

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659102

研究課題名(和文)硫化水素はEDRFか? : モデル動物としての深海性海洋動物の可能性を探る

研究課題名(英文)Whether H₂S is EDRF or not : Possibility of deep sea bivalves as experimental animal

研究代表者

瀬尾 芳輝 (Seo, Yoshiteru)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：90179317

交付決定額(研究期間全体) : (直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文) : 狭心症や心筋梗塞の発症と治療に重要な内皮細胞性血管弛緩因子とされる硫化水素の作用を研究するために、深海性二枚貝の実験モデル動物としての可能性を検討した。まず、ムラサキイガイを用い、MRIによる循環機能測定法を開発した。シンカイヒバリガイとヘイトウシンカイヒバリガイを用い、硫化水素のパルス投与の循環器系への効果を確認した。その結果、ムラサキイガイよりも高い硫化水素耐性を確認することができ、実験動物としての有用性を確認できた。

研究成果の概要(英文) : In order to test whether H₂S is the endothelium-derived relaxing factor (EDRF) or not, we plan to use deep sea bivalves as model animals, since these bivalves live in a high H₂S environment. MRI methods to analyse cardiovascular functions were developed by using *Mytilus galloprovincialis*. *Bathymodiolus japonicus* and *Bathymodiolus platifrons* presented higher tolerance to H₂S compared with *Mytilus*. Therefore, deep sea bivalves must be useful experimental animal for analysing EDRF.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、生理学一般

キーワード：内皮細胞性血管弛緩因子 深海性海洋生物 化学合成共生動物 MRI 血流計測 循環器

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は脳機能核磁気共鳴画像法 (fMRI) による脳機能解析にたずさわる中で、脳局所血流を制御する EDRF には常々注意を払ってきた。NO は代表的な EDRF であり、多様な NO synthase により各種臓器・組織の循環が制御されていることが確立されている。一方、R. Wang らは、ラット血中に H₂S を投与すると、ATP 感受性 K チャネルが開閉し、血圧が一過性に 12-30 mmHg 低下することを示し、H₂S は EDRF と主張した¹⁾。その後、Wang と Synder らは、cystathione-γ-lyase をノックアウトしたマウスは、血中 H₂S 濃度が低く、高血圧を示す事から、内因性の H₂S 産生機序が哺乳動物においても存在することを示した²⁾。しかしながら、H₂S の高い毒性から、血管平滑筋への作用が生理的なものか疑問視する意見もあり、さらに H₂S 濃度が NO により増加することから¹⁾、NO により二次的に産生されるのではないかと、NO のバックアップ的な役割とする意見もあり³⁾、H₂S の生理的意義は確立されていない。

哺乳動物を用いる限りは、H₂S の毒性から逃れることはできない。そこで、高濃度の H₂S 環境が「生理的な環境」である動物に着目した。熱水域や湧水域に生息する二枚貝や環形動物は、海水中の H₂S を主たるエネルギー源としている⁴⁾。高い H₂S 環境下で生息している動物では、H₂S の循環制御機能を正確に捉えることができるのではないかと考えた。これらの動物の循環機能についての知見は極めて乏しいが、申請者はハオリムシ (環形動物門多毛綱) 固定標本をマイクロ MR イメージング装置で測定し、その発達した脈管系が MRI 画像により描出可能なことを確認している。

1) Zhao W, Zhang J, Lu Y, Wang R (2001) The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. *EMBO J* 20(21):6008-16.

2) Yang G, Wu L, Jiang B, Yang W, Qi J, Cao K, Meng Q, Mustafa AK, Mu W, Zhang S, Snyder SH, Wang R. (2008) H₂S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine γ-lyase. *Science* 322(5901):587-90.

3) Sanderson K (2009) Physiology: Emissions control. *Nature*. 459:500-2.

4) 藤倉克則、奥谷喬司、丸山正編著 (2008) 潜水調査船が観た深海生物 東海大学出版 pp 487

2. 研究の目的

内皮細胞性血管弛緩因子 (EDRF) として、一酸化窒素 (NO) に続き硫化水素 (H₂S) が提案されている。確かに L-cysteine から H₂S を生成する cystathione-γ-lyase をノックアウトしたマウスは高血圧を示すが、H₂S の高い毒性から、その生理的意義については確定していない。申請者は、熱水域や湧水域に生息し H₂S を主たるエネルギー源とする化学合成共生動物では「H₂S が主たる EDRF として働いている」という作業仮説をたて、有用な実験モデル動物となると考えた。本研究では、脈管系が良く発達している環形動物や二枚貝を用い、核磁気共鳴画像法 (MRI) による血流速度と血管径の測定法を確立する。最終的には、H₂S の濃度を変えて循環動態を測定し、その循環制御機構における H₂S の寄与を明らかにする実験系を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、H₂S の内皮細胞性血管弛緩因子 (EDRF) としての生理的な機能を明らかにすることを最終目的に、その実験系を平成 24、25 年度の 2 年間で確立することを目的とした。

平成 24 年度には、1) 環形動物や二枚貝の生体測定用の MR プロブと灌流システムを構築する。また、2) 7 T MR マイクロイメージング装置を用い、脈管系の三次元構築を確認し、3) モデル系を用いて位相エンコード MRI 法による血流速度測定法を確立し、生体で測定精度を確認する。

平成 25 年度には、シンカイヒバリガイ、ハオリムシやシロウリガイなどの生体を用い、4) H₂S の濃度を変えて循環動態を測定し、その循環制御機構において、「H₂S が主たる EDRF として働いている」という作業仮説を実証し、H₂S による循環制御研究の実験系を確立することを目指した。

4. 研究成果

(1) 二枚貝や環形動物の生体測定用の MR プロブと灌流システムの構築

MRI 測定には、7 T MR マイクロイメージング装置を用いた。ラット・マウスについて 60-100 μm の空間分解での測定をルーチンに行っており、低倍率の光学顕微鏡相当の画像を得ている。海洋生物の生体測定のためには人工海水を還流する必要がある。人工海水はイオン強度が 0.6 と高いため、哺乳動物測定用 (イオン強度 0.15) に調整された MR プロブでは高負荷となり測定に用いる 300 MHz の高周波に同調できず測定できない。永年、特殊用途の MR プロブの作成について協力関係にある Dr. Dieter Gross (Bruker Biospin) の協力

を得て、内径 20 mm および 25 mm の ^1H 測定用 MR プローブを作成した。灌流システムは、ガラスおよびアクリルなどの非磁性素材で構築した。当初、重力差を利用して定流速灌流を試したが、温度の安定性に難があり、また、海洋生物、とりわけ深海性生物は高い低酸素耐性を持つことがわかり、内径 10 – 22.5 mm のプラスチックチャンパーに一定量の海水とともに置けば、6 時間以上、安定に保つことができた⁵⁾。

(2) 脈管系の三次元構築の測定

生体標本および固定標本を用い、二枚貝や環形動物の脈管系の三次元構造を測定した。ムラサキガイ全身の 1500 枚余りの連続切片を作成し、光学顕微鏡画像と、MRI 画像を比較検討し、臓器、組織を同定した⁵⁾。

(3) 位相エンコード MRI 法および T_1 強調画像法による血流測定法の確立

位相エンコード MRI 法により血流の方向と速度を画像化した。内径 80 μm ポリスチレンチューブ内の層流測定では、1 mm/sec 程度の流速まで測定可能であった。ムラサキガイ生体でも、2-5 mm/sec まで実測可能であり、静脈や囲心腔内の血流速度まで測定できた。以上の結果より、心臓および周囲の血管系での血流方向と速度が明らかになった⁵⁾。

時間変化の速い血流変化を測定するために、 T_1 強調画像法による流入血流効果を利用した。この方法では、血流方向はわからないが、血流速度は 5 – 50 mm/s の範囲で推測でき、しかも 1 秒未満の時間分解能での測定が可能となった⁶⁾。

また、周期的な心拍動が引き起こす、位相エンコード方向の artifact を利用した、心拍数測定法を確立した。これは、全く非接触で心拍数を測定できるようになった⁵⁾。

5) Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y. (2014) Testing the constant-volume hypothesis by magnetic resonance imaging of the mussel heart in the *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Biol.* 217: 964-973, (doi:10.1242/jeb.092577)

6) Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y. (2014) Magnetic resonance imaging analysis of water flow in the mantle cavity of live *Mytilus galloprovincialis*. *J. Exp. Biol.* (in press) (doi:10.1242/jeb.101949)

さらに、IntraGate 法と呼ばれる位相情報を用いた心拍動の測定にも成功し、心電図同期を用いずに、心拍動時の心室・心耳の容積変化を測定し、心拍出量などを算出することができた。副次的な成果ではあるが、Ramsay と Krijgsman & Divaris によって提唱された constant-volume 仮説^{7,8)}は、軟体動物の心臓について、50 年来の課題であったが、今回、ムラサキガイの心臓を用いた実験の結果、結論を出すことができた⁵⁾。

なお、本研究で、唯一の誤算は、平成 24 年 6 月に生理学研究所 4.7 T MRI 装置の超伝導磁石がクエンチし、使用できなくなったことである。このため、少し大きな個体の測定が不可能となった。当座の対応として、25 mm 径 RF コイルを用いて測定を行った。しかし、この RF コイルは、人工海水環境下で、なんとか調整が可能であったが、元々 ^{23}Na 測定用の RF コイルであり測定感度が低く、最高レベルの画像データは得られなかった。測定可能な個体数を増やし、測定精度を上げるために、計画を変更し、平成 25 年度研究経費で、海洋生物測定用の内径 25 mm ^1H RF コイルを調達した。

(4) H_2S の循環動態への影響

平成 25 年 3 月末から 4 月に 3 回の研究船利用航海研究により採取されたシンカイヒバリガイとヘイトウシンカイヒバリガイを用い、平成 25 年 4 月初めから、正常個体の構造と循環機能の測定を行い、心拍数、血流、および心拍動について基礎データの収集を行うことができた。

ムラサキガイを用い、パルス的に Na_2S を投与し、その効果を確認した。 Na_2S 1 mg/L の投与により、心拍動および鰓の水流が抑制されること、1 時間後に正常海水に戻すとすみやかに回復することが確認できた。一方、シンカイヒバリガイおよびヘイトウシンカイヒバリガイでは、 Na_2S 1 mg/L の投与によっても、心拍動も鰓の水流も大きな影響を受けなかった。すなわち、深海性二枚貝が H_2S に対する高い耐性を有していることが判明した。

今後、 Na_2S の濃度依存性について測定を進め、 H_2S に EDRF 作用があるのか否かを明らかにしていく予定である。

7) Ramsay, J. A. (1952). A Physiological approach to the lower animals. 149pp. Cambridge: Cambridge University Press

8) Krijgsman, B. J. and Divaris, G. A. (1955). Contractile and pacemaker mechanism of the heart of molluscs. *Biol. Rev.* 30, 1-39.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y. Magnetic resonance imaging analysis of water flow in the mantle cavity of live *Mytilus galloprovincialis*. J. Exp. Biol. (in press) 2014 (doi:10.1242/jeb.101949) (査読有)

Seo E, Ohishi K, Maruyama T, Imaizumi-Ohashi Y, Murakami M, Seo Y. Testing the constant-volume hypothesis by magnetic resonance imaging of the mussel heart in the *Mytilus galloprovincialis*. J. Exp. Biol. 217: 964-973, 2014 (doi:10.1242/jeb.092577) (査読有)

〔学会発表〕(計 6件)

Y Seo, E Seo, K Ohoishi, T Maruyama, Y Imaizumi-Ohashi, M Murakami Cardiovascular function of marine mussels monitored by MRI. 91st Annual Meeting of Physiological Society of Japan. March 16, 2014 Kagoshima University (Kagoshima)

瀬尾芳輝、瀬尾絵理子、大石和恵、大橋好偉、村上政隆、丸山正 MRI法による深海性二枚貝の外殻膜腔水流の可視化ブルーアース2014 2014年2月20日、東京

瀬尾芳輝、瀬尾絵理子、大橋好偉、村上政隆、大石和恵、丸山正 MRI法による海洋生物の循環機能測定 第41回日本磁気共鳴医学会大会 2013年9月19日 アステイ徳島(徳島市)

瀬尾芳輝、瀬尾絵理子、大橋好偉、村上政隆、大石和恵、丸山正 7T MRIによるイガイ循環機能の解析 第17回NMRマイクロイメージング研究会 2013年8月2日、東京

瀬尾芳輝、瀬尾絵理子、大橋好偉、早川実佳、藤倉克則、村上政隆、丸山正 MRI法による二枚貝の循環機能測定法の検討ブルーアース2013 2013年3月14日、東京

丸山正、村上政隆、瀬尾絵理子、大石和恵、藤倉克則、大橋好偉、早川実佳、瀬尾芳輝 海洋生物のNMR micro-imaging 第16回NMRマイクロイメージング研究会 2012年8月2日、大津市

〔図書〕(計 7件)

瀬尾芳輝 深海と地球の事典 コラム: MRIによる深海生物研究 (1ページ) 深海と地球の事典編集委員会編、丸善出版株式会社 (2014) in press

瀬尾芳輝、村上政隆 生理研磁気共鳴共同利用実験総括会費2013の記録、自然科学研究機構生理学研究所MRI共同研究グループ、イヅミ出版、149ページ、2013

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾芳輝 (Seo Yoshiteru)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90179317

(2) 連携研究者

丸山正 (Maruyama Tadashi)

独立行政法人海洋研究開発機構・海洋・極限環境生物圏領域・プログラムディレクター

研究者番号: 90373464