

エストロゲンによる個体維持から繁殖への機能的モード  
変換に関する研究

三 浦 弘

①

エストロゲンによる個体維持から繁殖への機能的モード  
変換に関する研究

1998年

東京大学大学院農学生命科学科  
獣医学専攻

三浦 弘

## 目次

### 第1章 総合緒言

1-1 序	2
1-2 繁殖戦略と代謝系	3
1-3 E2の作用と代謝モード変換機構の想定	5
1-4 卵巣摘除雌ラットに対するエストロゲン投与の影響	6
1-5 本論文の構成	7

### 第2章 E2投与による体重、摂食量及び摂水量の変化

2-1 緒言	10
2-2 材料と方法	11
2-3 結果	12
2-4 考察	13
2-5 小括	15
2-6 第2章の図	16

### 第3章 E2投与による回転活動量の変化

3-1 緒言	24
3-2 材料と方法	25
3-3 結果	26
3-4 考察	27
3-5 小括	31
3-6 第3章の図	32

## 第4章 E2投与による脳内一酸化窒素合成酵素及び

### アミノ酸動態の変化

4-1 緒言	44
4-2 材料と方法	46
4-3 結果	48
4-4 考察	49
4-5 小括	50
4-6 第4章の図	51

## 第5章 総合考察

5-1 エストロゲンが代謝に与える影響とその意義	56
5-2 代謝モード変換と繁殖戦略	59
5-3 繁殖戦略にかかわるその他の要素について	60
5-4 まとめ	61
5-5 第5章の図	63

総括	66
----	----

謝辞	71
----	----

引用文献	72
------	----

## 第1章 総合緒言



## 1-1 序

“全ての動物は自身の適応度を上げるべく行動する”。これは現代動物行動学の根幹とも言うべき基本的ドグマであり、これに矛盾する事実は現在の所発見されていない。これは内分泌や免疫機能といった生理学的観点に対しても言えることである。高等動物の場合、繁殖成功をおさめて自身の有する遺伝子セットを次世代に継承していくためには、生存に不可欠な個体維持活動と子孫を残していくための繁殖活動という二つの局面で適応度を上げていく事が必要不可欠である。しかし個体を維持しつつ繁殖活動のためのエネルギーを確保することは全ての動物にとって困難な問題である。この二つの活動はともに大きなエネルギー消費を伴い、限られたエネルギー摂取量のなかでお互いを脅かしかねないからである。

繁殖のためのエネルギー確保は雌動物、特に妊娠、出産、泌乳などによって大きなエネルギーコストを負う哺乳類の雌動物にとって特に困難なものであると言えよう。従って雌動物が繁殖活動を行う場合、同時にその個体の代謝的活動全般が繁殖活動のための代謝エネルギーを確保するための準備を整える必要がある。すなわち行動や代謝を変化させることによってエネルギー供給を増やし、消費を少なくすることによって繁殖のための代謝エネルギーを確保することがそれにあたり、この背景には代謝エネルギーの巧妙な分配調節機構の存在が想定される。この機構の働きにより、非繁殖期には個体維持のためだけに代謝エネルギーを費やし、繁殖期にはエネルギー需要を減らし、供給を増やすことによって遺伝情報継承のための最重要課題である繁殖活動にもエネルギーを振り向ける。これは個体維持優先モードと繁殖優先モードを状況に応じて切り替える、いわば生命機能のモード変換機構にたとえることができる。

この仮想的な中枢機構は、自律神経系が視床下部を最高中枢として情動反応などと関連して交感神経と副交感神経の優位性を切り換えるのと同様に、内分泌や代謝に関する情報をうけて個体維持優先モードと繁殖優先モードを切り替えることによって摂食行動、体重、自発活動量に働きかけるのではないかと仮定される。そして、その機構切換の鍵を握る主要因の一つは、雌動物の繁殖活動のほぼ全ての局面に深くかわり、個体の生存には必須でないまでも子孫を残していく上では必要不可欠であることが知られているE2 (Estradiol-17 $\beta$ ) である事が推察されるのである。

本研究においては、繁殖活動に伴って個体全般の代謝状態を切り替える中枢機構が

存在し、これが性成熟に伴って放出され始めるE2の血中濃度上昇を契機として個体維持優先モードから繁殖優先モードへの代謝系全般の恒常性モード切替を起こす事によって全身の代謝状態が統一的に制御され、体重、摂食量、活動量などがこれを反映して変化していくという作業仮説の元に、E2投与による体重、摂食量、活動量及び脳内NO（脳内一酸化窒素、Nitric oxide）及びアミノ酸動態の変化を詳細に解析することによりこの機構の働きを探ることを目的に研究を行った。

## 1-2 繁殖戦略と代謝系

繁殖と代謝との間に密接な関連性のある事は、既にチャールズ・ダーウィンが「種の起源」のなかでふれている[Darwin, 1859]。彼は、多くの家畜動物が同じ種の野生種よりも繁栄しているのは餌を獲得するためのエネルギーが最小限ですむことが理由の一つであろうと指摘している。これらのことは尾黒鹿、兎、カンガルーなどで、野生の動物と飼育動物との比較研究によって確認されている[Mueller & Sadlier, 1979; Sadlier, 1969a; 1969b]。また、餌が足りないと春機発動の遅れや発情間期の延長が起こり、餌が十分あればこれらが早まるという事実は古くから家畜繁殖の現場で経験的に知られており、生産効率の面で非常に重要であることから羊 [Allen & Lamming, 1961]、豚 [Dickerman et al, 1964]、肉牛 [Lammond, 1970]などの多くの家畜種で研究されてきた。

このような現象が起こるのは、ダーウィンが指摘したように哺乳類の雌動物の繁殖活動にはきわめて大きなエネルギーが必要であることがその理由であろう。発情期の性行動や排卵は代謝エネルギー消費の上昇を伴い、妊娠した場合の胎児の成長はばく大なエネルギー消費を必要とし、また出産は母体に大きな負担と危険をもたらす。その後の泌乳は哺乳類にとって最もエネルギー消費の大きい生理的活動の一つであり、また母性行動の発現によって子どもを育てなければならない。こうした大きなコストをまかなうため、大量の代謝エネルギーが繁殖活動に振り向けられ、このエネルギーを確保するために多くの代謝的活動が変化して繁殖成功に向けた準備を進めることになるが、このための戦略は種によって異なっているようである[Wade & Schneider, 1992]。

例えばラットの場合、妊娠中は摂食量が増加するとともに、脂肪組織を蓄積する

[Flint et al, 1979; Glass et al, 1987; Moore & Brasel, 1984; Naismith et al, 1982; Steingrimsdottir et al, 1980]。蓄積した脂肪は妊娠後期の胎児の成長と出産後の泌乳のために消費される[Spray, 1950]。ハムスターの場合、妊娠中は餌の貯蓄活動が上昇して巣に餌を蓄積するが摂食量は上昇せず、脂肪蓄積を取り崩すことによって胎児のためのエネルギーを得る[Quack & Trayhurn, 1990; Wade et al, 1986; Zucker et al, 1972]。そして泌乳期に至って摂食量が上昇し、巣に蓄積した餌を消費するのである[Fleming, 1978; Fleming et al, 1983]。ヒトは外部環境によって戦略を変え、食料事情がいい場合はラットに似たパターンを、そうでない場合はハムスターに似たパターンをとるとされている[Prentice et al, 1989]。さらにクマ、アザラシ、ヒゲクジラ類の多くの種はあらかじめ脂肪を蓄積し、泌乳中は餌を食べずこれによって個体維持と繁殖を行う[Ofstedal, 1993]。

しかしこうした巧妙な繁殖戦略にもかかわらず、母体の個体維持活動に支障をきたしてしまえば繁殖成功は望めなくなってしまう。母体の健康障害は胎子や乳子の生存率にまで影響を及ぼし、さらに万が一母体が死亡してしまうとこれらの子供も生存できないからである。この事態を避けるために、雌動物は栄養条件が悪いと繁殖活動を一時的に停止し、自身の個体維持を優先する場合が多い。前述の家畜での知見の他に、実験用齧歯類のラット[Howland, 1972a 1972b; Jackson, 1915; Kennedy, 1963a; 1963b; Schenck et al, 1980]、マウス[Hamilton & Bronson, 1985; 1986; Marsteller & Lynch, 1983; McClure, 1966; Merson & Kirkpatrick, 1981; 1983; Perrigo & Bronson, 1983]、モルモット、ハムスター[Howland & Skinner, 1973; Morin, 1975; Printz & Greenwald, 1970]などで、代謝エネルギー不足による繁殖活動の抑制が引き起こされることが示されている。ヒトにおいても栄養不足の状態[Chakravarty et al, 1982; Kurin et al, 1984]や神経性拒食症[Falk et al, 1983]、あるいは運動量の多いマラソン選手[Glass et al, 1987]やダンサー[Abraham et al, 1982]などの女性に生理不順が見られることがある。これらは他の健康障害を伴わず、マウスを使った実験でも個体維持機能が正常のままで繁殖抑制を引き起こせることが示されている[Merson & Kirkpatrick, 1983]ことなどから、これは病的反応ではなく母体を保護して次の繁殖機会を待つことによって繁殖率を高める生殖戦略の一環とみなすことができよう。

このように雌個体が繁殖活動に伴って代謝活動を変化させたり、あるいは逆に代謝



状況によって繁殖に影響を与えたりする事実に基づき、以下のようなプロセスが想定される。つまり、中枢機構においては代謝状況が常にモニターされ、個体が出たエネルギーは全て個体維持あるいは成長のために費やされる。そして雌動物の場合、繁殖期に至って栄養条件が悪ければ繁殖は抑制されるが、繁殖可能な栄養条件であれば直接繁殖活動が誘起されるとともに繁殖のためのエネルギーを確保するために代謝全般を変化させるというものである。これを個体の恒常性の面から解釈すると、哺乳類雌動物には個体維持優先モードと繁殖優先モードの二つの恒常性の代謝モードが存在し、繁殖状況に応じてこの二つが巧妙に切り替えられると見ることができる。

### 1-3 E2の作用と代謝モード変換機構の想定

哺乳類の雌動物の繁殖活動は、視床下部-下垂体-卵巣軸の活動によって支配されている。非繁殖期には卵巣からのエストロゲンが視床下部に働いてGnRH（性腺刺激ホルモン放出ホルモン、gonadotropin releasing-hormone）分泌を抑制し、続く下垂体からのLH（黄体形成ホルモン、lutening hormone）分泌をも抑制して卵巣の発育を抑制するという負のフィードバックが成立している。卵巣が徐々に発達していき、エストロゲン分泌が上昇することにより、正のフィードバックが働いてGnRHの一過性大量放出（GnRHサージ）、続いてLHサージを引き起こし、これによって排卵が起こり、また発情行動が誘起される[鈴木ら, 1988]。

以上のように繁殖活動は中枢から末梢に至る一連の内分泌活動の結果として生じるが、特に直接繁殖活動を誘起する主要なエストロゲンであるE2は、雌動物の繁殖活動の内分泌学的並びに行動学的な局面に深くかかわっており、個体の生存にそれ自体が必須の要因とはいえないまでも子孫を残していくための最も重要なホルモンの一つであると言える。しかし直接的に繁殖活動に関わる他に、E2には体重増加抑制や摂食量抑制[Sieck et al, 1978; Tarttelin & Gorski, 1973]、自発活動量の増加[Young & Fish, 1945; Gentry et al, 1976; Gerall et al, 1973; Kennedy, 1964]など、繁殖そのものには直接関係ないように見える作用も数多く報告されている。医学的な見地からは、更年期後のE2濃度減少による骨組織の吸収増加が原因で骨粗鬆症が起こる事実が良く知られている[Lindsay et al, 1976; 1980]。

繁殖活動のために分泌されるホルモンのはずのE2が何故このように多岐にわたる生

理的作用を持っているのであろうか。この理由として、E2が個体維持優先モードから繁殖優先モードへの変換機構の鍵を握るホルモンであるとすれば理解が可能である。つまり、血中E2濃度上昇は直接繁殖活動を誘起するだけではなく、繁殖に備えて代謝システムを変化させ、個体維持優先モードから繁殖優先モードへ恒常性を変換する引き金となるホルモンでもあるのではないかと推定されるのである。

E2のもつ代謝系への作用はかなり多彩であるが、これらは全て繁殖活動があるいはその準備のための反応であろう。本研究では、これらの作用が全て同じ中枢の制御を受けて働いているのではないかと仮定した。この仮想的な代謝モード変換機構は繁殖期にE2が放出されるとその情報を受け、繁殖のためのエネルギーを確保するために体重、摂食量、活動量などの多くのパラメーターに影響を与えるのではないかと推定される。

もしそうであるとすれば、E2による多彩な代謝活動は、中枢モード切換機能によって一元的に制御された繁殖優先モードと個体維持優先モードの切換を反映したものであることになる。しかし、この中枢機構が具体的に何をモニターしてどのような作用機序によって作用を及ぼしているのかについては現在までの所まだ十分に解明されていない。この中枢機能に関しては考えられる仮説をいくつか図1に例示した。

#### 1-4 卵巣摘除雌ラットに対するエストロゲン投与の影響

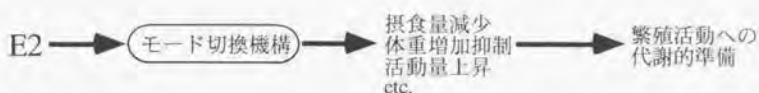
雌ラットの卵巣を摘除して性腺ステロイドの影響を除去したり、またエストロゲンを外的に投与することによって機能を代償させる実験は古くから行われてきた。例えば、卵巣を摘除したラットは性周期も性行動も消失するが、E2投与によってLHサージが回復し[Lee et al, 1990]、さらにプロゲステロン処置などで性行動を回復することもかなり古くから知られている。このように、E2は他の動物種にとってそうであるようにラットの繁殖活動にとっても必要不可欠であることが知られているが、前述のように代謝系に影響を与えている事実もかなり古くから知られ、研究が行われている。卵巣摘除による体重上昇や摂食量上昇[Sieck et al, 1978; Tarttelin & Gorski, 1973]、また活動量の低下[Young, 1945]が観察され、この作用はエストロゲン投与によって抑制されることが報告されている。これらの個々の作用については多くの実験が行われてきたものの、こうした作用の関連性、言い替えれば共通の中枢機構によって制御さ

れている可能性にはあまり注意が払われず、そうした観点からの研究もほとんど行われていない。

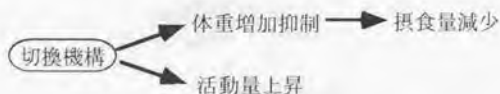
本研究では、前項で示した繁殖成功を導くモード切換中枢機構の存在様式を探るために、卵巣摘除によって内因性E2の影響を除いた雌ラットにE2含有シリコンチューブを投与する系を用い、卵巣摘除動物を個体維持モード、そしてE2処理動物を繁殖優先モードと設定していくつかの代謝パラメーターの変化を同時に測定し、それらの相互関連性について詳しく解析した。

#### 1-5 本論文の構成

本論文は5章から構成され、第1章では総合緒言として本研究の背景と目的を述べた。続く第2章及び第3章では卵巣を摘除した雌ラットを用いて体長、体重、摂食量、摂水量、そして回転活動量についてE2の影響を観察し、またそれらの関係について考察した。そして第4章ではこうした変化に関連すると考えられる脳内変化について検討し、最後に第5章で総合考察を行った。

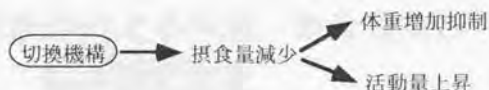


仮説1.



仮説2.

?



仮説3.

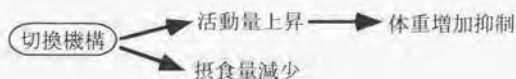


図1. 代謝モード切換機構に関する仮説。中枢に存在する代謝モード切換機構がE2の存在を受けて体重、摂食量、活動量などのパラメーターに影響を与える。これらの多彩な変化がどのような形で引き起こされるのかについてはよく分かっていない。本研究では、これらの関係を詳細に解析することによってこの切換機構の作用様式を探る事を目的とした。



## 第2章 E2投与による体重、摂食量及び 摂水量の変化

## 2-1 緒言

卵巣摘除した雌ラットが体重や摂食量の増加を起こし、E2を投与されるとそうした変化が消失するという事実から、卵巣由来のE2に体重及び摂食量抑制作用があることは古くから知られていた[Sieck et al., 1978; Tarttelin & Gorski, 1973]。この体重増加抑制には体格の成長抑制が伴っていることがClark & Tarttelin [1982]によって指摘されているため、これはおそらく春機発動に伴って分泌されるE2によって体格が小型化することにより個体維持や成長のためのエネルギー消費を抑え、繁殖のためのエネルギーを確保するという意義があるのであろう。

このE2による体重増加抑制と摂食量抑制は一見して背後に共通の機能があることを予測させるために同じ文脈中で解釈される場合が多く、この二つを区別せずに論じている場合もあるようであるが、これに関連してWade & Schneider [1992]は、E2の摂食量と体重への効果は必ずしも機能的に関連はなく、また一方がもう一方の原因というわけでもなく、条件によってはE2投与によって摂食が減少しても体重増加が停止しない、あるいはその逆のケースが存在することを多くの論文を示して主張している。しかし摂食量が増えればその分だけ体重も増加することは明らかであり、摂食と体重変化が全くの無関係であるとは考えにくい。このように摂食と体重がどの程度機能的に相関があるのかに関してはこれまで特に注意が払われていなかったため、本研究では、摂食量と体重の関係について詳細に研究し、さらにそれによってその背後に想定される代謝モード切替機構の存在について考察する事を目指した。

一方、E2投与による活動量の上昇は暗期に高い事が指摘されている[Thomas & Armstrong, 1989]。この回転活動量上昇が、E2による摂食及び体重の制御機構とリンクしていると仮定した場合、摂食量や体重についても活動量と同様に明期と暗期の作用に差が見られる可能性が高いのではないかと想定された。そこで、明期と暗期の作用の違いについても測定し、これらの機構と日リズムがどのように結びつくのかについても考察することとした。

本章では主に二つの実験を行った。まず、E2による体重増加抑制が体格成長の抑制を伴うかどうかを研究するためにE2投与による体重及び頭尾長への影響を観察した。次の実験では、体重、摂食量及び摂水量に対するE2の効果を同時に測定することにより、これらが共通の機構で制御されているかどうかの知見を得るための研究を行った。

この共通機構が明暗リズムを持つ可能性が示唆されていることから、明期と暗期に分けて測定し、その差を調べた。

## 2-2 材料と方法

### ＜実験1＞

本研究では、日本クレア社から購入した7週齢の雌ウィスター系ラットを購入後直ちに卵巣摘除し、一週間の回復期間をおいて内因性性腺ステロイドホルモンの影響を除去した後に実験に供試した。飼育環境は室温 $25 \pm 2.0$ 度、湿度 $70 \pm 5\%$ 、明暗周期12L:12D (8:00~20:00明期) であり、餌はペレット状の日本農産ラットMRブリーダーを、水は水道水を与えて自由摂取とした。

E2を長期投与するのに用いたE2チューブは内径2mm、外径3mmのシリコンチューブに、E2とコレステロールを1:4で混合した20%粉末（重量比）を7.5mmの長さに詰め、両端をシリコン系接着剤で封じたものを使用した。対照チューブとしてコレステロールのみを詰めたCholチューブを作成した。コレステロールはE2をはじめとするステロイドホルモンの原料物質であるが、この投与方法では生理活性はほとんどないと考えられる。これらのチューブを投与前日から生理食塩水に漬けておき、投与当日に動物をエーテル麻酔し、背側頸部の皮膚を切開して皮下移植した。このチューブの投与により、血清中で正常雌ラットの性周期中のE2最大濃度である約50pg/mlのE2濃度が長期にわたって維持できることが報告されている[Albert et al, 1991]。

供試動物を2群に分け飼育し、一方の群にはE2チューブ（n=4、E2群）もう一方にはCholチューブ（n=4、Chol群）を投与した。一週間ごとにネブタール麻酔下で体重と頭尾長を測定した。3週間後に両チューブを除去し、さらに4週間測定を続けた。データは全て投与日をday0として標準化した。また、頭尾長を3乗した数値から仮想標準体重を算出し、実際の体重をこの値で割ることにより肥満指数（体長の伸びから予想される体重に比べて実際の体重がどれだけ違うか）を求めた。

### ＜実験2＞

供試動物及び飼育環境については実験1と同様であった。まず供試動物を25\*35\*15cmの金網ケージで個別飼育し、一日二回、明期に入った直後と明期が終

る直前にそれぞれのラットの体重、餌消費量、摂水量を測定した。食べ残した餌が金網の下に落下するので、測定した餌消費量をその落下餌の重量を差し引いて補正したものを摂食量とした。一週間後にラットを二群に分け、一方にはE2チューブを皮下移植し(n=10, E2群) もう一方には対照としてCholチューブを移植した(n=9, Chol群)。その後さらに一週間、同様に測定を続けた。

### 2-3 結果

#### <実験1>

図2-1に結果を示した。E2投与群においては体重と頭尾長の増加が停止したのに対し、Chol群はそれと比較して有意に上昇していた。また、E2除去後は体重、頭尾長ともに急速に上昇し、Chol群の値に近づく傾向が見られた。

