

機関番号：32686

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21700596

研究課題名 (和文) 体温調節機構におけるセロトニンネットワークの役割解明

研究課題名 (英文) Role of serotonergic network on thermoregulatory system

研究代表者

石渡 貴之 (ISHIWATA TAKAYUKI)

立教大学・コミュニティ福祉学部・准教授

研究者番号：40435235

研究成果の概要 (和文)：

脳内セロトニン (5-HT) は体温調節機構において主要な神経伝達物質であることが示唆されている。本研究では、熱放散系に関与する部位である腹側被蓋野 (VTA) に注目し、VTA の体温調節機構における 5-HT の役割を解明することを目的とした。体温調節が活発になる暑熱・寒冷暴露中の VTA の 5-HT の変動、又は VTA の 5-HT を増加させた時の体温調節反応を観察した。その結果、VTA の 5-HT は体温調節機構における熱放散機能に関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

It is suggested that brain serotonin (5-HT) is the main neurotransmitter in the thermoregulatory system. The purpose of present study was to clarify the role of 5-HT in the ventral tegmental area (VTA) on thermoregulatory system. We observed the change of 5-HT of VTA during heat or cold exposure. In addition, we observed the change of thermoregulatory responses when 5-HT in the VTA was increased. As a result, it was suggested that 5-HT in the VTA mainly regulates heat loss regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：環境生理学，運動生理学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学，身体教育学

キーワード：体温調節，神経伝達物質，セロトニン，腹側被蓋野，マイクロダイアリシス

## 1. 研究開始当初の背景

“ADHD (Attention Deficit Hyperactivity Disorder：注意欠陥・多動性障害)” の子供達が、教育現場で問題になっている。この“ADHD”という現象は、環境の変化による行動異常であり、原因は脳内の抑制や制御を司る領域の神経伝達物質のバランスの乱れか

ら起こると考えられている。また、“躁鬱状態”もセロトニン (5-HT)，ドーパミン (DA)，ノルエピネフリン (NE) の脳内神経伝達物質のバランスの乱れによって誘発されるとの報告例が存在し、運動パフォーマンスを左右する“中枢性疲労”においては、5-HT と DA のバランスによって決定されることが報告

されてきた。この様に近年、行動レベルは脳内の複数の神経伝達物質の相互作用によって調節されていると考えられ、更に、行動レベルは脳全体の神経伝達物質のバランスではなく、特定領域の神経核での神経伝達物質のバランスによって調節されていると考えられるようになってきた。

我々の生命維持に必要な不可欠である“体温調節”においても同様に、脳内神経伝達物質による調節が重要である。本研究では特に中枢神経系に広く存在し、睡眠、摂食、性行動や認知・記憶などの様々な制御に関与している 5-HT の役割に注目し、体温調節機構におけるその役割と特定部位の解明を目的としている。

## 2. 研究の目的

本研究では、熱放散系に関与する部位である腹側被蓋野 (Ventral tegmental area; VTA) に注目し、VTA の体温調節機構における 5-HT の役割を解明する。初年度は体温調節が活発になる暑熱暴露時及び寒冷暴露時の VTA の 5-HT 放出量の経時的変化を測定し、温熱刺激による反応を検討する。更に暴露中にテロドトキシンにより VTA の神経活動を抑制したときの体温調節反応を観察する。

次年度は、複数の 5-HT 作動薬により VTA の 5-HT 量を変化させた時の深部体温、熱産生反応 (心拍変動) と熱放散反応 (皮膚温変動) を測定することにより、VTA の体温調節機構における 5-HT の役割を明確にする。

## 3. 研究の方法

本研究ではマイクロダイアリシス (脳内微量透析) 法とテレメトリー (無線式小型体温計) 法の組み合わせに加え、液体クロマトグラフィー法により腹側被蓋野 (VTA) のセロトニン (5-HT) 放出量の計測を行い、体温調節機構における VTA の 5-HT の役割の考察を深める。効果器系の反応として心拍数 (熱産生反応の指標) と尾部皮膚温 (熱放散反応の指標) の測定を同時に行う。

ネジレン (RC-2000, Osaka Microsystem Ltd., Japan) を用いて、実験中の動物の自由な行動を妨げることなく、ダイアリシスプローブへの灌流液の灌流と尾部皮膚温の測定を両立させる。灌流液はダイアリシスポンプ (ESP-32, Eicom, Japan) を用いて流速  $1\mu\text{l}/\text{min}$  で灌流する。尾部皮膚温を測定するため、尻尾基部より 10mm にアルメルークロメル熱電対を接着する。熱電対はプラスチックカバーとコイルにより動物に噛まれるのを防ぐ。灌流液の灌流と同時に、深部体温、心拍数、尾部皮膚温および活動量を 1 分毎に測定する。5-HT の回収は 10 分毎に行い、液体クロマトグラフィーにて分析する。

