

ウナギの飲水行動を調節している神経回路網の探索

椋田 崇生

鳥取大学医学部機能形態統御学講座形態解析学分野

Neuronal networks regulating the drinking behavior in eels

Takao MUKUDA

*Division of Morphological Analysis, Department of Functional, Morphological and Regulatory Science,
Tottori University, Yonago 683-8503*

要 旨

本研究ではウナギの飲水行動に関与する脳部位を組織学的、電気生理学的に調べた。ウナギの腹腔に注射したEvans blue (EB) によって、magnocellular preoptic nucleus (PM)、nucleus anterior tuberis (NAT)、area postrema (AP) のニューロンが染色された。これは、これらの部位が血液脳関門を欠いていることを示唆しており、これらは血中飲水調節因子を受容するウナギの脳室周囲器官であると考えられる。飲水に関与している口腔・咽頭・食道領域の筋（飲水関連筋）にEBを注射すると、延髄にあるspinooccipital motor nucleus (NSO) と glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) のニューロンが逆行性に標識された。これらのニューロンは choline acetyltransferase (ChAT) の抗体で免疫染色すると大部分がChAT様免疫陽性反応を示した。したがって、これらのニューロンは飲水関連筋を直接支配し、acetylcholine (ACh) を神経伝達物質として用いていると考えられる。ウナギの飲水の律速段階である upper esophageal sphincter (UES) を支配するGVCニューロンの活動はadrenaline (AD) やdopamine (DA) によって抑制された。この抑制効果はGVC神経終末でのACh放出を抑え、結果として、収縮状態にあるUESが弛緩すると思われる。catecholamine (CA) 合成の律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH) の抗体を用いた免疫染色では、AP や commissural nucleus of the Cajal (NCC) のニューロンが TH 様免疫陽性反応を示し、その線維はGVCに達していた。AP や NCC のニューロンはCAを神経伝達物質として用いて、GVCを抑制的に支配していると考えられる。

序 論

飲水行動は大部分の脊椎動物にとって体内水分の恒常性維持のために欠かすことができない。これまで飲水行動を調節している神経回路を明らかにする研究は、おもに哺乳類を用いて古くからなされてきたが、現在でも決定的なモデルは提唱されていない。哺乳類を含めた多くの陸上脊椎動物は、渇きを感じ、水を探し、水場へ移動し、水を口に含み、水を飲み込むこと（嚥下）で飲水行動は完了する。これらの各ステップにはそれぞれの神経回路が存在する。そのため、哺乳類の飲水行動を調節し

ている神経回路網はより複雑になっていると考えられる。また最近、哺乳類の飲水行動に關与する神経回路と体温調節の神経回路は交差しているといわれ始めた (Takahashi *et al.*, 2001)。一方、魚類は水中に生活し、呼吸のために絶えず口腔内に水があるので、嚥下だけで飲水行動は完結する。このことは、魚類の飲水行動を調節している神経回路は哺乳類より単純で、モデルとしては優れていることを暗示している。魚類の飲水行動は、外科的手術に耐性があることから、ウナギを用いて飲水調節因子の同定が行われてきたが (Hirano, 1974; Takei *et al.*, 1979, 1998; Ando & Nagashima, 1996; Ando *et al.*, 2000a, b)、飲水を調節している神経回路の解析は行われていない。そこで本研究では、ウナギの飲水行動に關与している脳の神経回路を組織学的、電気生理学的に明らかにすることを目的とした。

第1章 ウナギの飲水行動に關与している脳部位：脳地図の構築と脳室周囲器官の同定

ウナギの飲水行動に關与している脳部位を調べるために、Klüver-Barrera 染色した切片にもとづいて、嗅球から延髄におよぶウナギの脳地図を作製し、哺乳類で嚥下関連神経核と考えられている舌咽・迷走神経起始核 (dorsal motor nucleus of vagus と nucleus ambiguus) に相当する神経核をウナギの延髄で同定した。ウナギの舌咽・迷走神経起始核は一緒になって前後に長い神経核複合体を形成していたので、この複合体を glossopharyngeal-vagal motor complex (GVC) と呼ぶことにした。ウナギの腹腔に EB を注射すると、saccus dorsalis (SD)、epiphysis (E)、PM、NAT、AP が血中からの EB で染色された。EB は血中でアルブミンと結合し EB-アルブミン複合体を形成するため血液脳関門 を通過することはできない。この結果は、SD、E、PM、NAT、AP が血液脳関門を欠いている部位であることを示唆している。また、これらの脳部位のなかでも、PM、NAT、AP のニューロンは明らかに EB を取り込んでいた。したがって、これらの脳領域は血中からの飲水調節因子を受容するウナギの脳室周囲器官であると考えられる。

