

DB
1829
2001
HG

博士論文

概日リズムの発生と維持に関する生物心理学的研究

平成13年度

井 深 信 男

(滋賀大学教育学部教授)

寄贈
井深信男氏

03006576

目次

序章	概日リズムとは何か	・ ・ ・ 3
	1. はじめに	
	(1) サーカディアンリズム (概日リズム) の意味	
	(2) 同調とフリーラン	
	(3) 位相-反応曲線	
	(4) 移行期	
	(5) 生物時計の可塑性	
	(6) 温度補償性	
	2. 本論文における検討課題	
第1章	概日リズムの生得的、獲得的基盤	・ ・ ・ 22
	(Nobuo Ibuka(1987) Circadian rhythms in sleep-wakefulness and wheel-running activity in a congenitally anophthalmic rat mutant. Physiology and Behavior, 39, 321-326. を中心に)	
	問題と目的	
	方法	
	結果	
	討議	
第2章	概日リズムの個体発達	・ ・ ・ 36
	(Nobuo Ibuka(1984) Ontogenesis of circadian sleep-wakefulness rhythms and developmental changes of sleep in the altricial rat and in the precocial guinea pig. Behavioural Brain Research, 11, 185-196. を中心に)	
	問題と目的	
	方法	
	結果	
	討議	

第 3 章	生物時計の種普遍性の問題	・ ・ ・ 5 0
	(Ibuka,N., Nihonmatsu,I., and Sekiguchi, S.(1980) Sleep-wakefulness rhythms in mice after suprachiasmatic nucleus lesions. Waking and Sleeping, 4, 167-173. を中心に)	
	問題と目的	
	方法	
	結果	
	討議	
第 4 章	生物時計としての視交叉上核の位置－第二の時計の存在の可能性－	・ ・ ・ 5 8
	(Saito,M., and Ibuka,N.(1983) Decreased food intake of rats kept under adurnal feeding cycles: effect of suprachiasmatic lesions. Physiology and Behavior, 30, 87-92. を中心に)	
	問題	
	実験 1	
	目的	
	方法	
	結果	
	実験 2	
	目的	
	方法	
	結果	
	討議	
第 5 章	概日リズムと季節リズムの関係－視交叉上核の関わり－	
	(Ruby,N.F., Ibuka,N., Barnes,B.M., and Zucker,I.(1989) ・ ・ ・ 6 9	
	Suprachiasmatic nuclei influence torpor and circadian temperature rhythms in hamsters. American Journal of Physiology, 257, R210-R215. を中心に)	
	問題と目的	
	方法	
	結果	
	討議	
	結論と残された問題	・ ・ ・ 8 2
	引用文献	・ ・ ・ 8 8

序章 概日リズムとは何か

はじめに

私たちの体温は、自分では気づかないが、夜に入ると徐々に低下しはじめ、就寝後数時間した夜明け前に最低に達する。そして、朝、目覚める少し前から上昇し始め午後にピークを迎える。このように体温が昼間高く、夜低いというパターンはヒトが、本来的に昼行性の動物であることに由来する。ラットのような、夜行性の動物では、これとは逆に、夜高く、昼低いという体温リズムが観察される。ヒトやラットのこのような体温リズムは、活動を制限しても変わらないので、運動や活動の結果として生み出された人工的な副産物でないことがわかる。このとき、最高体温や最低体温の時刻を調べてみると、驚くほど安定していて、一定である。

体温のほかにも、睡眠・覚醒、活動性、種々のホルモン、酵素活性、尿量や尿より排泄される電解質の量、脳細胞活動、さらには私たちの精神活動まで、実に多くの生理機能や行動が1日の周期で変動している。生理機能や行動にみられる1日周期の生物リズムあるいは生体リズムは、単細胞動物からヒトに及ぶ広範囲の動物において観察される非常に普遍的な生物現象であり、多くの植物においても観察される。

この生物リズムは、間違いなく一日で一回転する地球の自転によって作り出される昼と夜の交代に対する適応の結果として、獲得されたものである。この一日周期の生物リズムは、一年、一月、一週間、半日、数時間などさまざまな周期の生物リズムのなかでも、サーカディアンリズム（概日リズム）とよばれ、最も中心的なリズムであり、広く研究されている。

（1）サーカディアンリズム（概日リズム）の意味

いま、ラットやハムスターの体温を明暗サイクルが正確に24時間で交代する環境のもとで調べると、最低体温に達する時刻はきわめて安定していて、毎日、同時刻となる。換言すると、その周期は正確に24時間である。ところが、動物を温度を一定に維持した明暗サイクル（以下LDと略記）の交代のない24時間の恒常暗（以下DDと略記）、あるいは恒常明（以下LL

と略記)のような環境に移し、そこで体温を記録すると、最低体温に達する時刻は、毎日少しずつ遅れだす。条件によっては、進むこともある。また、最低体温でなく最高体温に達する時刻を調べても同じことが観察される。

Fig. 0-1は24時間周期のLDサイクル条件およびとDD条件のもとでのジャンガリアンハムスターの1日の体温変化の推移を約2ヶ月半にわたって記録したものである。このハムスターを2ヶ月間、短日、寒冷の環境におくと、動物はある日突然、その非活動期に体温を十数度まで下げる。この行動は、デイリー・トーパー (daily torpor) と呼ばれ、ジャンガリアンハムスターやシロアシハツカネズミのような異体温動物で観察される。デイリー・トーパーはこれらの動物が餌の不足する、短日、寒冷な厳しい冬の季節を生き延びるために、最大限エネルギーの消費を節約するために進化させた行動である。

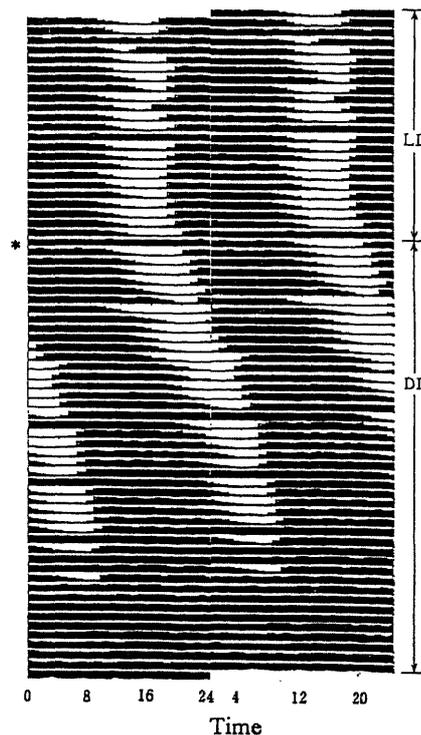


Fig.0-1 A representative example of daily torpor in Djungarian hamster under LD and DD. The experiment was performed under a short photoperiod (LD8:16, L,0900-1700) with cold temperature of 15 °C. White parts indicate body temperature. Ordinate shows days. An animal shows daily torpor synchronized with LD cycles, but free-running rhythms under DD. (Ibuka and Zucker, 1986)

このとき、最低体温の時刻について、周期を計算すると、明暗サイクル

下では正確に 24 時間となるが、恒常環境下では約 24 時間となる。周期が正確に 24 時間ということは、最低体温に達する時刻が毎日同じであることを意味する。これに対し、周期が約 24 時間ということは、最低体温の時刻が毎日、少しずつ遅れるか、進むかを意味する。たとえば、毎日、30 分の遅れの場合には、周期は 24.5 時間であり、30 分の進みの場合は、周期は 23.5 時間である。ヒトの場合も、普通の日常生活では、体温リズムは正確に 24 時間周期を示すが、洞窟のような時間手がかりの全くない環境において生活させると、多くのヒトにおいて、周期が 25 時間に近い値を示すことがわかっている。

恒常環境のもとで示されるこのときの生物リズムの周期を自由継続周期 (free-running period, FRP) という。恒常環境下で個体が示すこのリズムこそが、その個体にとっての本来的な生物リズムともいえる。ヒトでみると個体により、周期が 24.2 時間、24.7 時間、あるいは 24.5 時間と様々に異なるが、多くの事例で 25 時間近いことが知られている。従って、私たちは本来的な 25 時間周期のリズムを、毎日 1 時間修正して、24 時間周期の外部環境に合わせて生活している、といえる。

ある生物リズムをサーカディアンリズムとよぶためには、周期が約 24 時間ということのほかに、このリズムが 24 時間で交代する明暗サイクルや温度サイクルによって誘発されたリズムでないことの証明が必要である。上述のように、温度を一定に維持した明暗の交代のない恒常環境に動物を暴露することも、実はこの要件を満たすための手続きといえる。このような恒常環境のもとで約 24 時間の周期性が認められることは、このリズムが概日時計 (生物時計) によって作り出される内因性 (endogenous)、あるいは自律的 (self-sustained) なリズムの証拠にほかならない。

このように、約 24 時間の周期を持ち、内因性であることが証明された生物リズムをサーカディアンリズムとよぶ。これは、circa: およそ、と dian: 24 時間の、よりなる造語 (Halberg, 1959) であるが、現在では生物用語として広く認知されている。この言葉は、時として、“日周リズム”、“日内リズム

ム"と言われることもあるが、言葉本来の意味からは、"概日リズム"が最も適切である。

これに対し、明暗サイクルや温度のような24時間周期の環境サイクルに
応答して受動的に誘発される生物リズムは、見かけ上、概日リズムと似て
いるが、恒常環境に暴露すると消失するので、両者ははっきりと区別され
ねばならない。この場合、環境サイクルに応答して誘発されるリズムは昼
夜リズム (diurnal rhythm, day-night rhythm) という。

(2) 同調とフリーラン

Fig. 0-1でみたように、多くの動物はその行動、この場合体温であったが、
を24時間の明暗サイクルに合わせることが出来る。このとき、体温リズム
は明暗サイクルに同調している (entrained) といい、この環境サイクルを同
調因子 (Zeitgeber, entraining agent) という。動物はこの同調因子に合わせて
生活しているともいえ、同調因子はこの意味では、いわば時刻を知らせる
時計の役目を果たしている。このとき、同調因子の周期 (T) が24時間から
大きく隔たらない限り、生物リズムはこれに同調する性質を持つことが知
られている。一般的には、同調の範囲は 24 ± 4 時間となることが多い。