次に、肥満指数を比較すると、Chol群はおおよそ1.05~1.1で推移したのに対してE2投与中は1.0以下の値であった。E2チューブの除去によって肥満指数が対照群に近づくのは体重と頭尾長の場合と同様であった。すなわち卵巣摘除による体重増加は体格の成長から予測されるよりもより大きく、卵巣摘除による体重増加の原因は体格の成長だけではないことが示された。

#### <実験2>

図2-2に体重について示した。ラットの体重は暗期に上昇して明期に減少するためにジグザグに上昇した。E2投与によって体重の漸増は停止したが、明暗周期はそのまま保たれた。

次に、図2-3に示した方式で数値化体重変化量、摂食量及び摂水量について、処置前後の一週間の平均値を求め、明期、暗期、そして一日あたりの値として示した(図2-4)。その結果、E2群はChol群と比較して体重に関しては明期に、摂食量に関しては明期と暗期の両方に有意に減少が見られた。一方、摂水量には変化は見られなかった。

このグラフからは一見して、体重、摂食量ともに明期の方が抑制が大きいようにも見える。しかし、移植前後の一週間の平均値の差を個体ごとに取り、その平均を見ると、体重と摂食量について、明期と暗期の両方に明瞭な差があらわれた。しかもE2群とChol群との差を数値にして表すと、体重、摂食量ともに明期と暗期の抑制量がほぼ



同じという結果が得られた(図2-5)。

図2-6にこの結果を模式図として表した。体重は暗期に上昇し、明期に減少するが、E2移植によってどちらにも同じ程度の抑制がかかり、結果として一日の体重変化の振幅は変わらない。摂食量についても、明期と暗期とでほぼ同じ程度の抑制がおこり、結果として一日全体ではその2倍の抑制がかかっていた。

さらに体重についての模式図を図2-7に示した。体重変化は、その成分を日周変化と基底変化に分けて考えると、日周変化の部分についてはE2の影響を受けず、基底変化の部分にE2の影響が反映されることが示された。

#### 2-4 考察

まず最初の実験により、E2には体格の成長を抑制する作用と、もう一つ別の経路で体重増加を抑制する作用のあることが示唆された。E2には脂肪蓄積を抑制する作用があることが多くの研究から示されている[Benoit et al, 1982; Hansen et al, 1980; Lacasa et al, 1991; Lazzarini & Wade, 1991; Pasquier et al, 1988; Rebuffé-Scrive, 1987]ため、これがその経路であろうと推測される。つまり、体格の成長と脂肪蓄積の少なくとも二つが卵巣摘除による体重増加要素であると思われる。そして、E2はこの2者を同時に抑制することによって体重増加を抑制していることが示唆された。

また次の実験により、E2による体重増加抑制作用と摂食抑制作用に関しては明期と暗期とでの差は見られないことが示唆された。言い替えれば、E2による作用は明暗期とは関係なく、終日一定に働いている事になる。

この結果のうち、まず摂食量について考察する。摂食量そのものの明暗リズムについては、脳内のSCN(視交叉上核、Suprachiasmatic nucleus)から生じる内因性の概日リズムによる事が示されている[Nagai et al, 1978; Stoynev & Ikonomov, 1982]。E2投与による明期と暗期の摂食抑制量がほとんど同じであるという実験結果は、E2による摂食の抑制機構がこの概日リズムには影響されていないことを示唆すると考えられる。

このことは、摂食に関する中枢機構と併せて論じるとはっきりする。摂食を制御する神経核としてはPVN(室傍核、Paraventricular nucleus)とVMH(視床下部腹内側核、Ventromedial hypothalamus)が重要であることが古くから指摘されているが、こ

の二つの神経核はその役割に違いが見られる。神経核に直接E2を投与する実験において、PVNでは摂食抑制を起こすがVMHでは起こさなかった[Butera & Beikirch, 1989]。また、神経核を破壊する実験では、どちらの核を破壊しても過食が起こるが、VMHを破壊されると摂食の日周リズムが消滅し、一方PVNを破壊すると過食は起こるもののリズムは残ることが示唆されている[Butera et al, 1992; Tokunaga et al, 1986]。つまり、VMHは摂食行動の日周リズムを担う一方、PVNはリズムには関与せずに摂食行動を制御しており、E2の作用はPVNによって引き起こされるためにVMHで生じる日周リズムには影響を及ぼさないと解釈する事ができるのである。

次に体重変化について考察する。体重変化は、摂食や摂水、成長や脂肪蓄積、また排泄や呼吸といった多くの代謝活動の総和であると思われるため、その解釈は慎重に行わなければならない。本実験の結果、体重変化は日周リズムの成分とその基底変化の成分とに分けられることが示されたので、この二つの成分について個々に論じることとした。

まず基底変化についてはE2による体重増加抑制が現れるため、前の実験で示されたように体格成長と脂肪組織蓄積の抑制を反映していると思われる。つまりこれらは明期と暗期で作用の違いが無く、一日を通じてほぼ一定に作用している事が推測される。次に日周リズムの成分についてであるが、この変化の主要な原因が摂食量及び摂水量の日周リズムであることは疑いない。つまり夜行性であるラットは暗期に多くの餌と水を摂取し、明期にはあまり摂取しないために体重の日周リズムが生じると考えられる。E2投与によって体重の日周リズム幅に変化が見られなかったのは、摂食及び摂水量の明暗差が変化しなかった事に加え、おそらく排泄に影響するような代謝作用にもE2による明暗差への影響が無いためと考えられる。

次に、摂食量と体重変化の関連性について考察する。体重の一日の抑制値は3.81g、摂食量の一日の抑制値は3.42gであり、ちょうど同じ程度の抑制量なので、摂食抑制によって体重抑制が生じているように見える。摂食量が減少すればその分体重増加も減少するのは明らかだからである。

しかし、ラットの摂取したエネルギーの大部分は脂肪蓄積や体重ではなく、体温調節などの個体維持活動に消費されると思われるため、餌の摂取量が減少したので同じ重量だけ成長や脂肪蓄積に影響したと単純に解釈するのは難しいと思われるし、もし

摂食量が減少したとしてもこれに伴って排泄も減少するのではないかと考えるのが自然である。つまり摂食が減少しても、これが原因で成長や脂肪蓄積が抑制されたという直接の証拠がない限り、摂食減少と体重抑制を結びつけて考えるのは早計であろう。前述のButera[1992]らのPVNにE2を投与する実験においては摂食抑制は観察されたものの体重抑制は見られなかったし、Wadeも摂食と体重変化は同時に起こるとは限らないことを論じている[Wade & Schneider, 1992]。これらのことなどから、E2によって摂食量が減少することによって体重も減少したとする考えに対して、体重抑制機構と摂食量抑制機構がE2によってそれぞれ独立して働いたと解釈する事も可能である。この解釈については第3章において回転ケージによる実験を考察する際に示すこととする。

#### 2-5 小括

本章ではE2による体重や頭尾長、そして摂食量や摂水量への影響を観察し、それらの相互作用について考察を行った。その結果、まずE2による体重抑制作用は成長の抑制と脂肪蓄積抑制の少なくとも二つの機構によって起こっていることが示唆された。E2による摂食量抑制と体重増加抑制はどちらも同じような重量だけ起こった。また体重変化と摂食量そのものは明暗リズムの影響を受けるが、E2による作用という点ではどちらもこの影響を受けないことが示唆された。E2による回転活動量への作用が明暗リズムの影響を受けることに関しては第3章で論じられる。

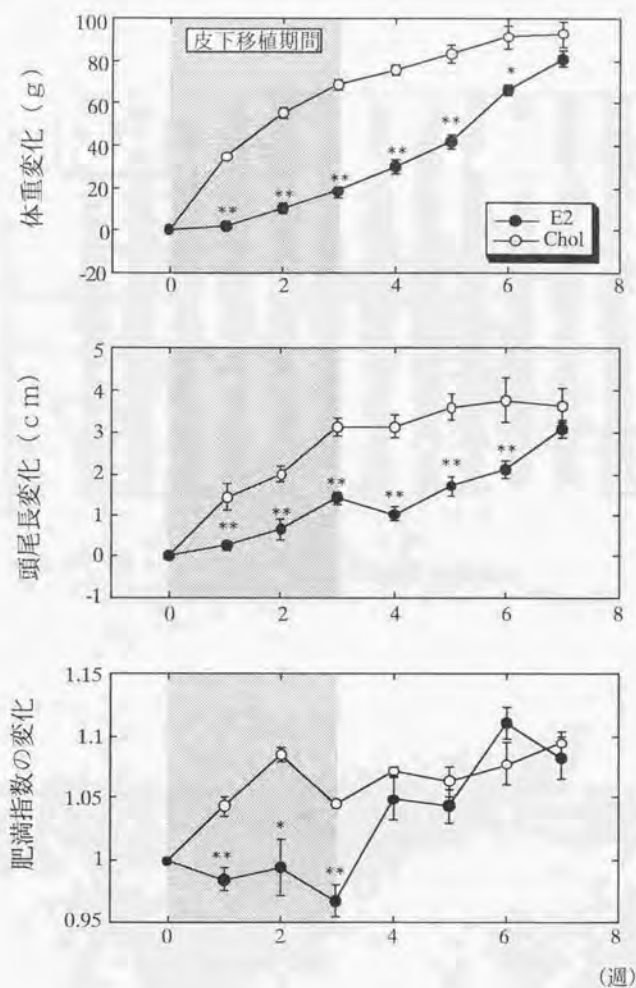


図2-1 E2 (n=4) あるいはCholチューブ (n=4) を皮下移植した卵巣摘除ラットにおける体重 (上)、頭尾長 (中) 及び肥満指数の変化 (下)。チューブは3週間後に除去した。肥満指数は実際の体重と体長の3乗との比から算出した。体重と頭尾長は投与日からの変化量で示した。エラーバーは標準誤差を示す。有意差はT検定によって算出した。\*\*... $p < 0.01$ , \*... $p < 0.05$ 。



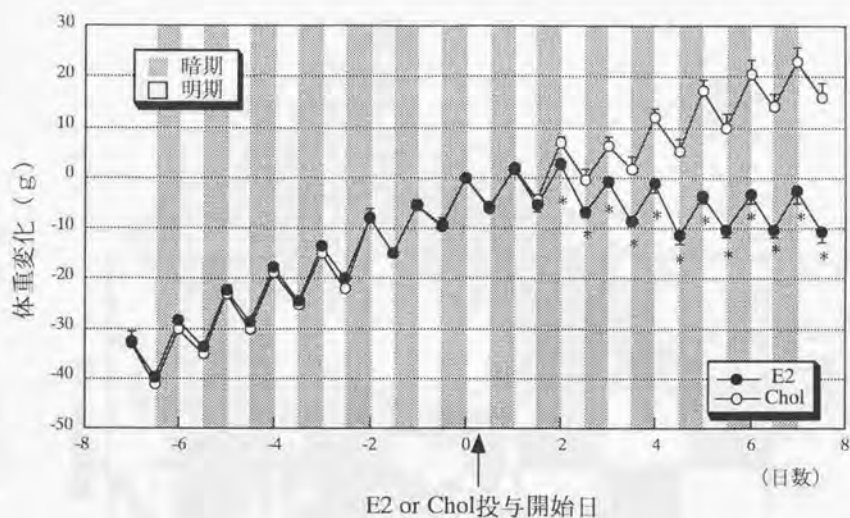


図2-2 体重が増加し続けている卵巣摘除雌ラットにE2 (n=11) あるいはChol チューブ (n=10) を皮下移植した際の体重変化。投与日の明期開始時の体重を0gとして標準化した。エラーバーは標準誤差を示す。有意差はT検定によって算出した。\*..p<0.01。

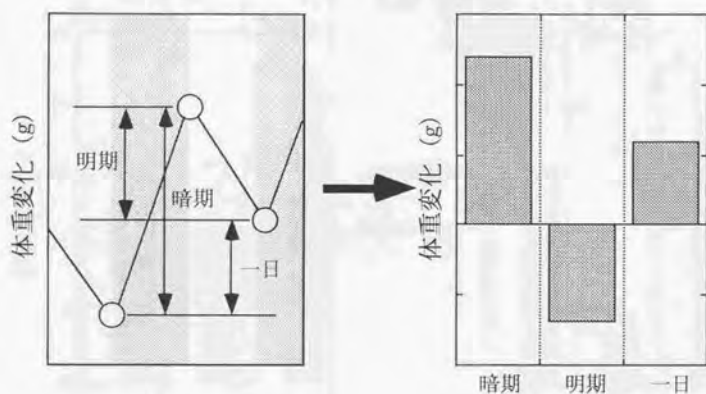


図2-3 図2-2の結果から暗期、明期及び一日を通じての体重変化量（摂食量及び摂水量についても同様）を求め、E2あるいはCholチューブ皮下移植前後の各一週間の平均値を棒グラフとして図2-4に示した。

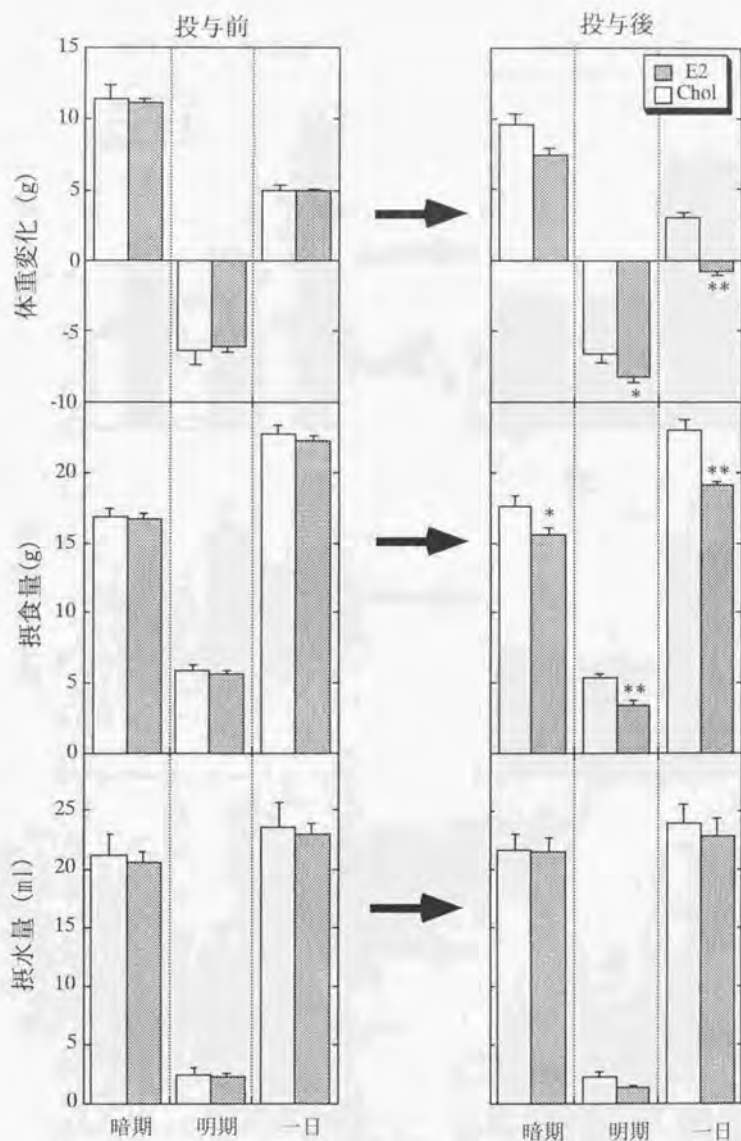


図2-4 暗期、明期及び一日を通じての体重変化量(上)、摂食量(中)及び摂水量(下)をE2 (n=11)あるいはCholチューブ (n=10)皮下移植前後各一週間の平均値として示した図。全てのパラメーターに明瞭な明暗差が見られ、E2投与の影響は体重変化と摂食にみられたものの摂水量にはみられなかった。エラーバーは標準誤差を示す。有意差はT検定によって算出した。  
\*... $p<0.05$ 、\*\*... $p<0.01$ 。

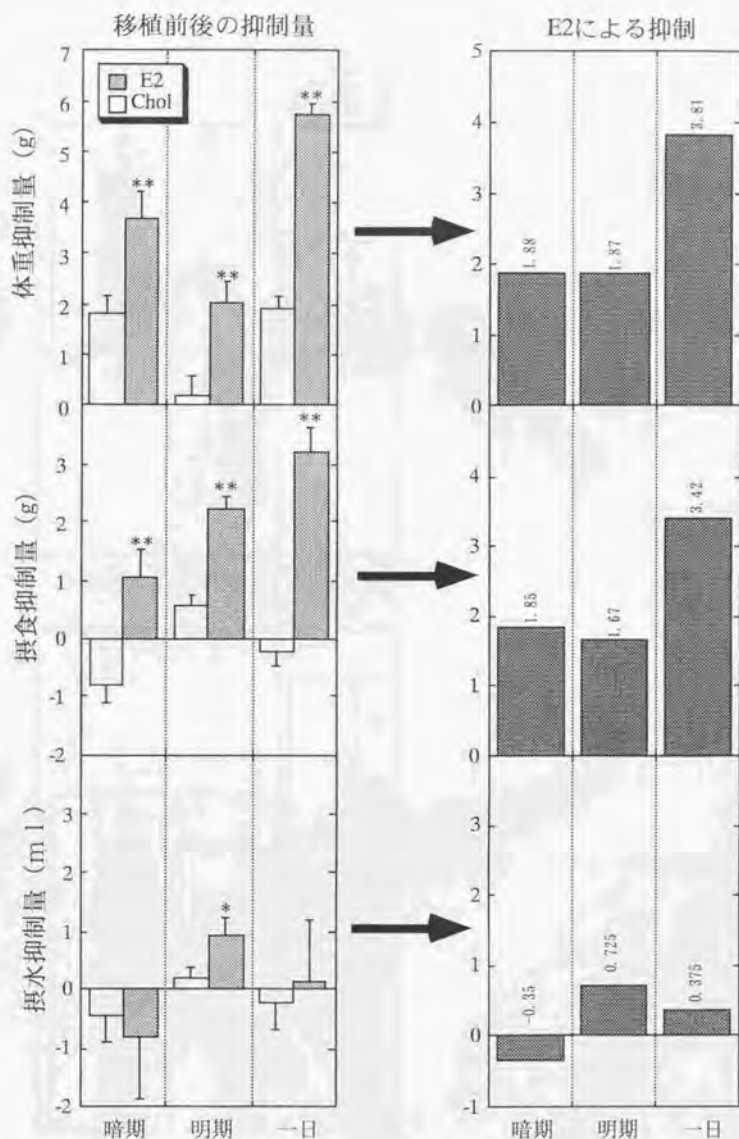
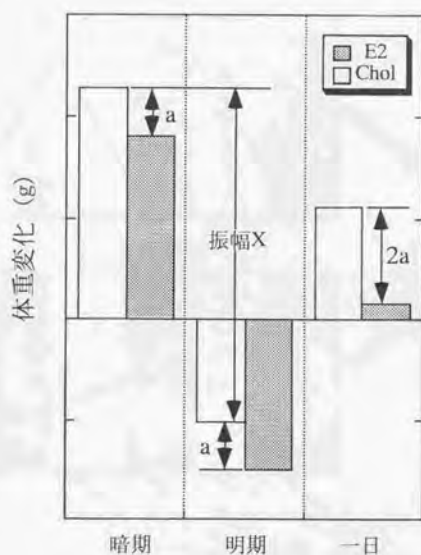
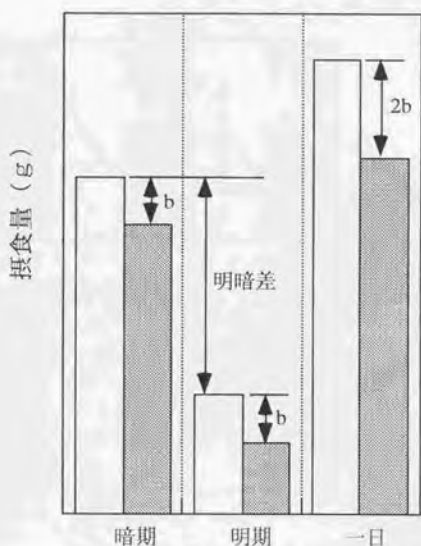


図2-5 暗期、明期及び一日全体の体重(上)、摂食(中)及び摂水(下)の抑制量。左はE2 (n=11)あるいはCholチューブ (n=10) 皮下移植前後各一週間の平均値の差を示し、右は左の図でのE2とChol群との差を数字とともに示した。エラーバーは標準誤差を示す。有意差はT検定によって算出した。\*... $p < 0.05$ , \*\*... $p < 0.01$ 。





$a = \text{E2による半日の体重増加抑制量}$

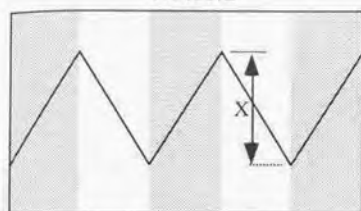


$b = \text{E2による半日の摂食抑制量}$

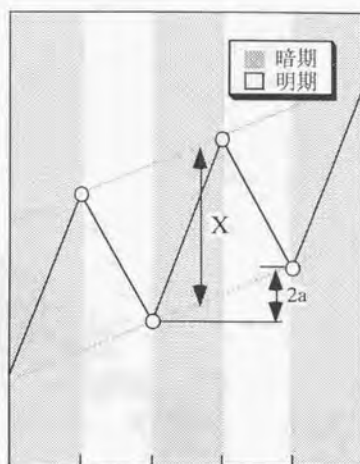
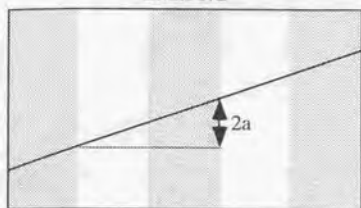
図2-6 E2が体重増加(上)及び摂食量(下)に及ぼす影響についての概念図。明期と暗期で同程度の抑制が起こり、結果として1日全体では各期の2倍の抑制が起こる。体重の振幅や摂食量の明暗差の部分についてはE2投与によって変化しない。

# OVX群

日周変化

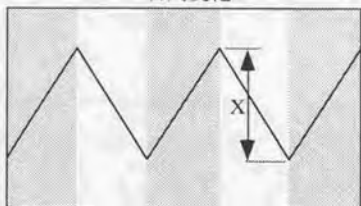


基底変化



# E2投与群

日周変化



基底変化

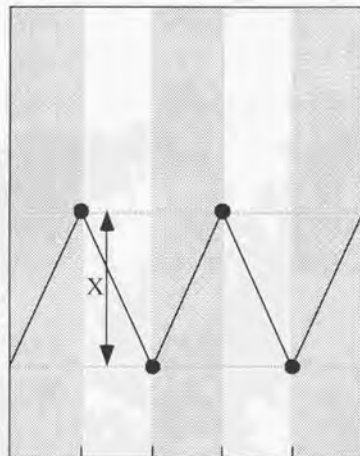
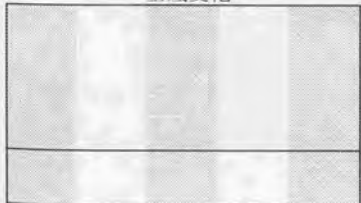


図2-7 体重変化の概念図。E2投与により体重の漸増が停止するが、体重の日周変化幅は変わらない。

### 第3章 E2投与による回転活動量の変化

### 3-1 緒言

E2投与はラットの体重や摂食量の他に、回転籠付きケージ（回転ケージ）を用いて測定された活動量（回転活動量）にも影響を及ぼすことが古くはYong & Fish [1945]の実験で示され、それ以来多くの研究によって確かめられてきた[Gentry et al, 1976; Gerall et al, 1973; Kennedy, 1964]。これらの研究によると回転活動量は卵巣摘除によって低下し、E2を投与することによって回復する。また、回転活動量は概日リズム機構の支配下にあることが証明されており、これが計測しやすいパラメーターである事から概日リズムの研究手段としてよく用いられてきたが、E2と概日リズムの関係を指摘する報告もある[Sano et al, 1995; Thomas & Armstrong, 1989]。

しかし回転籠のない普通のケージ（平ケージ）で飼育した場合、この活動量上昇は起こらないようである。Ruiz de Elvira et al [1992]は、テレメトリーを用いて回転ケージ及び平ケージで飼育した際のE2投与による活動量の変化を比較した結果、回転ケージではE2による活動量増加が起こるが、平ケージではこれが観察できないことを示し、飼育環境の差によって活動量に対するE2の影響が異なることを示唆した。

この活動量増加は、E2が発情行動を引き起こすことから性行動の誘起に伴うものであるとも考えられるが、以下の理由によってこの解釈を採る事は難しいと思われる。まず、この回転活動量増加が性行動誘起に関連するものだとすると、平ケージで活動量の増加が観察されないことの説明がつかない。性行動は平ケージで飼育しても起こるからである。また、ラットの場合E2のみでは性行動は誘起できず、一般的にはE2とともにプロゲステロンを処置することによって性行動を誘起するが、この場合回転活動量はむしろ減少する傾向にあることが報告されており[Rodier III, 1971]、本研究室でも同様の結果が得られている。さらに、精巣摘除した雄ラットにE2を投与しても全く同様の回転活動量上昇の見られることが本研究室での実験で示されている。これらの理由から、この活動量増加は性行動に直接の関連を持つものではなく、むしろ何らかの形で代謝活動変化に関連するのではないかと推定される。

E2による活動量増加の飼育環境による差の意義については現在の所よく分かっていないが、これが個体維持優先モードから繁殖優先モードへのモード変換の一つの側面を反映していると解釈する事も可能である。そこで本章ではE2投与による体重、摂食及び回転活動量のそれぞれの変化がどのように関連するかという点について詳細に検



討し、モード変換の中枢機構について考察を試みた。また、この作用が平ケージでは観察されず、回転ケージで起こることによって代謝にどのような影響が引き起こされるのかについて考察した。

回転ケージによって測定した活動量は、Runnig Activity、Wheel-Running ActivityあるいはRevolving Activityと呼称されているが、Locomotor Activityと呼ばれることもある。この名称はテレメトリーなどで測定した水平移動量と混同する可能性があるが、E2の作用という点からみると水平移動量と回転活動量の調節は異なる機序で起こっていることが想定されるため、これらを混同するのは好ましくないと思われる。本論文では全て回転ケージで測定した走行量を回転活動量と呼称することにした。

### 3-2 材料と方法

#### <実験1>

まず予備実験としてE2の回転活動量に与える影響を確認した。本研究では、日本クレア社から購入した7週齢の雌ウィスター系ラットを購入後直ちに卵巣摘除し、一週間の回復期間を置いて内因性性腺ステロイドホルモンの影響を除去した後に実験に供試した。飼育環境は室温 $25 \pm 2.0$ 度、湿度 $70 \pm 5\%$ 、明暗周期12L:12D(8:00~20:00明期)であり、餌はペレット状の日本農産ラットMRブリーダーを、水は水道水を与えて自由摂取とした。E2を長期投与するのに用いたE2チューブは前章と全く同様に内径2mm、外径3mmのシリコンチューブに、E2とコレステロールを1:4で混合した20%粉末(重量比)を7.5mmの長さ詰めに詰め、両端をシリコン系接着剤で封じたものを使用した。

回転ケージは岡崎産業(株)製の回転ケージを用いた。この回転籠は直径33cmで、ラットが中で一回転するごとに1mの走行量となる。活動量の測定システムは早稲田大学人間科学部の池田博士の開発したラットの活動量測定システムを用いた。供試動物を回転ケージで個別飼育し、一週間おいて環境に慣らした後にE2チューブをエーテル麻酔下で皮下投与し、3週間飼育した後にチューブを除去し、さらに一週間飼育した。チューブ投与及び除去前後5日間について一時間毎の平均値をとり、図3-1に示した。

#### <実験2>

実験手順は基本的に第2章の実験2と同様であった。まず供試動物を回転ケージで飼育し、一日二回、明期の開始直後と終了直前に各ラットの体重、餌消費量、摂水量を測定した。ケージ下に落下した餌については、本実験では無視したが、この値は真の摂食量とほぼ同じ動態を示した。第2章の平ケージの実験でも、残存餌から算出した結果は落下餌を差し引いて補正した摂食量とほぼ同じ傾向を示す事が分かっている。そこで、この章では摂食は全て餌消費量の値として示し、本性では第2章のデータを使用する際も全て摂食量ではなく餌消費量で示すこととした。

また、20%粉末を詰めたE2チューブに加え、E2とコレステロールを1:9、1:19の割合で混合した10%粉末及び5%粉末を詰めたチューブを同時に用意してそれぞれを20%E2、10%E2、5%E2チューブとして用い、E2投与量の差による作用の違いを研究することにした。10%及び5%E2チューブは、20%E2チューブに比べて1/2及び1/4の血中E2濃度を実現することが文献から期待される[Albert et al, 1991]。この状況で一週間の慣らし期間をおいた後、さらに一週間後にラットを4群に分け、それぞれに20%E2チューブ (n=11, 20%E2群)、10%E2チューブ (n=9, 10%E2群)、5%E2チューブ (n=9, 5%E2群) 及びCholチューブ (n=10, Chol群) を皮下移植して持続投与した。その後さらに一週間、同様に測定を続けた。

得られたデータは第2章と全く同様の手順で図表化した。また、これに加えて1日の餌消費量と体重変化量の日毎の変化を棒グラフにしてまとめた。さらに第2章のデータも含めて、ケージによる違いについても示した。

### 3-3 結果

まず実験1の結果を図3-1に示した。E2移植によって暗期の回転活動量が上昇し、E2の除去によって低下した。さらに、このE2チューブが3週間効果を持続する事が明らかとなった。

次に実験2の結果を図3-2aに示す。まず回転活動量について、暗期と明期、そして一日全体について一日ごとの変化を示した。全てのE2投与群で、投与2日目に回転活動量上昇が始まり、5日目以降はプラトーとなった。また図3-1にみられるように、回転活動量の上昇は暗期のみに生じていた。また、E2投与量による回転活動量の差は全く見られなかった。この結果をまとめて示した図3-2bにおいても同様の結果が得られた。

図3-3には、処理後の体重変化について示した。全ての群で体重の日周リズムが観察され、またいずれのE2群においても体重増加抑制が見られた。また、体重変化量、餌消費量及び摂水量について各チューブ皮下移植前後各一週間の平均を図3-4に示した。この図からは、明らかな体重抑制が見られたものの、平ケージの場合と違ってはっきりした摂食抑制は見られなかった。この結果から更に処置前後各一週間の平均値の差を個体ごとに取った平均と、E2による抑制量を各E2群について数値で示した(図3-5)。平ケージでの結果と違ってE2による体重増加抑制は主に暗期に起こっており、また餌消費量抑制は不明瞭であった。

摂食量については、チューブ皮下投与前日から7日目までの摂食量を一日ごとに平均し、平ケージでの餌消費量のデータとあわせて示した(図3-6)。すると、平ケージの20%E2群及び回転ケージの20%、10%E2群ではE2チューブ投与前日に比べて2日目に餌消費量の減少が見られた。Friedman検定によって変化の有無を検定すると、20%、10%E2群で有意差が検出されたが、5%E2及びChol群では有意差は見られなかった。さらに平ケージではE2群の餌消費量は抑制されたままで推移していったのに比べ、回転ケージの場合ではいったん減少した後でまた上昇する傾向が見られた。

図3-7に体重変化について同様のグラフを示したが、Chol群以外の全てのE2群でE2投与翌日に体重増加の抑制が観察された。

### 3-4 考察

まず、最も顕著な変化のあらわれた回転活動量について考察する。雌ラットの場合、卵巣摘除によってこの回転活動量が減少し、E2投与によって再び上昇することから、E2がこの活動量変化に大きく関与していることは間違いない。また、このE2投与による活動量上昇には概日リズム機構の関連が示唆される場合もあるが[Sano et al, 1995; Thomas & Armstrong, 1989]、第2章の結果から考えて概日リズム機構にE2が直接的に関与しているとは考えにくい。おそらく回転活動量を引き起こす中枢は摂食や体重の抑制に関わる部位とは別に存在し、E2に関する情報と概日リズム機構からの入力を総合して機能しているのではないかと推測された。

次に体重について着目すると、体重増加抑制は回転ケージでも生じたが、その抑制は平ケージの場合と違い、主に暗期に起こっていることが示された。これが暗期の活



動量増加と関連しているであろう事は容易に想像がつくが、その意味を解釈するため  
に第2章と同様にこれを日周変化と基底変化の2つの成分に分けて検討した。その結果、  
体重の基底成分の増加が抑制される他に日周リズムの変化幅も減少している事が示唆  
された(図3-10)。

日周リズムの振幅の減少については、餌消費量及び摂水量が有意に変化しない以上、  
暗期の回転活動量の増加による代謝活動の活性化による排泄の上昇がその原因である  
と考えるべきであろう。つまり暗期の体重抑制量の増加は、E2投与による回転活動量  
の増加によって暗期の新陳代謝が活性化し、排泄が増大したり脂肪組織がエネルギー  
として消費されたりした結果であると思われる。また、基底変化については、図3-9か  
らすれば平ケージの場合と比べて回転ケージの抑制傾向がやや強いが、このことにつ  
いては後で別途に考察する。さらに、図3-5bからはE2用量依存性の傾向が見いだせる  
が、あまりはっきりとはしていない。

次に餌消費量について考察すると、E2投与によって体重増加抑制が見られたにもか  
かわらず餌消費量の抑制が見られなかったのは、E2による回転活動量の上昇によって  
代謝が活発化したことで二次的に摂食量が上昇したのが原因であることは図3-6に明瞭  
にあらわれており、間違いないように思われる。また、この抑制が5% E2チューブ皮下  
移植時には見られないことから、E2の摂食抑制効果に関しては閾値の存在が推察され  
る。すなわち、体重増加抑制や活動量上昇に比べて摂食量抑制の起こる血中E2濃度閾  
値が高い可能性が示唆された。

次に体重、餌消費量及び回転活動量の関係について検討した。結果的には、平ケ  
ージにおいてはE2投与による体重増加と摂食の抑制が起こるが活動量の上昇は起こらず、  
一方回転ケージでは体重増加抑制と活動量上昇が起こるが摂食量抑制が見られなくな  
ることから、E2による代謝モード変換中枢の主要な機能はおそらく体重を一定に保つ  
ことであり、これを引き起こすために回転ケージにおいては活動量上昇によってエネ  
ルギー消費を増加させ、活動が制限される平ケージにおいてはかわりに摂食量が抑制  
されてエネルギー供給を押さえるのではないか、という作業仮説に到達するのが自然  
のように思われる。

しかし、もしこのような機能的リンクが存在するなら、この二つの反応を引き起こ  
すE2濃度の閾値が異なることに対する説明が困難となる。この仮説に従えば、E2投与



量減少によって摂食量抑制効果が消失すれば回転活動量の増加もみられなくなってしまうはずであるが、前述のように5%E2群では摂食抑制が観察されなかったにもかかわらず、回転活動量は上昇していた。つまり、摂食量抑制と回転活動量上昇を司る機構はそれぞれE2に対する反応の閾値が違っており、上記のような仮説は成立しないことがわかる。

では、この摂食量と回転活動量の増加をどのように解釈するべきであろうか。体重変化量について平ケージと回転ケージとを比較した場合、E2投与群では回転ケージのほうがより抑制が強い傾向がみられた(図3-8)。これは回転活動量の増加によってより強い抑制がかかったと考えられる。従って、E2による摂食量及び体重抑制作用は活動量とは無関係に存在するが、回転ケージで飼育した場合は回転活動量上昇による代謝の活発化が摂食量や体重に二次的に影響を与え、これによってE2による摂食量の抑制が解除される一方、体重増加の抑制が強化されたというのがより矛盾が少ない解釈であろう。なお、5%E2群ではE2による摂食抑制が見られなかったにもかかわらず、(図3-6)、投与後一週間の平均では餌消費量が上昇していない(図3-4)。つまり、活動量上昇は単純に摂食量を上昇させるのではなく、E2による摂食抑制を解除しているのだらうと推測されるが、この詳しい機序については不明である。

次に摂食量と体重の関係について考察を試みる。餌消費量はE2投与後2日目に抑制が始まるのに対し(図3-8)、体重はE2投与開始翌日から既に抑制が起こっている(図3-9)。つまり、平ケージの場合も含めて摂食の抑制よりも体重の抑制の方が1日早く起こることが示唆された。回転活動量の上昇は2日目以降からなので1日目の体重増加抑制とは関係ないため、第2章の考察でも述べたように摂食量が抑制されることによって体重が抑制される、という説明は成立しないことになる。この解釈として、中枢の切換機構の主な作用はやはり体重増加抑制であり、これによってエネルギー需要が減少するために摂食が抑制されると仮定することが出来るが、これについても前述の活動量の場合と同様にE2の閾値から考えると、5%E2群では明瞭に体重増加が抑制されるにもかかわらず摂食抑制が見られない。つまり、体重が抑制されたことによって摂食量も抑制されたとは考えにくいことになる。さらに、第2章で既に述べたようにButera & Beikirch [1989]やWade & Schneider [1992]により、E2による摂食抑制と体重増加抑制が必ずしも直接的には関連していないことが予想される。つまり、E2に

よる体重増加抑制と摂食抑制は独立した機構を介してもたらされるのではないかと推察されるのである。

最後に、回転ケージと平ケージでの飼育環境の差について考察する。2章で用いたE2チューブは本章で用いた20%E2チューブと同じものなので、体重変化の比較を行ったところ、E2群においては回転ケージ群の方がやや抑制が強く、Chol群については抑制量の差は全く見いだせなかった(図3-8)。そこで次に、E2群について投与前後での平ケージ群と回転ケージ群の体重変化、餌消費量及び摂水量を比較した(図3-9)。まず体重について考えると、E2投与前においては平ケージと回転ケージで体重の上昇は同じ程度だったが、日周リズム幅は回転ケージよりも平ケージの方が小さい傾向にあった。E2投与後の一日あたりの体重増加抑制は回転ケージの方が大きく、また暗期の体重増加がより大きく抑制されており、これは日周リズム幅が小さくなったことを意味すると考えられた(図3-6)。これを模式的にであらわすと図3-10のようになる。回転ケージではChol群の1日の体重増加量は平ケージの場合と全く同じだが、日周変化幅については回転ケージの方が小さく、環境の違いが現れた。また、E2投与によって回転ケージの方により強い抑制が現れるが、前述のようにこれはE2による抑制作用に加え、活動量増加による新陳代謝促進作用が二次的に加算されるためだと思われる。

餌消費量については、E2投与前は暗期、E2投与後は明期暗期とも平ケージよりも回転ケージ群の方が大きかった。このことから、回転ケージ飼育環境が、E2による活動量増加作用とはまた別の機構で摂食量を上昇させていることが示唆された。最も差が顕著だったのは摂水量で、E2投与前後で明期暗期とも回転ケージ群の方が有意に大きかった。しかしE2の投与によっては、大幅な活動量の上昇にも関わらず全く摂水量に影響が現れなかったため(図3-4)、摂水量はケージ環境によって大きく影響されるものの、E2投与やそれに伴う活動量上昇によっては変化しないことが示唆された。

Tokuyama [1982]らは回転ケージ導入によって摂食量が増える事を示し、回転籠の有無によって代謝活動に差があることを報告している。しかし摂水量に関してはこれに注目した論文は少なく、本研究のように明瞭に摂食量と違う動態をとる事を示した報告は筆者の知る限りない。この摂水量の結果が回転活動量増加と関係するかどうかは分からないが、少なくとも何らかの形でケージ環境を反映していると思われることから、今後の更なる検討が期待される。

本章では、まずE2による回転活動量の増加が摂食や体重に対するE2の作用機序と比較的独立性が高い機能を介してもたらされる可能性が高いことが示され、また摂食量減少と体重増加抑制の間についても直接的な因果関係の存在する可能性は低いことが分かった。つまり、E2が回転活動量、体重及び摂食量を制御する機構は一元的なものではなくそれぞれがかなり独立性の高い中枢機構の支配下にあることが示唆された。また、平ケージと回転ケージでは、摂水量を含むいくつかのパラメーターに差が見られ、環境が無視できない要因の一つであるものと推測された。

### 3-5 小括

本章では回転ケージで飼育したラットを用い、前章と同様のプロトコルで実験を行うことにより、E2投与による回転活動量、餌消費量及び体重変化の間の機能的な関連を探った。この結果、この三つのパラメーターはE2の作用が現れるまでの時間や閾値に違いが見られ、相互にかなり独立性の高い機構の支配下にあることが示唆された。また、代謝の状況やE2の作用は飼育環境によってかなり違ってくることが示唆された。

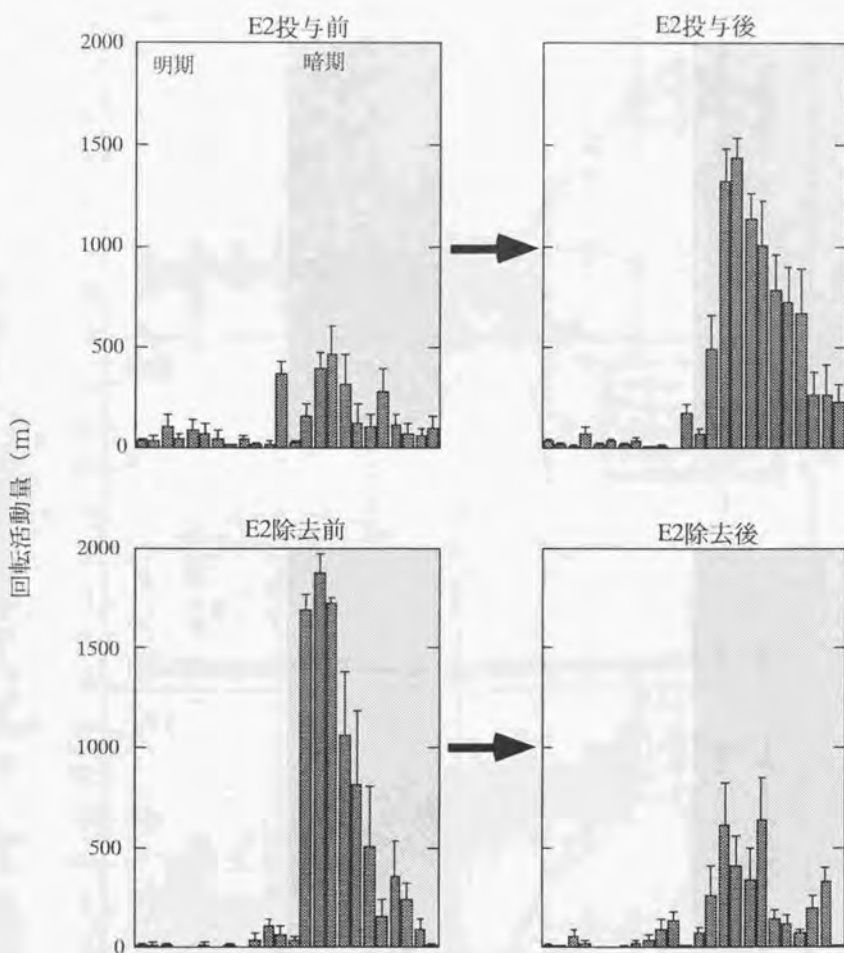


図3-1 回転ケージを用いて測定した卵巣摘除雌ラット（代表例の一個体）の1日の回転活動量を1時間ごとに示した。上段にはE2チューブ移植前後の5日間の平均を、下段にはE2チューブ除去前後での5日間の平均を示した。エラーバーは標準誤差を示す。なお、E2チューブ移植期間は3週間であった。



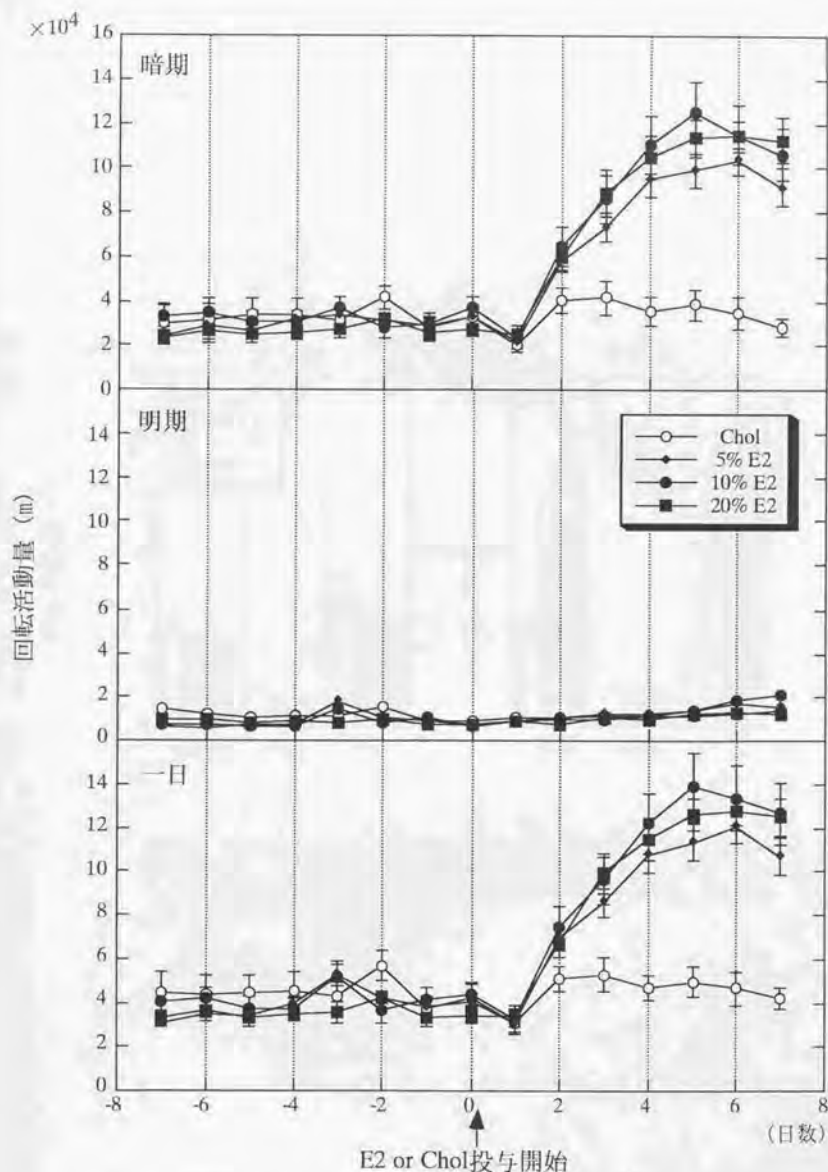


図3-2a 卵巣摘除した雌ラットにE2 (5% (n=9)、10% (n=9)、20% (n=11)) あるいはCholチューブ (n=10) を皮下移植した際の回転活動量。エラーバーは標準誤差を示す。一日全体について分散分析を行うと、Chol群との間で、10%E2群は2日目、20%及び5%E2群は3日目から5%の有意差があらわれた。

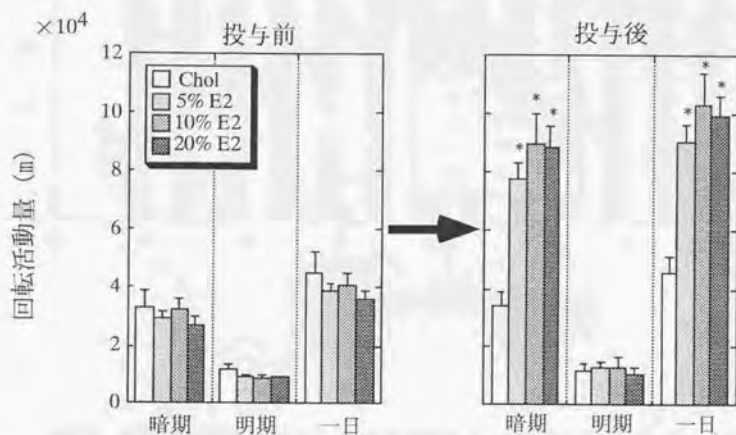


図3-2b 図3-2aに示した回転活動量についての結果を投与前後各一週間の平均として暗期、明期及び一日全体にまとめて示した。エラーバーは標準誤差を示す。有意差は各E2とChol群との間で、T検定によって算出した。\*.. $p < 0.01$ 。

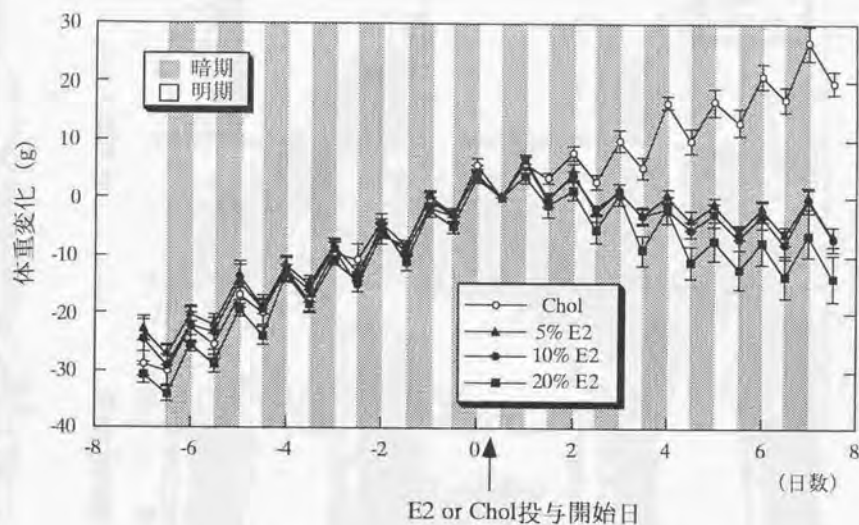


図3-3 体重が増加し続けている卵巣摘除雌ラットにE2 (5% (n=9)、10% (n=9) 20% (n=11)) あるいはCholチューブ (n=10) を皮下移植した際の体重変化。移植日の明期の終わりを0gとして標準化した。エラーバーは標準誤差を示す。

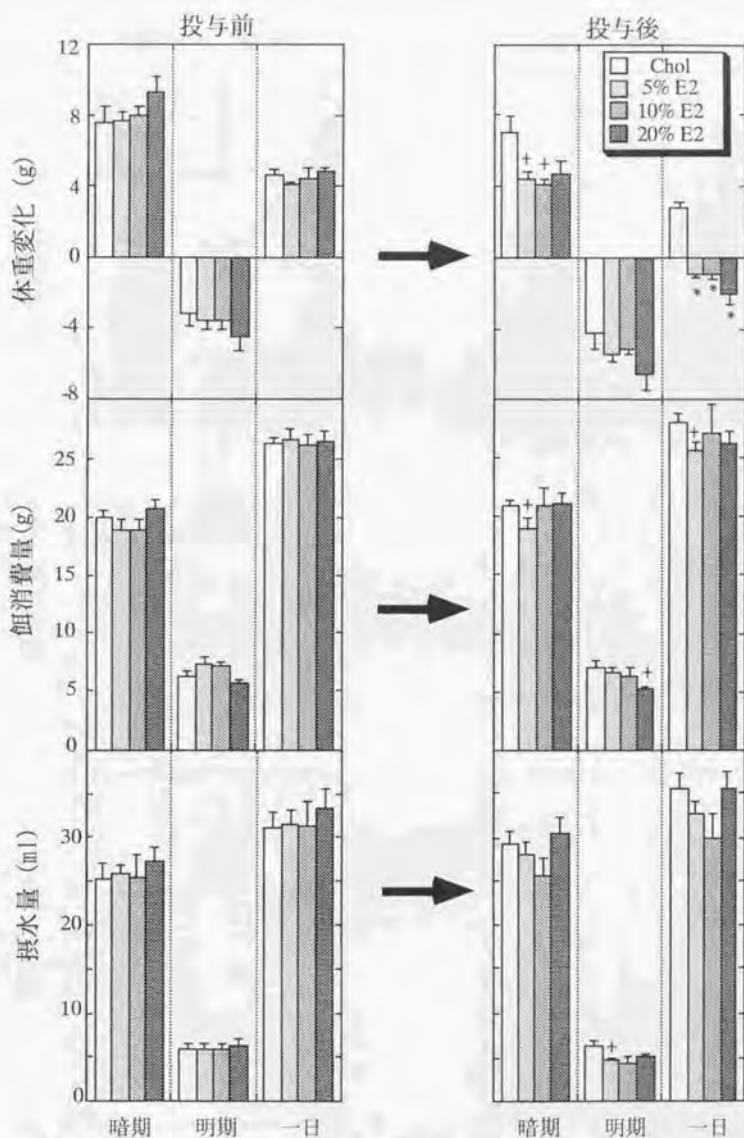


図3-4 暗期、明期及び一日全体の体重変化量（上）、摂食量（中）及び摂水量（下）をE2 [5% (n=9)、10% (n=9) 20% (n=11)] あるいはCholチューブ (n=10) 投与前後各一週間の平均として示した。エラーバーは標準誤差を示す。有意差は各E2とChol群との間で、T検定によって算出した。+... $p<0.05$ , \*... $p<0.01$ 。



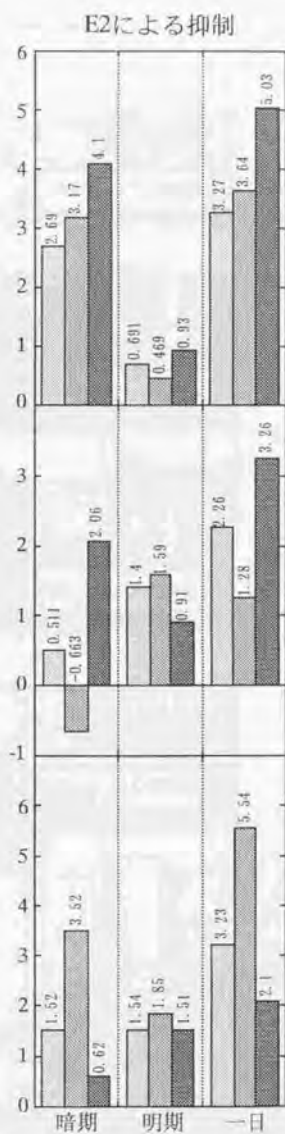
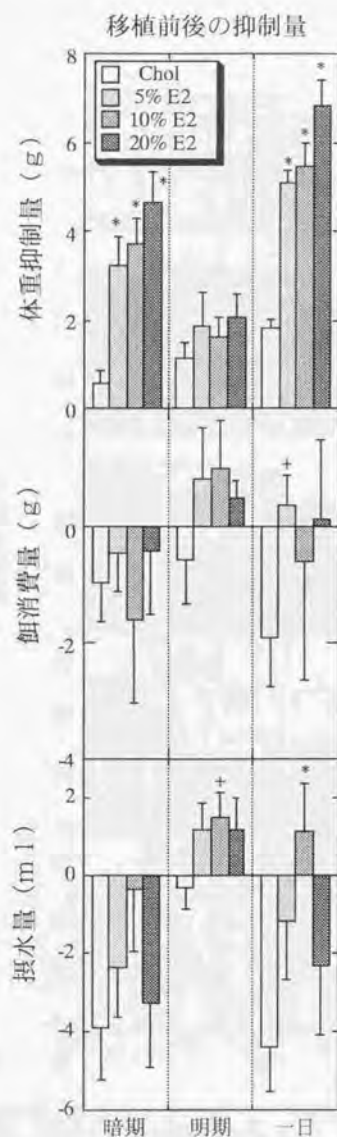


図3-5 E2 (5% (n=9), 10% (n=9), 20% (n=11)) あるいはCholチューブ投与による体重変化量 (上), 餌消費量 (中), 摂水量 (下) の抑制量 (左) 及びE2による抑制量 (右) の差。エラーバーは標準誤差を示す。有意差は各E2とChol群との間で、T検定によって算出した。+... $p < 0.05$ , \*... $p < 0.01$ 。

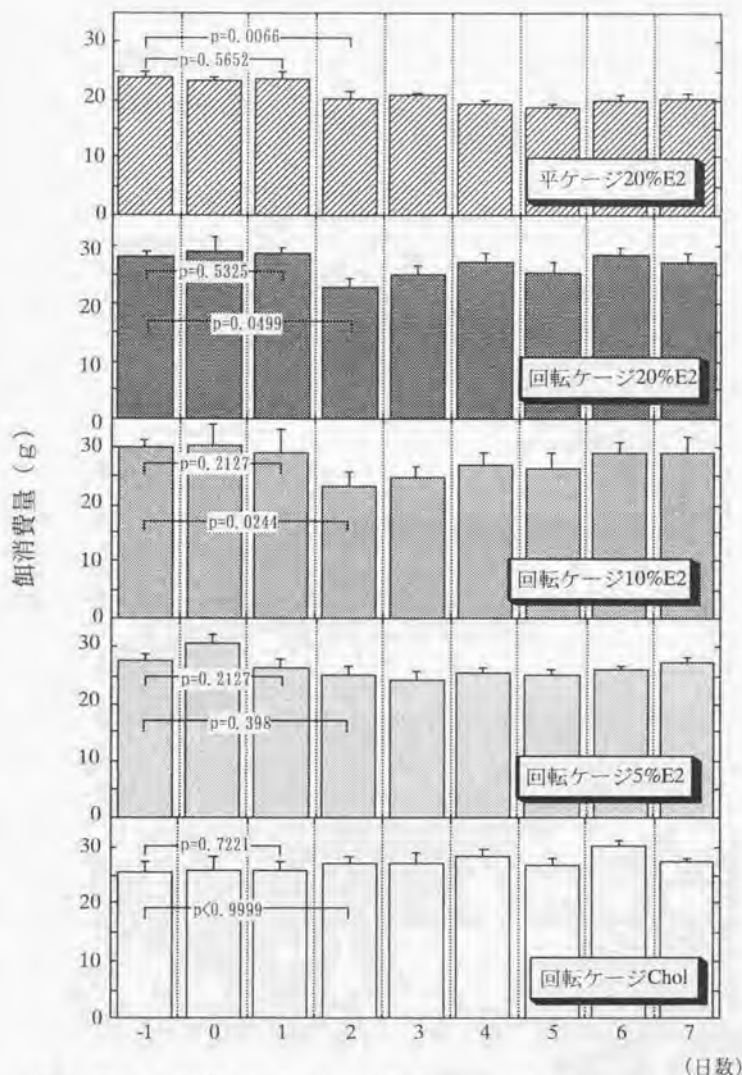


図3-6 E2あるいはCholチューブ投皮下移植前日から7日目までの餌消費量の経時的変化。平ケージ20%E2群及び回転ケージ20%、10%投与E2群では移植2日目に減少傾向が見られるが、回転ケージ5%投与E2群及び回転ケージChol群では見られない。また、平ケージでは餌消費量が減少したまま推移したが、回転ケージではいったん減少した後に再び上昇し、もとのレベルまで回復した。エラーバーは標準誤差を示す。p値はWilcoxonの符号順位検定によって算出した。また、day1-7のFriedman検定の結果は、E20... $p=0.0113$ 、E10... $p=0.022$ 、E5... $p=0.5377$ 、C... $p=0.0901$ であった。

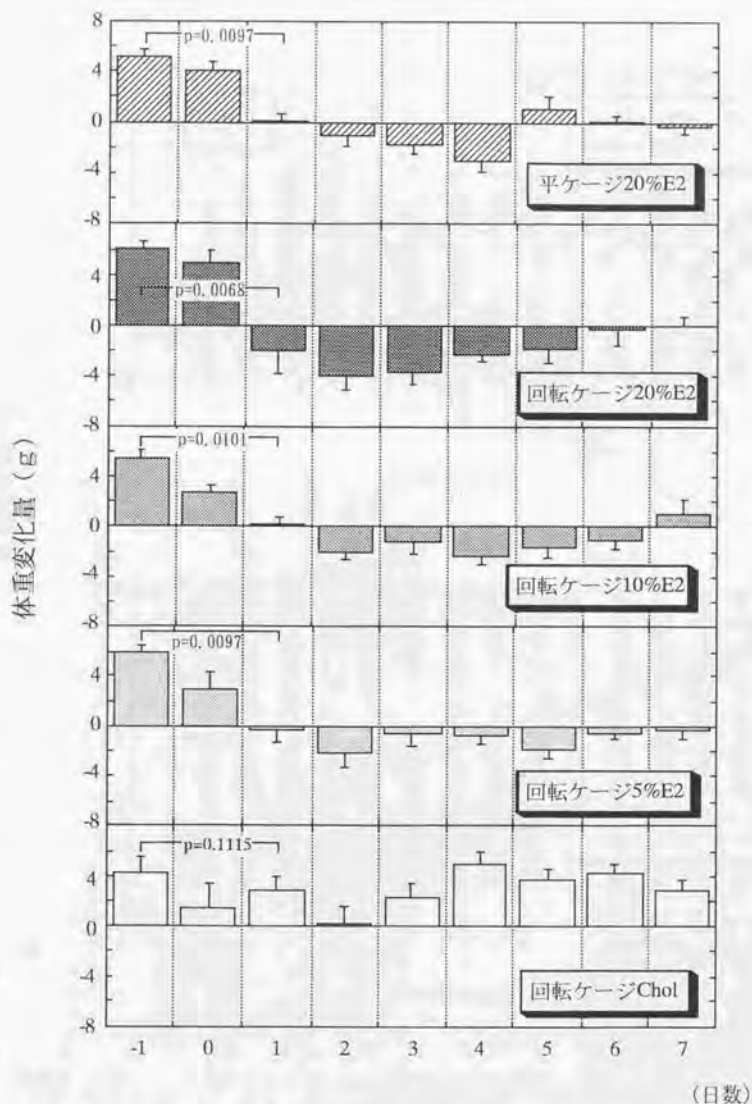


図3-7 E2あるいはCholチューブ投皮下移植前日から7日目までの体重変化量の経時変化。全てのE2群で投与翌日に減少傾向が見られる。エラーバーは標準誤差を示す。p値はWilcoxonの符号順位検定によって算出した。



体重変化量 (g)

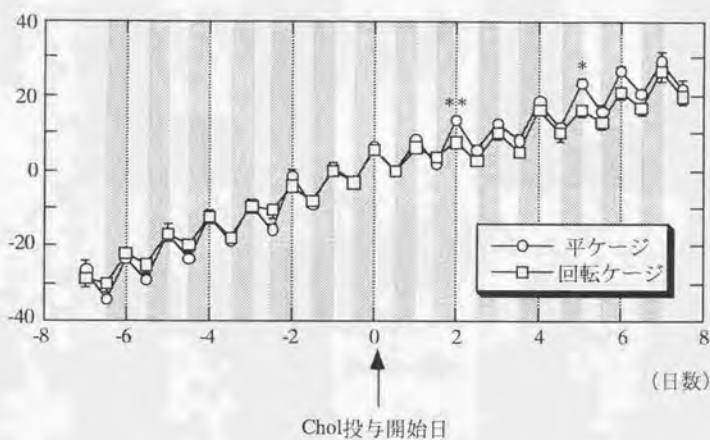
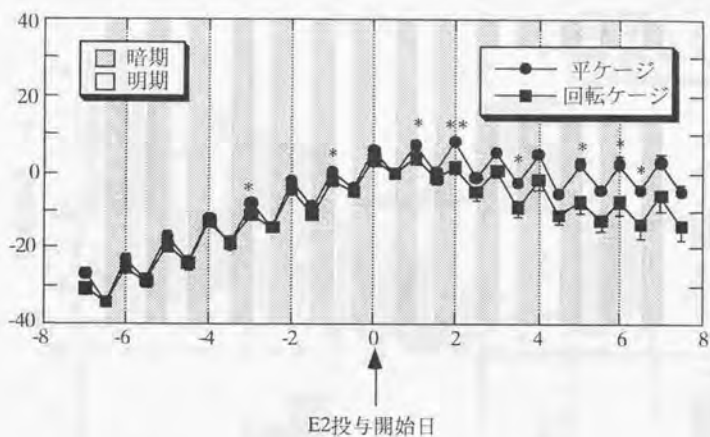


