

平成22年 6月21日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790197
 研究課題名 (和文) ストレス時の交感神経系亢進が卵巣内分泌機能に及ぼす影響の生理学的研究
 研究課題名 (英文) The effect of stress-induced sympathetic activation on ovarian hormonal function.
 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) : ストレス時に亢進する交感神経が卵巣内分泌機能に与える影響とその機序を麻醉ラットで検討した。卵巣支配の2種の交感神経のうち上卵巣神経のC線維の亢進で卵巣からのエストラジオール分泌低下が起こること、この反応には α_2 アドレナリン受容体が関与することを明らかにした。更に、卵巣交感神経活動を亢進させるストレス刺激である皮膚侵害性刺激が、卵巣エストラジオール分泌を低下することを見いだした。

研究成果の概要 (英文) : The effect of stress-induced sympathetic activation on ovarian hormonal secretion was examined in anesthetized rats. Electrical stimulation of the superior ovarian nerve at a supramaximal intensity for C-fibers decreased the ovarian estradiol secretion rate through the activation of α_2 -adrenoceptors. In addition, noxious mechanical stimulation (pinching) of a hindpaw, which increases ovarian sympathetic nerve activity, also decreased the ovarian estradiol secretion rate.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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, 自律神経, 皮膚刺激, ラット

1. 研究開始当初の背景

卵巣の排卵やホルモン分泌機能は視床下部-下垂体-卵巣系のホルモンにより制御されている。ストレス時には、視床下部からのゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) の分泌が低下することにより、下垂体からのゴナドトロピン (Gn) さらには卵巣ホルモンの

分泌が乱れ、月経不順や無排卵を来すと考えられている (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も良く知られている。卵巣の血管やホルモン産生細胞には自律神経 (主にアドレナリン作動性神経) 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、月経不順や無排卵を来たす一因となる可能性が予想される。しかし、自律神経の卵巣支配については、これまで解剖組織学的研究に留まり、卵巣機能調節に関する生理学的研究は殆ど行われてこなかった。研究代表者は近年、卵巣血流に着目して研究を進め、既に、①卵巣交感神経を電気刺激すると卵巣血流が減少すること、この血流減少にはアドレナリン受容体が関わること、③ストレス刺激（皮膚侵害性刺激）時に交感神経性に卵巣血流が減少することを明らかにした（Uchida et al., 2003; 2005; 2007）。

交感神経の興奮による卵巣血流減少は、卵巣ホルモン分泌の低下をまねく可能性が予想される。さらに、交感神経は卵巣血管だけでなく卵巣ホルモン産生細胞にも分布するため（Burden, 1985）、交感神経が卵巣ホルモン産生を直接的に制御する可能性もある。このような研究の流れから、研究代表者は本研究において、卵巣支配の交感神経が卵巣ホルモン分泌に及ぼす影響を調べ、ストレス時の卵巣機能障害に対する卵巣自律神経の関与を明らかにしたいと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究は、ストレス時の交感神経亢進が卵巣内分泌機能に及ぼす影響とその機序の解明を目的とする。

(1) 交感神経が卵巣ホルモン分泌に与える影響を明らかにする。まず、卵巣からのエストロジオール分泌速度の測定方法を開発する。その上で、卵巣支配交感神経の電気刺激が、卵巣エストロジオール分泌速度に及ぼす影響を調べる。

(2) 交感神経による卵巣ホルモン分泌変化が、直接的なホルモン産生変化によるか、血流変化による二次的変化であるかを明らかにする。さらに、交感神経による卵巣ホルモン分泌調節に関わる受容体を明らかにする。

(3) ストレス時に交感神経を介した卵巣ホルモン分泌変化が起こるかを明らかにする。卵巣の交感神経活動が高まるストレス刺激として皮膚侵害性刺激を用い、皮膚侵害性刺激が卵巣エストロジオール分泌速度に及ぼす影響を調べる。

研究費申請時から既に予備実験を開始し、卵巣エストロゲン分泌速度の安定な測定方法や交感神経刺激の影響等を調べる方法を可能としており、それらの手法を用いて実験を進める。