明暗サイクルのほかにも、動物では温度、食餌、母親との接触・同居な
どの社会的刺激、が同調因子として有効であることが知られている。しか
しなんと言っても、哺乳類や鳥類のような恒温動物では、明暗が同調因子
として最も有力であり、重要である。

一方、明暗サイクルに代表される同調因子を取り除いた環境に動物をお
くと、そのリズムは自由に動き出す。これは、いわば動物が明暗サイクル
という外部時計を利用できなくなったことにより、正確な時刻あわせが出
来なくなったため、と考えることが出来る。

このように、生物リズムが同調因子の束縛を逃れ、自己の固有周期で自
由に動きだした状態をフリーラン (free-run)、あるいは自由継続の状態にあ
るといい、その時の生物リズムの周期を τ で表す。

周期を計算する際、活動性を指標とすると、伝統的に活動の開始点をとることが多いが、これはもちろん活動の終了点であってもかまわない。活動の開始点をとるのはそれが終了点より明瞭に特定でき、安定し信頼性が高いことによるものである。同じような理由から、体温、ホルモン、酵素活性のリズムでは、最大値から次の最大値、あるいは最小値から次の最小値、までの値が周期の計算に用いられる。またヒトの睡眠では、入眠時刻が用いられる。周期が24時間より長いということは、活動の開始点や体温の最低値が毎日、少しずつ遅れることであり、開始点や最低値を線で結べば Fig. 0-1 のように右下がりになり、逆に24時間より短いことは、前進するので左下がりの図が得られる。

(3) 位相－反応曲線

ラットやハムスターを24時間の明暗サイクルからDDへ移しても、彼らは約24時間周期で、眠り、活動する。このことは、24時間真っ暗であるにもかかわらず、彼らは、休み、眠る時間帯を“主観的に”あくまでも“昼”と感じ、捉えているため生ずることである。おなじように、活動する時間帯は“主観的な夜”と考えられる。このように、DDに移されても動物にとっては、“主観的な昼”と“主観的な夜”がほぼ12時間周期で交代していると考えられている。

時間生物学ではこの主観的な1日の長さをサーカディアン時間 (Circadian time; Ct) で表す。したがって、活動周期のタウが23時間の場合、これがその個体にとっての主観的な1日なのである。そのため、この場合その個体にとっての1時間は57.5分であり、太陽時の1時間より、短くなってしまう。

今、DD下でフリーランしているリズムに対し、Ctのどの時刻で光パルスを与えるかによって、その後のリズムの位相が前進、後退、あるいは変化なし、の3通りの場合が生じる。一般に、主観的な昼の終わり、あるいは夜の始めに光パルスを与えると、リズムの位相は後退し、主観的な夜の終

わり、あるいは主観的昼の始めでは、リズムの位相は前進する。また、主観的な昼 ($Ct_{04} \sim Ct_{09}$) はサイレントゾーンで、光パルスはリズムを前進も後退もさせない。光パルスを与える時刻を主観的真夜中の Ct_{19} に近づけると、ある時点を境として、位相は前進から後退へ、あるいは後退から前進へとジャンプする。このように DD 下でフリーランしているリズムにただ 1 回の光パルスを与えたときの位相変位の量を、サーカディアン時間の関数としてプロットしたものを位相-反応曲線 (phase-response curve) という

(Fig. 0-2)。このような位相-反応曲線が得られるということは、光に対する感受性そのものがサーカディアン振動していて、光感受性がリズムの位相によって大きく異なるためと考えることが出来る。光感受性が主観的な夜において高いことを示す位相-反応曲線は夜行性動物だけでなく、昼行性動物についても得られる。

また、動物種が異なっても、得られる位相-反応曲線の形が大変よく似ているのも特徴的なことである。このことは、種が異なっても概日リズム

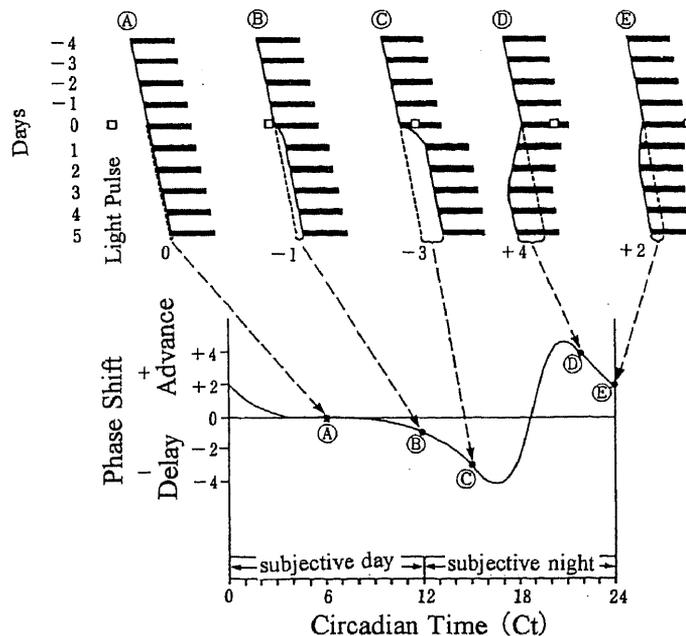


Fig.0-2 Derivation of a phase-response curve. Five experiments with one individual nocturnal animal. A free-running activity rhythm with a period of 25.0 hours is seen on days -4 to -1. On day zero, a light pulse is given at mid-subjective day (A), at late subjective day (B), at early subjective night (C), at late subjective night (D), and at early subjective day (E). The light pulse in mid-subjective day (A) has no effect, whereas the light pulse in late subjective day and early subjective night (B and C) produce phase delays of the activity rhythm that are complete within one cycle. The light pulse in late subjective night and early subjective day (D and E) produce phase advances with several cycles of transients before reaching a steady-state shift by day 5. (Moore-Ede et al., 1982, Fig.2.23).

ムを駆動する概日時計機構が本質的にきわめて類似していることを強く示唆する。

さらに位相－反応曲線からいえることは、1回の光パルスにより位相変位の後退は短時間、多くの場合1日で、完了するが、前進の場合には数日の後に定常状態に達する性質も重要である。これは東西に飛行した場合、同じ時間であっても、西への移動の方が東への移動に比べ、早く現地時間に同調することができることの基礎を与えている。

約24時間の周期でフリーランしているリズムが、24時間周期の環境サイクルに同調できるのも、この位相－反応曲線から推測される。このように、位相－反応曲線は生物リズムの背後にある概日時計機構の性質について、多くのことを教えてくれる。

(4) 移行期

明暗サイクルのような同調因子を時間軸上に沿って前進または後退させても、生物リズムは翌日から直ちに新しく移動された同調因子に同調するわけではない。多くの場合、何日かの後に初めて、移動された同調因子に再同調するという過程をとる。この再同調に要する期間を移行期 (transient) とよんでいる。

移行期の存在もまた、概日リズムが明暗サイクルによって誘発された受動的な生物現象でないことをはっきりと示すものである。なぜならば、もしこの生物リズムが明暗サイクルによって惹起されたものであるならば、環境サイクルを移動した翌日に、再同調が完了するはずだからである。従って、移行期の存在もまた、概日リズムが自律的に振動する現象で、明暗サイクルのような環境は単にそれを同調させる役割しかもっていないことをはっきりと示すものである。

私たちはこの移行期の存在を日常的に体験することができる。時差のある土地に飛行機で短時間に移動した場合がそれである。たとえば、東京－

サンフランシスコでは時差が7時間あるが、夕方成田を飛び立つと、同日の午前中にサンフランシスコに到着する。しかし、もちろん、私たちの体は日本時間で依然として動いているので、著しく眠く、動きも鈍く、頭もさえないような惨めな状態にある。現地時間に合わせて、快適な生活が出来るようになるまでには数日を要する。

この移行期に伴う心身の乱れが、いわゆる時差ぼけ (jet lag)、あるいは非同期化症候群 (desynchronized syndromes)とよばれるものである。しかも、時差の大きさ (時間) が同じであっても、西→東へ飛行する場合と、東→西へ飛行する場合では、再同調に要する時間が異なり、一般に東→西への移動のほうが西→東への移動より、現地時間に適応するのに要する時間は短い。したがって、日本を起点とすれば、時差が同じであってもヨーロッパへの飛行の方がアメリカへの移動より、短時間で現地に慣れることになる。

実験室で、明暗サイクルの位相を変化させることにより、これと似た事態をシミュレートすることが出来る。たとえば、LD12:12 (L, 08:00 ~ 20:00)のもとで、ラットの睡眠・覚醒リズムを記録すると、1日の睡眠の70%以上が明期の12時間に集中して起こる。このとき、明暗サイクルの位相を6時間前進、あるいは後退させ、新しく移動した明暗サイクルへの再同調の過程を調べた (Fig. 0-3)。

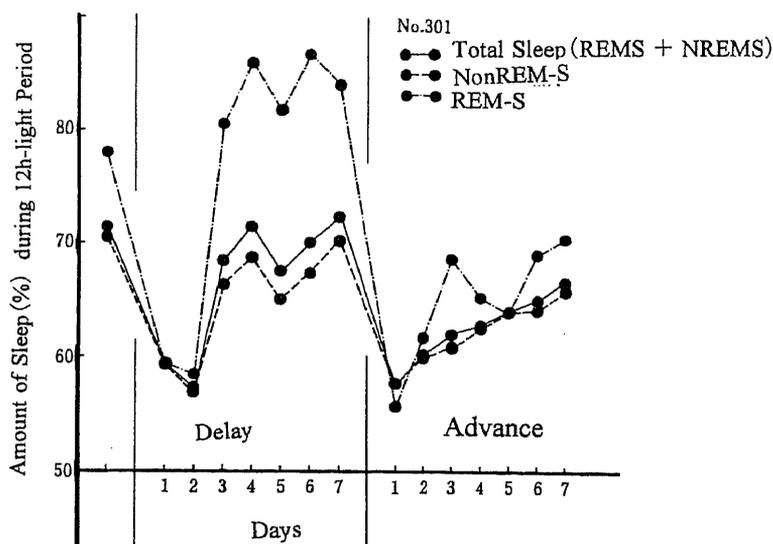


Fig.0-3 A reentrainment process of sleep to 6 hour phase-advanced and phase-delayed LD cycles in a rat. It takes 2 fold time to reentrain in advanced phase-shift than in delayed phase-shift. (Ikegami and Ibuka, 1985).

