

論文の内容の要旨

論文題目

The role of atrial natriuretic peptide in seawater adaptation in eel:
An integrative physiological study
(ウナギの海水適応におけるナトリウム利尿ペプチドの役割：統合生理学的研究)

氏名 塚田 岳大

序論

海産の真骨魚類は、体液浸透圧を海水の約 3 分の 1 に保っているため、体内外の塩濃度の差に従って絶えず塩分が流入し、水分が奪われる。そのため海水魚は、海水を飲むことによって脱水から身を守っている。飲み込んだ海水は食道の脱塩などにより前腸に至るまでに体液とほぼ同程度に希釈され、その後、腸で塩分と共に水が体内に取り込まれる。いっぽう、余分に摂取した一価イオンは、鰓の塩類細胞などから排出される。このように飲水とそれに続く腸からの吸収、及び鰓を介した水やイオンの輸送は、魚類の海水適応に極めて重要であり、これらの輸送調節には多くのホルモンが関与している。

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) は主に心房から分泌され、脊椎動物で広く浸透圧調節に関与しているホルモンである。魚類では、海水移行時に一過性に血中 ANP レベルが上昇することや、ANP の連続投与を行うと用量依存的に血漿 Na 濃度が減少することから、ANP は魚類の血漿 Na 濃度を下げ、海水適応を促進するホルモンであることが注目されている。しかし、ANP の血漿 Na 調節に関わる部位や ANP の作用機構についてはまだ明らかになっていない。本実験の目的は、ANP による血漿 Na 濃度減少作用のメカニズムを明らかにして、魚類の海水適応における役割を解明することにある。そこで、優れた浸透圧調節能をもち、外科手術に強い耐性をもつ日本ウナギ (*Anguilla japonica*) を用いて、個体レベルにおける ANP の作用機構を詳細に調べた。

本論文は 2 つの章からなる。第一章では、魚類の浸透圧調節部位における ANP の作用を個体レベルで調べ、血漿 Na 濃度が減少する原因を明らかにした。第二章では、ANP の生理機能のひとつである飲水抑制作用に着目し、その作用メカニズムを組織学的、生理学的に調べた。

ANP による血漿 Na 濃度減少作用のメカニズムを探る

序論で述べたように、海水ウナギの血中に ANP を投与すると、血漿 Na 濃度が減少する。

体内外の Na 収支から考えると、血漿 Na 濃度が減少する原因は、(1) 鰓や腎臓による Na 排出の促進、または(2) 飲水および腸からの Na 摂取の抑制、が考えられる。しかし、ウナギでは哺乳類とは異なり腎臓での Na 利尿作用がないことがわかっている。そこで本章では、腎臓以外の浸透圧調節部位(鰓、飲水、腸)に着目し、ANP の作用を調べた。

はじめに、魚類において最も重要な浸透圧調節器官である鰓における ANP の作用を調べた。まず、 ^{22}Na を用いて体内外の Na の動きを調べたところ、約 $1300 \mu\text{mol}/100 \text{g}/\text{h}$ の Na が体表(主に鰓上皮)を通して出入りしていることがわかった。そこで、海水ウナギの体内に ^{22}Na を投与して、Na 排出速度に対する ANP の作用を調べたが、排出速度はその前後に投与した saline の時の値(time control)と変わらなかった。従って、ANP は最も主要な Na 排出部位である鰓に作用して血漿 Na 濃度を下げたのではないことが明らかとなった。

次に、ANP の飲水への作用を調べた。海水ウナギの食道と胃にカニューレを挿入し、経時的に飲水量を測定する系を用いて調べたところ、ANP は飲水を強力に抑えると同時に血漿 Na 濃度を減少させ、両者には有意な相関があった。次に、ANP を投与して飲水量が減少しているウナギに海水を強制的に飲ませたところ、ANP による血漿 Na 濃度減少作用は見られなくなった。従って、ANP の飲水抑制作用が血漿 Na 濃度の減少に関与していることがわかった。

次に、ANP の消化管における作用を *in vivo* で調べた。まず、食道から直腸にいたる消化管各部位の内容液の組成を調べ、イオン濃度の変化から各部位における Na 吸収量を計算したところ、主な吸収部位は食道と中腸であった。そこで、これらの部位の両端を縛って袋を作り、その中に人工的に作った内容液を入れて、水や各イオンの吸収を無麻酔下で調べた。ANP を血管内投与すると、中腸での Na の吸収が強力に抑えられたが、食道では変わらなかった。従って、腸からの Na の吸収にも ANP が関わっていることが示唆された。

上記の実験で得られた結果をもとに、海水ウナギの Na 収支を計算した(図 1)。定常時には、飲水やその後続く腸からの Na 摂取量は約 $380 \mu\text{mol}/100 \text{g}/\text{h}$ で全 Na 摂取量の約 30% に相当した。いっぽう、ANP を投与すると、その摂取量が約 $75 \mu\text{mol}/100 \text{g}/\text{h}$ にまで減少し、これは血漿 Na 濃度を減少させるのに十分な量であった。このように、海水ウナギでは、ANP は鰓や腎臓からの Na の排出を促進するのではなく、飲水とそれに続く腸からの Na 吸収を抑制することにより血漿 Na 濃度を減少させることがわかった。