図3-8 回転ケージ及び平ケージでの体重変化量について、E2群（上）及びChol群（下）とで比較した。エラーバーは標準誤差を示す。有意差はT検定によって算出した。\*... $p < 0.05$ 、\*\*... $p < 0.01$ 。



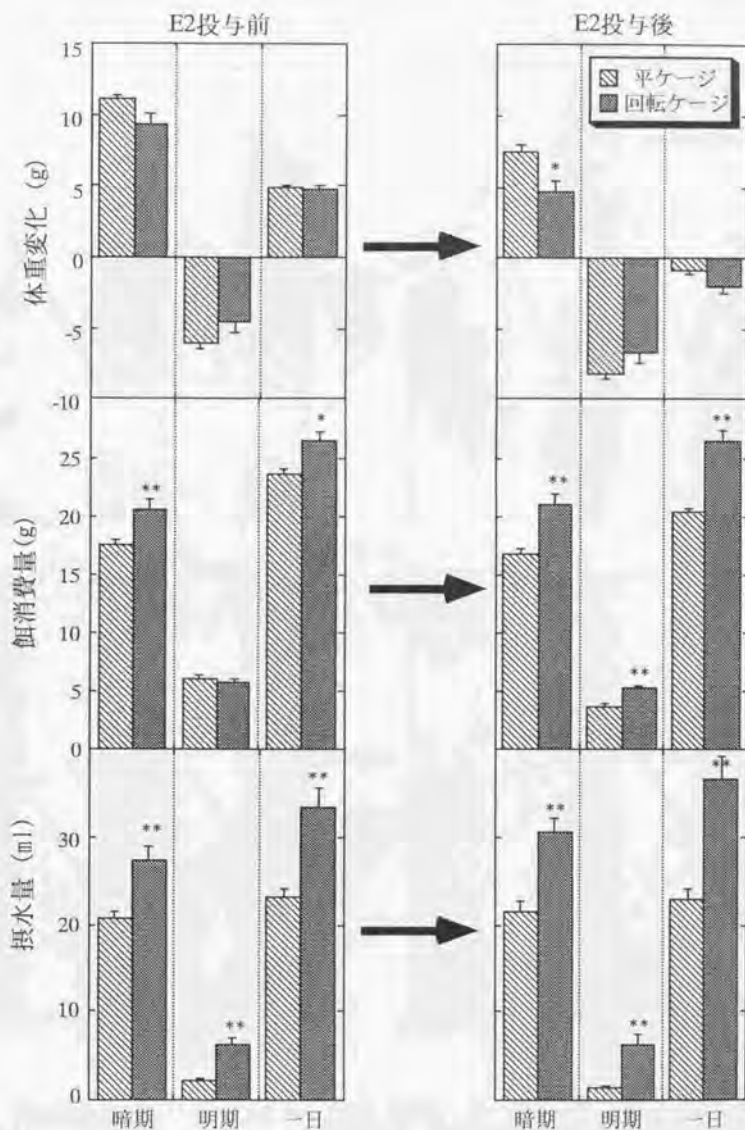


図3-9 平ケージ (n=12) あるいは回転ケージ (n=11) における暗期、明期及び一日全体の体重変化量 (上)、餌消費量 (中) 及び摂水量 (下) をE2チューブ移植前後各一週間の平均として示した図。エラーバーは標準誤差を示す。有意差はT検定によって算出した。\*... $p < 0.05$ , \*\*... $p < 0.01$ 。

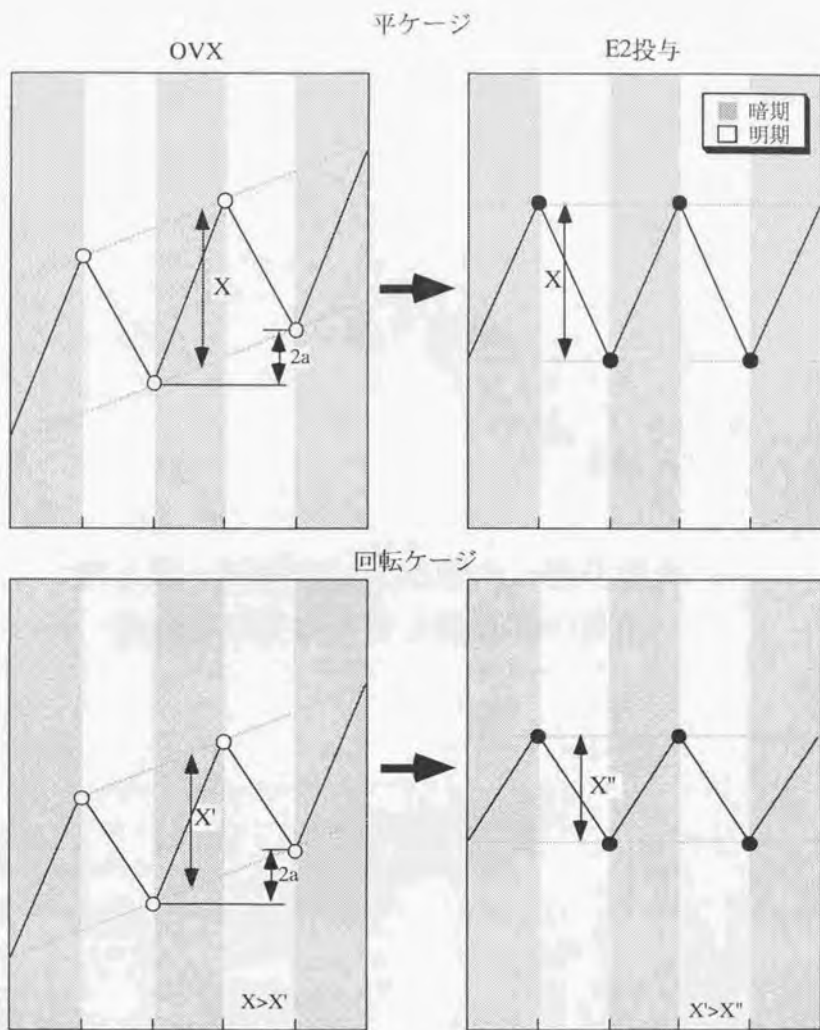


図3-10 卵巣摘除群(左)及びE2投与群(右)の平ケージ(上)及び回転ケージ(下)における体重変化のパターンを示す概念図。卵巣摘除群の体重増加量はどちらのケージで飼育していても同じだが、日周リズムの振幅は回転ケージの方が小さい( $X > X'$ )。また、E2投与によりどちらも体重漸増が抑制されるが、平ケージの場合は振幅に変化はなく、回転ケージの場合は振幅が小さくなる( $X' > X''$ )。

#### 第4章 E2投与による脳内一酸化窒素 合成酵素及びアミノ酸動態の変化

#### 4-1 緒言

ステロイドホルモンであるE2は脳血液関門を通過するため、脳内に存在するE2受容体に結合して作用をあらわすとされている。E2が脳内に作用することによってどのような神経活動が起こるのかについての研究には、いくつかの流れがあり、そのうち最も大きいのはE2及びプロゲステロン投与とラット雌性行動であるロードシスとの関連の研究である。ロードシスはE2存在下でしか誘起されず、またE2脳内投与実験によってVMHの腹外側核がロードシスを引き起こすE2の作用部位であることが示されている[Blache et al, 1991; Butera & Beikirch, 1989]。しかし逆に、E2さえ投与されていれば極めて多くの神経伝達物質がロードシスに関与しうるため[Kow et al, 1994]、E2が実際にどのような神経伝達物質の変化によってロードシスを引き起こすのかについては現在もはっきりしていない。

E2の脳内作用に関してこれに次いで多いのはGnRHニューロンとの関連についての研究である。E2投与によって簡単にGnRHサージを引き起こすことができ、しかも血中LH濃度を測定しやすいこと、免疫組織学的手法が有効なこと、さらにGnRHニューロンにE2受容体が存在しないことから[Shivers et al, 1983]E2がGnRHニューロンに影響を与える機構に研究の焦点が集まった事などがその理由であると考えられる。これらの研究からは、E2投与によるGnRH分泌あるいはGnRHサージ誘起にはGABA、NE（ノルエピネフリン、Norepinephrine）、あるいはGlu（グルタミン酸、Glutamate）などの興奮性アミノ酸が関与していることが示唆され[Adler & Crowley, 1986; Barraclough, 1992; Brann & Mahesh, 1991a; 1991b; Demling et al, 1985; Grattan et al, 1996; Flügge et al, 1986; Herbison et al, 1990; Herbison et al, 1991; Herbison et al, 1995; Jarry et al, 1992; Kimura & Jinnai, 1994; Leranthe et al, 1985; Lopez et al, 1990; Seltzer & Donoso, 1992; Unda et al, 1999; Wise et al, 1981]。最近ではNO（一酸化窒素、nitric oxide）との関連も報告されている[Aguan et al, 1996; Bonavera et al, 1993; Bonavera et al, 1996]。

E2投与による代謝系の変化に関しては、主に脳内神経核破壊や、E2を神経核に投与する実験によってその作用部位を探索研究が行われてきた。その結果、E2の作用部位として脂肪蓄積抑制については自律神経を司る視床下部の神経核、摂食量抑制はPVN、そして回転活動量増加はPOA（視索前野、Preoptic area）であるとする意見が有力で



ある[Wade & Schneider, 1992]。しかし、これらの神経核で主にどのような神経伝達物質が働いて作用をあらわすのかは現在でもよくわかっていない。この理由の一つは、脳内でのE2の生殖に直接関連する作用と代謝に関係する変化を区別して評価することが難しいことであろう。実際、VMHなどは代謝系と繁殖の双方にとって重要な神経核であり、この部位での神経伝達物質の変化は特に慎重に解釈しなければならない。

これらを区別し、E2投与によるどのような脳内変化が代謝活動変化と関連するのかを解釈するために、本章においては2つの手法で脳内のいくつかの神経核の変化を同時に測定した。これによって各神経核の変化の違いからそれぞれの神経核の役割を探り、本研究における他章の成績とあわせて論じることを試みた。

まずE2の作用に関連性を指摘されているNOS（一酸化窒素合成酵素、Nitric Oxide Synthase）の染色性を神経核ごとに測定し、E2投与による影響を研究した。NOはNOSがアルギニンをシトルリンに変化させる過程で放出されるガス状神経伝達物質であり、脳内で重要な役割を持っていることが広く知られている[室田ら, 1996]。E2の作用との関連では、E2投与によるLHサージや性行動誘起にNOが重要な役割を持っていることが報告されており[Bonavera et al, 1993; Mani et al, 1994]、またNOS陽性部位とE2集積部位はそれぞれの脳地図を比較するとHands of Calleja、POA、PVN、VMH、Amy、境界条など多くの共通部分を持っており[Stumpf, 1970; Vincent & Kimura, 1992]、さらに発生段階におけるE2受容体とNOSの関連が示唆されていることから[Lizasoain et al, 1996]、NOがE2による作用に何らかの関わりを持つ事が想定されており、マウスでは脳内NOによって摂食量や体重が上昇するという報告もある[Morley & Flood, 1991; 1992]。NOそのものを測定することは困難であるが、NADPHジアホラーゼ染色法（以下NOS染色）によってNOS陽性細胞を染色できることが報告されており[Bredt et al, 1991]、本項ではこの方をNOS染色法として用いた。これによりまず卵巣摘除ラットの脳内NOS分布を確かめ、次にE2持続投与によるNOS染色性の変化を測定し、E2による脳内NO活性の変化を推測した。

次に、パンチアウト法によって脳内神経核の組織含有アミノ酸を測定し、E2投与によるアミノ酸プールの変化を研究した。脳組織は脳血液関門によって生体の他の場所と切り放されており、そのアミノ酸代謝プールは特異なものである。その最大の特徴はGln（グルタミン、Glutamine）、Glu、Asp（アスパラギン酸、Aspartate）及び

GABA ( $\gamma$ -アミノ酪酸,  $\gamma$ -aminobutyric acid) の含量が他のアミノ酸に比べて比較的大きく、またこれらが神経伝達に大きく関わっていることである[Ansell & Richter, 1954; Bradford et al, 1977; 1989]。また、脳内でも神経核によって個々のアミノ酸含量がかなり異なっていることが指摘されている[Banay-Schwartz et al, 1989a; 1989b]。これはおそらく個々の神経核の独自の神経活動により、それに伴う代謝系やアミノ酸プールも独自のバランスを取ることがその原因であろうと推測される。従って長期的な神経活動の変化に伴ってアミノ酸プールの代謝バランスが変わってくることが予想される。例えば、神経活動としてGABAの放出が長期的に上昇した場合、GABAの前駆物質であるGluやさらにその前駆物質のGlnの代謝も変化し、全体として新しい代謝バランスに移行するであろう。

本章ではアミノ酸代謝プールの状態を表す指標としてGlnと他のアミノ酸との存在比を用い、E2持続投与による各神経核での変化を測定した。Glnは脳内で最も量の多いアミノ酸の一つで、しかも直接神経伝達物質として作用しないので神経伝達活動による変化が比較的小さいと考えられる。

#### 4-2 材料と方法

##### <実験1>

まず、Vincent & Kimura [1992]のプロトコルに従って卵巣摘除雌ラットの脳から作成した切片にNOS染色を行い、脳内NOS染色陽性部位を確かめた。第2章と同様に日本クレア社から購入した7週齢の雌ウィスター系ラットを購入後直ちに卵巣摘除し、一週間の回復期を置いて内因性性腺ステロイドホルモンの影響をのぞいた動物を供試した。採材や染色の方法は以下の通りである。

1. 供試動物をネンブタールで麻酔後へバリン入り生理食塩水で前灌流を行い、パラホルムアルデヒドを4%含んだ0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で灌流して固定を行った。

2. 脳組織を採取し、後固定液として15%のスクロースを灌流液に溶解したものに24時間浸漬して後固定を行った。

3. ミクロトームを用いて固定した脳を40  $\mu$ mの厚さにスライスし、ホルマリンを除く目的でリン酸緩衝液に一晩浸漬した。

4. 切片を酵素反応液 (ニトロブルーテトラゾリウム 0.1mg/ml,  $\beta$ -NADPH

1mg/ml, TritonX 0.3%) に入れて37度で30分間反応させ、洗浄後にスライドグラスにのせて標本とした。

次に、E2投与によるNOS染色性の変化を測定した。この供試動物を3群にわけ、そのうち2群に第2章で用いた20%E2チューブを皮下投与して一週間経過した後に明期あるいは暗期に灌流し、NOS染色を行った。残りの一群は対照群としてCholチューブを皮下移植した。次に、切片の顕微鏡写真を映像データとし、NOS染色性陽性細胞が密集してみられたVMH/VL (VMH腹外側部、VMH/ventrolateral part) 及びVMH/DM (VMH背内側部、VMH/dorsomedial part)、PVN及びAmy (扁桃核、Amygdala) の染色濃度をフリーソフトウェアであるNIH Imageで測定し、同様に染色されていない部分を背景濃度としてその値を引いてその神経核の染色濃度とした。

#### <実験2>

供試動物には前項と全く同様にE2あるいはCholチューブを皮下移植し、一週間後にエーテル麻酔下で断頭して脳を取り出し、-80度で冷凍保存した。次にパンチアウト法によってPOA、PVN、VMH (前部及び後部) 及びAmyの組織を採材した。

具体的には、コールドトーム内で凍結脳を1mmの厚さに切断し、内径0.81mmのステンレスパイプで目的部位を目視で確認して採取した。組織は蛋白質を除去する目的でトリクロロ酢酸5%溶液内に入れ、超音波破砕器によって組織を破砕し、15000rpm 45分で遠心分離によって上澄を採取し、エーテル抽出操作によってトリクロロ酢酸をのぞいた後にアミノ酸濃度を測定した。

アミノ酸の測定には、オルトフタルアルデヒド (o-phthalaldehyde; OPA) によるプレカラム蛍光誘導検出法を用い、高速液体クロマトグラフィー法 (HPLC法) によって検出した。HPLCは、オートサンブラ; 851-AS、デガッサ; DG-980-50、低圧グラジェントユニット; LG-980-02、ポンプ; PU-980、蛍光検出器; 821-FP、インテグレータ; 807-IT (以上全て日本分光) により構成されている。本研究では逆相系のカラム (CrestPak; C18S、全長; 150mm、内径; 4.6mm、粒子径; 5 $\mu$ m、日本分光) を恒温槽で25℃に維持して誘導体化アミノ酸を分離し、励起波長345nm、蛍光波長445nmを用いて検出した。誘導体化液としてOPA; 5mg、メタノール; 500 $\mu$ l、0.4M ホウ酸緩衝液 (pH9.00); 1ml、に重合剤として2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol);



10  $\mu$ lを混合して使用した。誘導体化アミノ酸は非常に不安定であるため、反応時間および検出までの時間が常に一定となるようにオートサンブラ内で試料10  $\mu$ lに対して誘導体化液20  $\mu$ lを7分間反応させ、そのうち10  $\mu$ lをHPLCに注入した。移動相として50mM酢酸ナトリウム水溶液 (pH5.99~6.00) および10%テトラヒドロフラン添加メタノールを使用した。

本装置ではAsp、Glu、GABA、Gln、の他にアスパラギン、ヒスチジン、セリン、アルギニン、グリシン、スレオニン、アラニン、タウリン (taurine; Tau)、チロシン (tyrosine; Tyr)、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、リジン、トリプトファン、メチオニンの各アミノ酸が測定可能であった。

得られたアミノ酸含量について、全てのアミノ酸をGln含量との存在比で表した。このうち神経伝達に重要であるとされるAsp、Glu、Tau、Tyr、GABAの五つのアミノ酸についてデータとして示した。

#### 4-3 結果

##### <実験1>

卵巣摘除雌ラット脳をNOS染色することによってHalls of Calleja、視索上核、VMH/VL、Amyのそれぞれの部位にNOS陽性細胞が密集して観察された。やや密度が低いPVNにもやはり多くのNOS陽性細胞が見られた。POAに関しては、NOS陽性細胞は散在して見られたもののそれほど多くはなかった。また、Amyから分界条を經由し、分界条床核へ投射する経路の一部がNOS陽性であり、AmyのNOS陽性細胞の軸索がこの経路を通っていることが示唆された。VMHの顕微鏡写真を写真1に、またAmyとPVNを写真2に示した。

次に、濃度比較の結果を図4-1に示した。E2投与によってVMH/VLの染色性が上昇したが、VMH/DM及びPVN、Amyでは染色性に差が見られなかった。また、E2投与群の明期と暗期のデータを比較した場合には、いずれの神経核でも染色性に差は観察されなかった。

##### <実験2>

E2投与によってPOA、PVN、VMH後部及びAmyにおいてTyr濃度の減少が見られた



(図4-2)。また各神経核ごとにかなりははっきりしたアミノ酸含量の違いが特徴的に見られ、POAにおいてはGABA濃度が、AmyにおいてはTau濃度が高く、一方PVNとAmyに関しては他の神経核と比べてGlu濃度が高い傾向が認められた。

#### 4-4 考察

E2の投与によってラットVMH/VL核でNOS染色性が変化することは既にRachman et al [1996]やOkamura et al [1994]が指摘しているが、本研究では画像解析プログラムであるNIH Imageで処理することにより定量的な解析を試み、こうした変化がVMH/VLでは最も明瞭に起こる一方、VMH/DMやPVN、Amyでは起こらないことを示した。従ってVMH/VLについては、E2がNOS活性を変化させることによってNOを介した神経活動を活性化させることが示唆された。

この変化の意義についてRachman et al [1996]は、VMH/VLが性行動の中核核であるとされていることから、これが性行動の誘起に結びついているのではないかと推測している。この変化が何らかの代謝系の変化を反映しているかどうかを確認するには更に研究を進める必要がある。

なお、VMHには絶食によって回転活動量を上昇させる走行ニューロンが存在することが報告されているが[Yokawa et al, 1989]、この論文を見るとそのニューロンの位置はおそらくVMH前部かVMH/DMのように思われる。少なくともVMH/VLにこれが存在するとは考えにくい。これと本実験の結果についての関連性を論じるのは難しいと思われる。

またOkamura et al [1994a]は、POAで同様にE2によるNOS陽性細胞数が増加することを報告しているが、本研究においてはNOS陽性細胞がそれほど認められず、E2投与による影響も見いだせなかった。このような結果の違いの理由としては、Okamura et al [1994a; 1994b]は10 $\mu$ gのエストラジオールベンゾエートを灌流2日及び3日前に投与していることから、E2の投与方法の違いがその原因ではないかと推測される。

次に、脳内アミノ酸濃度についての結果を考察する。脳内の部位によってアミノ酸の存在比がかなり違っており、同じ神経核では同じアミノ酸比率になる傾向があることはBanay-Schwartz et al [1989a; 1989b]が指摘したとおりであった。しかし、Asp、Glu、GABA濃度には変化が見られず、Tyrの減少が見られた。TyrはドパミンやNEな

どのカテコラミンの前駆体なので、この結果はE2投与によって多くの神経核においてカテコラミンの代謝が促進されたことを示唆している。ただ、今回の結果によってGluやGABAの神経活動が変化している可能性は否定できない。これらの代謝が促進されたとしても、Glnの代謝も促進されてGluやGABA産生が活性化されて結果的に同じ存在比を保っている可能性もあるからである。また、パンチアウト法はあくまで組織内の物質濃度を測定するもので、代謝回転速度といった機能面までは推定できない。例えばTyr濃度の変化はカテコラミン代謝の変化であると考えてよいと思われるが、Gluの場合はそのほとんどが代謝に関係し、実際に細胞外に放出されて神経伝達物質として作用するのはごく一部だと考えられるため、ここで見られた変化が神経伝達に関与している保証はない。さらにこれらが神経伝達による変化だとしても、本当に代謝系に関連した変化であるのかについては不明である。PVNに関してはおそらくカテコラミンの活性化が摂食抑制などに関連すると考えてよいと思われるが、AmyやPOA、VMHに関してはGnRH分泌や性行動との関連が考えられ、代謝とどのように関連するかは慎重に考える必要がある。これらの要素を排除し、代謝と神経伝達物質との関連を明らかにするには今後なお一層の研究が必要であろう。

