

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19570069  
 研究課題名 (和文) 海水ウナギにおける” 渇き” から” 飲水” までの内分泌系及び神経系  
 研究課題名 (英文) Endocrine and nervous systems involved in “thirst”  
 and “drinking” in the seawater eel

## 研究代表者

安藤 正昭 (ANDO MASAOKI)  
 広島大学・大学院総合科学研究科・教授  
 研究者番号：10100976

## 研究成果の概要：

海水ウナギは海水を飲まなければ生きてゆけないが、飲水行動は末梢で生じたペプチドホルモンによってコントロールされている。ホルモンの脳内作用部位として大細胞性視索前核・前隆起核・最後野が考えられるが、これらの神経活動を安定して測定する手法を開発した。またイソトシンが飲水行動を調節していることを発見した。さらに延髄から出て、食道の筋肉を収縮させる神経を同定し、この神経束に胃からの感覚神経が含まれることを見つけた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

## 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：行動生理、水代謝、飲水行動

## 1. 研究開始当初の背景

” 渇感” や” 空腹感” が満たされることから快の気持ち、満たされないことから不快の気持ちが生じ、これら快・不快の感情 (情動) が動物の行動を規定する。これらの情動はまた、ヒトの” 心” の基盤をなしていると思われる。動物に感情を直接聞くことはできないが、” 渇感” は飲水行動を、” 空腹感” は摂食行動を引き起こすので、動物の情動はこれらの行動から類推することになる。摂食行動の調節機構は、哺乳類を用いてかなりの程

度明らかになってきたが (Morton et al., 2006; Nature 443, 289-295)、飲水行動を調節する神経回路はまだ解かっている。哺乳類の飲水行動を調節する神経回路は、水の損失を補うという本来の目的以外にも、体温調節や呼吸の調節にも利用されるようになっており、そのぶん複雑になっていることが予想される。それに対して海水に棲むウナギ (変温動物) は、呼吸のために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) という

単純な神経回路であることが予想される。また飲水調節因子の作用がウナギと哺乳類でよく似ていることから (Ando et al., 2003)、ウナギは脊椎動物に一般化できる良いモデル動物だと考えた。本研究では、“渇き”の受容から飲水行動の誘発までの神経回路を明らかにし (*in vitro* 実験)、その結果を *in vivo* の実験で確かめることを目的とするが、いずれのステップもほとんど解かっていない。

#### (1) 脳における“渇き”の受容

ウナギの飲水は静脈中のアンギオテンシン II (ANG II) によって促進され、心房性 Na 利尿ペプチド (ANP) で抑制される (Ando et al., 2000)。同様の効果は脳室内投与でも見られる (Kozaka & Ando, 2003) ことから、これらのペプチドホルモンは脳に作用していると考えられる。しかしこれらのホルモンが脳内のどこに作用しているのか、その後どのような神経回路を経て最終的な嚥下に結びつくのか、脳内の作用部位は全く不明である。

#### (2) 上部食道括約筋の収縮調節

ウナギの飲水行動の律速段階は上部食道括約筋 (Upper esophageal sphincter muscle, UES) の収縮と弛緩であり、この筋は延髄の舌咽・迷走運動核 (Grossopharyngeal-vagal motor complex, GVC) の神経支配を受けている (Mukuda & Ando, 2003)。また GVC ニューロンはコリナージックであり (Mukuda & Ando, 2003)、UES 筋は Acetylcholine (ACh) で収縮する (Kozaka & Ando, 2003)。しかし、GVC を支配する上位の神経核については全く分かっておらず、UES の収縮弛緩を調節する因子も ACh 以外は全く知られていない。

#### (3) *in vivo* 実験系

GVC から出て UES を支配する神経線維もまだ同定されていない。また平野 (1976) はウナギの胃に水を入れると飲水が抑えられることを報告しているが、胃からの情報がどのような神経を介して脳に入るのか、この感覚神経も同定されていない。

### 2. 研究の目的

#### (1) 脳における“渇き”の受容

ウナギは、血液量の減少 (低血圧) に応答して血中の ANG II レベルを上げ、血液浸透圧の上昇に反応して ANP レベルを上げる。その結果として ANG II では飲水促進が、ANP では飲水抑制が惹起される。しかし血中で生じたこれら飲水調節ホルモンが、脳のどこに作用しているのかはまだ解かっていない。本研究ではウナギの左右半球を用いるこ

とにより (スライス標本ではなく)、神経連絡がよりインタクトに近い状態で神経活動を記録し、ANG II と ANP の効果を調べることによって、これらペプチドホルモンの脳内作用部位を明らかにする。

