

第 80 回生理学会大会サテライトシンポジウム

第 3 回 環境生理シンポジウム プログラム

期日：2003 年 3 月 23 日（日）13:00-19:00
会場：九州大学医学部コラボステーション

主催 環境生理シンポジウム世話人会

共催
日本生理学会

後援
日本神経内分泌学会 日本自律神経学会 日本生気象学会
平成 14 年度基盤研究 C(企画調査)「脂溶性シグナル分子の
脳機能に対する作用機構」班
エスペック株式会社

ごあいさつ

第3回環境生理シンポジウムをお世話するに当たって

環境生理シンポジウムは第一回の京都府立医大（2001年3月28日）、第二回の広島大学（2002年3月27日）を経て、第三回を九州大学で迎えることになりました。研究テクニックはもとより、研究組織、研究者養成機構といったパラダイムが大きく転換しつつある今日、「環境」との相互作用という視点から生命にアプローチしている研究者間の新たなネットワークを構築することを目標に掲げて開始した本シンポジウムは、分子生物学から行動学にわたる広い分野の演者のご講演と、何れの年も200人を越える熱心なご参加者を得て、世話人一同、所期の役割を果たしてきたと自負しております。

研究テクニックの進歩は「環境」という概念の理解にも変化を起こします。環境生理学が外的環境のダイナミックに変化に抗して内的環境の恒常性を維持するという、いわば受け身の機構の理解を目的としていた時代は過去のものになりました。内的環境が決して静的なものではないことは、ホメオスタシスではなく、ホメオスターシスという用語が意識的に用いられてきたことに既に先人の知恵が現れていますが、昨今のオーファン受容体に対するリガンド分子の作用の解明に典型的に見られるように、内的環境もさまざまな情報伝達系を介して揺れ動いており、ストレス負荷やさまざまな病態、嗜癖の獲得などがアロスターシスと呼ばれる異常な平衡状態に陥ること、われわれ内分泌生理学者がホルモン分泌の階層的制御におけるフィードバック調節を血中濃度の維持という静的な視点から研究してきたのに対して、フィードバック調節における振動数という動的特性に着目することで時間遺伝子の動作機序が判明するといった最近の研究は、環境という概念を考え直す格好の事例です。内分泌攪乱物質の例を挙げるまでもなく、人工照明の普及や飽食など、ヒトはごく日常の外的環境に干渉を加え、安逸な生活の見返りに生活習慣病といった手痛いしっぺ返しを食らう事態も起こっています。外的環境の信号伝達物質であるフェロモン作用によって、手軽に性的魅力を高めることを売り物にする香水さえ市場に現れています。実現は容易でないにしろ、環境との関わりから、巷間称揚されているトランスレーショナルリサーチにアプローチする手法もありましょう。

今回のシンポジウムでは、このような背景のもとで、既成概念にとらわれない研究を紹介していただける先生方のお話を伺うことにしました。改めて「環境」の概念を構築する契機にさせていただければ幸いです

第3回環境生理シンポジウム当番： 佐久間康夫
日本医科大学大学院医学研究科
システム生理学分野
113-8602 東京都文京区千駄木1
Phone 03-3824-6640/Fax 03-5685-3055
e-mail: ysakuma@nms.ac.jp
URL: <http://www.nms.ac.jp/nms/seiri1/>

環境生理シンポジウム

開催の趣旨

内分泌攪乱物質が環境ホルモンという名のもとで日常の用語になったり、地球温暖化が人類の生存をも左右する問題として議論されるなど、近年「環境」は人々の強い関心を集めている。ヒトをふくめた生物は環境の中に生きるものであり、その意味で生命現象の理解を目指す「生理学」はつねに環境からの影響を視野の中に含んでいる。しかし従来の生理学はどちらかといえば生体を環境から独立させて還元論的視点から解析する手法を多くとって来た。そこでは呼吸・循環・体液・体温...といった個々の調節系が別個に解析された。このようなアプローチは生体现象の理解を大きく進めたが、人類に突きつけられた諸問題を考える上で、生体を統合的に捉える視点が必要となっていることは間違いない。また分子生物学、情報科学を始めとする新たな研究手法の発達も従来の学問的枠組みを越えた研究を可能にしつつある。このような外的状況の変化にも関わらず、生理学研究者の交流はいまのところ従来の枠組みを中心としたものに留まっており、横断的な情報交換の場が少ないのが現状である。そこで「環境」に関わる種々の領域の研究者の新たなネットワークをつくり、さらには分子生物学から脳科学までを包括する新しいタイプの基礎科学を模索する第一歩として「環境生理シンポジウム」を企画し、2001年に第1回、2002年に第2回の会合を開催した。何れも200名を超える参加者を得て大いに盛り上がり、今回2003年で第3回を迎えることになった。

