6-nitro-2,3-

dioxo-benzo[f]quinoxaline-7-sulfonamide (NBQX: 非 NMDA-R 選択的)

## 4. 研究成果

(1) 基礎状態にあるラットの AV3V に、GABA (A)-R の作動薬である Mus を局所注入しても、血漿 ADH その他の因子は有意に変動しなかった。しかし、GABA (A)-R の阻害薬である Bic を AV3V に与えると、血漿 ADH、浸透圧、グルコース、血圧、心拍数が著しく増大した。GABA (B)-R の阻害薬である phaclofen を AV3V に注入した場合には、それらの因子は有意に変化しなかった。Bic で惹起された上記因子の反応は全て、同じ部位に Mus を前投与することにより抑制された (Fig. 1)。

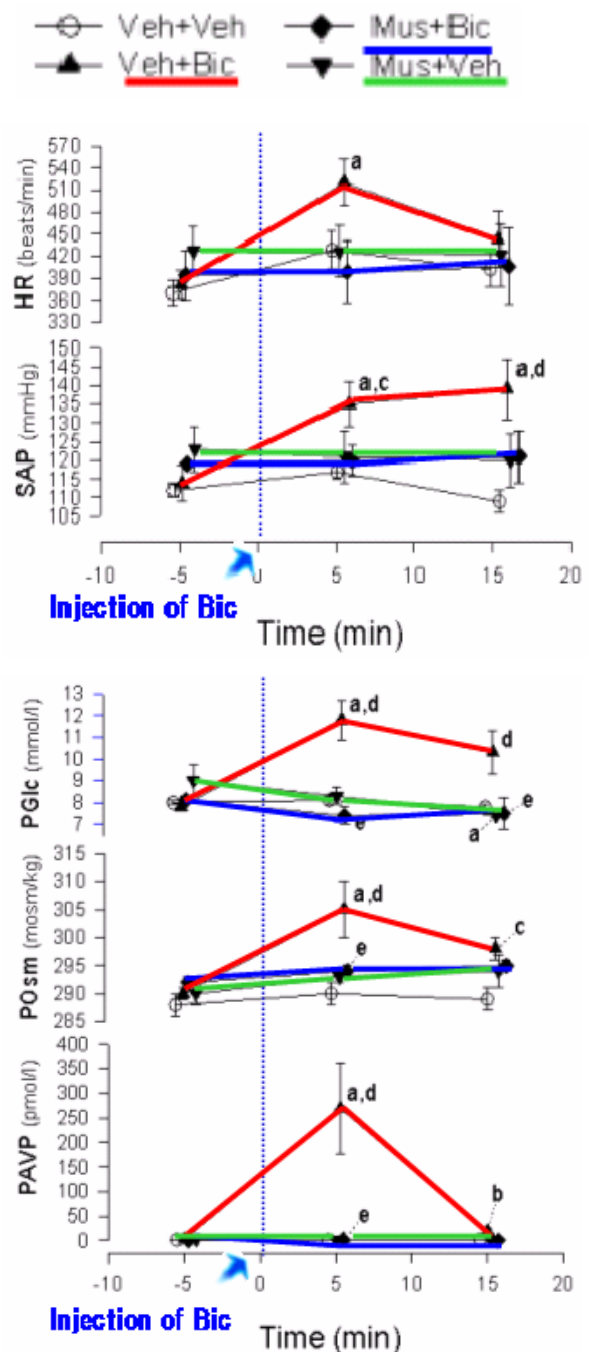


Fig. 1

Bic を、AV3V でなく、脳室内に注入した場合には、全因子が有意に変動しなかった。

(2) AV3V GABA(A)-R の阻害によって生じる血漿 ADH、浸透圧、グルコース、血圧、心拍数の変化は、当該領域にある Glu の NMDA-R および非 NMDA-R を活性化することで起こる変化と同様であった。さらに、Bic の AV3V 投与による GABA(A)-R 阻害で生じた血漿 ADH、浸透圧、グルコースおよび心拍数の上昇は、当該領域の NMDA-R、或いは非 NMDA-R を、それぞれ MK-801 或いは NBQX によって抑えることにより、抑制された (Fig. 2, S)。MK-801 や NBQX を単独で AV3V に注入した場合、血漿 ADH その他の因子は顕著に変化しなかった。