#### (2) 上部食道括約筋の収縮調節

ウナギは水中に生活しているので絶えず口腔内に水がある。したがって、上部食道括約筋 (UES) が弛緩すれば水は食道に入る (嚥下)。この UES を支配しているのが延髄の GVC である。本研究では、この GVC を支配するより上位の脳内神経回路を明らかにする。と同時に、UES の収縮や弛緩を調節する ACh 以外の因子を探す。

#### (3) *in vivo* 実験系

*in vitro* で得られた結果を最終的には *in vivo* の系で証明したい。そこで本研究では、麻酔下で静脈中に ANG II や ANP を注射することにより、飲水促進 (UES 弛緩) や飲水抑制 (UES 収縮) が記録できる *in vivo* の実験系を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脳における“渇き”の受容

ウナギの脳では大細胞性視索前核 (Magnocellular preoptic nucleus, PM)、前隆起核 (Anterior tuberal nucleus, NAT)、最後野 (Area postrema, AP) の3箇所が血液脳関門を欠いていることが知られている (Mukuda et al., 2005)。そこで、これら3つの部位で ANG II と ANP の作用を調べる。これら3箇所のニューロンは正中線にあるので、脳を正中面で切断し (左右の脳半球にし)、切断面にタングステン電極 (直径 10  $\mu\text{m}$ ) を当て、それぞれのニューロンの自発活動を記録しながら、その部位に局所的にペプチドホルモンを投与し (puff application)、反応を見る。ANG II と ANP で反対の反応を示す部位は、飲水調節ホルモンの作用部位である可能性が高く、この部位で“渇き”を受容している可能性がある。

#### (2) 上部食道括約筋の収縮調節

GVC の神経活動はカテコールアミンで抑えられるので (Ito et al., 2006)、カテコールアミンを伝達物質として用いるニューロンが GVC を支配している可能性がある。そこで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 (TH) に対して免疫陽性である神経核を探し、これら TH 陽性の神経核を電気刺激し、GVC の反応を調べる。GVC に抑制効果が現れたら、その効果がカテコールアミン受容体のアンタゴニストで

抑えられるかどうか調べる。

### (3) *in vivo* 実験系

麻酔下で UES にバルーンを挿入し、鰓の裏にある 10 本の神経枝を電気刺激し、UES を支配する神経枝（運動神経）を同定する。このとき神経終末より ACh が放出されていることを薬理的に確かめる。また胃を膨らませることにより、反応する神経枝（感覚神経）を同定し、運動神経との関連を調べる。

## 4. 研究成果

### (1) 脳における“渇き”の受容

ウナギの脳で血液脳関門を欠いている大細胞性視索前核 (PM)、前隆起核 (NAT)、最後野 (AP) はいずれも ANG II と ANP に対して反応するが、再現性がなく、2007 年度は結論が出せなかった。2008 年度になって、くも膜を剥離し、脳脊髄液の組成を変え、実験装置を改良して、試行錯誤の末に 2009 年の 2 月になって、ようやく再現性良くペプチドの効果を観察できるようになった。今年度で一番の難所を突破したので、次年度はこれら 3 箇所での飲水調節ホルモンの作用をはっきりさせることができる。

### (2) 上部食道括約筋の収縮調節

ウナギの神経葉ホルモンであるイソトシン (IT) は、単独では UES を濃度依存的に弛緩させるが、迷走神経が刺激されているときには収縮を強めた (Watanabe et al., 2007; Sakihara et al., 2007)。IT の弛緩作用は筋に対する直接効果であり (Watanabe et al., 2007)、収縮増強効果は迷走神経終末よりの ACh 放出を促進することによると思われる (Sakihara et al., 2007)。IT はまた、静脈中に投与すると飲水を促進した (Watanabe et al., 2007)。

一方、GVC の神経活動はカハールの交連核 (Commissural nucleus of the Cajal, NCC) や迷走神経葉 (Vagal lobe, LX) を電気刺激すると抑えられるが、NCC 刺激の効果はナロキソンで抑制されることから、NCC はノルアドレナリンかアドレナリンを用いて GVC をコントロールしていると思われる。一方 LX の電気刺激の効果は、ナロキサンでは抑えられず、Suramine や Phaclofen で抑えられることから、LX は ATP や GABA を伝達物質として用いていると思われる (準備中)。

### (3) *in vivo* 実験系

鰓の裏で見られる 10 本の神経枝の内、X2・X3・X4・X5 の神経枝を電気刺激すると、UES 部に挿入されたバルーンの圧は高まった (UES の収縮)。これらの神経枝の中でも X5

の刺激が一番有効であり、100  $\mu$ A の電流で UES 内圧は最大となった。またバルーン圧は X5 刺激の周波数によって変化し、20 Hz の時に最大内圧を示した (至適周波数)。この 20 Hz で X5 を刺激した時のバルーン圧の上昇は、UES 筋に Curare を注射することで抑えられた。この結果は、UES 筋の ACh 受容体はニコチン性であるという *in vitro* の結果 (Kozaka & Ando, 2003) とよく一致する (準備中)。

