

発表番号 54

## 食塩摂取による脳内下垂体後葉ホルモン放出の生理的役割：ストレス修飾仮説の検証

助成研究者名：尾仲 達史 (自治医科大学生理学)

共同研究者名：高柳 友紀 (自治医科大学生理学)

ストレスが加わると食塩嗜好性が増え食塩摂取量が増加する。その結果、体液の浸透圧が増加する。体液の浸透圧が増加すると、ストレスに対する反応性が減弱する。この食塩による抗ストレス作用は、ストレスによる食塩嗜好性増加の生理的役割とも考えられるが、この機構は不明である。本研究の目的は、食塩摂取による抗ストレス作用の機序を明らかにすることである。

様々なストレス刺激は、ACTHのみならず下垂体後葉からのオキシトシンを放出させる。我々は、このオキシトシンのストレス反応は、延髄A1あるいはA2からのノルアドレナリン入力により伝達されることを明かにしてきた。即ち、痛み刺激によるオキシトシン放出は延髄A1ノルアドレナリンニューロンを活性化することにより、これに対し、条件恐怖のような情動ストレス刺激は、延髄背内側部弧束路核のA2ノルアドレナリンニューロンを活性化することによりオキシトシン放出を増強させる。このストレスに対するオキシトシン放出も、体液の浸透圧を上昇させるとストレス刺激に対する反応が減弱することを我々は見出した。本研究は、このストレスによるオキシトシン放出を指標として、体液浸透圧上昇による抗ストレス作用の機序を解明することを目標とした。急性にあるいは慢性に浸透圧を増大させるとオキシトシン放出のみならず視床下部におけるノルアドレナリン放出が減弱した。しかし、ノルアドレナリンニューロン細胞体の活性化は、浸透圧刺激により減弱しなかった。次に、浸透圧上昇時に視床下部でオキシトシンが放出することが示されているので、オキシトシンが抗ストレス作用を担っている可能性を、オキシトシン受容体アンタゴニストを用いて検討した。オキシトシン受容体アンタゴニストを投与すると、侵害刺激に対する視床下部のノルアドレナリン放出が増強し、末梢血中へのオキシトシン放出も増加した。したがって、オキシトシンはむしろ侵害刺激に対する反応を増強していると考えられる。一方、条件恐怖刺激に対する反応は、オキシトシン受容体アンタゴニストを投与しても変化しなかった。条件恐怖刺激に対する反応はA2ノルアドレナリンニューロンを介している。従って、オキシトシン受容体による促進作用は、A2ノルアドレナリンニューロンではなく、A1ノルアドレナリンニューロンに対して選択的であることを示唆している。

以上のデータから、浸透圧刺激は、ノルアドレナリン放出を視床下部において前シナプス的に抑制していること、オキシトシンはノルアドレナリン放出に関して促進的に作用していることが考えられた。



5

助成番号 0432

食塩摂取による脳内下垂体後葉ホルモン放出の生理的役割  
: ストレス修飾仮説の検証

助成研究者: 尾仲 達史 (自治医科大学生理学)

共同研究者: 高柳 友紀 (自治医科大学生理学)

## 1. 研究目的

ストレスにさらされると、食塩の嗜好性が高まり、食塩摂取量が増加する<sup>(1)</sup>。食塩を摂取すると、体液の浸透圧が増加する。一方、体液の浸透圧が増加すると、ストレスに対するACTH放出反応が低下する<sup>(2)</sup>。この浸透圧上昇による抗ストレス作用を考えると、ストレス時に食塩嗜好性が高まることは、急性期には生体にとって、有利な反応であると考えられる。しかし、この食塩摂取による抗ストレス作用のメカニズムは現在まで不明である。本研究の目的は、食塩摂取による抗ストレス作用の機序を明らかにすることである。