本章の結論としては、E2の長期投与は脳内VMH/VL核でNOS活性の変化を引き起こし、さらにPOA、PVN、VMH、Amyなどの比較的広い範囲でカテコラミンの代謝変化を引き起こす事が示唆された。このうちPVNのカテコラミン変化についてはE2による摂食抑制に関与する可能性があるが、他の神経核についてははっきりした考察は出来なかった。

#### 4-5 小括

本章では、E2による代謝活動の変化はその関連が予想される中枢神経系での神経伝達変化を測定することを目的として実験を行った。まずE2によってVMH/VL核でのNOS活性が上昇することによって神経活動が影響を受けるという可能性が示唆された。次にE2投与による脳内遊離アミノ酸プールでの代謝変化を測定した結果、POA、PVN、VMH、Amyの各神経核においてTyrの代謝の促進が観察され、おそらくカテコラミンの神経活動上昇に伴う代謝系の変化によるものではないかと推察された。

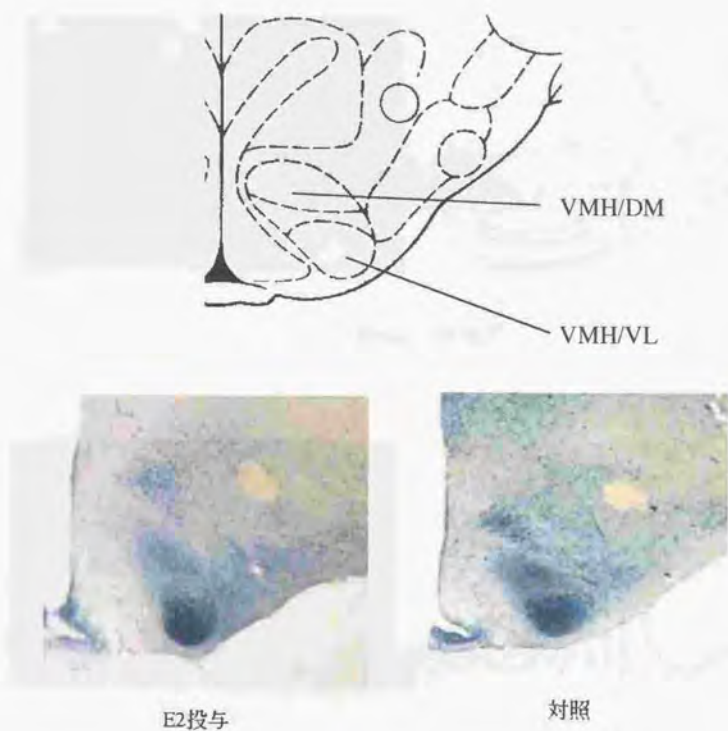
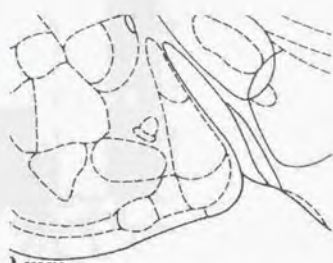


写真1. VMH/VLにおけるNOS染色性の違い



Amy; 扁桃核



PVN; 室傍核

写真2. NOS染色陽性部位：扁桃核及び室傍核



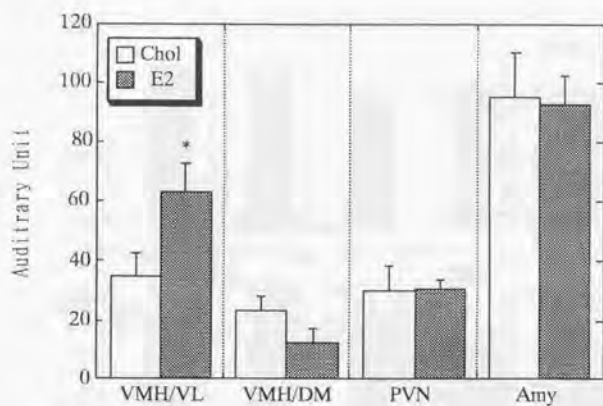


図4-1a NOS染色した脳切片の染色濃度を測定し、E2群 (n=7) とChol群 (n=5) と比較した結果。エラーバーは標準誤差。有意差はT検定によって算出した。  
\*... $p < 0.05$ 。VMH/VL: 視床下部腹内側核背外側部、VMH/DM: 同じく腹内側部、PVN: 室傍核、Amy: 扁桃核。

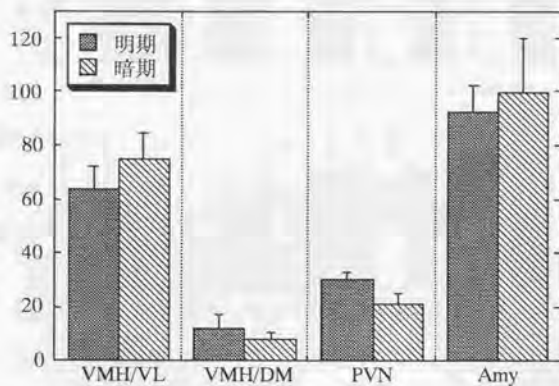


図4-1b. E2処理したラットを、明期 (n=7) と暗期 (n=3) にそれぞれ灌流した切片をNOS染色し、NIH Imageで濃度を測定して比較した結果。エラーバーは標準誤差。

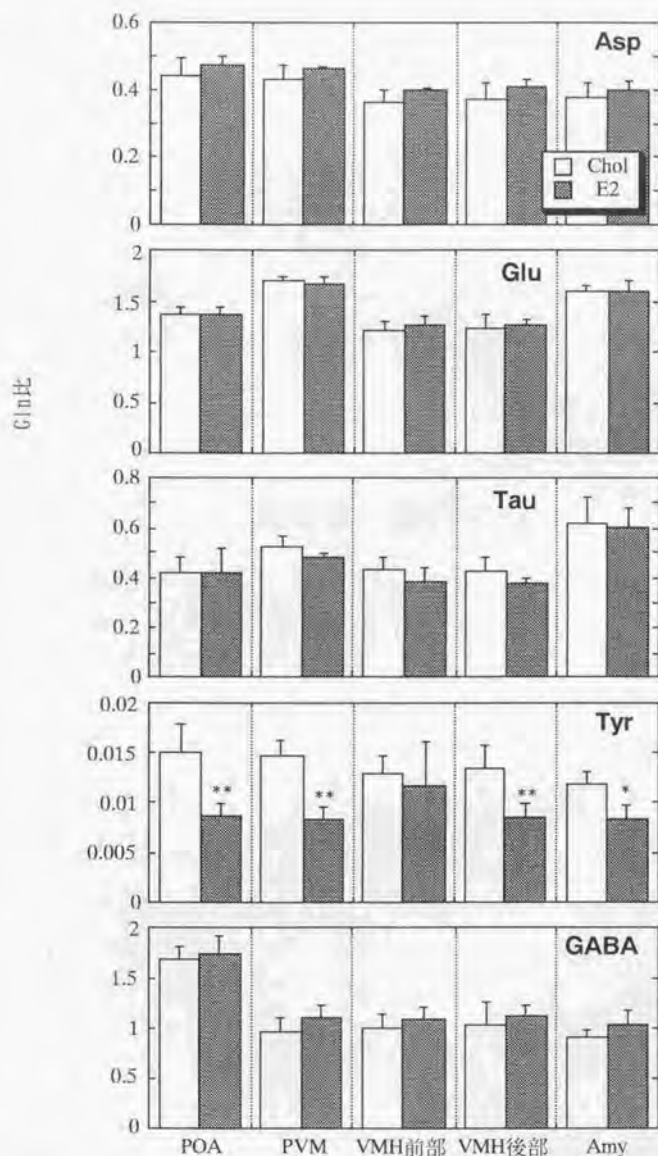


図4-2 E2処群 (n=5) とChol群 (n=5) との各アミノ酸濃度比。アミノ酸はそれぞれGlnとの存在比で表した。エラーバーは標準誤差を示す。有意差はMann-Whitney検定によって算出した。E2によりTyrに有意差が現れた。\*... $p<0.05$ , \*\*... $p<0.01$ 。

## 第5章 総合考察

### 5-1 エストロゲンが代謝に与える影響とその意義

本研究では、まずE2が代謝モード変換を指揮する中枢に作用することによって摂食、体重、回転活動量を一元的に制御しているという仮説をたて、これを検証することを目的として実験を進めたが、結果としてこれらのパラメーターに対するE2の作用はそれぞれにある程度の独立性を有することが明らかとなり、ある特定の中枢機構によって制御されているとは考えにくい事が示唆された。これを考察する前に、この項ではE2による摂食、体重、回転活動量への影響について、それぞれの作用機序、作用部位及びその意義について概説を試みる。

本研究により、卵巣摘除雌ラットの体重変化は日周期リズム成分と基底成分に分けて考える事ができる事が示唆された。このうち日周期リズム成分は摂食、摂水、そして糞尿などの排泄の日周期リズムが原因であると考えられる。このリズムはE2投与のものによっては影響を受けないが、E2投与によって暗期の活動量が上昇した場合、おそらく代謝活動の上昇によって暗期の排出量が増加することにより、リズム幅が縮小する。また、このリズム幅は平ケージよりも回転ケージで飼育した場合のほうが小さいことから、飼育状況に影響されると思われる。次に、体重変化の基底成分について考察する。卵巣摘除雌ラットの体重増加はどちらのケージでも同程度であるため、環境の影響を比較的受けにくいと思われる。またこの作用は体格成長及び脂肪組織の蓄積によって起こり、E2投与による体重増加抑制はこの2者が同時に抑制されることによって起こることが本研究から示唆されたため、この二つについて分けて考える。

脂肪組織蓄積の抑制については、この作用が脂肪組織の神経切断により弱まることから自律神経による脂肪組織の支配が関与していると推測され[Lazzarini & Wade, 1991]、また脂肪組織そのものもE2によってNEへの反応性が上昇することが指摘されている[Benoit et al, 1982; Hansen et al, 1980; Lacasa et al, 1991; Pasquier et al, 1988; Rebuffé-Scrive, 1987]。そこで、E2が視床下部では脂肪組織へのNE放出を促進し、一方脂肪組織ではNEの反応性を上昇させることによって脂肪組織蓄積を抑制していると解釈する事ができる。E2投与後の回転ケージ飼育群の体重抑制がより大きいのは、E2投与による体重抑制に加え、活動量増加による脂肪組織消費などが起こることが原因であろうと思われる。Schuurink et al [1989]は、運動量増加によって自律神経由来のNE放出が増加することを指摘している。体格成長抑制については、おそらく



骨端軟骨に存在するE2受容体が骨の成長を停止させることが原因ではないかと推測されている[Sömjen et al, 1991; Sömjen et al, 1994; Sömjen et al, 1995]が、これがケージ環境に影響されるかどうかは不明である。

また、この体格成長と脂肪組織蓄積はその意義が違うのではないかと推測できる。E2による体格成長抑制は第1章で述べたように体格を小型化することで個体維持のためのエネルギー消費を押さえ、かつ繁殖のためのエネルギーを確保するために引き起こされるのではないかと解釈される。それに対して脂肪蓄積への作用の意義は、卵巣摘除状態は妊娠状態を模倣しているとする考え方がある。ラットの場合、妊娠初期から中期にかけて、E2濃度が低くプロゲステロン濃度が高い状態が続く。この時期に摂食量上昇と脂肪組織の蓄積が起こるが、プロゲステロンはE2の作用に対抗する性質があり、Wade & Schneider [1992]はこの状態が卵巣摘除された状態に対応するとしている。この場合E2が体重増加を抑制するというよりは、E2の作用が弱い妊娠期に脂肪を蓄積するという解釈になる。E2が体重に影響を与える作用機序については模式図5-1にまとめた。

摂食量抑制の作用機序については現在も議論が続いており、実験が行われている。Baskin et al [1993]は少なくともこの作用が視床下部インシュリン受容体の変化を伴わないことを示唆し、Ganesan [1994]はこれが味覚の嗜好変化と関連しない事などから一般的な不快や食欲不振によるものではないことを示唆した。またCRF (Corticotropine Releasing Factor) の関与[Dagnault et al, 1993]、NPY (Neuropeptide Y) の関与[Baskin et al, 1995; Bonavera et al, 1994]、さらにPVNから迷走神経背側核路への投射が重要であると主張する意見[Butera et al, 1992]や、PVNで蛋白合成を阻害すると摂食抑制が起こらない[Butera et al, 1993]といった報告もある。しかしその作用部位については、PVNに存在するE2受容体があるという報告がほぼ定説となっている。これについては模式図5-2に示す。PVNへのE2投与は体重への影響を及ぼさないという報告[Butera & Beikirch, 1989]と、体重にも影響を与えるという報告[Palmer & Gray, 1986]の両方があり、現在もはっきりした結論は得られていないが、系統の違いなどが関連していると推測される。また、E2によって摂食量が抑制される意義としては、脂肪蓄積の場合と同様に妊娠中に摂食量が増加することと関連するのではないかとされている[Wade & Schneider, 1992]。

回転活動量の作用部位は、脳内神経核にE2を投与する実験からPOAであるという報告[Fahrbach et al, 1985; Wade & Zucker, 1970]があり、実際にPOAの破壊実験によってE2の回転活動量上昇が抑制されることが示されている[King, 1979]。同様に回転活動量に関連する神経核としてはVMHがあり、この部位に存在する走行ニューロンが絶食によって導入された回転活動量の上昇に関与していることが知られており、神経伝達物質の研究と合わせて解析が進んでいる[Bannai, 1998; Narita et al, 1993; 1994; Nishimura, 1996; Yokawa, 1989]。しかし、絶食によって誘導される活動量上昇とE2投与による活動量上昇はその動態が大きく違う。まず、絶食による活動量上昇は赤外線を用いた測定システムによって平ケージでも観察できるが、E2による実験では観察できない[Nishimura et al, 1996]。次に、絶食による活動量上昇は主に明期に引き起こされるが、E2による活動量上昇は暗期に起こる[Bauman, 1992; Nishimura et al, 1996]。そして第三に、前述のようにPOA破壊によってE2投与による活動量増加作用が見られなくなるものの、絶食による活動量上昇は阻害されない[King, 1979]。これらのことから、絶食による活動量上昇とE2による活動量上昇はその作用機序に違いがあることが推測される。おそらくE2による活動量上昇は概日リズムの抑制を受けるが、絶食による活動量上昇は概日リズムの抑制を解除するのであろう。

E2投与による回転活動量上昇機構についての模式図を図5-3に示す。なお、VMHにE2を投与することによって性行動を誘起できる事が示されており[Blache et al, 1991]、これを根拠にしてVMHのE2受容体が回転活動量を引き起こしているとも考えられるが、第3章で述べたように回転活動量は性行動を反映しているとは考えにくい。また、この回転活動量上昇の意義については、発情期に探索行動を上昇させたり、妊娠期に活動量を減少させるという解釈も出来るが、平ケージにおいて活動量上昇が起こらない理由はよくわかっておらず、その作用機序に至っては現在の所全く不明である。

E2による影響は観察されなかったが、摂水量についてもふれておく。E2投与やこれに伴う回転活動量の上昇にもかかわらず摂水量が上昇せず、ケージの種類によって変化が見られたことはかなり意外な結果であり、摂水量が何らかの形で内的環境条件よりも外的環境条件を強く反映することを示唆していると考えられる。

ここまで述べてきた様々なパラメーターに対するE2の作用について、それぞれがE2長期投与実験でどのような時間経過で反応したかを図5-4にまとめて示した。E2投与

の翌日にまず体重増加の抑制が起こり、その翌日に摂食量が抑制される。そして平均飼育の場合はそのまま推移するが、回転ケージ飼育の場合はE2投与2日目から回転活動量が上昇し始めて5日目にプラトーに達し、体重や摂食量もおそらくその影響を受けて二次的に変化する。このように体重、摂食量及び回転活動量はそれぞれがE2の情報を受けて独立して作用し、全体として代謝モード変換を引き起こすのではないかと推察された。

## 5-2 代謝モード変換と繁殖戦略

こうしたE2による代謝系の変化は哺乳類雌動物の繁殖戦略の多様性に深く関係するものと考えられる。実際、E2の作用様式は全ての哺乳類に共通なわけではない。実験用齧歯類に関してだけでも、ハムスターではE2による回転活動量や摂食量の変化はラットほどはっきりしておらず[Bhatia & Wade, 1993]、またスナネズミの場合、E2投与によって摂食量が増加することが知られている[Maass & Wade, 1977]。ドワーフジャンガリアンハムスターでは、妊娠によって摂食量が増加するものの脂肪蓄積が減少する[Schneider & Wade, 1987]。マウスでは様々な結果が出ており、おそらく系統によって反応が違ふと思われる[Wade & Schneider, 1992]。

このように種や系統によって差が生じることについて、E2の様々な作用を司る中枢機構は一元的なものではなく、今回の研究から示唆されたように、いくつかの独立した作用から成立していると考えた方が理解しやすいように思われる。全ての代謝が一元的に支配されているとした場合、環境の変化によって生殖戦略の変更が必要となった場合に柔軟な対応をとりづらいが、これがいくつかの独立した機構の複合体として存在しているとすれば、その機能の多様性により様々な繁殖戦略が可能となるであろう。例えば、妊娠中に胎児や泌乳のためのエネルギーを獲得する戦略としては、摂食量を上昇させたり、あらかじめ巣に餌をため込んだり、脂肪組織を蓄積したりすることが考えられるが、摂食量や体脂肪率の制御はこれらの戦略によって違ってくるはずである。例えばラットは妊娠してから摂食量を上昇させて脂肪組織を蓄積するが、ハムスターはむしろ餌を巣に蓄積し、摂食量はそれほど上昇しない[Wade & Schneider, 1992]。クマ、アザラシ、ヒゲクジラ類などは餌が豊富な時期に脂肪を蓄積し、妊娠後期から泌乳期にかけての泌乳や個体維持は全て蓄積されたエネルギーでまかない、餌



は食べない[Ofstedal, 1993]。これらは冬の環境条件が厳しい時期をやり過ごし、繁殖を成功させるための戦略と考えて良いだろう。また、スナネズミがE2によって摂食量が上昇するという事実は、おそらくスナネズミが性周期回帰中に何らかの形で餌の量が増えた方が都合のいいような繁殖戦略をとっていることを意味すると予測される。これについては野生下での生態の研究が進むことによって検証されることになる。

これらのことをふまえると、E2の代謝に与える影響は各々の生物種の繁殖戦略に合わせて発達してきたものと思われるため、種間の相同性がかなり低いことが推察される。本研究において、E2の作用が一元的ではなくいくつかの独立した作用機構を持って働いていることが示唆されたのには、このような背景があると推測される。従って、ラットで得られた知見をそのまま他の哺乳類に当てはめることはできず、個々の哺乳類の繁殖戦略を考慮し、適応的観点に立つことによってはじめて繁殖ホルモンの生理作用の意義が理解できると考えられる。

### 5-3 繁殖戦略にかかわるその他の要素について

この項では、繁殖戦略と代謝に関係する最近の知見を引用する。

細胞質内のER（エストロゲンレセプター、estrogen receptor）は一種類しか知られていなかったが、最近になってもう一種が発見され、これまで見つかったものをER $\alpha$ 、新しく見つかったものをER $\beta$ と呼称し、これらの脳内分布についても研究されている[Shughrue, 1997]。これによると、ER $\alpha$ とER $\beta$ は脳内において分布が違っており、例えばER $\alpha$ はVMH/VLに、ER $\beta$ はPVNに特に多く分布している。VMH/VLは繁殖に重要な神経核であり、またER $\alpha$ をノックアウトしたマウスは不妊になる[Korach, 1994]。また、PVNは前述のように摂食と関係の深い神経核なので、この部位のER $\beta$ が摂食抑制に関与していることが推測される。

この二つの受容体はE2に対しては反応性に差はないが、合成エストロゲンに対しては異なる反応性を示すようである[Kuiper & Gustafsson, 1997]。例えば抗エストロゲン剤であるタモキシフェンは、性行動を抑制するものの摂食や体重に関してはE2と同じ作用を持ち[Wade & Heller, 1993]、これが受容体の違いと関係する可能性がある。つまり、ER $\alpha$ とER $\beta$ がそれぞれ繁殖や代謝という別の作用を受け持つという推測も可能であるが、これについては研究が進むにつれて明らかになるであろう。



次に、レプチンについてふれる。レプチンは脂肪組織から分泌される蛋白質ホルモンで、体脂肪率のモニターに重要であることが指摘されている[Considine & Caro, 1996; Hamann & Mathiaei, 1996]。今回のラットについての実験ではレプチンについては観察しなかったが、レプチンがE2投与に影響される事実はラットでも示されている[Shimizu et al, 1997]ため、このレプチンが繁殖の際の脂肪蓄積に何らかの作用を担っていることは容易に推測できる。さらにクマやアザラシといった脂肪蓄積が繁殖成功に大きな影響を及ぼす動物にとってはそれは特に重要な要素となりうるであろう。