Fig. 0-3 からわかるように、6 時間の明暗サイクルの後退の場合にはほぼ 4 日で新しく移動された明暗サイクルに再同調しているのに対し、前進の場合には 7 日を要していることがわかる。

実験室での明暗サイクルの後退は、日没を追って東→西への移動に相当し、前進は日の出をめざして西→東への移動に相当する。このように、明暗サイクルの変異量（時差）が同じであっても、後退（東→西）の方が前進（西→東）より再同調に要する時間が短くて済むのは、ひとつには、ヒトや動物の本来的な周期が 24 時間より長いことと関係している。このことはまた、光パルスを与えたとき、その後のリズムの位相変位は後退の場合、多くの場合翌日に完了したが、前進では数サイクルを経た後に安定し、定常状態に達することを示す位相-反応曲線からわかるように、理論的に予測されることである。

（5）生物時計の可塑性

概日リズムの周期が約 24 時間であることを先に述べたが、同調因子という環境要因によって、その個体の固有周期であるタウ (τ) をどこまで変えられるのか、これも問題である。

動物種や概日リズムの指標として何を採用するかによって、若干変わることもあるが、一般的にはこのサーカディアン周期は生まれた後の環境サイクルの経験によっても、ほとんど変わらないことがわかっている。

明暗サイクルの周期が 28 時間と 20 時間の環境で飼育された母親から生まれたマウスはこれらの明暗サイクルに同調して、活動し休息する。ところが、恒常暗の環境に移されると、これらのマウスは、まるでそれまでの飼育環境の影響が全くなかったかのように、すぐにその個体に固有の周期でフリーランする (Fig. 0-4)。確かに、明暗サイクルという同調因子が存在したときには、動物はある範囲でこの同調因子に同調することが出来た。しかし、それは、あくまで活動性という表現型を環境因子に合わせただけのことで

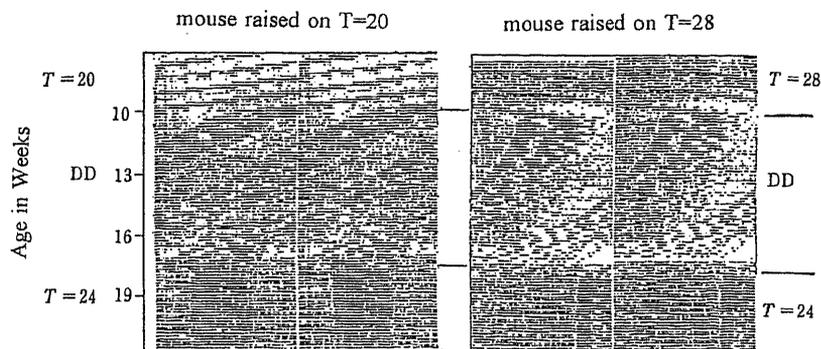


Fig.0-4 Activity records of two mice raised on 20-h light/dark cycles (T=20) and 28-h light/dark cycles (T=28). Constant darkness indicated by DD. Mice are entrained with LD cycles under each condition, but activity rhythms begin to free-run under DD in each case. (Davis and Menaker, 1981, Fig.2)

あって、生物時計本来の周期を永久にかえてしまったということではない。

明暗サイクルの周期が 18 時間、あるいは 32 時間というように、 24 ± 4 時間のいわゆるサーカディアンレンジを超えた場合にも、これに同調できず、自己の固有周期でフリーランすることが知られている (Fig. 0-5)。この意味で、生物時計の周期を環境サイクルの力によって作り変えることは、きわめて困難であると言わねばならない。つまり、環境サイクルは動物の概日リズムを同調させるという意味では、リズムに影響するが、一時的な効果しかもたず、恒常環境に暴露されると、リズムは今までの環境サイクルの制約を捨てて、すぐに自己の固有周期でフリーランする。これらの研究結果から、生物時計の周期の可塑性はきわめて低いことがわかっている。

6) 温度補償性

生体现象の多くは、生体内の生化学的な代謝反応の結果として生ずる。この生化学的な反応の速さは、試験管内では周りの温度によって大きく左右され、温度上昇に伴って反応のスピードは上昇する。このとき、温度

10℃上昇させたときの反応速度の増加率を Q_{10} であらわす。すなわち、
 $Q_{10} = 10^\circ\text{C}$ 上昇したときの反応/元の温度での反応、である。温度を 10℃ 上
 昇させても、生物事象の反応速度に全く影響を与えない場合には、 $Q_{10} = 1$
 となるが、反応速度が 2 倍になったとすると $Q_{10} = 2$ となる。概日リズムでい
 えば $Q_{10} = 2$ ということは、周波数が 2 倍になること、換言すれば、周期が
 1/2 になることを意味する。

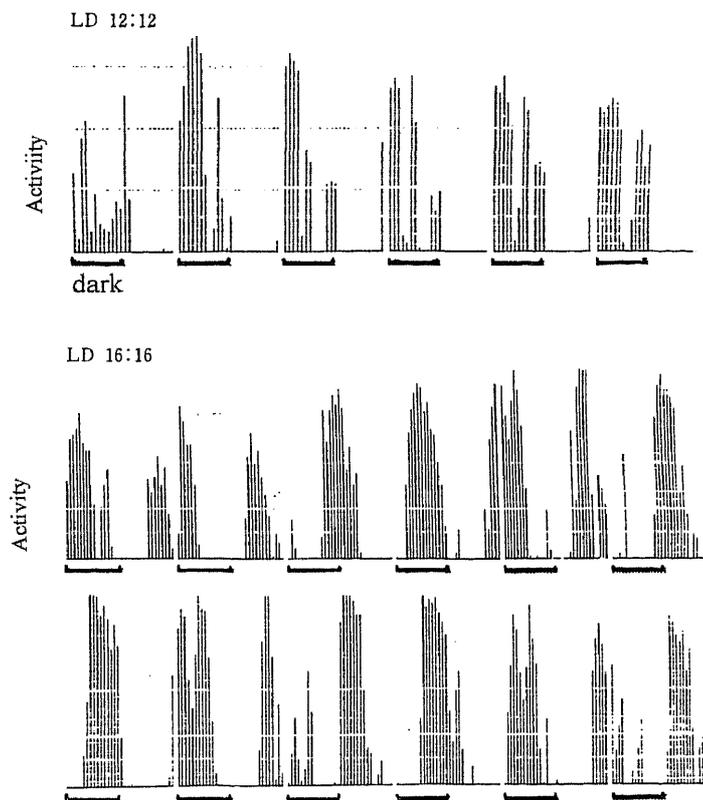


Fig.0-5 Desynchronization of activity rhythm in C57BL/6 mouse. Activity rhythm can be entrained in LD12:12, but free-runs when an animal is transferred to LD16:16. (Ibuka and Sekiguchi, 1977)

概日リズムの周期が周りの温度によってどの程度変化するかも、生物時計の性質を考えると、重要な問題となる。

爬虫類、両生類、魚類の活動性は周囲の環境温度に大きく左右される。

一方、概日リズムは、他の生物現象に比べると、 Q_{10} の値が 1 に近いことが知られている。言い換えると、周りの温度が 10°C 上昇しても、その周期はほとんど変化しない。この性質を概日リズムの温度補償性 (temperature compensation)、あるいは温度不依存性 (temperature independence) とよび、概日リズムの重要な性質の一つである。

概日リズムの温度不依存性は生物にとって重要である。なぜなら、周りの温度が変化するたびに、時計の精度に狂いが生じるなら、時間を測り、来るべき環境変化を予測し、対処するという生物リズム本来の機能が大きく損なわれてしまうことになるからである。

温度補償性に関する研究は、温度がその動物の生活に大きな影響を与える変温動物で多くなされている。恒温動物である哺乳類や鳥類は、周囲の環境温度に左右されず、 $37 \sim 38^{\circ}\text{C}$ の体温を維持できる。このことから、恒温動物に比べ、変温動物において温度補償機構はより強固に備わっていることが予想される。

さらにまた、哺乳類の中でもリスやコウモリのような冬眠動物は、ラットのような非冬眠動物と比べ、概日リズムの温度補償性はよく発達している。前者では $Q_{10}=1.01 \sim 1.13$ に対し、ラットでは $Q_{10}=1.2 \sim 1.4$ とされている (Gibbs, 1981; Moore-Ede ら, 1982)。冬眠動物においても、冬眠中といえども基礎代謝は著しく減少するものの、生物時計は停止することなく、動き続けているものと考えられる。冬眠時に、体温を著しく低下させたことにより、時計機構が作動しなくなったのでは、いつ冬眠から目覚めるかを知ることが出来ない。実際に、冬眠下にあってもキンイロジリスやシリアハムスターはきわめて規則的に一定の間隔で目覚めていることがこれまでの研究で知られている (Barnes ら, 1986; Ueda & Ibuka, 1995; Ibuka & Fukumura, 1997)。

周囲の温度の変化によって時計機構に狂いが生じないことの保証、これも生物リズムの重要な性質である。しかし、どのような機構でこの生物時計の温度補償性という性質が保護されているかについては不明な点が多い。

2. 本論文における検討課題

これまで述べてきたように、概日リズムについてはいくつかの性質が明らかにされ、行動レベルで多くの知見が得られている。その一方、本論文で取り上げた問題は、今日においてもなお、概日リズム研究において、未解決、未開拓な領域であるか、あるいは過去の研究データが乏しく、充分吟味された実験デザインが採用されていないため、当該問題に対する結論が得られていない分野である。以下に、何が問題とされねばならないかを明示した。

(1) 1章において、概日リズムの発生は生得的な基盤を持つのか、あるいは獲得的な基盤の上に形成されるのか、の問題を取り上げた。ヒトでこの問題の解答を得ることは困難である。そのためヒト以外の動物で、実験計画的に、24時間周期で交代する環境サイクルを生まれたときから動物に経験させることなく育て、成体になったときのリズムを記録し、その周期性を検討する方法が考えられる。通常の実験室環境では、環境サイクルとして変動する最大の要因が明暗と温度である。より具体的には温度一定の条件で、24時間暗、あるいは24時間明のもとで動物を出産時から育てることになる。あるいは、全く明暗の環境サイクルの交代を生まれたときから経験したことの無い動物モデルのリズムを調べるやり方は、もっとこの問題の解決に適しており、優れている。そのための方法として、先天性無眼球症ラットあるいはマウスにおいて、睡眠・覚醒リズムや活動性リズムを調べることが考えられる。しかしながら、この研究は知る限りにおいて、後述のようにわずかで、データの蓄積は不十分であり、実験デザインでも充分と言えない。このような理由から、1章において、概日リズム発生の問題を突然変異の無眼球症ラットを用いて検討した。

(2) 次に問題となるのは、この概日リズムが個体発生的にいつ頃形成

されるか、ということである。発達問題は、遺伝・環境、すなわち生得・経験の相互作用の研究にとって極めて重要である。発達を考えると、興味もたれるのは、出生時における脳の成熟度の違いに由来する晩熟性動物と早熟性動物の存在である。前者の動物は、出生時において運動機能や感覚機能は極めて未発達で、体温調節も不良である。そのため、その生存を親に大きく依存する。また、脳の大きさも、生後大きく増大し、出生時に比べ、ラットやマウスでは9～11.7倍 (Portmann, 1961)になる。これらの動物の妊娠期間は短く、一度に生まれる産仔数の多いのが特徴である。

これに対し、出生時の脳の成熟度が極めて高いため、運動、感覚機能が良好な動物が早熟性動物である。これらの動物は、妊娠期間が長く、一度の産仔数は通常1仔であり、その形態も親のミニチュアで生まれてくる。牛や馬、鹿などがその代表であり、脳の大きさも、生後直後から大きく、その後成体でも1.4～1.8倍 (牛・馬)、あるいは2.3から2.5倍 (鹿)に留まる。実験室動物としてはモルモットがその代表と言えるだろう。

概日リズムの個体発達を考えると、この視点は非常に重要である。しかしながら、睡眠・覚醒の概日リズムを記録するには電極類を頭蓋に慢性的に埋め込む必要がある。これに加えて、個体発達を追うには生後出来るだけ早い時期から、記録を開始する必要がある。しかしこの時期では、未だ動物が幼弱なことと、長期にわたる記録の必要性から、ヒトでの行動観察にもとづく研究を除けば、睡眠・覚醒の概日リズムの個体発達はこれまで全くといってよいほど研究されていない。

2章では、睡眠・覚醒の概日リズムの個体発達をこれらの晩熟性、早熟性という動物の種特異性に注目して明らかにすることが課題である。

(3) 近年、脳損傷実験、ニューロン活動記録、2DGを用いた生化学実験、あるいは脳破壊によりリズムを消失したラットへの移植などにより、概日リズムを生み出す生理学的実体である概日時計 (生物時計) が、視床下部視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) にあることが確立したが、こ

これらの知見はラット、ハムスターから得られたものである。生物科学で一般的に使われることの多いマウスにおいて、概日時計の共通性を確認できれば今後の研究に大いに貢献できる。

心理学に限らず、普通、科学は法則の個別性を捨て、普遍性・一般性を求めることを意図している。この意味からも、ラットやハムスターの実験で得られた視交叉上核が、種を超えてこれらの動物以外の他の動物にも概日時計として妥当するのかを検討することは重要である。本来的な望みさから言えば、この問題の解決には多くの種で検討することが望ましいに違いないが、自ずと実験動物としての限界もある。しかし、少なくとも、ラット、ハムスターの近縁種であるマウスにおいて、視交叉上核が概日時計として機能すること明らかにすることは必要であり、概日リズム研究で残された課題である。

(4) 視交叉上核が齧歯類を代表とする哺乳類において、概日時計であることは、確立しているといってもよい。問題は視交叉上核以外に第二の概日時計を仮定しないと、説明できない現象が概日リズムにおいて存在することである。4章でこの第二の概日時計の存在を問題にする。

ヒトは、前述のように、時間手掛かりを欠く環境に長期間おかれると、ある時からそれまで同調していた睡眠・覚醒のリズムと体温のリズムが同調を止め、異なった周期でフリーランすることが知られている。この現象は内的脱同調といわれ、睡眠・覚醒と体温のリズムを生み出す概日時計が別個に存在する証拠として、理解されている。つまり、1個体のなかに少なくとも睡眠・覚醒と体温の概日リズムを駆動する二個の時計が存在している。複数の概日時計が存在することの証拠として、内的脱同調のほかにも、リズム分割があげられる。

ラットなどの齧歯類でも、SCN以外に第二の概日時計は存在するのであろうか。この問題の解決へのアプローチには、古くから心理学で知られている制限給餌法が有効である。ラットにおいて、1日に与える餌を2～3

時間に制限して与えると、動物はやがて、餌のもらえる時刻を予期して、給餌時刻の1～2時間前から活動性が高まることが知られている。面白いことに、この制限給餌時間を18時間周期、30時間周期のように24時間から大きく隔てると、この予期的活動の亢進は観察されない。このことから、動物は、単に時間学習をしているのではなく、何らかの形で概日時計を利用して時刻を知り、予期的なリズムを形成していることがわかる。

この実験パラダイムは体温やコルチコステロンの予期的亢進のリズムを作り出す時にも採用されている。ところが、ラットで概日時計であるSCNを破壊し、時計としての機能を喪失した場合にも、体温とコルチコステロンの予期的亢進の概日リズムは観察されたのである（Krieger, 1977）。この事実はSCN以外にも、概日リズムを作り出す時計機構が、ラットにおいても存在することを示すものである。脳にSCN以外に強力な時計機能を果たす部位が存在するのか、実はこの問題も概日リズム研究において現在も解決されていない。4章で、この問題を新しい実験パラダイムを開発することにより検討した。

(5) 概日時計が他の周期の生物リズム、特に季節リズムにおける発振機構として機能するのか、これも研究されねばならない課題である。多くの生物は概日リズムのほかに、さまざまな生物リズムを示す。なかでも、寿命が相対的に長い哺乳類は、概日リズムに加え、1年周期の季節変化に適応した季節リズムを進化させた。

この季節リズムを誘発させる最大の環境要因が日の出から日没までの時間、すなわち日長、と気温の変化である。実験室では、普通、1日における明暗比の変化により季節変化をシミュレートする。ハムスターを短日に長期間暴露すると、数週間のうちに精巣や卵巣は萎縮しはじめ、十数週間後に、その萎縮は最大に達する。このように動物が日長変化に応答して、その生理機能や行動を調節する仕組みを光周性（photoperiodism）といっている。

この光周性の性質はラット、マウス、モルモットなどの実験動物としての長い歴史を持つ動物ではすでに失われてしまったが、近縁の齧歯類のハムスター類ではなお維持されている。哺乳類では光の情報は眼から入り、網膜－視床下部路 (retino-hypothalamic tract) より、概日時計である視交叉上核 (SCN) に達し、室傍核、IML 核を経て、上頸神経節 (SCG) より松果体に最終的に達する (Fig. 5-1 参照)。そこで産生されるホルモンのメラトニンは、ハムスターのような長日繁殖種 (春繁殖種) では、視床下部に働きかけ、短日下では性腺刺激放出ホルモン (GnRH) の分泌を抑え、性腺の発達を抑制する。

この性腺の季節変化以外にも、ジャンガリアン・ハムスターは短日寒冷環境への長期暴露により、デイリー・トーパー (daily torpor, 日内休眠) や毛色の変化などの季節リズム行動を示すことが知られている。これらの季節行動は、1日の暗期に対応して分泌されるメラトニンによって調節されている。そのため松果体は、いわば、一日の暗期の長さの情報をメラトニン分泌の量に変換するトランスジューサーともいえる。秋冬の短日では夜 (暗) が長く、メラトニンが多量に長時間分泌されることになるので、性腺は萎縮する。

このように季節行動の発現には松果体が深く関係していることが知られている。しかしながら、前述のように明暗期の長さの情報は概日時計である視交叉上核 (SCN) を経由して、松果体に達するので、この季節リズム行動にも概日時計である視交叉上核の積極的な関与が推論される。また、季節リズム行動のなかでも、デイリー・トーパーは、その現象が最近になってやっと正確に記述されるような珍しい行動であり、その発現機構については全く明らかにされていない。

一方、時間生物学でも、概日リズムは概日リズムとして、季節リズムは季節リズムとして自己完結的に個別的に扱われ、研究されていて、両者の関係を問題にする研究はほとんどなく、未開拓な領域である。しかし、季節行動発現に重要な役割を果たしている季節時計とも言える松果体と概日

時計である視交叉上核(SCN)の神経連絡をみれば、SCNが季節行動に積極的に関与していることが、十分予想される。この問題への取り組みも、今後の生体リズム研究になくてはならない視点といえ、5章の課題とした。

このように、いま述べたような問題意識をもって、概日リズムの発生と維持機構の問題を生物心理学的な視点からアプローチする。ここでいう“生物心理学的”の意味は、分析の対象とした反応が本論文では睡眠・覚醒、活動量、摂食量、デイリー・トーパーのように、主として行動レベルを問題としたからである。

第 1 章 概日リズムの生得的、獲得的基盤

Nobuo Ibuka(1987) Circadian rhythms in sleep-wakefulness and wheel-running activity in a congenitally anophthalmic rat mutant. *Physiology and Behavior*, 39, 321-326. を中心に

第1章 概日リズムの生得的、獲得的基盤

『先天的無眼球症ラットにおける睡眠・覚醒リズムと 回転輪活動の概日リズム』

問題と目的

ある形質が遺伝された情報に基づいて発現するのか、あるいは生まれた後の環境に曝されたことによって獲得されたものなのか、の問題は古くから多くの分野で関心が持たれてきた。この問題は、心理学では、“氏か育ちか”のテーマのもとで研究され、今日においても、なお古くて新しい問題である。ヒトの知能や性格形成に関与する遺伝要因や環境要因の寄与については双生児法や家系研究を用いて多くの研究がなされてきた。

一方、動物ではラットの選択交配、近交系マウスの系統比較、交雑実験などにより情動性、学習能力、活動性、などの行動形質について研究がなされてきた。1章では、このような背景を踏まえ、概日リズムの発現に関与する遺伝要因と環境要因の役割を突然変異種の先天性無眼球症ラットを用いて、実験検討した。

突然変異による先天性無眼球症動物は、概日リズムが出生後から24時間の明暗サイクルに暴露されたことにより獲得されたものなのか、あるいはこのリズムが明暗という環境サイクルに暴露されることを必要としない先天的に備わったもの、かを確定するのに適した実験動物である。これまで、マウスとラットの無眼球症モデルを用いた概日リズム研究はわずかであり、十分な情報が得られていない (Faradji ら, 1980; Richter, 1971)。先行の ZRDCT/An マウスを用いた睡眠・覚醒の概日リズム報告では、1眼球が残存していたにもかかわらず、明暗サイクルへの同調が不可能であった (Faradji ら, 1980)。しかし、この報告は、明暗サイクルへの同調を調べるときに必要とされる明暗サイクルの位相を移動し、後退または前進した明暗サイクルへの再同調への過程をみる、という手続きをとらない致命的欠陥をもつ。

本実験は無眼球症ラットを用い、先行研究のこの欠陥を克服し、同時に睡眠・覚醒と回転輪活動の概日リズムの基本的特徴を調べることを目的とした。

方法

睡眠・覚醒： ドンリュウ系統由来の一番（つがい）の先天性無眼球症ラットを実験動物中央研究所（川崎）より分与してもらい、滋賀大学心理学実験室コロニーで飼育繁殖させ、その仔を実験に使用した。睡眠・覚醒リズムを記録出来た動物は生後3～5ヶ月の雄11、雌1の12匹であった。12匹の動物の内、10匹は完全な両眼球欠損で、2匹は1眼球のみ欠損していた。他に両眼球健全な2匹のドンリュウ系ラットを統制動物として用いた。これらの動物の飼育環境は実験開始まで(LD 12:12, L08:30～20:30)で

Table 1-1

SUMMARY OF TOTAL NUMBER OF DAYS AND THE ENVIRONMENTAL LIGHTING CONDITIONS FOR THE SLEEP-WAKEFULNESS RECORDING FOR EACH RAT

Subject No.	Eye	Total Number of Days and the Lighting Conditions
233	BA	6 (LD)
234	BA	7 (LD)
240	BA	11 (LD), 6 (LL)
241	BA	7 (LL)
242	BA	7 (LD)
245	BA	6 (LD)
246	UA	18 (DPS)
247	UA	12 (DPS)
249	BA	6 (LD)
250	BA	8 (DPS)
251	BA	6 (LD)
252	S	8 (DPS)
253	S	10 (DPS)
254	BA	7 (DPS)

BA: bilaterally anophthalmic, UA: unilaterally anophthalmic, S: sighted. LD: the light-dark cycle, LL: constant light, DPS: 6 hr delayed phase-shift. The rats except for No. 234 are all male.

あった。前頭、後頭部よりの皮質脳波と頸部筋電図を記録するためのネジ電極と針電極をDavid-Kopf社の脳定位固定装置を用いて、ペントバルビタール麻酔下(50 mg/kg, ip)で慢性的に動物に埋め込んだ。それに加えて両眼球健全動物に対しては、眼

球運動記録用の銀針電極を両眼球脇に埋め込んだ。これらの電極はアンフェノール社の9ピンのプラグにまとめられ、デンタルセメントで頭蓋に固定された。リード線はエアープリシジョン社のslip-ringに連結されたので、動物は装置内を自由に動き回ることが出来た。動物は床敷の敷かれた直径

30 cm, 高さ 36 cm のガラス容器に入れられ、電氣的にシールドされた温度一定(23±2 °C) の防音室で、明暗サイクル(LD12:12; L, 08:30 ~ 20:30)あるいは連続照明(LL)で脳波、眼球運動、筋電図がポリグラフ記録された。餌と水は自由に摂取できた。装置床面での明るさは 95 ルクスであった。

睡眠・覚醒リズムの記録は日本光電社の脳波計で、長期間の記録を考慮し、通常より遅い紙送り速度(60 mm/min)で行った。脳波記録は LL あるいは LD で最低 6 日連続して行った。1 眼球残存ラットにおいて、明暗サイクルへの同調を調べるため、明暗サイクルの位相を 6 時間後退させ、それへの再同調の過程を調べた。記録されたポリグラフを 10 秒単位で、視察により高振幅脳波と低振幅筋電図を特徴とする徐波睡眠(SWS)、低振幅脳波と筋電図の完全消失を特徴とした逆説睡眠(PS)、低振幅脳波と高振幅筋電図を持つ覚醒(awake)の 3 相に分類し、これらの値を電算機(HITAC10II)処理し、必要な SWS、PS についての情報を得た。Table 1-1 に睡眠・覚醒リズムを記録した日数とその時の環境条件を動物ごとにまとめた。

回転輪活動性：12 匹の両眼球欠損ラット(♂6、♀6)を用いた。回転輪活動記録装置は直径 36cm の回転輪に餌と水が自由に摂取できる附属ケージ(40×15×14 cm)とで構成されていた。原則として連続 22 日間(LD12 日、LL10 日)の活動性を記録した。2 匹の動物については、活動性記録後、睡眠・覚醒リズムをも記録した。活動性は 15 分ごとに集計され、電算機処理された。

すべての実験終了後、麻酔薬の過剰投与で動物を安楽死させ、脳を生理食塩水で還流し、ホルマリンで固定した後、凍結標本を 50 ミクロンに切り出し、クレシールバイオレット法で染色した。そして顕微鏡下で視交叉上核(SCN)を組織学的に調べた。

結果

睡眠・覚醒リズム：調べた 10 匹の両眼球欠損ラットすべてにおいて、明暗サイクル(LD)と連続照明(LL)下でSWSとPSの二相の概日リズムがみられた。代表的な睡眠・覚醒リズムの事例を Fig. 1-1 に示した。この動物では、LD 下で睡眠は暗期中頃より多発し18時間程度持続するが (Fig. 1-1, upper, 連続 11 日の記録)、LL に移しても、睡眠が多発する概日リズムは消失すること

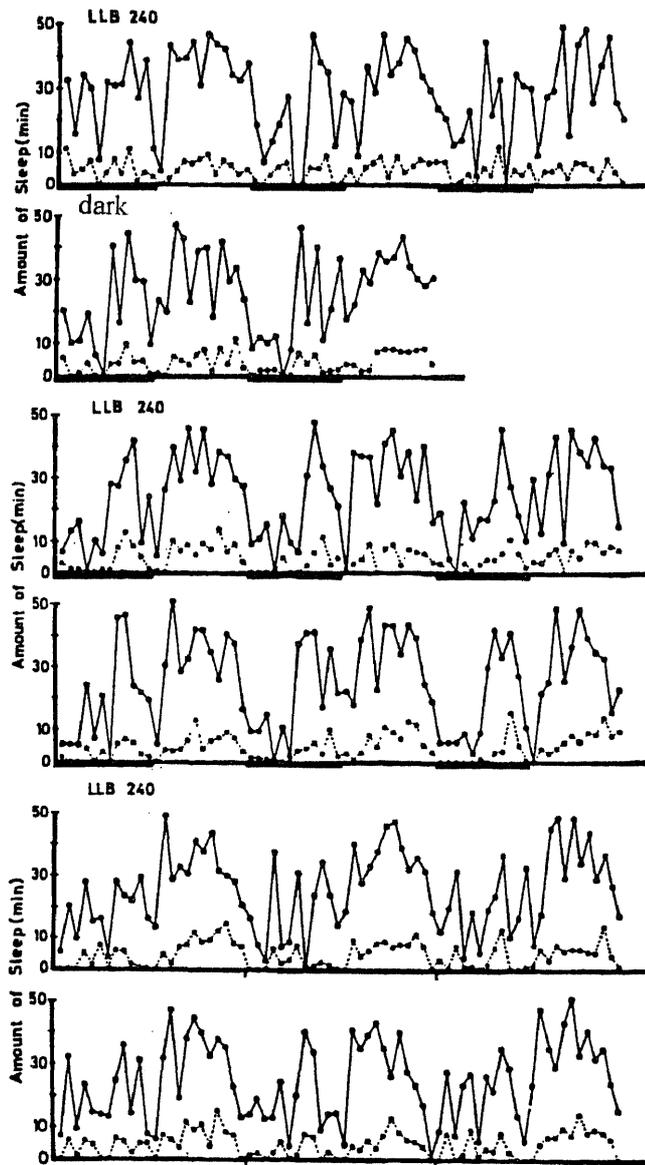


Fig.1-1 The circadian sleep-wakefulness rhythms in an aphthalmic rat for 11 consecutive days under LD cycles and 6 consecutive days under LL. SWS as well as PS shows clear circadian rhythms in both conditions. Solid line: SWS, dashed lines: PS.