様々なストレス刺激は、ACTHのみならず下垂体後葉からのオキシトシンを放出させる<sup>(3, 4)</sup>。我々は、このオキシトシンのストレス反応は、延髄A1あるいはA2からのノルアドレナリン入力により伝達されることを明かにしてきた。即ち、痛み刺激を加えると延髄腹外側部のA1ノルアドレナリンニューロンが活性化すること、オキシトシンニューロンへのノルアドレナリン投射を破壊するとオキシトシンニューロンの活性化が阻止される<sup>(5, 6)</sup>。従って、痛み刺激によるオキシトシン放出は延髄A1ノルアドレナリンニューロンを介すると思われる。これに対し、条件恐怖のような情動ストレス、或いは、CCK末梢投与による腹部迷走神経の活性化によるオキシトシン放出は延髄背内側部弧束路核のA2ノルアドレナリンニューロンを介する<sup>(6, 7)</sup>。

さらに、最近、このストレスに対するオキシトシン放出も、体液の浸透圧を上昇させるとストレス刺激に対する反応が減弱することを我々は見出した。本研究は、このストレスによるオキシトシン放出を指標として、体液浸透圧上昇による抗ストレス作用の機序を解明することを目指した。

そこでまず、浸透圧を増大させるとオキシトシン放出のみならず視床下部におけるノルアドレナリン放出が減弱するかを調べた。

次に、浸透圧上昇時に視床下部でオキシトシンが放出することが示されている<sup>(8)</sup>ので、オキシトシンが抗ストレス作用を担っている可能性を、オキシトシン受容体アンタゴニストを用いて検討した。

## 2. 研究方法

動物はウィスター系の成熟雄ラットを用いた。

### 2.1 オキシトシンニューロンの活動の測定

体液の浸透圧を慢性的に上昇させるために、2%食塩水を1週間自由飲水させる、あるいは、2Mの食塩水を13  $\mu$ l/分で静脈内に投与した。ストレス負荷刺激としては、痛み刺激として足掌部皮膚表面の電気刺激（フットショック）を用いた。これらの動物の血中のオキシトシン濃度をラジオイムノアッセイ法を用いて定量化した。

### 2.2 視床下部ノルアドレナリン放出の測定

視床下部の視索上核におけるノルアドレナリン放出を測定する目的で、ラットをウレタン麻酔し、腹側から視索上核を露出し、視索上核内にマイクロダイアリシス用のプローブを刺入させ、視索上核内の細胞外灌流液を採取した。灌流液中のノルアドレナリン濃度は電気化学検出器付きのHPLCで定量化した<sup>(9)</sup>。

### 2.3 延髄ノルアドレナリンニューロンの活性化の定量

延髄A1ノルアドレナリンニューロンはチロシン水酸化酵素に対する抗体をもちい、DAB反応で茶色に染めた。このニューロンが刺激により活性化されているかどうかは、Fos蛋白質の発現により決定した<sup>(10)</sup>。Fos蛋白質はこれに対する抗体を用い、DAB-ニッケル法で黒く染めた。チロシン水酸化酵素陽性細胞のうち、Fos蛋白質に対する免疫陽性であるものの絶対数と割合を数えた<sup>(7, 10)</sup>。

