

学 位 論 文 題 名

松果体メラトニンリズムの光調節機構

— in vivo microdialysis 法を用いた実験的研究 —

学位論文内容の要旨

I 緒 言

松果体から分泌されるメラトニンの血中濃度には顕著なサーカディアンリズムが認められ、生物時計の有力な指標の1つになっている。松果体におけるメラトニン合成は光の二重支配を受け、光を介してリズムの位相が調節され、また分泌亢進時には光により速やかに抑制される。光によるメラトニン合成の調節は、網膜、視交叉上核、頸部交感神経節を介して行われるが、リズム調節と光抑制が同じ機構で行われているかどうかは不明である。本研究の目的は、ラットを用いてメラトニン合成に対する光の二重効果を同時に測定することにより、背後にある神経機構の相違を明らかにすることである。まずメラトニン合成の光抑制反応における、波長特性と時刻依存性を検討し、行動リズムを指標とした生物時計の位相反応と比較した。次に松果体マイクロダイアリシス法により、細胞外液中メラトニンを測定し、同一個体で光の二重効果を解析した。更に、松果体や生物時計に対し光と類似した効果を持つとされるコリン作動薬、カルバコールを視交叉上核内に投与し、メラトニン抑制反応とリズム位相反応を同時に測定した。

II 実験材料と方法

実験1：実験には明暗サイクル(6-18時明)下で飼育した Wistar 系ラットを用いた。24時、あるいは4時に 1.5×10^{13} photon/cm²/sec の緑色(520nm)あるいは赤色(660nm)の単色光を3分間ラットに照射した後、経時的に断頭屠殺し、松果体メラトニン含量と血漿メラトニン濃度をRIA法にて測定した。また、連続暗でフリーランしている行動リズムの活動期開始5時間後(CT17)あるいは10時間後(CT22)に、前述の二種の単色光を照射し、光照射前後各々3週間の行動リズムの周期と位相を解析した。

実験2：松果体マイクロダイアリシス法により、逆転明暗サイクル(19-7時明)下で飼育したラットの松果体細胞外液中メラトニンを、無麻酔無拘束下で30分毎連続4日間測定した。1日

目は明暗サイクル下で、2日目以降は連続暗の下で透析を行い、2日目のCT17,あるいはCT22に200Luxの白色光を3分間照射した。

実験3:逆転明暗サイクル下で飼育したラットを用い、4日間の松果体マイクロダイアリシスを行った。透析2日目に眼球摘出によりラットを盲目とし、カルバコール(1 n mole/0.5 μ PBS)をCT17,あるいはCT22に一侧の視交叉上核内に注入した。

III 結 果

同一光子量の単色光照射による松果体、及び血漿メラトニンの抑制は、24時では赤色光よりも緑色光で大であったが、4時では両波長ではほぼ等しかった。また、24時と4時との比較では、24時の赤色光照射では、松果体メラトニンは一過性の低下を示したのみで、血漿メラトニンは有意の低下を示さなかったのに対し、4時の照射では松果体、血漿メラトニンとも速やかに抑制された。緑色光照射でも、4時のメラトニン抑制反応は、24時よりも早く生じた。一方、フリーラン行動リズムのCT17あるいはCT22における同一光子量の単色光照射は、緑色光、赤色光共に行動リズムに有意の位相反応を起こしたが、反応量は赤色光より緑色光で大であった。

マイクロダイアリシスで測定した松果体細胞外液中メラトニンリズムは、個体内では4日間安定した一定のパターンを示したが、個体間では位相や形に違いがみられた。細胞外液中メラトニンは、CT17あるいはCT22の白色光照射により有意な低下を示した。CT17の光照射によるメラトニンの低下は90分後には回復したが、CT22の光照射では、照射当日には回復しなかった。一方、細胞外液中、メラトニンリズム位相は、CT17の光照射で照射翌日に有意な後退を示し、CT22の照射では有意に前進した。

カルバコールの視交叉上核内注入は、松果体細胞外液中メラトニンに対し、抑制反応、リズム位相反応のどちらも生じさせなかった。

IV 考 察

ラット松果体及び血漿メラトニンの光抑制反応及び行動リズムの位相反応は、緑色域の光で効果が大きく、従来の報告と一致した。ラット網膜にはロドプシンが存在し、その光吸収スペクトルの極大は500nm付近にあるので、光による松果体メラトニンの抑制反応及び生物時計の位相反応は、共にロドプシンを介していると考えられる。一方、同一光子量の光を照射したにも関わらず、メラトニン光抑制反応には時刻による違いが見られた。この時刻依存性の原因としては、網膜における光感受性リズム、松果体におけるレセプター機能のリズムが想定される。

行動リズム位相反応は、CT22の赤色光照射で緑色光より有意に小さかったが、同一位相である4時のメラトニン抑制反応には差がなかった。従って、メラトニン光抑制はメラトニンリズムの位相反応よりも閾値が低いと考えられ、網膜からの光伝達経路に差違のあることが示唆された。

松果体細胞外液中、メラトニンリズムにも、光照射により位相反応が見られたが、行動リズムでは数日を要したのに対し、メラトニンリズムでは照射の翌日には反応が完了した。また細胞外液中、メラトニンの光抑制にも時刻依存性が認められた。この結果は、マイクロダイアリシス法を用いることにより、従来の断頭法では検出できなかった光によるメラトニン合成の二重支配が、同一個体で解析可能なこと、また、松果体メラトニンが生物時計のより直接的な表現系であることを示している。

カルバコールは *in vivo* では唯一、サーカディアンリズムに対し、光に類似した効果が報告されている物質で、光情報の伝達にはアセチルコリンの関与が示唆されていた。しかし従来の研究では、行動リズムが解析されており、メラトニンリズムを指標に解析した本研究では、カルバコールの光類似効果は認められなかった。アセチルコリンが網膜視床下部路の伝達物質である可能性は低いと考えられる。

V 結 語

ラットを用い、光の松果体メラトニン抑制反応と、生物時計を介するリズム位相反応とを比較し、以下の結果を得た。

1. 光による松果体メラトニン合成の抑制は波長と照射時刻に依存し、緑色光が赤色光よりも抑制効果が大きく、同一波長では4時の方が24時よりも効果大きい。

2. 4時の光照射で、メラトニン光抑制反応と、行動リズムの位相反応には乖離が認められた。網膜視床下部路は機能的に異なる機構を含む可能性がある。

3. 同一個体から連続測定した松果体細胞外液中メラトニンは著明なサーカディアンリズムを示し、光抑制反応とリズム位相反応を同時に示した。

4. 松果体細胞外液中メラトニンリズムの位相反応は光照射の翌日に完了した。

5. コリン作動薬カルバコールの視交叉上核内投与は松果体細胞外液中メラトニンに変化を与えなかった。アセチルコリンが生物時計や松果体への光情報の伝達に関与している可能性は低い。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 研 一
副 査 教 授 加 藤 正 道
副 査 教 授 阿 岸 祐 幸

松果体から分泌されるメラトニンの血中濃度には暗期に高値をとる顕著なサーカディアンリズムが認められ、生物時計の有力な指標の1つとなっている。松果体におけるメラトニン合成は光の二重支配、すなわち生物時計を介したメラトニンリズム位相の調節と光によるメラトニン合成の抑制を受けているが、その神経機構に関しては不明な点が多い。本研究では、ラットを用いてメラトニン合成に対する光の二重効果を解析し、背後にある神経機構を検討した。

まず光の波長および照射時刻により反応の差異を検討する目的で波長520nmの緑色光と波長660nmの赤色光を暗期の24時と4時に3分間照射し、照射前後の松果体メラトニン含量および血漿メラトニン濃度をradioimmunoassayにて測定した。また同じ単色光を用いて、恒常暗でフリーランしている自発行動リズムの位相反応を光パルス法にて測定し、生物時計を介する光の作用を解析した。その結果、メラトニン光抑制反応には波長および時刻依存性のあることが示され、赤色光照射より緑色光照射で、また24時より4時の光照射でより大きな反応が認められた。さらに、赤色光照射では、メラトニン抑制反応とリズム位相反応には乖離が認められ、2つの反応の光刺激伝達機構に差異のあることが示された。

メラトニン合成に対する光の効果をさらに詳しく解析する目的で *in vivo* microdialysis 法（体内微量透析法）を松果体に適用し、同一個体から松果体細胞外液中メラトニンを30分間隔で4日間にわたって測定した。その結果、メラトニン光抑制反応とメラトニンリズム位相反応を同時に測定することができ、個体レベルでの解析が可能となった。また従来、数日の移行期を経て完了すると考えられていたリズム位相反応が、メラトニンリズムでは光照射の翌日にはすでに完了していることがわかり、メラトニンリズムが生物時計のより直接的な指標であることが示された。さらに、松果体メラトニン合成や生物時計に光と類似した作用を持つとされてきたコリン作動薬、カルバコールを生物時計の局在部位であり、網膜から松果体に至る経路に存在する視交叉上核内に投与して、メラトニン光抑制反応とリズム位相反応を同時に測定したが、カルバコールはいずれの反応も示さず、コリン作動性ニューロンがこれらの光反応に関与している可能性は少ないと考えられた。また長期間の連続照明による松果体メラトニンリズムの消失が、光による抑

制反応によるものか、生物時計の振動停止あるいは内的脱同調によるものかを定める実験では、松果体メラトニンリズムは連続照明から連続暗に移行後直ちに出現し、しかもそのリズム位相は照明条件を変化させた位相に依存しなかったことから、メラトニンリズムの消失は光による抑制反応の結果と結論した。

口頭発表において、加藤教授より、松果体に挿入した透析プローブの位置によるメラトニンリズムの差異について、阿岸教授より、ヒトにおけるメラトニン光抑制反応およびリズム位相反応の波長依存性、紫外線のメラトニン合成に対する影響について、斉藤和雄教授より、メラトニン光抑制反応の時刻依存性と覚醒レベルとの関係について質問があったが、申請者は概ね妥当な解答を行った。また加藤、阿岸両教授には個別に審査を受け、合格と判断された。

本研究は、松果体メラトニン合成の光による調節機構の解明に *in vivo* microdialysis 法を導入して、個体レベルでの解析を初めて可能にした新しい研究であり、学位の授与に値すると思う。