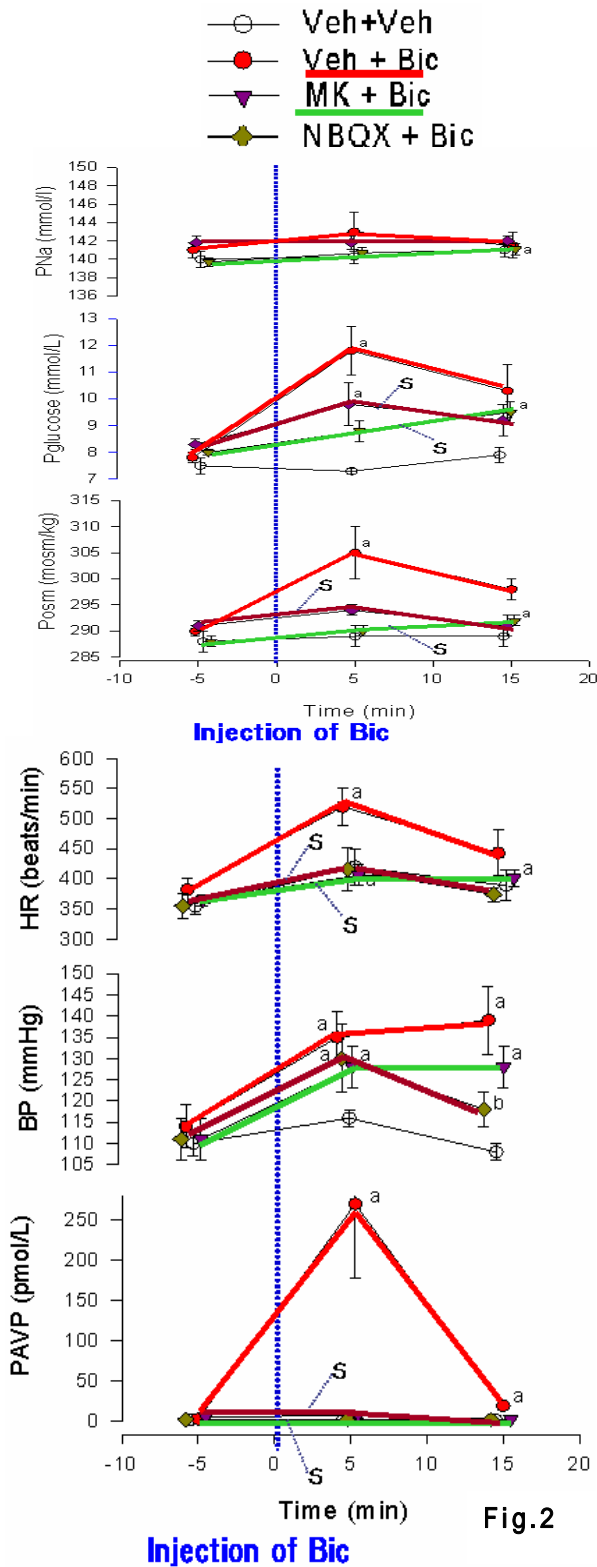


Fig.2

(3) 2.5 M の高張 NaCl を静脈内に連続注入すると、血漿浸透圧、Na<sup>+</sup>、Cl<sup>-</sup> が漸次増加し、これと平行して血漿 ADH と動脈圧が上昇した。高張 NaCl の注入に先立って AV3V に Mus を投与し、GABA(A)-R を活性化すると、血漿 ADH および動脈圧の上昇反応が消失した (Fig. 3)。高張 NaCl 注入による血漿 ADH 増大反応は、MK-801 或いは NBQX の注入によって、それぞれ NMDA-R、或いは非 NMDA-R を阻害した場合にも、消失した (Fig. 4)。他方、等張 NaCl を静脈注入し、高浸透圧負荷をかけなかった場合には、AV3V GABA(A)-R の活性化処置や、NMDA-R 或いは非 NMDA-R の阻害処置は、血漿 ADH その他の因子に有意な変化をもたらさなかった。