このように繁殖活動と代謝に関する研究は現在も活発に行われ始めており、哺乳類の多彩な繁殖戦略を反映して両者をつなぐ神経機構や内分泌機構は動物種によって異なることが次第に明らかとなってきた。この点については個々の動物種について詳細な解析を行うと同時に系統発生という視点から総合的に判断することが多様性の背景に存在する統一性を理解する上で重要になるとと思われる。

#### 5-4 まとめ

本研究においては、繁殖期においてE2が様々な生理機能に影響を与えることに関して、個体維持優先モードから繁殖優先モードへ代謝システム全体を切り替える中枢機構の存在を仮定し、複数のパラメーターに対するE2の作用様式を解析することによってこの中枢機構について検討を行った。その結果、E2の持つ体重、摂食、摂水及び回転活動量に対する作用様式はそれぞれかなり独立性の高いことが示された。また、E2投与によってVMH/VLのNOS陽性ニューロンや、POA、PVN、VMH、Amyの各部位でカテコラミンの代謝促進が示唆され、E2が脳内のかかなり広い範囲で神経伝達に影響を与えている可能性が示唆された。これらのことから、E2の代謝による影響は、ある特定の中枢部位が一元的に制御しているのではなく、複数の中枢部位がある程度の独立性を維持しながら、しかもE2情報をうけて協調的に機能しているであろう事が推察された。

このように代謝制御経路を複数持つことによって環境に応じた繁殖戦略の変更が容易となり、結果として哺乳類の繁殖戦略の多様性が生み出されていったのではないかと考えられる。従って、動物の繁殖系と代謝系の関連を研究する際にはその動物の繁殖戦略までを視野に入れてはじめて理解が可能となることが示唆された。

## E2投与による体重増加抑制の機構

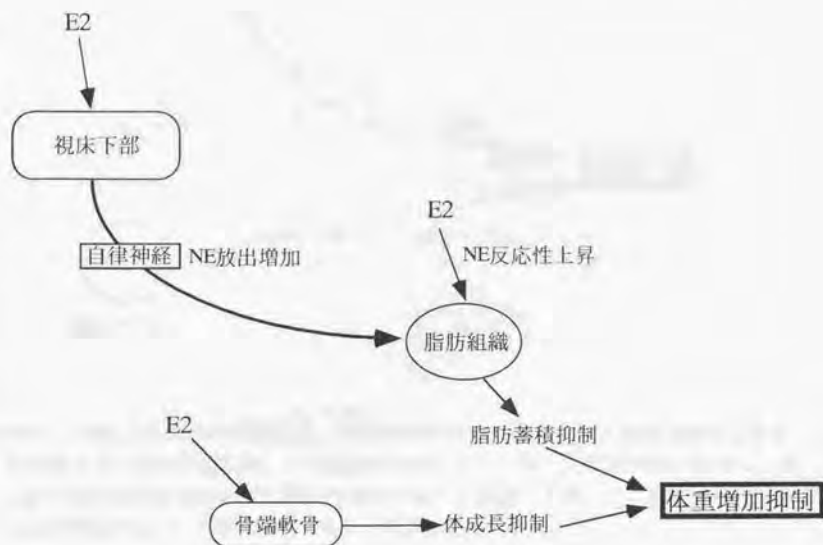


図5-1 E2による体重増加抑制機構。E2は視床下部に作用してNE放出を促進し、さらに脂肪組織に直接作用することによってNEへの反応性を上昇させ、これによって脂肪の蓄積を抑制する。さらに成長抑制については、骨端軟骨に存在するE2受容体の作用によるものであるとされている。この二つによって体重増加が抑制されると推測される。E2処理後24時間以内に体重増加抑制作用が現れる。

## E2投与による摂食抑制の機構

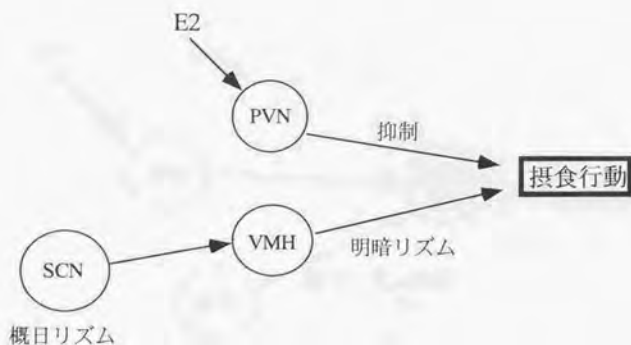


図5-2 E2による摂食量抑制機構。VMHはSCNからの概日リズム情報を受けて摂食の明暗リズムを作り出すが、この経路にはE2は関与しない。E2はPVNに作用し、何らかの蛋白合成の過程を経て摂食行動の抑制を引き起こすが、この抑制は日周リズムに影響されない。E2処理から2日後に作用があらわれる。

## E2投与による活動量上昇の機構

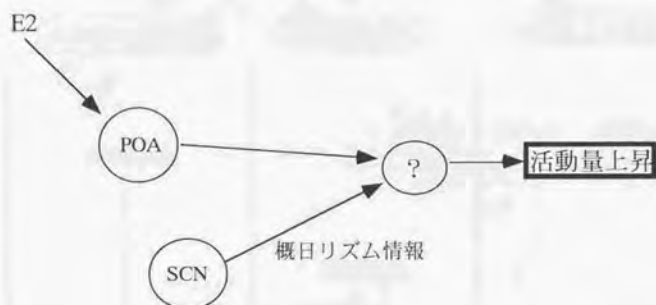


図5-3 E2による活動量増加機構。E2が直接POAに働き、さらにSCNの概日リズム情報と何らかの形で統合され、暗期のみの回転活動量上昇を引き起こすが、詳しい神経経路は不明である。E2投与後2日目から上昇し始め、5日目でプラトーに達する。



## E2投与による代謝への影響

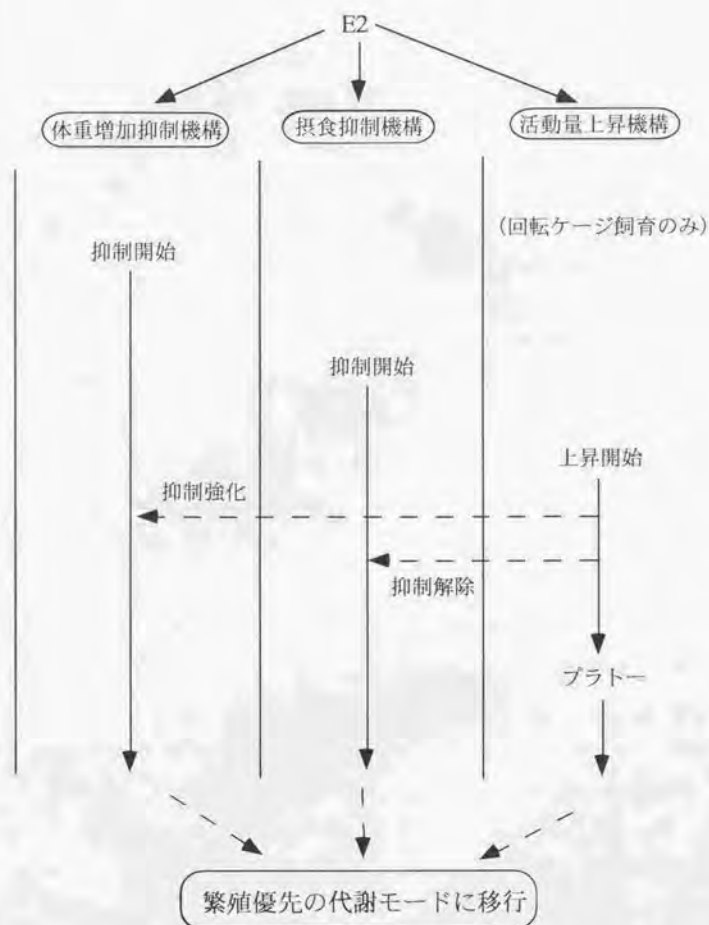


図5-4 E2投与による代謝への影響。それぞれの機構がE2を受けて作用し、結果として代謝系全体が繁殖優先モードへと移行する。回転活動量の増加が体重や摂食量に影響を与えることは観察されたが、体重増加や摂食量の抑制が他のパラメーターに影響を与えているかどうかは不明である。

## 総括

全ての動物は究極的には自己の適応度を上げるべく行動していると理解されている。このことは行動的指標についてだけでなく、内分泌や免疫機能といった生理学的観点からも妥当な解釈であることが多い。高等動物の場合、自身の有する遺伝子セットを次世代に継承し、繁殖成功をおさめ適応度を上げていくためには、個体維持活動と繁殖活動の二つの局面が必要不可欠である。個体維持活動とは摂食、摂水、呼吸などによって代謝エネルギーを獲得し、それを消費しながら個体の生命を存続していくことであり、一方、繁殖活動とは性行動や母性行動の発現を介して子孫を残し遺伝的情報を継承していく活動のことである。この個体維持活動と繁殖活動は対立的要素を本来的に内包しており、このため両者のいずれかが個体のライフサイクルの中で適切な時期に優先的に発現されてこそ、その個体は繁殖成功を収めることが出来ると考えられるが、その実体については未だ明らかにされていない。

本論文は5章より構成され、以下のようにまず第1章では性腺ステロイドホルモンであるエストラジオール17 $\beta$  (E2) が様々な生理的機能を統合的に変化させることにより個体維持活動から繁殖活動への変換が図られるという作業仮説をたて、第2章と第3章では実際にこの変換の過程を観察するための実験を行い、第4章ではこうした変化に伴う脳内神経核での一酸化窒素合成酵素 (NOS) 及びアミノ酸濃度の変化について検討し、これらの検討結果を基礎として第5章で総合考察を展開した。

第1章では、これまでに繁殖と代謝の関係について行われた過去の研究成果を概観し、本研究の背景と目的について解説した。哺乳類の雌動物にとって妊娠、出産、泌乳といった一連の繁殖活動は、同種の雄に比べてかなり大きなコストを伴うことが予想される。餌不足や環境の悪化、ストレスなどによって母体が障害が及んでしまうと胎子や乳子は生存できず、その雌にとっての繁殖成功は望めないことになる。このため、繁殖の成功確率が低い環境条件下では、雌動物は繁殖活動を一時的に停止し、次の繁殖機会の到来を待つ事が多い。その反面、成功する見込みがそれなりに高いと判断される場合には、個体の代謝的活動全般が繁殖活動に集約されるべく準備が整えられることになるのであろう。こうした変化は、個体維持優先モードから繁殖優先モードに切り替わる、いわば生命機能のモード変換に例えることができよう。すなわちこれは、今まで専ら個体維持のために費やされていた代謝エネルギーが、遺伝情報の継承といった観点からの最重要課題である繁殖活動に振り向けられることで

あり、しかもそのことで個体維持に危険が及んでは意味のないことから、このモード変換の背景には繁殖を可能ならしめる代謝エネルギーの巧妙な分配調節機構の存在が想定されるのである。そして、その機構の鍵を握る主要因の一つは、雌動物の繁殖活動のほぼ全ての局面に深くかかり、個体の生存には必須でないまでも子孫を残していく上では必要不可欠であることが知られているE2であろうと推察される。E2は繁殖活動に直接的に影響を与えるだけではなく、体重や摂食量の低下、骨端形成の誘導や脂肪組織の減少、自発活動量の増加など、一見繁殖には直接関係ないように思える生理作用も数多く有することが知られている。このことは、E2が代謝系全般に作用して個体維持優先モードから繁殖優先モードへの変化を指揮するホルモンであると仮定すれば理解が可能である。

そこで第2章では、まず雌動物においてE2の持続投与が体重や摂食摂水量といった代謝系のパラメーターにどのように影響を与えるかという点に着目して実験を行った。まず平ケージ内で飼育した動物について、体重及び頭尾長の経日変化に対するE2の影響を調べた。7週齢のウィスター系雌ラットを卵巣摘除して内因性E2の影響を除去し、一週間の回復期間を置いてE2を封入したシリコンチューブを皮下移植し、発情期における生理的E2濃度を長期間持続的に維持したものを繁殖モード、また対照群としてコレステロールを封入したシリコンチューブを皮下移植したものを個体維持モードとして、両群の個体について一週間ごとに体重及び頭尾長を測定した。E2投与は3週間とし、その後さらに4週間の記録を行った。その結果、E2の持続的投与は加齢に伴う体重と頭尾長の増加をいずれも顕著に抑制した。またこのE2による体重増加の抑制には、体格の成長抑制と脂肪組織蓄積の抑制の両者が相加的に関与することが示唆された。

次にE2による体重、摂食量及び摂水量の抑制パターンについてより詳細に解析する目的で、一日の中の明期と暗期の変化量をそれぞれ測定し比較した。前実験と同様にE2投与によって加齢に伴う体重増加が停止し摂食量も減少したが、体重と摂食量に対する抑制の程度については明期と暗期の間で差はみられず、これらの結果から、E2は脂肪蓄積、体格成長及び摂食量に対していずれも抑制的に作用することが明らかとなり、また体重変化や摂食量には明らかな日リズムが存在するもののE2の作用は概日リズム機構に直接的には共軛していないものと推察された。



次に第3章では、前章の平ケージとは異なり、自発的に運動できるという意味でより自然環境条件に近いと思われる自発活動量測定用回転籠付きケージ（回転ケージ）を用い、回転活動量の測定も合わせて同様の観察を行った。またシリコンチューブのE2含量を前章と同じものに加えて1/2及び1/4に下げたチューブを作製し、E2作用の用量依存性についても検討した。その結果、E2投与によって暗期の回転活動量のみが著しく上昇したが、その際にはE2濃度に対応した差異は認められなかった。また、前章の実験結果と同様に体重増加が抑制されたが、平ケージの場合に比べて抑制の程度がやや大きく、E2の用量に依存する傾向も観察された。一方、平ケージでの結果と違って、摂食量の減少は観察されなかった。こうしたデータを平ケージの場合も含めて詳細に解析してみると、両条件下とも体重増加の抑制がE2投与翌日に開始したのに対して、摂食量抑制はそのさらに翌日以降に起こっており、また回転ケージでの摂食抑制の程度にはE2投与量についての用量依存性がみられたが、いずれの場合もいったん減少したのちに元のレベルへの回復が観察された。この回復は運動量の著しい上昇に起因するものと考えられた。本章の結果から、E2の体重や摂食量への作用には用量依存的傾向の認められること、また平ケージの場合と違い、回転ケージにおいては明期と暗期の間でE2の効果に差の生じることが示された。

第4章では、こうしたE2の作用発現への関与が予想される脳内部位に着目し、いくつかの神経核における一酸化窒素（NO）とアミノ酸の動態について検討した。脳内でNOは神経伝達物質として様々な脳機能の発現に重要な役割を持つことが示唆されている。そこで、NOの合成を司るNOSの発現を酵素染色法を用いて検出し、E2投与の影響について検討したところ、視床下部腹内側核背内側部においてE2による染色性の増加が見られた。明期と暗期の間ではこの染色性に差はみられず、視床下部腹内側核背内側部においてE2により合成促進されるNOがE2の中枢作用に関与しているものと推察された。次に、パンチアウト法により各神経核の組織を採取してそのアミノ酸含量を測定し、これがE2投与によってどのように変化するかを調べた。その結果、E2投与群では視索前野、室傍核、腹内側核及び扁桃核においてチロシン濃度の減少が観察された。チロシンはノルエピネフリンやドパミンなど重要な神経伝達物質であるカテコラミンの前駆物質であることから、これらの各神経核においてカテコラミンを介した神経伝達活性の亢進が推察された。

第5章では、以上の結果を総括し、個体維持の維持モードから繁殖モードへのスイッチングに関するE2の中枢作用機序について考察を行った。E2による体重増加抑制がE2投与翌日から生じたのに対して、摂食量抑制は一日遅れて観察されたことから、まず摂食量抑制が体重減少の直接的な原因とは限らないことが示唆された。さらに、E2による体重増加抑制と摂食量抑制では閾値に差が認められるなど、両者を司る機構は同一ではないことが示唆された。また、E2による体重や摂食量への影響が平ケージと回転ケージではやや異なっており、その要因として後者における活動量上昇が推測された。活動量の上昇が摂食量回復や体重増加抑制を引き起こす可能性は否定できないが、今回の成績からは、むしろE2により摂食および体重増加の抑制される機構が、活動量の調節機構とは別個に存在していることが推測された。またE2は特定の視床下部神経核におけるNOやカテコラミンの代謝回転に影響を与えることで多面的な向中枢作用を発揮している可能性が示唆された。

これらを総合すると、E2による体重増加の抑制、摂食の抑制そして活動量増加の背景となる中枢機構は、いずれもE2によって個体の代謝を制御し個体維持活動から繁殖活動へ変化させる統合的機能調節機構の一部ではあるが、各々については相当程度独立性の高いシステムから構成されていることが推察された。このことは哺乳類の繁殖戦略の多様性の大きさと関連しているのかもしれない。例えば、このような生命機能のモード変換に関わる機構が多能的構造を有しており、ある程度の許容範囲内で独立的にE2に反応しうるとすれば、繁殖活動の開始に際して起こりうる環境の急激な変化や突然変異によって仮にいずれかの機能が不調をきたしたとしても、別の機構による補填あるいは代償をより効率的に行えることになる。そして、こうした柔軟性を持つ対応様式が結果として遺伝的変異の種内蓄積を可能とし、これにより進化や適応の過程が促進され、ほ乳類の繁殖戦略の多様性が生み出されたとも考えられる。

以上、本研究の結果から、雌動物における個体維持から繁殖へのモード変換に関わる主要な代謝的反応の制御機構は、性腺シグナルであるE2に対してそれぞれ特異的な反応様式を有しながらも個体としての合目的な反応を司る統合的な中枢制御機構の要素として互いに連携することで協調的变化を実現していることが示された。

## 謝辞

本研究の遂行及び本論文の執筆に当たり終始ご指導とご鞭撻を賜りました森裕司教授に謹んで感謝申し上げます。

さらに実験の遂行全般にわたってご指導とご助言を賜りました武内ゆかり助教授に謹んで感謝申し上げます。

菊水健史助手には本論文の執筆に際して貴重なご助言を賜りましたことを心から感謝申し上げます。

また、東京大学行動学研究室の戸畑伝治氏、高野道子氏をはじめとする本研究室の学生の皆様には多大なご援助を頂きました。心より感謝の意を表します。

## 引用文献



# 引用文献

Abraham SF, Beaumont PJV, Fraser IS & Llewellyn-Jones D (1982) Body weight, exercise and menstrual status among ballet dancers in training, *Br. J. Obstet. Gynaec.*, 89:507-10.

Adler BA & Crowley WR (1986) Evidence for  $\gamma$ -aminobutyric acid modulation of ovarian hormonal effects on luteinizing hormone secretion and hypothalamic catecholamine activity in the female rat. *Endocrinology*, 118:1:91-97.

Aguan K, Mahesh VB, Ping L, Bhat G & Brann DW (1996) Evidence for a physiological role for nitric oxide in the regulation of the LH surge: Effect of central administration of antisense oligonucleotides to nitric oxide synthase. *Neuroendocrinology*, 64:449-55.

Albert DJ, Jonik RH, Gorzalka BB, Newlove T, Webb B & Walsh ML (1991) Serum estradiol concentration required to maintain body weight, attractiveness, proceptivity, and receptivity in the ovariectomized female rat. *Physiol. Behav.*, 49:225-231.

Allen DM & Lammings GB (1961) Nutrition and reproduction in the ewe. *J. Agric. Sci.*, 56:69-79.

Ansell GB & Richter D (1954) A note on the free amino acid content of rat brain *Biochem. J.*, 57:70-73.

Banay-Schwartz M, Lajtha A & Palkovits M (1989a) Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements I. Glutamate and related amino acids. *Neurochemical Research*, 14:555-62.

Banay-Schwartz M, Lajtha A & Palkovits M (1989b) Changes with aging in the levels of amino acids in rat CNS structural elements II. Taurine and small neural amino acids. *Neurochemical Research*, 14:563-70.

Bannai M, Ichikawa M, Nishihara M, and Takahashi M (1998) Effect of injection of antisense oligonucleotides of GAD isozymes into rat ventromedial hypothalamus on food intake and locomotor activity. *Brain Res.*, 784:305-15.

Barracough CA (1992) Neural control of the synthesis and release of luteinizing hormone-releasing hormone. *Ciba Found. Symp.*, 168:233-46.

Baskin DG, Gierke EP, Wilcox BJ, Matsumoto AM & Schwartz MW (1993) Food intake and estradiol effects on insulin binding in brain and liver. *Physiol. Behav.*, 53:757-762.

Baskin DG, Norwood BJ, Schwartz MW & Koerker DJ (1995) Estradiol inhibits the increase of hypothalamic neuropeptide Y messenger ribonucleic acid expression induced by weight loss in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 136:5547-54.

Bauman RA (1992) The effects of wheel running, a light/dark cycle, and the instrumental cost of food on the intake of food in a closed economy. *Physiol. Behav.*, 52:1077-83.

Benoit V, Vallette B, Mercier L, Meignen JM & Boyer J (1982) Potentiation of epinephrine-induced lipolysis in fat cells from estrogen treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 109:1186-91.

Bhatia AJ & Wade GN (1993) Energy balance in pregnant hamsters: A role for voluntary exercise? 265:R563-567.

Blache D, Fabre-nys CJ & Venier G (1991) Ventromedial hypothalamus as a target for estradiol action on proceptivity, receptivity and lutenizing hormone surge of the ewe. *Brain Res.*, 546:241-249.

Bonavera JJ, Sahu A, Kalra PS & Kalra SP (1993) Evidence that nitric oxide may mediate the ovarian steroid-induced lutenizing hormone surge: involvement of excitatory amino acids. *Endocrinology*, 133:2481-2487.

Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS & Kalra SP (1994) Anorexic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology*, 134:2367-70.

Bonavera JJ, Kalra PS & Kalra SP (1996) L-arginine/nitric oxide amplifies the magnitude and duration of the lutenizing hormone surge induced by estrogen: Involvement of neuropeptide Y. *Endocrinology*, 137:1956-62.

Bradford HF, Ward HK & Thomas AJ (1978) Glutamine-A major substrate for nerve endings. *J. Neurochem.*, 30:1453-1459.

Bradford HF, Ward HK & Foley P (1989) Glutaminase inhibition and the release of neurotransmitter glutamate from synaptosomes. *Brain Research*, 476:29-34.

Brann DW & Mahesh VB (1991a) Endogenous excitatory amino acid regulation of the progesterone-induced LH and FSH surge in estrgen-primed ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 53:107-110.

Brann DW & Mahesh VB (1991b) Endogenous excitatory amino acid involvement in the preovulatory and steroid-induced surge of gonadotropins in the female rat.

Endocrinology, 128: 1541-1547.

Bredt DS, Glatt CE, Hwang PM, Fotuhi M, Dawson TM & Snyder SH (1991) Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 7:615-24.

Butera PC & Beikirch RJ (1989) Central implants of diluted estradiol: independent effects on ingestive and reproductive behaviors of ovariectomized rats. *Brain Res.*, 491:266-273.

Butera PC, Willard DM & Raymond SA (1992) Effects of PVN lesions on the responsiveness of female rats to estradiol. *Brain Res.*, 576:304-10.

Butera PC, Campbell RB & Bradway DM (1993) Antagonism of estrogenic effects on feeding behavior by central implants of anisomycin. *Brain Res.*, 624: 354-356.

Chakravarty I, Sreedhar R, Gosh KK & Bulusu S (1982) Circulating gonadotropin profiles in severe cases of protein-calorie malnutrition. *Fertil. Steril.*, 37:650-4.

Clark RG & Tarttelin MF (1982) Some effects of ovariectomy and estrogen replacement on body composition in the rat. *Physiol. Behav.*, 28:963-9.

Considine RV & Caro JF (1996) Leptin: Genes, concepts and clinical perspective. *Horm. Res.*, 46:24-56.

Dagnault A, Ouerghi D & Richard D (1993) Treatment with alpha-helical -CRF (9-41) prevents the anorectic effect of 17-beta-estradiol. *Brain Res. Bull.*, 32:689-692.

Darwin CR (1859) *The Origin of Species by Means of Natural Selection*. Murray, London.

Demling J, Fuchs E, Baumert M & Wuttke W (1985) Preoptic catecholamine, GABA and glutamate release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-primed rats utilizing a push-pull cannula technique. *Neuroendocrinology*, 41:212-218.

Dickerman JWT, Gresham GA & McCance RA (1964) The effect of undernutrition and rehabilitation on the development of reproductive organs: pigs. *J. Endocrinol.*, 29:111-8.

室田誠逸 (1996) NOの基礎と臨床。メディカルレビュー、東京。

Fahrbach SE, Meisel RL & Pfaff DW (1985) Preoptic implants of estradiol increase

wheel running but not the open field activity of female rats. *Physiol. Behav.*, 35:985-992.

Falk JR, Halmi KA, Eckert E, Casper, R (1983). Primary and secondary amenorrhea in anorexia nervosa. Lexington.

Fleming AS (1978) Food intake and body weight regulation during the reproductive cycle of the golden hamster (*Mesocricetus auratus*) *Behav. Biol.*, 24:291-306.

Fleming AS & Miceli MO (1983) Effect of diet on feeding and body weight regulation during pregnancy and lactation in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Behav. Neurosci.*, 97:246-54.

Flint DJ, Sinnet-Smith PA, Clegg RA & Vernon RG (1979) Role of insulin receptors in the changing metabolism of adipose tissue during pregnancy and lactation in the rat. *Biochem. J.*, 182:421-7.

Flügge G, Oertel WH & Wuttke W (1986) Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology*, 43:1-5.

Ganesan R (1994) The aversive and hypophasic effects of estradiol. *Physiol. Behav.*, 55:279-85.

Gentry RT, Wade GN & Roy EJ (1976) Individual differences in estradiol-induced behaviors and neural 3H-estradiol uptake in rats. *Physiol. Behav.*, 17:195-200.

Gerall AA, Napoli AM & Cooper UC (1973) Daily and hourly estrous running in intact, spayed, and estrone implanted rats. *Physiol. Behav.*, 10:225-9.

Glass AR, Deuster PA, Kyle SB, Yahiro RA, Vigerski RA & Schoemaker EB (1987) Amenorrhea in olympic marathon runners. *Fertil. Steril.*, 48:740-5.

Grattan DR, M. S. Rocca MS, Strauss KI, Sagrillo CA, Selmanoff M & McCarthy MM (1996) GABAergic neuronal activity and mRNA levels for both forms of glutamic acid decarboxylase (GAD65 and GAD67) are reduced in the diagonal band of Broca during the afternoon of proestrus. *Brain Res.*, 733:46-55.

Hamann A & Matthaei S (1996) Regulation of energy balance by leptin. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 104:293-300.

Hamilton GD & Bronson FH (1985) Food restriction and reproductive development in wild house mice. *Biol. Reprod.*, 32:773-8.



Hamilton GD & Bronson FH (1986) Food restriction and reproductive development: Male and female mice and male rats. *Am. J. Physiol.*, 250:R370-6.

Hansen L, Fahmy N & Nielsen JH (1980) The influence of sexual hormones on lipogenesis and lipolysis in rat fat cells. *Acta Endocrinol.*, 95:566-70.

Herbison AE, Heavens RP & Dyer RD (1990) Oestrogen modulation of excitatory A1 noradrenergic input to rat medial preoptic gamma aminobutyric acid neurons demonstrated by microdialysis. *Neuroendocrinology*, 52:161-168.

Herbison AE, Chapman C & Dyer RG (1991) Role of medial preoptic GABA neurons in regulating luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Exp. Brain Res.*, 87:345-352.

Herbison AE, Augood SJ, Simonian SX & Chapman C (1995) Regulation of GABA transporter activity and mRNA expression by estrogen in rat preoptic area. *J. Neurosci.*, 15:8302-8309.

Howland BE (1972a) Ovarian weight and ovarian compensatory hypertrophy in the rat as affected by duration of underfeeding. *J. Reprod. Fertil.*, 28:321-7.

Howland BE (1972b) Effect of restricted food intake on LH levels in female rats. *J. Anim. Sci.*, 34:445-7.

Howland BE & Skinner KR (1973) Effect of starvation on LH levels in male and female hamsters. *J. Reprod. Fertil.*, 32:505-7.

Jackson CM (1915) Effects of acute and chronic inanition upon the relative weights of the various organs and systems of adult albino rats. *Am. J. Anat.*, 18:75-116.

Jarry H, Hirsch B, Leonhardt S & Wuttke W (1992) Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH surge. 56:133-140.

Kennedy GC & Mitra J (1963a) Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *J. Physiol.*, 166:408-18.

Kennedy GC & Mitra J (1963b) Hypothalamic control of energy balance and the reproductive cycle in the rat. *J. Physiol.*, 166:395-407.

Kennedy GC (1964) Hypothalamic control of the endocrine and behavioral changes associated with oestrus in the rat. *J. Physiol.*, 172:383-92.

Kimura F & Jinnai K (1994) Bicuculline infusions advance the timing of luteinizing hormone surge in proestrous rats: Comparisons with naloxone effects. *Horm. Behav.*, 28:424-30.

King JM (1979) Effects of lesions of the amygdala, preoptic area, and hypothalamus on estradiol-induced activity in the female rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 93: 360-7

Korach KS (1994) Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science*, 266:1524-7.

Kow L-M, Mobbs CV & Pfaff DW (1994) Roles of second-messenger systems and neuronal activity in the regulation of lordosis by neurotransmitters, neuropeptides, and estrogen: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 18:251-268.

Kuiper GGJM & Gustafsson J-Å (1997) The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Letters*, 410:87-90.

Kurin HE, Bwiho N, Mutie D & Santner SJ (1984) Gonadotropin excretion during puberty in malnourished children. *J. Pediatr.*, 105:325-8.

Lacasa D, Agli B, Pecquery R & Giudicelli Y (1991) Influence of ovariectomy and regional fat distribution on the membranous transducing system controlling lipolysis in rat fat cells. *Endocrinology*, 128 747-53.

Lammond DR (1970) The influence of undernutrition on reproduction in cow. *Anim. Breed. Abstr.*, 28:350-72.

Lazzarini SJ & Wade GN (1991) Role of sympathetic nerves in effects of estradiol on rat white adipose tissue. *Am. J. Physiol.*, 260:R47-51.

Lee WS., Smith MS & G. E. Hoffman (1990) Progesterone enhances the surge of luteinizing hormone by increasing the activation of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Endocrinology*, 127:2604-6.

Leranth C, MacLusky NJ, Sakamoto H, Shanabrough M & Naftolin F (1985) Glutamic acid decarboxylase-containing axons synapse on LHRH neurons in the rat medial preoptic area. *Neuroendocrinology*, 40:536-539.

Lindsay R, Hart DM, Aitken JM, MacDonald EB, Anderson JB & Clarke AC (1976) Long-term prevention of postmenopausal osteoporosis by oestrogen. Evidence for an increased bone mass after delayed onset of oestrogen treatment. *Lancet*, 1(7968):1038-41.

Lindsay R, Hart DM, Forrest C & Baird C (1980) Prevention of spinal osteoporosis in oophorectomized women. *Lancet*, 2(8205):1151-4.

Lizasoain I, Weiner CP, Knowles RG & Moncada S (1996) The ontogeny of cerebral and cerebellar nitric oxide synthase in the guinea pig and rat. *Pediat. Res.*, 39:779-83.

López FJ, Donoso AO & Negro-Vilar A (1990) Endogenous excitatory amino acid neurotransmission regulates the estradiol-induced LH surge in ovariectomized rats. *Endocrinology*, 126:1771-1773.

Maass CA & Wade GN (1977) Effects of gonadal hormones on eating and body weight in Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Horm. Behav.*, 9:178-187.

Mani SK, Allen JMC, Rettori V, McCann SM, O'Malley BW & Clark JH (1994) Nitric oxide mediates sexual behavior in female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:6468-6472.

Marsteller FA & Lynch CB (1983) Reproductive consequences of food restriction at low temperature in lines of mice divergently selected for thermoregulatory nesting. *Behav. Genet.*, 13:397-410.

McClure TJ (1966) Infertility in mice caused by fasting at about the time of mating. I. mating behaviour and littering rates. *J. Reprod. Fertil.*, 12:243-8.

Merson MH & Kirkpatrick RL (1981) Relative sensitivity of reproductive activity and body-fat level to food restriction in white-footed mice. *Am. Midl. Nat.*, 106:305-12.

Merson MH & Kirkpatrick RL (1983) Role of energy intake in the maintenance of reproduction in female white-footed mice *Peromyscus leucopus*. *Am. Midl. Nat.*, 109:206-8.

Moore BJ & Brasel JA (1984) One cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation or no lactation, and recovery: effects on carcass composition in ad libitum-fed and food restricted rats. *J. Nutr.*, 114:1548-59.

Morin LP (1975) Effects of various feeding regimens and photoperiod or pinealectomy on ovulation in the hamster. *Biol. Reprod.*, 13:99-103.

Morley JE & Flood JF (1991) Evidence that nitric oxide modulates food intake in mice. *Life Science*, 49:707-11.

Morley JE & Flood JF (1992) Competitive antagonism of nitric oxide synthase causes weight loss in mice. *Life Science*, 51:1285-9.

Mueller CC & Sadler RMFS (1979) Age at first conception of black-tailed deer. *Biol. Reprod.*, 21:1099-104.

Nagai K, Nishio T, Nakagawa H, Nakamura S & Fukuda Y (1978) Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food-intake. *Brain Res.*, 142:384-9.

Naismith DJ, Richardson DP & Pritchard AE (1982) The utilization of protein and energy during lactation in the rat with particular regard to the use of fat accumulated in pregnancy. *Br. J. Nutr.*, 48:433-41.

Narita, K, Yokawa, T, Nishihara, M, and Takahashi, M (1993) Interaction between excitatory and inhibitory amino acids in the ventromedial nucleus of the hypothalamus in inducing hyper-running. *Brain Res.*, 603:243-7.

Narita, K, Nishihara, M, and Takahashi, M (1994) Concomitant regulation of running activity and metabolic change by the ventromedial nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.*, 642:290-6.

Nishimura F, Nishihara M, Torii K & Takahashi M (1996) Changes in responsiveness to serotonin on rat ventromedial hypothalamic neurons after food deprivation. *Physiol. Behav.*, 60:7-12.

Ofstedal OT (1993) The adaptation of milk secretion to the constraints of fasting in bears, seals, and baleen whales. *J. Dairy Sci.*, 76:3234-46.

Okamura H, Yokosuka M, McEwen BS & Hayashi S (1994a) Colocalization of NADPH-diaphorase and estrogen receptor immunoreactivity in the rat ventromedial hypothalamic nucleus: Stimulatory effect of estrogen on NADPH-diaphorase activity. *Endocrinology*, 135:1705-1708.

Okamura H, Yokosuka M & Hayashi S (1994b) Estrigenic induction of NADPH-Diaphorase activity in the preoptic neurons containing estrogen receptor immunoreactivity in the female rat. *J. of Neuroendoc.*, 6:597-601.

鈴木善祐, 高橋迪雄, 堤義雄, 豊田裕, 入谷明, 正木淳二, 横山昭, 森純一, 古賀修 (1988) 新家畜繁殖学. 朝倉書店. 東京.

Palmer K & Gray JM (1986) Central vs. peripheral effects of estrogen on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. *Physiol. Behav.*, 37:187-189.



Pasquier YN, Pecquery R & Giudicelli Y (1988) Increased adenylate cyclase catalytic activity explains how estrogens "in vivo" promote lipolytic activity in rat white fat cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 154:1151-9.

Perrigo G & Bronson FH (1983) Foraging effort, food intake, fat deposition, and puberty in female mice. *Biol. Reprod.*, 34:455-63.

Prentice AM, Goldberg GR, Davies HL, Murgatroyd PR & Scott W (1989) Energy-sparing adaptations in human pregnancy assessed by whole-body calorimetry. *Br. J. Nutr.*, 62:5-22.

Printz RH & Greenwald GS (1970) Effects of starvation on follicular development in the cyclic hamster. *Endocrinology*, 86:290-5.

Quek VSH & Trayhurn P (1990) Calorimetric study of the energetics of pregnancy in golden hamsters. *Am. J. Physiol.*, 259:R807-12.

Rachman IM, Pfaff DW & Cohen RS (1996) NADPH diaphorase activity and nitric oxide synthase immunoreactivity in lordosis-relevant neurons of the ventromedial hypothalamus. *Brain Research*, 740:291-306.

Rebuffé-Scrive M (1987) Sex steroid hormones and adipose tissue metabolism in ovariectomized and adrenalectomized rats. *Acta Physiol. Scand.*, 129:471-7.

Rodier III WI (1971) Progesterone-estrogen interactions in the control of activity-wheel running in the female rats. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 74:365-73.

Ruiz de Elvira MC, Persaud R & Coen CW (1992) Use of running wheels regulates the effects of ovaries on circadian rhythms. *Physiol. Behav.*, 52:277-284.

Sadler RMFS (1969a) The role of nutrition in the reproduction in the reproduction of wild mammals. *J. Reprod. Fert. Suppl.*, 6:39-48.

Sadler, RMFS (1969b). The ecology of reproduction in wild and domestic mammals. London, Methuen.

Sano H, Hayashi H, Makino M, Takezawa H, Hirai M & Saito H (1995) Effects of suprachiasmatic lesions on circadian rhythms of blood pressure, heart rate and locomotor activity in the rat. *Jpn. Circ. J.*, 59:565-573.

Schenck PE, Koos Slob A, Uilenbroek JIJ & van der Werfften Bosch JJ (1980) Effect of neonatal undernutrition on serum follicle stimulating hormone levels and ovarian development in the female rat. *Br. J. Nutr.*, 44:179-82.

Scheurink AJW, Steffens AB, Bouritius H, Dreteler GH, Bruntink R, Remie R & Zaagsma J (1989) Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. *Am. J. Physiol.*, 256:R155-60.

Schneider JE & Wade GN (1987) Body composition, food intake, and brown fat thermogenesis in pregnant Djungarian hamsters. *Am. J. Physiol.*, 253:R314-20.

Seltzer AM & Donoso AO (1992) Restraining action of GABA on estradiol-induced LH surge in the rat: GABA activity in brain nuclei and effects of GABA mimetics in the medial preoptic nucleus. *Neuroendocrinology*, 55:28-34.

Shimizu H, Shimomura Y, Nakanishi Y, Futawatari T, Ohtani K, Sato N & Mori M (1997) Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. *J. Endoc.*, 154:285-92.

Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI & Pfaff DW (1983) Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature*, 304:345-347.

Shughrue PJ (1997) Comparative distribution of estrogenreceptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 388:507-25.

Sieck GC, Nance DM & Gorski RA (1978) Estrogen modification of feeding behavior in the female rat: Influence of metabolic state. *Physiol. Behav.*, 21:893-897.

Sömjen D, Weisman Y, Mor Z, Harell A & Kaye AM (1991) Regulation of proliferation of rat cartilage and bone by sex steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 40:717-23.

Sömjen D, Z. Mor & M. Kaye (1994) Age dependence and modulation by gonadectomy of the sex-specific response of rat diaphyseal bone to gonadal steroids. *Endocrinology*, 134:809-14.

Sömjen D, Weisman Y & Kaye AM (1995) Pretreatment with 1, 25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D or 24, 25 (OH)<sub>2</sub> vitamin D increases synergistically responsiveness to sex steroids in skeletal-derived cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 55:211-7.

Spray CM (1950) A study of some aspects of reproduction by means of chemical analysis. *Br. J. Nutr.*, 4:354-60.

Steingrimsdottir L, Brasel JA & Greenwood MRC (1980) Diet, pregnancy, and lactation: effects on adipose tissue, lipoprotein lipase, and fat cell size. *Metabolism*, 29:837-41.

Stoynev AG & Ikonov OC (1982) Feeding pattern and light-dark variations in water intake and renal excretion after suprachiasmatic nuclei lesions in rats. 29:35-40.

Stumpf WE (1970) Estrogen-neurons and estrogen-neuron systems in the paraventricular brain. *Am. J. Anat.*, 129:207-18.

Tartelín MF & Gorski RA (1973) The effects of ovarian steroids on food and water intake and body weight in the female rat. *Acta Endocrinologica*, 72:551-568.

Thomas EMV & Armstrong SM (1989) Effect of ovariectomy and estradiol on unity of female rat circadian rhythms. *Am. J. Physiol.*, 257:R1241-R1250.

Tokunaga K, Fukushima M, Kemnitz JW & Bray GA (1986) Comparison of ventromedial and paraventricular lesions in rats that become obese. *Am. J. Physiol.*, 251:R1221-7.

Tokuyama K, Saito M & Okada H (1982) Effects of wheel running on food intake and weight gain of male and female rats. *Physiol. Behav.*, 28:899-903.

Unda R, Brann DW & Mahesh VB (1995) Progesterone suppression of glutamic acid decarboxylase (GAD 67) mRNA levels in the preoptic area; Correlation to the luteinizing hormone surge. *Neuroendocrinology*, 62:562-70.

Vincent SR & Kimura H (1992) Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience*, 46:755-784.

Wade GN & Zucker I (1970) Modulation of food intake and locomotor activity in female rats diencephalic hormone implants. *J. Comp Physiol. Psychol.*, 72:328-36.

Wade GN, Jennings G & Trayhurn P (1986) Energy balance and brown adipose tissue thermogenesis during pregnancy in Syrian hamsters. *Am. J. Physiol.*, 250:R845-50.

Wade GN & Schneider JE (1992) Metabolic fuels and reproduction in female mammals. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 16:1-38.

Wade GN & Heller HW (1993) Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. *Am. J. Physiol.*, 33:R1219-1223.

Wise PM, Rance N & Barraclough CA (1981) Effects of estradiol and progesterone on catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic regions in ovariectomized

rats. *Endocrinology*, 108:2186-2193.

Yokawa T, Mitsushima D, Itoh C, Konishi H, Shiota K & Takahashi M (1989) The ventromedial nucleus of the hypothalamus outputs long-lasting running in rats. *Physiol. Behav.*, 46:713-7.

Young WC & Fish WR (1945) The ovarian hormones and spontaneous running activity in the female rat. *Endocrinology*, 36:181-9.

Yuri K & Kawata M (1994) Region-specific changes of tyrosine hydroxylase-immunoreactivity by estrogen treatment in female rat hypothalamus. *Brain Res.*, 645: 278-84.

Zucker I, Wade GN & Ziegler R (1972) Sexual and hormonal influences on eating, taste preferences and body weight of hamsters. *Physiol. Behav.*, 8:101-11.