我々は実験手法に伴う問題点を最小限に

排除し、より生理的状态に近い生体反応を測定するために、テレメトリー法とマイクロダイアリシス法を同時に用いている。テレメトリー法は予め無線式小型体温計を腹腔内に埋め込むため、実験時に動物に与える侵襲性や恐怖感を最小限に抑え、無麻酔・無拘束下の動物の深部体温、心拍数、活動量を生理的状态に近い状態で測定することが出来る方法である。マイクロダイアリシス法は微量透析プローブを用い、同じく無麻酔・無拘束動物における薬理刺激、そして神経伝達物質を *in vivo* で経時的にサンプリングする簡便にして効率的な方法であり、従来用いられてきたマイクロインジェクション法よりも脳組織への損傷が少ないと考えられている。特にマイクロダイアリシス法は脳科学の研究分野において、現在欠かすことの出来ない実験手法の一つである。しかしながら、きわめて限局された部位へ挿入する必要があるため、その実験手法は非常に困難であり、体温調節研究の分野において、これらの手法を用いて神経薬理的刺激又は神経伝達物質の回収を行った研究は極めて少ない。

研究を遂行する上での具体的な方法について、動物の飼育から手術、実験系、実験プロトコルまでを以下に詳細に述べる。

2009 年度：暑熱・寒冷暴露時の腹側被蓋野 (VTA) の 5-HT 放出量の計測

実験動物：

実験には体重 240~260g の雄 Wistar ラットを使用する。動物は人工気候装置を用いて 12h:12h の明暗サイクル (6:00-18:00 明期)、環境温 23°C、湿度 50% で飼育する。実験中以外の時間は、水、餌の摂取を自由とする。なお本研究は、日本学術会議の動物実験ガイドライン及び日本生理学会の動物実験指針に従って行う。

無線式小型体温計手術：

深部体温、心拍数、活動量を測定するために、無線式小型体温計 (TA10ETA-F20, Data sciences, USA) を腹腔内へ埋め込む手術を実験より 1 週間以前に行う。ネブタール麻酔のもと、動物の腹部の皮膚を約 2cm 切開し、腹直筋を露出させ、切開する。ここから無線式小型体温計を腹腔内へ挿入し、移動しないように縫合糸を用いて腹直筋へ縫い付ける。心拍数測定用の電極線は胸部筋肉および腹部筋肉に縫合糸で縫い付ける。その後、切開した腹筋、皮膚をそれぞれ縫する。なお、先述の手術同様に、シート状のヒーターを用いて動物の体温を維持する。

マイクロダイアリシスプローブ手術：

マイクロダイアリシスプローブ

(A-I-8-02(22G), Eicom, Japan)をVTAへ挿入する手術を実験の2~3日前に行う。プローブ先端の透析膜はカットオフ分子量6,000のセルロース製で、膜長1.0mm, 外形0.22mmの形状のものを使用する。ネンブタール麻酔(50 mg/kg, intraperitoneal, Abbott laboratory, USA)のもと、動物の頭部を脳定位固定装置へ設置する。手術中は麻酔による動物の体温低下を防ぐため、37℃を維持するように設定したシート状のヒーター

(CAM150, CMA/Microdialysis AB, Sweden)を用いて動物の体温を維持する。頭頂付近の皮膚を約1cm切開し、頭蓋骨を露出させ、ブregmaの位置を確認する。プローブを挿入するためドリルを用いて頭蓋骨に穴を開け、プローブ先端の透析膜の位置がVTA (bregmaから後位4.8mm, 側位0.4mm, 腹位8.4mm;

Paxinos and Watson, 1982)となるように挿入する。2本のステンレス製ネジをアンカーとして頭蓋骨に埋め込み、これをプローブと共にデンタルセメントで頭蓋骨に固定する。はじめに切開した皮膚を接着剤で塞いだ後、動物を脳定位固定装置から外し、ケージに移す。麻酔と傷口の回復、及び動物を実験環境下に慣れさせる為に、動物に2~3日間の安静期間を与える。

#### 実験プロトコル：

実験はすべて明期(6:00-18:00)の間に行う。実験開始前に動物に挿入されたダイアリスプローブのインレットにマイクロインジェクションポンプを繋ぎ、尾部皮膚温測定用アルメルクロメル熱電対をキネシオテープで接着した後、人工脳脊髄液の灌流を開始する。動物の深部体温と心拍数、および尾部皮膚温がダイアリスプローブを実験系に繋ぐ直前の値まで安定した時点を測定開始時間とする。すべての実験は測定開始から1時間を安静期間とする。測定開始60分後の平均体温、心拍数、活動量および尾部皮膚温を基準値として統計分析を行う。暑熱暴露