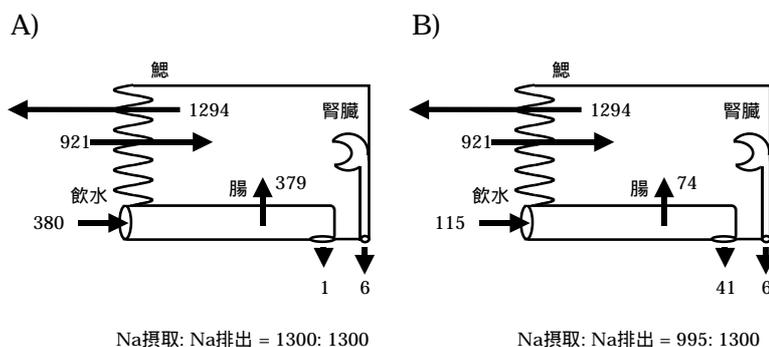


図 1: 海水ウナギにおける Na 収支 (A) と ANP を一時間投与したときの Na 収支の変化 (B) の模式図

これらの実験は、体外から ANP を投与したものであり、体内に存在する ANP が Na 摂取の抑制に関与しているかどうかはわからない。そこで、ANP と特異的に結合する抗体を海水ウナギの血中に投与して血漿 ANP を除いたところ、正常ウサギ血清を投与した対照群に比べて、血漿 Na 濃度と飲水量が徐々に増加した。従って、内因性 ANP が長期的に血漿 Na 濃度や飲水の抑制に関与していることがわかった。

ANP の飲水調節メカニズムを探る

第一章の実験で、ANP の飲水抑制作用が魚類の血漿 Na 濃度の調節に極めて重要であることが示唆されたため、第二章では、ANP の飲水調節メカニズムを詳しく調べた。本実験では、ANP が脳に作用し飲水を調節していると予想して、脳内における ANP 受容体 (NPR-A) の分布を調べた。まず、脳を7つに分け各部位における NPR-A の発現を RT-PCR で調べたところ、全ての部位で NPR-A の発現がみられた。次に免疫染色法を用いて NPR-A の脳内分布を詳しく調べたところ、脳全体の血管系に NPR-A が局在し、RT-PCR の結果と一致した。また、脳の嗅球から小脳に至るまで NPR-A 陽性の神経細胞は確認できず、延髄の網様体に存在する比較的大きな神経細胞や、飲水調節に関与している舌咽・迷走神経運動野 (GVC) ニューロン、哺乳類で嘔吐や血圧調節に関与している最後野 (AP) の神経細胞に NPR-A が局在していた。いっぽう、血液中の ANP が飲水を抑制することから、ANP は AP のように血液脳関門を欠く脳室周囲器官群に作用していると考えられる。そこで、アルブミンに結合するため血液脳関門を通過できないトリパンブルーを血中に投与し、視索前核、および AP や松果体などの脳室周囲器官にトリパンブルーの蛍光反応がみられた。NPR-A が存在して血液脳関門を欠く部位が AP のみであることから、血中の ANP が AP の神経細胞に作用して飲水を抑制していることが示唆された。そこで、海水ウナギの AP を破壊したところ、実験群は偽手術群と比べて飲水量が減少するとともに、血液中に投与した ANP により飲水量が抑制されなくなった。このことから、AP が魚類の飲水調節、とりわけ ANP の飲水抑制作用に関与していることが示唆された (図2)。

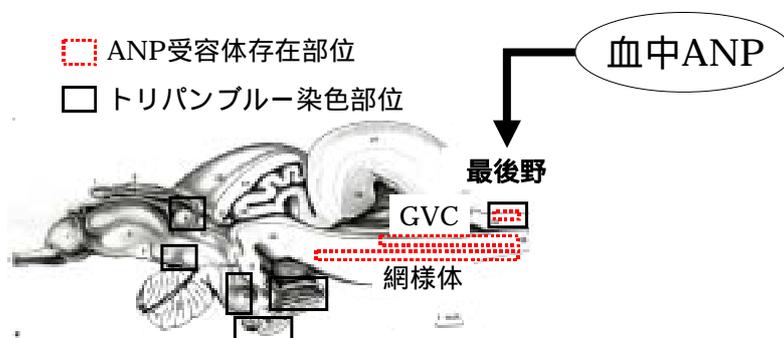


図2：脳を介した ANP の飲水抑制機構

考察

これまで ANP は、海水魚の主要な Na 排出部位である鰓に作用して排出を促進すると考えられていた。しかし本研究により、ANP は鰓に作用するのではなく、飲水や腸からの Na 摂取を抑制することで、血漿 Na 濃度を減少させることを明らかにした。また、海水移行後に血中 ANP レベルが一過性に上昇することから、ANP は環境変化に対して短期的に作用するホルモンであると考えられていた。しかし、海水に適応したウナギの内因性 ANP を不活性化すると飲水と血漿 Na 濃度が並行して上昇することから、ANP が短期的だけではなく長期的に海水魚の飲水と血漿 Na 濃度を低く保っていることが示唆された。そして、ANP の飲水抑制作用には脳室周囲器官である AP が関与していることがわかった。AP の神経細胞の一部は、飲水に関わる上部食道平滑筋を支配している GVC ニューロンに投射していることが明らかになっている。このことから、血液中の ANP は AP で受容された後、GVC ニューロンを介して飲水を抑制していると考えられる。序論でも述べたように、海水魚には飲水が必須であり、体外からの水の摂取を抑制することは海水適応において不利のように見える。しかし、海水を飲むことは同時に塩分を過剰に摂取することでもあり、海水魚は常に塩分の過剰に曝されている。そのため、陸上で生活する四足動物と比較して魚類では飲水の抑制メカニズムが発達している。魚類の浸透圧調節における ANP の役割を考察すると、ANP は海水魚において飲水や腸からの Na 吸収を抑制することによって、魚類の海水適応を促進するホルモンであると考えられる。