3. 研究の方法

(1) 卵巣静脈からの採血方法

①動物

非妊娠雌 Wistar ラット、3-6 か月齢を用

いた。エストロジオールを安定に測定するために、膣スメア観察により規則正しい5日周期を示したラットを発情日に実験に用いた（図1A）。

②手術手順

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 0.5 mm、内径 0.2 mm）を右の卵巣静脈に挿入した（図1B）。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。卵巣静脈血を一定間隔で約 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。実験中は 4% Ficoll 70 溶液を 2 ml/h の速さで頸静脈から持続注入した。脱血の影響を少なくするため、非採血時は卵巣静脈血は右大腿静脈にカテーテルを介してシャントさせた。卵巣静脈血から全てのサンプルを採取した後、右の大腿動脈と大腿静脈にそれぞれ挿入したカテーテルを介して、末梢動脈血と末梢静脈血のサンプル（約 140 μ l）をヘマトクリット管に採取した。

③エストロジオール濃度の測定

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。血漿中のエストロジオール濃度をエストロジオール（17 β エストロジオール）EIA キット（Cayman Chemical Co., Michigan, USA）を用いて、酵素免疫法で測定した。

(2) 卵巣支配交感神経の刺激が卵巣エストロジオール分泌速度に及ぼす影響

①卵巣支配交感神経の電気刺激

卵巣には上卵巣神経（SON）と卵巣動脈神

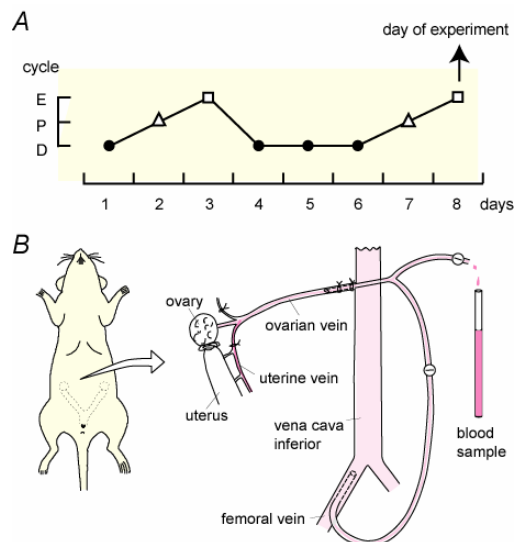


図1 A: 典型的な発情周期（膣スメア観察による）。E: 発情期, P: 発情前期, D: 発情間期. B: 卵巣静脈血の採取方法を示す模式図。

経叢 (OPN) の2種の神経支配がある。そこでSONとOPNを各々電気刺激した。電気刺激のパラメーターは、0.5ms幅の矩形波、20 Hz、20 V (SON) 又は5V (OPN)、5分間とした。

卵巣静脈血サンプルを、電気刺激5分前、刺激開始後1分、10分、20分および30分の合計5回採取し、OPNあるいはSON刺激によるエストラジオール分泌速度の変化を調べた。

②卵巣支配交感神経の誘発電位記録

SONまたはOPNに刺激幅0.5ms、種々の強度(0.1-20V)の電気刺激を加え、誘発電位を記録した。刺激電極と記録電極の間の距離と、誘発活動電位の潜時から最大伝導速度を算出した。

③交感神経による卵巣エストラジオール分泌に関わる受容体の検討

アドレナリン受容体の関与を、 α_1 受容体遮断薬(プラゾシン、0.1mg/kg)、 α_2 受容体遮断薬(ヨヒンビン、1mg/kg)を用いて検討した。

(3)皮膚侵害性刺激によるストレス時の卵巣ホルモン分泌変化

ストレス刺激として皮膚侵害性刺激が卵巣エストラジオール分泌に及ぼす影響を検討した。一側の後肢足蹠を外科鉗子で摘む刺激を5分間加えた。卵巣静脈血サンプルを、皮膚刺激5分前、刺激開始後、1分、10分、20分および30分の合計5回採取し、皮膚刺激によるエストラジオール分泌速度の変化を調べた。

4. 研究成果

(1)卵巣エストラジオール分泌速度の測定方法の開発

麻酔ラットにおいて、安静時の卵巣静脈血

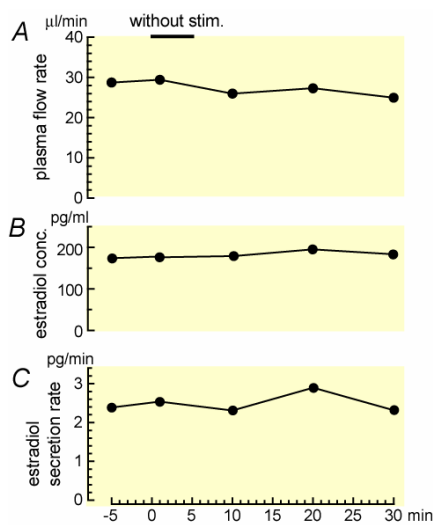


図2 安静時の卵巣血漿流速(A)、卵巣静脈血漿のエストラジオール濃度(B)、およびエストラジオール分泌速度(C)の一例。

漿のエストラジオール濃度の平均は 134.0 ± 13.3 pg/mlだった。一方、末梢動脈血漿と末梢静脈血漿のエストラジオール濃度は、卵巣静脈血漿の値の約1/2で、各々 69.8 ± 6.9 pg/mlおよび 69.9 ± 5.3 pg/mlであった。卵巣静脈血のエストラジオール濃度から、末梢動脈血(卵巣に流入する動脈血)のエストラジオール濃度を差し引いたエストラジオール濃度に卵巣静脈血漿流速を乗じて、分泌速度(pg/min)を算出した。4匹のラットの安静状態における連続した5つのサンプルの卵巣血漿流速(範囲26.0~28.7 µl/min, 図2A)、卵巣静脈血漿のエストラジオール濃度(範囲115.8~173.0 pg/ml, 図2B)、およびエストラジオールの分泌速度(範囲1.5~2.4 pg/min, 図2C)の各値は、35分間安定していた。平均血圧(MAP)の平均の基準値は 109 ± 15 mmHg (n=4)であり、卵巣静脈血サンプルの採取の間、35分間安定だった。

これらの手法を用いて、卵巣のエストラジオール分泌速度を安定して測定する方法を確立できた。

(2)上卵巣神経(SON)と卵巣動脈神経叢(OPN)の電気刺激が卵巣エストラジオール分泌速度に及ぼす影響

①SONとOPNからの誘発電位の記録

SONおよびOPNからは何れも主に無髄C線維の誘発電位が記録された(図3)。電子顕微鏡を用いた形態学的研究において、SONと

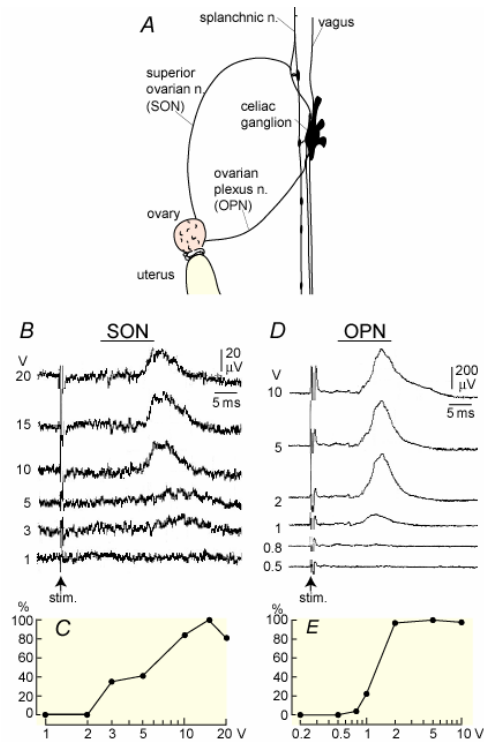


図3 A:卵巣を支配する上卵巣神経(SON)と卵巣動脈神経叢(OPN)の解剖図。SON(B, C)とOPN(D, E)からの誘発電位の記録。

OPN はいずれも多くは無髄線維と僅かな有髄線維が含まれることが報告されている (Lawrence & Burden, 1980; Payer, 1978). 本研究の電気生理学的結果は、上述の形態研究の結果と一致する. 本研究で SON の C 線維の誘発電位は、3V 以上の刺激強度で現れ、15V で最大に達した. SON の C 線維の伝導速度は 1.2 m/s だった. OPN の無髄 C 線維の誘発電位は、0.8V 以上の刺激強度で現れ、2V で最大に達した. OPN の C 線維の伝導速度は 1.1 m/s だった. この結果から、これ以降の実験で、各神経の電気刺激強度は C 線維の最大上刺激 (SON には 20V, OPN には 5V) に設定した.

②SON および OPN 刺激がエストラジオール分泌速度に及ぼす影響

SON および OPN の電気刺激は、何れも刺激中に卵巣血漿流速をそれぞれ刺激前値の $76 \pm 3\%$ および $74 \pm 9\%$ に低下させた (図 A と D). 流速の低下は刺激終了 5 分後には刺激前値近くに回復した. エストラジオール分泌速度は、OPN 刺激では有意に変化しないが (図 4F), SON 刺激中に刺激前値の $53 \pm 6\%$ に低下し、刺激終了 5 分後に回復した (図 4C). 卵巣静脈血漿のエストラジオール濃度 (図 4B, E) と、平均血圧はいずれも SON 刺激や OPN 刺激の影響を受けなかった.

本研究結果から、卵巣エストラジオール分泌は SON により抑制的に調節されることが初めて明らかとなった. SON によるエストラジオール分泌抑制作用は、血流量 (卵巣血漿流速) の減少による二次的影響よりも、エストラジオール合成の直接的な抑制によると考えられる.

Lawrence & Burden (1980) の組織学的研究は、OPN に由来する多くのアドレナリン作動性神経は卵巣血管周囲に終末し、SON に由

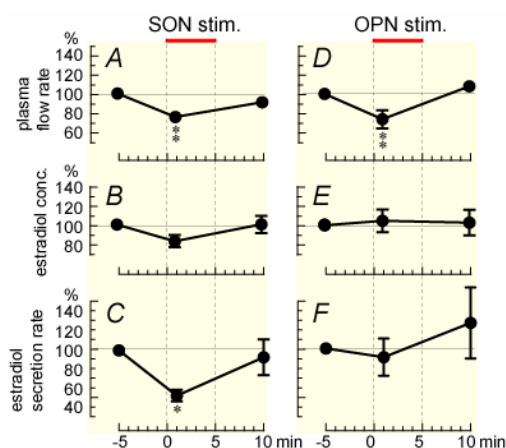


図4 上卵巣神経 (SON, A-C) と卵巣動脈神経叢 (OPN, D-F) の刺激による卵巣静脈血漿流速、卵巣静脈血漿のエストラジオール濃度、エストラジオール分泌速度の変化.

来する多くのアドレナリン作動性神経は血管とステロイド産生間質腺細胞の両者を支配すると報告している. 本研究によって、卵巣血流量 (卵巣静脈血漿流速) の低下が SON と OPN の何れの刺激でも起こるのに対して、エストラジオール分泌速度の低下が SON 刺激でのみ起こった結果は、Lawrence & Burden (1980) の組織学的研究結果と一致する.

③SON によるエストラジオール分泌変化に関わるアドレナリン受容体

SON 刺激で起こるエストラジオール分泌速度低下反応に関わるアドレナリン受容体を調べた. α_1 受容体遮断薬 (プラゾシン) の前投与は、SON 刺激時の卵巣静脈血漿流速の低下反応を消失させたが、エストラジオール分泌速度低下反応には有意な影響を及ぼさなかった (図 5B). 一方、 α_2 受容体遮断薬 (ヨ

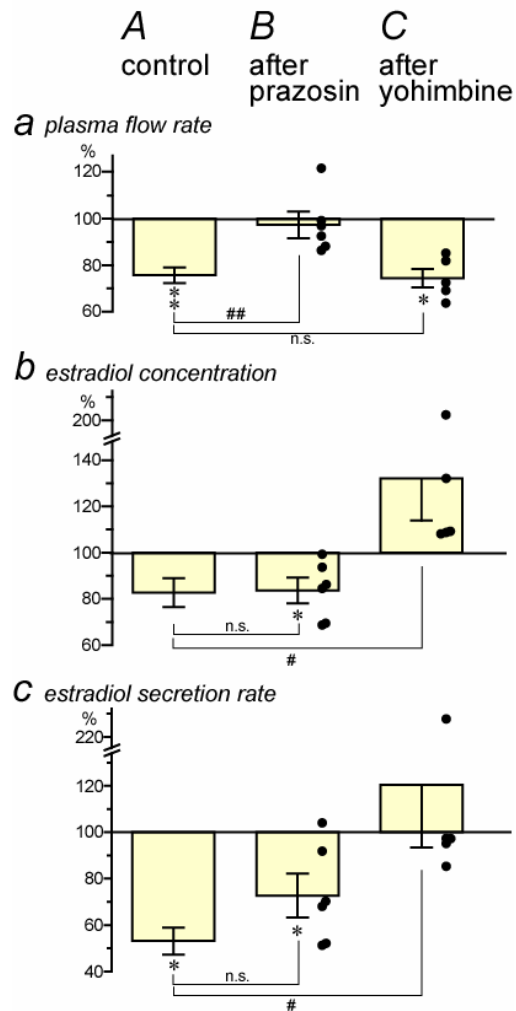


図5 プラゾシン (B) およびヨヒンビン (C) の前投与が、上卵巣神経 (SON) 刺激時の卵巣静脈血漿流速、卵巣静脈血漿のエストラジオール濃度、エストラジオール分泌速度の変化に与える影響. A: 薬物を投与しないコントロールの反応.

ヒンビン)の前投与は, SON 刺激時の卵巣静脈血漿流速の低下反応には有意な影響を及ぼさなかったが, エストラジオール分泌速度低下反応を消失させた (図 5C). この結果から, SON による卵巣エストラジオール分泌抑制には α_2 受容体が, 卵巣血管収縮反応には α_1 受容体がそれぞれ関与することが明らかとなった.

(3) 皮膚侵害性刺激によるストレス時の卵巣ホルモン分泌変化

皮膚侵害性刺激が卵巣エストラジオール分泌速度に及ぼす影響を検討した.

一側の後肢足蹠を外科鉗子で摘む侵害性機械的刺激を加えると, 卵巣エストラジオール分泌速度が低下した. 刺激中から低下し始め, 刺激終了後 15 分で投与前値の約 40% に低下した, その後徐々に回復した. 皮膚侵害性刺激後に分単位の速い時間経過で認められるエストラジオール分泌速度の低下には, 神経性機序が関与する可能性が高い.

(4) 成果のまとめと今後の展望

本研究は, ストレス時に亢進する卵巣支配の交感神経活動亢進が, 卵巣のエストラジ

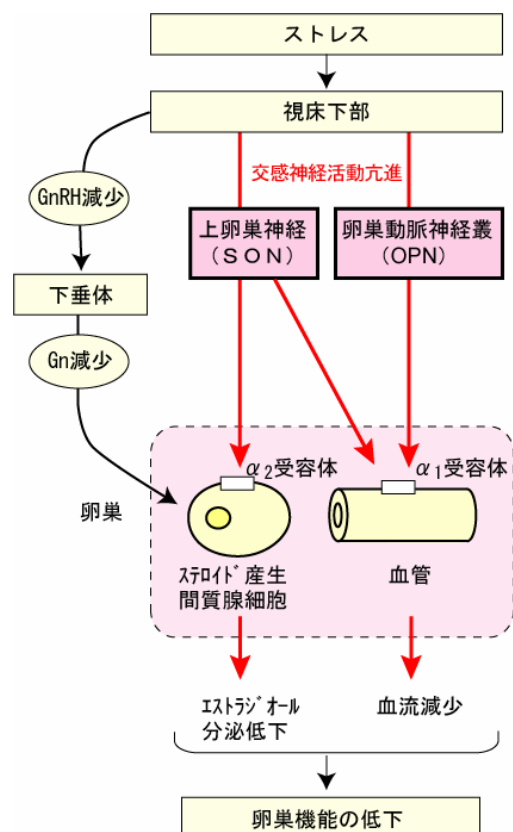


図 6 本研究成果を示す模式図. ストレスは既に知られていた視床下部-下垂体系の不調 (図左) に加えて, 交感神経活動亢進による卵巣のエストラジオール分泌低下と血流低下を起こすことを明らかにした.

ール分泌を低下させることを明らかにした (図 6). 卵巣を支配する交感神経のうち, 上卵巣神経 (SON) は卵巣エストラジオール分泌低下と卵巣血流低下を起こし, 卵巣動脈神経 (OPN) はエストラジオール分泌には影響を及ぼさずに血流低下のみを起こす. エストラジオール分泌低下反応には α_2 受容体, 血流低下反応には α_1 受容体の関与を明らかにした. さらに, 卵巣交感神経活動を亢進させるストレス刺激である後肢皮膚侵害性刺激が, 卵巣エストラジオール分泌を低下させることを見いだした.

ストレス時の交感神経亢進による卵巣の血流不足や卵巣エストラジオール分泌低下は, 無排卵といった卵巣機能障害の一因となりうる. 本研究成果は, ストレスで生じる卵巣機能低下の原因として, これまで考えられてきた視床下部-下垂体-卵巣系のホルモン分泌の不調に加えて, 卵巣交感神経亢進による卵巣内分泌機能低下という新たな機序を示した. 今後更に, 交感神経亢進が卵巣エストラジオール分泌を低下させる機序や, 交感神経亢進が排卵に与える影響などを解明する必要がある. そして, ストレスによる卵巣機能障害を軽減するために, 卵巣交感神経活動を抑制する手法を開発する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 11 件)

- ①. 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, 2010, in press.
- ②. Uchida, S., Kagitani, F., Watanabe, F., 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.
- ③. Kagitani, F., Uchida, S., Hotta, H., Effects of electrical stimulation of the superior ovarian nerve and the ovarian plexus nerve on the ovarian estradiol secretion rate in rats. *Journal of Physiological Sciences*, 査読有, 58 巻, 2008, 133-138.

- ④. Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H., Mechanism of the reflex inhibition of heart rate elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*, 査読有, 143 巻, 2008, 12-19.
- ⑤. Uchida, S., Hotta, H. Acupuncture affects regional blood flow in various organs. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 査読有, 5 巻, 2008, 145-151.
- ⑥. Uchida, S. Somatosensory modulation of ovarian blood flow in rats. *The Autonomic Nervous System*, 査読無, 45 巻, 2008, 43-49

[学会発表] (計 33 件)

- ①. 内田さえ, 鍵谷方子, 堀田晴美 “卵巣自律神経の形態及び機能の加齢変化” 第 37 回自律神経生理研究会, 2009 年 12 月 5 日, 東京
- ②. 内田さえ, 鍵谷方子, 花田智子, 堀田晴美 “卵巣自律神経の加齢変化” 第 62 回日本自律神経学会総会, 2009 年 11 月 5-6 日, 和歌山
- ③. Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H. “Neural mechanism of reflex inhibition of heart rate elicited by acupuncture-like stimulation in anesthetized rats.” 6th Congress of The International Society for Autonomic Neuroscience, Sep. 1-4, 2009, Sydney
- ④. 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, July 27-Aug. 1, 2009, Kyoto
- ⑤. Uchida, S.: “Neural mechanism of acupuncture effects on cardiac function.” 36th International Congress of Physiological Sciences, July 27-Aug. 1, 2009, Kyoto
- ⑥. Kagitani, F., Uchida, S., Hotta, H. “Regulation of the ovarian estradiol secretion rate by superior ovarian nerve in rats.” 24th Meeting of British Society for Neuroendocrinology, June 28-30, 2009, Edinburgh
- ⑦. 内田さえ, 鍵谷方子, 堀田晴美 “卵巣自律神経の電気刺激が卵巣エストロゲン分泌速度に及ぼす影響” 第 36 回自律神経生理研究会, 2008 年 12 月 6 日,

東京

- ⑧. Uchida S., Kagitani, F., Hotta H. “Autonomic nervous regulation of ovarian estradiol secretion rate in rats.” 第 31 回日本神経科学大会, 2008 年 7 月 9-11 日, 東京
- ⑨. 内田さえ, 金井千恵子, 花田智子, 堀田晴美 “卵巣自律神経の形態および機能の加齢変化” 日本基礎老化学会第 31 回大会, 2008 年 6 月 12-13 日

[図書] (計 2 件)

- ①. 内田さえ 3. 神経系 3.1 反射 b) 成人～老年, からだの年齢事典, 鈴木隆雄, 衛藤隆 (編), p57-63, 朝倉書店, 東京, 2008
- ②. 内田さえ, 花田智子, 6 章 生殖・成長と老化, コメディカルのための専門基礎分野テキスト 生理学 2 版 (黒澤美枝子, 長谷川薫 編), p138-149, 中外医学社, 東京, 2008.3 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 : 9 0 2 7 0 6 6 0