第2章 ウナギの飲水関連筋に投射しているニューロン

ウナギの飲水に關与している7つの筋 (飲水関連筋; sternohyoid muscle、3rd branchial muscle、4th branchial muscle、opercular muscle、pharyngeal muscle、UES、esophageal body muscle) に EB を注射し、これらの筋に投射しているニューロンを逆行性に標識した。sternohyoid muscle は '開口' を引き起こし (開口関連筋) 残りの筋は '嚥下' に關与する筋 (嚥下関連筋) である。EB で染色されたニューロンはすべて延髄尾部に同側性に認められた。第1章で作製した脳地図に基づいて、sternohyoid muscle に投射しているニューロンは NSO、残りの嚥下関連筋に投射しているニューロンは GVC のニューロンであると同定された。GVC ではニューロンの配列が筋の配列と対応していた (viscerotopic arrangement)。したがって、GVC のニューロンが吻尾方向に順番に発火すれば、嚥下は完了すると考えられる。これら NSO や GVC ニューロンを ChAT の抗体で免疫染色すると、大部分が ChAT 様免疫陽性反応を示すので、ACh を神経伝達物質として用いていると考えられる。延髄のニューロンとは別に、pharyngeal muscle、UES、esophageal body muscle に EB を注射すると、迷走神経の神経節でも EB で染色されたニューロンが観察された。これらのニューロンは、その局在位置や形態から判断すると、感覚ニューロンであると考えられる。また、これらのニューロンは ChAT 様免疫陽性反応を示さないで、ACh を神経伝達物質に用いていない可能性が高い。哺乳類の嚥下の神経調節機序をもとに、これらの結果からウナギの飲水行動の神経調節機序を推測した。ウナギの飲水行動を制御している神経回路は、哺乳類の嚥下を制御している神経回路に相当しているのかもしれない。

い。

第3章 カテコールアミンによるウナギの glossopharyngeal-vagal motor complex の活動変化とそれを支配する神経核

ウナギの飲水行動では咽頭領域の筋の収縮とともにUESが弛緩しなければ咽頭から食道に水は送られない。したがって、UESの弛緩はウナギの飲水行動の律速段階であると考えられる。そこでUESを支配しているGVCの活動抑制がUESの弛緩をもたらすと考え、GVCニューロンの活動を抑制する物質の探索を行った。GVCの周りにメスで切り込みを入れ、他の脳領域からの神経連絡を完全に絶ったウナギの脳標本（ブロック脳）にDA、AD、noradrenaline (NA)をそれぞれ作用させ、これらCAsの効果を細胞外記録した。いずれの物質でも発火頻度が有意に抑えられた。抑制効果はADが最も強くDA、NAが次いだ。次にGVCを支配し、CAを含むニューロンの局在を調べるために、CA合成の律速酵素であるTHの抗体を用いて、ウナギ延髄尾部（vagal lobe (LX)からAPまでの領域）で免疫染色を行った。GVCの周囲やGVCニューロンの細胞体にオーバーラップするように非常に多くのTH様免疫陽性神経線維が観察されたが、GVCニューロンはTH様免疫陽性反応を示さなかった。TH様免疫陽性細胞体はLX、NCC、AP、reticular formation、GVCで観察された。このうち、NCCとAPのニューロンはGVCに神経線維を伸ばすものが観察された。これらの結果は、NCCやAPがGVCをCAによって抑制的に支配していることを示唆している。

第4章 総合的考察とまとめ

ウナギの血液脳関門のない脳部位（脳室周囲器官）を間脳領域で2部位（PM, NAT）、延髄で1部位（AP）同定した。ウナギの飲水行動は血中の種々の飲水調節因子によって調節されているが（Ando *et al.*, 2000a）、angiotensin II (ANGII) や atrial natriuretic peptide (ANP) のような因子は、血液脳関門があるために一般に血液から脳に入ることはない。しかし、ウナギにこれらの因子を血中投与したときと頭蓋内投与したときとは同じ飲水効果を示す（Kozaka & Ando, unpublished observation）。これは、これらの因子がPM、NAT、APに作用しているからであると考えられる。仮に、飲水促進因子であるANGIIがAP作用すれば、APニューロンは活性化され、その神経終末からADあるいはDAがGVCニューロンに放出されることが考えられる。GVCニューロンは他の嚥下関連筋とともにUESを支配し、高い頻度で自発発火しているため、その神経終末では継続してAChが放出され、UESは収縮状態を保持していることが考えられる。そこにAPからのADあるいはDAが作用すれば、GVCニューロンの神経終末からのAChの放出は抑制され、結果としてUESは弛緩する。UESの弛緩は、咽頭腔の水を食道に送るためのゲートを開くことになり飲水は促進される。このような機序は、ANGIIが飲水促進因子としてウナギの飲水行動に影響をおよぼすことと矛盾しない。今後、PMやNAT、APへのANGIIの局所投与によって、ウナギの飲水行動がどのように変化するのか、脳のどの部位が活性化されるのか、また、ANGIIのAPへの投与によってUESはどのような挙動を示すのか検討することで、ウナギの飲水行動を調節している神経回路網をより詳細に解析する予定である。