

立教大学学術推進特別重点資金(立教SFR)
 個人研究費
 2008年度研究成果報告書

研究代表者	所属・職名	氏名
	コミュニティ福祉学部・助教	石渡 貴之 印
研究課題	体温調節機構における腹側被蓋野のセロトニンの役割解明	
研究期間	2008年度	
研究経費	500,000円	

研究の概要(200~300字で記入、図・グラフは使用しないこと)

我々ヒトを含む恒温動物は、個体内部の熱産生量が増えた時や外界の温度が変動した時に、深部体温を一定の範囲内に保つ体温調節機能を備えている。今後益々地球温暖化が進む中で、体温調節機能の維持、向上は重要な課題であり、その中枢における基本的なメカニズムを解明する必要がある。

脳内の調節機構には、神経細胞を促進または抑制する神経伝達物質の働きが極めて重要である。その中でも、セロトニン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に注目し、腹側被蓋野の体温調節機構におけるセロトニンの役割を解明することを目的とした。

キーワード(研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[体温調節] [セロトニン] [腹側被蓋野]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)**成果 1 : 実験系の確立**

新たに挑戦する脳部位，実験のため，先ずは実験系の立ち上げに時間を費やした．試行錯誤の結果，最終的に安定したデータが取れるまでに実験系の確立が成功した．以下に実験系の詳細を示す．なお，動物に関する実験は全て独立行政法人東京都長寿医療センター東京都老人総合研究所にて行った．

実験系概要：

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（Ventral tegmental area : 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 の役割の考察を試みた．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）の測定を行った．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ことができた．灌流液はダイアリシスポンプ（ESP-32, Eicom, Japan）を用いて流速 $1\mu\text{l}/\text{min}$ で灌流した．尾部皮膚温を測定するため，尻尾基部より 10mm にアルメルクロメル熱電対を接着した．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いだ．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 分毎に測定した．5-HT およびその代謝産物，そして他の神経伝達物質（ドーパミン，ノルアドレナリン）の回収は 20 分毎に行い，液体クロマトグラフィーにて分析した．

実験動物：

実験には体重 240～260g の雄 Wistar ラット（Clea Japan.Inc., Japan）を使用した．動物は人工気候装置を用いて 12h:12h の明暗サイクル（7:00-19:00 明期），環境温 23℃，湿度 50% で飼育した．実験中以外の時間は，水，餌の摂取を自由とした．なお本研究は，日本学術会議動物実験ガイドライン，日本生理学会動物実験指針及び独立行政法人東京都長寿医療センター東京都老人総合研究所倫理規定に従い行った．

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 3 日前に行った．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した．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した．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（CMA150, CMA/Microdialysis AB, Sweden）を用いて動物の体温を維持した．頭頂付近の皮膚を約 1cm 切開し，頭蓋骨を露出させ，ブレグマの位置を確認した．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 8.2mm; Paxions and Watson, 1982) となるように挿入した．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した．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，ケージにした．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た．

研究成果の概要 (つづき)

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 週間以前に行った．ネン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，切開した．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た．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た．その後，切開した腹筋，皮膚をそれぞれ縫した．なお，手術中はシート状のヒーターを用いて動物の体温を維持した．

実験プロトコル：

実験はすべて明期(7:00-19:00)の間に行った．ハロタン麻酔のもと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した．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測定開始時間とした．すべての実験は測定開始から 1 時間を安静期間とした．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た．暑熱暴露（35℃）および寒冷暴露（5℃）はそれぞれ 3 時間行った．実験終了後，ブ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 μ m の切片標本を作製しプローブ挿入位置を組織学的に確認した．

成果 2：暑熱暴露中の VTA の 5-HT 変動

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神経伝達物質の変動が興味深いところだが，残念ながら 5-HT は非常に微量であるため検出が困難であった．しかし，5-HT の代謝産物である 5-HIAA は確実に検出でき，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．ノルアドレナリンも検出できたが，暑熱暴露中に変化しなかった．

今後例数を追加し，更なる検討を行う必要があるが，現段階では 5-HT 系およびドーパミン系の両方により，暑熱暴露中の VTA の神経活動を調節している可能性が示唆された．

成果 3：VTA 電気刺激時の体温調節反応

ウレタン麻酔下において VTA を電気刺激した時の心拍数および尾部皮膚温の変動を観察した．電気刺激後の心拍数の変動に関しては一概に同じ反応は現れなかった．VTA の吻側と尾側で反応が異なる可能性が示唆された．尾部皮膚温の変動は麻酔下では現れにくいことが確認された．

今後の課題

体温調節機構における VTA の神経伝達物質の役割を解明するには，やはり代謝産物ではなく 5-HT，ドーパミンそのものを検出，分析する必要がある．その為にはより検出感度の良い電気化学検出器が必要になる．