環境生理シンポジウム世話人会

本間研一（北海道大）
彼末一之（大阪大）
佐久間康夫（日本医大）
能勢博（信州大）
照井直人（筑波大）

2002年9月6日

第 80 回生理学会大会サテライトシンポジウム
第 3 回 環境生理シンポジウム

期日：2003 年 3 月 23 日（日）13：00-19:00

会場：九州大学医学部コラボステーション I

・分野別講演（各 20 分+討論 5 分）

1. 温熱・体力・自律神経 13:05-14:55 座長：照井直人（筑波大）
- 1-1 永島 計（阪大保健学科）「生存のための体温調節—摂食条件、時間により変化する体温調節機構」
 - 1-2 岡澤 慎（京大生体情報処理）「温度受容器のイオン機構・分子機構」
 - 1-3 井上芳光（大阪国際大スポーツ行動学科）「熱放散反応の性周期・性差」
 - 1-4 西田育弘（防衛医大生理）「血压制御、2つの意味と2つの方法」

休憩（10分）

2. ストレスとオレキシン 14:55-16:10 座長：前田正信（和歌山医大）
- 2-1 征矢英昭（筑波大運動生化学）「運動によるストレス反応とオレキシン」
 - 2-2 桑木共之（千葉大分子統合生理）「ストレス防衛反応の表出におけるオレキシン神経系の役割」
 - 2-3 上田陽一（産業医大生理）「新規摂食関連ペプチドとストレス反応」

休憩（10分）

3. 内分泌 16:20-17:35 座長：佐久間康夫（日本医大）
- 3-1 鯉淵典之（群大生理）「発達期中枢神経系における甲状腺ホルモン作用臨界期の形成機構」
 - 3-2 篠原一之（長崎大神経機能学）「女性の脳機能の卵巣ステロイドホルモンによる変化と匂い物質による治療」
 - 3-3 折笠千登世（日医大システム生理）「視索前野エストロゲン受容体 発現細胞による生殖内分泌調節」

休憩（10分）

・特別講演（各 30 分+討論 5 分）17:45-18:55

石田直理雄（産業技術総研生物時計グループ）「生物時計遺伝子の分子生理学」 座長：本間研一（北大）

田中 実（日本獣畜大動物生理制御）「プロラクチンの脳神経系への作用—母性行動とストレス耐性の誘導機構」 座長：粟生修司（九州工大）

Third Annual Symposium on Environmental Physiology

Satellite symposium of the 80th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan

March 23, 2003

13:00-19:00

Collaboration Station I, Kyushu University, Fukuoka

Session 1 Thermal Physiology, Physical Fitness & Autonomic Regulation

Chairperson: Naohito Terui (University of Tsukuba)

1-1) Kei Nagashima

Thermoregulation for survival: Its modulation during fasting.

Department of Physiology, School of Allied Health Sciences

Osaka University Faculty of Medicine

1-2) Makoto Okazawa, Shigeo Kobayashi

Ionic and Molecular Basis of Thermostats against Cold.

Biological Information, Intelligence Science and Technology

Kyoto University Graduate School of Information

1-3) Yoshimitsu Inoue

Effects of Menstrual Cycle and Sex on Human Heat Loss Responses.

Laboratory for Human Performance Research, Osaka International University

1-4) Yasuhiro Nishida

Blood Pressure Control: Master or Assistant ?

Department of Physiology, National Defense Medical College

2 Orexin in Stress Responses

Chairperson: Masanobu Maeda (Wakayama Medical University)

2-1) Hideaki Soya

Exercise-Induced Stress Response and Orexin.

Laboratory of Exercise Biochemistry, Institute of Health and Sports Sciences

University of Tsukuba

2-2) Tomoyuki Kuwaki

Role of Orexin in Defense Response.

Department of Molecular & Integrative Physiology

Chiba University Graduate School of Medicine

2-3) Yoichi Ueta

Novel Feeding-Related Peptides and Stress Responses.

Department of Physiology, School of Medicine

University of Occupational and Environmental Health

3 Neuroendocrine Correlates

Chairperson: Yasuo Sakuma (Nippon Medical School)

3-1) Noriyuki Koibuchi

Possible Mechanisms Generating Critical Period of Thyroid Hormone Action during Brain Development.

Department of Physiology, Gunma University School of Medicine

3-2) Kazuyuki Shinohara

Changes in Brain Function during Menstrual Period: Treatments by Pheromone and Fragrance.

Division of Neurobiology and Behavior, Department of Translational Medical Sciences
Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

3-3) Chitose Orikasa

Rat Preoptic Estrogen Receptor and Luteinizing Hormone Surge.

Department of Physiology, Nippon Medical School

4 State-of-the-Art Lectures

4-1) Norio Ishida

Chairperson: Ken-ichi Honma (Hokkaido University Graduate School)

Molecular Physiology of Circadian Clock Genes.

Clock Cell Biology Research Group (brf-ccb)

Institute for Biological Resources and Functions

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

4-2) Minoru Tanaka

Chairperson: Shuji Aou (Kyushu Institute of Technology)

Prolactin Actions on Brain: Mechanism of Induction of Maternal Behavior and Stress Tolerance.

Department of Animal Physiology

Nippon Veterinary and Animal Science University

生存のための体温調節 摂食条件、時間により変化する体温調節機構

永島 計
大阪大学医学部保健学科

体温調節機構は、核心部や体表にある温度センサーからの入力に対して各温度効果器が反応し、体温を調節するフィードバック機構と考えられている。我々の最近の研究で、食事量を制限すると恒温動物はフィードバック機構では説明し得ない体温調節反応を示すことを発見したのでこれを報告する。

実験1 ラット絶食時の体温リズム 23°C の環境温下にラットを自由摂食後3日間絶食させ、この間の体温、代謝率、体表温度を各々、テレメトリー、サーモグラフィーにて連続測定をおこなった。絶食期間中は明期（非活動期）初期に特異的な体温の低下がみられ、自由摂食時の 37.1 ± 0.1 より $36.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ に低下した。一方、暗期体温は 37.8°C で不変であった。熱産生に反映する代謝率は絶食により自由摂食時より著明に低下し（自由摂食時、暗期：明期 = 24.37 ± 1.06 ； 18.91 ± 0.64 ml/min·kg body wt 0.75；絶食時、 16.24 ± 0.69 ； 14.00 ± 0.41 ml/min·kg body wt 0.75）、またその暗・明期の振幅が減少した。絶食に伴う体表温の変化は尾部で明らかで、特に暗期には自由摂食の $30.7 \pm 0.1^\circ\text{C}$ から室温に近い $23.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ まで低下したが、明期においてはその変化は軽度であった（ 28.2 ± 0.1 より $25.2 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ）。以上の結果より、ラットは絶食により熱産生が低下するにも関わらず、尾部よりの熱放散を抑制することにより、活動期の体温を維持していることが推察される、一方、非活動期にはこのメカニズムは減弱し体温が低下すると考えられる。すなわち、ラットは絶食時には、体温の変動以外の因子により熱放散効果器である尾部血流を調節して体温調節を行い、またそのリズムを形成するメカニズムが働いていると考えられる。

実験2 実験1により絶食時の体温調節に生物時計あるいは光あるいは食餌などの外的な時間因子が大きく関係していることが予想された。実験は時計遺伝子の一つである *cry1/2*（時計遺伝子のフィードバックループの形成において重要な遺伝子）のノックアウトマウスに3日間の60%食餌制限を環境温26°C、明暗サイクルあるいは恒暗条件下に行い、正常マウスと比較した。正常マウスにおいては食餌制限1日目より、活動期終了直前より始まる体温の低下、代謝率の低下がみられ、食餌制限によりこれが増強した。*cry1/2* ノックアウトマウスでは、このような体温・代謝の低下が大きく減弱され、時計遺伝子が大きく絶食時の体温調節に関わっていることが示唆された。

皮膚を加温・冷却すると、温・冷受容体は温・冷線維上に求心性のインパルスを発する。それが脳に達すると、温・冷感覚や体温調節活動が生じる。そこで、これらの温・冷受容体は、暑さ・寒さに対する皮膚温のサーモスタットとして働くと私たちは提唱している。近年、カプサイシン受容体であり侵害性熱受容体でもある VR1 (TRPV1) のクローニングを皮切りに数個の温受容体が同定された。冷受容体についてもそのイオン機構が明らかになるとともに、遺伝子も同定された。これらはすべて Transient Receptor Potential (TRP) ファミリーに属す非選択的陽イオンチャンネルだった。本シンポジウムでは、私たちが記録した冷受容体のイオン機構を中心に述べ、温度受容体の最近の進歩を概観する。

冷線維の細胞体は、後根神経節 (Dorsal Root Ganglion, DRG) にある。培養した後根神経節には冷却で細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が上昇する冷受容細胞がある。そこで、我々は後根神経節から培養した冷受容細胞のイオン機構を Ca イメージングとパッチクランプ法で解析した

冷却は一部の小型の DRG ニューロンに $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とインパルスを誘発した。一方、メントールも一部の DRG ニューロンに $[Ca^{2+}]_i$ 上昇とインパルスを誘発した。冷却で興奮する細胞とメントールで興奮する細胞は大体一致した。

これらの冷受容細胞からの whole-cell patch-clamp 記録では、ステップ状の冷却は非選択的陽イオンチャンネルを活性化し脱分極性の受容体電位を誘発した。この脱分極が、短時間持続するインパルスの発生につながった。細胞体から切離した膜片からの単一チャンネル記録では、閾以下に温度が低下すると静止相から活動相に相転移する冷チャンネルが現れた。そこでこの冷チャンネルは、温度に直接応答するサーモスタットの分子であり、サーモスタットの動作原理は相転移と考えられる。

加えて、冷受容体 (CMR1/TRPM8) の遺伝子が同定された。この受容体はメントールでも冷却でも活性化する非選択的陽イオンチャンネルだった。CMR1 の閾温度は DRG ニューロンの冷細胞の閾温度と近似すること、発現する細胞が小型のニューロンであることなどから、CMR1 は私たちが記録した冷チャンネルに対応すると考えられる。他の温度受容チャンネルについても概観し、これらが基準温度がそれぞれ異なるサーモスタットだと述べる。

ヒトの形態および機能には、男女とも生殖に関わるホルモン分泌が活発になる思春期から性差が現れる。女性では、卵巣から分泌されるエストロゲンとプロゲステロンがほぼ 28 日周期で変動し、排卵を境とした卵胞期と黄体期の性周期がみられる。これらのホルモン変動は、安静時のみならず暑熱・運動刺激時の深部体温にも影響する。卵胞早期を基準にすると、深部体温はエストロゲンのみが増加する排卵前（卵胞後期）に 0.2~0.3 低くなり、排卵後のプロゲステロンとエストロゲンが増加する黄体期に 0.3~0.5 高くなる。このことと熱放散反応が深部体温に影響されることを考え合わせると、女性の熱放散特性を理解するためには、その性周期・性差を精査する必要性がある。

暑熱刺激時において、発汗量・皮膚血流量の経時的変化および発汗量・皮膚血流量 - 深部体温の対応関係における傾きには性周期の影響が観察されなかったものの、発汗開始および皮膚血管拡張の深部体温閾値は卵胞中期から黄体中期に高い方へシフトした。これらのシフトは、発汗および皮膚血管拡張システムに關与する中枢の調節が女性ホルモンに修飾されたためと推察される。また、女性は男性に比し発汗よりも皮膚血管拡張に依存した熱放散特性を有し、その傾向は特に大腿で顕著だった。大腿で観察された高い皮膚血流量は皮膚血管拡張感受性の亢進に、低い発汗量は低い単一汗腺あたりの汗出力に起因した。これらの性周期・性差の結果は、女性は男性より、特に卵胞期より黄体期に体温調節上不利になり、汗が唯一の熱放散手段となる環境温が皮膚温より高い条件では運動パフォーマンスの低下が予想される。

しかし、正常な性周期を有する女性でも持久的運動トレーニングを継続すると、女性ホルモン（特に排卵後のプロゲステロン）の分泌量が低下し、その変動幅も小さくなる。そのため、暑熱・運動刺激（常温環境下での 50%V02max 運動）時の発汗開始および皮膚血管拡張の深部体温閾値は、卵胞中期および黄体中期とも運動鍛錬者が非鍛錬者より低く、そのトレーニング差は運動鍛錬者に性周期の影響がほとんどみられなかったため、黄体期により顕著になった。さらに、非温熱性要因も關与する運動刺激時の発汗量および皮膚血流量 - 食道温の傾きにおいて、運動鍛錬者では暑熱刺激時と同様に有意な性周期差はみられなかったものの、非鍛錬者では黄体中期に卵胞中期より有意に低下したため、そのトレーニング差は黄体期により顕著になった。そのため、運動鍛錬者では高温環境下でも高い運動パフォーマンスを保持できるものと考えられる。女性の運動トレーニングによる熱放散反応の修飾機序については、性周期を考慮して実施した縦断的な運動トレーニング実験の結果を加えて考察する。

血圧制御、2つの意味と2つの方法

西田 育弘、堀内 城司、晝間 恵
防衛医科大学校生理学第二講座

血圧調節機構と言え、圧受容器反射を代表とする negative feedback による短期的調節と、高血圧形成のメカニズムに関わるであろう長期的調節の2つが直ちに思い浮かぶ。また、生理学テキストでは調節系の遠心路や効果器の種類によって、神経性、ホルモン性、腎臓性、心臓性、局所性などに分けて説明されている。いずれも判ったようで何となくわかりにくい。血圧調節の目的や意味を問わずして、動作メカニズムのみを説いているからであろう。このシンポジウムでは、これまでに得られた若干のデータから、血圧調節の意味とその機構を推論してみたいと思う。

短期的であれ長期的であれ、血圧によって駆動される高速な血流とそれに引っ張られて動く細胞外液の循環によって、身体の各種構成臓器を結びつけ一個体を形成していなければ、個体の生命は維持できない。このような個体の生命維持の目的からは、血流の駆動力である血圧はその変動を出来るだけ小さくした方が、血流を享受する各種臓器にとっては条件が一定となりそれぞれの臓器機能を果たすには都合がよいと考えられる。このためには、negative feedback 調節が最適であり、その動作メカニズムとしては圧受容器反射や内分泌性調節など数多く知られており、また、数多くの研究もなされ、短期的調節機構としてほぼ確立されている。このことから、一つの意味は血圧環境を一定にすることであり、その方法は homeostatic regulation であろう。

しかし、血圧変動を押さえる negative feedback だけでは、変化する体外環境への適応や緊急時の体内事情に対応しきれない場合もある。運動開始時に見られる運動昇圧反応 exercise pressor response や短距離スプリンターにみられる心拍数の予期変動などは一種の予測制御であり、今から身体に起こるであろう変化を自律系記憶や遺伝子に基づいて予測し、循環動態を予め準備するための調節と考えられている。この場合、血圧や心拍数は実際に身体が動く前から幾分高めにセットし、そのためには安静時に作動していた feedback 調節を抑制しているかのように見える。これは循環の第2の意味を含んでいる。その意味は体外環境への適応、或いは、体内の他機能をカバーする / 助けることであり、その方法は血圧や心拍数を積極的に変動させる homeodynamic regulation であろう。

長期の血圧制御は、神経やホルモンなどのメディアを介する調節より、血管や心臓、腎臓など効果器の特性を変化させることによる調節の方が主力のように思われる。これら効果器に re-modeling や urinary output curve resetting を生じせしめる本質的機構はまだ知られていない。実験データから某かを推論したい。

運動によるストレス反応とオレキシン

征矢 英昭
筑波大学体育科学系運動生化学

我々は運動効果の複雑性を包括的なモデルから明らかにするため、動物の最も基本的な運動である locomotion を利用した走運動ストレスモデルを作製し、それを用いて運動の視床下部や海馬に及ぼす効果を検討している。今回は、走運動時のストレス反応におけるオレキシンの関与を調べる仕事について紹介する。オレキシンは摂食促進だけでなく、循環反応、ストレス反応、睡眠-覚醒調節機構などを調節する効果が注目されている。運動も ACTH やカテコラミン分泌応答などストレス反応を惹起し、摂食行動を変化させ、睡眠-覚醒リズムを変えうることから、これらの効果にオレキシンの関与が示唆される。ここでは、1) オレキシンは運動時に活性化されるのか、2) その条件は何か？ 3) ストレス反応や睡眠-覚醒調節に関与しうるか、などについて検証した。ラットに走運動を行わせ、血中の乳酸や ACTH 分泌が惹起される乳酸性閾値 (LT, lactate threshold) を境に低強度(<LT)、高強度(>LT)で運動させ、その際のオレキシン神経の活動について主に RIA, 免疫組織化学ならびに in situ hybridization を用いて検討した。視床下部外側野のオレキシン含有神経において、>LT 運動でのみ c-Fos との二重標識細胞が増加し、さらに、prepro-orexin mRNA の発現量は運動後に有意に増加した。この時、血糖値やカテコラミンは増加し、ノルアドレナリン、セロトニンなどの代謝も海馬や皮質で増加した。視床下部室傍核の hnCRH ならびに prepro-AVP mRNA も増加した。したがって、走運動は低血糖時とは異なる機構でオレキシン神経を活性化すること。さらにこの機構が室傍核や青斑核を介したストレス反応や脳賦活に何らかの関与を果たす可能性が示唆された。この疑問に答えるために、逆行性蛍光トレーサーを室傍核や青斑核に注入して検討したところ、室傍核や青斑核に投射するオレキシン神経の一部が>LT 運動時にも興奮することが示唆された。現在、走運動時の ACTH 分泌応答へのオレキシンへの関与について検討している。さらに、>LT の運動が入眠潜時を早める効果がみられ、筋緊張維持にも働くことが示唆されており、運動による睡眠-覚醒調節や姿勢調節へのオレキシン効果もノックアウトマウスを用いて検討を始めている。今のところオレキシンは、運動ストレス時に必要な、脳の賦活や筋緊張維持などに関与する可能性が示唆されている。

ストレス防衛反応の表出におけるオレキシン神経系の役割

桑木 共之
千葉大分子統合生理

オレキシンは 1998 年に発見された神経ペプチドで、オレキシン神経の細胞体は視床下部外側野に限局して存在しており、その軸索は中枢神経系の広範囲にわたって投射している。そのうち、大脳・視床下部・橋への投射は摂食・睡眠調節に関与していることが明らかになっているが、延髄・脊髄への投射の生理学的意義は不明であった。一方、視床下部外側野の一部である脳弓周囲領域はオレキシン神経細胞体が密に存在する部位でもあるが、ストレスに際して「闘争または逃走」を準備する防衛反応を惹起する部位としても知られていた。そこで、防衛反応の表出におけるオレキシンの役割を、ノックアウトマウスを用いた解析により明らかにすることを目的とした。ウレタン麻醉下で野生型マウスの視床下部周辺を電気刺激し、血圧・心拍数・呼吸数の上昇を特徴とする防衛反応を惹起する部位を検索したところ、他の動物と同様に、脳弓周囲領域の刺激が最も効果的であることが確認された。次に、同部位に GABA の拮抗薬であるビククリンを微量注入した時の防衛反応の大きさを野生型マウスとオレキシンノックアウトマウスとで比較した。この実験では上述した循環・呼吸の指標の他に、脳波に占める速波の割合を覚醒度の指標として計測した。野生型マウスでは 0.1~1 mM (20nl) のビククリンで用量依存的に防衛反応が惹起されたが、ノックアウトマウスでは、低濃度のビククリンにほとんど反応せず、高濃度でも反応の持続が短かった。いずれの指標に関しても、ノックアウトマウスの反応は完全には消失しなかったが、統計学的に有意に減弱していた。さらにノックアウトマウスでは、刺激前の基礎血圧は有意な低値を示し、基礎呼吸数は有意な高値を認めた。基礎値の異常は無麻醉の動物でも確認され、ウレタンを投与すると血圧は両群で平行移動的に低下した。つまり、麻醉下の実験において観察された防衛反応の大きさの差異は、麻醉薬感受性の差に起因するものではなかったと考えられた。以上の結果から、オレキシンは、循環・呼吸・脳波という複数の出力系を一斉に変化させる反応である防衛反応を担う神経伝達物質の少なくとも一部として働いていると考えられた。さらに、内因性のオレキシンは血圧・呼吸の基礎値の決定にも関与していると結論された。

新規摂食関連ペプチドとストレス反応

上田 陽一
産業医科大学医学部第1生理学

Gタンパクに共役する受容体（G protein coupled receptors: GPCRs）のうち、リガンドの不明である受容体は”孤児（orphan）”の意味からオーファン受容体と呼ばれている。オーファン受容体の内因性リガンドを探索する方法は、従来の生理活性物質を単離・同定して構造決定を行い、後にその受容体を同定するに至る研究の流れとは逆なことから”reverse pharmacology”と呼ばれている。最近、この方法により新規リガンドが続々と発見されている。我々は、これらの新規リガンドのうち、摂食に関連するペプチドであるオレキシン-A, -B/ヒポクレチン-1, -2、ニューロメジン U およびガラニン様ペプチド（Galanin-like peptide: GALP）に着目し、生体のストレス反応との関連について研究している。

（1）オレキシン/ヒポクレチンを産生するニューロンは視床下部外側野とその周辺部に局限しており、その軸索は脳内に広く投射する。オレキシン受容体には2種類（OX1R, OX2R）あり、脳内の分布はかなり異なる。我々は、アフリカツメガエル卵母細胞にこれらの受容体を発現させ、Gタンパクとの共役を検討している。オレキシンをラット脳室内に投与すると強力に摂食を惹起する。オレキシンのラット脳室内投与により、視床下部 CRH ニューロンが活性化し、ACTH 分泌および血中コルチコステロン濃度が増加することを明らかにした。また、食餌制限、2-DG 脳室内投与によるグルコースの枯渇、寒冷ストレス、拘束ストレスおよびエンドトキシンショックによりラット視床下部オレキシン含有ニューロンが賦活することを Fos タンパクを指標にして明らかにした。（2）ニューロメジン U をラット脳室内に投与すると摂食が抑制される。一方では、視床下部 CRH ニューロンが活性化し、ACTH 分泌および血中コルチコステロン濃度が増加すると同時にオキシトシンニューロンも活性化し、血中オキシトシン濃度が増加することを見出した。（3）GALP は視床下部弓状核のニューロンで産生されており、このニューロンはレプチン受容体を発現していることが知られている。摂食との関連についての詳細は不明である。興味深いことに、脱水や2%高張食塩水飲水負荷による浸透圧ストレスによりラット下垂体後葉の支持細胞である pituicyte が GALP を産生するようになる。エンドトキシンショック時に pituicyte で GALP が発現することも見出した。

生体のストレス反応は、血圧上昇などの自律神経系を介した反応、副腎皮質ホルモンの増加などの内分泌反応および不安などの感情の変化や摂食障害といった行動変化として生じる。これらのストレス反応の脳内メディエーターとしての GPCR リガンドであるペプチドの生理的役割を今後明らかにしていきたい。

発達期中枢神経系における甲状腺ホルモン作用臨界期の形成機構

鯉淵 典之

群馬大学医学部生理学第一講座、CREST (科学技術振興事業団)

甲状腺ホルモンは中枢神経系の正常な発達のために必須の物質である。クレチン症で知られるように、周産期における甲状腺機能低下は、なるべく早期に甲状腺ホルモン補充を開始しない限り非可逆的な発達障害を脳に残す事になる。その一方で、身体の成長障害や骨形成不全は発達期以降に甲状腺ホルモン補充を行ってもある程度の補正が可能である。この事からも分かるように、甲状腺ホルモンの中枢神経系に及ぼす作用には明らかな臨界期が存在する。しかし、臨界期形成のメカニズムはよく分かっていない。われわれはメカニズムの解析のため、げっ歯類小脳を中心とする実験系を用いて研究を行なっている。げっ歯類小脳の発達は出生後に生ずるため、甲状腺機能を細かく調節しながら実験をすすめる事が可能だからである。生後発達期のげっ歯類小脳において、甲状腺ホルモンによる遺伝子発現の変化を調べたところ、neurotrophin-3、ROR 等小脳発達に重要な遺伝子の発現が甲状腺機能に応じて変化している事が分かった。しかし、臨界期(生後約2週間)を超えると甲状腺機能に関わらず発現は一定となり、これらの遺伝子の甲状腺ホルモン感受性が臨界期のみで生じている事が分かった。感受性変化の原因として、甲状腺ホルモン受容体(TR)を介するシグナル伝達機構が何らかの形で修飾されている可能性があげられる。そこでTRを介する転写共役因子のうちp160 familyに属するcoactivatorおよびcorepressorの発現を調べてみたところ、mRNAレベルでは臨界期の前後で大きな違いは見られなかった。蛋白レベルではSRC-1が最も高レベルでプルキンエ細胞と顆粒細胞に発現していた。現在、臨界期の前後での共役因子蛋白の局在と量的変化を調べている。並行してTR作用を修飾する新たな転写共役因子の検索をFar Western解析を用いて行ったところ、約90kDaの小脳特異的なTR結合蛋白が同定された。さらにYearst two hybrid法を用い、この蛋白の同定を進めている。また、甲状腺ホルモン感受性遺伝子の更なるスクリーニングのため、DNAマイクロアレイによる解析を青山学院大学の田代朋子グループと共同研究で行っており、これらの結果の一部を紹介する。

一方、臨界期における環境因子による甲状腺ホルモン作用のかく乱も中枢神経系発達に大きな影響を残す可能性が考えられる。我々はin vitro実験系を用いて甲状腺ホルモン受容体を介する内分泌かく乱物質の影響を解析している。最近、新たな知見を得られたので併せて報告したい。

女性の脳機能の卵巣ステロイドホルモンによる変化と匂い物質による治療

篠原 一之

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
病態解析・制御学講座 神経機能学分野

近代医学は、「器質的な病態異常で説明できない」自覚症状に対しては、不定愁訴として我慢を強いてきた。しかし、最近、女性特有の不定愁訴は卵巣ステロイドホルモンの脳への作用として説明できるようになり、治療の対象として注目されてきている。不定愁訴は以下の時期特異性がある。

1. 月経前：排卵後、黄体から分泌されるプロゲステロンレベルは徐々に高まるが、妊娠しないと、そのレベルは次第に低下し、月経が始まる。この時期に（月経開始 7 日前 月経開始）、女性の 20 5 等の不定愁訴が生じる（月経前緊張症（PMS））。

2. 出産後：排卵後受胎すると、プロゲステロン（盤）される。妊娠の間高値を示したプロゲステロンレベルは、分娩後数時間以内に急激に下降する。出産後 3 5 日目から 2 週間、約 80% の女性は PMS 様不定愁訴を示す（マタニティーブルース）。

3. 更年期：卵巣機能の老化に伴う卵巣ステロイドホルモンレベルの低下により閉経期を迎える。この閉経期をはさんだ前後約 5 年間（更年期）に、60 70% の女性が「のぼせ」、「ほてり」等に加え、PMS 様不定愁訴が出現する（更年期障害）。

以上のように、女性特有不定愁訴が見られる三つの時期には、プロゲステロン下降という特徴が存在する。そこで、健常女性を対象に卵胞期、排卵期（エストロゲン高値期）、黄体前期（プロゲステロン上昇期）、黄体後期（プロゲステロン下降期）において、脳機能（うつ病尺度、不安尺度、覚醒レベル、性的覚醒度、食欲、睡眠、痛覚閾値、作業能率）を調べたところ、不安尺度以外は、月経周期に伴って変動していた。黄体前期には、幸福感が高く、性的覚醒度が高く、食欲も上昇する、黄体後期に抑うつ症状が強く、性的覚醒度が低く、食欲も低下するという結果を得た。逆に、覚醒レベルは黄体前期に低く、黄体後期に高いという結果も得た。一方、痛覚閾値や作業能率は排卵期に最も高かった。次に、更年期障害の患者に低用量エストロジオール貼付剤を 1 ヶ月以上投与したところ、身体症状は改善したが、精神症状改善しなかった。かくて、不定愁訴の中には、プロゲステロン依存性のものとエストロゲン依存性のものがあることがわかった。

最近、私達は、ヒトにもフェロモンが存在し、それが脳機能（特に神経内分泌機構）を変えることを明らかにした。そこで、女性特有の不定愁訴に対して、匂い物質を用いた治療法を考え、動物モデルを用いて匂い物質の抑うつ、不安、覚醒度、痛覚、性行動に対する効果を調べた。その結果、抗うつ効果、鎮痛効果、性的覚醒度を上げる物質をいくつか見出したので、当日は、匂い物質の作用機序、女性特有不定愁訴への治療への可能性について述べたい。

ヒトを含む哺乳類の雌動物では、黄体形成ホルモン(LH)のサージ様分泌によって排卵がおこる。LHのサージ様分泌は雌に固有で、この現象が雄にみられないのは脳の性分化の結果と考える。エストロゲンは個体発生の途上で脳の性分化に関与し、性的に成熟した動物では性腺刺激ホルモンの正負のフィードバック調節を行う。ラットでは、脳の性分化は、胎生期及び周産期にかけて精巣から分泌されるテストステロンがアロマトラーゼによってエストラジオールに変換され、エストロゲン受容体(ER)を介して起こる。ERには、現在 α 、 β 二種が明らかになっている。最近クローニングされたER β の生理機能には不明の点が多く、脳内の発現様式も不明であった。そこで、ラット前脳におけるER β mRNA及びタンパクの発現を非アイソトープラベル法であるジゴキキゲンin situ hybridization組織化学や免疫組織化学によって可視化し、出生後の発達に伴う変化を検討し、ER α の発現と比較した。ER β mRNAは、視索前野脳室周囲核、室傍核、分界条床核、視索上核、腹内側核外側部、内側扁桃体に検出された。これらの部位のうち、室傍核および視索上核では、ER β mRNAのみが検出され、ER α は検出されなかったが、他の領域では、ER α の分布と一部重複していた。また、視索前野脳室周囲核と腹内側核外側部では、ER α mRNAの発現に性差が認められた。これらの結果は抗体を用いた免疫組織化学においても確かめられた。

視索前野脳室周囲核(AVPV)について行った詳細な解析の結果を報告する。雌ラットではER β mRNA、タンパクの何れもAVPVの第三脳室上衣層の直下に密に集積する神経細胞に発現していたが、雄ではこの集積像が認められないこと、この性差が新生仔期のエストロゲン作用の有無で決まることが判明した。この性差は幼若期から性成熟に至るまで維持されていた。ER β mRNAとER α タンパクの同一切片上での可視化により、ER α mRNA陽性細胞の84%にER α タンパクの共存を認めた。さらに、雌ではER β mRNA陽性細胞の18%にチロシン水酸化酵素(TH)タンパクの共存を認め、ER β を発現するニューロンの少なくとも一部はドーパミン作動性であると考えられる。雄ではER β とTHの分布に重複が見られなかった。性的に成熟した8-9週令雌を用いて、AVPV近傍の第三脳室内にER β アンチセンスオリゴヌクレオチドを14日間浸透圧ポンプにより連続的に投与したところ、ER β タンパク免疫陽性細胞数はスクランブルオリゴヌクレオチド投与群に比して50%減少し、膣垢周期で連続発情が成立した。以上の結果から、AVPVに発現するER β が性腺刺激ホルモンの排卵時大量分泌に関与する可能性が示唆された。

時計がなく、外界と遮断された部屋で過ごしても、ヒトは覚醒と睡眠をほぼ 24 時間周期で繰り返します。体温や血圧は午後 4 時頃に最も高くなるし、脳卒中は朝に多いというように、病気の起こりやすい時刻も生物時計に支配されることが知られています。このような約 24 時間を周期とする生命活動の周期的変化のリズムをサーカディアン（概日）リズムと呼びます。生物は、このリズムを司る“時計”を体内に持っているのです。

仮に、時計のない、しかも真っ暗な部屋の中で生活し始めたとします。すると次第に時間の感覚が長くなり、やがてほぼ 25 時間周期に落ち着きます。つまり私たちの体内時計でも外界の昼夜同様、昼と夜は自転しているのです。これをフリーラン（自由継続）と呼び、ほぼヒトは 25 時間、ラットは 24.5、ショウジョウバエは 23.5 時間の周期を持ちます。そして、すべての生物はこのような固有の周期を日々地球が示す正確な一日の環境サイクルに同調（エントレイメント）させています。

今回のシンポジウムでは、このような生物時計がどのような分子機構によって時間情報を作り出しているかについて、ショウジョウバエからヒトまで時計遺伝子の最近の知見を交えて紹介します。さらに、分子機構としての時計遺伝子産物の核内移行機構の重要性 1)、交尾行動と時計の関係 2)、新しい時計関連遺伝子の発見 3) 等についての最新の我々の研究室からのデータについても述べます。

- 1) Miyazaki K, Mesaki M, Ishida N: Nuclear entry mechanism of rat PER2 (rPER2): role of rPER2 in nuclear localization of CRY protein. *Mol Cell Biol* 2001, **21**: 6651-6659.
- 2) Sakai T, Ishida N: Circadian rhythms of female mating activity governed by clock genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, **98**: 9221-9225.
- 3) Inoue, S.B., Shimoda, M., Nishinokubi, I., Siomi, M., Okamura, M., Nakamura, A., Kobayashi, S., Ishida, N., Siomi, H.: A Role for the *Drosophila* fragile X-related gene in circadian output. *Current Biology* 2002, **12**: 1331-1335

プロラクチンの脳神経系への作用 母性行動とストレス耐性の誘導機構

田中 実
日本獣医畜産大学動物生理制御学教室

プロラクチンは主に脳下垂体で産生、分泌されるペプチドホルモンであり、乳腺発育の促進、浸透圧調節、免疫機能制御、母性行動誘導、ストレス応答等、種々の動物種で多様な生理作用にかかわっていることが知られている。ここでは、プロラクチンの脳神経系への作用としての母性行動およびストレス耐性の誘導機構についての知見を紹介する。

プロラクチンの多様な生理作用は広範な組織で発現している受容体を介して発揮される。哺乳類のプロラクチン受容体には細胞内領域の長い Long form と短い Short form が存在し、乳腺等におけるプロラクチンの情報伝達は主に Long form を介していることが知られている。ラット脳においては妊娠後期から long form 受容体の発現量が増加し、以後授乳期間中高レベルに維持されている。授乳中に乳仔を離してしまうと発現レベルは速やかに低下し、乳仔を戻すと再び発現量が増加する。雄においても乳仔の接触刺激を繰り返すと母性行動様の行動が誘導されるが、この場合も脳において Long form 受容体の発現が増加する。このように脳における Long form 受容体の発現は母性行動と密接に関連している。また、ラットに水浸拘束ストレスを負荷すると数時間後にストレス性胃潰瘍を発症する。ストレス負荷直後には血中プロラクチンレベルが一過性に上昇し、その後脳における Long form 受容体の発現が特に脈絡叢およびストレス中枢である室傍核において顕著に増加する。ストレス負荷前にプロラクチンを脳室内投与すると胃潰瘍の発症度は大きく軽減される。これらの知見はプロラクチンが中枢に作用し、母性行動の誘導およびストレス耐性の増強に働くことを支持している。しかしながら最近我々のグループが作成したプロラクチンノックアウトマウスにおいて、雌が不妊であるものの仮仔に対する母性行動を観察すると、予想に反し正常マウスと同等の母性行動が認められた。一方、他のグループが作製したプロラクチン受容体のノックアウトマウスは母性行動を欠如している。母性行動における両ノックアウトマウスの矛盾した結果は、プロラクチンノックアウトマウスは胎児期に母親（遺伝子型はヘテロで表現型は正常）由来のプロラクチンおよび胎盤性ラクトゲンの作用を受け、また、乳児期には母乳中に高濃度に分泌されているプロラクチンの作用を受け得るのに対し、プロラクチン受容体ノックアウトマウスはこれらの作用を全く受けないことに起因すると推測される。すなわち、プロラクチンが胎児期あるいは乳児期の脳に作用することにより将来の母性行動やストレス耐性の発現に必須の神経回路が形成され、成体におけるプロラクチンはその増強に働くと考えられる。