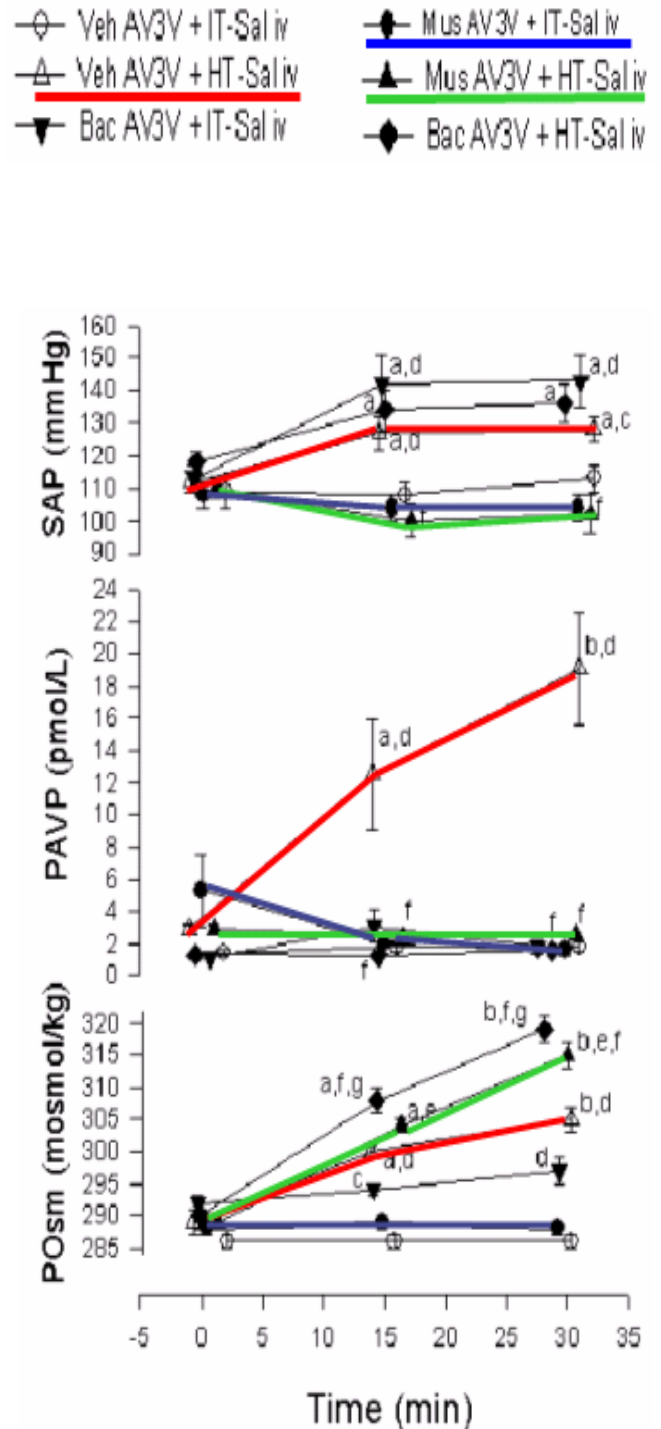


Fig.3

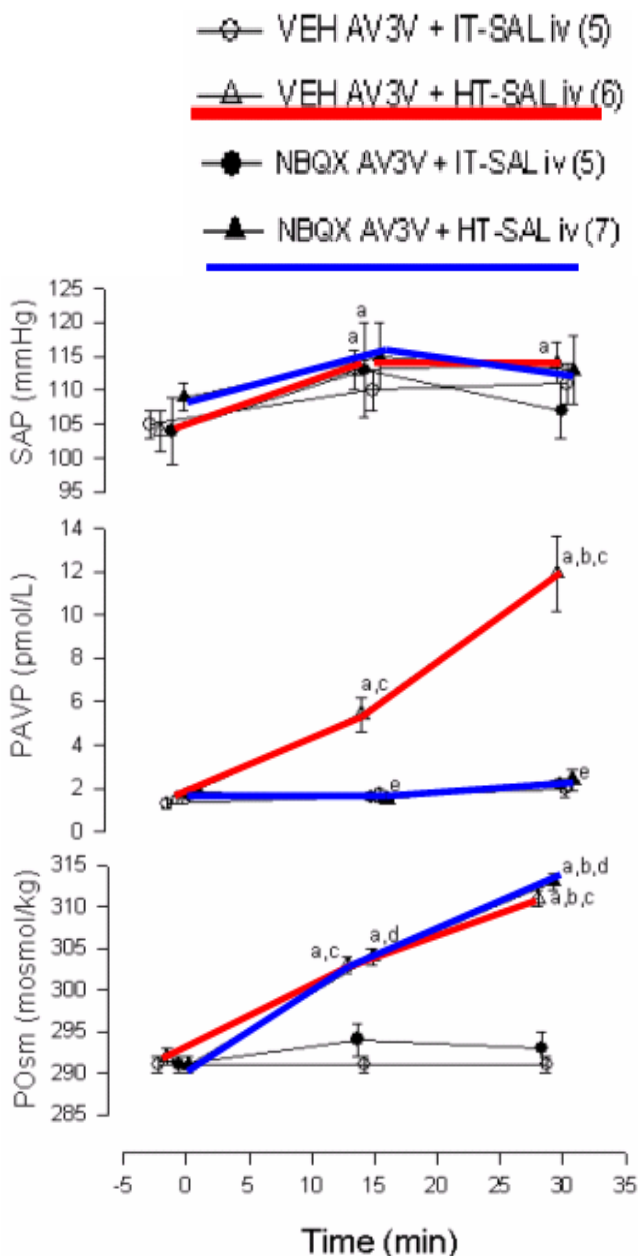


Fig.4

(4) 覚醒・非拘束ラットの大腿動脈から10分間隔で二度、それぞれ全血液量の約14%の血液を吸引除去し、非降圧性ならびに降圧性の容量刺激を与えた。血漿ADH、angiotensin II、浸透圧、glucoseは、非降圧性の刺激では僅かに、降圧性の刺激では著しく増加した。これらの処置に先立ってAV3VのGABA(A)-RをMusによって活性化すると、脱血による血漿ADHの上昇が顕著に抑制された。脱血によるその他の因子の変化には、Mus群と対照群の間に有意差がなかった。容量刺激を与えない偽脱血群のAV3VにMusを注入し、GABA(A)-Rを活性化した場合には、血漿ADHその他の因子は有意に変化しなかった。

(5) 以上の実験結果から、結論として、次のことが推察出来る。

基礎状態では、AV3VのGABA系が緊張的に活性化しており、GABA(A)-Rを介して、ADH分泌、血圧、心拍、血糖値は低く維持されている。基礎状態でGABA(B)-Rは、活発に働いていない。GluのNMDA-Rや非NMDA-Rも同様に働いていない。

基礎状態でAV3VのGABA(A)-Rの働きが抑えられると、Glu神経の働きが活発になり、放出されたGluは、NMDA-Rや非NMDA-Rに作用して、ADH分泌、心拍、血糖値を増大させる。血圧上昇は別であろう。

ADH分泌の代表的刺激である血漿浸透圧の上昇や血液量の減少は、共通して、AV3VのGABA系を抑制し、それによってGlu系の活性化を促し、NMDA-Rおよび非NMDA-Rを介して、ADH分泌を増強する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計14件)

1. Yamaguchi K. and Yamada T., Roles of forebrain GABA receptors in controlling vasopressin secretion and related phenomena under basal and hyperosmotic circumstances in conscious rats. *Brain Research Bulletin* (査読あり) 77 (2008) 61-69.
2. Yamaguchi K. and Yamada T., Inhibition of forebrain GABA neurons participates in the osmotic ADH secretion. *Japanese Journal of Physiology* (査読あり) 58 Suppl. (2008) s138.
3. 山口賢一、山田貴穂、濱齋、小池衛、山谷金光：浸透圧刺激時のバゾプレッシン分泌における前脳GABA-Glu系の機能連関。日本内分泌学会雑誌 (査読あり) 84 (2008) 234.
4. Veeraveedu P. T., Watanabe K., Ma M., Palaniyandi S. S., Yamaguchi K., 他2名; Effects of V2-receptor antagonist tolvaptan and the loop diuretic furosemide in rats with heart failure. *Biochemical pharmacology* (査読あり) 75 (2008) 1322-1330.
5. Veeraveedu P. T., Watanabe K., Ma M., Palaniyandi S. S., Yamaguchi K., 他3名; Torasemide, a long-acting loop diuretic, reduces the progression of myocarditis to dilated cardiomyopathy. *European Journal of Pharmacology* (査読あり) 581 (2008) 121-131.
6. Veeraveedu P. T., Watanabe K., Ma M., Thandavarayan R. A., Palaniyandi S. S., Yamaguchi K., 他3名, Comparative effects of torasemide and furosemide in rats with heart failure, *Biochemical Pharmacology* (査読あり) 75 (2008) 649-659.