## 3. 研究結果

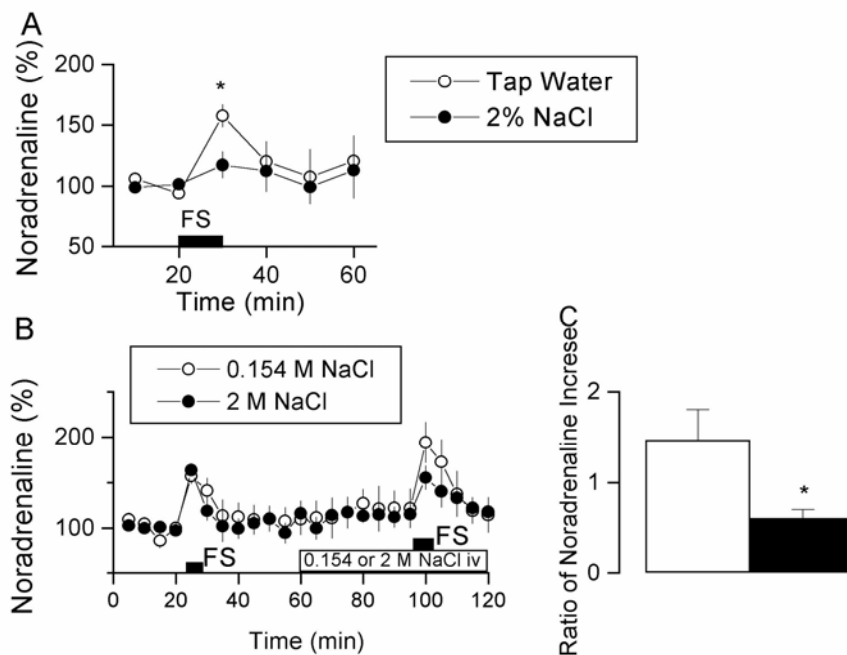
### 3.1 浸透圧刺激のオキシトシン放出への減弱効果

2%食塩水負荷をすると、浸透圧が、水道水摂取群の299 mOSM/kg H<sub>2</sub>Oに比べ303 mOSM/kg H<sub>2</sub>Oと上昇し、血中オキシトシン濃度の基礎値も増加した。侵害刺激としてフットショックをくわえると、血中のオキシトシン濃度が上昇した。このフットショックによるオキシトシン濃度の増加反応は、食塩水負荷群で対照群に比べ有意に低値を示した。これに対し、フットショックによるバゾプレシン放出増加反応は浸透圧を上昇させても、有意には変化しなかった。

### 3.2 浸透圧刺激の視床下部ノルアドレナリン放出への減弱効果

フットショックによるオキシトシンニューロンの活性化の上流は、視床下部におけるノルアドレナリン放出である。そこで、浸透圧負荷により、オキシトシン放出のみならず、その上流の視床下部のノルアドレナリン放出も減弱するかを検討した。

まず、2%食塩水負荷をし、体液の浸透圧を上昇させた動物と、水道水を飲水させておいた正常な動物に、フットショックを加え、視床下部視索上核におけるノルアドレナリン放出を観察した。侵害刺激としてフットショックをくわえると、視索上核におけるノルアドレナリン放出が増加した。この増加は食塩水負荷動物において有意に低下していた(Fig. 1)。



**Fig. 1 Effects of salt loading upon noradrenaline release in the hypothalamus in response to noxious stimuli**

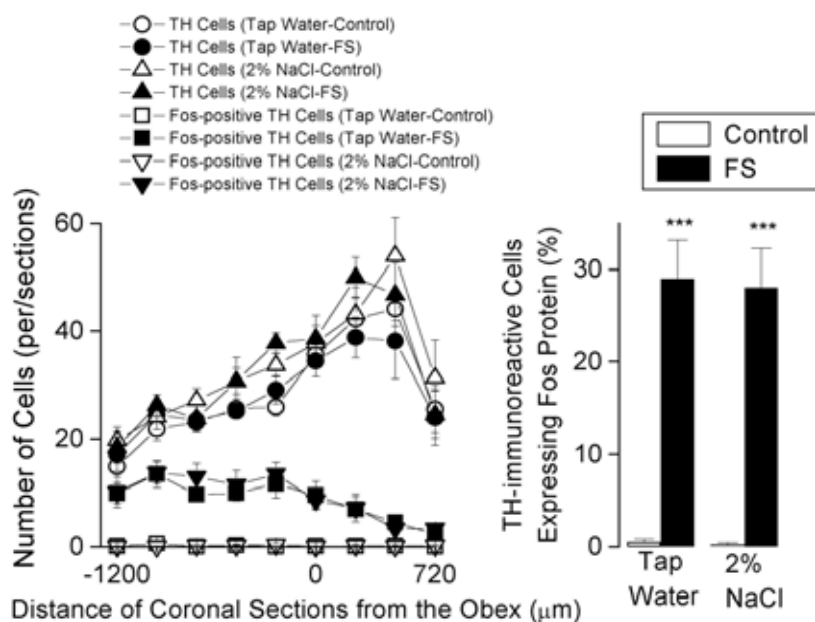
Chronic (A) or acute salt loading (B, C) reduced noradrenaline release in the supraoptic nucleus following noxious stimuli.

さらに、急性の食塩水負荷でもノルアドレナリン放出の低下が観察されるかを検討した。まず、フットショックを加え、視床下部視索上核においてノルアドレナリン放出が観察されることを確認した。そこで、2Mの食塩水を13  $\mu$ l/分、45分間投与し、血漿浸透圧を上昇させて、ふたたび、フットショックを加えた。すると、2度目のフットショックに対するノルアドレナリン放出は、浸透圧負荷をしていない1度目のフットショックに対するノルアドレナリン放出に比べ、有意に減弱した (Fig. 1 B,C)。この高張食塩水投与で血漿の浸透圧は 11 mOSM/kg H<sub>2</sub>O上昇した。

### 3.3 浸透圧刺激の延髄A1ノルアドレナリンニューロンの活性化に対する作用

浸透圧刺激によりノルアドレナリン放出反応が減弱することが分かった。さらに、このノルアドレナリンの起始核である延髄A1ノルアドレナリンニューロンの活性化が浸透圧刺激により抑圧されるかどうかを検討した。ノルアドレナリンニューロンの活性化はFos蛋白質発現の有無で判定した。

侵害刺激を加えると延髄A1ノルアドレナリンニューロンのうちFos蛋白質陽性となる細胞の数が増えた。一週間、2%食塩水負荷をして体液の浸透圧を上昇させておいた動物においても、侵害刺激を加えると延髄A1ノルアドレナリンニューロンのうちFos蛋白質陽性細胞の数が増えた。侵害刺激に対するA1ノルアドレナリンニューロンの活性化の割合、あるいはその分布は、食塩水負荷をしても変化しなかった (Fig. 2)。



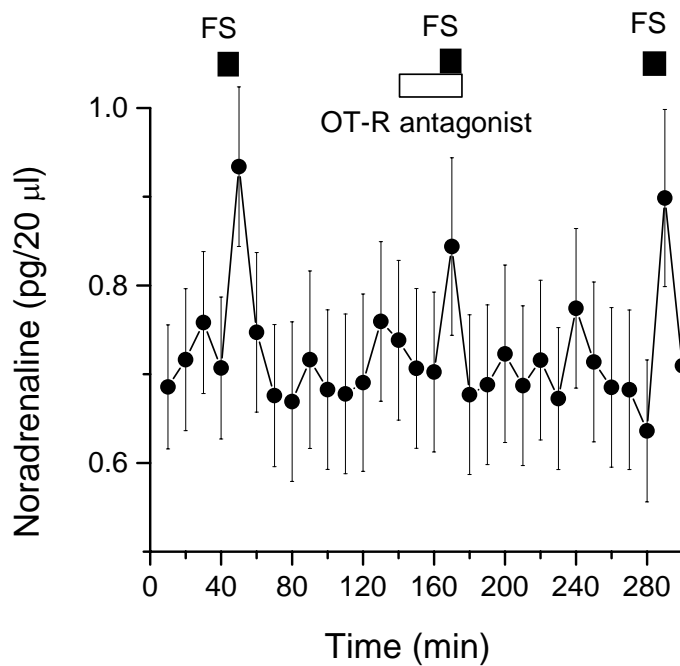
**Fig2 Effects of salt loading upon expression of Fos protein in the A1 noradrenergic neurones following noxious stimuli**

Salt loading did not significantly affect the percentage or distribution of A1 noradrenergic neurones expressing Fos protein following noxious stimuli.

### 3.4 視床下部オキシトシン受容体のノルアドレナリン放出への働き

浸透圧を上昇させると、オキシトシンニューロンが活性化される。このとき、末梢血中にオキシトシンが放出されるだけでなく、中枢内においてもオキシトシン放出が増加する。中枢のオキシトシンの働きを検討する目的で、視床下部の局所にオキシトシン受容体アンタゴニストを投与し、侵害刺激に対するノルアドレナリン放出を検討した。

視床下部の視索上核にオキシトシン受容体アンタゴニストを局所投与すると、侵害刺激に対するノルアドレナリン放出が減弱した (Fig. 3)。

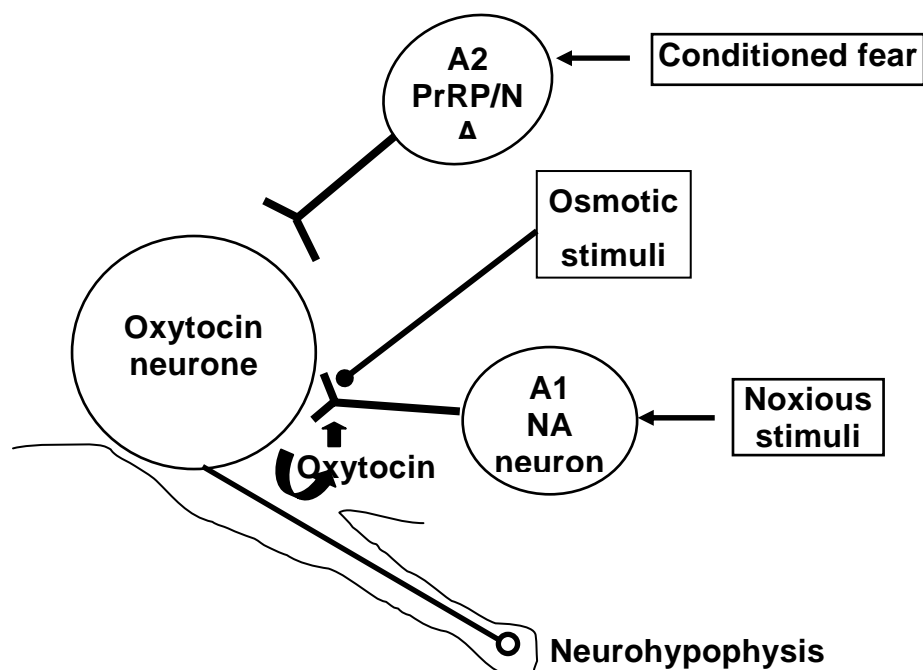


**Fig 3 Effects of an oxytocin receptor antagonist upon noradrenaline release in the hypothalamus in response to noxious stimuli**

Local application of an oxytocin receptor antagonist attenuated noradrenaline release in the supraoptic nucleus following noxious stimuli.

さらに、オキシトシン受容体アンタゴニストを投与すると末梢へのオキシトシン放出も減弱した。従って、侵害刺激に対する反応においては、オキシトシン受容体が促進的に働いていると考えられた。

一方、A2ノルアドレナリンニューロンを介する反応である条件恐怖刺激に対するオキシトシン放出は、オキシトシン受容体アンタゴニストを投与してもオキシトシン放出は有意には変化しなかった。



**Fig 4 Effects of osmotic stimuli upon noradrenaline release**

Osmotic stimuli reduces stress-induced noradrenaline release in the hypothalamus and, as a result, attenuates oxytocin response to stressful stimuli.

#### 4. 考 察

本研究において、侵害刺激に対する視床下部のノルアドレナリン放出と末梢血中へのオキシトシン放出反応が予め浸透圧負荷をしておくで減少した。侵害刺激を加えるとA1ノルアドレナリンニューロンが活性化され、視床下部においてノルアドレナリンが放出され、その結果、オキシトシンが末梢血中に放出される。浸透圧刺激を加えるとノルアドレナリン放出は減弱したがA1ノルアドレナリンニューロンの細胞体の活性化は変化しなかった。従って、浸透圧刺激は、ノルアドレナリン放出を視床下部において前シナプス的に抑制していると考えられる (Fig. 4)。

我々は、以前、浸透圧刺激をくわえると視索上核におけるGABA放出が増加することを示した<sup>(11)</sup>。このGABAが、もしかすると、浸透圧刺激によるノルアドレナリン放出の抑制に関与しているかも知れない。

浸透圧刺激により視床下部においてオキシトシン放出が増加する。オキシトシン受容体アンタゴニストを投与すると、侵害刺激に対するノルアドレナリン放出が増強し、末梢血中へのオキシトシン放出も増加した。したがって、オキシトシンはむしろ侵害刺激に対する反応を増強していると考えられる。一方、条件恐怖刺激に対する反応は、オキシトシン受容体アンタゴニストを投与しても変化しなかった。条件恐怖刺激に対する反応はA2ノルアドレナリンニューロンを介している。従って、オキシトシン受容体による促進作用は、



A2ノルアドレナリンニューロンではなく、A1ノルアドレナリンニューロンに対して選択的であることを示唆している。

## 5. 今後の課題

本研究により、浸透圧刺激が視床下部のシナプス前に作用してノルアドレナリン放出を抑制することが明らかになった。オキシトシンは浸透圧刺激で脳内で放出されるが、オキシトシンはむしろ侵害刺激に対するノルアドレナリン放出に関しては促進的に働いていることが分かった。今後、浸透圧刺激がどういうメカニズムでノルアドレナリン放出を抑制しているのか検討課題である。

## 文 献

- 1) Ely D, Herman M, Ely L, Barrett L, Milsted A. Sodium intake is increased by social stress and the Y chromosome and reduced by clonidine. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000, **278**: R407-12.
- 2) Chowdrey HS, Jessop DS, Patel H, Lightman SL. Altered adrenocorticotropin, corticosterone and oxytocin responses to stress during chronic salt load. *Neuroendocrinology*. 1991, **54**: 635-8.
- 3) Onaka T. Catecholaminergic mechanisms underlying neurohypophysial hormone responses to unconditioned or conditioned aversive stimuli. *Exp Physiol*, 2000, **85S**: 101S-110S.
- 4) Onaka T. Neural pathways controlling oxytocin release from the pituitary during stress. *J Neuroendocrinol*, 2004, **16**: 308-312.
- 5) Onaka T, Yamashita T, Liu X, Honda K, Saito T, Yagi K. Medullary A1 noradrenergic neurones may mediate oxytocin release after noxious stimuli. *NeuroReport*, 2001, **12**: 2499-2502.
- 6) Zhu L, Onaka T. Involvement of medullary A2 noradrenergic neurons in the activation of oxytocin neurons after conditioned fear stimuli *Eur J Neurosci* 2002, **16**: 2186-2198.
- 7) Onaka T, Luckman SM, Antonijevic I, Palmer JR, Leng G. Involvement of the noradrenergic afferents from the nucleus tractus solitarii to the supraoptic nucleus in oxytocin release after peripheral cholecystokinin octapeptide in the rat. *Neuroscience*, 1995, **66**: 403-412.
- 8) Ludwig M. Dendritic release of vasopressin and oxytocin. *J Neuroendocrinol*. 1998, **10**: 881-95.
- 9) Ludwig M, Onaka T, Yagi K. Vasopressin regulation of noradrenaline release within the supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol*, 2000, **12**: 477-479.
- 10) Onaka T, Yagi K. Involvement of N-methyl-D-aspartic acid receptor activation in oxytocin and vasopressin release after osmotic stimuli in rats. *J Neuroendocrinol*, 2001, **13**: 166-174.

- 11) Leng G, Brown CH, Bull PM, Brown D, Scullion S, Currie J, Blackburn-Munro RE, Feng J, Onaka T, Verbalis JG, Russell JA, Ludwig M. Responses of magnocellular neurons to osmotic stimulation involves coactivation of excitatory and inhibitory input: an experimental and theoretical analysis. *J Neurosci* 2001, **21**: 6967-6977.

## Roles of neurohypophyseal hormones in the control of stress responses following salt intake

Tatsushi Onaka, Yuki Takayanagi

Department of Physiology, Jichi Medical School

### Summary

Salt loading reduces neuroendocrine responses to stressful stimuli. The neural mechanisms underlying this reducing effects are unclear. Noxious stimuli facilitate noradrenaline release in the hypothalamus and, as a result, activate oxytocin neurones. We examined effects of salt loading upon plasma oxytocin concentrations and noradrenaline release in the hypothalamus after footshocks. Male rats were allowed to drink 2 % NaCl for 7 days. Salt loading reduced footshock-induced increase in plasma oxytocin concentrations and noradrenaline release in the supraoptic nucleus. On the other hand, salt loading did not significantly change activation of A1 catecholaminergic neurones in the medulla oblongata, as measured by expression of Fos protein. Local application of an oxytocin receptor antagonist reduced noradrenaline release in the supraoptic nucleus following footshocks. An icv administration of an oxytocin receptor antagonist also reduced the increase in plasma oxytocin concentrations following footshocks but not that following conditioned fear stimuli. These data suggest that salt loading presynaptically suppresses noradrenaline release in the hypothalamus and that oxytocin released during salt loading facilitates the noradrenaline release.