

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成23年6月15日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790238

研究課題名（和文） ストレス時の交感神経亢進が卵巣の機能と組織に及ぼす影響

研究課題名（英文） The effect of stress-induced sympathetic activation on ovarian function and morphology

研究代表者

内田 さえ（UCHIDA SAE）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）

・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：90270660

研究成果の概要（和文）：ストレス時の卵巣機能障害に交感神経亢進が関わる可能性をラットで調べた。短期ストレス（皮膚侵害刺激）による卵巣エストロゲン分泌低下が卵巣支配の2種類の交感神経のうち上卵巣神経の活動亢進に起因すること、卵巣エストロゲン分泌低下には、前駆体テストステロンからの変換反応の抑制が関わることを見出した。さらに交感神経を亢進させる長期ストレス（カイニン酸全身投与）により排卵障害を示唆する卵巣組織変化（嚢胞性卵胞数の増加、黄体数の減少）が生じることを示した。

研究成果の概要（英文）：Involvement of sympathetic nerve hyperactivity in stress-induced ovarian dysfunction was examined in rats. Acute stress (nociceptive cutaneous stimulation) reduced the ovarian estradiol secretion rate via activation of the superior ovarian nerve. The reduction of estradiol secretion by superior ovarian nerve activation was caused by inhibition of testosterone conversion into estradiol. Chronic stress, which caused sympathetic nerve hyperactivation, produced morphological changes in the ovarian tissues (increase in the number of cystic follicles and decrease in the number of corpus luteum), suggesting an ovulatory dysfunction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養医学）

キーワード：ストレス，卵巣ホルモン，交感神経，卵胞，黄体，ラット

1. 研究開始当初の背景

ストレスによる卵巣機能障害の発症は、視床下部-下垂体-卵巣系のホルモン分泌の不調に起因すると考えられている（Genazzani AD et al., 2006 総説参照）。一方、ストレス時には交感神経系が亢進すること、卵巣の血管やホルモン産生細胞には自律神経が分布

する（Papka and Traurig, 1993 総説参照）ことから、ストレス時の交感神経系亢進が卵巣の血流やホルモン分泌に悪影響を及ぼし、排卵障害などの卵巣機能障害を来す要因となる可能性が考えられる。しかし、卵巣の自律神経支配に関する研究は、これまで解剖組織学的研究にとどまり、卵巣支配の自律神

経の記録や刺激実験による卵巣ホルモン分泌調節に関する詳細な生理学的検討は殆ど行われていない。

最近、研究代表者らは交感神経による卵巣機能調節の研究をラットを用いて取り組んで来た。ラットの卵巣には卵巣提索に添って卵巣に至る「上卵巣神経 (SON)」と卵巣動脈に添って卵巣に至る「卵巣動脈神経 (ONP)」の二種の交感神経支配がある

(Lawrence and Burden, 1980) (図 2 参照)。これまでに研究代表者は、上卵巣神経の電気刺激が卵巣のエストラジオール分泌と血流の両者を低下させるのに対して、卵巣動脈神経は血流のみを低下させることを報告した (Uchida et al., 2003; 2005; 2007; Kagitani et al., 2008)。

交感神経系を亢進させるストレス刺激が、卵巣のエストラジオール分泌や血流を低下させ、卵胞の発達や排卵機能にも影響を与える可能性が考えられる。そこで本研究において、研究代表者はこれまでの研究を発展させて、ストレス刺激が卵巣エストラジオール分泌に及ぼす影響とその反応への卵巣交感神経の関与や、エストラジオール分泌低下反応のメカニズムを明らかにしたいと考えた。さらに、長期的な交感神経亢進が排卵機能に影響を与え、卵巣組織 (卵胞や黄体) に形態的变化をもたらす可能性を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ストレスによる卵巣機能障害における交感神経の役割を解明することを目的とする (図 1)。

(1) 短期ストレス刺激によるエストラジオール分泌低下反応の機序を解明する。

既に、研究代表者は麻酔ラットを用いた実験で短期的なストレス刺激 (皮膚侵害刺激) が卵巣エストラジオール分泌を低下させる結果を見出している。本研究では、このストレス刺激による卵巣エストラジオール分泌低下反応のメカニズムを解析する。卵巣支配交感神経が関与するかについて、交感神経の切断と記録実験で明らかにする。また、反射中枢が脳に存在するか脊髄に存在するかについて、脊髄切断動物を用いて明らかにする。

(2) 交感神経刺激により卵巣エストラジオール分泌が低下する機序を解明する。

エストラジオールの産生は、アロマトラーゼによって触媒される前駆体テストステロンからエストラジオールへの変換反応が律速段階である。アロマトラーゼ活性がノルアドレナリンにより抑制されるという先行報告 (Jimbo et al., 1998) に着目し、本研究では、卵巣交感神経刺激が卵巣からのエストラジオールとテストステロンの分泌比率をどのように変化させるかを明らかにする。

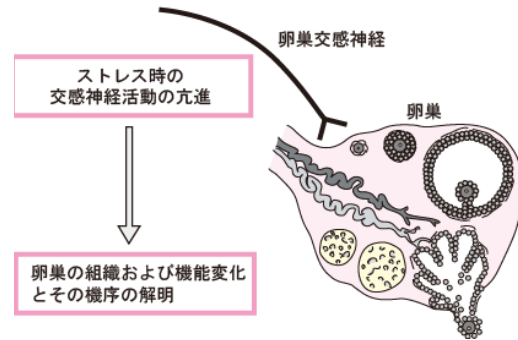


図 1 本研究の目的

(3) 長期ストレス時の交感神経活動亢進が卵胞・黄体の形態に与える影響を解明する。

ストレス刺激による交感神経活動亢進が長期にわたった際に、血流やエストラジオール分泌低下に続いて、排卵や卵胞・黄体組織の形態にどのような影響を及ぼすかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 卵巣からのホルモン分泌速度の測定

①動物

非妊娠雌 Wistar ラット (3-6 か月齢) を用いた。卵巣からのエストラジオール分泌は、性周期により大きく変動する (Shaikh and Sahikh, 1975)。本研究では卵巣からのエストラジオール分泌が他の時期よりも安定である発情期のラットを用いた。

②卵巣静脈血、末梢動静脈血の採取

ラットをウレタンで麻酔し、人工呼吸下で直腸温、血圧などを生理的に維持した。正中で開腹した後、ポリエチレンカテーテル (外径 0.5mm, 内径 0.2mm) を右の卵巣静脈に挿入した。血液凝固を防いで採血をスムーズにするために、ヘパリンナトリウム溶液 (200 IU/kg/h) を持続注入した。卵巣静脈血を間欠的に約 70 μ l ずつヘマトクリット管に採取し、同時に採血にかかった時間を測定した。脱血の影響を少なくするため、非採血時は卵巣静脈血を右大腿静脈にカテーテルを介してシャントさせた (図 2)。卵巣静脈血から全てのサンプルを採取した後、右の大腿動脈に挿入したカテーテルを介して、末梢動脈血 (約 140 μ l) を採取した。

③エストラジオールおよびテストステロン濃度の測定

血液サンプルを遠心分離 (11,000 回転, 5 分間) して血漿を集めた。血漿中のエストラジオール濃度をエストラジオール (17 β エストラジオール) EIA キットを用いて、テストステロン濃度をテストステロン EIA キットを用いて (両キットともに Cayman chemical Co., Michigan, USA), 酵素免疫法で測定した。

エストラジオールあるいはテストステロ

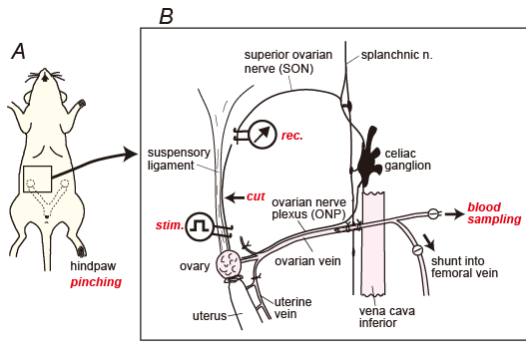


図2 卵巢静脈血の採取，上卵巢神経 (SON) の切断・記録・刺激の方法を示す模式図。

ンの分泌速度を，各ホルモンの卵巢静脈血漿中の絶対濃度（卵巢静脈血漿中濃度から末梢動脈血漿中濃度を引き算する）と卵巢静脈血漿流速から求めた。

④ 脊髄切断

第二頸髄レベルで脊髄を切断した。脊髄切断後，4% Ficoll70 を投与して収縮期血圧を70mmHg 以上に保った。

(2) 短期ストレス刺激および卵巢交感神経刺激による卵巢エストラジオール分泌速度低下反応の機序の解析

短期的ストレス刺激として，皮膚侵害刺激が卵巢エストラジオール分泌速度に及ぼす影響とその機序を調べた。機序の解析として，上卵巢神経の切断，記録，及び刺激実験を行った（図2）。

① 短期ストレス刺激

左側の後肢足蹠を外科鉗子でつまむ刺激を5分間加えた。

② 卵巢支配交感神経の切断

上卵巢神経を卵巢提索と付属の血管とともに，両側性に切断した。

③ 卵巢支配交感神経活動の記録

左あるいは右側の上卵巢神経を，卵巢提索に併走する手前で切断し，切断中枢端を白金一イリジウム電極にのせて遠心性活動を記録した。

④ 卵巢支配交感神経の電気刺激

右側の上卵巢神経を卵巢提索とともに切断し，切断末梢端を白金一イリジウム電極にのせて電気刺激を行った。刺激条件は，0.5ms，20V，20Hz，5分間とした。

(3) 長期ストレス刺激が卵巢組織の形態に及ぼす影響の解析

① 長期ストレス刺激

ラットへのカイン酸投与（10 mg/kg, i.p.）が心臓交感神経活動を異常に亢進させるという先行報告（Hotta et al., 2009）に着目し，同様の手法を用いた。

② 卵巢交感神経活動へ影響

麻酔下で卵巢交感神経（卵巢動脈神経）の遠心性活動を記録し，同活動に及ぼすカイン酸投与（10 mg/kg, i.p.）の影響を観察した。

③ 卵巢組織標本の作成と観察

ストレス刺激を開始して約4ヶ月後に，深麻酔下で卵巢を摘出し，ホルマリンで固定した。卵巢標本をパラフィンに包埋し，厚さ3-6μm に切断し，ヘマトキシリンとエオジン（HE）で染色した。一つの卵巢標本につき少なくとも400μm 離れた3切片について，囊胞性卵胞，非囊胞性卵胞，黄体の数を実体顕微鏡下で数え，平均値を求めた。

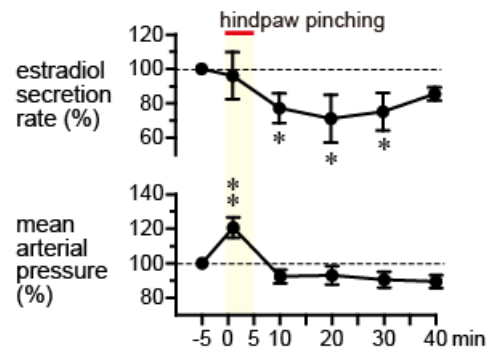
4. 研究成果

(1) 短期ストレス刺激によるエストラジオール分泌低下反応の機序

① 後肢皮膚侵害刺激による卵巢エストラジオール分泌の低下反応

麻酔ラットの安静時の卵巢エストラジオール分泌速度は，平均 4.1 ± 0.7 pg/min ($n = 6$) であった。短期ストレス刺激として後肢皮膚侵害刺激を5分間加えると，血圧上昇反応と，卵巢エストラジオール分泌速度の低下反応

A SON intact



B SON cut

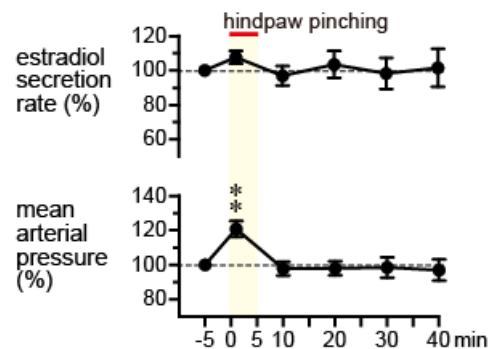


図3 後肢皮膚侵害刺激が卵巢エストラジオール分泌速度と平均血圧に及ぼす反応 (A) と同反応に対する上卵巢神経 (SON) 切断の影響 (B)。

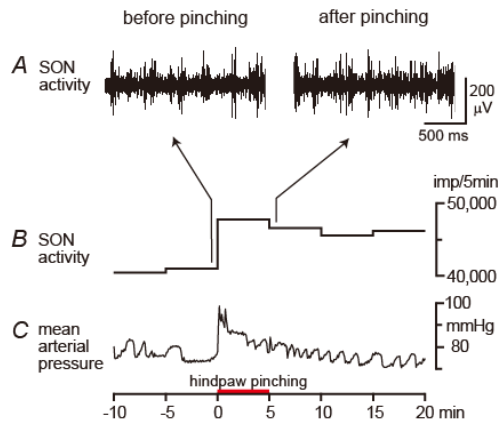


図4 後肢皮膚侵害刺激が上卵巣神経の遠心性活動に及ぼす影響。

が観察された (図3A). 侵害刺激に対する血圧上昇反応は刺激中のみ認められた. 一方, エストラジオール分泌速度の低下は, 刺激終了5分で明確となり, 刺激終了後15分に最低となり, 刺激終了35分で元のレベルに回復した. 刺激終了後15分におけるエストラジオール分泌速度は, 刺激5分前の値を100%とすると, 平均 $71.1 \pm 14\%$ であった.

② 上卵巣神経切断のエストラジオール分泌反応への影響

後肢皮膚侵害刺激で起こるエストラジオール分泌速度の低下に, 上卵巣神経が関与するかについて, 上卵巣神経の切断実験と記録実験により調べた. 上卵巣神経を両側性に切断したラットでは, 後肢皮膚侵害刺激は依然として血圧上昇反応を誘発した. しかし, 卵巣エストラジオール分泌速度に対しては有意な変化を起こさなかった (図3B). この結果から, 後肢皮膚侵害刺激で起こる卵巣エストラジオール分泌速度の低下は, 上卵巣神経を介する反応であると考えられる.

③ 後肢皮膚侵害刺激が上卵巣神経遠心性活動に及ぼす影響

上卵巣神経の遠心性活動を記録したところ, その活動レベルは, 安静状態における自発活動のレベルに比べ皮膚侵害刺激時において上昇した (図4). 刺激中のみでなく刺激後も高い活動レベルが維持された. 上卵巣神経活動は後肢皮膚侵害刺激中に最大に達し, その大きさは刺激前の活動レベルを100%とすると, 平均 $124.0 \pm 4.9\%$ であった. 刺激終了後も15分以上, 活動レベルは高い値を維持した.

これらの結果から, 後肢皮膚侵害刺激による卵巣エストラジオール分泌速度の低下反応は, 比較的長く持続する (5分の刺激に対して30分持続) 特徴が示された. 同反応は, 上卵巣神経活動の反射性亢進によって引き

起こされる反応であることが明らかとなった.

③ 反射中枢の検討

後肢皮膚侵害刺激で起こる反射性的上卵巣神経活動亢進反応の反射中枢の検討を, 第2頸髄脊髄切断動物で調べた. 脊髄切断後は, 後肢皮膚侵害刺激は上卵巣神経活動に有意な変化をもたらさなかった. この結果から, 中枢無傷時に認められた後肢皮膚侵害刺激による上卵巣神経活動の亢進反応と, それによって起こるエストラジオール分泌低下反応は, 脳 (上脊髄) を介する反射性反応であると考えられる.

(2) 交感神経刺激により卵巣エストラジオール分泌が低下する機序

① 卵巣テストステロン分泌速度

安静時において, 末梢動脈血よりも卵巣静脈血におけるテストステロン濃度が約4倍高く, 卵巣からテストステロンが分泌されることが確認された. 安静時における卵巣テストステロン分泌速度は平均 $21.7 \pm 4.6 \text{ pg/min}$ であり, エストラジオール分泌速度よりも高い値であった.

卵巣テストステロン分泌速度は, 上卵巣神経電気刺激中に減少し, 刺激終了5分後にはほぼ元の値に回復した. 上卵巣神経刺激中の分泌速度の平均値は $14.9 \pm 2.1 \text{ pg/min}$ であり, 安静時 (コントロール) の値よりも有意に減少した. 卵巣テストステロン分泌は上卵巣神経刺激により, 抑制されることが明らかとなった.

② テストステロン分泌とエストラジオール分泌の比較

上述の卵巣テストステロン分泌速度を調べたラットの一部において, 同時にエストラジオール分泌速度を測定した. テストステロン分泌速度に対するエストラジオール分泌速度の比率 (E/T%) を算出し, 安静時と上卵巣神経刺激中で比較した. E/T% は安静時には平均約25%であるのに対して, 上卵巣神経刺激中には約20%に低下した.

ステロイドホルモンは, 分泌顆粒に貯蔵されて放出されるという過程を持たず, 一度産生されると細胞膜を自由に通過できる. このため, 卵巣のステロイド産生は放出と同義と考えられる (Ojeda and Griffin, 2004). 従って, 本研究結果は, 上卵巣神経は卵巣のテストステロンおよびエストロゲンのいずれの合成に対しても, 抑制的に作用することを示唆する. エストラジオールの合成は, 変換酵素アロマターゼの作用による, 前駆体テストステロンからの変換反応が律速段階である. 本研究結果において, テストステロンに対するエストラジオール産生の割合 (E/T%) が, 上卵巣神経刺激中に低下したことから, アロマターゼによるテストステロンからエスト

ラジオールへの変換反応の抑制が示唆された。

(3) 長期ストレス刺激が卵巣組織の形態に及ぼす影響の解析

麻酔ラットにおいて、カイニン酸投与 (10 mg/kg, i.p.) は卵巣交感神経活動を著しく興奮させた。次いで卵巣組織の形態を、長期ストレス群 (カイニン酸投与群) と対照群で比較した。対照群においては、正常な非嚢胞性の卵胞と黄体が多く観察された。卵巣組織における割合で示すと、正常な非嚢胞性卵胞数は約 45%、黄体数は約 42% を占めた。一方、長期ストレス群においては、異常に大きな嚢胞性卵胞が多く観察され (約 50%)、排卵後に形成される黄体は殆ど観察されなかった (約 6%)。この結果は、交感神経過活動を起こす長期ストレスが、排卵機能に障害を誘発した可能性を示唆する。排卵機能障害の結果として、多くの異常な嚢胞性卵胞が観察され、黄体組織が殆ど形成されなかったと考えられる。

(4) 成果のまとめと今後の展望

本研究はストレスによる卵巣機能障害の発生に、ストレス時に亢進する交感神経が関与する可能性を、卵巣のホルモン分泌機能及び組織の形態観察の両面から検討した。ストレス刺激としては、短期ストレス (皮膚侵害刺激) と長期ストレス (カイニン酸投与) について調べ以下のことを明らかにした。

第一に、本研究は短期ストレス刺激 (後肢皮膚侵害刺激 5 分) が、上卵巣神経の反射性亢進を引き起こし、その結果として卵巣からのエストラジオール分泌を抑制することを明らかにした (図 5 左)。この反射性反応の中枢は脳に存在することを示した。

第二に、上卵巣神経の興奮 (刺激) によって起こる卵巣エストラジオール分泌低下は、前駆体テストステロンからの変換反応の抑制が関わることを見出した (図 5 左)。エストラジオール分泌低下に $\alpha 2$ アドレナリン受容体が関わることから、この変換反応抑制に $\alpha 2$ 受容体の関与が示唆される。本研究では更に、卵巣テストステロン分泌も上卵巣神経により抑制的に調節される事実を明らかにした。卵巣内における一連の性ホルモン合成過程が、交感神経により抑制されている可能性が考えられる。

第三に、長期ストレス刺激 (交感神経を著しく亢進させるカイニン酸投与後 4 ヶ月) は、卵巣組織において、嚢胞性卵胞数を増加させ、黄体数を減少させることを見出した (図 5 右)。交感神経過活動を起こす長期ストレスにより排卵機能が障害されることが示唆された。

本研究によって、ストレス時の交感神経亢進が、卵巣の機能を抑制し、卵巣組織に排卵

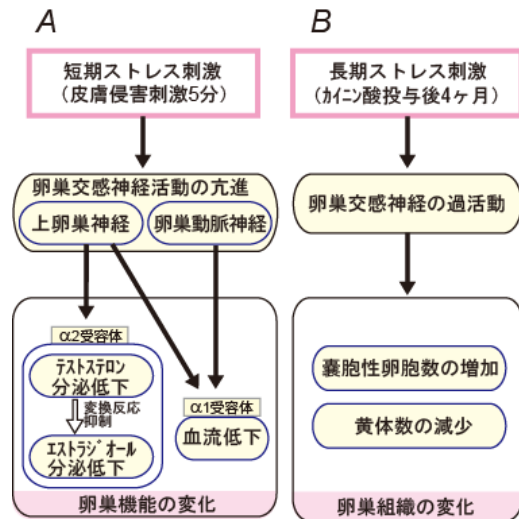


図 5 本研究成果を示す模式図。

障害を示唆する変化をもたらすことがラットで明らかとなった。ストレスによる卵巣機能障害の原因には、これまで卵巣に作用する視床下部一下垂体系のホルモン分泌の不調が考えられてきたが、これに加えて、卵巣交感神経活動亢進も卵巣機能障害に関与することが示された。今後さらに、交感神経による卵巣機能調節の詳細なメカニズムや、交感神経系と視床下部一下垂体系の両者の卵巣機能調節の関連性などを明らかにする研究に発展させる必要がある。また、交感神経系を制御することに着目した卵巣機能障害の新たな治療法の開発を目指す研究に発展させる必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Kagitani, H., Uchida, S., Hotta, H. The role of alpha adrenoceptors in the vascular and estradiol secretory responses to stimulation of the superior ovarian nerve. Journal of Physiological Sciences, 査読有, 61 巻, 2011, 247-251.
- ② Hanada, T., Uchida, S., Hotta, H., Aikawa, Y. Number, size, conduction, and vasoconstrictor ability of unmyelinated fibers of the ovarian nerve in adult and aged rats. Autonomic Neuroscience, Basic and Clinical, 査読有, 164 巻, 2011, 6-12.
- ③ Uchida, S., Kagitani, F., Watanabe, N., Hotta, H. Sympatho-inhibitory response of the heart as a result of short-term acupuncture-like stimulation of the rat hindlimb is not augmented when

sympathetic tone is high due to hypercapnia. Journal of Physiological Sciences, 査読有, 60 巻, 2010, 221-225.

- ④ Kagitani, F., Uchida, S., Hotta, H. Afferent nerves and acupuncture. Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical, 査読有, 157 巻, 2010, 2-8.
- ⑤ Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H. Neural mechanisms of reflex inhibition of heart rate elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical, 査読有, 157 巻, 2010, 18-23.

〔学会発表〕(計 31 件)

- ① Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H., “Role of ovarian afferent fibers in cardiovascular responses to ovarian stimulation” 第 89 回日本生理学会大会, 2012 年 3 月 29-31 日, 松本
- ② 内田さえ, 鍵谷方子, 堀田晴美 “皮膚侵害刺激は交感神経を介して卵巣エストロジオール分泌を低下させる” 第 64 回日本自律神経学会総会, 2011 年 10 月 27-28 日, 秋田
- ③ Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H., “Superior ovarian nerve regulates ovarian estradiol secretion in rats” 7th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN), September 12-16, 2011, Buzios
- ④ Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H. “Ovarian estradiol secretion is reflexively regulated by noxious mechanical stimulation of a hindpaw via ovarian sympathetic nerve.” 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月 28-30 日, 横浜
- ⑤ Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H. “Contribution of α -adrenoceptors in the autonomic regulation of ovarian estradiol secretion in rat” The 7th International Congress of Neuroendocrinology, July 11-15, 2010, Rouen

〔図書〕(計 1 件)

内田さえ, 花田智子, 6 章 生殖・成長と老化, 子メディカルのための専門基礎分野テキスト 生理学 3 版 (黒澤美枝子, 長谷川薫編), p138-149, 中外医学社, 東京, 2012.3 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 さえ (UCHIDA SAE)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究

所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号 : 90270660