

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570078

研究課題名（和文） 海水ウナギの飲水行動を調節する脳内神経回路：ホルモン受容から食道収縮まで

研究課題名（英文） Central nervous system controlling drinking behavior in seawater eels: from hormone reception to esophageal muscle contraction

研究代表者

安藤 正昭 (ANDO MASAOKI)

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：10100976

研究成果の概要（和文）：ウナギの延髄の Area postrema (AP1) のニューロンは Angiotensin II (ANG II) によって興奮させられ、AP1 の興奮は Glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC1) の神経活動を抑制する。一方 Atrial natriuretic peptide (ANP) は AP1 での ANG II の効果を抑える。AP1 での ANG II と ANP の作用は哺乳類の飲水中枢である Subfornical organ (SFO) での作用と良く似ているので、ウナギの飲水調節ホルモンは AP1 に作用していると思われる。また ANG II による AP1 の興奮が GVC1 を抑制することはウナギの飲水促進に対応している。

研究成果の概要（英文）：Neurons in the area postrema (AP, especially at AP1 region) of the medulla oblongata of the eel was excited by angiotensin II (ANG II), and the ANG II-induced AP1 excitation inhibited the neuronal activity of the glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC, especially at GVC1 region). On the other hand, atrial natriuretic peptide (ANP) inhibited the ANG II-induced AP1 excitation. Similar interaction between ANG II and ANP has been reported in the subfornical organ of the rat, therefore it is likely that these dipsogenic (ANG II) and antidipsogenic (ANP) hormones act on the AP1 in the eel. ANG II may facilitate the drinking rate by exciting the AP1 activity, which inhibits the GVC1 activity, which relaxes the upper esophageal sphincter muscle, thus enhance the water intake into the esophagus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：飲水調節ホルモン、Area postrema (AP)、神経活動、Glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC)、飲水行動

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 飲水調節ホルモンが作用できる脳部位

海水ウナギの静脈中にアンギオテンシン II (Angiotensin II, ANG II) を打つと飲水量は増

大し、心房性ナトリウムリニョウペプチド (Atrial natriuretic peptide, (ANP) を打つと飲水は抑えられる (Ando et al., 2000)。同様の結果はこれらのペプチドを脳室内に投与しても見られた (Kozaka et al., 2003)。このことはこ

これらのペプチドが脳に作用していることを示唆する。しかし通常ペプチドは血液脳関門を通過しないので、ウナギの脳で血液脳関門を欠いている場所を探し、少なくとも大細胞性視索前核 (Magnocellular preoptic nucleus, PM)、前隆起核 (Anterior tuberal nucleus, NAT)、最後野 (Area postrema, AP) の3箇所には関門がないことを示した (Mukuda et al., 2005)。しかし、これら3箇所におけるANG IIとANPの作用は全く調べられていなかった。

#### (2) 嚥下を支配する脳内運動神経

ウナギは呼吸のために絶えず口腔内に水があり、上部食道括約筋 (Upper esophageal sphincter muscle, UES) が緩むと水は食道に入る (嚥下)。この上部食道括約筋にエヴァンスブルーを注入し、逆行性に支配神経を染色すると延髄の舌咽・迷走複合運動核 (Glossopharyngeal-vagal motor complex, GVC) が染まった。またこのニューロンはコリンアセチルトランスフェラーゼの抗体で染まることから、アセチルコリンを神経伝達物質として用いていると考えられる (Mukuda and Ando, 2003)。一方、アセチルコリンは上部食道括約筋を収縮させるので、GVCニューロンの興奮は括約筋を収縮させ、飲水を抑制すると考えられる (Kozaka and Ando, 2003)。またGVCニューロンの活動はカテコールアミンによって抑えられるが (Ito et al., 2006)、GVCがどのニューロンによって支配されているのかは未だ分かっていなかった。

## 2. 研究の目的

飲水行動は、大部分の陸上脊椎動物や海産魚にとって、生存のために必須の行動である。しかし多くの研究者のいる哺乳類でも、飲水行動を調節している脳内神経回路は未だ一部しか明らかにされていない。哺乳類の飲水行動を調節する神経回路は、体温や呼吸の調節にも利用されるなど (Takahashi et al., 2001)、かなり複雑になっており、この複雑性が哺乳類での研究の進展を阻んでいるように思われる。一方海水に棲むウナギ (変温動物) は絶えず口腔内に海水があるので、体液量が減少すると直ちに海水を飲む (Ando et al., 2000)。したがって、水の損失を補うという飲水行動本来の神経回路を理解するには、哺乳類よりウナギのほうが直接的で分かりやすいと思われる。本研究では、脊椎動物が体液保持のために持っている、飲水行動の本源的な神経回路を、ウナギで明らかにすることにより、哺乳類での飲水行動の理解を深めることを目的とする。飲水行動や摂食行動は"渴感"や"空腹感"によって動機付けられ、これらの行動の完遂は"快感"をもたらす。快・不快の感情はヒトの"心"の基盤をなしていると思われるので、ウナギの飲水行動を調節する神経回路は、ヒトの"心"の神経回路の一部をなしている可能

性がある。

本研究の具体的な目的は以下ようになる。

#### (1) 飲水調節ホルモンの脳内作用部位の同定

ウナギの脳で血液脳関門を欠いている脳部位がペプチドホルモンの標的になると考え、まずPM、NAT、APの3箇所ではANG IIとANPの効果を調べ、飲水調節ホルモンの脳内作用部位を明らかにする。

#### (2) 飲水促進ホルモンと飲水抑制ホルモンの相互作用

ホルモンの脳内作用部位が決まったら、その部位で飲水促進ホルモン (ANG II) と飲水抑制ホルモン (ANP) の相互作用を明らかにする。

#### (3) ホルモン受容から運動ニューロンの活動まで

上記(1)で決定された脳部位に飲水調節ホルモンを作用させ、その時反応するGVC部位を決める。次に飲水促進ホルモンと飲水抑制ホルモンを作用させた時のGVCの反応を調べ、UESの収縮・弛緩、それに伴う飲水抑制と促進が矛盾なく説明できるかを検討する。

#### (4) *in vivo* 実験系の確立

上記(1)から(3)は摘出した脳標本で行う実験であるが、得られた結果から類推されることが、実際に起こっていることを、*in vivo*の系で確かめる。

## 3. 研究の方法

#### (1) *in vitro* 脳灌流システムの構築

血液脳関門を欠いている3箇所の神経核は全て脳の正中線上にあるので、摘出した脳のクモ膜を剥離し、正中面で切断し、切断面を上にして固定し、脳脊髄液で灌流する。神経活動はタングステン電極を用いて記録し、オシロスコープで波形を確認し、パワーラボで解析し、コンピュータに記録した。ただし切断脳では電気シグナルがなかなか記録できないので、1年目に低濃度のCa<sup>2+</sup>と高濃度のNa<sup>+</sup>を含む脳脊髄液で灌流することにした。それでもコンスタントに記録できないので、2年目には灌流する前に、高濃度のCa<sup>2+</sup>とK<sup>+</sup>を含む培養液で1時間以上インキュベートした。最終年の後半になって、それまでの変更に加えて、全脳を用いる系を導入した。

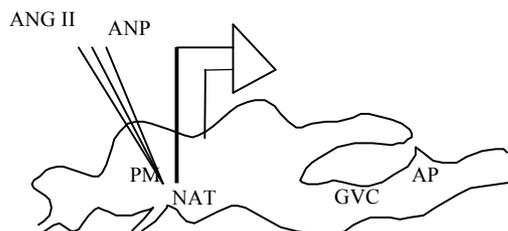
#### (2) ANG IIとANPの同一場所投与

血液脳関門を欠いている3箇所の神経活動を記録しながら、圧インジェクターを用いて、ペプチドを記録部位に局所的に投与する。この際ダブルピペットホルダーを用いて、同一場所にANG IIとANPを投与する。

#### (3) 飲水調節ホルモンの受容部位とGVCとの脳内神経連絡

上記飲水調節ホルモンの受容部位での反応を確かめた後に、記録電極をGVCに移し、

受容部位 (AP1) にホルモンを作用させたときに応答する GVC 部位を決定する。



### (3) *in vivo* 実験系

MS222 で麻酔したウナギの食道にバルーンを装着し、バルーンの内圧変化から上部食道括約筋の収縮具合をモニターする。

## 4. 研究成果

### (1) 飲水調節ホルモンの作用部位

脳半球を用いて、AP の最前部の脳室側 (深部で AP1 と命名) のニューロンは ANG II によって興奮させられる (興奮は標本によって一過性のこともあるし、持続することもある)。ANP 自体の効果は切断脳では通常見られないが、ANP 処理後に ANG II を作用させると ANG II の効果は抑制される。一方、AP は全脳標本でも識別できるが、AP1 領域では ANG II による興奮と ANP による抑制が見られた。ただし、全脳標本では個々のスパイクは小さい。

NAT と PM では ANG II の効果も ANP の効果も見られなかった。ただ PM の腹側 (Ventral preoptic area, PAV と命名) で視神経の直上 (PAV2 と命名) のニューロン活動は ANG II の影響を受けないが ANP で抑制された。最近我々は、この部位も血液脳関門を欠いていることを見ている (棕田、未発表) ので、この部位も飲水調節ホルモンの作用部位と考えられる。

この研究で一番問題なのは、脳半球標本では神経活動をほとんど記録できないということであった (出現頻度が極めて低い)。脳脊髄液のイオン組成を変えてみたが、ほとんど改良されなかった。多分、脳を切断して半球にするときに、目的とするニューロンを傷つけたのではないかと考え、2 年目には傷を修復するための時間 (1 時間) を設け、最終年の後半になって全脳標本に切り替えた。