また、胃と食道の間を縦に走っている神経は、胃内にバルーンを入れて膨らませると発火頻度を上昇させ、30 cmH<sub>2</sub>O で最大発火頻度 60 Hz に達した。一方、胃を 2% NaCl 液 (海水ウナギの胃内液に相当; Ando & Nagashima, 1996) で膨らませると、神経の発火は急激に上昇し、10 cmH<sub>2</sub>O で最大発火に達し、その後プラトーを維持した。最初の急激な反応は、液が直接胃壁に接触することで生じる触刺激によるものだと考えられ、プラトー部分では触刺激の脱感作と、Na 又は Cl イオン (化学受容) によって神経活動が濃度依存的に抑制されている可能性が考えられる (準備中)。

なおこの神経は鰓の裏では X5 と合流していたので、X5 神経枝には UES に行く遠心性神経と、胃からの求心性神経が含まれていることが分かった。

## 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 2 件)

1. Watanabe, Y., T. Sakihara, T. Mukuda & M. Ando (2007) Antagonistic effects of vasotocin and isotocin on the upper esophageal sphincter muscle of the eel acclimated to seawater. *J. Comp. Physiol. B177*, 867-873. 査読有
2. Sakihara, T., Y. Watanabe, T. Mukuda & M. Ando (2007) Post- and pre-synaptic action of isotocin in the upper esophageal sphincter muscle of the eel: its role in water drinking. *J. Comp. Physiol. B177*, 927-933. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

1. 椋田崇生、安藤正昭: ウナギの飲水行動を調節する脳内神経回路—哺乳類との比較、第 33 回日本比較内分科学会シンポジウム (広島) 2008 年 12 月 6 日
2. 安藤正昭: 海水ウナギの飲水調節におけ

るホルモンの作用：脳内作用部位、平成  
20年度基生研研究会「体内環境を維持  
する統合的理解をめざして」(岡崎) 2008  
年 11 月 10 日

3. 安藤正昭：海水ウナギの飲水調節ホルモ  
ンの脳における作用、第 79 回日本動物  
学会 (福岡) 2008 年 9 月 7 日
4. 椋田崇生、安藤正昭：ウナギの嚥下反射  
を調節する神経回路、第 79 回日本動物  
学会 (福岡) 2008 年 9 月 7 日
5. 安藤正昭、椋田崇生、小川美佐、藤江奈  
津子：海水ウナギの飲水調節における迷  
走神経支配と上部食道括約筋の収縮、第  
80 回日本動物学会中国四国支部大会  
(広島) 2008 年 5 月 18 日
6. 椋田崇生、小川美佐、安藤正昭：ウナギ  
の嚥下を調節する延髄迷走神経反射弓、  
第 60 回日本動物学会中国四国支部大会  
(広島) 2008 年 5 月 18 日
7. 椋田崇生、安藤正昭：魚類の上部食道括  
約筋の弛緩に関与する延髄の神経回路、  
第 85 回日本生理学会 (東京) 2008 年 3  
月 26 日
8. 安藤正昭、椋田崇生、渡辺要平、崎原卓：  
海水ウナギの飲水行動における神経葉  
ホルモンの役割、第 32 回日本比較内分  
泌学会 (日光) 2007 年 10 月 12 日
9. 安藤正昭、椋田崇生、渡辺要平、崎原卓：  
ウナギの上部食道括約筋の収縮に及ぼ  
す神経葉ホルモンの影響：飲水行動と関  
連して、第 78 回日本動物学会 (弘前)  
2007 年 9 月 20 日
10. 椋田崇生、伊藤直、山里竹美、安藤正  
昭：嚥下を調節するウナギ延髄の神経回  
路、第 78 回日本動物学会 (弘前) 2007  
年 9 月 20 日
11. 安藤正昭、椋田崇生、渡辺要平、崎原  
卓：海水ウナギの上部食道括約筋におけ

るイソトシンのプレアクションとポス  
トアクション：飲水調節における意義、  
第 59 回日本動物学会中国四国支部大  
会 (鳥取) 2007 年 5 月 20 日

12. 椋田崇生、伊藤直、山里竹美、安藤正  
昭：嚥下を調節するウナギ延髄神経核の  
神経連絡、第 59 回日本動物学会中国四  
国支部大会 (鳥取) 2007 年 5 月 20 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安藤 正昭 (ANDO MASAOKI)  
広島大学・大学院総合科学研究科・教授  
研究者番号：10100976

### (2) 研究分担者

椋田 崇生 (MUKUDA TAKAO)  
広島大学・大学院総合科学研究科・助教  
研究者番号：60346335

### (3) 連携研究者