

機関番号：32419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790228

研究課題名(和文) ストレスが視床下部-下垂体内分泌系と自律神経系を介して卵巣機能に及ぼす影響

研究課題名(英文) The effect of stress on ovarian function via activation of hypothalamic-pituitary hormones and sympathetic nerves.

研究代表者

鍵谷 方子 (KAGITANI FUSAKO)

人間総合科学大学・人間科学部・講師

研究者番号：50291133

研究成果の概要(和文)：本研究はストレス刺激が末梢血中エストラジオール濃度へ及ぼす影響とその機序の解明を目的として行った。麻酔ラットを用い、後肢足蹠へ5分間の侵害刺激および交感神経が最大に興奮する強度で直接卵巣交感神経に5分間の電気刺激を加えたところ、いずれの場合も末梢静脈血中のエストラジオール濃度に変化はみられなかった。一方、同じ刺激によって、卵巣からのエストラジオール分泌速度はそれぞれ約30%および約50%減少した。以上の結果から、短期のストレス刺激による卵巣エストラジオール分泌速度の減少は、末梢血中には反映されないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The present experiments examined the effects of stress stimulation on the estradiol concentration in peripheral blood plasma. Using anesthetized rats, application of noxious stimulation to the hind paw for five minutes, and of electrical stimulation, with an supramaximal intensity, directly to the ovarian sympathetic nerve for five minutes, both resulted in no change in the estradiol concentration in peripheral blood plasma. On the other hand, by the same stimulations, the secretion rate of ovarian estradiol was reduced by approximately 30% and by approximately 50%, respectively. These results showed that reduction of the secretion rate of ovarian estradiol by short-term stress stimulation is not reflected in the peripheral blood.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：卵巣・自律神経・エストロゲン・ストレス・視床下部-下垂体系

1. 研究開始当初の背景

ストレス時には交感神経系や視床下部-下垂体系が亢進し、種々の臓器に機能障害が起こる事が知られている。成熟女性でみられる月経困難症や月経前症候群など子宮や卵巣の機能障害にはストレスが一因となっている場合がある(Genazzaini AD et al.,

2006)。近年、我々は麻酔ラットを用いて、卵巣に分布する交感神経を刺激した際に卵巣血流が低下し、卵巣のエストロゲン分泌速度が低下することを明らかにした(Kagitani et al., 2008)。ストレス時に交感神経活動が亢進する際、末梢血中エストロゲン濃度がどう変化するか興味深い。ただしエストロゲン

の末梢血中濃度は、これまでも示されてきたように視床下部-下垂体-卵巣系の内分泌性の調節機能も反映している。これらの事実から、ストレスは視床下部-下垂体内分泌系及び自律神経系を介して末梢血中エストロゲン濃度に影響を及ぼす可能性がある（図1参照）。

以上のことから、本研究では特に、末梢血中エストロゲン濃度に及ぼすストレス刺激の影響とその自律神経性および内分泌性調節の関与について解明したいと考えた。

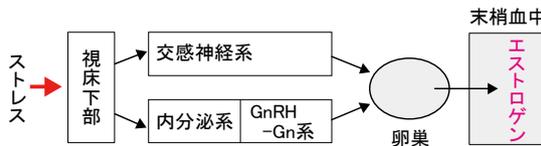


図1 研究の概要を示す模式図

2. 研究の目的

本研究の目的は、ストレス刺激が末梢血中エストロゲン濃度におよぼす影響とその自律神経性および内分泌性調節機序を解明することである。

(1) 麻酔ラットに加えたストレス刺激が末梢血中エストロゲンの濃度に及ぼす影響を明らかにする。具体的には、ストレス刺激として皮膚に侵害性刺、あるいは卵巣交感神経の最大上強度での電気刺激、を加えた際の末梢血中エストロゲン濃度変化をそれぞれ経時的に調べる。

(2) ストレス刺激が末梢血中エストロゲン濃度に及ぼす影響に対する卵巣自律神経系の関与と視床下部-下垂体内分泌系の関与のを明らかにする。具体的には、卵巣自律神経の切断実験を行い、皮膚侵害性刺激を加えた際の末梢血中エストロゲン濃度の変化を調べ、切断前後で比較する。

3. 研究の方法

(1) 実験は3~6カ月齢の発情日の雌性Wistar系成熟ラットを用い、麻酔下、人工呼吸下で体温、血圧などを生理的に安定に維持した状態で行った（図2）。

(2) 後肢足蹠に侵害刺激（後肢足蹠を外科鉗子で摘む侵害性機械的刺激）を5分間行った。皮膚への侵害性刺激は、麻酔ラットにおいて、心臓や血管などの種々の臓器を支配する交感神経活動を高めたり、視床下部からの副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）の分泌を高めるなどのストレス反応を誘発することが知られている（Sato et al., 1997の総説参照）。卵巣についても、我々は先行研究において皮膚侵害性刺激が卵巣交感神経活動を高めることを報告している（Uchida et

al., 2003）。

(3) 刺激と対側の大腿静脈あるいは大腿動脈にカテーテルを挿入して間欠的に約140または210 μ lずつ採血した。各血液サンプルを遠心分離して血漿を得、血漿中のエストラジオール濃度を酵素免疫法（EIA法）を用いて測定した。脱血の影響を少なくするために、採血量は最低限とし、経時的に繰り返し安定な採血を行えるように工夫する。

(4) 卵巣静脈にカテーテルを挿入し間欠的に約70 μ lずつ採血した。EIA法により測定した卵巣静脈血漿中エストラジオール濃度および採血時間から卵巣からのエストラジオール分泌速度を算出した。

(5) 上卵巣神経（SON）を分離・切断し、末梢端を電気刺激（0.5 ms, 20V, 20Hz, 5 min）した。

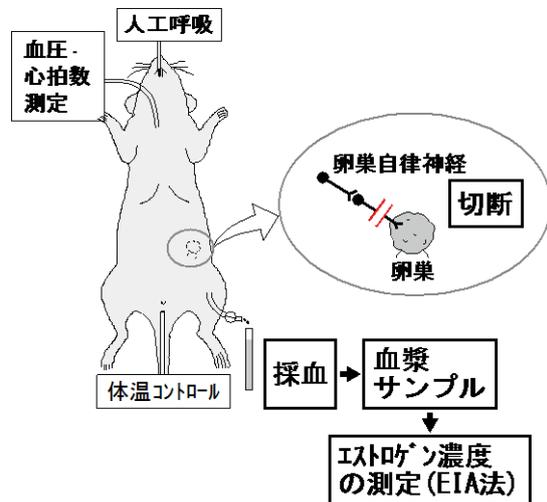


図2 末梢血中エストラジオール濃度測定と卵巣自律神経切断の方法を示す模式図

4. 研究成果

<結果と考察>

(1) 初めに末梢血漿中エストラジオール濃度を安静時において測定した。その結果、末梢動脈血漿と末梢静脈血漿中のエストラジオール濃度はほぼ等しく約70pg/mlであり、卵巣静脈血漿中の濃度の約半分であることが分かった（図3, n=4）。

安静状態において、20分毎に間欠的に採取した末梢血漿中エストラジオール濃度は200分間安定であった（図4, n=4）。

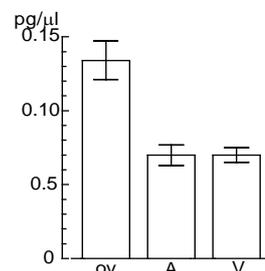


図3 安静時の卵巢静脈血中 (ov), 末梢動脈血漿中 (A), 末梢静脈血漿中(V)のエストラジオール濃度.

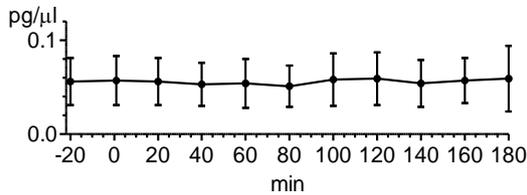


図4 安静時の末梢血漿中エストラジオール濃度.

(2) 次に, 後肢足蹠への侵害刺激を5分間おこなった際の末梢血中エストラジオール濃度へ及ぼす効果を調べた. その結果, 末梢血中のエストラジオール濃度は刺激前に比べ, 刺激中および刺激後20分までの間に有意な変化はみられなかった. 図5は4匹のラットにおける侵害刺激前と刺激後の末梢血漿中エストラジオール濃度のまとめを示したものである.

変化がみられなかった理由として, 侵害刺激が卵巢からのエストラジオール分泌に影響を及ぼさなかった可能性と, 侵害刺激が軽度だった可能性とが考えられた.

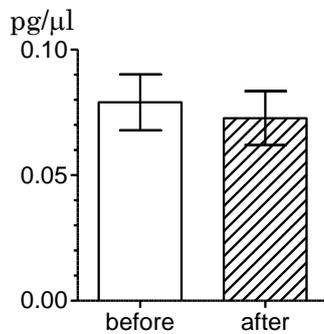


図5 5分間の後肢足蹠への侵害刺激前後の末梢血漿中エストラジオール濃度の変化(n=4).

(3)そこで, 5分間の後肢足蹠への侵害刺激が卵巢からのエストラジオール分泌に影響を及ぼすかどうかについて, 卵巢静脈から採血を行い検討した.

その結果, 5分間の後肢足蹠への侵害刺激により卵巢からのエストラジオール分泌濃度およびエストラジオール分泌速度は, 刺激前に比べ刺激後5分および15分において有意に減少することが明らかとなった. 減少の

程度は刺激前5分および10分の値の平均値を100%とすると, 刺激後15分にエストラジオール濃度は約20%, 卵巢からのエストラジオール分泌速度は約30%減少した(図6, n=6).

これらの減少反応は, 卵巢に分布する交感神経(上卵巢神経:SON)を切断すると消失した.

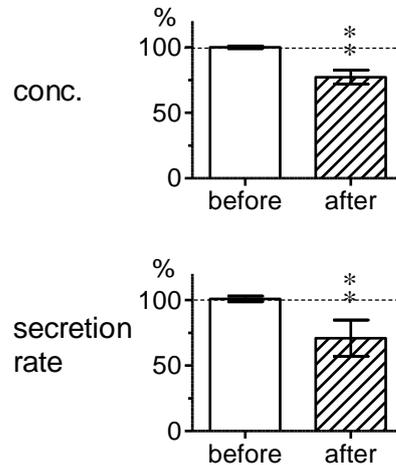


図6 後肢足蹠への5分間の侵害刺激前後の卵巢静脈血エストラジオール濃度と卵巢からのエストラジオール分泌速度の変化

以上の結果から, 5分間の後肢足蹠への侵害刺激は, 卵巢交感神経を介して卵巢からのエストラジオールの分泌を減少させることが明らかとなった.

卵巢エストラジオール分泌は, 視床下部-下垂体-卵巢系のホルモンによって制御されることがよく知られているが, 今回の後肢足蹠への侵害刺激による卵巢からのエストラジオール分泌抑制には, 内分泌系による制御は関与せず, 卵巢交感神経活動がストレス刺激により高まった結果であることが分かった.

(4) 卵巢交感神経活動が最も高まった状態における卵巢エストラジオール分泌速度の変化およびその末梢血中エストラジオール濃度への影響を調べるために, 上卵巢神経(SON)を直接電気刺激した.

上卵巢神経(SON)を分離し, その切断端を最大上刺激である20V, 20Hzで5分間電気刺激したところ, 卵巢からのエストラジオール分泌速度が刺激中に約50%減少し, 刺激後はもとのレベルに回復した(図7, n=5).

一方, 上卵巢神経(SON)の電気刺激中および刺激後における末梢血中エストラジオール濃度は, いずれも刺激前と同程度で有意な変化が認められなかった.

以上の結果から、上卵巣神経 (SON) 電気刺激により卵巣からのエストラジオール分泌速度が約 50%も減少しても、5 分間の短期間では、末梢血中エストラジオール濃度には反映されないことが明らかとなった。

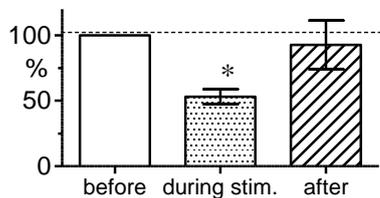


図 7 上卵巣神経刺激 (20V, 20Hz) による卵巣エストラジオール分泌速度の変化

卵巣からのエストラジオール分泌の減少が、末梢血中のエストラジオール濃度に反映されにくい理由としては、以下のことが考えられた。

血中エストラジオールの半減期が遅いため、末梢静脈血のエストラジオール濃度が末梢動脈血の濃度とほぼ等しく、また卵巣静脈血中エストラジオール濃度との差が約半分である。したがって、卵巣からの分泌の変化が末梢血中で反映されにくい可能性がある。

<結論と今後の展望>

本研究により、短期のストレス刺激、すなわち 5 分間の後肢足蹠への侵害刺激および最大上強度での卵巣交感神経の電気刺激により、卵巣からのエストラジオール分泌速度はそれぞれ約 30%および約 50%減少するが、その減少は末梢血中エストラジオール濃度には現れないことが明らかとなった。したがって、短期のストレス刺激による卵巣エストラジオール分泌の異常は、末梢血中エストラジオール濃度に反映されないことが示唆された。

本研究の結果は、女性生殖機能障害に悩む女性が少なくない現代において、ストレスが卵巣神経活動を亢進し、エストラジオール分泌を減少させること、そしてその卵巣における変化が臨床の場合において発見されにくい可能性を示している。今後さらに卵巣交感神経が女性生殖機能に及ぼす働きを解明し、卵巣交感神経を視野に入れた、早期発見への方策や新たな治療法を開発する研究へ発展させることが必要となる。

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 6 件)

1. Hotta, H., Kagitani, F., Kondo, M. and Uchida, S. Basal forebrain stimulation induces NGF secretion in ipsilateral parietal cortex via nicotinic receptor activation in adult, but not aged rats. *Neurosci Res* **63**: 122-8, 2009. [査読有り]
2. Uchida, S., Kagitani, F., Watanabe, N. and 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 as a result of hypercapnia. *Journal of Physiological Science* **60**: 221-5, 2010. [査読有り]
3. Kagitani, F., Uchida, S. and Hotta, H. The role of alpha adrenoceptors in the vascular and estradiol secretory responses to stimulation of the superior ovarian nerve. *Journal of Physiological Science* **61**: 247-251, 2011. [査読有り]
4. Hotta, H., Uchida, S., Kagitani, F. and Maruyama, N. Control of cerebral cortical blood flow by stimulation of basal forebrain cholinergic areas in mice. *Journal of Physiological Science* **61**: 201-209, 2011. [査読有り]
5. Kagitani, F., Uchida, S. and Hotta, H. Afferent nerve fibers and acupuncture. *Auton Neurosci* **157**: 2-8, 2010. [査読有り]
6. Uchida, S., Kagitani, F. and Hotta, H. Neural mechanisms of reflex inhibition of heart rate elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. *Auton. Neurosci* **157**: 18-23, 2010. [査読有り]

[学会発表] (計 6 件)

1. Kagitani F., Uchida, S., Hotta, H. Regulation of the ovarian estradiol secretion rate by superior ovarian nerve in rats. British Society for Neuroendocrinology. 2009 年 6 月. Edinburgh.
2. Kagitani F., Uchida S., Hotta H. The ovarian estradiol secretion rate is regulated by superior ovarian nerve in rats. 36th International Congress of Physiological Sciences. 2009 年 7 月, 京都.
3. 鍵谷方子, 内田さえ, 堀田晴美. 卵巣支配自律神経の刺激がラット卵巣からのエス

- トラジオール分泌に及ぼす影響. 第 32 回日本基礎老化学会. 2009年6月, 横浜.
4. 鍵谷方子, 内田さえ, 堀田晴美. Ovarian estradiol secretion is regulated by autonomic nerves via activation of α_2 -adrenoceptors. 第87回日本生理学会大会. 2010年5月. 盛岡.
 5. 鍵谷方子, 内田さえ, 堀田晴美. 上卵巣神経刺激による卵巣血流および卵巣エストロジオール分泌反応における α アドレナリン受容体の役割. 第63回日本自律神経学会総会発表. 2010年10月. 横浜.
 6. 鍵谷方子, 内田さえ, 堀田晴美. Effect of age on sympathetic regulation of ovarian estradiol secretion in rats. 第88回日本生理学会大会. 2011年3月. 横浜 (開催中止のため紙面発表のみ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鍵谷 方子 (KAGITANI FUSAKO)
人間総合科学大学・人間科学部・講師
研究者番号: 50291133 ()

(2) 研究分担者

なし ()

(3) 連携研究者

なし ()