

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590308

研究課題名(和文) 卵巣交感神経支配に対するエストロゲンの可塑的影響の解析

研究課題名(英文) Plastic changes in function of ovarian sympathetic innervation induced by estrogen

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：交感神経が興奮すると卵巣血流が抑制される。この交感神経性の卵巣血流反応及び卵巣ホルモン分泌機能に対するエストロゲン慢性投与の影響をラットで調べた。エストロゲン慢性投与(28日間)により、性周期が停止し、性周期に伴う卵巣エストラジオール分泌変動が停止した。更に交感神経興奮時の卵巣血流の抑制が起こりにくくなった。このエストロゲン作用は、交感神経の高頻度刺激(20Hz)ではなく低頻度刺激(2Hz)に対する血流抑制反応に対して有意に認められた。交感神経の安静時活動頻度が一般に1-3Hzであることから、エストロゲンの慢性的増加は、安静時において交感神経の血流抑制作用を減弱していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Activation of the sympathetic nerves to the ovary reduces ovarian blood flow. In the present study, effects of chronic estradiol treatment on the sympathetically-induced reduction of ovarian blood flow, and the ovarian estradiol secretion rate were examined. Chronic subcutaneous infusion of estradiol (28 days) stopped normal menstrual cycles and the cyclic changes of ovarian estradiol secretion rate. Furthermore, chronic estradiol treatment attenuated the sympathetically-induced reduction of ovarian blood flow. This attenuation effects of estradiol were significantly appeared to the blood flow responses to the sympathetic stimulation at low frequency (2Hz) but not at high frequency (20Hz). Since sympathetic activity at rest is 1-3 Hz in general, chronic elevation of estradiol may attenuate the sympathetically-induced reduction of ovarian blood flow under the resting condition.

研究分野：環境生理学

キーワード：卵巣 交感神経 エストロゲン 可塑性 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで、卵巣の機能がホルモンのみならず自律神経によっても調節される事実を明らかにしてきた。すなわち卵巣交感神経が亢進すると卵巣のエストロゲン分泌と血流が抑制されることをラットで見出した。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「卵巣動脈神経叢 (ONP)」の二種の交感神経支配がある (Lawrence and Burden, 1980)。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速度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 (図 1 左) (Uchida et al., 2003; 2005; 2007; Kagitani et al., 2008)。

妊娠時などのエストロゲンが高まる時期に、子宮の交感神経支配が消退することがよく知られている (Hasse et al., 1997)。近年、卵巣の交感神経支配に対してもエストロゲン増加が、卵巣支配の交感神経節後ニューロン数を減少させることが報告された (Koszykowska M et al., 2011)。エストロゲン増加時には、交感神経による卵巣機能の抑制性調節が弱まり、卵細胞保護に好ましい環境が作られる可能性が考えられる。

そこで本研究において、研究代表者はエストロゲン増加が卵巣交感神経機能に与える可塑的影響を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究は、エストロゲン増加が卵巣交感神経機能に与える可塑的影響を解明することを目的とする (図 1)。

(1) エストロゲン慢性投与が、交感神経による卵巣血流低下反応に与える影響を明らかにする。

研究代表者は既に、麻酔ラットを用いた実験で卵巣を支配する交感神経 (上卵巣神経)

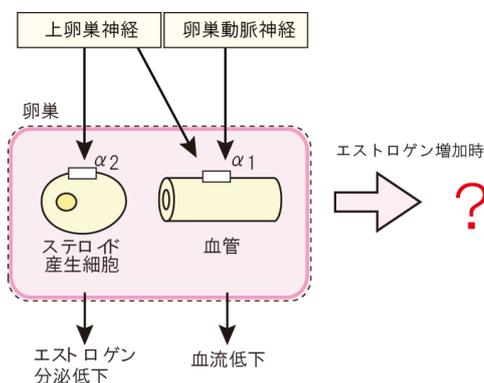


図 1 本研究の目的

の電気刺激が卵巣血流を低下させることを見出している。本研究では、この上卵巣神経刺激による卵巣血流反応に対する、エストロゲン慢性投与の影響について、まず投与期間を 2 週間と 4 週間とで比較し、より効果的な投与期間を明らかにする。エストロゲン投与量については、生理的なエストロゲン増加の状態と類似させるため、妊娠中の血中濃度に反映する量のエストロゲンを持続投与する。

(2) エストロゲン慢性投与が、卵巣からのエストラジオール分泌速度に与える影響を調べる。

効果的なエストロゲン慢性投与条件において、卵巣自体が分泌するエストラジオールがどのような影響をうけるか解明する。

(3) エストロゲン慢性投与が、卵巣血流量に与える影響を明らかにする。

エストロゲン慢性投与が卵巣血流量の絶対値に与える影響を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

非妊娠雌 Wistar ラット (3-6 か月齢) を用いた。

### (2) エストロゲン慢性投与の方法

エストロゲンを 14 日間あるいは 28 日間持続皮下投与した (図 2)。対照群のラットには生理食塩水を持続皮下投与した。麻酔下でラットの背部皮下に水溶性エストラジオールあるいは生理食塩水を注入した浸透圧ポンプ (Alzet, model #2002 あるいは #2004) を埋め込んだ。先行研究で報告された妊娠後期の血中濃度に相当するエストラジオール投与量 (5  $\mu\text{g}/\text{日}$  すなわち約 25  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ ) を用いた (Zoubina et al., 2001)。膺スミア観察により性周期を調べ、エストロゲン慢性投与による変化を観察した。投与期間 (14 日間あるいは 28 日間) 経過後、麻酔下での *in vivo* 実験を行った。

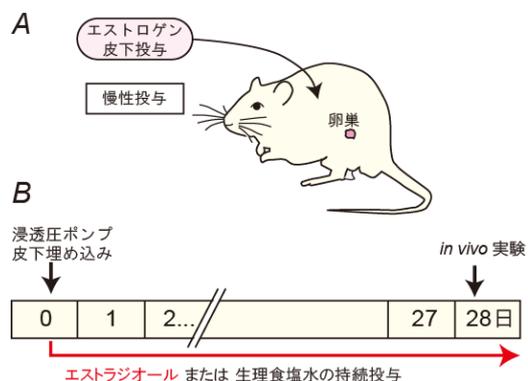


図 2 エストロゲン慢性投与の方法を示す模式図。

### (3) In vivoでの卵巣血流の測定方法

卵巣血流を、レーザードップラー血流計を用いた連続的測定(図3A), および卵巣静脈血の採取による卵巣血流量の絶対値測定を行った。

#### レーザードップラー血流計による卵巣血流測定

実験日に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, レーザードップラー血流計のプロブを一側の卵巣表面にのせたスライドガラスの上に設置し, 局所血流を連続測定した(図3A)。レーザードップラー血流測定法は血流量の絶対値測定は出来ないが, 血流反応性の測定に適している。そこで, この方法を用いて, 上卵巣神経刺激で起こる卵巣血流低下反応(相対的変化)を観察した。

#### 卵巣静脈血の採取による卵巣血流量の測定

上述と同様にラットを麻酔し, 呼吸, 体温, 血圧を生理的状态に維持した。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 $\mu$ 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。ヘマトクリット管への採血量を採血時間で割ることにより卵巣血流量( $\mu$ l/min)を算出した(図3B)。

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 $\mu$ l)を採取した。

卵巣静脈および末梢動脈から採取した血液サンプルを用いて, 次項に示す方法により血漿中エストラジオール濃度を測定した。

#### 血漿中エストラジオール濃度の測定

卵巣静脈および末梢動脈から採取した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 $\beta$ エストラジオール)EIAキット(Cayman chemical Co., Michigan, USA)を用いて, 酵素免疫法で測定した。

エストラジオールの分泌速度(pg/min)を, エストラジオールの卵巣静脈血漿中の絶対濃度(卵巣静脈血中濃度から末梢動脈血漿中濃度を引き算する)と卵巣静脈血漿流速から求めた。

### (4) 上卵巣神経の電気刺激

一側の上卵巣神経を卵巣探索とともに切断し, 切断末梢端を白金イリジウム電極にのせて電気刺激を行った(図3A,B)。刺激条件は, 0.5ms, 20V, 0.5-50Hzとした。刺激時間は30秒間(レーザードップラー血流計を用いた卵巣血流反応観察実験)ないし5分間(卵巣静脈血採取による血流量測定実験)とした。

## 4. 研究成果

### (1) エストロゲン慢性投与期間の検討

#### 性周期の変化

対照群では浸透圧ポンプ(生理食塩水)を皮下に埋め込んだ後も, 規則正しい4-5日周期を示した。

エストラジオール投与群においては, 皮下投与開始2日目以降から周期が乱れ始め, その後も周期が停止した状態が14日間あるいは28日間持続した。

#### 卵巣および子宮重量の変化

in vivo 実験日に実験終了後, 卵巣と子宮を摘出し, 湿重量を測定した。子宮重量は, 対照群と比較し, エストラジオール投与群(14日間, 28日間投与群ともに)で有意に上昇した。卵巣重量は, 対照群と比較して, エストラジオール投与群(14日間, 28日間投与群ともに)において低下傾向が認められたが, 統計的有意性は認められなかった。体重は, 対照群とエストラジオール投与群(14日間, 28日間投与群ともに)で同程度であり, 群間に有意差は認められなかった。

#### 交感神経による卵巣血流低下反応の変化

実験日にラットを麻酔し, 上卵巣神経(SON)刺激で生じる卵巣血流低下反応を観察した。SON刺激の頻度を0.5~50Hzについて調べた。対照群, エストラジオール投与群(14日間, 24日間)のいずれの群においても, 頻度依存性に卵巣血流低下反応が観察された。

対照群においては, 0.5Hzの刺激では有意な血流変化は認められないが, 1Hz以上の頻度において, 有意な血流低下反応が観察され, 頻度依存性に血流低下反応が増大し, 20Hzで

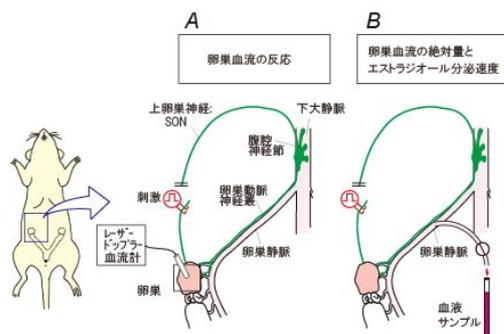


図3 in vivo 実験の方法を示す模式図。A: レーザードップラー血流計を用いた卵巣血流反応の測定方法。B: 卵巣血流の絶対値およびエストラジオール分泌速度測定のための卵巣静脈血採取方法。上卵巣神経(SON)刺激も示す。

ほぼ最大反応に達した。

エストラジオール 14 日間投与群においても、対照群と同様に 1Hz 以上の頻度において、有意な血流低下反応が観察され、頻度依存性に血流低下反応が増大し、20Hz でほぼ最大反応に達した。しかし、血流低下反応の大きさは対照群と比較してエストラジオール投与群で減弱傾向が認められた。

エストラジオール 28 日間投与群では、SON 刺激頻度が 1-2Hz では有意な血流減少反応は認められず、5Hz 以上の頻度で有意な血流低下が観察され、頻度依存性に血流低下反応が増大し、20Hz でほぼ最大反応となった。血流低下反応の大きさは対照群と比較してエストラジオール投与群で減弱していた。

以上の結果から、エストラジオール慢性投与は、交感神経興奮による卵巣血流低下反応を減弱させることが示された。エストラジオール投与期間を 14 日間から 28 日間に延長すると、その減弱は顕著となった。

そこで、より顕著な変化が認められた 28 日間のエストラジオール投与期間をこれ以降の実験に用いた。

(2) エストロゲン慢性投与が、卵巣からのエストロゲン分泌に及ぼす影響

エストラジオール慢性投与 (28 日間投与) が、卵巣からのエストラジオール分泌速度に与える影響を調べた。

まず、末梢動脈血漿中のエストラジオール濃度について調べたところ、エストラジオール投与群では対照群よりも約 10 倍高値であった。この結果から投与群ではエストラジオールが確実に投与されていることが確認された。

卵巣からのエストラジオール分泌速度は、対照群では約 2-200 pg/min の範囲で個体により大きく異なった。卵巣からのエストラジオール分泌速度は、性周期で大きく異なる (Shaikh and Shaikh, 1975)。したがって、本実験の対照群では様々な周期のラットが含まれるために、卵巣エストラジオール分泌速度の個体差が大きかったと考えられる。一方、エストラジオール投与群では、約 4-35 pg/min の範囲に比較的一定していた。この結果は、エストラジオール慢性投与が視床下部-下垂体系を抑制することにより、性周期とそれに伴う卵巣エストラジオール分泌変動を停止したことによると考えられる。

(3) エストロゲン慢性投与が、卵巣血流量に及ぼす影響

エストラジオール慢性投与 (28 日間投与) が、卵巣血流量の絶対値に与える影響を調べた。実験日に麻酔下において、安静時の卵巣血流量は、対照群、エストラジオール投与群ともに約 50-110  $\mu$ l/min の範囲にあり、群間

に有意な差は認められなかった。平均血圧にも群間に有意差は認められなかった。

(4) エストロゲン慢性投与が、交感神経興奮による卵巣血流低下反応に及ぼす影響

卵巣血流量の絶対値を測定しながら、上卵巣神経 (SON) 刺激で生じる卵巣血流低下反応を観察した。刺激頻度は、低頻度 (2Hz) と高頻度 (20Hz) について検討した。対照群では、低頻度、高頻度のいずれの刺激によっても有意に卵巣血流量が低下した。低頻度刺激中には約 15% の低下、高頻度刺激中には約 30% の低下が認められた。一方、エストラジオール投与群では、低頻度刺激では卵巣血流量の有意な低下は認められず、高頻度刺激中のみ約 30% の有意な低下が認められた。

(5) 成果のまとめと今後の展望

以上の結果から、エストロゲンの慢性的な増加は、性周期を停止し、性周期に伴う卵巣からのエストロゲン分泌変動を抑え、さらに交感神経興奮時の卵巣血流の抑制を起りにくくする、ことが明らかとなった (図 5)。このエストロゲンの可塑的影響は、交感神経の高頻度刺激 (20Hz) ではなく低頻度刺激 (2Hz) に対する血流抑制反応に対して認められることが示された。交感神経の安静時活動頻度が一般に 1-3Hz であることから、エストロゲンの慢性的増加は、安静時において交感神経の卵巣血流抑制作用を減弱させていると考えられる。一方、ストレス時など交感神経活動が著しく高まる状態での卵巣血流抑制作用は維持されていると考えられる (図 5)。

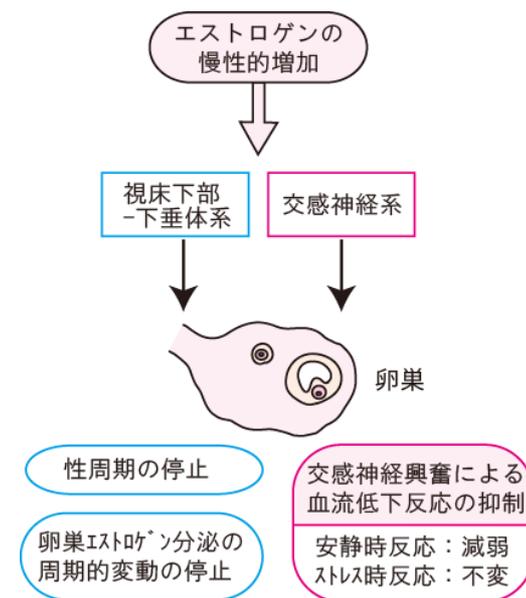


図 5 本研究成果を示す模式図。

ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた実験において、エストラジオールは血管内皮細胞の一酸化窒素合成酵素（eNOS）を活性化する（Hisamoto et al., 2001）。ブタにおいて子宮血管の $\alpha 1$ アドレナリン受容体数は、黄体期よりも、エストラジオールが高い卵胞期に少なくなる（Ford et al., 1984）。これらの報告から、エストラジオール投与は卵巣血管においても、NOによる弛緩反応を高め、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体数を減少することで、交感神経興奮時の血流抑制反応が起こりにくくなることが予想される。

本研究結果から、妊娠時にはエストロゲンの持続的上昇が、安静時において交感神経による卵巣血流の抑制を起こりにくくすることにより、卵巣に保護的に働いている可能性が考えられる。妊娠時以外においては、エストロゲン慢性投与は視床下部を抑制して、排卵周期を止めてしまう恐れがある。

交感神経 - 卵巣系の基礎研究は未だ十分ではない。卵巣の血流やホルモン分泌の交感神経性調節が、妊娠時、老化あるいは病態時などに、どのように変化するのか、その意義を考えながら、今後さらに解明していく必要がある。

#### 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 9 件）

Uchida, S., Kagitani, F. Autonomic nervous regulation of ovarian function by noxious somatic afferent stimulation. *Journal of Physiological Sciences*, 査読有, 65 巻, 2015, 1-9.

doi: 10.1007/s12576-014-0324-9

Uchida, S. Sympathetic regulation of estradiol secretion from the ovary. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 査読有, 187 巻, 2015 年, 27-35.

doi: 10.1016/j.autneu.2014.10.023.

内田さえ, 自律神経と排卵, 女性心身医学, 査読無, 19 巻, 2015 年, 278-281.

Uchida, S., Kagitani, F. Effects of electrical stimulation of autonomic nerves to the ovary on the ovarian testosterone secretion rate in rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 査読有, 180 巻, 2014 年, 48-52.

doi: 10.1016/j.autneu.2013.10.007.

内田さえ, 体性-自律神経反射と鍼灸, *Biomedical Thermology*, 査読無, 33 巻, 2014 年, 41-46.

内田さえ: ストレス時の卵巣エストラジオール分泌低下における交感神経の役

割, 自律神経, 査読有, 50 巻, 2013 年, 39-44.

Naggar, I., Uchida, S., Kamran, H., Lazar, J., Stewart, M. Autonomic boundary conditions for ventricular fibrillation and their implications for a novel defibrillation technique. *Journal of Physiological Sciences*, 査読有, 62 巻, 2012 年, 479-492. doi: 10.1007/s12576-012-0225-8.

Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H. Reflex modulation of ovarian estradiol secretion by noxious mechanical stimulation of a hindpaw in anesthetized rats. *Autonomic Neuroscience, Basic and Clinical*, 査読有, 171 巻, 2012 年, 14-20.

doi: 10.1016/j.autneu.2012.08.014.

Uchida, S., Hotta, H., Misawa, H., Kawashima, K. The missing link between long-term stimulation of nicotinic receptors and the increases of acetylcholine release and vasodilation in the cerebral cortex of aged rats. *Journal of Physiological Sciences*, 査読有, 63 巻, 2012 年, 95-101.

doi: 10.1007/s12576-012-0239-2.

#### 〔学会発表〕（計 15 件）

内田さえ, “鍼灸刺激が卵巣機能に及ぼす影響” 医師のための鍼灸セミナー第 部「女性科疾患に対する鍼灸治療の実際—基礎から臨床の実践に向けて—」第 65 回日本東洋医学会学術総会, 2014 年 6 月 27-29 日, 東京

内田さえ, “自律神経機能と排卵” シンポジウム 2 「自律神経」第 43 回日本女性心身医学会学術集会, 2014 年 8 月 9-10 日, 京都

内田さえ, 鍵谷 方子, “Regulatory mechanism of testosterone secretion from the ovary by autonomic nerves”

第 37 回日本神経科学大会, 2014 年 9 月 11-13 日, 横浜

内田さえ, 鍵谷 方子, “卵巣障害時の卵巣求心性神経活動と循環反応” 第 67 回日本自律神経学会総会, 2014 年 10 月 30-31 日, さいたま

内田さえ, 渡辺 信博, 堀田 晴美, “内分泌腺静脈血の直接採集によるホルモン分泌速度評価システム” TOBIRA 第 4 回研究交流フォーラム, 2015 年 2 月 2 日, 東京

内田さえ “自律神経研究の最新の進歩” 千葉県鍼灸師会生涯研修学術講習会, 2015 年 2 月 8 日, 千葉

鍵谷 方子, 内田さえ “卵巣交感神経の血管収縮反応に対するエストロゲンの可塑的影響” 第 92 回日本生理学会大会, 2015 年 3 月 21-23 日, 神戸

Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H., “Reflex modulation of ovarian estradiol secretion via the superior ovarian nerve by somatosensory stimulation in rats.” The 8th Congress of the International Society for Autonomic Neuroscience (ISAN), 2013年7月29日-8月2日, Giessen, Germany

Uchida, S., “Autonomic regulation of ovarian function by somatic afferent stimulation.” International Scientific Acupuncture and Meridian Symposium (iSAMS 2013), 2013年10月4-6日, Stockholm, Sweden

内田さえ, “体性 - 自律神経反射と鍼灸” 日本サーモロジー学会第30回大会, 特別講演, 2013年6月21-23日, つくば

内田さえ, 鍵谷方子 “ 卵巢交感神経の血管収縮反応に対するエストロゲンの可塑的影響 ” 第66回日本自律神経学会総会, 2013年10月24-25日, 名古屋

鍵谷方子, 内田さえ “ 卵巢交感神経刺激が卵巢テストステロン分泌に及ぼす影響 ” 第41回自律神経生理研究会, 2013年12月7日, 東京

Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H., “Neural mechanism for stress-induced inhibition of estradiol secretion from the ovary” The 35th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2012), 2012年9月18-21日, Nagoya

内田さえ, “ 体性感覚刺激と自律機能 皮膚からの反射に重点を置いて ” 第8回公益法人 日本鍼灸師会 全国大会, 2012年10月7-8日, 大宮

内田さえ, 鍵谷方子, 堀田晴美, “ 交感神経刺激が卵巢テストステロン分泌に及ぼす影響 ” 第65回日本自律神経学会総会, 2012年10月25-26日, 東京

## 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