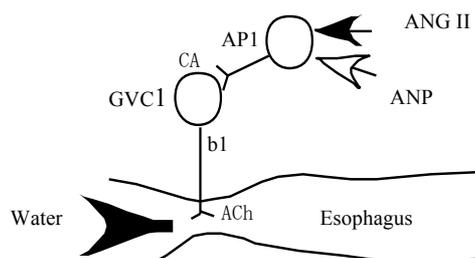
### (2) ANG II と ANP の相互作用

ANG II と ANP の両ホルモンの作用が見られたのは AP1 のみであった。ANG II は AP1 の神経活動を促進し、ANP は AP1 の神経活動を抑えた。脳半球では ANP の抑制効果はほとんど見られないが、ANG II の促進効果を完

全に抑えた。良く似た ANG II と ANP の相互作用は、ラットのスライス脳標本の脳弓下器官 (Subfornical organ, SFO) でも見られている (Hattori et al., 1988)。このことはウナギの AP1 にも、ラットの SFO にあるニューロンと同じように ANG II と ANP に対して反応するニューロンが存在していることを示している。ラットの SFO は飲水中枢としてよく知られており、血中 ANG II や ANP の作用部位と考えられているので、ウナギの AP1 は血中で生じた飲水調節ホルモン (ANG II と ANP) の作用部位である可能性が高い。

### (3) AP1 から GVC1 への神経連絡

全脳標本でも AP と GVC から神経活動が記録できる。そこで AP1 で ANG II の効果を確認した後、記録電極を GVC に移動させ、AP に ANG II を作用させたときに反応する GVC 部位を探した。すると門 (Obex) 直下の GVC (GVC1 と命名) の神経活動が抑制された。GVC ニューロンはアセチルコリンを神経伝達物質として用いており (Mukuda and Ando, 2003)、アセチルコリンは上部食道括約筋を収縮させるので (Kozaka and Ando, 2003)、この結果は ANG II が AP1 に作用して GVC1 の活動を抑え、上部食道括約筋を弛緩させる (飲水促進) ことを初めて示したことになる。なお、これまでにウナギの GVC ニューロンはカテコールアミン (Catecholamines, CA) によって抑制されること、及び AP ニューロンはカテコールアミン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ抗体で染まることを見ている (Ito et al., 2006) が、いずれも今回の結果と矛盾しない。



### (4) 上部食道括約筋の迷走神経支配 (*in vivo* 実験)

ウナギの脳から出て、内頸静脈 (Internal jugular vein) の上を走り、上部食道に至る迷走神経枝がある (b1 と命名)。この神経枝を電気刺激すると、食道上部に挿入したバルーンの内圧が上がる (上部食道括約筋の収縮)。この効果は上部食道筋にクラレを注射すると消失するので、b1 神経線維の終末

からはアセチルコリン (ACh) が出ていると  
考えられる。これまでに上部食道括約筋のア  
セチルコリン受容体はムスカリン性で、クラ  
ーレによってブロックされることを *in vitro*  
の系で見ている (Kozaka and Ando, 2003) が、  
*in vivo* の系でも確かめることが出来たこと  
になる。

#### 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 1 件)

- ① Mukuda Takao and Ando Masaaki: Central  
regulation of the pharyngeal and upper  
esophageal reflexes during swallowing  
in the Japanese eel.  
J. Comp. Physiol. 査読有、 A196, 2010,  
111-122  
DOI: 10.1007/s00359-009-0498-4

[学会発表] (計 3 件)

- ① Ando Masaaki and Takei Yoshio: Guanylin  
enhances Cl<sup>-</sup> permeability across the  
intestine of the eel acclimated to sea  
water.  
第 8 回国際比較生理生化学会議 (ICCPB2011  
Japan) 2011 年 6 月 3 日、名古屋国際会議  
場 (愛知県)
- ② 安藤正昭、竹井祥郎、海水ウナギの腸にお  
ける塩と水の輸送に及ぼすグアニリンの作  
用  
第 82 回日本動物学会大会、2011 年 9 月 22  
日、旭川大雪アリーナ (北海道)
- ③ 安藤正昭、竹井祥郎、海水ウナギの延髄最  
後野ニューロンの飲水調節ホルモンに対す  
る応答、第 36 回日本比較内分泌学会大会、  
2011 年 11 月 23.24 日、都道府県会館 (東  
京都)

[図書] (計 2 件)

- ① Ando Masaaki & Takei Yoshio: Science  
Publishers, Eel Physiology (Chapter 4:  
Intestinal absorption of salts and  
water), 2013、印刷中
- ② Nobata shigenori & Ando Masaaki: Science  
Publishers, Eel Physiology (Chapter 2:  
Regulation of drinking), 2013、印刷中

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安藤 正昭 (ANDO MASA AKI)

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：10100976

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：