7. Nishimura H., Yang Y., Lau K., Kuykindoll R. J., Fan Z., Yamaguchi K. and Yamamoto T., Aquaporin-2 water channel in developing quail kidney: possible role in programming adult fluid homeostasis. American Journal of Physiology (Regul. Integr. Comp. Physiol.) (査読あり) 293 (2007) R2147-R2158.
8. Yamaguchi K. and Yamada T., Forebrain GABA neurons operate tonically to prevent ADH secretion and cardiovascular function in conscious rats. Japanese Journal of Physiology(査読あり)57 Suppl.(2007), s75.
9. 山口賢一、山田貴穂、濱齋、小池衛、渡辺賢一、山谷金光：前脳の GABA 神経による vasipressin 分泌の緊張性抑制. 日本内分泌学会雑誌 (査読あり) 83 (2007) 123.
10. Paraniyandi S.S., Nagai Y., Watanabe K., Ma M., Veeraveedu P.T., Prakash P., Kamal F.A., Abe Y., Yamaguchi K., 他 3 名., Chymase inhibition reduces the progression to heart failure after autoimmune myocarditis in rats. Experimental Biology and Medicine (Maywood) (査読あり) 232 (2007) 1213-1221.
11. Veeraveedu P.T., Watanabe K., Ma M., Palaniyandi S.S., Yamaguchi K., 他 3 名., Effects of nonpeptide vasopressin V2 antagonist tolvaptan in rats with heart failure. Biochemical Pharmacology (査読あり) 74 (2007) 1466-1475.
12. Yamaguchi K. and Yamada T., Involvement of anteroventral third ventricular AMPA/kainate receptors in both hyperosmotic and hypovolemic AVP secretion in conscious rats. Brain Research Bulletin (査読あり) 71 (2006) 183-192.
13. Yamaguchi K. and Yamada T., Pursuit of functional correlations between NMDA receptors and nitric oxide in forebrain structures. Japanese Journal of Physiology (査読あり) 56 Suppl. (2006) s99.
14. 山口賢一、山田貴穂、濱齋、小池衛、渡辺賢一、山谷金光：AV3V の AMPA/カイン酸受容体によるバゾプレシン分泌の調節と関連因子の変動. 日本内分泌学会雑誌 (査読あり) 82 (2006) 178.

[学会発表](計9件)

1. 山口賢一：アミノ酸伝達物質による前脳抗利尿ホルモン分泌調節機構の活性変化 - 特に血漿浸透圧との関連について、自然科学研究機構基礎生物学研究所平成 20 年度研究会「体内環境を維持する諸機構の統合的理解をめざして」、岡崎市、2008・10・10.
2. 山口賢一：脳内ノルアドレナリン 受容体を介する心拍数の調節. 第 31 回新潟高血圧談話会、新潟市、2008・7・18.
3. 山口賢一：前脳 GABA 神経の抑制は浸透圧的

ADH 分泌に働く. 第 85 回日本生理学会大会、東京都、2008・3・26.

4. 山口賢一：浸透圧刺激時のバゾプレッシン分泌における前脳 GABA-Glu 系の機能連関. 第 81 回日本内分泌学会学術総会、青森市、2008・5・16.
5. 山口賢一：前脳の GABA 神経は ADH 分泌と心血管機能を緊張性に抑えている. 第 84 回日本生理学会大会、大阪、2007・3・20.
6. 山口賢一：前脳の GABA 神経による vasipressin 分泌の緊張性抑制. 第 80 回日本内分泌学会学術総会、東京、2007・6・16.
7. 山口賢一：前脳の AMPA/カイン酸受容体による ADH 分泌並びに自律性反応の制御. 第 83 回日本生理学会大会、高崎市、2006・3・28.
8. 山口賢一：AV3V の AMPA/カイン酸受容体によるバゾプレッシン分泌の調節と関連因子の変動. 第 79 回日本内分泌学会学術総会、神戸市、2006・5・21.
9. 山口賢一：出血によるバゾプレッシン分泌における前脳向イオン性グルタミン酸受容体の役割. 第 16 回バゾプレッシン研究会、東京、2006・1・7.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山口 賢一  
新潟大学・医歯学系・講師  
研究者番号：50108023

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし