

学 位 論 文 題 名

ラットにおける食餌性コルチコステロン概日リズムの中枢機構：

In vivo microdialysis 法を用いた室旁核ノルアドレナリン分泌動態の解析

学位論文内容の要旨

<緒言> 多くの生理機能には24時間リズム（概日リズム）が認められ、このリズムは生体内に存在するいわゆる生物時計（Biological clock）によって支配され、その中枢は、視床下部の視交叉上核に存在する。一方、視交叉上核に依存しない概日リズムも報告されており、これらのリズムは明暗サイクル以外の同調因子に同調する。

視交叉上核に依存しないリズムの代表的なものに、周期的制限給餌で出現する概日リズム（給餌性リズム）がある。ラットの給餌を一日の一定時刻に制限すると（周期的制限給餌）、自発行動や血漿コルチコステロンの24時間変動パターンが変化し、給餌の1～2時間前より自発行動量や血漿コルチコステロンレベルが増加する（給餌前ピーク）。給餌性ピークの中枢機構は不明であるが、血漿コルチコステロンの給餌性リズムの発現に中枢ノルアドレナリンニューロンが関与し、CRHニューロンの細胞体が存在する室旁核において脳幹からでたノルアドレナリンがCRH分泌を刺激し給餌前コルチコステロンピークを形成することが示唆されている。

本研究の目的は、ラット室旁核におけるノルアドレナリン分泌をIn vivo microdialysis法を用いて、直接測定することにより上述の仮説を検討するとともに、給餌性リズムの発現におけるノルアドレナリンニューロンの役割を明らかにすることである。

＜実験方法と結果＞ 実験にはWistar系雄ラットを使用した。室温 $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60\pm 5\%$ および6時から18時まで明の明暗サイクル下で繁殖飼育した。実験開始時のラットはおよそ12週齢で、体重は450g-550gのものを使用した。

実験1) 給餌性行動リズムの発現にも中枢カテコールアミンが関与するか否かを6-OHDAをもちいて検討した。周期的制限給餌を一定期間行った後、一度自由摂食に戻しその後完全絶食した時(周期的制限給餌-自由摂食・絶食パラダイム)のリズム発現を指標とした。1日のうち10~12時までしか餌を与えないという3週間の周期的制限給餌に引き続き10日間自由摂食に戻した後、ラット側脳室に6-OHDAあるいは溶媒(0.1%アスコルビン酸を含む生食)を注入した。術後5日間自由摂食で飼育した後、ラットを絶食にした。対照群では絶食下では自由摂食時に比べ給餌性行動ピークが有意に増加したが、6-OHDAを投与した群では、自由摂食時と絶食時では行動量に有意差はなく、給餌性行動ピークは認められなかった。また、同じ実験デザインで、絶食時の血漿コルチコステロンの給餌性ピークも6-OHDAの投与で消失した。

実験2) In vivo microdialysis法によってラット室旁核細胞間隙のノルアドレナリンがカテコールアミン神経終末からのノルアドレナリン分泌を反映していることを検討した。カテコールアミン放出作用があるといわれているストレス負荷や薬物(メトアンフェタミン)投与後の室旁核ノルアドレナリンを4~7時間にわたり測定した。エーテル麻酔及び全身拘束負荷やメトアンフェタミン投与後の室旁核ノルアドレナリンは、有意な上昇を示した。また6-OHDAで室旁核カテコールアミンニューロンを破壊すると、メトアンフェタ

ミン投与による室旁核ノルアドレナリンの上昇は有意に抑制された。
実験3) *In vivo microdialysis*法を用いてラット室旁核ノルアドレナリンに24時間リズムがあるかどうかを、自由摂食下で検討した。試量のサンプリングは2時間毎に52時間連続して行った。暗期の室旁核ノルアドレナリンは明期に比べて2～3倍上昇し顕著な24時間変動を示した。

実験4) 周期的制限給餌下における室旁核ノルアドレナリンを*In vivo microdialysis*法を用いて測定した。10時から12時までの周期的制限給餌を2週間行った後、室旁核の直上にガイドカニューレを挿入して、さらに制限給餌を1週間続けた。室旁核ノルアドレナリンの測定は、2時間間隔で24時間行った。対照群として、自由摂食ラットの室旁核ノルアドレナリン24時間変動を用いた。その結果、周期的制限給餌群の室旁核ノルアドレナリンは暗期前半では自由摂食群より有意に低い、暗期後半では自由摂食群と差はなかった。一方、給餌前の値は、周期的制限給餌群で有意に高かった。

さらに周期的制限給餌-自由摂食・絶食パラダイムにおける絶食時の室旁核ノルアドレナリンを測定した。10時から12時までの周期的制限給餌を2週間行った後、室旁核の直上にガイドカニューレを挿入して、1週間自由摂食にもどした。その後3日間絶食にして、絶食3日目の室旁核ノルアドレナリンを*In vivo microdialysis*法で2時間毎に24時間測定した。対照群には、自由摂食ラットを3日間絶食にしたものを用いた。その結果、給餌直前、8時-10時の室旁核ノルアドレナリンが実験群で有意に高く、また、12時から14時の給餌終了直後の値も実験群で有意に上昇していた。一方、暗期の20時から22時は実験群で室旁核ノルアドレナリンが有意に低下していた。

＜考察＞本研究によって室旁核に投射するカテコールアミンニューロンは給餌性コルチコステロンピークだけでなく給餌性輪回し行動ピークの発現にも関与していることが明らかになった。さらに給餌性コルチコステロンあるいは輪回し行動ピークと時間的に一致して室旁核におけるノルアドレナリン分泌が上昇することが示された。これらの結果から、給餌性リズム振動体からの情報はノルアドレナリンニューロンを介して室旁核に伝達され、一方では室傍核 C R H を介して血漿コルチコステロンを上昇させ、他方では輪回し行動を亢進させる機序が示唆された。

＜結語＞1) 室旁核にカテコールアミン枯渇剤である 6-hydroxy-dopamine (6-OHDA) を投与すると、周期的制限給餌-自由摂食・絶食パラダイムにおける絶食時に出現する給餌性輪回し行動リズムおよび給餌性コルチコステロンリズムが抑制された。一方、明暗サイクルに同調する輪回し行動リズムおよびコルチコステロンリズムは影響されなかった。2) *In vivo* microdialysis法によって経時的に測定した室旁核ノルアドレナリンは室旁核におけるノルアドレナリン分泌を反映していることが、ストレス負荷実験、メトアンフェタミン投与実験、6-OHDA投与実験で明らかにされた。3) 室旁核におけるノルアドレナリン分泌は、自由摂食下では暗期に上昇する24時間リズムを示した。4) 室旁核におけるノルアドレナリン分泌は、周期的制限給餌下では給餌直前で上昇した。この給餌前上昇は、血漿コルチコステロン、輪まわし行動の給餌前上昇と時間的に一致した。また周期的制限給餌-自由摂食・絶食パラダイムにおける絶食時でも、以前の給餌時に一致して室旁核ノルアドレナリンの上昇が認められた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 口 春 久
副 査 教 授 亀 田 和 夫
副 査 教 授 松 本 章
副 査 教 授 本 間 研 一 (医学部)

学 位 論 文 題 名

ラットにおける食餌性コルチコステロン概日リズムの中枢機構：
In vivo microdialysis法を用いた室旁核ノルアドレナリン分泌
動態の解析

審査は主査および副査の口頭試問により、研究の目的ならびに、内容について詳細に実施された。本研究はラットに周期的制限給餌を行った時に出現する副腎皮質ホルモン（血漿コルチコステロン）の給餌性リズムの中枢機構を明らかにするために、コルチコステロンの上位のホルモンであるコルチコトロピン放出ホルモンの分泌ニューロンが存在する視床下部室旁核において、ノルアドレナリンの分泌動態をIn vivo microdialysis法をもちいて経時的に測定し、解析することを目的とした。このことは、食餌性ホルモン分泌の中枢機構の解明に重要な知見をもたらすのと同時に、高等生物に共通して認められる摂食の機序を明らかにする上でも重要な意義を有する。

実験にはWistar系雄ラットを使用した。室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ および6時から18時まで明の明暗サイクル下で繁殖飼育した。実験開始時のラットはおよそ12週齢で、体重は450g-550gのものを使用した。ラット行動量の測定は回転式運動測定器を用いて輪回し行動量を15分毎に測定した。採血は、尾先端連続採血法または断頭法により行い、Murphyの蛋白競合結合法により血漿コルチコステロンを測

定した。In vivo microdialysis法は、室旁核に長さ1mmの透析膜プローベを挿入し灌流を行い、2時間間隔で採集し、サンプル中のノルアドレナリンを高速液体クロマトグラフィーにて測定した。

実験を要約すると次のようであった。

給餌性行動リズムの発現に中枢カテコールアミンが関与するか否かをカテコールアミン枯渇剤である6-hydroxydopamine (6-OHDA)を用いて検討した。周期的制限給餌を一定期間行った後、一度自由摂食に戻しその後完全絶食した時（周期的制限給餌－自由摂食・絶食パラダイム）のリズム発現を指標とした。1日のうち10～14時までしか餌を与えないという3週間の周期的制限給餌に引き続き10日間自由摂食に戻した後、ラット側脳室に6-OHDAあるいは溶媒（0.1%アスコルビン酸を含む生食）を注入した。術後5日間自由摂食で飼育した後、ラットを絶食にした。対照群では絶食下では自由摂食時に比べ給餌性行動ピークが有意に増加したが、6-OHDAを投与した群では、自由摂食時と絶食時では行動量に有意差はなく、給餌性行動ピークは認められなかった。また、同じ実験デザインで、絶食時の血漿コルチコステロンの給餌性ピークも6-OHDAの投与で消失した。以上のことから給餌性輪回し行動リズムおよび給餌性コルチコステロンリズムの発現には脳内カテコールアミンが関与していることが考えられた。

次に、周期的制限給餌下における室旁核ノルアドレナリンをIn vivo microdialysis法を用いて測定した。10時から12時までの周期的制限給餌を3週間行い、室旁核ノルアドレナリンを測定した。対照群として、自由摂食ラットの室旁核ノルアドレナリン24時間変動を用いた。その結果、室旁核におけるノルアドレナリン分泌は、周期的制限給餌下では給餌直前で上昇した。この給餌前上昇は、血漿コルチコステロン、輪回し行動の給餌前上昇と時間的に一致した。また周期的制限給餌－自由摂食・絶食パラダイムにおける絶食時でも、以前の給餌時に一致して室旁核ノルアドレナリンの上昇が認められた。

以上の結果より室旁核ノルアドレナリンは、給餌性コルチコステロンおよび輪回し行動ピークの発現に促進的に働いていることが示唆された。

周期的制限給餌下の室旁核ノルアドレナリンの分泌動態を直接測定し、血漿コルチコステロン変動との関係を明らかにした論文は文献上認められない。また、*In vivo microdialysis*法という新手法を用いて実験的に実施が困難とされていた神経核レベルにおける神経伝達物質の測定に成功したことは意義深い。

以上のような学位申請者からの説明に基づいて、主査および副査から本論文の内容について詳細な説明が求められ、次いで本論文に関連して質問されたが、申請者はそれらに対しては正しく理解した上で明快な解答を述べた。また、将来における本研究の発展の可能性についても明確な展望を述べた。

本研究は、歯学医学の発展に十分貢献するものであり、審査の結果、審査担当者全員によって、本研究の論文は博士(歯学)の学位授与に値するものと認められた。