(35℃)および寒冷暴露(5℃)はそれぞれ3時間行う。テトロドトキシン(TTX)実験は環境温度23℃の下で行い、1時間の安静期間後にTTX(5 $\mu$ M)溶液の灌流を1時間行う。なお、TTX溶液灌流中以外は人工脳脊髄液を灌流する。実験終了後、プロモフェノールブルー(0.2%)を灌流させてダイアリスプローブ先端の透析膜近傍の組織を染色し、脳を摘出する。脳をホルマリンで固定後、厚さ100 $\mu$ mの切片標本作製しプローブ挿入位置を組織学的に確認する(Ishiwata et al., 2004)。

2010年度度：腹側被蓋野(VTA)の5-HT量を変化させた時の体温調節反応

基本的に平成21年度と同じ条件で実験を

行う。VTAに5-HT作動薬を灌流し、VTAの5-HT量を変化させた時の体温調節反応および5-HT放出量を計測する。薬理刺激実験は環境温度23℃の下で行い、1時間の安静期間後に5-HT作動薬(Fluoxetine, 8-OH-DPATなど)の灌流を1時間行う。なお、5-HT作動薬灌流中以外は人工脳脊髄液を灌流する。薬理刺激の濃度は参考文献を基に、幾つかの濃度を試みる。

#### 4. 研究成果

初年度は体温調節が活発になる暑熱暴露時及び寒冷暴露時のVTAの5-HT及びドーパミン、ノルアドレナリン放出量の経時的变化を測定し、温熱刺激による反応を検討した。暑熱暴露によりラットの体温は約1.5℃上昇した。体温調節反応を見ると熱放散の指標である尾部皮膚温は上昇し、熱産生の指標である心拍数は減少した。このことより、暑熱暴露中には積極的な熱放散活動が行われていることが分かる。この体温調節反応が活発になっている時のVTAの5-HT及び5-HTの代謝産物である5-HIAAは、暴露開始1時間後に上昇する傾向が認められた。またドーパミンの代謝産物であるDOPACは逆に暑熱暴露開始後から減少することが観察された。ノルアドレナリンは暑熱暴露中に変化しなかった。寒冷暴露中はラットの体温は約0.8℃上昇した。尾部皮膚温は低下し、心拍数は増加した。このことより、寒冷暴露中には積極的な熱産生活動が行われていることが分かる。しかしながら、この時のVTAの5-HT、ドーパミン、ノルアドレナリンの顕著な変動は認められなかった。すなわち、暑熱暴露中のVTAの神経活動の調節には、5-HT系およびドーパミン系の両方の関与が示唆された。

次年度は基本的に昨年度と同じ条件で実験を行い、VTAに5-HT作動薬を灌流し、VTAの5-HT量を変化させた時の体温調節反応および5-HT放出量を計測した。薬理刺激実験は環境温度23℃の下で行い、1時間の安静期間後に5-HT再取り込み阻害剤(Fluoxetine, Citalopram)の灌流を1時間行った。なお、5-HT作動薬灌流中以外はRinger液を灌流した。薬理刺激の濃度は参考文献を基に、幾つかの濃度を試みた。実験終了後、プロモフェノールブルー(0.2%)を灌流させてダイアリスプローブ先端の透析膜近傍の組織を染色し、脳を摘出した。脳をホルマリンで固定後、厚さ100 $\mu$ mの切片標本作製しプローブ挿入位置を組織学的に確認した。

FluoxetineまたはCitalopramの灌流投与により、VTAの5-HTが有意に増加した。ノルアドレナリン、ドーパミンは多少増加したものの、統計的に有意差は認められなかった。VTAでの5-HTの増加に伴い、ラットの深部体温は約0.5℃低下し、熱放散の指標である尾

部皮膚温の上昇を伴った。熱産生の指標である心拍数の変動は見られなかった。

以上の結果より、VTAの5-HTは体温調節機構における熱放散機能に関与していることが示唆された。

## 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 1件)

①Takayuki Ishiwata, Satomi Takatsu, Hiroshi Hasegawa, Shigeki Nomoto, Role of serotonin in the ventral tegmental area on thermoregulation of freely moving rats, The Journal of Physiological Sciences, Supplement 1, 査読無, 61, 2011, P243

[学会発表] (計 1件)

①石渡貴之, 体温調節機構における腹側被蓋野のセロトニンの役割, 第88回日本生理学会大会, 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会, 2011年3月29日, パシフィコ横浜・会議センター (震災のため誌上発表)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石渡 貴之 (ISHIWATA TAKAYUKI )  
立教大学・コミュニティ福祉学部・准教授  
研究者番号: 40435235

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし