

令和4年度 博士論文

# 走運動誘発性 ACTH 分泌応答の視床下部調節機構に 関する神経内分泌学的研究

： 中強度運動時のヒトのストレス反応を探るための  
動物モデルを用いて

筑波大学大学院 人間総合科学研究科 博士後期課程

体育科学専攻 運動生化学研究室

201630470 高橋(酒井) 佳那子



## 目次

目次 .....	i
List of Tables .....	v
List of Figures .....	vi
List of Appendices.....	vii
用語と略語.....	viii
関連論文 .....	xii
第 I 章 緒言 .....	1
第 II 章 先行研究 .....	6
1. ストレス反応とその調節機構.....	6
1-1. PVN による ACTH 分泌制御.....	6
1-2. PVN からの出力 .....	7
1-3. PVN への入力.....	8
2. ACTH 分泌促進因子.....	10
2-1. ヒトと動物間の構造比較 .....	10
2-2. ACTH 分泌能 .....	11
2-3. 生理的役割.....	12
2-4. 発現部位別機能的役割 .....	12
3. ACTH 分泌促進因子の受容体.....	14
3-1. CRH 受容体.....	14
3-2. AVP 受容体 .....	14
3-3. セカンドシグナリング .....	16
4. ACTH 分泌促進因子の受容体拮抗薬 .....	16
4-1. CRH1R 拮抗薬: CP154526.....	16
4-2. V <sub>1b</sub> R 拮抗薬: SSR149415 .....	17
5. ストレス条件と ACTH 応答の視床下部調節.....	18
6. 運動時の ACTH 応答の視床下部調節.....	19
7. Wistar ラット .....	21
7-1. Wistar ラットの歴史.....	21
7-2. ストック間の差 .....	21
第 III 章 研究目的及び課題 .....	23
1. 研究目的 .....	23
2. 研究課題 .....	23
第 IV 章 運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣する Wistar ラットのストックの選定(研究課題 1-1) .....	27

1. 目的 .....	27
2. 方法 .....	27
2-1. 被験動物および飼育条件 .....	27
2-2. 走行学習 .....	28
2-3. 外頸静脈カテーテル留置術 .....	29
2-4. 走行試験 .....	30
2-5. 血中乳酸値及び血糖値測定 .....	31
2-6. 血漿 ACTH 濃度測定 .....	31
2-8. 統計処理 .....	32
3. 結果 .....	33
3-1. 代謝応答 .....	33
3-2. ストレス反応 .....	35
4. 考察 .....	36
5. 要約 .....	37
第V章 LT の算出（研究課題 1-2） .....	38
1. 目的 .....	38
2. 方法 .....	38
2-1. 被験動物および飼育条件 .....	38
2-2. 走行学習 .....	38
2-3. 外頸静脈カテーテル留置術 .....	39
2-4. 走行試験 .....	39
2-5. 血中乳酸値測定 .....	39
2-6. 統計処理 .....	40
3. 結果 .....	40
4. 考察 .....	41
5. 要約 .....	41
第VI章 走運動ストレス時の ACTH 応答の抑制に効果的な V <sub>1b</sub> R 拮抗薬投与量の検討（研究課題 2-1） .....	42
1. 目的 .....	42
2. 方法 .....	42
2-1. 被験動物および飼育条件 .....	42
2-2. 走行学習 .....	42
2-3. 外頸静脈カテーテル留置術 .....	42
2-4. 拮抗薬 .....	42
2-5. 群分け .....	43
2-6. 走行試験 .....	43

2-7. 血漿 ACTH 濃度測定.....	44
2-8. 統計処理.....	45
3. 結果.....	45
3-1. 電気ショック暴露数.....	45
3-2. 血漿 ACTH 濃度.....	45
4. 考察.....	46
5. 要約.....	47
第Ⅶ章 走運動ストレス時の ACTH 応答の抑制に効果的な CRH1R 拮抗薬投与量の検討 (研究課題 2-2) .....	49
1. 目的.....	49
2. 方法.....	49
2-1. 被験動物および飼育条件.....	49
2-2. 走行学習.....	49
2-3. 外頸静脈カテーテル留置術.....	49
2-4. 拮抗薬.....	49
2-5. 群分け.....	50
2-6. 走行試験.....	50
2-7. 血漿 ACTH 濃度測定.....	50
2-8. 統計処理.....	50
3. 結果.....	51
3-1. 電気ショック暴露数.....	51
3-2. 血漿 ACTH 濃度.....	51
4. 考察.....	52
5. 要約.....	53
第Ⅷ章 運動誘発性 ACTH 応答制御に対する AVP と CRH の関与の検証 (研究課題 2-3) .....	54
1. 目的.....	54
2. 方法.....	54
2-1. 被験動物および飼育条件.....	54
2-2. 走行学習.....	54
2-3. 外頸静脈カテーテル留置術.....	54
2-4. 拮抗薬.....	54
2-5. 群分け.....	54
2-6. 走行試験.....	55
2-7. 血漿 ACTH 濃度測定.....	55
2-8. 統計処理.....	55

3. 結果 .....	55
3-1. 電気ショック暴露数 .....	55
3-2. 血漿 ACTH 濃度 .....	56
4. 考察 .....	57
5. 要約 .....	60
第IX章 運動ストレス時の視床下部 AVP と CRH の神経細胞活性の検証（研究課題3）	62
1. 目的 .....	62
2. 方法 .....	63
2-1. 被験動物及び飼育条件 .....	63
2-2. 走行学習 .....	63
2-3. 外頸静脈カテーテル留置術 .....	63
2-4. 走行試験 .....	64
2-5. 血漿 ACTH 濃度測定 .....	64
2-6. 脳サンプル準備 .....	65
2-7. 蛍光免疫組織化学染色 .....	66
2-8. c-Fos 発現の解析 .....	67
2-9. 統計処理 .....	67
3. 結果 .....	67
3-1. 血漿 ACTH 濃度 .....	67
3-2. AVP 及び CRH 神経細胞活性 .....	68
3-3. 運動誘発性神経細胞活性と ACTH 濃度の相関関係 .....	71
4. 考察 .....	72
5. 要約 .....	74
第X章 総合討論 .....	76
第XI章 総括と結論 .....	85
謝辞 .....	88
引用文献 .....	89
Appendices .....	98

## List of Tables

表 1. 走行学習プロトコル .....	28
表 2. 走行動評価表 .....	44
表 3. 研究課題 2-1 における運動中の電気ショック暴露数.....	45
表 4. 研究課題 2-2 における運動中の電気ショック暴露数.....	51
表 5. 研究課題 2-3 における運動中の電気ショック暴露数.....	55

## List of Figures

図 1. 本研究の概念図 .....	5
図 2. 外頸静脈カテーテル留置術.....	30
図 3. 研究課題 1-1 の実験プロトコル.....	31
図 4. ACTH 測定時の標準曲線の典型例 .....	32
図 5. 各 Wistar ラットストックにおける異なる運動強度時の代謝応答 .....	34
図 6. 各 Wistar ラットストックにおける異なる運動強度時の ACTH 応答.....	35
図 7. 研究課題 1-2 の実験プロトコル .....	39
図 8. 漸増負荷運動時の血中乳酸値の変化 .....	40
図 9. 研究課題 2 の実験プロトコル.....	44
図 10. 運動ストレス時の ACTH 応答に対する SSR の容量反応.....	46
図 11. 運動ストレス時の ACTH 応答に対する CP の容量反応 .....	52
図 12. 運動時の ACTH 応答に対する SSR と CP の効果.....	57
図 13. 研究課題 2 の要約図.....	61
図 14. ラット脳における pPVN、mPVN 及び SON の解剖学的位置 .....	63
図 15. 研究課題 3 の実験プロトコル .....	64
図 16. 安静または運動前後の血漿 ACTH 濃度 .....	68
図 17. 運動ストレス後の pPVN の AVP (A) 及び CRH (B) の神経細胞活性 .....	70
図 18. 運動ストレス後の mPVN (A) 及び SON (B) の AVP 神経細胞活性.....	71
図 19. 視床下部各垂領域における AVP 及び CRH 神経細胞活性と運動後の ACTH の 関係 .....	72
図 20. 研究課題 3 の要約図.....	75
図 21. 本研究のまとめ .....	84



## List of Appendices

Appendix 1. ストックごとの体重 (g).....	98
Appendix 2. ストックごとの電気ショック暴露数 (回).....	99
Appendix 3. ストックごとの実質走行時間 (%).....	100
Appendix 4. ストックごとのランニングスコア.....	101
Appendix 5. ストックごとの運動時の血中乳酸値.....	103
Appendix 6. ストックごとの運動時の血糖値.....	103
Appendix 7. ストックごとの運動時の血漿 ACTH 濃度.....	104
Appendix 8. 漸増負荷運動時の血中乳酸動態.....	104
Appendix 9. LT.....	105
Appendix 10. 研究課題 3-1 の電気ショック暴露数.....	106
Appendix 11. 研究課題 3-1 の血漿 ACTH 濃度.....	107
Appendix 12. 研究課題 3-2 の電気ショック暴露数.....	108
Appendix 13. 研究課題 3-2 の血漿 ACTH 濃度.....	109
Appendix 14. 研究課題 3-3 の電気ショック暴露数.....	110
Appendix 15. 研究課題 3-3 の血漿 ACTH 濃度.....	111
Appendix 16. pPVN における AVP ニューロン活性.....	111
Appendix 17. pPVN における CRH ニューロン活性.....	112
Appendix 18. mPVN における AVP ニューロン活性.....	112
Appendix 19. SON における AVP ニューロン活性.....	113

## 用語と略語

- AC: adenylylate cyclase (アデニル酸シクラーゼ)

ATP から cAMP とピロリン酸への変換を触媒する酵素で、セカンドメッセンジャーの 1 つ。CRH1 型受容体に作用すると活性化される。

- ACTH: adrenocorticotrophic hormone (副腎皮質刺激ホルモン)

HPA 軸の活性により下垂体前葉より分泌されるストレスホルモン。この分泌量の増加がストレス指標となっている。

- AVP: arginine vasopressin (アルギニン・バソプレッシン)

視床下部で産生・分泌される神経ペプチド。下垂体前葉からの ACTH 分泌を促進する。下垂体後葉から分泌される抗利尿ホルモンでもある。

- cAMP: cyclic adenosine monophosphate (環状アデノシン 1 リン酸)

ホルモン伝達の際の細胞内シグナル伝達においてセカンドメッセンジャーとして働く。

- CP: CP 154526

選択的、非ペプチド CRH1 型受容体拮抗薬。CRH 誘発性アデニル酸シクラーゼ活性を阻害し、CRH による HPA 軸の活性を弱める。

IUPAC name: N-Butyl-N-ethyl-2,5-dimethyl-7-(2,4,6-trimethylphenyl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine hydrochloride

- CRH: corticotropin-releasing hormone (コルチコトロピン放出ホルモン)

視床下部で産生・分泌される神経ペプチド。下垂体前葉からの ACTH 分泌を最も強く促進する。

●c-fos

Fos タンパク質（細胞活性マーカー）を発現させる遺伝子。

●ED<sub>50</sub>: effective dose（50%有効量）

薬を投与された動物の 50%が効果を発現すると推定される投与量。

●GC: glucocorticoid（グルココルチコイド）

副腎皮質から分泌されるストレスホルモン。血糖上昇作用を有する。ヒトではコルチゾール、げっ歯類ではコルチコステロンが代表である。

●HPA 軸: hypothalamus-pituitary-adrenal axis（視床下部-下垂体-副腎皮質軸）

視床下部由来の ACTH 分泌促進因子により分泌が惹起された ACTH が副腎皮質からの GC 分泌を惹起する一連の系。

●IP<sub>3</sub>: Inositol trisphosphate（イノシトールトリスリン酸）

細胞内シグナル伝達として利用されるセカンドメッセンジャーの 1 つ。V<sub>1b</sub> 受容体に作用すると産生される。

●K<sub>i</sub>（阻害定数）

阻害物質の結合親和性。数値が小さいほど阻害作用が強いことを表す。

●LT: lactate threshold（乳酸性作業閾値）

漸増負荷運動時に急激に血中乳酸値が上昇する強度。V̇O<sub>2</sub>max の 50～60%に出現する。

●mRNA: messenger RNA (伝令 RNA)

タンパク質に翻訳され得る塩基配列情報と構造を持った RNA。mRNA の遺伝情報に従い、特定のタンパク質が合成される。

●mPVN: magnocellular part of the paraventricular hypothalamic nucleus (視床下部室傍核大細胞系)

視床下部室傍核の一部で、AVP や OT が多く発現する。一般的には、下垂体後葉に投射し、分泌されたペプチドは末梢に反映されると言われる。

●NA: noradrenaline (ノルアドレナリン)

主に脳幹に分布する神経伝達物質の一つで、カテコラミンの 1 つ。視床下部に作用し、HPA 軸活性に関与する。

●OT: oxytocin (オキシトシン)

PVN 及び SON で合成され、下垂体後葉から分泌されるペプチドホルモンで、バソプレッシンと構造が類似している。平滑筋の収縮や乳汁分泌の促進を行う。

●POMC: pro-opiomelanocortin (プロオピオメラノコルチン)

オピオイドの 1 種で、ACTH 及び  $\beta$ -エンドルフィン、リポトロピンの前駆体。主に下垂体前葉及び中葉で産生される。

●PVN: paraventricular hypothalamic nucleus (視床下部室傍核)

視床下部に位置する神経細胞群。小さな細胞から成る小細胞系と大きな細胞から成る大細胞系に分けられる。

●pPVN: parvocellular part of the paraventricular hypothalamic nucleus（視床下部室傍核小細胞系）

HPA 軸活性調節の要。CRH が密に分布し、この神経細胞のうち約半数は AVP も発現する。本領域の神経細胞の軸索は正中隆起に投射している。

●SAM 軸: sympathetic-adrenomedullary（交感神経-副腎髄質軸）

ストレス反応の代表的な調節軸の 1 つ。最終的に副腎髄質よりカテコラミンを放出し、ストレスに適応する。

●SME: stalk median eminence (正中隆起)

第三脳室の底をなす。視床下部室傍核小細胞系の神経細胞は正中隆起に投射し、この神経細胞から分泌される因子は下垂体門脈を通じて下垂体前葉に運ばれる。

●SON: supraoptic hypothalamic nucleus（視床下部視索上核）

視床下部に位置し、AVP を産生する神経細胞がある。これらの AVP は下垂体後葉に軸索を投射し、循環血中へ神経内分泌される。

●SSR: SSR 149415

選択的、非ペプチドバソプレッシン  $V_{1b}$  受容体拮抗薬。AVP 誘発性細胞内  $Ca^{2+}$  増加を阻害し、AVP による HPA 軸の活性を弱める。

IUPAC name: (2S,4R)-1-((R)-5-chloro-1-(2,4-dimethoxyphenylsulfonyl)-3-(2-methoxyphenyl)-2-oxoindolin-3-yl)-4-hydroxy-N,N-dimethylpyrrolidine-2-carboxamide

## 関連論文

1. Kanako Takahashi, Takeru Shima, Mariko Soya, Leandro Kansuke Oharomari, Masahiro Okamoto and Hideaki Soya. Differences in exercise capacity and physiological responses in Wistar rats among breeders. *Experimental Animals* (2021) 70(4), 508-513
2. Kanako Takahashi, Takeru Shima, Mariko Soya, Jang Soo Yook, Hikaru Koizumi, Subrina Jesmin, Tsuyoshi Saito, Masahiro Okamoto and Hideaki Soya. Exercise-induced adrenocorticotrophic hormone response is cooperatively regulated by hypothalamic arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone. *Neuroendocrinology* (in press)

## 第 I 章 緒言

生体は、恒常性を乱すまたは乱す恐れのある刺激（ストレス）に対し、生体防御反応としてストレス反応を働かせる。運動では、心血管系や代謝を乱すような強度においてストレス反応が生じ、持久力等高い運動パフォーマンスの発揮や健康維持増進に貢献する一方 (Sellers *et al.*, 1988; van Praag *et al.*, 2014)、過度となるとパフォーマンスの低下やうつ病発症等、様々な症状の引き金となり得る (de Graaf-Roelfsema *et al.*, 2007; Mastorakos *et al.*, 2005)。このように、運動時のストレス反応は条件により身心に対して対極的な影響をもたらすが、その背景にあるストレス反応調節機構の詳細は明らかでない。

医学・生理学分野において、ストレスの指標は下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH) の分泌量増加である (Ganong, 1991; Pacak, 2000)。これは、視床下部－下垂体－副腎 (hypothalamus-pituitary-adrenal: HPA) 軸を介した内分泌反応であり、続いて分泌される副腎皮質からのグルココルチコイド (glucocorticoid: GC) が代謝調節やストレス反応収束に貢献する (Kuo *et al.*, 2015; Osterlund *et al.*, 2016)。一般的に、ストレス誘発性 ACTH 分泌は、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone: CRH)、アルギニン・バソプレッシン (arginine vasopressin: AVP)、オキシトシン (oxytocin: OT) など、様々な視床下部因子によって促進される (Aguilera, 2011; Negro-Vilar *et al.*, 1987)。最も強力な因子である CRH は、ストレス負荷時のみならず安静時の ACTH 分泌にも貢献し (Aguilera, 2011)、ACTH やその前駆体であるプロオピオメラノコルチンの生合成を促進する働きも有する重要な因子である (Bruhn *et*

*al.*, 1984; Engler *et al.*, 1999)。AVP は CRH に次ぐ ACTH 分泌促進能を有し (Negro-Vilar *et al.*, 1987)、CRH より早く ACTH 分泌を促す (Carroll *et al.*, 2007; Rivier C. *et al.*, 1982)。さらに CRH と AVP は協同的に作用することで互いの ACTH 能を高めることが明らかとなっている (Abou-Samra *et al.*, 1987; Antoni, 1986; Carroll *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 1984)。OT の ACTH 分泌促進能は弱く、ラットでは AVP 同様 CRH との協同作用が確認されているものの、ヒトでは ACTH 分泌を抑制することも示唆されている (Aguilera, 2011; Antoni, 1986)。このようにそれぞれ特徴を持つ ACTH 分泌促進因子は、全てのストレス時の ACTH 分泌調節に同様に関与するのではなく、ストレス条件により異なることが多くの研究で示されている (Antoni, 1986; Pacak and Palkovits, 2001; Ramos *et al.*, 2006; Spiga *et al.*, 2009)。

運動では、その強度が乳酸性作業閾値 (lactate threshold: LT) を超えると視床下部が興奮し、ACTH 分泌量が増加するため運動ストレスと定義されており (Farrell *et al.*, 1983; Luger *et al.*, 1987; Ohiwa *et al.*, 2007; Rahkila *et al.*, 1988; Saito and Soya, 2004; Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007)、運動誘発性の ACTH 分泌の調節因子が調査されてきた。特に焦点を当てられてきた因子は、複数ある ACTH 分泌促進因子の中で ACTH 分泌能の強い AVP や CRH である。我々は既に、血漿 ACTH 濃度の増加を伴う LT 強度以上の走運動が視床下部室傍核小細胞系 (parvocellular part of the hypothalamic paraventricular nucleus: pPVN) の AVP 神経細胞を活性化させ、視床下部と下垂体を仲介する正中隆起における AVP 含有量を変化させることを報告している (Saito and Soya, 2004)。くわえて、ギャロップING 中の馬の下垂体静脈血中や運動中のヒトの末梢血中における ACTH と AVP 濃



度の同期的な増加が示されている (Alexander *et al.*, 1991; Inder *et al.*, 1998)。このように、運動誘発性 ACTH 応答において AVP は重要な役割を担うとされているが、これらは AVP の動態観察に留まっており、決定的な証拠は未だに得られていない。CRH に関しては、運動が血漿 CRH 濃度や pPVN における *Crh* mRNA 発現量、PVN の CRH 神経細胞活性を増加させることが報告されている (Inder *et al.*, 1998; Morikawa *et al.*, 2021; Otsuka *et al.*, 2016; Timofeeva *et al.*, 2003)。一方で、運動前の CRH 受容体占有が ACTH 分泌に影響を与えないという報告や (Smoak *et al.*, 1991)、ギャロッピングにより ACTH が分泌されても CRH 分泌は促進されないという報告がされており (Alexander *et al.*, 1991)、運動中のストレス反応は CRH 以外の因子が制御することが示唆されている。このように、運動時 ACTH 応答への CRH の関与については一致した見解が得られていない。

運動誘発性の ACTH 応答における AVP と CRH の関与を明らかにするには、視床下部一下垂体軸への介入が有効である。とりわけ、様々なサブタイプの受容体の中でも ACTH 分泌を仲介する AVP V<sub>1b</sub> 受容体 (AVP V<sub>1b</sub> receptor: V<sub>1b</sub>R) 及び CRH 1 型受容体 (CRH type 1 receptor: CRH1R) を特異的に阻害する拮抗薬の使用は、AVP と CRH の作用点に対する直接的なアプローチとなる。また、神経解剖学的観点として、AVP や CRH を産生する視床下部神経細胞の運動ストレスによる興奮の有無の検証も重要である。これらは動物実験で検証可能であり、運動ストレス時の ACTH 分泌調節に対する AVP や CRH の関与に関する直接的及び間接的な証拠を得ることができるはずである。

本研究含め、動物実験は将来的なヒトへの外挿を主目的とするため、ヒトのモデルとなる実験の実施が求められる。Wistar ラットは汎用性の高い代表的な実験

動物の一つであるが、育成・維持している集団（ストック）はブリーダーにより異なるため、血液成分、認知機能や薬物に対する反応性などはストックにより異なることが報告されている（Hirate *et al.*, 1988; Hirate *et al.*, 1989; Kampfmann *et al.*, 2012）。このことから、運動に対する反応性もストック間で異なることが予想され、ヒトの運動に対する生理応答を模倣するストックが限定的である可能性がある。そのため本研究においては、妥当性の高いラットの運動モデルとして、ヒトのモデルに近い運動時の代謝・ストレス応答を示すストックを選別し、運動ストレス時の視床下部調節機構の検証に臨むのが適切である。

以上のことから本研究は、運動ストレス時の ACTH 分泌を少なくとも AVP が、さらに CRH も調節する可能性を想定し、ヒトの運動時の代謝・ストレス応答を模倣する動物を用いて、この仮説を明らかにすることを目的とした。そのために研究課題 1 では、4 つの異なるブリーダー由来の Wistar ラットからヒトの運動時の代謝・ストレス応答を模倣する動物を選定し、そのストックの LT を算出して本研究の動物運動モデルを確立した。続いて研究課題 2 では、V<sub>1b</sub>R 及び CRH1R の単独または併用投与後の中強度運動誘発性 ACTH 応答を検証し、さらに研究課題 3 において、ACTH 分泌を伴う運動時の視床下部における AVP 及び CRH 神経細胞の活性を評価した。

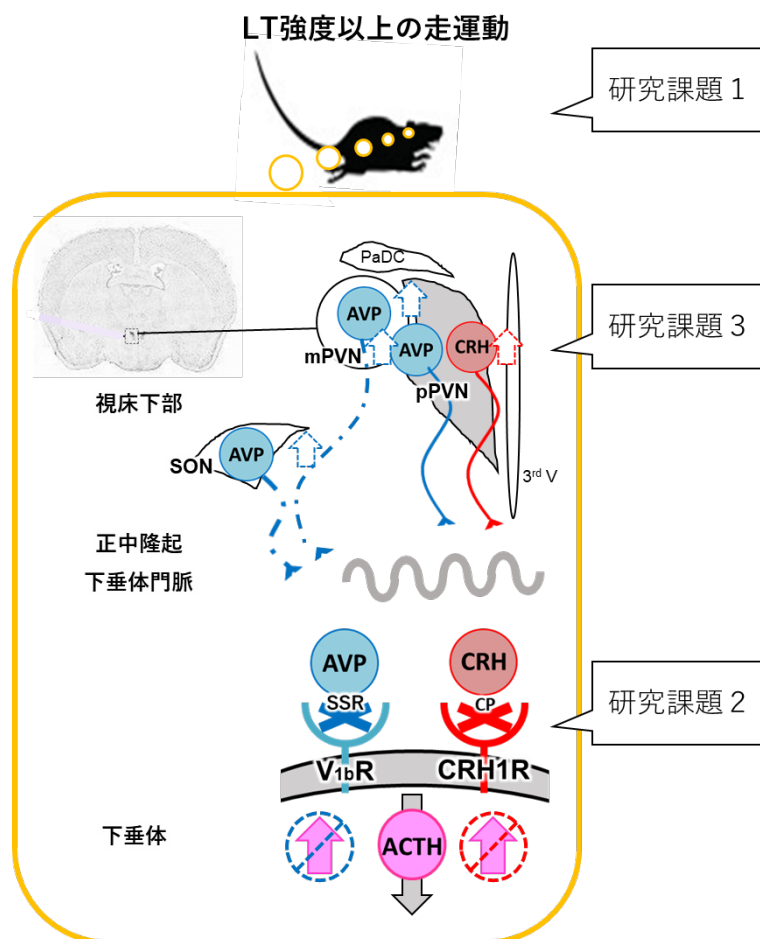


図 1. 本研究の概念図

LT 強度以上の運動で高まる ACTH 分泌は視床下部 AVP 及び CRH により制御される可能性がある。これを検証するため、本研究では3つの研究課題を設けた。研究課題1では、運動時のヒトの生理応答を模倣するラット走運動モデルに適した Wistar ラットのストックを選定し、その LT を算出してモデルを確立する。研究課題2では ACTH 分泌促進作用を仲介する  $AVP_{V_{1b}}$  受容体 ( $V_{1b}R$ ) 及び CRH 1 型受容体 ( $CRH1R$ ) の作用を拮抗薬 (SSR 及び CP) で阻害し、運動ストレス時の ACTH 分泌が抑制されるかどうか検証する。研究課題3では、運動ストレス時に視床下部室傍核小細胞系 (pPVN) の AVP 神経細胞及び CRH 神経細胞、並びに視床下部室傍核大細胞系 (mPVN) 及び視床下部視索状核 (SON) の AVP 神経細胞が活性化するかどうか検証する。

## 第Ⅱ章 先行研究

### 1. ストレス反応とその調節機構

医科学・生理学分野では、物理的・身体的、あるいは精神的・感情的な、生体内の恒常性を乱す刺激、すなわちストレスに対して抗うための生体反応をストレス反応と呼ぶ (Dayas *et al.*, 2001; Pacak and Palkovits, 2001)。ストレス反応には、神経内分泌系である視床下部—下垂体前葉—副腎皮質 (hypothalamus-pituitary-adrenal cortex: HPA) 軸を介した ACTH やグルココルチコイド (glucocorticoid: GC) の増加、自律神経系である視床下部—交感神経—副腎髄質 (sympathetic-adrenomedullary: SAM) 軸を介したカテコールアミンの増加、さらには視床下部—下垂体後葉系を介した OT や AVP の増加など、様々ある。中でも、ストレス学説を唱えた H. Selye は、あらゆる条件のストレスにおいて HPA 軸の調節を介して ACTH 分泌量が増加するとして (Selye, 1950)、この分泌量の増加が本分野におけるストレス反応指標となっている。

#### 1-1. PVN による ACTH 分泌制御

末梢及び中枢がストレスを感受すると、HPA 軸の起点である視床下部室傍核 (paraventricular nucleus: PVN) にシグナル伝達される (Aguilera and Liu, 2012; Herman and Cullinan, 1997; Ulrich-Lai and Herman, 2009)。PVN の破壊は安静時及びストレス状況下において血中 ACTH 濃度を顕著に減少させ (Antoni *et al.*, 1990; Makara *et al.*, 1981)、更に PVN への電気刺激は ACTH 分泌を増加させることから (Dunn and Critchlow, 1973)、PVN はストレス時の ACTH 分泌調節に

最も重要な部位として位置づけられている。PVN は内側部の小細胞系 (pPVN) と背外側部の大細胞系 (magnocellular part of the paraventricular hypothalamic nucleus; mPVN) に分けられ、最も主要な ACTH 分泌促進因子である CRH の産生神経細胞は、ヒトでもげっ歯類でも pPVN に発現している (Aguilera and Liu, 2012; Mouri *et al.*, 1993)。pPVN のニューロンは軸索終末を正中隆起に投射しており、ストレス刺激を感受すると活性し、ACTH 分泌促進因子が正中隆起を介して下垂体門脈血中へと分泌される (Gibbs, 1986; Whitnall, 1993; Wiegand and Price, 1980)。更にそれらの因子は下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン分泌細胞に発現する各因子の受容体に作用することで ACTH 分泌を促す。このように視床下部性 ACTH 分泌促進因子は pPVN－正中隆起－下垂体門脈を介して下垂体に到達する経路を通じて ACTH 分泌を促す。

## 1-2. PVN からの出力

細胞が刺激されると、*c-fos* を始めとする最初期遺伝子の発現が素早く誘導される。*c-fos* 遺伝子にコードされる c-Fos タンパクは、他の最初期遺伝子関連タンパクである c-Jun との複合体を形成し、標的遺伝子発現を促進させる (Kovács, 1998)。そのため、最初期遺伝子発現やそのタンパク発現は神経活動の指標となっている。これはストレス負荷時の PVN でも生じ、インターロイキン-1 の腹腔内投与や摂水制限、高張生理食塩水投与、恐怖条件付け等により、PVN における CRH 等の神経細胞で c-Fos 発現が高まることが報告されている (Chae and Heideman, 1998; Ericsson *et al.*, 1994; Kubota *et al.*, 2014)。CRH 神経細胞が刺激を受けると、転写や翻訳を経て CRH ペプチドが産生され、軸索輸送

し末端から正中隆起に放出されるが、この一連の流れは刺激を受けてから 1 時間以上を要すると推定されている (Watts, 2005)。そのため新たなペプチド産生は遅延型の回復・適応的反応であり、即自的なペプチド放出は、軸索末端に蓄積されていたペプチドが細胞刺激による膜興奮で生じる (Watts, 2005)。また、軸索末端から放出されたペプチドは、正中隆起でも蓄積される。正中隆起には安静時から常に、CRH やこれに次ぐ ACTH 分泌促進能を有する AVP が蓄積している。ストレス時には、軸索末端から正中隆起への放出と正中隆起から下垂体門脈への放出が生じるが、後者の量が多いため、正中隆起内のペプチド含有量は結果的に低下する (de Goeij D. C. *et al.*, 1991; Feldman *et al.*, 2000; Hashimoto *et al.*, 1982)。

### 1-3. PVN への入力

PVN の主な神経支配は、興奮性ではノルアドレナリン (noradrenaline; NA)、抑制性では GABA により行われている。NA 作動性神経系は脳幹に位置し、その神経群から A1~A7 の領域に分けられており、視床下部への投射は、延髄腹外側核からの A1、孤束核からの A2、青斑核からの A6 が代表的である (Cunningham and Sawchenko, 1988)。A1 は主に mPVN や SON といった大細胞系に、A2 は pPVN に広く投射しており、A6 は pPVN に独占的であるが、ソマトスタチンなどを含む脳室周囲が顕著である (Cunningham and Sawchenko, 1988)。低血糖や出血、病原菌の侵入等、生理的脅威をもたらすストレス、すなわち物理的・身体的ストレスに対する HPA 軸の応答は、このような脳幹経路を介して PVN に迅速に興奮性シグナルを伝達して生じる (Aguilera and Liu, 2012;

Herman and Cullinan, 1997)。PVN の CRH ニューロンには NA の受容体である  $\alpha$  1 受容体が発現しており (Day *et al.*, 1999)、PVN への NA 局所投与は血中 ACTH や GC 濃度を高め、PVN での c-Fos 発現を誘導するとともに、PVN での CRH や AVP の hnRNA 発現量も増加させる (Cole and Sawchenko, 2002; Leibowitz *et al.*, 1989)。また、他の興奮性神経伝達物質としてグルタミン酸がある。グルタミン酸作動性神経のうち PVN へ投射する領域は明確でなく (Ziegler and Herman, 2000)、グルタミン酸の PVN への局所投与は幅広い濃度であっても GC を増加させないという報告があるものの (Cole and Sawchenko, 2002)、一方でグルタミン酸が PVN に興奮性の作用をもたらすことも報告されている。PVN の CRH ニューロンにはイオンチャンネル型のグルタミン酸受容体が発現しており (Ziegler *et al.*, 2005)、グルタミン酸の PVN への投与で正中隆起の CRH 含有量が低下し、血中 ACTH と GC 濃度を増加させること、グルタミン酸受容体拮抗薬投与により拘束ストレス誘発性の GC 放出を抑制すること (Ziegler and Herman, 2000) などである。一方、グルタミン酸は PVN 以外の脳領域に作用すると間接的に HPA 軸に抑制的に働くことがある。PVN 周囲核や視床下部背内側核、視索前野、分界条床核は、抑制的に働く GABA 作動性神経を PVN に投射しており、PVN 周囲核へは前頭前野、腹部海馬台といったグルタミン酸作動性神経が投射すると推定されている (Herman *et al.*, 2020; Ziegler and Herman, 2000)。PVN の CRH ニューロンには GABA-A 受容体が発現しており (Cullinan, 2000)、PVN への GABA-A 受容体拮抗薬投与による非ストレス状態での GC の増加や PVN での c-Fos 発現、CRH 及び AVP の hnRNA 発現増加にくわえ (Cole and Sawchenko, 2002)、PVN への GABA-A 受容体拮抗薬投与によるエアースト

レス誘発性血中 ACTH 濃度上昇の抑制が報告されている (Stotz-Potter *et al.*, 1996)。人間関係や不安、恐怖等、生理的な恒常性を脅かす緊急性はなく、過去の経験との比較により生じる刺激で構成される精神的・感情的ストレスでは (Herman and Cullinan, 1997)、扁桃体などにより高次な処理を介し、視床下部背内側核や視索前野、分界条床核等抑制的に働く神経核を抑制する、つまり脱抑制させることで HPA 軸を活性化させる (Herman *et al.*, 2020)。

## 2. ACTH 分泌促進因子

下垂体前葉からの ACTH 分泌は、CRH、AVP、OT、アンジオテンシンIIなど、様々な因子により促進される (Aguilera, 2011; Negro-Vilar *et al.*, 1987)。これら因子の ACTH 分泌に対する関与の仕方はストレスの条件により異なることが広く知られている (Antoni, 1986; Pacak and Palkovits, 2001; Ramos *et al.*, 2006; Spiga *et al.*, 2009)。本研究では、このうちラットやヒトにおいて最も ACTH 分泌能の高い CRH と、運動時のストレス反応に重要とされてきた AVP に着目し、その特徴を以下に述べる。

### 2-1. ヒトと動物間の構造比較

CRH は 41 個のアミノ酸残基からなるポリペプチドであり、ラットとヒトでは CRH 遺伝子の塩基配列が一部異なるが高度に保存されており、サイズとアミノ酸配列は同じである (Thompson *et al.*, 1987)。また、CRH の発現部位は、ヒトではラットのように PVN が小細胞系と大細胞系の領域に分かれていないものの、どちらも小細胞系に局在している (Mouri *et al.*, 1993)。AVP はそのペ



プチド構造と受容体構造が、ヒトやげっ歯類、その他の哺乳類及び非哺乳類で、進化の初期からあまり変化せず、様々な種に受け継がれている (Goodson and Bass, 2001; Koshimizu *et al.*, 2012; Thibonnier *et al.*, 2001)。また、全ての脊椎動物で、AVP（または非哺乳類の場合は AVT）神経細胞は pmPVN と SON にあり、他の脳領域または下垂体に投射していることは、少なくとも 5 億年間変わらないとされている (Goodson and Bass, 2001)。

## 2-2. ACTH 分泌能

CRH はあらゆる ACTH 分泌促進因子の中で最も強力な主要な因子である (Aguilera, 2011; Aguilera *et al.*, 1983; Negro-Vilar *et al.*, 1987)。安静時とストレス負荷時のどちらにおいても重要性が大きく、CRH 遺伝子欠損マウス（ノックアウトマウス）では、血中 GC 濃度が極端に低く、拘束や絶食のストレス負荷に対してほとんど反応を示さない (Kvetnansky *et al.*, 2006; Muglia *et al.*, 1995)。また、抗 CRH 血清や CRH 抗体による免疫中和は内因性の CRH 活性を阻害し、副腎摘出ラットの安静時の ACTH 分泌と副腎摘出していない動物のストレス誘発性 ACTH 分泌を有意に抑制する (Rivier C. *et al.*, 1982; Rivier C. L. and Plotsky, 1986)。一方、AVP の ACTH 分泌促進作用は CRH と比較すると弱いものの、AVP 欠損ラットは HPA 軸の反応性が鈍感であり (Fodor *et al.*, 2013)、AVP 受容体拮抗薬の投与はストレス誘発性 ACTH 分泌上昇を抑制する (Ramos *et al.*, 2006; Rivier C. and Vale, 1983; Spiga *et al.*, 2009)。また、AVP と CRH の協同的な作用は ACTH 分泌能をより高めるほか (Abou-Samra *et al.*, 1987; Antoni, 1986; Hashimoto *et al.*, 1984)、慢性的なストレスによる CRH 脱感作時の ACTH

分泌は AVP により維持される (Aguilera *et al.*, 2008; de Goeij Dimphena C. E. *et al.*, 1992; Whitnall, 1993)。

## 2-3. 生理的役割

安静時における ACTH 分泌の脈動的なリズムは、CRH と AVP によって異なることが示唆されている (Negro-Vilar *et al.*, 1987)。CRH 受容体拮抗薬の投与は、平均的な ACTH 分泌量を顕著に減少させる一方、脈動の頻度や持続時間には影響しない。一方 AVP 受容体拮抗薬の投与は、平均的な ACTH 濃度は変化させないが、脈動の頻度や持続時間を顕著に減少させる。また、CRH は ACTH 分泌のみならず、ACTH の合成と ACTH 前駆体であるプロオピオメラノコルチン (proopiomelanocortin; POMC) の合成も促進するが、他の視床下部神経ペプチドでは確認されていない (Bruhn *et al.*, 1984; Engler *et al.*, 1999)。

## 2-4. 発現部位別機能的役割

### 2-4-1. PVN 小細胞系 (pPVN)

CRH ニューロンは、PVN の中でもとりわけ背内側に位置する小細胞系に最も密集しており、その一部は AVP も発現している (Aguilera and Liu, 2012; Itoi *et al.*, 2004; Whitnall, 1993)。この領域のニューロンは正中隆起の外層に投射しており、ここでは半数近くの CRH 陽性軸索末端が AVP 陽性である (Itoi *et al.*, 2004; Whitnall *et al.*, 1985)。さらに繰り返しのストレスにより、PVN の CRH ニューロンや CRH 陽性軸索末端での AVP 陽性が増加する (de Goeij Dimphena C. E. *et al.*, 1992; Itoi *et al.*, 2004)。正中隆起外層部に放出された因子は下垂体門脈

を介して下垂体前葉に到達するため (Aguilera and Liu, 2012; Whitnall *et al.*, 1985)、pPVN 由来の CRH や AVP は ACTH 分泌を調節すると考えられている。

#### 2-4-2. 視床下部室傍核大細胞系 (mPVN) 及び視床下部視索上核 (supraoptic hypothalamic nucleus; SON)

AVP は大細胞系の PVN や SON に多く分布しており、CRH も少量発現している (Aguilera, 1998)。この領域のニューロンは正中隆起の内層経由で下垂体後葉に投射し (Aguilera, 1998; Antoni, 2020; Whitnall, 1993)、一般的に大細胞系 AVP の役割は、末梢での抗利尿作用による血漿浸透圧の調整であると考えられている。しかし従来から、大細胞系ニューロンの軸索から下垂体門脈、あるいは下垂体後葉から下垂体前葉へ神経ペプチドが逆行し、HPA 軸活性に寄与するという仮説がある (Gibbs, 1986; Whitnall, 1993)。最近、大細胞系の AVP は、GC による負のフィードバックを抑制する役割をもつという新たな仮説が立てられた (Antoni, 2019; Antoni, 2020)。負のフィードバックは、HPA 軸の過度な活性を抑制する制御システムである。精神的ストレスである Air Puff ストレスや拘束ストレス時には、事前の GC 投与により負のフィードバックが機能して ACTH 分泌が抑制されるが、出血ストレス時や過度な運動時にはこれが機能しない (Antoni, 2020; Deuster *et al.*, 1998; Osterlund *et al.*, 2016; Thrivikraman *et al.*, 2000)。このような GC の負のフィードバックが効かないストレスでは共通して大細胞系の AVP の動員がある (Antoni, 2012; Thrivikraman *et al.*, 2000)。そのため、生命を脅かし、ストレス反応を継続させる必要性のある強いストレス時には、大細胞系 AVP が関与する可能性が示されている。

### 3. ACTH 分泌促進因子の受容体

CRH や AVP といったホルモンは、細胞膜にある受容体に結合し、細胞内のタンパク質を活性化させて連鎖的なシグナル伝達を引き起こす (セカンドシグナリング) ことでその機能を発揮する。各ホルモンが結合する受容体は特定ではあるものの 1 種類とは限らず、結合する受容体により発揮する作用が異なる。本項では、CRH と AVP それぞれの受容体について概要を述べる。

#### 3-1. CRH 受容体

CRH 受容体は、大きく CRH1 型受容体 (CRH1R) と CRH2 型受容体 (CRH2R) の 2 種類に分類される。ACTH 分泌の促進や POMC の転写は CRH1R を介して生じ、多くは下垂体前葉に分布する一方、大脳皮質や小脳にも発現する (Aguilera, 1998)。CRH1R への作用は HPA 軸の活性のみならず、不安関連行動も誘発する (Keck, 2006)。一方 CRH2R は視床下部や心臓に発現し、主に摂食行動や心臓機能の調節、さらには HPA 軸活性の回復に関わる (Aguilera, 1998; Keck, 2006)。CRH2R に対する CRH の親和性は小さく、CRH 様ペプチドであるウロコルチン I、II、III がこれに強く結合する (Aguilera *et al.*, 2004; Bale and Vale, 2004)。CRH1R に対する親和性は CRH とウロコルチン I が強いが、ウロコルチン I の大部分は中脳の動眼神経副核に発現している。CRH とウロコルチン I は CRH 結合タンパクへの親和性も強く、これに結合した場合は CRH 誘発性の ACTH 分泌に抑制的に働く (Bale and Vale, 2004)。

#### 3-2. AVP 受容体

AVP の受容体のサブタイプは大きく 3 種類ある。1 つ目の AVP V<sub>2</sub> 受容体は腎尿細管細胞に存在し、主に腎尿細管水透過性亢進作用 (抗利尿作用) を有する。一定量を超える AVP V<sub>2</sub> 受容体の特異的な阻害は重大な脱水を生じさせ、内因性 AVP 及び ACTH の分泌量増加を引き起こす (Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002)。2 つ目の AVP V<sub>1a</sub> 受容体は、血管平滑筋や肝細胞、子宮、脳など、いたるところに存在し、血管収縮や肝糖新生、中枢性血圧調節、さらには情動作用や日内リズムの形成など、様々な点で重要な役割を果たす。AVP の脳室内投与はストレス誘発性の潰瘍の発生を抑制するが、V<sub>1a</sub> 受容体拮抗薬の脳室内投与は潰瘍の発生を有意に増加させる (Buyukcoskun and Ozluk, 1999)。このことから、AVP は脳内の AVP V<sub>1a</sub> 受容体を介してストレス潰瘍の発生を抑制していることが示唆される。3 つ目の AVP V<sub>1b</sub> 受容体 (V<sub>1b</sub>R) は、大脳皮質や小脳等にもあるが、主に下垂体前葉の ACTH 産生細胞に存在し、ACTH 分泌促進作用を有する (Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000; Griebel *et al.*, 2005)。V<sub>1b</sub>R ノックアウトのげっ歯類では、安静時の ACTH 分泌については健常動物より低下または変わらないが、強制水泳やエタノール投与等のストレス負荷時の ACTH 応答が減弱することが報告されている (Koshimizu *et al.*, 2012)。また、V<sub>1b</sub>R 拮抗薬投与は、ストレス負荷時の ACTH 分泌減弱のみならず (Koshimizu *et al.*, 2012)、不安行動を軽減することが報告されている (Griebel *et al.*, 2005)。AVP と OT は 1 つのアミノ酸構造が異なるだけで非常に類似した構造を持つが (Maybauer *et al.*, 2008)、3 つの AVP 受容体に対する OT の親和性は低いことが確認されている (Koshimizu *et al.*, 2012)。

### 3-3. セカンドシグナリング

CRH1R と  $V_{1b}R$  は、どちらも G タンパク質共役受容体であるが、リガンド結合後の細胞内シグナリング (セカンドシグナリング) は異なる。CRH は下垂体前葉の CRH1 型受容体に結合すると、アデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase: AC) を活性化させることで細胞内環状アデノシン 1 リン酸 (cyclic AMP: cAMP) を増加させ、プロテインキナーゼ A を活性化させる。最終的には細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を増加させることで ACTH 分泌を促進する (Aguilera, 1998)。一方で AVP は、 $AVP V_{1b}$  受容体に結合するとホスホリパーゼ C を活性化し、ホスファチジルイノシトールビスリン酸の分解によりイノシトール 1,4,5-3 リン酸 (1,4,5-inositol triphosphate:  $IP_3$ ) とジアシルグリセロールを産生する。結果としてプロテインキナーゼ C の活性化や細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を増加させ、ACTH 分泌を促進する (Maybauer et al., 2008; Murat et al., 2012)。CRH と AVP は共に作用することで ACTH 分泌能を相乗的に高めることが明らかとなっているが、この背景には AVP が  $V_{1b}$  受容体へ結合することで CRH による cAMP の蓄積が增強し、CRH が CRH1 型受容体へ結合することで AVP による  $IP_3$  の産生が增強するというクロストークがあることが示唆されている (Abou-Samra et al., 1987; Murat et al., 2012)。

## 4. ACTH 分泌促進因子の受容体拮抗薬

### 4-1. CRH1R 拮抗薬: CP154526

CP154526 (CP) は、血液脳関門を通過できる CRH1R に特異的な非ペプチド

性拮抗薬である。これまで CRH による ACTH 分泌や不安行動等の検討に用いられてきた代表的な CRH 受容体拮抗薬に  $\alpha$ -helical CRF<sub>9-41</sub> があるが、これは CRH1R と CRH2R を共に阻害する拮抗薬であった。これに対し CP は CRH1R を特異的に阻害するため、実験結果の解釈が  $\alpha$ -helical CRF<sub>9-41</sub> に比べ容易である。

拮抗薬による受容体阻害作用は阻害定数 ( $K_i$ ) で表され、その値が小さいほど阻害作用が大きいことを示す。CP の CRH1R に対する  $K_i$  は 2.7 nM と小さいが、CRH2R に対する  $K_i$  は 10  $\mu$ M 以上、CRH 結合蛋白質にも 1  $\mu$ M 弱と大きいことから、CP の CRH1R への特異性がわかる (Schulz *et al.*, 1996; Seymour *et al.*, 2003)。また、*in vitro* における CRH によるアデニル酸シクラーゼ (AC) 活性の 50%有効量 (Effective Dose 50%: ED<sub>50</sub>) での検証により、CP は濃度依存的に CRH による AC 活性を抑制し、その  $K_i$  は 3.7 nM であるのに対し、 $\alpha$ -helical CRF<sub>9-41</sub> の  $K_i$  は 30 nM であり、CP が極めて小さい値を示した (Schulz *et al.*, 1996)。更に、*in vivo* において ACTH を約 3 倍に高める CRH 投与で CP の皮下投与は濃度依存的に 10 mg/kg からそれを抑制することが報告されている (Schulz *et al.*, 1996)。

#### 4-2. V<sub>1b</sub>R 拮抗薬: SSR149415

SSR149415 (SSR) は、AVPV<sub>1b</sub>R に特異的に作用する競合的非ペプチド性拮抗薬である (Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2007; Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002; Serradeil-Le Gal Claudine *et al.*, 2005)。動物及びヒトの V<sub>1b</sub>R に対する  $K_i$  は 5 nM 以下と小さいのに対し、V<sub>1a</sub>R、V<sub>2</sub>R 及び OT 受容体に対する  $K_i$  は 90~3000 nM

と非常に大きく、SSR の  $V_{1b}R$  への親和性の高さと特異性を示している (Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002)。また、*in vitro* における  $Ca^{2+}$  増加を最大限もたらす AVP 量 (30 nM) での刺激は、SSR 濃度依存的に  $Ca^{2+}$  を抑制した (Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002)。更に、*in vivo* において ACTH 濃度を約 3 倍に増加させる AVP 量 (0.3  $\mu$ g/kg) を用いた SSR の ACTH 分泌阻害力も検討されている。1～30 mg/kg の SSR の腹腔内または経口投与は、ACTH 分泌を濃度依存的に抑制し、その最低有効効果量は腹腔内投与で 3 mg/kg、経口投与で 10 mg/kg であった (Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002)。SSR は 30 mg/kg の経口投与で CRH による ACTH 及び GC の血漿濃度上昇を抑制しないが、10～30 mg/kg の経口または腹腔内投与は、AVP と CRH の併用投与や拘束ストレスによる血漿 ACTH 及び GC の血漿濃度上昇を抑制する (Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002)。

## 5. ストレス条件と ACTH 応答の視床下部調節

ストレス刺激の種類やストレス反応継続期間等、ストレスの条件により関与する ACTH 分泌促進因子が異なることが多くの研究で示されてきた。例えば CRH や AVP の合成は、拘束ストレスや出血ストレスでは増加するが、寒冷ストレスでは増加しない (Antoni, 1986; Pacak and Palkovits, 2001)。また、CRH 及び AVP 受容体拮抗薬を用いて、それぞれの因子の ACTH 分泌に対する関与も検討されている。例えば、エーテルストレス時の ACTH 分泌は CRH 受容体拮抗薬投与の影響を受けない一方で AVP 受容体拮抗薬投与により抑制される。また、浸水ストレス時にはそれぞれの拮抗薬の単独投与は ACTH 分泌を抑制しないが、同時に投与することで顕著に抑制する。一方拘束ストレスではそれぞれの拮抗薬の単独投与により ACTH 分



泌増加は抑制されるが、これらを同時に投与することでより一層抑制される (Ramos et al., 2006)。更に、多くの急性ストレス時には CRH が ACTH 分泌に対し主要な役割を担うが、慢性化することで CRH から AVP へと貢献度の比重が変化することが示されている (Whitnall, 1993; Aguilera, 1994)。これらのことから、ストレス刺激の条件によって、その刺激に対処するのにふさわしい因子が ACTH 分泌を促進するよう働いていることが考えられる。

## 6. 運動時の ACTH 応答の視床下部調節

運動ストレス時の ACTH 分泌促進には、AVP が重要な役割を果たすことが示唆されている。Alexander らは、放出された視床下部ホルモンや下垂体ホルモンを反映する下垂体静脈からの連続採血のために、ウマにカテーテルを留置し、5 分間のギャロップ運動（駆け足）を課すと、走運動時には ACTH 及び AVP の血中濃度に正の相関関係があることを報告した (Alexander et al., 1991)。また、Inder らは、自転車エルゴメーターを用いたヒト研究で、最大運動時に末梢血中の ACTH と AVP の値が同時に高まることを報告した (Inder et al., 1998)。末梢血中の AVP は血漿浸透圧調節に関与すると考えるのが一般的だが、この時の AVP 濃度は血漿浸透圧の変動だけでは説明できないほどの大きな増加であることから、ACTH の分泌に AVP が関わっている可能性が示された。さらに、げっ歯類の研究では、ACTH 分泌を伴う走運動時に pPVN の AVP 神経細胞が顕著に活性化することや、正中隆起内の AVP 含有量が減少することも明らかにとなっている (Saito and Soya, 2004)。これらの報告は AVP が運動時の ACTH 応答を制御するという仮説を支持しているが、いずれも運動ストレス時

の AVP の動態の観察に留まるため、決定的な証拠は得られていない。

一方で、一般的に最も主要な ACTH 分泌促進因子である CRH の運動ストレスへの関与については、一致した見解が得られていない。CRH の関与に肯定的な先行研究の一つは、上述の Inder らの報告である (Inder *et al.*, 1998)。ここでは、ACTH 分泌を伴う自転車運動時に末梢 CRH 濃度も高まることが明らかとなった。しかし、ACTH 分泌を促す CRH は視床下部由来であるが CRH は末梢からも分泌されるため、観察された末梢血中の CRH が末梢由来である可能性を否定できない。また、疲労困憊に導く 60 分間のラットの漸増負荷運動により、pPVN 内の *Crh* mRNA を発現する細胞のうち約 95% が細胞活性マーカーの遺伝子である *fos* を発現したことが報告されている (Timofeeva *et al.*, 2003)。しかしながら、漸増負荷運動では最終的に 25 m/min まで速度を高めたのに対し、事前の走行学習の最大速度は 15 m/min であったため、高強度のトレッドミル運動への馴化が十分ではなく、精神的ストレスの影響を拭えない。実際、精神的ストレスに強く関与する扁桃体内側核及び基底外側核の活性化が確認されている。さらに、ラットの固定負荷運動を用いた先行研究では、運動強度依存的な PVN の CRH ニューロン活性が確認されているが、ACTH 応答が評価されておらず、運動ストレスによる反応かどうか定かでない (Morikawa *et al.*, 2021; Otsuka *et al.*, 2016)。一方で、運動ストレスに対する CRH の非関与を示唆する報告もされている。上述した Alexander らの報告では、ギャロップ運動は下垂体静脈血中の ACTH を高めたにも関わらず、CRH 濃度は変化しなかった (Alexander *et al.*, 1991)。また、ヒトのトレッドミル運動前の外因性 CRH による CRH 受容体占有は、ACTH 濃度上昇を抑制しなかった (Smoak *et al.*, 1991)。こ

のように、運動誘発性ストレス応答に対する CRH の関与については見解が一致せず、長きに渡って論争が繰り広げられている。

## 7. Wistar ラット

### 7-1. Wistar ラットの歴史

非近交系 Wistar ラットの起源は、アメリカのウィスター研究所で維持されていたラットにある。ウィスター研究所で繁殖されていた期間 (1909～1960 年) に研究所外、及び日本を含む国外に供給されたアルビノラットが、それぞれの機関で繁殖・維持されてきた (西川, 1990)。これらウィスター研究所から由来したラットが一般名「Wistar ラット」として流通している (山田, 1987)。同一系統内での遺伝的変異を極力少なくしている近交系とは異なり、非近交系はある程度の個体間の遺伝的変異が予想されることに加え、各機関における環境条件も異なる (野村, 1969)。これらのことから、各機関で繁殖・維持されている Wistar ラットは異なるものと考えられ、ブリーダーごと、すなわち繁殖・育成する集団であるストックごとに、マウスおよびラットの系統命名規約に則ってラボラトリーコードの付いた名前が与えられ、区別されている (Committee, 2016)。

### 7-2. ストック間の差

非近交系である Wistar ラットは、各個体の遺伝的性質のばらつきが一定の範囲内で生じるものの、集団としては固有の遺伝的性質を示すことから、ヒト

などの個体間の遺伝子型が不均一な集団のモデルとして適している (海野, 2017; 野村, 1969)。一方集団 (ストック) を超えると、いくつかの生物学的特徴が大きく異なることが報告されている。例えば、エステラーゼとアミラーゼの遺伝子座において、Wistar ラットの 4 つのストック間の遺伝的距離は大きく、SD ラットとの区別をし得る結果は認められていない (Yamada *et al.*, 1979)。このような一般名称が同一でストックの異なる実験動物における遺伝的な差は ICR マウスでも観察されており、いくつかの表現型が一致しない (Hayakawa *et al.*, 1980)。Wistar ラットのストック間の差は遺伝的關係のみならず、白血球やリンパ球等の血液学的データにも見られている (Kampfmann *et al.*, 2012)。さらには認知機能にもストック間で差があることが、Wistar ラットにくわえ Long-Evans ラットでも確認されている (Hirate *et al.*, 1988; Hirate *et al.*, 1989; Nakamura and Anderson, 1962)。ストック間の違いは、これらのような安静状態のみならず、薬物投与に対する反応性にも表れる (Hirate *et al.*, 1988)。これらの報告は、たとえ同じ一般名称を持つ実験動物であっても同じ生物学的・生化学的特徴を有するとは限らず、ストックが違えば研究の再現性が得られない可能性を示している。

### 第Ⅲ章 研究目的及び課題

#### 1. 研究目的

本研究は、ヒトの代謝・ストレス応答を模倣するラット運動ストレスモデルを用いて、乳酸性作業閾値 (LT) を超える中強度の走運動時の ACTH 分泌調節に対する AVP と CRH の関与を明らかにすることを目的とした。そのために研究課題 1 では、4 つのストックの Wistar ラットの運動時の代謝・ストレス応答を検証してヒトの応答を模倣するストックを選択し、そのストックの LT を算出した。研究課題 2 では、 $V_{1b}R$  及び CRH1R の単独または併用投与後の運動誘発性 ACTH 応答を検証し、続いて研究課題 3 において ACTH 分泌を伴う運動時の視床下部における AVP 及び CRH 神経細胞の活性化を評価した。

#### 2. 研究課題

本研究の目的を達成するために、以下の研究課題を設定した。なお、各研究課題には適宜複数の小課題を設定して実施した。

【研究課題 1】運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣するラット走運動モデルの確立

研究課題 1-1: 運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣する Wistar ラットのストックの選定

動物実験は、得られた研究成果をヒトに還元することを見据えて実施するた

め、ヒトの生体で生じる現象を再現する実験動物を用いる必要がある。Wistar ラットは、その由来ブリーダー、すなわちストックによって、遺伝的構成や血液成分、認知機能や薬物に対する反応性などが異なることが報告されており、運動に対する反応性も異なる可能性がある。そのため、ヒトで生じる運動強度依存的な代謝・ストレス応答を模倣する Wistar ラットのストックを用いて妥当性の高い運動モデルを確立するために、異なる強度の運動時の代謝・ストレス応答を複数のブリーダー由来の Wistar ラットで検証する。

#### 研究課題 1-2: LT の算出

ヒトでもラットでも、運動強度を段階的に高めると、一定の強度までは血中乳酸値は低値で安定するが、45-65%最大酸素摂取量に達すると血中乳酸値が急激に上昇する乳酸性作業閾値 (LT) が出現し、LT 以上の強度においてストレス反応が生じる。研究課題 1-1 で、ヒトの代謝・ストレス応答を模倣することが示された Wistar ラットで LT 強度を基準とした走運動モデルを確立するために、漸増負荷運動時の血中乳酸動態から LT を算出し、その妥当性を評価する。

### **【研究課題 2】運動時の ACTH 分泌を調節する視床下部因子の解明**

#### 研究課題 2-1: 走運動ストレス時の ACTH 応答の抑制に効果的な $V_{1b}R$ 拮抗薬投与量の検討

AVP は運動時の ACTH 分泌に関与する可能性が現象として示されてきたが、その決定的な証拠を得るためには、薬理的な介入が有効である。そこで、AVP が ACTH 分泌を引き起こす機構である  $V_{1b}R$  に特異的に作用する拮抗薬を様々

な量で投与し、LT 以上の中強度運動で生じる ACTH 分泌の抑制に効果的な投与量を明らかにする。

#### 研究課題 2-2: 走運動ストレス時の ACTH 応答の抑制に効果的な CRH1R 拮抗薬投与量の検討

CRH は運動時の ACTH 分泌に関与しないという仮説が主流であるが、視床下部の CRH 神経細胞や遺伝子発現が運動の影響を受けることが報告されており、運動誘発性 ACTH 応答に対する作用について不明である。これを薬理的に介入して明らかにするために、まずは CRH が ACTH 分泌を引き起こす機構である CRH1R に特異的に作用する拮抗薬を様々な容量で投与し、LT 以上の中強度運動で生じる ACTH 分泌の抑制に効果的な投与量を明らかにする。

#### 研究課題 2-3: 運動誘発性 ACTH 応答制御に対する AVP と CRH の関与の検証

運動ストレス時の ACTH 分泌を AVP または CRH が調節するのか、さらに、両因子は協調的に ACTH 分泌を促すのかについて、未だ不明である。したがって、研究課題 2-1、2-2 でそれぞれ求められた V<sub>1b</sub>R 及び CRH1R 特異的な拮抗薬の有効投与量を用いて運動前に単独または併用投与し、運動誘発性 ACTH 応答に対する AVP と CRH の関与を明らかにする。

#### **【研究課題 3】 運動ストレス時の視床下部 AVP と CRH の神経細胞活性の検証**

AVP や CRH が運動時の ACTH 応答に関与している場合、運動ストレス時には視床下部のそれぞれの神経細胞が活性化するはずである。そこで、ACTH 分泌を伴う運動時に視床下部 AVP 及び CRH 神経細胞が活性化するかどうかを明

らかにする。



## 第Ⅳ章 運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣する Wistar ラットのストックの選定（研究課題 1-1）

### 1. 目的

動物実験の多くは、その成果を将来ヒトに還元するために実施するものであるため、ヒトの生理現象を再現する実験モデルの使用が求められる。実験モデルの重要な構成要素の一つである実験動物の中でも代表的な Wistar ラットは、同じ一般系統名でも、遺伝的構成、血液成分、認知機能、及び薬物に対する生理的反応性が、由来ブリーダーすなわちストックにより異なることが報告されている。これらのことから、Wistar ラットの運動時の代謝・ストレス応答もストック間で異なる可能性がある。ヒトでは、血中乳酸値が高まる運動強度で血糖値及び血漿 ACTH 濃度が上昇し、運動強度依存性を示す。そこで研究課題 1-1 では、これまで我々が確立してきた実験条件下において妥当性の高いラット運動モデルを確立するために、様々なブリーダー由来の Wistar ラットの運動時の血中乳酸値、血糖値、ACTH 濃度を評価し、運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣する Wistar ラットのストックを選定した。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

本研究は、筑波大学動物実験指針に基づき、動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。実験には、8 週齢の雄性 Wistar ラット (Slc:Wistar、日本 SLC 株式会社、n = 4; Crj:WI、日本チャールズ・リバー株式会社、n = 4; Kwl:Wistar、

東京実験動物株式会社、n = 5; Jcl:Wistar、日本クレア株式会社、n = 5) を用いた。飼料には実験動物用固形飼料 (MF、オリエンタル酵母工業) を、飲料水には蒸留水を用い、ともに 24 時間自由摂取とした。飼育環境は、午前 7 時と午後 7 時を境とする明暗サイクルとし、室温 22–24°C、湿度 40±10% を維持した。動物を搬入後、少なくとも 7 日間の予備飼育期間を設け、体重変化を確認するとともにハンドリングを行った。

## 2-2. 走行学習

ラットには予備飼育後、トレッドミル (夏目製作所、KN-73 TREAD-MILL) を用いて、1 日に最大 30 分間、週 5 日の頻度で合計 7 回の走行学習を施行した (表 1)。走行前のトレッドミル上での安静時には電極の電源を入れておき、電極に触れると微弱な電気が流れることを学習できるようにした。走行時にはラットの後肢をたわしで突いて走らせ、レーン末端の電極による電気刺激は極力用いらないよう努めた。

表 1. 走行学習プロトコル

day	Menu
0	(0 m/min × 10 min)
1	(5 m/min × 7 min) + (10 m/min × 15 min)
2	(10 m/min × 20 min) + (15 m/min × 5 min)
3	rest
4	(10 m/min × 15 min) + (15 m/min × 15 min)
5	(15 m/min × 25 min) + (20 m/min × 5 min)
6	rest
7	(15 m/min × 15 min) + (20 m/min × 15 min)
8	(20 m/min × 25 min) + (25 m/min × 5 min)
9	(20 m/min × 15 min) + (25 m/min × 15 min)

### 2-3. 外頸静脈カテーテル留置術

走行学習最終日の 2 日後、走運動中の連続採血を可能とするために、外頸静脈にカテーテル（ポリエチレンチューブ）を挿入した（図 2）。

動物吸入麻酔薬であるイソフルラン（DS ファーマアニマルヘルス）を実験動物用ガス麻酔システム（DS ファーマバイオメディカル）に注ぎ、濃度を 2~3 %、ガス流速を 1.5~3.0 l/min に設定した。ラットを麻酔ボックスに入れ、麻酔が効いたことを確認した後、チューブを通した維持麻酔を施しながら手術を行った。まず右鎖骨上部の皮膚を切開し、右外頸静脈を露出した。その上端を絹糸で縛り血流を止めた状態で静脈の一部をウィッケルで切開し、切開部から右心房に向け、カテーテルを Slc:Wistar には 32 mm、Crj:WI には 36 mm、Kwl:Wistar と Jcl:Wistar には 33 mm、それぞれ挿入した。血液がカテーテルから抜けることを確認し、カテーテルを絹糸で外頸静脈に固定した。その後、後頭骨の直下約 1 cm を切開し、そこからカテーテルを露出させた。再度カテーテルから血液が抜けることを確認した後、カテーテル内を 10%ヘパリン生理食塩水で満たした。後頭部から出たカテーテルを絹糸で皮膚に固定し、切開部を縫合した。手術終了後、感染症を防ぐために抗生物質（マイシリンゾル明治、明治製菓ファルマ）を 100  $\mu$ l 皮下投与した。手術後 3 日間の回復期間を設け、実験を行った。

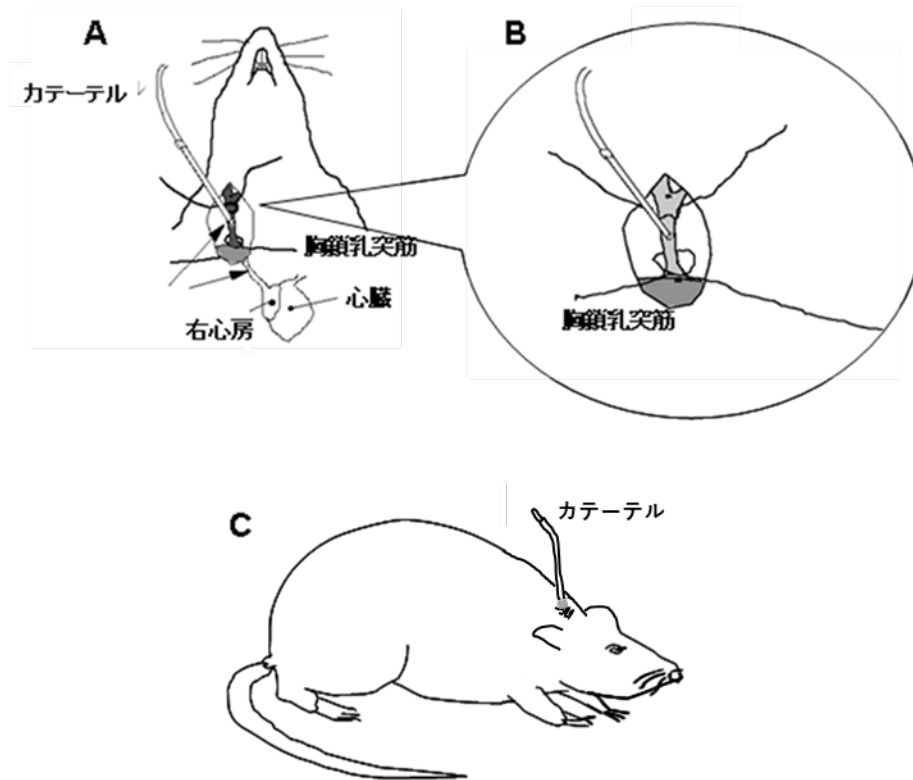


図 2. 外頸静脈カテーテル留置術

麻酔下に置いたラットの右鎖骨部を切開して外頸静脈から右心房にカテーテルを留置した。図 2-A は挿入部位を、2-B は挿入部位の拡大図を、2-C は手術後のラットの外見を示した。

#### 2-4. 走行試験

実験プロトコルを図 3 に示した。走行試験は日内変動による影響を防ぐために朝実施された。全てのラットは、実験開始の 2 時間前から絶食した後、15 m/min、20 m/min、22.5 m/min の 3 つのステージ（各 10 分間）で構成されたトレッドミル走行試験に課された。これらの速度は、先行研究 (Soya *et al.*, 2007) で報告された Wistar ラット (Kwl:Wistar、埼玉実験動物) の LT (20 m/min) を基準に設定された。ラットの後肢をたわしで突いて走らせ、電気ショックによるストレス反応を防ぐためにレーン末端の電極による電気刺激は極力用いら

ないよう努めたが、必要に応じて微弱な電流で刺激し、電気ショック暴露数をカウントした。ラットはトレッドミル上で 15 分間安置され、運動開始前及び各ステージ終了直前に、留置したカテーテルより 350  $\mu$ l ずつ採血され、直ちに 1.5%EDTA 溶液でコーティングしたエッペンチューブに採取し、優しく転倒混和した。

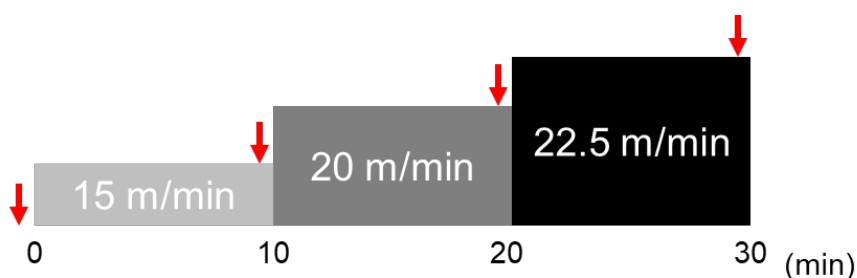


図 3. 研究課題 1-1 の実験プロトコル

先行研究で報告されたあるストックの Wistar ラットの LT (20 m/min) を基準に、15 m/min、20 m/min、22.5 m/min のステージを設定し、それぞれ 10 分間ずつ連続して走らせた。赤矢印のポイントで採血した。

## 2-5. 血中乳酸値及び血糖値測定

血液は直ちにグルコース・ラクテート・アナライザー (2300 Stat Plus、YSI、アメリカ) を用いて血中乳酸値及び血糖値を測定した。

## 2-6. 血漿 ACTH 濃度測定

血液は直ちに 3000 rpm で 10 分間、4°C で遠心分離し、120  $\mu$ l の血漿を採取した。ACTH は不安定なため、その分解防止剤として Aprotinin (MP Biomedicals、アメリカ) を 1000 KIU/mg 血漿に加え、長期保存を可能とした。採取した血漿は測定まで -80°C で保存した。

血漿 ACTH 濃度の測定には、MD Bioproducts 社 (アメリカ) の ELISA キ

ットを用いた。このキットはあらかじめウェルにコーティングされたストレプトアビジンがビオチンと非常に強力に結合する性質を利用しており、ACTH の C 末端に結合するビオチンで標識された抗体と N 末端に結合する西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase ; HRP) で標識された抗体によるサンドイッチ法を用いた測定であるため、交差反応がほとんどなく、ACTH を特異的に検出することが可能である。このキットの感度は 0.46 pg/ml、測定内誤差は 7%以下、測定間誤差は 8%以下である。

血漿サンプルは 0.1%の牛血清アルブミン (Bovine serum albumin ; BSA) (ナカライテスク、日本)で 4 倍希釈し測定に用いた。吸光度測定には ARVO X (Perkin Elmer、日本)を用い、450 nm 及び 405 nm の波長の吸光度を測定した。450 nm の吸光度は 150 pg/ml 以下、405 nm の吸光度は 150 pg/ml 以上の値の算出に用いるため、2 種類の標準曲線を作成した。標準曲線の一例を図 4 に示す。サンプルの値は得られた吸光度によって適した標準曲線を用いて算出し、希釈倍率で補正して求めた。

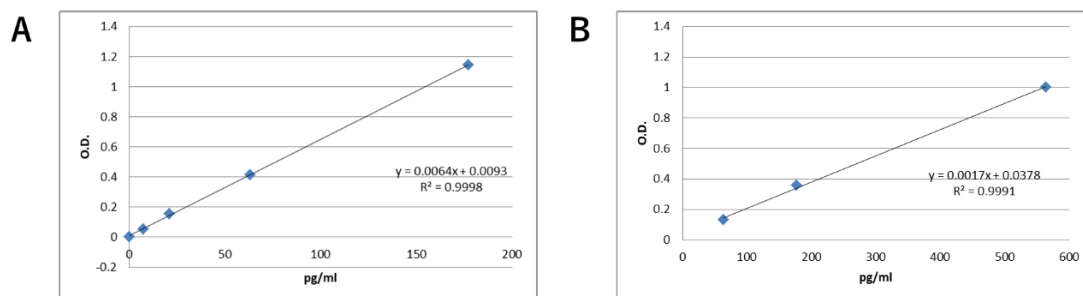


図 4. ACTH 測定時の標準曲線の典型例

図 4-A に 450 nm、図 4-B に 405 nm の標準曲線の一例を示した。全サンプルを 450 及び 405 nm の波長で吸光度を測定した。450 nm の吸光度と標準曲線を用いて算出した値が 150 pg/ml 以上となったサンプルは 405 nm の吸光度と標準曲線を用いて血漿 ACTH 濃度を算出した。

## 2-8. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で示した。統計ソフトには、GraphPad Prism 7.04 (MDF 社、日本) を用いた。繰り返しのある 2-way ANOVA を行い、時間または運動強度とストックの因子にはそれぞれ Dunnett または Tukey の事後多重比較検定を行った。走行試験の最終ステージにおける各値は Spearman の相関分析にかけた。統計的有意差は両側検定とし、有意水準は 5%とした。

### 3. 結果

#### 3-1. 代謝応答

運動に対する代謝応答として測定された血中乳酸値及び血糖値の結果を図 5 に示す。血中乳酸値に対する運動強度とストックの主効果及びそれらの交互作用が認められた (図 5 A; 運動強度;  $F_{(3, 42)} = 20.72, p < 0.0001$ , ストック;  $F_{(3, 14)} = 53.67, p < 0.0001$ , 運動強度×ストック;  $F_{(9, 42)} = 4.303, p = 0.0005$ )。血中乳酸値は安静時には有意な群間差は認められなかったが、全ての運動強度において、KwI:Wistar と Jcl:Wistar 間以外の全ての群間で有意に異なった ( $p < 0.05$ )。くわえて、血中乳酸値の変化については、Slc:Wistar は全ての運動強度で、Crlj:WI は 20 m/min 以上で、KwI:Wistar は 22.5 m/min で、運動前より有意な高値を示したが ( $p < 0.05$ )、Jcl:Wistar はいずれの運動強度でも変化しなかった ( $p > 0.05$ )。血糖値に対しても、運動強度とストックの主効果及びそれらの交互作用が認められた (図 5 B; 運動強度;  $F_{(3, 42)} = 34.56, p < 0.0001$ , ストック;  $F_{(3, 14)} = 5.777, p = 0.0087$ , 運動強度×ストック;  $F_{(9, 42)} = 7.72, p < 0.0001$ )。血糖値は安静時には群間で有意差はなかったが、全ての運動強度において、Slc:Wistar と Jcl:Wistar、

Crlj:WI と Kwl:Wistar、及び Crlj:WI と Jcl:Wistar 間で有意に異なった ( $p < 0.05$ )。運動により Slc:Wistar と Crlj:WI では血糖値が有意に上昇したが ( $p < 0.05$ )、Jcl:Wistar では変化がなく ( $p > 0.05$ )、一方で Kwl:Wistar では 15 m/min 時に有意に低下した ( $p = 0.0004$ )。

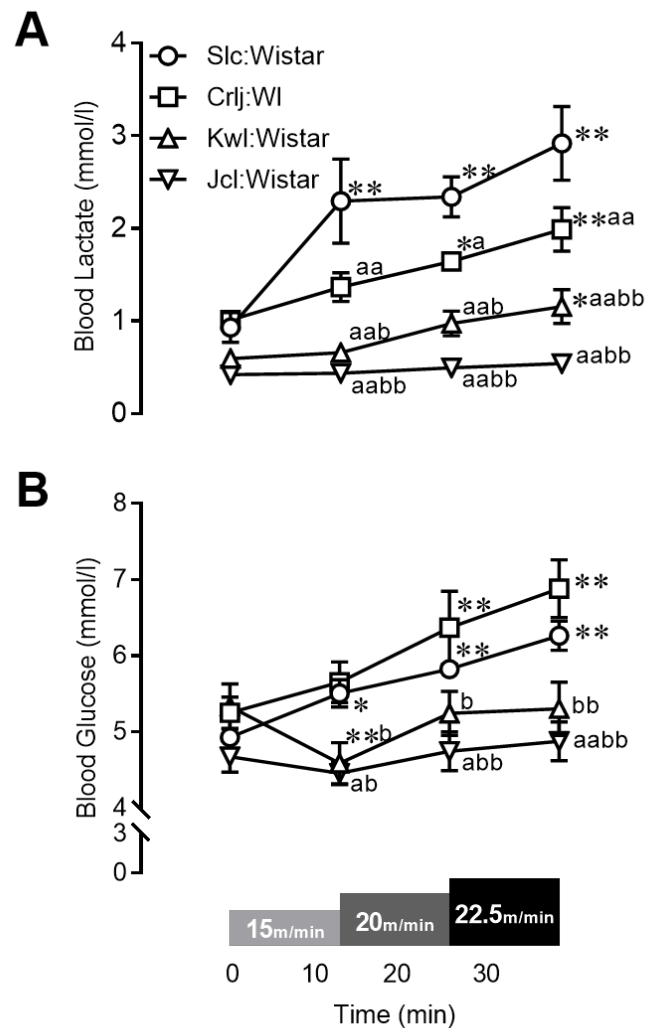


図 5. 各 Wistar ラットストックにおける異なる運動強度時の代謝応答

4 つのストックの Wistar ラットの各運動強度における血中乳酸値 (A) 及び血糖値 (B)。Values are mean  $\pm$  SEM. (n = 4-5). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  vs. 0 min, a:  $p < 0.05$ , aa:  $p < 0.01$  vs. Slc:Wistar, b:  $p < 0.05$ , bb:  $p < 0.01$  vs. Crlj:WI.



### 3-2. ストレス反応

ストレス反応の指標として血漿 ACTH 濃度が測定された (図 6)。運動強度とストックの主効果及びそれらの交互作用は有意だった (運動強度;  $F_{(3, 42)} = 34.09$ ,  $p < 0.0001$ , ストック;  $F_{(3, 14)} = 4.345$ ,  $p = 0.0232$ , 運動強度×ストック;  $F_{(9, 42)} = 2.526$ ,  $p = 0.0206$ )。血漿 ACTH 濃度は安静時には有意な群間差はなかったが、全ての運動強度で Slc:Wistar と Jcl:Wistar 間、及び 15 m/min 時に Slc:Wistar と Kwl:Wistar 間で有意に異なった ( $p < 0.05$ )。また、運動前と比較すると、Slc:Wistar は全ての運動強度で、Crlj:WI と Kwl:Wistar では 20 m/min 以上で、有意な高値を示したが ( $p < 0.05$ )、Jcl:Wistar では変化がなかった ( $p > 0.05$ )。

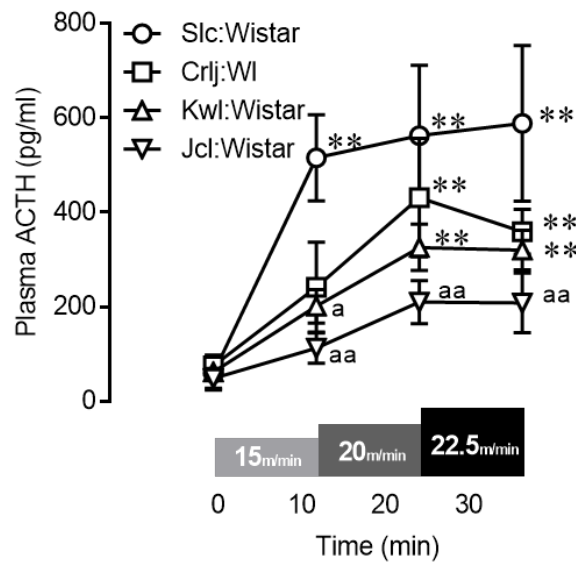


図 6. 各 Wistar ラットストックにおける異なる運動強度時の ACTH 応答

Values are mean  $\pm$  SEM. (n = 4-5). \*\*:  $p < 0.01$  vs. 0 min, a:  $p < 0.05$ , aa:  $p < 0.01$  vs. Slc:Wistar.

#### 4. 考察

研究課題 1-1 では、ヒトへの還元を見据えて、ヒトの運動時の代謝・ストレス応答を模倣する Wistar ラットのストックを用いた妥当性の高いラット走運動モデルを確立するために、4 つの Wistar ラットのストックにおける異なる強度の走運動時の代謝・ストレス応答を検証した。その結果、4 つの Wistar ラットのストックの中で、Crlj:WI が本研究の運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣し、本研究の実験動物として適切であることが示された。

本研究で用いた走運動に対する代謝・ストレス応答はストック間で異なった。4 つのストックのうち Crlj:WI と Kwl:Wistar において、血中乳酸値及び血漿 ACTH 濃度はヒトと同様に運動強度依存的に上昇した（図 5A、図 6）（Farrell *et al.*, 1983; Luger *et al.*, 1987; Rahkila *et al.*, 1988）。しかしながら、血糖値に関しては、Crlj:WI ではヒトと同様の運動強度依存性が見られたものの、Kwl:Wistar では低い速度で一度有意な低値を示し、その後安静値と同様の値を維持するというヒトとは異なる動態を示した（図 5B）（Farrell *et al.*, 1983）。これらの結果から、本研究の実験条件においてヒトと同様の運動時の生理応答を示す Wistar ラットのストックは Crlj:WI であることが示された。

ヒトの運動時の生理応答を模倣するストックとして Crlj:WI のみ示されたことは、本実験デザイン限定的である可能性に注意が必要である。研究課題 1-1 では、規定の走行学習や走行試験を課した。例えば Slc:Wistar の代謝・ストレス応答は、15 m/min から高まりヒトで見られる運動強度依存性が現れなかったが、これはこの速度が Slc:Wistar にとって LT 以上だった可能性を示している。

LT は個体が生まれながらに有する体力や筋力はもちろんのこと、事前のトレーニングで変動する。適度なトレーニングの蓄積は相対的な運動強度を下げ、生理応答に適応的な変化をもたらすことができるため (Chennaoui *et al.*, 2002; Kawashima *et al.*, 2004; Luger *et al.*, 1987)、ストックに適した走行学習の実施や、ストックごとの LT を基準とした運動強度での走行試験実施等により、どのストックでも運動強度依存的な生理応答が生じる可能性を念頭に入れる必要がある。

## 5. 要約

研究課題 1-1 の結果に基づいて、本研究で用いる実験条件下で、Crlj:WI が運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣する Wistar ラットのストックであることが明らかとなった。

## 第V章 LTの算出（研究課題1-2）

### 1. 目的

ヒト及びげっ歯類において、走運動ストレス時の ACTH 応答は LT 強度以上で生じることが明らかとなっていることから (Farrell *et al.*, 1983; Luger *et al.*, 1987; Ohiwa *et al.*, 2007; Rahkila *et al.*, 1988; Saito and Soya, 2004; Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007)、走運動ストレスモデルの確立には LT を基準とすることが有用である。さらに、漸増負荷運動時の血中乳酸値はしばらく低値で安定し、中強度において急激に上昇する (LT) (Beaver *et al.*, 1986; Jones and Ehram, 1982)。このことから、漸増負荷運動時の血中乳酸動態や LT の出現はヒトの生理応答を模倣する動物モデルとしての妥当性の評価にも有用となる。そこで研究課題 1-2 では、研究課題 1-1 で選定した本研究で用いる被験動物 Crlj:WI の LT を算出し、妥当性を評価することを目的とした。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

本研究は、筑波大学動物実験指針に基づき、動物実験倫理委員会の承認を受けて行われた。実験には、8 週齢の雄性 Wistar ラット (Crlj:WI、日本チャールズ・リバー株式会社、n = 6) を用いた。飼育条件は研究課題 1-1 と同様とした。

#### 2-2. 走行学習

研究課題 1-1 と同様に実施した。

### 2-3. 外頸静脈カテーテル留置術

研究課題 1-1 と同様に実施した。シリコンカテーテルの右外頸静脈への挿入は、個体の体重に応じて 35–37 mm とした。

### 2-4. 走行試験

実験プロトコルを図 7 に示した。走行試験は日内変動による影響を防ぐために朝実施された。実験開始の 2 時間前からラットに絶食させた後、15 分間トレッドミルに安置した。留置したカテーテルから 50  $\mu$ l の採血を行い、血中乳酸値が安静値（約 1 mmol/l）であることを確認した後、走運動を開始した。走運動は 5 m/min から 3 分おきに 2.5 m/min 速度を速める漸増負荷運動とし、疲労困憊まで行わせた。ラットの疲労困憊は、継続して走ることができず、たわしで優しく押しても 30 秒間グリッド上に留まることを判断基準とした。速度を速める 30 秒前に 50  $\mu$ l の採血を行った。

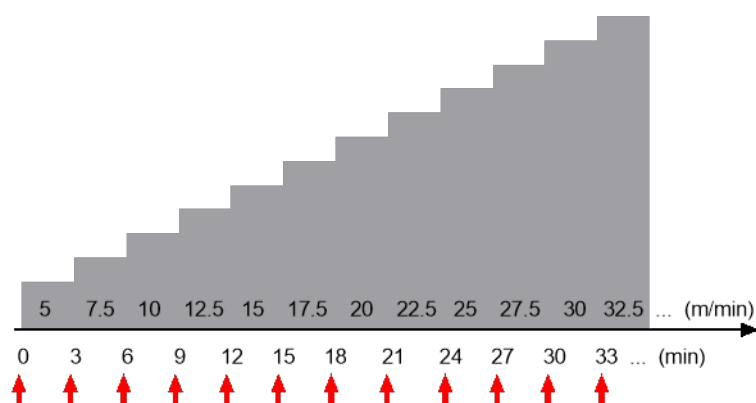


図 7. 研究課題 1-2 の実験プロトコル

カテーテルが留置されたラットに 5 m/min から 3 分毎に 2.5 m/min 速度を上げる漸増負荷運動を疲労困憊まで課した。赤い矢印のポイントで採血を行った。

### 2-5. 血中乳酸値測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

## 2-6. 統計処理

LT は先行研究を参考に (Beaver *et al.*, 1985; Green *et al.*, 1983; Soya *et al.*, 2007)、血中乳酸値から最小二乗法によって得られた 2 本の回帰直線より算出した。データは平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。

## 3. 結果

漸増負荷運動中の血中乳酸値の動態の典型例を図 8A に、平均乳酸値を図 8B に示す。運動中の血中乳酸値はしばらくの間安静値を維持したが、その後ラットが疲労困憊に至るまでその値は運動強度依存的に着実に増加した。血中乳酸値が安静値から急激に増加し始めた走速度を LT とし、6 匹の平均 LT 速度は  $19.8 \pm 1.1$  m/min、平均疲労困憊速度は  $42.1 \pm 1.5$  m/min であった。

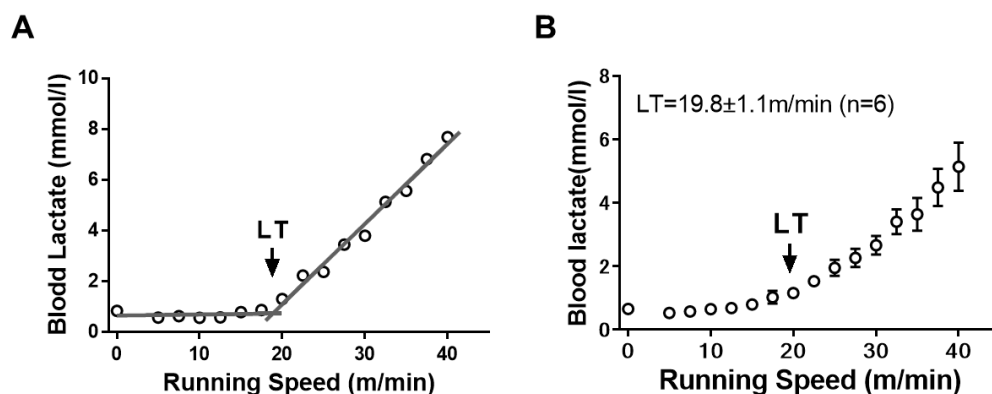


図 8. 漸増負荷運動時の血中乳酸値の変化

図 8A は 5 m/min から 3 分おきに 2.5 m/min 走速度を速める漸増負荷運動時のある 1 匹のラットの血中乳酸値を表している。乳酸性作業閾値 (LT) は二本の回帰直線から求めた。図 8B は同運動時の平均乳酸値 (n=6) の変化を表しており、19.8 m/min に LT が出現した。

#### 4. 考察

研究課題 1-2 では、運動ストレスモデル確立に必要な CrIj:WI の LT を算出した。その結果、漸増負荷運動により CrIj:WI の血中乳酸値は低値から急激に高まる LT が平均 19.8 m/min に出現し、ヒトを模倣する動物モデルとしての妥当性が示されると共に、この強度を基準とした運動ストレスモデルの確立が可能となった。

運動時の ACTH 分泌は運動強度依存的に生じ、とりわけ LT 強度以上で顕著に亢進することから (Farrell *et al.*, 1983; Luger *et al.*, 1987; Rahkila *et al.*, 1988; Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007)、被験動物の LT の算出は、運動ストレスモデル確立のために重要である。本研究の被験動物は先行研究の Wistar ラットとはストックが異なるため体力特性が異なる可能性があったが、先行研究では 17.5–20 m/min に LT が出現しており (Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007)、本研究の結果とほぼ同等であった。さらに、ヒトと同様、LT が出現するまでの低強度では血中乳酸値は安定した低値を示し、ヒトの生理応答を模倣する動物モデルとしての妥当性も示された。固定負荷の走運動ストレスモデル確立にあたり、本研究課題で得られた結果を基に、無理なく走れ、かつ ACTH 分泌を惹起する中強度運動の走速度を決定することが有用である。

#### 5. 要約

研究課題 1-2 において、本研究の被験動物 CrIj:WI の平均 LT は 19.8 m/min に現れることが確認され、ヒトに近いモデルとしての妥当性が示された。

## 第Ⅵ章 走運動ストレス時の ACTH 応答の抑制に効果的な V<sub>1b</sub>R 拮抗薬投与量の検討（研究課題 2-1）

### 1. 目的

走運動ストレス時の ACTH 分泌には、AVP が重要な役割を果たすことが示唆されているが決定的な証拠は未だに得られていない。この仮説を検証するためには AVPV<sub>1b</sub>R 拮抗薬 SSR149415 (SSR)投与による薬理的介入が有効であるが、SSR の有効投与量は不明である。そこで研究課題 2-1 では、走運動前に様々な濃度の SSR を投与し、走運動時の ACTH 分泌抑制に効果的な投与量を検討した。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

研究課題 1-2 と同様とした。

#### 2-2. 走行学習

研究課題 1-1 と同様に実施した。

#### 2-3. 外頸静脈カテーテル留置術

研究課題 1-2 と同様に実施した。

#### 2-4. 拮抗薬

AVPV<sub>1b</sub>R を特異的に阻害する拮抗薬として SSR149415 (SSR、Axon Medchem



B.V.、オランダ)を用いた。先行研究を参考に (Ramos *et al.*, 2006; Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002)、溶媒はジメチルスルホキシド (ナカライテスク、日本)、クレモフォール (Sigma-Aldrich、アメリカ)、0.9%生理食塩水 (大塚製薬工場、日本) を 5:5:90 の割合に調整した溶液とした。SSR 溶液の濃度は、ラットの体重あたりで投与する溶液量が全群同一になるように調整した。また、SSR の沈殿を防ぐために、ラットに投与するまで 4 °C に維持した。

## 2-5. 群分け

ラットは、SSR を 1 mg/kg (SSR1)、10 mg/kg (SSR10)、または 30 mg/kg (SSR30)、あるいは溶媒 (Vehicle) を投与される 4 群に、平均体重が等しくなるよう考慮して分けられた。

## 2-6. 走行試験

実験プロトコルを図 9 に示した。走行試験は日内変動による影響を防ぐために朝実施された。実験開始の 2 時間前からラットに絶食させ、15 分間トレッドミルに安置した。拮抗薬または溶媒の腹腔内投与は、先行研究を参考に (Ramos *et al.*, 2006; Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002; Seymour *et al.*, 2003) ストレス負荷の 30 分前に行った。その後、被験動物の平均 LT のすぐ上にあたる 21.5 m/min の速度のトレッドミル走運動を 30 分間課した。ラットの後肢をたわしで突いて走らせ、電気ショックによるストレス反応を防ぐためにレーン末端の電極による電気刺激は極力用いらないよう努めたが、必要に応じて微弱な電流で刺激し、電気ショック暴露数をカウントした。血漿 ACTH 濃度を測定するために、投与

前 (-45 分)、運動前 (0 分)、及び運動終了直前 (30 分) 時に、留置したカテーテルより 350  $\mu$ l ずつ採血され、直ちに 1.5%EDTA 溶液でコーティングしたエッペンチューブに採取し、優しく転倒混和した。運動後のストレス反応が小さい場合、その要因がラットの走行の失敗によるという懸念を排除するために、個体ごとの走行動を 2-3 人の験者がブラインド下で Dishman ら (Dishman *et al.*, 1988) に報告された 5 段階評価 (表 2 参照) を用いて評価し、平均スコアが 2.5 以下のラットは統計解析から排除した。

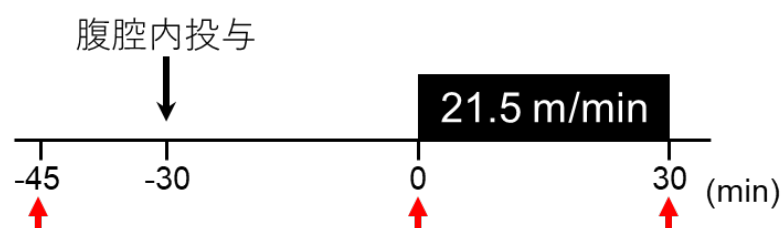


図 9. 研究課題 2 の実験プロトコル

30 分間の 21.5 m/min の運動開始 30 分前に腹腔内に拮抗薬またはその溶媒を投与した。赤矢印のポイントで 350  $\mu$ l ずつ採血した。

表 2. 走行動評価表

スコア	評価基準
5	よく走る。トレッドミルの前方に常にいる。
4	着実に走る。時々トレッドミルの後ろに落ちる。
3	走るが注意が必要。トレッドミルの後ろをたたいて走らせる。
2	走ったり止まったり。別の方向に行くことがある。
1	全く走らない。走るのを拒否する。

## 2-7. 血漿 ACTH 濃度測定

研究課題 1-1 と同様に実施した。

## 2-8. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で示した。統計ソフトには、GraphPad Prism 7.04 (MDF 社、日本) を用いた。電気ショック暴露数には 1-way ANOVA を、血漿 ACTH 濃度には繰り返しのある 2-way ANOVA を行い、事後多重比較には Bonferroni の検定を行った。効果量は Hedge の  $g$  を用いて算出した。統計的有意差は両側検定とし、有意水準は 5% とした。

## 3. 結果

### 3-1. 電気ショック暴露数

電気ショック暴露数には、統計的有意は認められなかった (表 3、 $F_{(3, 21)} = 2.669$ 、 $p = 0.0739$ )。

表 3. 研究課題 2-1 における運動中の電気ショック暴露数

Vehicle	SSR1	SSR10	SSR30
0.67±0.21	2.83±0.70	1.17±0.48	1.43±0.65

Values are mean ± SEM (n = 6-7).

### 3-2. 血漿 ACTH 濃度

血漿 ACTH 濃度の結果を図 10 に示す。時間要因は血漿 ACTH 濃度に有意な主効果が認められたが ( $F_{(2, 42)} = 158.7$ 、 $p < 0.0001$ )、投与の効果は有意傾向であった ( $F_{(3, 21)} = 2.973$ 、 $p = 0.0550$ )。投与前 (-45 分) と運動前 (0 分) では有意な変化はなかったが ( $p > 0.9999$ )、運動前と運動後 (30 分) の間には有意差が認めら

れた ( $p < 0.0001$ )。時間と投与との交互作用は認められなかった ( $F_{(6,42)} = 1.862$ ,  $p = 0.1103$ )。しかしながら、運動前後の変化量を Vehicle 群と比較した効果量は、SSR10 群及び SSR30 群で十分大きかった (SSR10、 $g = 1.24$ ; SSR30、 $g = 1.35$ ; SSR1、 $g = 0.37$ )。

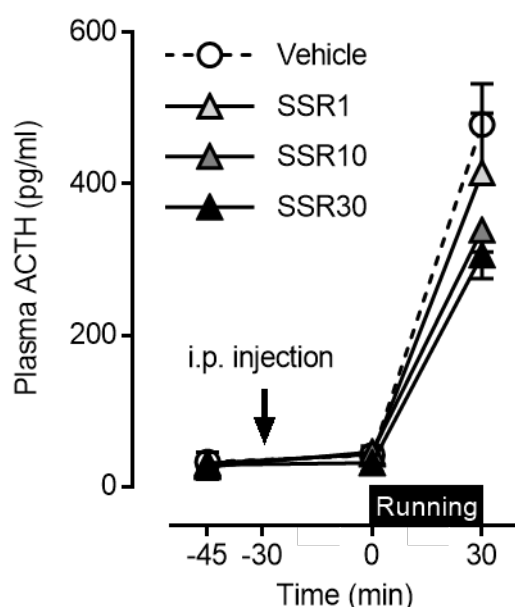


図 10. 運動ストレス時の ACTH 応答に対する SSR の容量反応

30 分間の 21.5 m/min の走運動開始 30 分前に、1 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg の SSR またはその溶媒を腹腔内に投与した。時間による主効果が認められ、運動前後で有意な差が認められた。投与の主効果と交互作用はなかった。Values are mean  $\pm$  SEM (n = 6-7).

#### 4. 考察

研究課題 2-1 は、AVP が運動時の ACTH 応答に関与するかを検証するための AVP  $V_{1b}R$  拮抗薬 SSR の有効投与量を検証することを目的とした。容量反応試験の結果、SSR の 10 または 30 mg/kg 投与が走運動誘発性 ACTH 分泌抑制に対する効果量が大きく、10 mg/kg 以上の投与量が有効である可能性が示された。

被験動物の平均 LT を基に設定した 21.5 m/min の 30 分間の走運動は、血漿 ACTH 濃度を高めたため、運動ストレスモデルとしての妥当性が示された。また、電気ショック暴露数は群間で有意な差が認められなかったことから (表 3)、ストレス反応の群間差は電気ショック暴露の影響を受けていないことが示された。本研究では、運動ストレス時の ACTH 応答を抑制する有効な SSR 投与量を 1~30 mg/kg で検討したが、統計的有意差は認められなかった (図 10)。本研究と同様にストレス負荷の 30 分前に SSR を腹腔内投与した先行研究では、ストレス負荷として AVP の静脈注射を行い、結果 3 mg/kg から ACTH 分泌の抑制効果を確認している (Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002)。純粋な AVP による ACTH 分泌に対する効果を検証した先行研究と異なり、本研究の研究対象である運動ストレス時の ACTH 分泌調節は複雑に調節されているために、低濃度を含む複数群での比較をした場合統計的有意差が出なかった可能性がある。運動ストレス時の ACTH 応答に AVP が関与しないという可能性も考えられるが、運動前後の血漿 ACTH 濃度の変化量は Vehicle 群で 436.65 pg/ml であるのに対し、SSR10 群と SSR30 群ではそれぞれ 293.07 pg/ml と 274.40 pg/ml で、Vehicle 群の 6~7 割程度に抑えられている。実際、この変化量を Vehicle 群と比較した効果量は SSR10 群と SSR30 群ではそれぞれ 1.24 と 1.35 あり、どちらも十分大きいと言える。これらのことから、SSR10 以上は運動時の ACTH 応答を AVP が調節するかどうかの検討に有用な可能性がある。

## 5. 要約

研究課題 2-1 により、SSR10 以上の投与は運動ストレス時の ACTH 応答に対する AVP の関与の検証に有効である可能性が示された。

## 第Ⅶ章 走運動ストレス時の ACTH 応答の抑制に効果的な CRH1R 拮抗薬投与量の検討（研究課題 2-2）

### 1. 目的

走運動時の ACTH 分泌に対する CRH の関与については、様々な知見がある一方強力な証拠は未だ得られておらず、論争中である。これを明らかにするには CRH が ACTH 分泌を促す機構に対し薬理的に介入することが有用であるが、CRH1R 特異的拮抗薬である CP154526 (CP) の運動ストレスに対する有効投与量は不明である。そこで研究課題 2-2 では、走運動ストレス時の ACTH 応答に対する CP の容量反応試験を実施した。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

研究課題 1-2 と同様とした。

#### 2-2. 走行学習

研究課題 1-1 と同様に実施した。

#### 2-3. 外頸静脈カテーテル留置術

研究課題 1-2 と同様に実施した。

#### 2-4. 拮抗薬

CRH1R を特異的に阻害する拮抗薬として CP154526 (CP, R&D Systems、ア

メリカ)を用いた。先行研究を参考に (Ramos *et al.*, 2006)、溶媒はジメチルスルホキシド (ナカライテスク、日本)、クレモフォール (Sigma-Aldrich、アメリカ)、0.9%生理食塩水 (大塚製薬工場、日本) を 5:5:90 の割合に調整した溶液とした。CP 溶液の濃度は、ラットの体重あたりで投与する溶液量が全群同一になるように調整した。また、CP の沈殿を防ぐために、ラットに投与するまで温かさを維持した。

## 2-5. 群分け

ラットは、CP を 1 mg/kg (CP1)、10 mg/kg (CP 10)、または 30 mg/kg (CP 30)、あるいは溶媒 (Vehicle) を投与される 4 群に、平均体重が等しくなるよう考慮して分けられた。

## 2-6. 走行試験

研究課題 2-1 と同様に実施した。

## 2-7. 血漿 ACTH 濃度測定

研究課題 1-1 と同様に実施した。

## 2-8. 統計処理

データは全て平均値±標準誤差で示した。統計ソフトには、GraphPad Prism 7.04 (MDF 社、日本) を用いた。電気ショック暴露数には 1-way ANOVA を、血漿 ACTH 濃度には繰り返しのある 2-way ANOVA を行い、事後多重比較には Bonferroni の検定を行った。統計的有意差は両側検定とし、有意水準は 5%とし



た。

### 3. 結果

#### 3-1. 電気ショック暴露数

電気ショック暴露数には、統計的有意は認められなかった（表 4、 $F_{(3, 19)} = 1.103$ 、 $p = 0.3724$ ）。

表 4. 研究課題 2-2 における運動中の電気ショック暴露数

Vehicle	CP1	CP10	CP30
3.00±1.55	2.40±0.93	2.14±0.80	0.67±0.33

Values are mean ± SEM (n = 5-7).

#### 3-2. 血漿 ACTH 濃度

CP の走運動誘発性 ACTH 応答に及ぼす影響を図 11 に示す。ACTH 分泌に対する時間の主効果が認められたが ( $F_{(2, 38)} = 106.8$ ,  $p < 0.0001$ )、投与の主効果は認められなかった ( $F_{(3, 19)} = 1.523$ ,  $p = 0.2409$ )。一方、これらの交互作用は有意だった ( $F_{(6, 38)} = 2.717$ ,  $p = 0.0270$ )。溶媒または CP の投与は全ての群で安静時の ACTH 値に影響を及ぼさなかったが ( $p > 0.05$ )、急性トレッドミル運動は ACTH 分泌を有意に高めた (Vehicle 群、CP1 群、CP10 群において  $p < 0.0001$ 、CP30 群において  $p = 0.0048$ )。CP30 群の走運動後の血漿 ACTH 濃度は Vehicle 群と比較して有意に低く ( $p = 0.0003$ )、CP1 群及び CP10 群と比較して有意傾向があった (vs. CP1 群:  $p = 0.0605$ 、vs. CP10 群:  $p = 0.0789$ )。

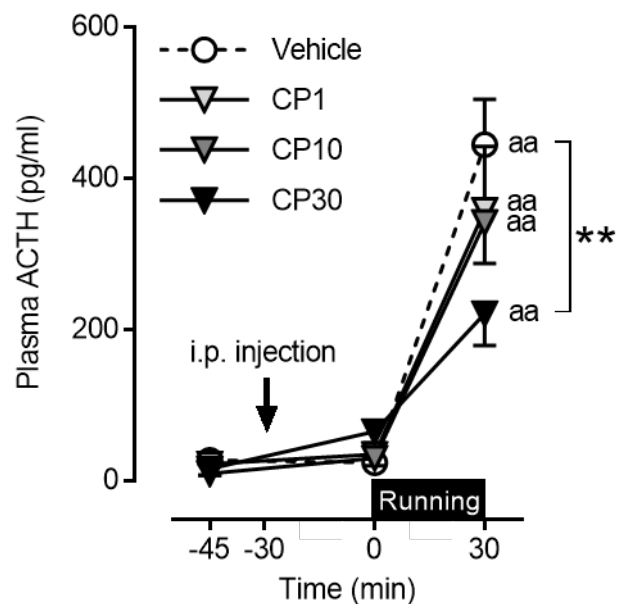


図 11. 運動ストレス時の ACTH 応答に対する CP の容量反応

30 分間の 21.5 m/min の走運動開始 30 分前に、1 mg/kg、10 mg/kg、30 mg/kg の CP またはその溶媒を腹腔内に投与した。時間による主効果と、時間と投与の交互作用が認められた。Values are mean  $\pm$  SEM (n = 5-7). aa:  $p < 0.01$  vs. 0 min. \*\*:  $p < 0.01$  vs. Vehicle.

#### 4. 考察

研究課題 2-2 では、CRH が走運動誘発性 ACTH 応答に関与するかどうかの検証のための、CRH1R 拮抗薬 CP の有効投与量を明らかにすることを目的とした。容量反応試験の結果、CP 30 mg/kg の腹腔内投与が、運動ストレス時の ACTH 応答を抑制し、最低有効投与量であることが示された。

研究課題 2-2 においても、21.5 m/min の 30 分間の走運動は、血漿 ACTH 濃度を高めたため、運動ストレスモデルとしての妥当性が示された。また、電気ショック暴露数は群間で有意な差が認められなかったことから（表 4）、本研究で得られたストレス反応の群間差は電気ショック暴露の要因を排除できる

ことが確かめられた。本研究では、運動ストレス時の ACTH 応答を抑制する有効な CP 投与量を 1~30 mg/kg で検討したところ、CP は投与量依存的に運動による ACTH 分泌を抑制し、運動ストレスでは CP 30 mg/kg で初めて有意な抑制効果を発揮することが示された (図 11)。CP の投与方法は本研究とは異なるものの、外因性 CRH による ACTH 放出を投与量依存的に抑制することが報告されており (Schulz *et al.*, 1996)、本研究は運動ストレスでも投与量依存的な抑制効果を発揮する知見を初めて示した。

## 5. 要約

研究課題 2-2 の結果から、運動ストレス誘発性 ACTH 応答を抑制する CP の最低有効投与量は 30 mg/kg であることが示された。

## 第Ⅷ章 運動誘発性 ACTH 応答制御に対する AVP と CRH の関与の検証（研究課題 2-3）

### 1. 目的

走運動ストレス時の ACTH 分泌を AVP や CRH が調節するか、くわえて両因子が協調的にそれを制御するかどうか明らかでない。これを解明するために、研究課題 2-1 及び 2-2 の結果に基づき、10 mg/kg の SSR (AVP V<sub>1b</sub>R 拮抗薬) 及び 30 mg/kg の CP (CRH1R 拮抗薬) を単独または併用投与により検証した。

### 2. 方法

#### 2-1. 被験動物および飼育条件

研究課題 1-2 と同様とした。

#### 2-2. 走行学習

研究課題 1-1 と同様に実施した。

#### 2-3. 外頸静脈カテーテル留置術

研究課題 1-2 と同様に実施した。

#### 2-4. 拮抗薬

研究課題 2-1 及び 2-2 と同様とした。

#### 2-5. 群分け

ラットは、10 mg/kg の SSR 単独投与群 (SSR 群)、30 mg/kg の CP 単独投与

群（CP 群）、SSR 10 mg/kg と CP 30 mg/kg の併用投与群（SSR+CP 群）、あるいは溶媒投与群（Vehicle 群）の 4 群に、平均体重が等しくなるよう考慮して分けられた。

## 2-6. 走行試験

研究課題 2-1 と同様に実施した。SSR+CP 群の拮抗薬の投与は、それぞれの拮抗薬をランダムかつ時間を空けずに行った。

## 2-7. 血漿 ACTH 濃度測定

研究課題 1-1 と同様に実施した。

## 2-8. 統計処理

研究課題 2-2 と同様に実施した。

# 3. 結果

## 3-1. 電気ショック暴露数

電気ショック暴露数には、統計的有意は認められなかった（表 5、 $F_{(3, 25)} = 0.7746$ 、 $p = 0.5192$ ）。

表 5. 研究課題 2-3 における運動中の電気ショック暴露数

Vehicle	SSR	CP	SSR+CP
1.56±0.50	1.57±0.37	0.86±0.52	0.83±0.48

Values are mean ± SEM (n = 6-9).

### 3-2. 血漿 ACTH 濃度

走運動時の ACTH 分泌に対する時間・投与の主効果及びこれらの交互作用は有意であった（図 12、時間:  $F_{(2, 50)} = 129.4$ 、 $p < 0.0001$ 、投与:  $F_{(3, 25)} = 12.18$ 、 $p < 0.0001$ 、交互作用:  $F_{(6, 50)} = 14.2$ 、 $p < 0.0001$ ）。投与は全ての群の安静値に影響を与えなかった ( $p > 0.05$ )。運動後の血漿 ACTH 濃度は、Vehicle 群、SSR 群、及び CP 群では運動前と比べて有意に上昇したが ( $p < 0.0001$ )、SSR+CP 群では有意な上昇は認められなかった ( $p = 0.0932$ )。運動後の血漿 ACTH 濃度は Vehicle 群と比較しいずれの拮抗薬群でも有意な低値を示した ( $p < 0.0001$ )。さらに、SSR+CP 群の運動後の血漿 ACTH 濃度はそれぞれの単独阻害群と比較しても有意な低値を示した (vs. SSR 群:  $p = 0.0024$ 、vs. CP 群:  $p = 0.0066$ )。一方、SSR 群と CP 群の間には有意な差は認められなかった ( $p > 0.9999$ )。

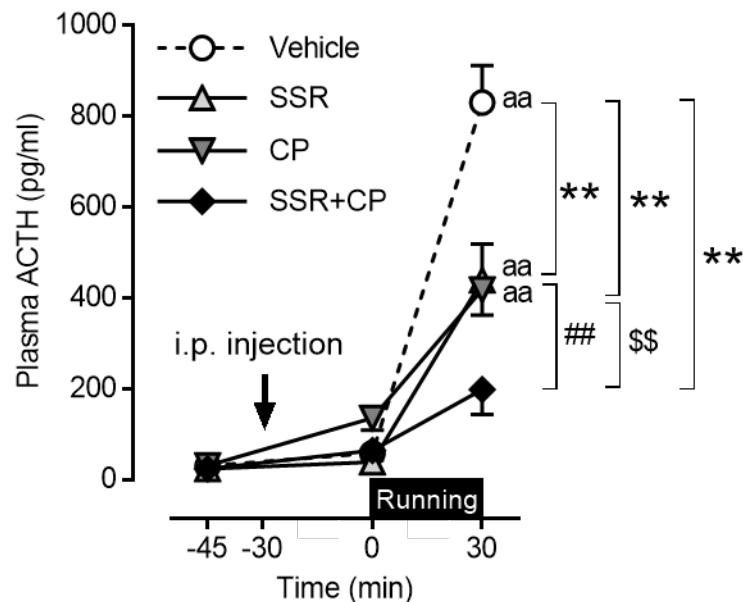


図 12. 運動時の ACTH 応答に対する SSR と CP の効果

30 分間の 21.5 m/min の走運動開始 30 分前に、SSR 10 mg/kg、CP 30 mg/kg、SSR 10 mg/kg + CP 30 mg/kg、またはその溶媒を腹腔内に投与した。時間と投与の主効果、及びそれらの交互作用が認められた。Values are mean  $\pm$  SEM (n = 6-9). aa:  $p < 0.01$  vs. 0 min. \*\*:  $p < 0.01$  vs. Vehicle. ##:  $p < 0.01$  vs. SSR. \$\$:  $p < 0.01$  vs. CP.

#### 4. 考察

研究課題 2-3 では、走運動ストレス時の ACTH 分泌を AVP や CRH が調節するかどうかを明らかにすることを目的とした。ACTH 分泌促進を仲介する AVPV<sub>1b</sub>R または CRH<sub>1</sub>R を特異的に阻害する拮抗薬である SSR と CP の単独投与は、それぞれ運動誘発性 ACTH 応答を抑制するとともに、両拮抗薬の併用投与はこの抑制をより強力とした。これにより、運動ストレス時の ACTH 応答は、AVP と CRH の両因子により調節されることが明らかとなった。

研究課題 2-3 においても、21.5 m/min の 30 分間の走運動は、Vehicle 群の血漿 ACTH 濃度を高めたため、運動ストレスモデルとしての妥当性が示された。

また、電気ショック暴露数は群間で有意な差が認められなかったことから（表 5）、本研究で得られたストレス反応の群間差は電気ショック暴露の要因を排除できることが確かめられた。

走運動ストレスで生じる ACTH 分泌は、SSR 投与により抑制されたことから、AVP が関与することが明らかとなった（図 12）。これまでに、駆け足運動中のウマの下垂体静脈血中の ACTH 及び AVP 濃度が同時に上昇したこと (Alexander *et al.*, 1991)、走運動ストレスにより、視床下部室傍核小細胞系の AVP 神経細胞が活性化したこと及び正中隆起内 AVP 含有量が減少したこと (Saito and Soya, 2004) から、走運動時の ACTH 応答を AVP が制御することが示唆されてきたが、決定的な証拠は得られていなかった。本研究は、特異的拮抗薬を用いて AVP が ACTH 分泌を促す機構を薬理的に介入することで、運動誘発性 ACTH 応答の AVP の関与を初めて明らかにした研究である。

運動ストレス時の ACTH 応答は、CP 投与により抑制されたことから、CRH による調節も受けることが明らかとなった。先行研究では、走運動で抹消血中 CRH 濃度の増加 (Inder *et al.*, 1998) や pPVN 内での *Crh* mRNA 発現量増加 (Timofeeva *et al.*, 2003)、CRH 神経細胞の活性化 (Otsuka *et al.*, 2016) 等が報告されており、CRH の運動時のストレス応答への関与の可能性が多少なりとも示されてきたものの、末梢血 CRH の由来が不明であること (Inder *et al.*, 1998) や、精神的ストレスが加わっていた可能性 (Timofeeva *et al.*, 2003)、ACTH 応答が評価されていないこと (Otsuka *et al.*, 2016) 等それぞれ問題点があり、いずれも ACTH 分泌への関与を示す証拠として乏しい。一方で運動中の下垂体静脈血中の ACTH と CRH の動態観察 (Alexander *et al.*, 1991) や CRH 受容体占有



による介入実験 (Smoak *et al.*, 1991) からは、CRH の運動時誘発性 ACTH 応答への非関与の可能性が示されていた。本研究の知見は、これらの先行研究とは一致しない。この矛盾は、運動条件の違いによると考えられる。CRH の非関与の可能性を主張した先行研究では (Alexander *et al.*, 1991; Smoak *et al.*, 1991)、合計 5 分間という短い運動を用いていたのに対し、本研究や、細胞活性や遺伝子発現等 CRH の運動に対する反応性を示した先行研究では (Inder *et al.*, 1998; Otsuka *et al.*, 2016; Timofeeva *et al.*, 2003)、30 分以上の比較的長時間の運動で検証した。*in vitro* と *in vivo* 実験により、AVP と比較して CRH による ACTH 分泌促進は開始が遅いが長時間継続することが報告されていることから (Carroll *et al.*, 2007)、CRH の非関与の可能性を示した先行研究では (Alexander *et al.*, 1991; Smoak *et al.*, 1991)、短い運動時間のために CRH による ACTH 分泌作用が生じず、一方本研究では比較的長い運動時間により ACTH 分泌に CRH が動員された可能性がある。

AVP 及び CRH それぞれの単独阻害に加え、両者の併用阻害はより顕著に運動時の ACTH 分泌を抑制することが明らかとなった。この結果は、中強度の持久運動時の ACTH 分泌調節を AVP と CRH が協調的に行うことを示唆している。AVP と CRH は、共に作用することで ACTH 分泌をより強く促進することが *in vitro* 及び *in vivo* 実験により明らかとなっている (Antoni, 1986; Carroll *et al.*, 2007; Hashimoto *et al.*, 1984; Whitnall, 1993)。ACTH の下流に位置し、副腎皮質から分泌される GC は、糖新生や脂質分解の刺激を介してエネルギー供給に貢献する (Kuo *et al.*, 2015)。これらのことから、中強度持久運動によるストレス時に AVP と CRH が協調的に作用するのは、ACTH 分泌をより効率的に促進

することで、運動遂行で高まるエネルギー需要を満たすためかもしれない。AVP と CRH を併用阻害した SSR+CP 群は 30 分間運動遂行が可能であり、先行研究でも副腎摘出したラットは中強度運動を 90 分間継続できたものの (Sellers *et al.*, 1988)、興味深いことに、副腎摘出群の運動継続時間は非摘出群より有意に短縮しており、さらに副腎摘出ラットに GC を補完することで短縮した運動継続時間は回復した (Sellers *et al.*, 1988)。これらのことから、AVP と CRH による ACTH 分泌は、その後の GC 放出を介してより長時間の運動遂行に影響を及ぼす可能性がある。

## 5. 要約

研究課題 2-3 から、AVPV<sub>1b</sub>R と CRH1R の単独及び併用阻害は中強度持久運動によるストレス時の ACTH 分泌を抑制することが明らかとなった。この知見は、AVP と CRH は協調的に中強度持久運動誘発性 ACTH 分泌を調節するという新たな仮説を導いた。

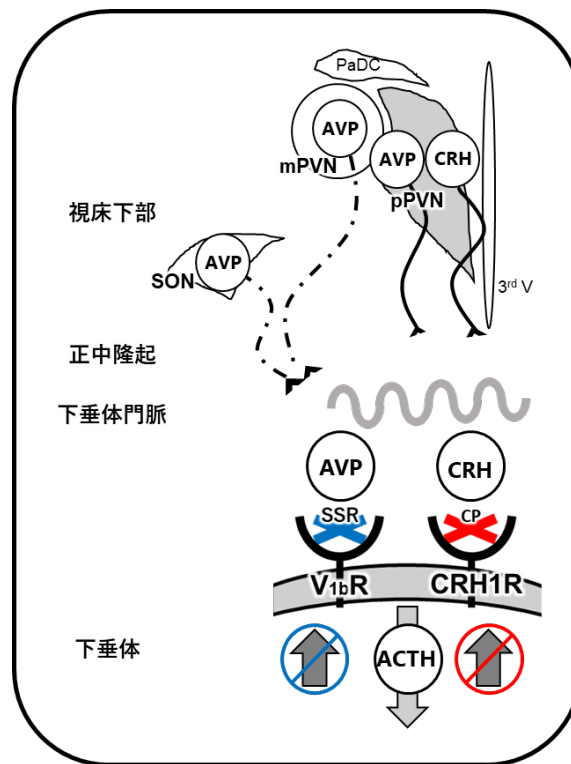


図 13. 研究課題 2 の要約図

ACTH 分泌促進を仲介する AVPV<sub>1b</sub>R と CRH<sub>1</sub>R の特異的な阻害は運動で高まる ACTH 分泌を抑制した。これは、運動ストレス時の ACTH 分泌に AVP と CRH の両因子が関与することを示す。

## 第IX章 運動ストレス時の視床下部 AVP と CRH の神経細胞活性の検証（研究課題 3）

### 1. 目的

研究課題 2-3 では、中強度持久運動誘発性 ACTH 応答は AVP と CRH 両因子が共に制御することが明らかとなった。CRH 神経細胞は視床下部室傍核小細胞系 (pPVN) に、AVP 神経細胞は pPVN 並びに視床下部の大細胞系の室傍核 (mPVN) と視索状核 (SON) に発現する (図 14)。このうち pPVN の AVP 及び CRH の神経細胞は正中隆起にそれぞれの因子を放出し下垂体の ACTH 産生細胞に作用することから、中強度持久運動によるストレス時には pPVN の AVP 及び CRH の神経細胞はどちらも活性化することが想定される。一方、mPVN と SON の AVP 神経細胞も HPA 軸活性に関与する説があり、ACTH 応答を伴う中強度持久運動時に活性化する可能性がある。そこで研究課題 3 では、免疫組織化学染色法を用いて、ストレス反応を伴う中強度持久運動時の pPVN における AVP 及び CRH の神経細胞、並びに mPVN と SON の AVP 神経細胞の活性を同個体で検証した。

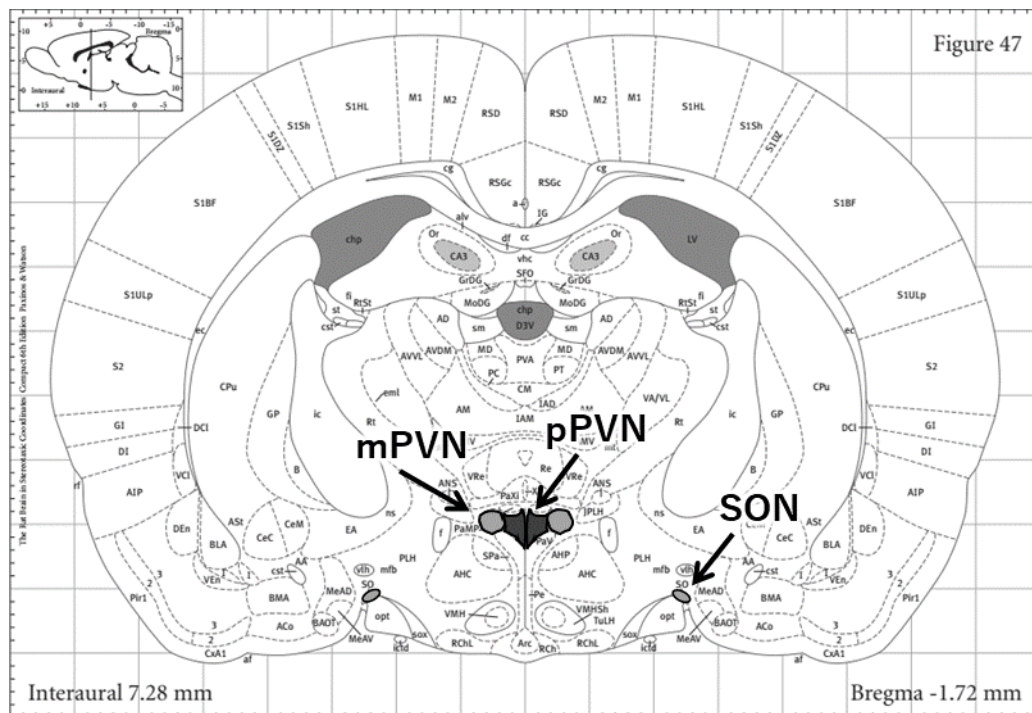


図 14. ラット脳における pPVN、mPVN 及び SON の解剖学的位置

Paxinos と Watson のラット脳地図 (Paxinos and Watson, 2009) の前額断面図（ブレグマから-1.72 mm）引用改変。黒は小細胞系領域、グレーは大細胞系領域を示す。

## 2. 方法

### 2-1. 被験動物及び飼育条件

研究課題 1-2 と同様とした。

### 2-2. 走行学習

研究課題 1-1 と同様に実施した。

### 2-3. 外頸静脈カテーテル留置術

研究課題 1-2 と同様に実施した。

## 2-4. 走行試験

実験プロトコルを図 15 に示した。走行試験は日内変動による影響を防ぐために朝実施された。実験開始の 2 時間前からラットに絶食させ、15 分間トレッドミルに安置した。その後ラットに、21.5 m/min の速度のトレッドミル走運動 (moderate-intensity exercise: ME) またはトレッドミル上での安静 (sedentary: SED) を 30 分間課した。ME 群のラットの後肢をたわしで突いて走らせ、電気ショックによるストレス反応を防ぐためにレーン末端の電極による電気刺激は極力用いらないよう努めた。血漿 ACTH 濃度を測定するために、運動前 (0 分)、及び運動終了直前 (30 分) 時に、留置したカテーテルより 350  $\mu$ l ずつ採血し、直ちに 1.5%EDTA 溶液でコーティングしたエッペンチューブに採取して優しく転倒混和した。運動後のストレス反応が小さい場合、その要因がラットの走行の失敗によるという懸念を排除するために、個体ごとの走行動を研究課題 2 同様に 2–3 人の験者がブラインド下で 5 段階のスコアで評価し、平均スコアが 2.5 以下のラットは統計解析から除外した。

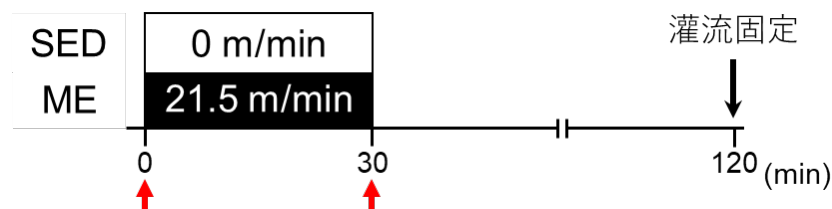


図 15. 研究課題 3 の実験プロトコル

ラットは 30 分間の運動ストレスまたはトレッドミル上での安静を課された後、運動開始から 120 分後に麻酔下で灌流固定された。赤い矢印のポイントで採血した。

## 2-5. 血漿 ACTH 濃度測定

研究課題 1-1 と同様に実施した。

## 2-6. 脳サンプル準備

免疫組織化学染色法で標的 (タンパクやペプチド) を視覚化するためには、事前に標的の構造保持のために組織を固定する必要がある。我々の研究室では既に 30 分間の走行試験終了 90 分後に最も細胞活性マーカーである c-Fos タンパクの発現が高まることを明らかにしている (Saito and Soya, 2004)。これを参考に、30 分間の走行試験終了 90 分後にラットはイソフルランでの麻酔下で、腹部を切開し、横隔膜を切断後素早く心臓を露出した。左心室から大動脈に向け留置針を挿入後、内針のみ抜きカテーテルを血管内に留置した。その後、右心房を切開し、心臓に留置したカテーテルを通じて 0.9%生理食塩水を 10 分間灌流し、全身脱血した。脱血後は同カテーテルより 0.1 M のリン酸緩衝液 (phosphate buffer: PB) で作成した 4 % パラホルムアルデヒド液 (paraformaldehyde: PFA) の 10 分間の灌流により組織を固定後、脳を摘出した。摘出した脳は 4 %PFA で 24 時間、4 °Cで後固定した後、凍結時の氷晶生成を防ぐために 4 °Cの 10–30%のスクロース溶液で徐々に脱水した。十分脱水された脳はドライアイスで凍結後、切片作成まで-80°Cで保存した。ミクロトーム (REM-710、ヤマト光機工業、日本) を用いて、SON 及び PVN を含む全脳の連続した冠状切片を 40  $\mu$ m 厚で作成した。切片は、細胞活性マーカーである c-Fos と共に、AVP または CRH 神経細胞を視覚化するために、それぞれ 80  $\mu$ m 間隔で 0.1 M PB に採取した。

## 2-7. 蛍光免疫組織化学染色

免疫組織化学染色法とは、抗原抗体反応を利用して組織上で標的とするタンパクを視覚化する手法である。免疫組織化学染色法の中でも本研究では蛍光免疫組織化学染色法を用いた。この手法は、標的タンパクに結合する一次抗体と、一次抗体に結合し蛍光物質を持つ二次抗体を用いる染色法であり、条件を整えれば複数の標的タンパクを同時に標識可能なことが特徴の一つである。本研究では、作成した脳切片に、細胞活性マーカーである c-Fos と AVP、または c-Fos と CRH の二重染色を施した。以下に染色の手順を示す。

1. 0.1 M PB で洗浄 (5 分間×2 回)
2. 2 %PB-Triton X-100 (PBT) で洗浄 (10 分間×3 回)
3. 2 %ロバ血清 (normal donkey serum: NDS) in PBT でブロッッキング (30 分間)
4. 一次抗体でインキュベーション (2 時間室温後 46 時間 4 °C 下)

マウス抗 c-Fos 抗体 (1:3000、MCA-2H2、EnCor Biotechnology、アメリカ)

ウサギ抗 AVP 抗体 (1:5000、AB1565、EMD Millipore、アメリカ)

ウサギ抗 CRH 抗体 (1:4000、T-4037、Peninsula Laboratories、アメリカ)

5. 2 %PBT で洗浄 (10 分間×3 回)
6. 二次抗体でインキュベーション (2 時間室温後 22 時間 4 °C 下)

Alexa594 ロバ抗マウス抗体 (1:500、A21203、Thermo Fisher Scientific、アメリカ)

Alexa488 ヤギ抗ウサギ抗体 (1:500、A11008、Thermo Fisher Scientific、アメリカ)



7. 2 %PBT で洗浄 (10 分間×2 回)
8. 0.1 M PB で洗浄 (5 分間×2 回)
9. ゼラチンコートしたスライドガラスへマウント、自然乾燥、カバー

## 2-8. c-Fos 発現の解析

染色した切片から、蛍光顕微鏡 (BZ-X700、キーエンス、日本) を用いて 1.0  $\mu\text{m}$  の Z スタック画像を作成した。Paxinos と Watson のラット脳地図 (Paxinos and Watson, 2009) を参照してブレグマから -0.60 mm ~ -1.72 mm の範囲の SON 及び -1.56 mm ~ -1.92 mm の範囲の PVN を同定し、c-Fos 陽性細胞数と c-Fos 及び AVP または CRH との二重標識神経細胞数を、ブラインド下でマニュアルカウントした。各脳切片の片側あたりのカウント細胞数の平均値を、ラットごとに算出した。

## 2-9. 統計処理

データは全て平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。統計ソフトには、GraphPad Prism 7.04 (MDF 社、日本) を用いた。血漿 ACTH 濃度には繰り返しのある 2-way ANOVA を行い、事後多重比較には Bonferroni の検定を行った。細胞活性には対応のない Welch の T 検定を行った。細胞活性と運動後の ACTH 値は Pearson の相関分析にかけた。統計的有意差は両側検定とし、有意水準は 5%とした。

# 3. 結果

## 3-1. 血漿 ACTH 濃度

LT 以上の中強度運動または安静時の血漿 ACTH 濃度の結果を図 16 に示す。時間と運動には有意な主効果があり (時間:  $F_{(1,8)} = 27.87$ ,  $p = 0.0007$ 、運動:  $F_{(1,8)} = 24.66$ ,  $p = 0.0011$ )、これらには有意な交互作用が認められた ( $F_{(1,8)} = 33.66$ ,  $p = 0.0004$ )。ACTH 値は運動前より運動後で有意に高まった (ME 群において、 $p = 0.0001$ 、SED 群において、 $p > 0.9999$ )。運動後の ME 群の血漿 ACTH 濃度は SED 群より有意な高値を示した ( $p < 0.0001$ )。

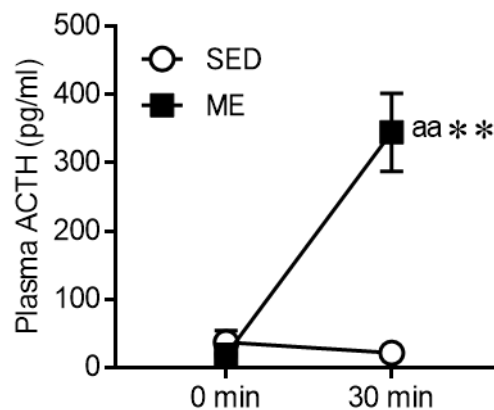


図 16. 安静または運動前後の血漿 ACTH 濃度

Values are mean  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). aa:  $p < 0.01$  vs. 0 min. \*\*:  $p < 0.01$  vs. SED.

### 3-2. AVP 及び CRH 神経細胞活性

図 17 は、ME 群または SED 群の pPVN の AVP (A) または CRH (B) の神経細胞における c-Fos 発現を示す。LT 以上の走運動は pPVN における c-Fos 発現を有意に増やした (AVP との二重染色サンプルにおいて、 $t_{(4.035)} = 6.538$ ,  $p = 0.0027$ 、CRH との二重染色サンプルにおいて、 $t_{(4.033)} = 5.576$ ,  $p = 0.0049$ )。さらに、SED 群と比較し ME 群の pPVN の c-Fos 陽性 AVP 神経細胞 ( $t_{(4.192)} =$

10.79、 $p=0.0003$ ) 及び c-Fos 陽性 CRH 神経細胞 ( $t_{(4.008)}=4.887$ 、 $p=0.0081$ ) は有意に多かった。一方、mPVN 及び SON の AVP 神経細胞も、ME 群では SED 群と比較して c-Fos 発現が有意に増加した (図 18、mPVN において、 $t_{(4.062)}=8.335$ 、 $p=0.0011$ 、SON において、 $t_{(4.006)}=10.75$ 、 $p=0.0004$ )。これらの領域の c-Fos 陽性 AVP 神経細胞もまた、ME 群では SED 群より有意に多かった (mPVN において、 $t_{(4.37)}=12.9$ 、 $p=0.0001$ 、SON において、 $t_{(4.001)}=7.776$ 、 $p=0.0015$ )。

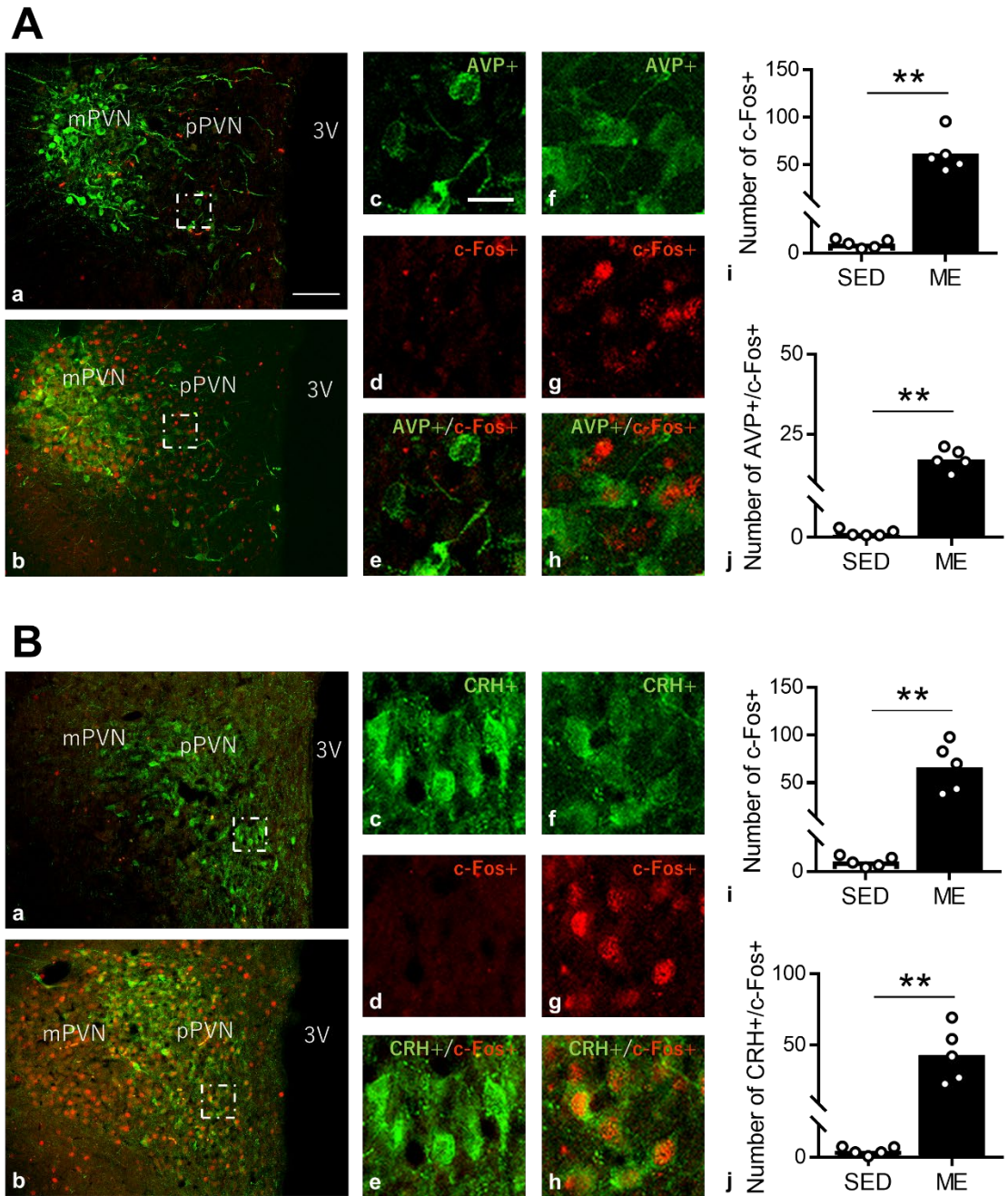


図 17. 運動ストレス後の pPVN の AVP (A) 及び CRH (B) の神経細胞活性

画像 a 及び c-e は SED 群、b 及び f-h は ME 群の c-Fos (赤) 及び AVP 神経細胞 (A、緑) または CRH 神経細胞 (B、緑) を示す。グラフ i は、pPVN 内の c-Fos 数、j は c-Fos 陽性 AVP 神経細胞数 (A) または c-Fos 陽性 CRH 神経細胞数 (B) を示す。3V: 第三脳室, pPVN: 視床下部室傍核小細胞系, mPVN: 視床下部室傍核大細胞系. 画像 a、b のスケールバー: 100  $\mu$ m、画像 c-h のスケールバー: 20  $\mu$ m. \*\*:  $p < 0.01$  vs. SED ( $n = 5$ ).

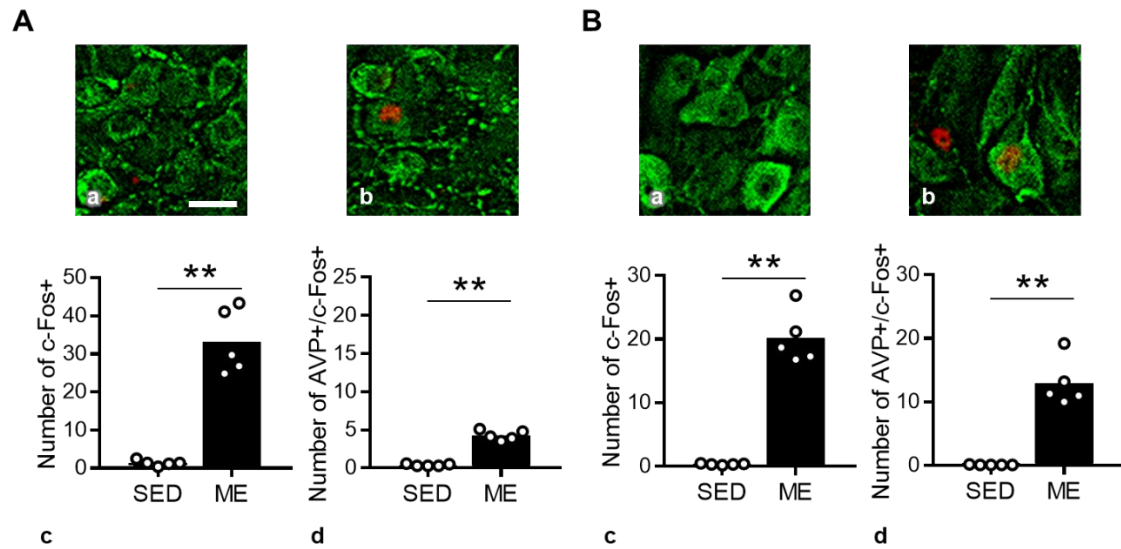
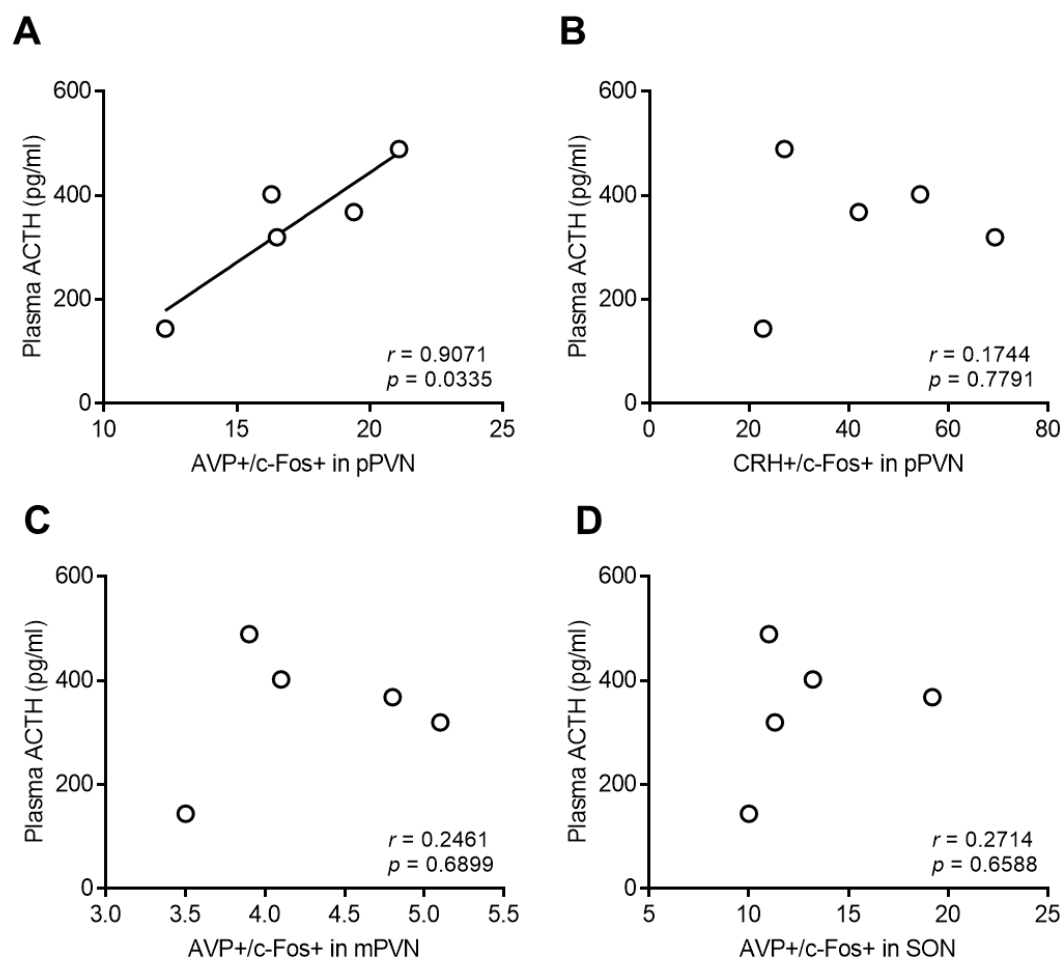


図 18. 運動ストレス後の mPVN (A) 及び SON (B) の AVP 神経細胞活性

画像 a は SED 群、b は ME 群の c-Fos (赤) 及び AVP 神経細胞 (緑) を示す。グラフ c は mPVN 内 (A) または SON 内 (B) の c-Fos 数、d は mPVN 内 (A) または SON 内 (B) の c-Fos 陽性 AVP 神経細胞数を示す。スケールバー: 20  $\mu$ m. \*\*:  $p < 0.01$  vs. SED ( $n = 5$ ).

### 3-3. 運動誘発性神経細胞活性と ACTH 濃度の相関関係

走運動ストレス後の血漿 ACTH 濃度は、pPVN の AVP 神経細胞活性と有意な強い相関関係が認められた (図 19A、 $r = 0.9071$ 、 $p = 0.0335$ )。一方、走運動ストレス誘発性 ACTH 値と、pPVN の CRH 神経細胞活性 (図 19B、 $r = 0.1744$ 、 $p = 0.7791$ )、mPVN の AVP 神経細胞活性 (図 19C、 $r = 0.2461$ 、 $p = 0.6899$ )、及び SON の AVP 神経細胞活性 (図 19D、 $r = 0.2714$ 、 $p = 0.6588$ ) との間には有意な相関関係は認められなかった。



**図 19. 視床下部各垂領域における AVP 及び CRH 神経細胞活性と運動後の ACTH の関係**  
 独立変数に運動ストレス後の pPVN の AVP 神経細胞 (A)、CRH 神経細胞 (B)、mPVN の AVP 神経細胞 (C)、または SON の AVP 神経細胞 (D) の活性数、従属変数に血漿 ACTH 濃度をとった。

#### 4. 考察

研究課題 3 では、ストレス反応を伴う中強度持久運動は pPVN の AVP 及び CRH 神経細胞を共に有意に活性化させるという仮説を検証した。その結果、仮説通り、ACTH 分泌を伴う中強度持久運動はこれらの神経細胞をどちらも活性化させた。この結果は、走運動 ACTH 応答に AVP と CRH の両者が関与する可

能性を支持するものである。

ACTH 分泌を伴う走運動では、pPVN の AVP 神経細胞を活性化させることが既に報告されており (Saito and Soya, 2004)、研究課題 3 で得られた走運動ストレス時の pPVN における AVP 神経細胞活性化 (図 17A) は先行研究を支持する結果である。一方、走運動時の pPVN 内 CRH 神経細胞活性が報告された先行研究では ACTH 応答を評価しておらず (Otsuka *et al.*, 2016)、運動ストレス下での CRH 細胞の活性化を明確に示したのは本研究が初めてである (図 17B)。さらに、走運動ストレスが同一個体の AVP と CRH の pPVN 内神経細胞を共に活性化させた報告はこれまでにない。pPVN の神経細胞は正中隆起外層に投射し、そのペプチドは下垂体前葉へと到達するため (Aguilera, 2011; Whitnall, 1993)、本知見は、AVP と CRH が共に走運動時のストレス反応に関与する可能性を示すものである。実際、運動ストレス後の血漿 ACTH 濃度と pPVN の AVP 神経細胞活性との間には有意な正の相関関係が認められた (図 19A)。一方で CRH 神経細胞活性との間に相関関係が見られなかったのは (図 19B)、CRH による ACTH 分泌促進作用は開始が遅いため (Carroll *et al.*, 2007)、CRH の活性レベルは運動開始 30 分後の血漿 ACTH 濃度には十分反映されなかった可能性がある。より長時間の運動後の血漿 ACTH 濃度との間には有意な正の相関関係が認められるかもしれない。

また、大細胞系である mPVN や SON における AVP 神経細胞も運動ストレスにより有意に活性化した (図 18)。mPVN や SON は血漿浸透圧に反応性のある領域であり、本研究と同様の運動ストレスモデルを用いた先行研究においては血漿浸透圧の上昇と、SON の AVP 神経細胞の活性化が確認されている

(Saito and Soya, 2004)。本研究では血漿浸透圧を評価していないが、SON 以上に血漿浸透圧に対する反応性の閾値が高い mPVN も活性化していることから、本研究のモデルにおいても血漿浸透圧が上昇したものと想定される。これらの領域の神経細胞は、正中隆起の内層を通過して下垂体後葉に軸索を伸ばし、ホルモンを末梢へ放出して血漿浸透圧の調整等の役割を果たす (Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000; Gibbs, 1986; Holmes *et al.*, 1986; Swanson and Kuypers, 1980)。しかし大細胞系を由来とするホルモンの一部は下垂体前葉に作用するという仮説もあり (Antoni, 1993; Buma and Nieuwenhuys, 1987; Gibbs, 1986; Whitnall, 1993)、mPVN や SON 由来の AVP は運動ストレス時の ACTH 応答調節に寄与する可能性も否めない。これらの仮説は、ニューロンの投射先や投射元を同定できるトレーサーや、特定のニューロンの人工的な制御が可能なシステム (DREADD; Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs) を用いることで明らかにすることができるだろう。

## 5. 要約

研究課題 3 の結果から、視床下部の AVP と CRH の神経細胞はストレス反応を伴う中強度持久運動によりどちらも活性化することが明らかとなった。これらの知見は、中強度持久運動時のストレス反応に AVP と CRH の両者が関与する可能性を支持する。



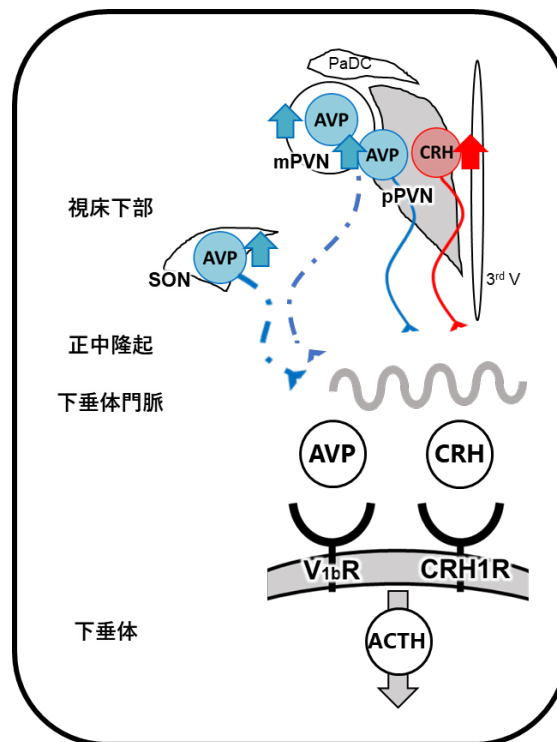


図 20. 研究課題 3 の要約図

ACTH 分泌を伴う中強度持久運動では、pPVN の AVP 及び CRH 神経細胞を活性化させた。これは、視床下部 AVP と CRH が共に走運動時のストレス反応に関与する可能性を示す。さらに、mPVN と SON の AVP 神経細胞も ACTH 分泌を伴う中強度持久運動により活性化した。これらの神経細胞が下垂体の ACTH 産生細胞に作用するかどうかは論争が続いている。

## 第X章 総合討論

ストレス条件により視床下部の ACTH 分泌調節機構が異なることが知られており (Antoni, 1986; Pacak and Palkovits, 2001; Ramos *et al.*, 2006; Spiga *et al.*, 2009)、運動ストレスにも特異的な視床下部調節機構があると想定されるが、未だ不明である。これまでにいくつかの先行研究から運動時のストレス反応調節への AVP の関与は有力視される一方 (Alexander *et al.*, 1991; Inder *et al.*, 1998; Saito and Soya, 2004)、CRH の関与は論争状態であり (Alexander *et al.*, 1991; Inder *et al.*, 1998; Otsuka *et al.*, 2016; Smoak *et al.*, 1991; Timofeeva *et al.*, 2003)、さらにどちらの視床下部因子の関与についても決定的な証拠は得られていなかった。ヒトへの還元を見据えてこれらを明らかにするには、ヒトの生理応答を模倣するラット運動ストレスモデルを用いて、AVP や CRH それぞれの ACTH 分泌作用機序に薬理的に介入することが有益である。

以上のことから本研究では、運動ストレス時の ACTH 分泌を少なくとも AVP が、さらに CRH も調節する可能性を想定した。この仮説を検証するために、まずヒトへの外挿を見据え、ヒトの運動強度依存的な代謝・ストレス応答を模倣する妥当性の高いラットの走運動モデルを確立し (研究課題 1)、続いて拮抗薬を用いて運動誘発性 ACTH 応答調節への AVP と CRH の関与を検証した (研究課題 2)。さらに、視床下部の AVP 及び CRH の神経細胞が運動ストレスで活性化するかどうかを検証した (研究課題 3)。

ヒトでもげっ歯類でも、LT 以上の強度でストレス指標である ACTH 分泌の顕著な上昇が見られることが明らかとなっている (Farrell *et al.*, 1983; Luger *et al.*,

1987; Ohiwa *et al.*, 2007; Rahkila *et al.*, 1988; Saito and Soya, 2004; Soya, 2001; Soya *et al.*, 2007)。そのため、ヒトの運動時の代謝・ストレス応答を模倣するげっ歯類のモデルを用いることで、ヒトでの検証が困難な課題に取り組むことが可能となる。しかし実験動物として広く用いられている Wistar ラットは、繁殖・飼育されてきたブリーダー、すなわちストックの違いにより、遺伝的構成や血液成分、認知機能、及び薬物に対する生理的反応性が異なることが報告されていることから (Hirate *et al.*, 1988; Hirate *et al.*, 1989; Kampfmann *et al.*, 2012; Yamada *et al.*, 1979)、運動に対する生理的反応性も異なる可能性が考えられた。そこで、我々が確立してきた実験条件下において Wistar ラットの4つのストック間で運動時の生理応答を比較し、血中乳酸値が高まる強度を境に血糖値・血漿 ACTH 濃度も上昇するヒトモデルを再現できるストックの選定を行った。その結果、一般名が同じ Wistar ラットでもストックにより運動時の生理応答が異なり、Crj:WI のみが本研究の実験条件下で運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣した(研究課題 1-1)。この動物の血中乳酸動態は安定した低値から急激な上昇を示し、その平均 LT は 19.8 m/min であることが示された(研究課題 1-2)。LT を少し超える強度である 21.5 m/min の走運動は血漿 ACTH 濃度を高めたため(研究課題 2、3) ヒトを模倣するラットの運動ストレスモデルとして妥当であると言える。

本研究では、ラットの走運動ストレスモデルを用いて、運動時のストレス反応制御機構を検証した。ストレス反応の指標である下垂体からの ACTH 分泌は CRH をはじめとする視床下部因子により制御される。運動ストレス時には、同じく ACTH 分泌促進能を有する視床下部因子 AVP と ACTH の下垂体静脈血中濃度が正の相関を示すこと (Alexander *et al.*, 1991)、視床下部室傍核

(pPVN) の AVP 神経細胞が活性化し、さらに正中隆起の AVP 含有量が低下すること (Saito and Soya, 2004) などから、AVP が ACTH 分泌を調節する可能性が高い。一方、運動ストレス時に下垂体静脈血中の CRH 濃度に変化がないことや (Alexander *et al.*, 1991)、CRH による作用機序への薬理的介入が ACTH 分泌に影響を及ぼさないことから (Smoak *et al.*, 1991)、CRH は運動ストレス時の ACTH 分泌調節に関与しないことが考えられる。しかし、運動による ACTH 応答との関連性は不明だが PVN の CRH 遺伝子や神経細胞の活性化等も報告されており (Otsuka *et al.*, 2016; Timofeeva *et al.*, 2003)、CRH が関与する可能性も否めない。

以上を検証すべく、研究課題 2 では、ACTH 分泌を仲介する AVPV<sub>1b</sub> 受容体 (AVPV<sub>1b</sub>R) 及び CRH 1 型受容体 (CRH1R) の拮抗薬の投与が運動時の ACTH 分泌を抑制するかどうかを検証した。研究課題 2-1 では、AVPV<sub>1b</sub>R の特異的拮抗薬である SSR149415 (SSR) は運動誘発性 ACTH 分泌の有意な抑制に失敗したが、効果が期待された投与量を用いた研究課題 2-3 では、SSR 単独投与が運動で高まる ACTH 分泌を有意に抑制することを見出した。これは、AVP が運動時の ACTH 分泌を調節することを示す初めての明らかな証拠であり、運動ストレス時の AVP 動態を観察した先行研究に支持される結果である (Alexander *et al.*, 1991; Inder *et al.*, 1998; Saito and Soya, 2004)。さらに、研究課題 3 では pPVN の AVP 神経細胞の活性化のみならず、この活性化と ACTH 分泌の間の正の相関関係が認められており、運動時の ACTH 分泌の AVP による制御は強く裏付けられた。一方、研究課題 2-2 及び 2-3 で CRH1R の特異的拮抗薬である CP154526 (CP) は運動後の血漿 ACTH 濃度上昇抑制に成功し、

CRH が運動誘発性 ACTH 分泌応答を制御することが初めて示された。さらに、ACTH 分泌を伴う運動による pPVN の CRH 神経細胞の活性化もこれを支持する (研究課題 3)。これだけでなく、AVP V<sub>1b</sub>R と CRH1R 両者の同時阻害は、運動ストレスで高まる ACTH 応答を単独阻害よりさらに顕著に抑制した (研究課題 2-3)。この結果は、AVP と CRH は協調的に運動時の ACTH 分泌を調節しているというこれまでにない新たな仮説を導く。この仮説は、pPVN の AVP 及び CRH 神経細胞の活性が同一個体で確認されたことから支持されるものである (研究課題 3)。

AVP と CRH は共に作用することで互いのセカンドシグナリングを増強し (Giguere and Labrie, 1982; Murat *et al.*, 2012)、ACTH 分泌能をより強めることが明らかとなっている (Abou-Samra *et al.*, 1987; Antoni, 1986; Hashimoto *et al.*, 1984)。運動ストレスでは AVP と CRH が協調することで、効率的な ACTH 分泌を促進するのかもしれない。それでは、AVP と CRH それぞれに特化した役割は何だろうか? *in vitro* 及び *in vivo* の先行研究では、AVP は ACTH 分泌に至る作用時間が早い、CRH は遅く、長く続くことが報告されている (Carroll *et al.*, 2007)。このことから、運動ストレスにおいても、運動開始すぐには AVP が素早く ACTH 分泌を促進し、運動開始からある程度の時間が経過してから CRH による ACTH 分泌が促進されるのかもしれない。確かに、運動ストレスへの CRH の関与に肯定的な結果を示した本研究や先行研究では (Inder *et al.*, 1998; Otsuka *et al.*, 2016; Timofeeva *et al.*, 2003)、運動継続時間が 30 分以上で比較的長く、一方否定的な結果を示した先行研究では (Alexander *et al.*, 1991; Smoak *et al.*, 1991)、合計 5 分程度と短い運動で検証している。運動ストレス時の ACTH 応

答に AVP が重要な役割を果たすという仮説がこれまで強く支持されてきたのは AVP が運動時間に関わらず作用するからであると考えられ、運動継続時間が長くなると CRH も作用し、両因子が協調的な ACTH 分泌調節を行う可能性がある。さらに、CRH による ACTH 分泌促進作用の開始が遅いことは、研究課題 3 において、CRH 神経細胞活性と ACTH 応答との間に相関関係が見られなかったことを説明するかもしれない。本研究における症例数は少ないため 30 分間の運動ストレス時の CRH 神経細胞活性と ACTH 応答の関係性に関しては再現性の確認が必要ではあるが、より長時間にわたる運動であれば相関関係が認められる可能性も考えられる。また、HPA 軸制御の他に、AVP は血漿浸透圧や血圧の調節 (Bourque *et al.*, 1994; Serradeil-Le Gal C. *et al.*, 2002)、CRH は呼吸や脳血流調節、ストレス誘発性鎮痛等の中枢作用も示す (Bao *et al.*, 2008; De Michele *et al.*, 2005; Lariviere and Melzack, 2000)。これらの作用は全身性ストレスである運動ストレスにとって重要な反応と考えられ、運動ストレス時に AVP と CRH 両因子が作用する意義や運動ストレスの特異性は、このような点にあるのかもしれない。

それでは、本研究で検討した 30 分間の走運動ストレスにおける AVP と CRH の貢献度はどの程度だろうか？ SSR の容量反応試験では SSR の有効量の可能性を示したに過ぎないが、運動誘発性 ACTH 応答は 10 mg/kg と 30 mg/kg の投与量でほぼプラトーに達していると考えられ (研究課題 2-1)、研究課題 2-3 で用いた投与量は最大効果量であった可能性がある。一方研究課題 2-2 における CP の容量反応試験では統計的に 30 mg/kg の有効性は示されたが、本研究内ではプラトーは出現せず、研究課題 2-3 で用いた投与量が最大効果量であったか

どうかは不明である。これにくわえ、運動の時間フェーズにより AVP と CRH の貢献が異なる可能性もある。そのため、本研究から両因子の貢献の度合いを検証することは難しい。さらに、研究課題 2-3 における AVP と CRH の両阻害群では、統計的には運動による ACTH 応答が消失したものの、血漿 ACTH 濃度の絶対値は運動前に比べ運動後で高値となった。そのためオキシトシンやアンジオテンシン II といった、他の ACTH 分泌促進因子が関与する可能性は残されたままである。SSR と CP 互いに最大効果量を用いて、運動中いくつかの時間帯で ACTH 応答を評価することで、それぞれの貢献についてより詳細な検証ができると考えられ、今後の課題である。

本研究では、大細胞系である mPVN や SON における AVP 神経細胞も運動ストレスにより有意に活性化した (図 18)。一般的には大細胞系領域由来のホルモンは末梢に作用すると考えられている (Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000; Gibbs, 1986; Holmes *et al.*, 1986; Swanson and Kuypers, 1980)。特にこの領域の AVP 神経細胞は血漿浸透圧上昇時に反応し、利尿の調節に貢献する (Bourque *et al.*, 1994; Koshimizu *et al.*, 2012; Maybauer *et al.*, 2008)。本研究では血漿浸透圧を評価していないが、SON にくわえ、より浸透圧に対する感受性の閾値が高い mPVN の AVP 神経細胞も活性化したことから、本研究の運動ストレスでも血漿浸透圧が上昇したと推測される。それでは、運動ストレスでの大細胞系 AVP 神経細胞活性化の目的は、末梢での利尿(血漿浸透圧)調節のみののだろうか？興味深いことに、大細胞系の神経細胞は、末梢のみならず下垂体前葉に放出するとの説がある。その一つは、下垂体後葉に投射する大細胞系ニューロンは正中隆起内層において AVP を開口分泌することが観察されたことから、傍分泌

により下垂体前葉に作用するというものである (Antoni, 1993; Buma and Nieuwenhuys, 1987)。しかし、大細胞系由来の AVP は単に ACTH 分泌を促進するわけではないかもしれない。HPA 軸に備わっている GC による負のフィードバックシステムは、ストレス反応を収束させ過剰亢進を防ぐ。大細胞系由来のホルモンは、このシステムを抑制しストレス反応の収束を防ぐという特別な手段で ACTH 分泌促進に貢献することが示唆されている (Antoni, 2020)。例えば出血や敗血漿、高強度運動などでは、GC の負のフィードバックが効かず、大細胞系 AVP 神経細胞の活性化や大細胞系 AVP が産生するインターロイキン 6 の増加が報告されている (Antoni, 2020; Deuster *et al.*, 1998; Thrivikraman *et al.*, 2000)。一方で精神的なストレスであるエアープフストレスでは GC の負のフィードバックは正常に作用するとともに大細胞系 AVP 神経細胞の活性化が見られない (Thrivikraman *et al.*, 2000)。これらのことから、生命や生体の機能維持のためにストレス反応を継続する必要性のある強いストレス時には大細胞系の AVP がストレス反応の収束を阻害することで HPA 軸の亢進に寄与している可能性がある。本研究の検証対象であった中強度運動では、AVP 大細胞系ニューロンの活性化が見られたことから、中強度運動時にもストレス反応の継続の必要性に応じて大細胞系由来 AVP が ACTH 応答に貢献する可能性が考えられ、デキサメタゾン抑制試験により明らかにすることができるかもしれない。

以上のように本研究では、ヒトの運動時の血中乳酸、血糖及び ACTH 応答を模倣する Wistar ラットのストック (CrIj:WI) を用いて、30 分間の LT 以上の走運動ストレス時の ACTH 分泌は、視床下部 AVP と CRH の二重調節を受けること、及び AVP と CRH の視床下部神経細胞が共に活性化することが明らか



となった。一方で、運動時 ACTH 応答の調節機構に関する本研究成果は、研究課題 1 から考えられるように、ストックにより異なる可能性がある。また、本研究で用いたラット運動ストレスモデルが、運動時の血中乳酸値や血糖値、並びに ACTH 応答以外について必ずしもヒトを模倣しているとは限らない。これらのような限界点は、全ての実験科学において共通すると考えられる。最低限ヒトのモデルとなる点を明確にしたうえで動物実験を行い、その他の点も随時ヒトのデータと比較しながら検証し続けることで、動物とヒトとの間の普遍的な真実の解明に近づくと期待される。

本研究課題と成果は、社会的にどのような意義があるだろうか。わが国では健康長寿社会を実現するためにスポーツライフの定着を推進していると共に、生活習慣病をはじめとする様々な疾患において治療として運動を処方するなど、運動の健康効果が広く認められている。しかしながら、運動が生体に及ぼす作用については未だ十分な解明に至っていない。本研究の成果は、一過性の中強度持久運動が視床下部を介してストレス反応を引き起こす機序の一端の解明に過ぎないが、今後の様々な発展の可能性を秘めている。例えば、習慣的な運動の健康増進効果の機序解明や、オーバートレーニングによるストレス関連疾患の病因の解明などである。運動ストレスは適応効果により心身に有益な効果をもたらす一方、ストレス負荷が過度となると健康を害する二面性を有する。特に慢性ストレスでは CRH や AVP のバランスが崩れるなど、視床下部におけるストレス反応調節機構の異常が生じる (Aguilera and Rabadan-Diehl, 2000)。運動ストレスにおいては、一過性での AVP や CRH による調節が、ストレス適応により健康増進効果をもたらす時、あるいはストレス不適応により健

康害をもたらす時に、どのように変化するのか、今後明らかにすべきと考える。  
 それにより将来的には、運動の健康効果を効率的に引き出す適切な運動手法の  
 提案や、オーバートレーニングを回避したアスリートのトレーニング方法の開  
 発に繋がると期待される。

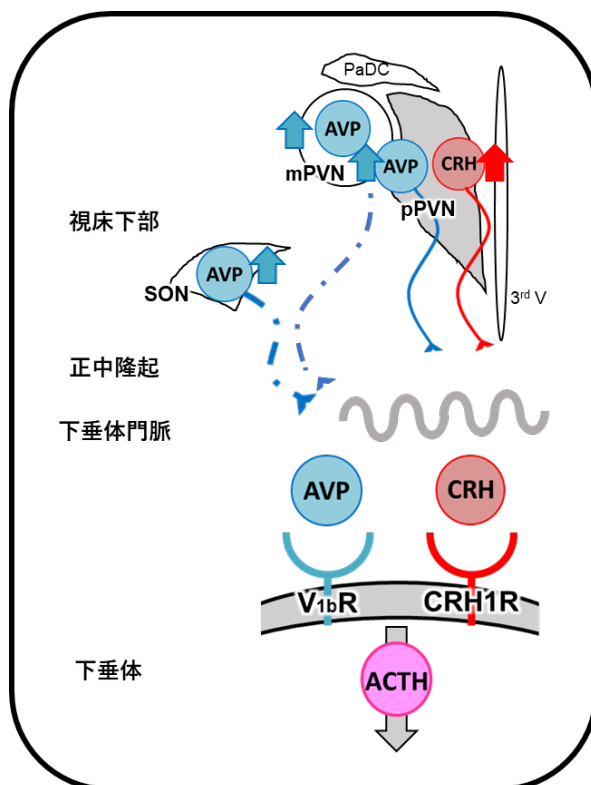


図 21. 本研究のまとめ

本研究の結果から、LT を超える中強度持久運動で生じる ACTH 応答は、AVP と CRH の両視床  
 下部因子が促進的な調節をすることが明らかとなった。この運動ストレス時には、pPVN の AVP  
 と CRH の神経細胞に加え、大細胞系である mPVN と SON の AVP 神経細胞も活性化し、中強度  
 持久運動時 ACTH 応答への関与の可能性が示された。

## 第XI章 総括と結論

本研究では、ヒトへの還元を見据えたラット走運動モデルを用いて、LT を越える中強度運動時のストレス反応を視床下部 AVP 及び CRH が調節するかどうかを明らかにすることを目的とした。これを達成するために、まずラット走運動モデルの被験動物として適した Wistar ラットのストックを選定し、選定されたストックの LT を算出した（研究課題 1）。続いてラット走運動モデルと ACTH 分泌促進を仲介する受容体である AVPV<sub>1b</sub> 受容体 (AVPV<sub>1b</sub>R) 及び CRH 1 型受容体 (CRH1R) それぞれに特異的な拮抗薬を用いて、AVP や CRH が運動時の ACTH 分泌に及ぼす効果を検証した（研究課題 2）。さらに、視床下部 AVP 及び CRH 神経細胞が運動ストレス時に活性化するかどうかを検証した（研究課題 3）。

研究課題 1：運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣するラット走運動モデルの確立

1) 研究課題 1-1: 運動時のヒトの代謝・ストレス応答を模倣する Wistar ラットのストックの選定

3つの強度のトレッドミル走行試験時の生理応答（血中乳酸値、血糖値、血漿 ACTH 濃度）は Wistar ラットの 4つのストック間で異なり、唯一 Crlj:WI は、3つ全ての生理応答がヒト同様に運動強度依存的に高まった。以上の結果から、Crlj:WI は本研究デザイン下でヒト同様の運動強度依存的な生理応答を示す Wistar ラットのストックであることが示された。

## 2) 研究課題 1-2: LT の算出

CrIj:WI にもヒト同様 LT の存在が確認され、その平均は 19.8 m/min であった。以降の研究課題では、ACTH 分泌を惹起する中強度のトレッドミル運動として、この結果を基準とした走速度を用いることで、運動時のヒトの生理応答を模倣する妥当性の高いラット走運動モデルを確立した。

## 研究課題 2: 運動時の ACTH 分泌を調節する視床下部因子の解明

### 1) 研究課題 2-1: 走運動ストレス時の ACTH 応答の抑制に効果的な $V_{1b}R$ 拮抗薬投与量の検討

LT を超える中強度走運動として設定した 21.5 m/min の 30 分間のトレッドミル走運動は血漿 ACTH 濃度を高めた。AVPV<sub>1b</sub> 受容体拮抗薬 SSR149415 (SSR) の 10 mg/kg および 30 mg/kg の投与は運動前後の血漿 ACTH 濃度の変化量を対照群の 6～7 割に抑え、その効果量はそれぞれ 1.24 及び 1.35 であった。以上の結果から、SSR の 10 mg/kg 以上の投与は運動時の ACTH 応答に対する AVP の効果の検証に有用な可能性が示された。

### 2) 研究課題 2-2: 走運動ストレス時の ACTH 応答の抑制に効果的な CRH1R 拮抗薬投与量の検討

CRH1R 拮抗薬 CP154526 (CP) は投与量依存的に運動で高まる ACTH 濃度を抑制し、その効果は 30 mg/kg で得られた。以上の結果から、CP の 30 mg/kg の投与は運動時の ACTH 応答に対する CRH の効果の検証に有用であることが示された。

### 3) 研究課題 2-3: 運動誘発性 ACTH 応答制御に対する AVP と CRH の関与の検証

走運動ストレス前の SSR 10 mg/kg 及び CP 30 mg/kg の単独投与は、運動で上昇する血漿 ACTH 濃度を有意に抑制した。これらの併用投与は LT 以上の運動時の有意な ACTH 分泌を生じさせず、運動後のその値は対照群のみならず各単独投与群と比較しても低値だった。以上の結果から、中強度持久運動時には AVP と CRH が協調的に作用し ACTH 分泌を促進するという新たな仮説が生まれた。

### 研究課題 3: 運動ストレス時の視床下部 AVP と CRH の神経細胞活性の検証

血漿 ACTH 濃度が上昇する LT 以上の走運動は視床下部室傍核小細胞系 (pPVN) の AVP 神経細胞及び CRH 神経細胞のどちらも活性化させた。pPVN の AVP 神経細胞活性は運動ストレス後の ACTH 濃度との間に正の相関関係が認められた。以上の結果は、中強度持久運動時の ACTH 分泌調節に視床下部 AVP と CRH の両因子が関与する可能性を裏付けた。

### 【結論】

ラット走運動ストレスモデルを用いて、中強度持久運動時の ACTH 応答は、視床下部 AVP と CRH の両因子が促進的に制御することが明らかとなった。この知見はヒトにおいても適用できる可能性がある。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導とご高閲を賜りました、主査の征矢英昭教授に深く感謝の意を表します。また、ご多忙の中、副査をお引き受けくださいました、大森肇教授、麻見直美准教授、並びに東京都立大学の北一郎教授にも、貴重なご指導とご助言を賜りましたこと、深く感謝いたします。さらに、適宜ご助言と実験のご協力をしていただきました岡本正洋助教、柴藤淳子氏、島孟留氏、征矢茉莉子氏をはじめ、征矢研究室の皆様にご心からお礼申し上げます。最後に、本研究の糧となった全ての実験動物に対し、深い感謝と哀悼の意を表します。

## 引用文献

- Abou-Samra AB, Harwood JP, Manganiello VC, Catt KJ, Aguilera G.** Phorbol 12-myristate 13-acetate and vasopressin potentiate the effect of corticotropin-releasing factor on cyclic AMP production in rat anterior pituitary cells. Mechanisms of action. *The Journal of biological chemistry* 262:1129-36, 1987.
- Aguilera G.** Corticotropin releasing hormone, receptor regulation and the stress response. *Trends Endocrinol Metab* 9:329-36, 1998.
- Aguilera G.** Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by neuropeptides. *Horm Mol Biol Clin Investig* 7:327-36, 2011.
- Aguilera G, Harwood JP, Wilson JX, Morell J, Brown JH, Catt KJ.** Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J Biol Chem* 258:8039-45, 1983.
- Aguilera G, Liu Y.** The molecular physiology of CRH neurons. *Front Neuroendocrinol* 33:67-84, 2012.
- Aguilera G, Nikodemova M, Wynn PC, Catt KJ.** Corticotropin releasing hormone receptors: two decades later. *Peptides* 25:319-29, 2004.
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C.** Regulation of vasopressin V1b receptors in the anterior pituitary gland of the rat. *Exp Physiol* 85 Spec No:19S-26S, 2000.
- Aguilera G, Rabadan-Diehl C.** Vasopressinergic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. *Regul Pept* 96:23-9, 2000.
- Aguilera G, Subburaju S, Young S, Chen J.** The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *Prog Brain Res* 170:29-39, 2008.
- Alexander SL, Irvine CH, Ellis MJ, Donald RA.** The effect of acute exercise on the secretion of corticotropin-releasing factor, arginine vasopressin, and adrenocorticotropin as measured in pituitary venous blood from the horse. *Endocrinology* 128:65-72, 1991.
- Antoni FA.** Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev* 7:351-78, 1986.
- Antoni FA.** Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes of age. *Front Neuroendocrinol* 14:76-122, 1993.
- Antoni FA.** New paradigms in cAMP signalling. *Mol Cell Endocrinol* 353:3-9, 2012.
- Antoni FA.** Magnocellular Vasopressin and the Mechanism of "Glucocorticoid Escape". *Front Endocrinol (Lausanne)* 10:422, 2019.
- Antoni FA.** New vistas of old terrains : magnocellular vasopressin and the neuroendocrine response to stress. San Diego: Academic Press.2020.

**Antoni FA, Fink G, Sheward WJ.** Corticotrophin-releasing peptides in rat hypophysial portal blood after paraventricular lesions: a marked reduction in the concentration of corticotrophin-releasing factor-41, but no change in vasopressin. *J Endocrinol* 125:175-83, 1990.

**Bale TL, Vale WW.** CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:525-57, 2004.

**Bao AM, Meynen G, Swaab DF.** The stress system in depression and neurodegeneration: focus on the human hypothalamus. *Brain Res Rev* 57:531-53, 2008.

**Beaver WL, Wasserman K, Whipp BJ.** Improved detection of lactate threshold during exercise using a log-log transformation. *J Appl Physiol* (1985) 59:1936-40, 1985.

**Beaver WL, Wasserman K, Whipp BJ.** A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange. *J Appl Physiol* (1985) 60:2020-7, 1986.

**Bourque CW, Oliet SH, Richard D.** Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 15:231-74, 1994.

**Bruhn TO, Sutton RE, Rivier CL, Vale WW.** Corticotropin-releasing factor regulates proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in vivo. *Neuroendocrinology* 39:170-5, 1984.

**Buma P, Nieuwenhuys R.** Ultrastructural demonstration of oxytocin and vasopressin release sites in the neural lobe and median eminence of the rat by tannic acid and immunogold methods. *Neurosci Lett* 74:151-7, 1987.

**Buyukcoskun NI, Ozluk K.** Role of intracerebroventricular vasopressin in the development of stress-induced gastric lesions in rats. *Physiol Res* 48:451-5, 1999.

**Carroll JA, McArthur NH, Welsh TH, Jr.** In vitro and in vivo temporal aspects of ACTH secretion: stimulatory actions of corticotropin-releasing hormone and vasopressin in cattle. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 54:7-14, 2007.

**Chae HE, Heideman PD.** Water-deprived white-footed mice express c-fos on a day/night cycle graded according to the duration of deprivation. *Brain Research* 791:1-10, 1998.

**Chennaoui M, Gomez Merino D, Lesage J, Drogou C, Guezennec CY.** Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiol Scand* 175:113-21, 2002.

**Cole RL, Sawchenko PE.** Neurotransmitter Regulation of Cellular Activation and Neuropeptide Gene Expression in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus. *The Journal of Neuroscience* 22:959-69, 2002.

Rat Nomenclature Guidelines, <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/strains.shtml> 2016

**Cullinan WE.** GABAA receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: A dual hybridization histochemical study. *The Journal of Comparative Neurology* 419:344-51,



2000.

- Cunningham ET, Jr., Sawchenko PE.** Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 274:60-76, 1988.
- Day HEW, Campeau S, Watson SJ, Akil H.** Expression of  $\alpha$ 1bAdrenoceptor mRNA in Corticotropin-Releasing Hormone-Containing Cells of the Rat Hypothalamus and Its Regulation by Corticosterone. *The Journal of Neuroscience* 19:10098-106, 1999.
- Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA.** Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* 14:1143-52, 2001.
- de Goeij DC, Kvetnansky R, Whitnall MH, Jezova D, Berkenbosch F, Tilders FJ.** Repeated stress-induced activation of corticotropin-releasing factor neurons enhances vasopressin stores and colocalization with corticotropin-releasing factor in the median eminence of rats. *Neuroendocrinology* 53:150-9, 1991.
- de Goeij DCE, Jezova D, Tilders FJH.** Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Research* 577:165-68, 1992.
- de Graaf-Roelfsema E, Keizer HA, van Breda E, Wijnberg ID, van der Kolk JH.** Hormonal responses to acute exercise, training and overtraining. A review with emphasis on the horse. *Vet Q* 29:82-101, 2007.
- De Michele M, Touzani O, Foster AC, Fieschi C, Sette G, McCulloch J.** Corticotropin-releasing factor: effect on cerebral blood flow in physiologic and ischaemic conditions. *Experimental Brain Research* 165:375-82, 2005.
- Deuster PA, Petrides JS, Singh A, Lucci EB, Chrousos GP, Gold PW.** High intensity exercise promotes escape of adrenocorticotropin and cortisol from suppression by dexamethasone: sexually dimorphic responses. *J Clin Endocrinol Metab* 83:3332-8, 1998.
- Dishman RK, Armstrong RB, Delp MD, Graham RE, Dunn AL.** Open-field behavior is not related to treadmill performance in exercising rats. *Physiology & Behavior* 43:541-46, 1988.
- Dunn J, Critchlow V.** Electrically stimulated ACTH release in pharmacologically blocked rats. *Endocrinology* 93:835-42, 1973.
- Engler D, Redei E, Kola I.** The corticotropin-release inhibitory factor hypothesis: a review of the evidence for the existence of inhibitory as well as stimulatory hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion and biosynthesis. *Endocr Rev* 20:460-500, 1999.
- Ericsson A, Kovacs KJ, Sawchenko PE.** A functional anatomical analysis of central pathways subserving the effects of interleukin-1 on stress-related neuroendocrine neurons. *J Neurosci* 14:897-913, 1994.
- Farrell PA, Garthwaite TL, Gustafson AB.** Plasma adrenocorticotropin and cortisol responses to

submaximal and exhaustive exercise. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 55:1441-4, 1983.

**Feldman S, Newman ME, Weidenfeld J.** Effects of adrenergic and serotonergic agonists in the amygdala on the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Brain Res Bull* 52:531-6, 2000.

**Fodor A, Pinter O, Domokos A, Langnaese K, Barna I, Engelmann M, Zelena D.** Blunted HPA axis response in lactating, vasopressin-deficient Brattleboro rats. *J Endocrinol* 219:89-100, 2013.

**Ganong WF.** Review of medical physiology. New York (NY): Appleton & Lange, c1991.1991.

**Gibbs DM.** Vasopressin and oxytocin: hypothalamic modulators of the stress response: a review. *Psychoneuroendocrinology* 11:131-39, 1986.

**Giguere V, Labrie F.** Vasopressin potentiates cyclic AMP accumulation and ACTH release induced by corticotropin-releasing factor (CRF) in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 111:1752-4, 1982.

**Goodson JL, Bass AH.** Social behavior functions and related anatomical characteristics of vasotocin/vasopressin systems in vertebrates. *Brain Res Brain Res Rev* 35:246-65, 2001.

**Green HJ, Hughson RL, Orr GW, Ranney DA.** Anaerobic threshold, blood lactate, and muscle metabolites in progressive exercise. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 54:1032-8, 1983.

**Griebel G, Stemmelin J, Gal C, Soubrie P.** Non-Peptide Vasopressin V1b Receptor Antagonists as Potential Drugs for the Treatment of Stress-Related Disorders. *Current Pharmaceutical Design* 11:1549-59, 2005.

**Hashimoto K, Murakami K, Hattori T, Ota Z.** Synergistic interaction of corticotropin releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin and cortisol secretion in *Macaca fuscata*. *Acta Med Okayama* 38:261-7, 1984.

**Hashimoto K, Ohno N, Murakami K, Kageyama J, Aoki Y, Takahara J.** The effect of serotonin agonist 1-(trifluoromethylphenyl)-piperazine on corticotropin releasing factor and arginine vasopressin in rat hypothalamic nuclei. *Endocrinol Jpn* 29:383-8, 1982.

**Hayakawa J, Koizumi T, Natsuume-Sakai S.** Constancy of genetic variability in mice for non-inbred closed colonies. *Lab Anim* 14:233-6, 1980.

**Herman JP, Cullinan WE.** Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 20:78-84, 1997.

**Herman JP, Nawreen N, Smail MA, Cotella EM.** Brain mechanisms of HPA axis regulation: neurocircuitry and feedback in context Richard Kvetnansky lecture. *Stress* 23:617-32, 2020.

**Hirate K, Kuribara H, Tadokoro S.** Breeder differences within Wistar strain rats in acquisition of discrete shuttle avoidance response and in sensitivity to chlorpromazine. *Jpn J Pharmacol* 47:209-16, 1988.

**Hirate K, Kuribara H, Tadokoro S.** Breeder differences within Wistar strain rats in step-through

type passive avoidance response. *Jpn J Pharmacol* 51:563-7, 1989.

**Holmes MC, Antoni FA, Aguilera G, Catt KJ.** Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. *Nature* 319:326-9, 1986.

**Inder WJ, Hellemans J, Swanney MP, Prickett TC, Donald RA.** Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes. *J Appl Physiol* (1985) 85:835-41, 1998.

**Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y, Watson SJ.** Regulatory mechanisms of corticotropin-releasing hormone and vasopressin gene expression in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 16:348-55, 2004.

**Jones NL, Ehrlsam RE.** The anaerobic threshold. *Exerc Sport Sci Rev* 10:49-83, 1982.

**Kampfmann I, Bauer N, Johannes S, Moritz A.** Differences in hematologic variables in rats of the same strain but different origin. *Vet Clin Pathol* 41:228-34, 2012.

**Kawashima H, Saito T, Yoshizato H, Fujikawa T, Sato Y, McEwen BS, Soya H.** Endurance treadmill training in rats alters CRH activity in the hypothalamic paraventricular nucleus at rest and during acute running according to its period. *Life Sci* 76:763-74, 2004.

**Keck ME.** Corticotropin-releasing factor, vasopressin and receptor systems in depression and anxiety. *Amino Acids* 31:241-50, 2006.

**Koshimizu TA, Nakamura K, Egashira N, Hiroyama M, Nonoguchi H, Tanoue A.** Vasopressin V1a and V1b receptors: from molecules to physiological systems. *Physiol Rev* 92:1813-64, 2012.

**Kovács KJ.** Invited review c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a functional map. *Neurochemistry International* 33:287-97, 1998.

**Kubota N, Amemiya S, Yanagita S, Nishijima T, Kita I.** Emotional stress evoked by classical fear conditioning induces yawning behavior in rats. *Neurosci Lett* 566:182-7, 2014.

**Kuo T, McQueen A, Chen TC, Wang JC.** Regulation of Glucose Homeostasis by Glucocorticoids. *Adv Exp Med Biol* 872:99-126, 2015.

**Kvetnansky R, Kubovcakova L, Tillinger A, Micutkova L, Krizanova O, Sabban EL.** Gene expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in corticotropin-releasing hormone knockout mice during stress exposure. *Cell Mol Neurobiol* 26:735-54, 2006.

**Lariviere WR, Melzack R.** The role of corticotropin-releasing factor in pain and analgesia. *Pain* 84:1-12, 2000.

**Leibowitz SF, Diaz S, Tempel D.** Norepinephrine in the paraventricular nucleus stimulates corticosterone release. *Brain Res* 496:219-27, 1989.

**Luger A, Deuster PA, Kyle SB, Gallucci WT, Montgomery LC, Gold PW, Loriaux DL, Chrousos GP.** Acute hypothalamic-pituitary-adrenal responses to the stress of treadmill exercise. Physiologic adaptations to physical training. *N Engl J Med* 316:1309-15, 1987.

**Makara GB, Stark E, Karteszi M, Palkovits M, Rappay G.** Effects of paraventricular lesions on

stimulated ACTH release and CRF in stalk-median eminence of the rat. *Am J Physiol* 240:E441-6, 1981.

**Mastorakos G, Pavlatou M, Diamanti-Kandarakis E, Chrousos GP.** Exercise and the stress system. *Hormones (Athens)* 4:73-89, 2005.

**Maybauer MO, Maybauer DM, Enkhbaatar P, Traber DL.** Physiology of the vasopressin receptors. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 22:253-63, 2008.

**Morikawa R, Kubota N, Amemiya S, Nishijima T, Kita I.** Interaction between intensity and duration of acute exercise on neuronal activity associated with depression-related behavior in rats. *J Physiol Sci* 71:1, 2021.

**Mouri T, Itoi K, Takahashi K, Suda T, Murakami O, Yoshinaga K, Andoh N, Ohtani H, Masuda T, Sasano N.** Colocalization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in the paraventricular nucleus of the human hypothalamus. *Neuroendocrinology* 57:34-9, 1993.

**Muglia L, Jacobson L, Dikkes P, Majzoub JA.** Corticotropin-releasing hormone deficiency reveals major fetal but not adult glucocorticoid need. *Nature* 373:427-32, 1995.

**Murat B, Devost D, Andres M, Mion J, Boulay V, Corbani M, Zingg HH, Guillon G.** V1b and CRHR1 receptor heterodimerization mediates synergistic biological actions of vasopressin and CRH. *Mol Endocrinol* 26:502-20, 2012.

**Nakamura CY, Anderson NH.** Avoidance behavior differences within and between strains of rats. *J Comp Physiol Psychol* 55:740-7, 1962.

**Negro-Vilar A, Johnston C, Spinedi E, Valenca M, Lopez F.** Physiological role of peptides and amines on the regulation of ACTH secretion. *Ann N Y Acad Sci* 512:218-36, 1987.

**Ohiwa N, Chang H, Saito T, Onaka T, Fujikawa T, Soya H.** Possible inhibitory role of prolactin-releasing peptide for ACTH release associated with running stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R497-504, 2007.

**Osterlund CD, Rodriguez-Santiago M, Woodruff ER, Newsom RJ, Chadayammuri AP, Spencer RL.** Glucocorticoid Fast Feedback Inhibition of Stress-Induced ACTH Secretion in the Male Rat: Rate Independence and Stress-State Resistance. *Endocrinology* 157:2785-98, 2016.

**Otsuka T, Nishii A, Amemiya S, Kubota N, Nishijima T, Kita I.** Effects of acute treadmill running at different intensities on activities of serotonin and corticotropin-releasing factor neurons, and anxiety- and depressive-like behaviors in rats. *Behav Brain Res* 298:44-51, 2016.

**Pacak K.** Stressor-specific activation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Physiol Res* 49 Suppl 1:S11-7, 2000.

**Pacak K, Palkovits M.** Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 22:502-48, 2001.

**Paxinos G, Watson C.** *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Cambridge: Academic Press. 2009.

- Rahkila P, Hakala E, Alén M, Salminen K, Laatikainen T.**  $\beta$ -Endorphin and corticotropin release is dependent on a threshold intensity of running exercise in male endurance athletes. *Life Sciences* 43:551-58, 1988.
- Ramos AT, Troncone LR, Tufik S.** Suppression of adrenocorticotrophic hormone secretion by simultaneous antagonism of vasopressin 1b and CRH-1 receptors on three different stress models. *Neuroendocrinology* 84:309-16, 2006.
- Rivier C, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, Vale W.** In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology* 110:272-8, 1982.
- Rivier C, Rivier J, Vale W.** Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science* 218:377-9, 1982.
- Rivier C, Vale W.** Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305:325-7, 1983.
- Rivier CL, Plotsky PM.** Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu Rev Physiol* 48:475-94, 1986.
- Saito T, Soya H.** Delineation of responsive AVP-containing neurons to running stress in the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R484-90, 2004.
- Schulz DW, Mansbach RS, Sprouse J, Braselton JP, Collins J, Corman M, Dunaikis A, Faraci S, Schmidt AW, Seeger T, Seymour P, Tingley FD, 3rd, Winston EN, Chen YL, Heym J.** CP-154,526: a potent and selective nonpeptide antagonist of corticotropin releasing factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10477-82, 1996.
- Sellers TL, Jaussi AW, Yang HT, Heninger RW, Winder WW.** Effect of the exercise-induced increase in glucocorticoids on endurance in the rat. *J Appl Physiol* (1985) 65:173-8, 1988.
- Selye H.** Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* 1:1383-92, 1950.
- Serradeil-Le Gal C, Raufaste D, Derick S, Blankenstein J, Allen J, Pouzet B, Pascal M, Wagnon J, Ventura MA.** Biological characterization of rodent and human vasopressin V1b receptors using SSR-149415, a nonpeptide V1b receptor ligand. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R938-49, 2007.
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Simiand J, Griebel G, Lacour C, Guillon G, Barberis C, Brossard G, Soubrie P, Nisato D, Pascal M, Pruss R, Scatton B, Maffrand JP, Le Fur G.** Characterization of (2S,4R)-1-[5-chloro-1-[(2,4-dimethoxyphenyl)sulfonyl]-3-(2-methoxy-phenyl)-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indol-3-yl]-4-hydroxy-N,N-dimethyl-2-pyrrolidine carboxamide (SSR149415), a selective and orally active vasopressin V1b receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 300:1122-30, 2002.
- Serradeil-Le Gal C, Wagnon J, Tonnerre B, Roux R, Garcia G, Griebel G, Aulombard A.** An Overview of SSR149415, a Selective Nonpeptide Vasopressin V1b Receptor Antagonist for the

Treatment of Stress-Related Disorders. *CNS Drug Reviews* 11:53-68, 2005.

**Seymour PA, Schmidt AW, Schulz DW.** The pharmacology of CP-154,526, a non-peptide antagonist of the CRH1 receptor: a review. *CNS Drug Rev* 9:57-96, 2003.

**Smoak B, Deuster P, Rabin D, Chrousos G.** Corticotropin-releasing hormone is not the sole factor mediating exercise-induced adrenocorticotropin release in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 73:302-6, 1991.

**Soya H.** Stress Response to Exercise and Its Hypothalamic Regulation: Role of Arginine-Vasopressin. In: *Exercise, Nutrition, and Environmental Stress*, vol. (Nose H, Gisolfi C, Imaizumi K, eds), pp. 21-37. Traverse: Cooper Publishing Group. 2001.

**Soya H, Mukai A, Deocaris CC, Ohiwa N, Chang H, Nishijima T, Fujikawa T, Togashi K, Saito T.** Threshold-like pattern of neuronal activation in the hypothalamus during treadmill running: establishment of a minimum running stress (MRS) rat model. *Neurosci Res* 58:341-8, 2007.

**Spiga F, Harrison LR, Wood S, Knight DM, MacSweeney CP, Thomson F, Craighead M, Lightman SL.** Blockade of the V(1b) receptor reduces ACTH, but not corticosterone secretion induced by stress without affecting basal hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *J Endocrinol* 200:273-83, 2009.

**Stotz-Potter EH, Morin SM, DiMicco JA.** Effect of microinjection of muscimol into the dorsomedial or paraventricular hypothalamic nucleus on air stress-induced neuroendocrine and cardiovascular changes in rats. *Brain Research* 742:219-24, 1996.

**Swanson LW, Kuypers HG.** The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. *J Comp Neurol* 194:555-70, 1980.

**Thibonnier M, Coles P, Thibonnier A, Shoham M.** The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:175-202, 2001.

**Thompson RC, Seasholtz AF, Herbert E.** Rat corticotropin-releasing hormone gene: sequence and tissue-specific expression. *Mol Endocrinol* 1:363-70, 1987.

**Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM.** Sensitivity to glucocorticoid-mediated fast-feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis is dependent upon stressor specific neurocircuitry. *Brain Research* 870:87-101, 2000.

**Timofeeva E, Huang Q, Richard D.** Effects of treadmill running on brain activation and the corticotropin-releasing hormone system. *Neuroendocrinology* 77:388-405, 2003.

**Ulrich-Lai YM, Herman JP.** Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci* 10:397-409, 2009.

**van Praag H, Fleshner M, Schwartz MW, Mattson MP.** Exercise, energy intake, glucose homeostasis, and the brain. *J Neurosci* 34:15139-49, 2014.

- Watts AG.** Glucocorticoid regulation of peptide genes in neuroendocrine CRH neurons: a complexity beyond negative feedback. *Front Neuroendocrinol* 26:109-30, 2005.
- Whitnall MH.** Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 40:573-629, 1993.
- Whitnall MH, Mezey E, Gainer H.** Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. *Nature* 317:248-50, 1985.
- Wiegand SJ, Price JL.** Cells of origin of the afferent fibers to the median eminence in the rat. *J Comp Neurol* 192:1-19, 1980.
- Yamada J, Nikaido H, Matsumoto S.** Genetic variability within and between outbred Wistar strains of rats. *Jikken Dobutsu* 28:259-65, 1979.
- Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP.** Organization and regulation of paraventricular nucleus glutamate signaling systems: N-methyl-D-aspartate receptors. *J Comp Neurol* 484:43-56, 2005.
- Ziegler DR, Herman JP.** Local integration of glutamate signaling in the hypothalamic paraventricular region: regulation of glucocorticoid stress responses. *Endocrinology* 141:4801-4, 2000.
- 海野 明.** 実験用マウス系統とその有用性について. 衛研技術情報 41, 2017.
- 山田 淳.** 実験動物における遺伝的モニタリングの意義と役割. 岡山実験動物研究会報 5:5-9, 1987.
- 西川 哲.** 実験用ラットの歴史について考える. 岡山実験動物研究会報 7:28-32, 1990.
- 野村 達.** 動物実験と実験動物. *Kagaku To Seibutsu* 7:35-40, 1969.

## Appendices

### Appendix 1. ストックごとの体重 (g)

Slc:Wistar	搬入時	実験時	Crlj:WI	搬入時	実験時
No. 4	198	204	No. 1	292	376
No. 6	198	207	No. 3	311	388
No. 20	204	234	No.7	301	319
No. 28	206	243	No. 8	302	321
Mean	201.5	222.0	Mean	301.5	351.0
SD	4.12	19.44	SD	7.77	36.14
SEM	2.06	9.72	SEM	3.88	18.07

Kwl:Wistar	搬入時	実験時	Jcl:Wistar	搬入時	実験時
No. 12	254	346	No. 14	218	293
No. 26	271	362	追加No. 5	247	305
追加No. 2	271	380	追加No. 6	253	318
追加No. 3	253	332	追加No. 7	245	311
追加No. 4	256	372	追加No. 8	248	310
Mean	261.0	358.4	Mean	242.2	307.4
SD	9.19	19.46	SD	13.8	9.3
SEM	4.11	8.70	SEM	6.19	4.15

Mean ± SEM [g]		
	搬入時	実験時
Slc:Wistar	201.5 ± 2.06	222.0 ± 9.72
Crlj:WI	301.5 ± 3.88 <sup>aa</sup>	351.0 ± 18.07 <sup>aa</sup>
Kwl:Wistar	261.0 ± 4.11 <sup>aabb</sup>	358.4 ± 8.70 <sup>aa</sup>
Jcl:Wistar	242.2 ± 6.19 <sup>aabb</sup>	307.4 ± 4.15 <sup>aabbcc</sup>

時間;  $F_{(1,14)} = 149.7$ , ストック;  $F_{(3,14)} = 54.35$ ,  $p < 0.0001$ ,  $p < 0.0001$ , 時間×ストック;  $F_{(3,14)} = 11.46$ ,  $p = 0.0005$ . aa:  $p < 0.01$  vs. Slc:Wistar, bb:  $p < 0.01$  vs. Crlj:WI, cc:  $p < 0.01$  vs. Kwl:Wistar

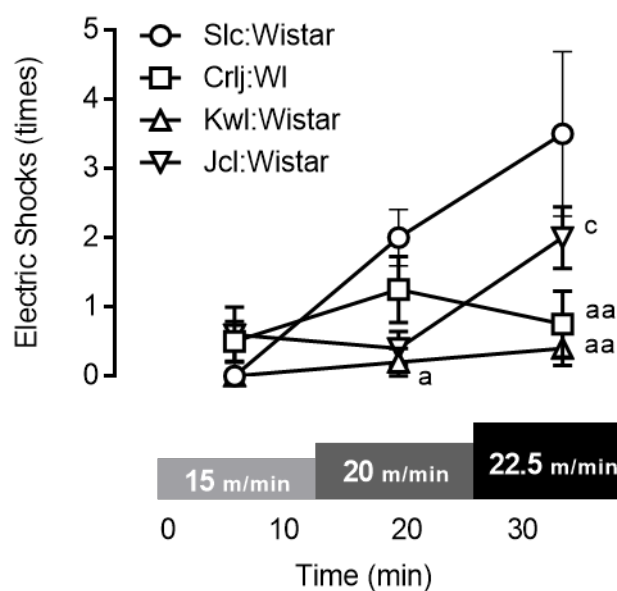


## Appendix 2. ストックごとの電気ショック暴露数 (回)

Slc:Wistar	10	20	30	Crlj:WI	10	20	30
No. 4	0	3	5	No. 1	1	2	2
No. 6	0	2	5	No. 3	0	0	1
No. 20	0	1	0	No. 7	0	1	0
No. 28	0	2	4	No. 8	1	2	0
Mean	0.0	2.0	3.5	Mean	0.5	1.3	0.8
SD	0.00	0.82	2.38	SD	0.58	0.96	0.96
SEM	0.00	0.41	1.19	SEM	0.29	0.48	0.48

Kwl:Wistar	10	20	30	Jcl:Wistar	10	20	30
No. 12	0	0	0	No. 14	0	1	1
No. 26	0	1	0	追加No. 5	1	0	2
追加No. 2	0	0	1	追加No. 6	2	1	3
追加No. 3	0	0	0	追加No. 7	0	0	1
追加No. 4	0	0	1	追加No. 8	0	0	3
Mean	0.0	0.2	0.4	Mean	0.6	0.4	2
SD	0.00	0.45	0.55	SD	0.89	0.55	1.00
SEM	0.00	0.20	0.24	SEM	0.40	0.24	0.45



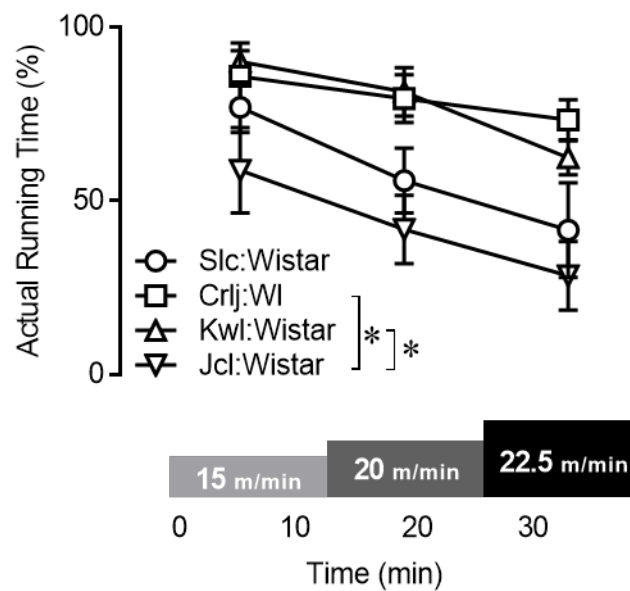
運動強度;  $F_{(2,28)} = 13.69, p < 0.0001$ , ストック;  $F_{(3,14)} = 4.558, p = 0.0199$ , 運動強度×ストック;  $F_{(6,28)} = 4.746, p = 0.0019$ . Values are mean  $\pm$  SEM. (n = 4-5). a:  $p < 0.05$ , aa:  $p < 0.01$  vs. Slc:Wistar, c:  $p < 0.05$  vs. Kwl:Wistar.

### Appendix 3. ストックごとの実質走行時間 (%)

Slc:Wistar	10	20	30	Crlj:WI	10	20	30
No. 4	80.4	45.5	20.4	No. 1	73.7	62.7	58.3
No. 6	63.0	46.3	34.0	No. 3	98.2	92	74.7
No. 20	95.7	83.8	81.5	No.7	99.3	89.3	74.3
No. 28	68.9	47.9	30.7	No. 8	72.3	74.1	86.2
Mean	77.0	55.9	41.7	Mean	85.9	79.5	73.4
SD	14.41	18.64	27.19	SD	14.88	13.71	11.47
SEM	7.20	9.32	13.60	SEM	7.44	6.85	5.73

Kwl:Wistar	10	20	30	Jcl:Wistar	10	20	30
No. 12	100	91.5	62.5	No. 14	69.6	54.5	60.5
No. 26	71.8	88.5	71.8	追加No. 5	40.3	36.8	22.3
追加No. 2	97.1	77.5	56.9	追加No. 6	28.5	18.6	1.0
追加No. 3	97.9	93.8	73.8	追加No. 7	99.4	72.9	38.1
追加No. 4	83.8	55.7	47.3	追加No. 8	56.3	26.0	20.6
Mean	90.1	81.4	62.5	Mean	58.8	41.8	28.5
SD	12.07	15.67	10.92	SD	27.53	22.03	22.21
SEM	5.40	7.01	4.88	SEM	12.31	9.85	9.93



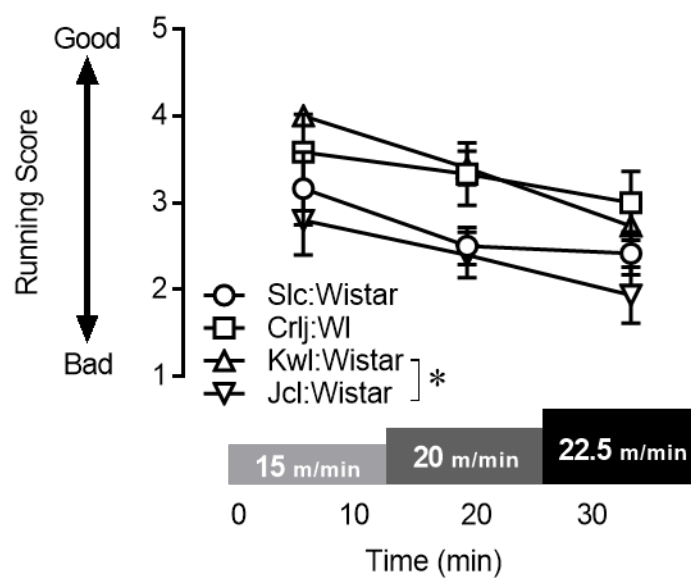
運動強度;  $F_{(2, 28)} = 29.68, p < 0.0001$ , ストック;  $F_{(3, 14)} = 5.191, p = 0.0128$ , 運動強度×ストック;  $F_{(6, 28)} = 1.143, p = 0.3642$ . Values are mean  $\pm$  SEM. (n = 4-5). \*:  $p < 0.05$ .

#### Appendix 4. ストックごとのランニングスコア

Slc:Wistar	10	20	30	Crlj:WI	10	20	30
No. 4	2.33	2.00	2.00	No. 1	2.67	2.33	2.00
No. 6	3.00	2.33	2.00	No. 3	4.33	4.00	3.00
No. 20	4.33	3.00	3.00	No.7	4.33	3.67	3.33
No. 28	3.00	2.67	2.67	No. 8	3.00	3.33	3.67
Mean	3.17	2.50	2.42	Mean	3.58	3.33	3.00
SD	0.84	0.43	0.50	SD	0.88	0.72	0.72
SEM	0.42	0.22	0.25	SEM	0.44	0.36	0.36

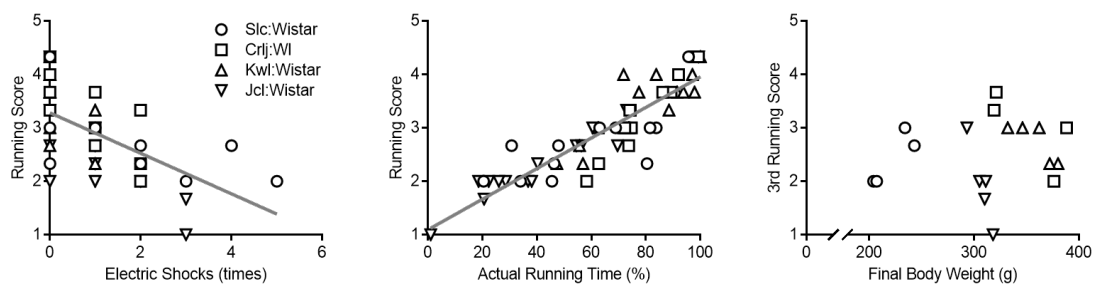
  

Kwl:Wistar	10	20	30	Jcl:Wistar	10	20	30
No. 12	4.33	3.67	3.00	No. 14	2.67	2.67	3.00
No. 26	4.00	3.33	3.00	追加No. 5	2.33	2.00	2.00
追加No. 2	4.00	3.67	2.33	追加No. 6	2.00	2.00	1.00
追加No. 3	3.67	3.67	3.00	追加No. 7	4.33	3.33	2.00
追加No. 4	4.00	2.67	2.33	追加No. 8	2.67	2.00	1.67
Mean	4.00	3.40	2.73	Mean	2.80	2.40	1.93
SD	0.24	0.43	0.37	SD	0.90	0.60	0.72
SEM	0.11	0.19	0.16	SEM	0.40	0.27	0.32



運動強度;  $F_{(2, 28)} = 19.81, p < 0.0001$ , ストック;  $F_{(3, 14)} = 3.753, p = 0.0362$ , 運動強度×ストック;  $F_{(6, 28)} = 0.8005, p = 0.5778$ . Values are mean  $\pm$  SEM. (n = 4-5). \*:  $p < 0.05$ .

## Appendix 5. ランニングスコアと各種項目の相関関係



左：電気ショック暴露数とランニングスコアの相関関係。 $r = -0.6509, p < 0.0001$ .

中：実質走行時間とランニングスコアの相関関係。 $r = 0.9095, p < 0.0001$ .

右：実験日の体重と第三ステージのランニングスコアの相関関係。 $r = 0.2573, p = 0.3027$ .

## Appendix 5. ストックごとの運動時の血中乳酸値

Slc:Wistar	0	10	20	30	Crlj:WI	0	10	20	30
No. 4	1.36	1.86	2.11	2.28	No. 1	1.16	1.46	1.77	1.70
No. 6	0.952	3.57	2.59	3.16	No. 3	0.788	1.43	1.56	1.53
No. 20	0.802	1.48	2.81	3.94	No.7	1.02	0.924	1.52	2.57
No. 28	0.603	2.27	1.86	2.29	No. 8	1.07	1.65	1.72	2.16
Mean	0.93	2.30	2.34	2.92	Mean	1.01	1.37	1.64	1.99
SD	0.32	0.91	0.43	0.80	SD	0.16	0.31	0.12	0.47
SEM	0.16	0.45	0.22	0.40	SEM	0.08	0.16	0.06	0.23

Kwl:Wistar	0	10	20	30	Jcl:Wistar	0	10	20	30
No. 12	0.61	0.571	1.43	1.88	No. 14	0.583	0.508	0.625	0.668
No. 26	0.600	0.639	1.04	1.00	追加No. 5	0.355	0.430	0.386	0.417
追加No. 2	0.673	0.904	0.801	0.924	追加No. 6	0.369	0.468	0.448	0.660
追加No. 3	0.627	0.539	0.636	0.921	追加No. 7	0.471	0.465	0.681	0.608
追加No. 4	0.467	0.647	0.956	1.05	追加No. 8	0.325	0.312	0.339	0.362
Mean	0.60	0.66	0.97	1.16	Mean	0.421	0.437	0.496	0.543
SD	0.08	0.14	0.30	0.41	SD	0.11	0.07	0.15	0.14
SEM	0.03	0.06	0.13	0.18	SEM	0.05	0.03	0.07	0.06

## Appendix 6. ストックごとの運動時の血糖値

Slc:Wistar	0	10	20	30	Crlj:WI	0	10	20	30
No. 4	4.85	5.39	5.68	6.03	No. 1	5.57	6.31	7.29	7.67
No. 6	5.09	5.84	6.17	6.84	No. 3	4.79	5.31	5.28	5.86
No. 20	4.70	5.05	5.70	6.11	No.7	5.02	5.14	5.85	6.87
No. 28	5.09	5.75	5.76	6.07	No. 8	5.63	5.85	7.06	7.13
Mean	4.93	5.51	5.83	6.26	Mean	5.25	5.65	6.37	6.88
SD	0.19	0.36	0.23	0.39	SD	0.41	0.53	0.96	0.76
SEM	0.10	0.18	0.12	0.19	SEM	0.21	0.27	0.48	0.38

Kwl:Wistar	0	10	20	30	Jcl:Wistar	0	10	20	30
No. 12	6.19	4.78	5.55	6.16	No. 14	5.21	4.85	5.18	5.14
No. 26	5.51	5.21	5.63	5.55	追加No. 5	4.18	3.97	4.05	4.03
追加No. 2	4.92	4.74	5.91	5.34	追加No. 6	4.45	4.50	4.94	4.81
追加No. 3	5.59	4.63	4.79	5.45	追加No. 7	5.11	4.65	5.33	5.59
追加No. 4	4.46	3.59	4.35	4.02	追加No. 8	4.43	4.33	4.23	4.83
Mean	5.33	4.59	5.25	5.30	Mean	4.68	4.46	4.75	4.88
SD	0.66	0.60	0.65	0.78	SD	0.46	0.33	0.57	0.57
SEM	0.30	0.27	0.29	0.35	SEM	0.20	0.15	0.26	0.26

## Appendix 7. ストックごとの運動時の血漿 ACTH 濃度

Slc:Wistar	0	10	20	30	Crlj:WI	0	10	20	30
No. 4	31.01	527.05	253.20	191.83	No. 1	136.29	466.95	756.72	423.27
No. 6	17.69	575.63	827.97	864.10	No. 3	75.10	330.94	500.73	451.84
No. 20	23.13	264.37	362.44	443.01	No.7	24.22	85.83	250.05	250.52
No. 28	165.86	695.11	807.45	854.78	No. 8	63.30	82.58	218.16	310.53
Mean	59.42	515.54	562.76	588.43	Mean	74.73	241.58	431.41	359.04
SD	71.17	181.73	297.86	329.33	SD	46.45	190.02	250.99	94.64
SEM	35.58	90.86	148.93	164.67	SEM	23.22	95.01	125.50	47.32

Kwl:Wistar	0	10	20	30	Jcl:Wistar	0	10	20	30
No. 12	35.07	151.95	403.45	477.66	No. 14	47.29	191.70	145.64	183.65
No. 26	38.25	207.58	298.04	224.81	追加No. 5	16.52	97.73	349.47	442.28
追加No. 2	53.13	306.02	464.21	311.38	追加No. 6	130.06	183.38	252.30	193.41
追加No. 3	64.94	100.46	184.73	301.78	追加No. 7	17.89	41.91	219.39	157.48
追加No. 4	120.24	241.28	278.69	284.85	追加No. 8	30.78	49.49	83.83	63.86
Mean	62.33	201.46	325.82	320.10	Mean	48.51	112.84	210.12	208.14
SD	34.53	79.38	109.63	94.29	SD	47.24	71.53	101.72	140.55
SEM	15.44	35.50	49.03	42.17	SEM	21.13	31.99	45.49	62.86

## Appendix 8. 漸増負荷運動時の血中乳酸動態

(m/min)	No.35	No. 37	No. 38	No. 40	No. 41	No. 42
0	0.845	0.573	0.54	0.515	0.463	0.99
5	0.579	0.583	0.433	0.422	0.503	0.669
7.5	0.639	0.421	0.492	0.445	0.564	0.889
10	0.568	0.496	0.522	0.544	0.736	1.05
12.5	0.586	0.539	0.487	0.625	0.648	1.20
15	0.797	0.566	0.562	0.755	0.643	1.45
17.5	0.878	0.756	0.661	1.15	0.749	1.96
20	1.31	1.04	0.966	1.24	0.984	1.42
22.5	2.24	1.35	1.27	1.39	1.17	1.75
25	2.38	1.50	1.47	2.19	1.31	2.87
27.5	3.45	1.76	1.92	2.03	1.63	2.79
30	3.80	1.81	2.71	3.00	1.96	2.70
32.5	5.14	2.54	2.92	3.58	2.71	3.52
35	5.57	2.68	2.91	4.21	2.20	4.24
37.5	6.82	3.23	3.93	5.46	3.02	4.44
40	7.69		3.76	5.86	3.53	4.84
42.5			3.98	5.85		4.48
45			4.92			6.29
47.5						6.27

# Appendix 9. LT

	LT (m/min)
No.35	18.8
No. 37	16.1
No. 38	17.9
No. 40	22.1
No. 41	21.3
No. 42	22.7
Mean.	19.8
SEM.	1.1

Appendix 10. 研究課題 3-1 の電気ショック暴露数

Vehicle	電気 (回)	SSR1	電気 (回)
141107_No. 1	1	150930_No. 1	1
141107_No. 4	1	151014_No. 22	1
141107_No. 5	1	151021_No. 42	4
141113_No. 17	0	151022_No. 43	5
141126_No. 13	0	151022_No. 48	4
141217_No. 28	1	151103_No. 11(2)	2
Mean.	0.67	Mean.	2.83
SD.	0.52	SD.	1.72
SEM.	0.21	SEM.	0.70

SSR10	電気 (回)	SSR30	電気 (回)
141107_No. 6	0	141124_No. 10	1
141124_No. 11	1	141113_No. 18	0
141127_No. 20	0	141126_No. 16	0
151109_No. 23(2)	1	141215_No. 25	1
151111_No. 28(2)	3	141218_No. 31	1
151111_No. 30(2)	2	151109_No. 19(2)	5
Mean.	1.17	151109_No. 25(2)	2
SD.	1.17	Mean.	1.43
SEM.	0.48	SD.	1.72
		SEM.	0.65



# Appendix 11. 研究課題 3-1 の血漿 ACTH 濃度

Vehicle	-45	0	30	SSR1	-45	0	30
141107_No. 1	20.09	53.16	321.14	150930_No. 1	0.88	10.69	690.17
141107_No. 4	51.64	27.17	310.58	151014_No. 22	4.68	28.33	251.25
141107_No. 5	36.55	73.38	492.49	151021_No. 42	94.29	63.54	539.66
141113_No. 17	61.41	31.49	596.05	151022_No. 43	23.21	49.77	347.84
141126_No. 13	9.69	31.21	611.38	151022_No. 48	48.01	25.09	483.48
141217_No. 28	14.46	30.94	535.64	151103_No. 11(2)	13.26	79.09	175.41
Mean.	32.31	41.22	477.88	Mean.	30.72	42.76	414.64
SD.	21.06	18.30	132.58	SD.	35.41	25.88	192.19
SEM.	8.60	7.47	54.13	SEM.	14.46	10.57	78.46

SSR10	-45	0	30	SSR30	-45	0	30
141107_No. 6	19.43	63.72	325.89	141124_No. 10	24.10	12.98	432.71
141124_No. 11	106.41	88.58	237.00	141113_No. 18	22.99	97.66	233.38
141127_No. 20	6.79	33.30	408.41	141126_No. 16	15.76	18.62	343.73
151109_No. 23(2)	6.40	13.74	305.90	141215_No. 25	65.20	35.68	200.37
151111_No. 28(2)	6.22	33.14	430.26	141218_No. 31	32.66	22.77	257.83
151111_No. 30(2)	10.70	40.76	324.18	151109_No. 19(2)	27.95	7.46	369.95
Mean.	25.99	45.54	338.61	151109_No. 25(2)	12.08	22.51	300.48
SD.	39.72	26.54	70.76	Mean.	28.68	31.10	305.49
SEM.	16.21	10.83	28.89	SD.	17.54	30.65	82.00
				SEM.	6.63	11.59	30.99

Appendix 12. 研究課題 3-2 の電気ショック暴露数

Vehicle	電気 (回)	CP1	電気 (回)
150930_No. 6	0	151001_No. 10	1
151001_No. 11	2	151016_No. 33	2
151016_No. 31	2	151102_No. 1(2)	0
151103_No. 7(2)	2	151103_No. 12(2)	4
151104_No. 14(2)	9	151104_No. 17(2)	5
Mean.	3.00	Mean.	2.40
SD	3.46	SD	2.07
SEM.	1.55	SEM.	0.93

CP10	電気 (回)	CP30	電気 (回)
151001_No. 12	0	150930_No. 4	1
151002_No. 15	1	151014_No. 20	0
151016_No. 35	2	151015_No. 27	1
151022_No. 47	0	151021_No. 38	0
151024_No. 54	5	151024_No. 51	0
151104_No. 18(2)	2	151111_No. 31(2)	2
151104_No. 13(2)	5		
Mean.	2.14	Mean.	0.67
SD	2.12	SD	0.82
SEM.	0.80	SEM.	0.33

### Appendix 13. 研究課題 3-2 の血漿 ACTH 濃度

Vehicle	-45	0	30
150930_No. 6	27.08	26.74	364.16
151001_No. 11	4.32	12.39	384.28
151016_No. 31	53.67	24.94	301.09
151103_No. 7(2)	8.55	34.25	587.92
151104_No. 14(2)	42.39	20.57	585.96
Mean.	27.20	23.78	444.68
SD	21.23	8.06	133.44
SEM.	9.49	3.60	59.68

CP1	-45	0	30
151001_No. 10	20.16	39.29	145.48
151016_No. 33	3.31	24.81	409.33
151102_No. 1(2)	7.95	9.95	193.05
151103_No. 12(2)	57.57	26.44	433.72
151104_No. 17(2)	21.57	74.02	606.15
Mean.	22.11	34.90	357.55
SD	21.30	24.21	188.63
SEM.	9.53	10.83	84.36

CP10	-45	0	30
151001_No. 12	2.64	5.55	163.27
151002_No. 15	12.80	16.15	347.58
151016_No. 35	2.72	18.33	377.81
151022_No. 47	6.04	83.25	566.47
151024_No. 54	8.85	23.11	442.83
151104_No. 18(2)	18.82	30.56	168.44
151104_No. 13(2)	15.48	31.27	325.15
Mean.	9.62	29.74	341.65
SD	6.31	25.20	143.89
SEM.	2.38	9.53	54.38

CP30	-45	0	30
150930_No. 4	57.61	30.11	180.21
151014_No. 20	2.79	46.97	221.05
151015_No. 27	4.11	78.06	375.21
151021_No. 38	12.35	82.68	149.94
151024_No. 51	9.14	29.22	302.48
151111_No. 31(2)	8.86	122.56	96.83
Mean.	15.81	64.93	220.95
SD	20.78	36.38	102.52
SEM.	8.48	14.85	41.85

Appendix 14. 研究課題 3-3 の電気ショック暴露数

Vehicle	電気 (回)	SSR	電気 (回)
151116_No. 39	0	151116_No. 41	1
151116_No. 49	0	151118_No. 50	2
151118_No. 44	0	151118_No. 47	1
170413_No. 2(3)	4	170413_No. 1(3)	2
170418_No. 11(3)	1	170420_No. 16(3)	3
170429_No. 24(3)	2	170427_No. 17(3)	2
170506_No. 25(3)	1	170429_No. 23(3)	0
170507_No. 30(3)	3	(170427_No. 18(3))	
170507_No. 31(3)	3		
Mean.	1.56	Mean.	1.57
SD	1.51	SD	0.98
SEM.	0.50	SEM.	0.37

CP	電気 (回)	SSR+CP	電気 (回)
151116_No. 38	0	151116_No. 35	3
151118_No. 46	0	151118_No. 48	0
170415_No. 8(3)	1	170413_No. 4(3)	0
170420_No. 15(3)	2	170418_No. 12(3)	1
170427_No. 19(3)	3	170420_No. 14(3)	1
170429_No. 21(3)	0	170427_No. 20(3)	0
170506_No. 28(3)	0		
Mean.	0.86	Mean.	0.83
SD	1.21	SD	1.17
SEM.	0.46	SEM.	0.48

### Appendix 15. 研究課題 3-3 の血漿 ACTH 濃度

Vehicle	-45	0	30	SSR	-45	0	30
151116_No. 39	30.71	39.36	1112.18	151116_No. 41	47.70	26.54	567.65
151116_No. 49	11.89	95.44	697.33	151118_No. 50	39.66	52.21	742.48
151118_No. 44	46.84	39.27	681.41	151118_No. 47	13.99	43.42	591.35
170413_No. 2(3)	5.80	53.03	539.61	170413_No. 1(3)	33.44	34.23	204.06
170418_No. 11(3)	27.71	25.67	1109.29	170420_No. 16(3)	6.18	49.56	246.90
170429_No. 24(3)	67.88	97.42	815.15	170427_No. 17(3)	18.51	28.22	236.33
170506_No. 25(3)	50.51	77.26	1132.07	170429_No. 23(3)	4.04	33.45	480.59
170507_No. 30(3)	21.77	70.60	521.15				
170507_No. 31(3)	5.20	24.16	864.56				
Mean.	29.81	58.02	830.31	Mean.	23.36	38.23	438.48
SD	21.62	28.28	242.30	SD	17.03	10.22	210.86
SEM.	7.21	9.43	80.77	SEM.	6.435	3.861	79.697

CP	-45	0	30	SSR+CP	-45	0	30
151116_No. 38	17.97	40.73	557.41	151116_No. 35	30.03	77.70	320.75
151118_No. 46	18.71	158.05	650.58	151118_No. 48	44.92	41.67	332.23
170415_No. 8(3)	75.79	176.54	409.61	170413_No. 4(3)	8.64	119.48	307.34
170420_No. 15(3)	36.31	59.54	216.97	170418_No. 12(3)	19.81	54.38	122.12
170427_No. 19(3)	45.91	150.97	351.24	170420_No. 14(3)	27.21	80.10	49.28
170429_No. 21(3)	8.93	115.10	309.19	170427_No. 20(3)	9.99	8.91	58.89
170506_No. 28(3)	12.59	245.64	430.33				
Mean.	30.89	135.22	417.90	Mean.	23.43	63.71	198.44
SD	23.82	70.39	147.46	SD	13.66	37.82	135.84
SEM.	9.00	26.61	55.73	SEM.	5.57	15.44	55.46

### Appendix 16. pPVN における AVP ニューロン活性

SED	c-Fos	Merge	ME	c-Fos	Merge
No.4	1.9	0.3	No.2	44.3	12.3
No.7	4.5	1.5	No.3	56.6	21.1
No.12	1.4	0.3	No.6	95.6	19.4
No.13	4.0	0.9	No.9	50.8	16.3
No.15	3.0	0.4	No.11	60.4	16.5
Mean.	2.96	0.68	Mean.	61.5	17.1
S.D.	1.32	0.52	S.D.	19.99	3.37
SEM.	0.26	0.10	SEM.	4.00	0.67

#### Appendix 17. pPVN における CRH ニューロン活性

<b>SED</b>	c-Fos	Merge	<b>ME</b>	c-Fos	Merge
No.4	4.3	1.6	No.2	38.3	22.8
No.7	5.2	1.7	No.3	43.6	27.1
No.12	1.9	0.8	No.6	69.9	42
No.13	2.8	0.8	No.9	82.9	54.3
No.15	1.3	0.2	No.11	97.7	69.3
Mean.	3.10	1.02	Mean.	66.48	43.10
S.D.	1.63	0.63	S.D.	25.37	19.24
SEM.	0.33	0.13	SEM.	5.07	3.85

#### Appendix 18. mPVN における AVP ニューロン活性

<b>SED</b>	c-Fos	Merge	<b>ME</b>	c-Fos	Merge
No.4	1.4	0.3	No.2	24.8	3.5
No.7	1.4	0.6	No.3	26.8	3.9
No.12	0.4	0.3	No.6	41.1	4.8
No.13	1.2	0.3	No.9	29.7	4.1
No.15	2.5	0.5	No.11	43.3	5.1
Mean.	1.38	0.40	Mean.	33.14	4.28
S.D.	0.75	0.14	S.D.	8.49	0.66
SEM.	0.15	0.03	SEM.	1.70	0.13

# Appendix 19. SON における AVP ニューロン活性

<b>SED</b>	c-Fos	Merge	<b>ME</b>	c-Fos	Merge
No.4	0.2	0.1	No.2	18.7	10.0
No.7	0.3	0.1	No.3	16.8	11.0
No.12	0.3	0.1	No.6	26.9	19.2
No.13	0.4	0.2	No.9	21.2	13.2
No.15	0.5	0.1	No.11	17.3	11.3
Mean.	0.34	0.12	Mean.	20.2	12.9
S.D.	0.11	0.04	S.D.	4.13	3.69
SEM.	0.02	0.01	SEM.	0.83	0.74