はない (Fig. 1-1, lower, 連続 6 日の記録)。

同じ動物の LL 下での連続 6 日の睡眠覚醒リズムの記録 (Fig.1-1, lower) にもとづく SWS と PS のパワー・スペクトル分析は、24 時間成分が SWS と PS 相に優勢であることがいえる (Fig. 1-2)。しかしながら、睡眠が多発する時刻は、両眼球欠損のため、個体によって異なっていた。それに対し、統制群の両眼球健常の 2 匹の動物の睡眠は明期に多発し、暗期に減少するリズムを示し、明暗サイクルに同調していた。両眼球欠損

ラットと健常ラットの間には、一日あたり睡眠量やPS周期のような睡眠構造に差はみられることはなかった。

一方、1眼球が残存していた2匹のラットにおいて、明暗サイクルへの同調を調べる目的で、明暗サイクルを6時間後退させた。1眼球欠損ラッ

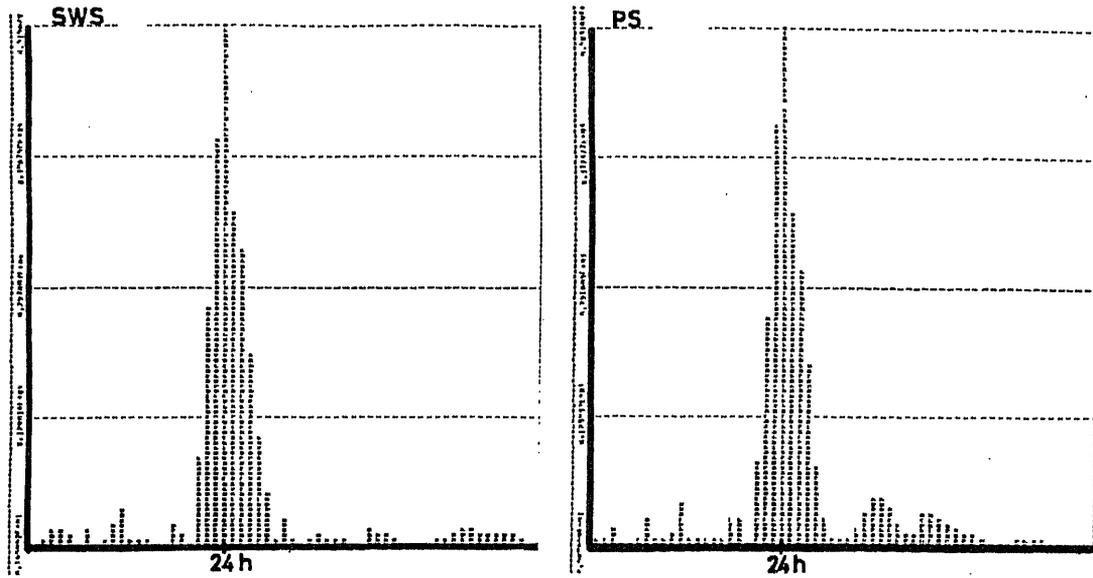


Fig.1-2 Power spectrum of SWS and PS in the anophthalmic rat shown in Fig.1-1 The analysis was performed on 6 consecutive days under LL condition. Twenty-four hour peaks can be detected clearly in SWS as well as in PS. Ordinates: power in arbitrary unit, abscissae: period.

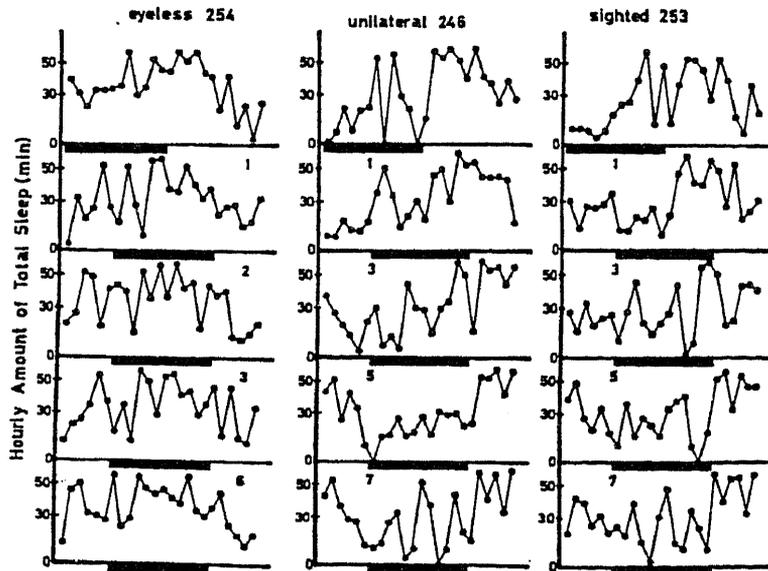


Fig.1-3 The reentrainment of total sleep (TS) after the delaying phase shift of the LD cycle in a unilaterally anophthalmic and a sighted rat. Note the absence of reentrainment in a bilaterally anophthalmic rat. Total sleep (TS) represents the cumulative total of SWS and PS.

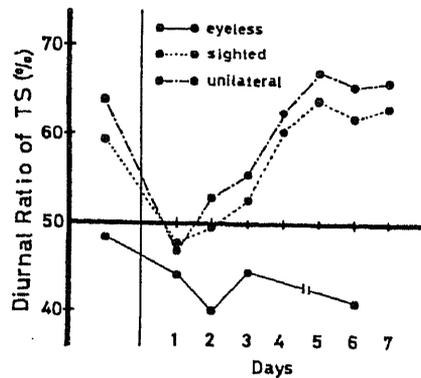


Fig. 1-4 The reentrainment process of TS in terms of the diurnal ratio for the unilaterally anophthalmic and the sighted rat shown in Fig. 1-3 after a delaying phase shift of LD cycle. Note the similar transient period in the unilaterally anophthalmic and the sighted rat.

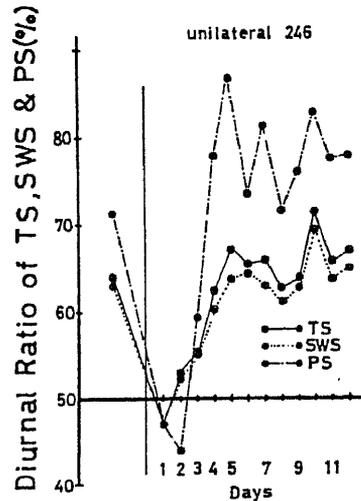


Fig. 1-5 The reentrainment process of SWS and PS stages to the phase shift in the same unilaterally anophthalmic rat as shown in Fig. 1-4. PS responds differently from SWS to the delaying phase shift. TS shows the cumulative total of SWS plus PS.

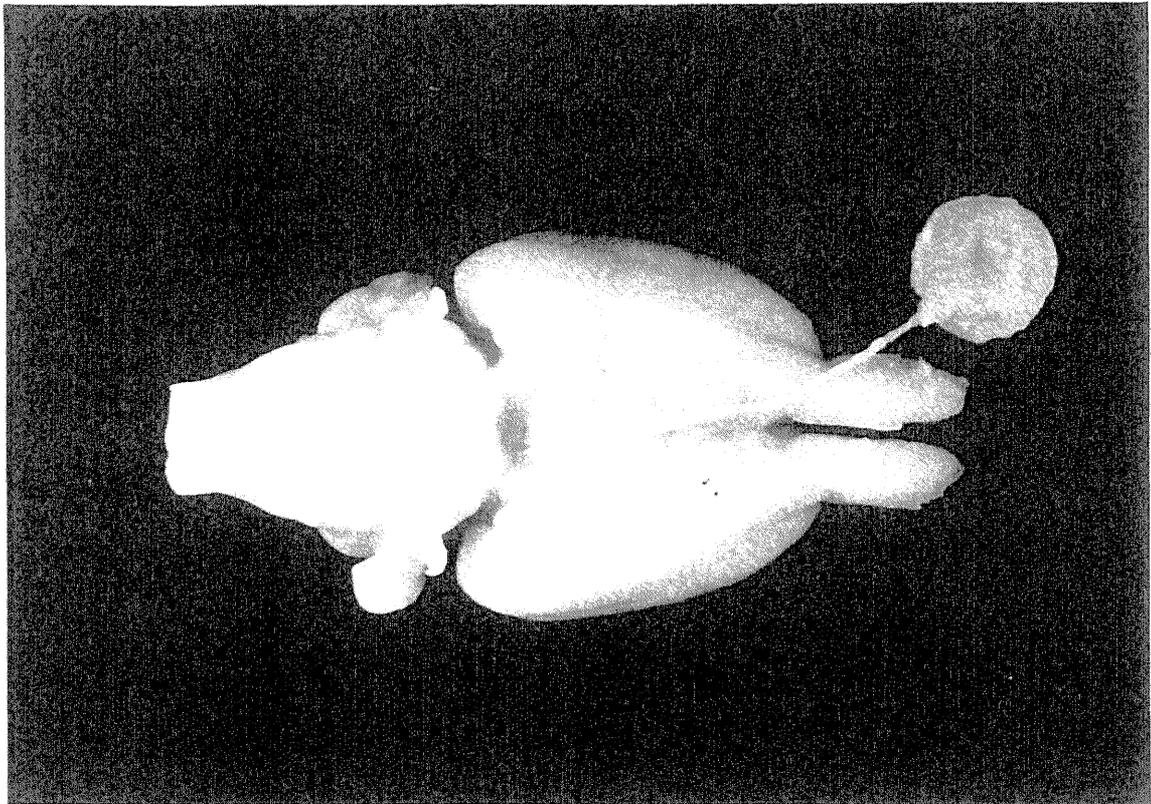
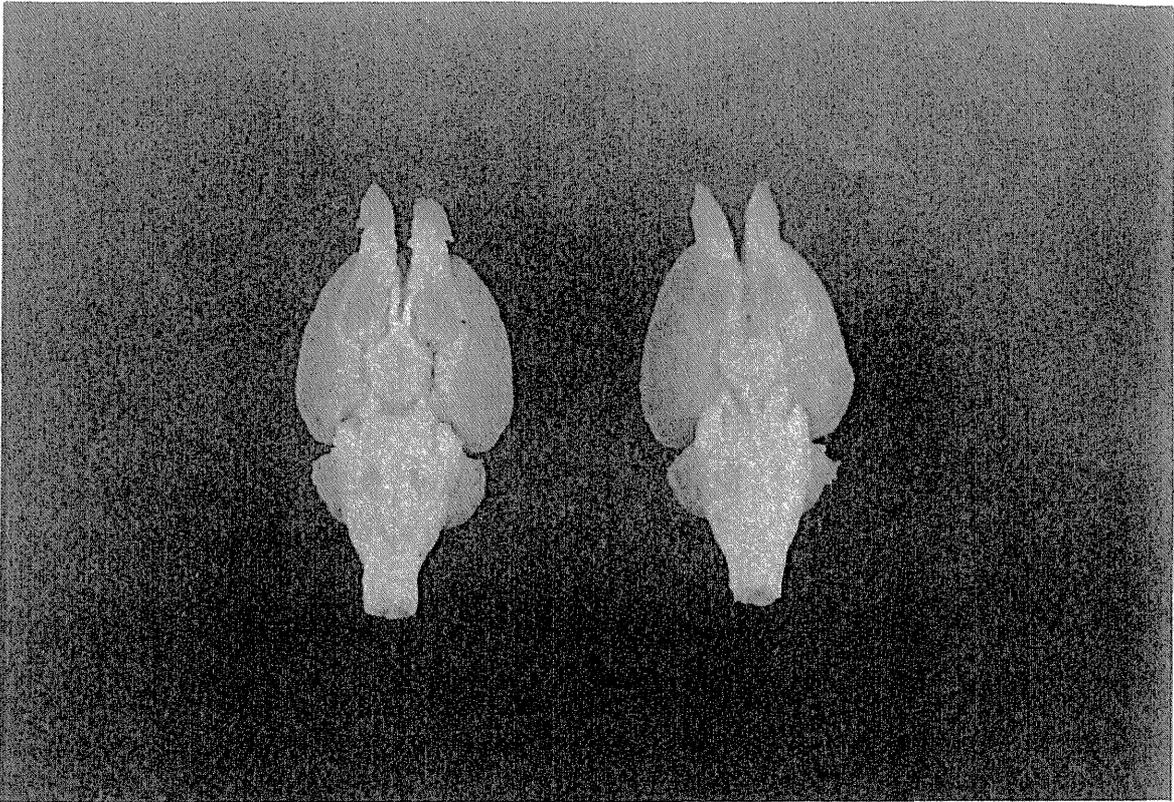


Fig. 1-6 Upper figure: Ventral view of optic nerve and optic chiasma for an anophthalmic rat (right) and a normal rat (left). An anophthalmic rat lacks completely optic nerve and optic chiasma.
Lower figure: An example of optic nerve and optic chiasma in an anophthalmic rat with intact one eye.

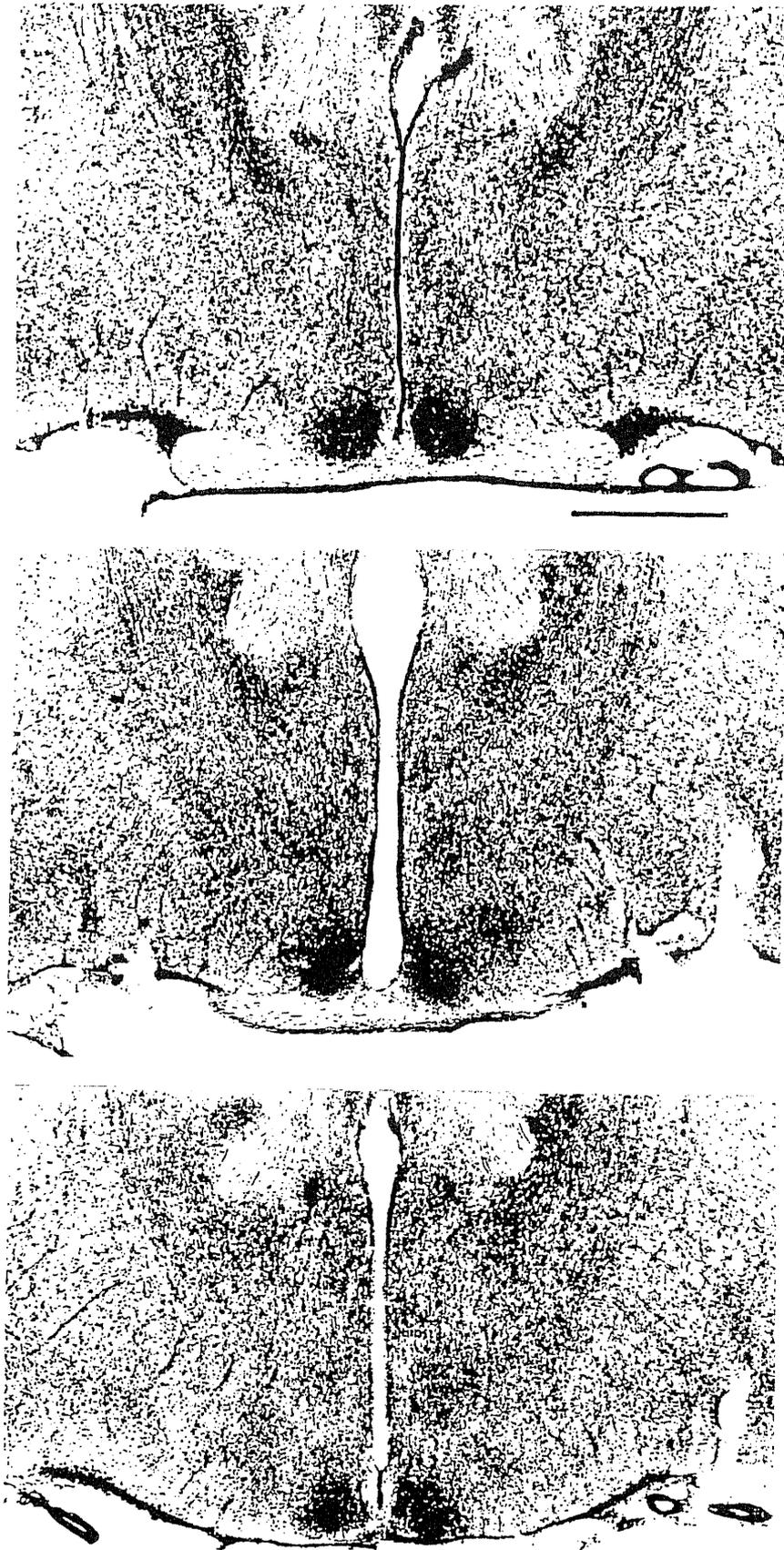


Fig.1-7 A representative photomicrograph of the SCN region and optic chiasma for a sighted (top), a unilaterally anophthalmic (middle) and a bilaterally anophthalmic rat (bottom). The SCN appear normal in size while the optic nerves are completely atrophied for a bilaterally anophthalmic rat. Calibration in the top panel shows 1 mm.

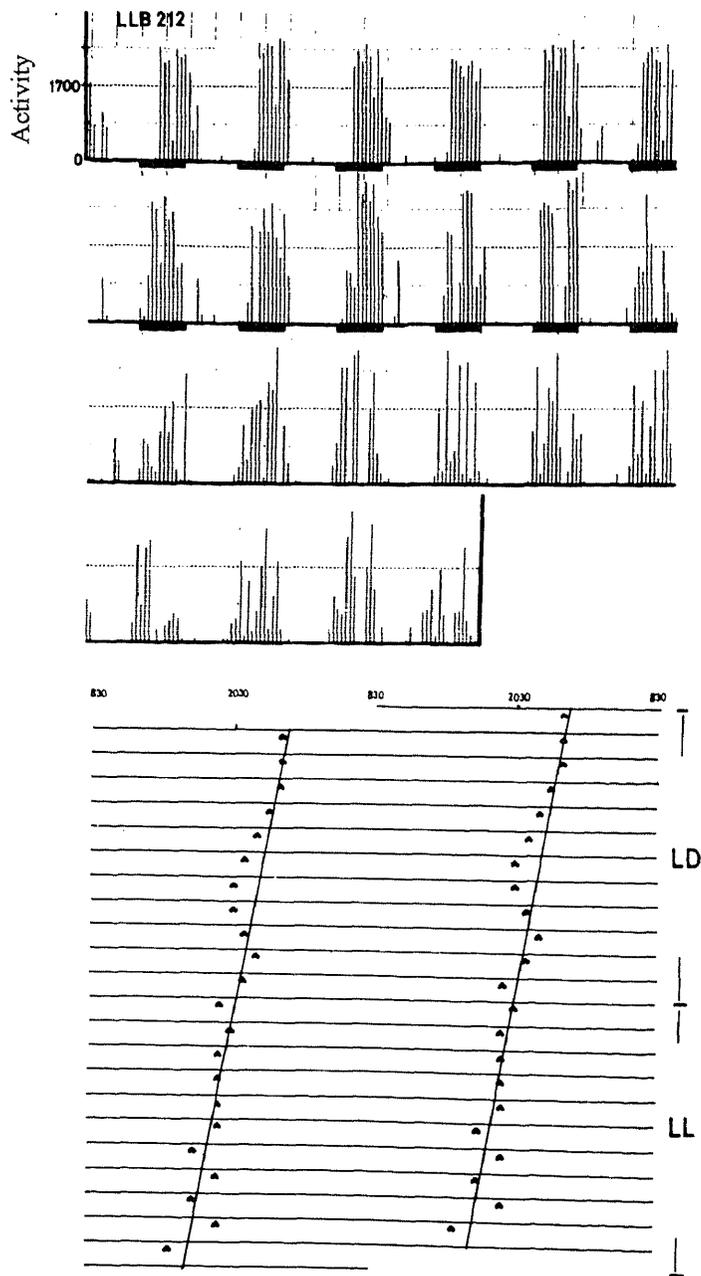


Fig.1-8 A representative example of computer displayed free-running activity rhythm in a bilaterally anophthalmic rat (top panel). Ordinates indicate the hourly number of revolutions. Abscissae indicate 22 consecutive days. Solid bars denote the dark phases. The inverted heart symbol (bottom panel) shows the onset of activity which is defined as occurring when number of revolutions per hour is 30. The records are double-plotted. LL: constant illumination, LD: light-dark cycles.

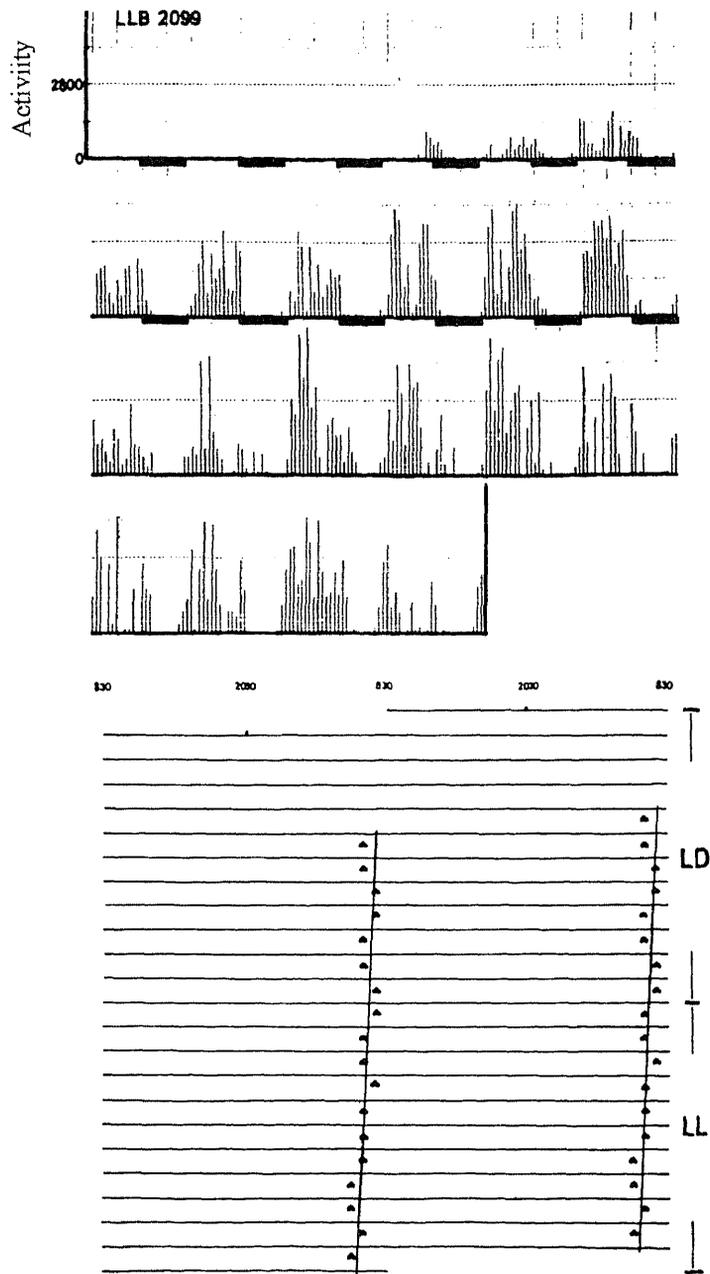


Fig. 1-9 A second example of circadian rhythmicity in a bilaterally anophthalmic rat illustrating the gradual emergence of the usual circadian rhythm (top panel). Abscissae shows 22 consecutive days. Solid bars denote the dark phases. The onset of activity in the same rat was shown in the double-plotted way.

トは4日の移行期を経て再同調したが、両眼球欠損ラットは全く再同調出来なかった (Fig. 1-3 と 1-4)。再同調の過程では、SWSとPSは同じように振る舞わず、PSのオーバーシュートが、1眼球欠損および両眼健常ラットでみられた (Fig. 1-5)。

両眼球を欠損していた10匹のラットすべてにおいて、眼球のみならず視神経と視交叉が完全に萎縮退化していた (Fig. 1-6)。ところが、1眼球が残存した場合には、1側の視神経と視交叉も残存した。一方、概日時計である視交叉上核(SCN)は、両眼健常ラットと比べ、大きさはやや小さいものの、形態学的な異常はとくに観察されなかった (Fig. 1-7, top; 両眼球健常、middle; 1眼球欠損、bottom; 両眼球欠損)。

回転輪活動性：活動性が記録された両眼球欠損の10匹の動物はその反応パターンから2グループに分かれた。6匹は記録第1日から明暗サイクルには同調しないフリーランした明瞭な概日リズムを示した (Fig. 1-8)。4匹は回転輪ケージに入れられた数日後から、徐々に活動を開始し、両眼球欠損のため明暗サイクルに同調していないフリーランリズムを示した (Fig. 1-9)。残った2匹はケージ内で回転輪を回すことが無かった。これら10匹の動物のタウ(τ)は、活動開始時間の最小自乗法に基づくと、23時間39分から24時間16分の範囲にあった。

討議

両眼球を完全に欠損した10匹と1眼球欠損ラット2匹から、睡眠・覚醒の概日リズムが記録された。これらの動物のSCNの大きさは、両眼球健常ラットと比較すると、少し小さいものの、とくに形態学的異常は認められなかった。この結果は先天性無眼球症マウスの結果と極めて類似している。マウスでも両眼が欠損していても、SCNの大きさに若干の萎縮は見られるが、形態的には特に異常は認められず、その働きも正常である (Scheuch, 1982)。本実験に見られたように、両眼球欠損ラットで、視神経や視交叉の完全萎

縮、退化が認められたものの、概日時計であるSCNにまで形態的異常が及ばないので、睡眠覚醒の概日リズムが出現したと考えられる。

一方、1 眼球欠損ラットは 6 時間の明暗サイクルの後退に対し、4 日後に移動された明暗サイクルに再同調した。このことは残された 1 眼と、その視神経、およびSCNに投射する網膜-視床下部線維路 (retino-hypothalamic tract) が機能していたことを強く示すものである。この再同調に要した日数は両眼健常ラットと 1 眼球健常ラットでは、全く同じであった。一日あたり睡眠量などの睡眠構造についても、両者には違いは認められなかった。

回転輪活動についても、両眼球欠損ラットはフリーランする概日リズムを示した。このときの自由継続周期タウ (τ) は 23 時間 39 分から 24 時間 16 分の範囲であった。この値は先行研究で、健常成体ラットで眼球摘出したときにみられた回転輪活動の τ が 23 時間 19 分から 24 時間 28 分で、いずれも 23 ~ 25 時間のいわゆるサーカディアンレンジに入る報告と一致した (Richter, 1967)。一方、回転輪活動では概日リズムが、装置投入後数日して、徐々に出現した動物がいたが、このことは回転輪による活動性の測定は、装置に対する慣れなどだけでなく、学習性の要素を反映し、回転すること自体が強化となり、回転数の増加となったと考えられよう。

このように回転輪の活動性の記録の場合には、睡眠・覚醒記録と異なり、活動性の反応が装置投入初日から、記録できた個体、数日して記録され、しかも回転数が徐々に増加する個体、最後まで回転輪を回さない個体の三つのパターンに分かれた。睡眠・覚醒リズムではこのようなことはなく、記録初日からすべての個体が、明瞭な概日リズムを示した。従って、睡眠・覚醒リズム記録時での覚醒は、即、'回転輪を回す'ことを意味しない。この意味では、睡眠・覚醒と回転輪活動性のリズムは、行動の異なった側面を記録している場合があるといえる。

しかしながら、睡眠・覚醒と回転輪活動ともに、本実験の先天性無眼球症ラットにおいて、概日リズムが記録された。この動物は、生まれてから、

当然、一度も明暗サイクルを経験することは無かったわけで、これらの概日リズムの出現に24時間周期の明暗環境サイクルの経験は必要ないと言える。他の環境要因で大きな役割を果たす温度も本実験では一定に維持したので、この場合、概日リズム形成に關与する要因は明暗サイクルの交代だけであった。

以上のデータから、睡眠・覚醒と活動性の概日リズムは、動物が生後直後から24時間の明暗サイクルに暴露される必要は全く無く、発現する生得的なリズムであると言える。この意味から、24時間周期の明暗や温度サイクルの環境要因は概日リズム形成に本質的な役割を果たさないといえる。また、両眼球欠損動物の睡眠内容は両眼球健常ラットと異ならず、ただ明暗サイクルに同調できない点でのみ、異なった。1眼球残存ラットでは、眼球、その視神経、および網膜-視床下部線維路が機能しており、これらが明暗サイクルへの同調を可能にした。

一方、他の研究者の一眼球残存マウスの報告(Faradjiら、1980)は、明暗サイクルに同調しないというものであったが、本実験のように明暗サイクルの位相を移動し、それに対する再同調の過程を吟味していないので、明暗サイクルへの同調という点で明確な結論は得られない。マウスではラットと異なり、一眼球残存した眼は機能しておらず、同調できなかった可能性も排除出来ない。ラットとマウスでの無眼球症ミュータントの種差は今後の課題である。

本実験で、概日リズムは、確かに、生得的なリズムであることが明らかとなった。この概日リズムの発生を考えると、次に問題となるのは、この概日リズムがいつ頃、個体発生的に形成されるのか、という問題である。次章では睡眠・覚醒の概日リズムを個体発達を検討する。

第 2 章 概日リズムの個体発達

Nobuo Ibuka(1984) Ontogenesis of circadian sleep-wakefulness rhythms and developmental changes of sleep in the altricial rat and in the precocial guinea pig. Behavioural Brain Research, 11, 185-196. を中心に

第2章 概日リズムの個体発達

『晩熟性ラットと早熟性モルモットにおける睡眠・覚醒概日 リズムの個体発達と睡眠の発達変化』

問題と目的

ノーベル賞受賞者の Tinbergen (1963)によれば、私たちは行動に対し四つの質問を発することができるという。これらの質問とは、①原因、すなわちメカニズム、②個体発達、③進化（系統発達）、そして④機能、である。いずれ一つをとりあげても、行動研究では重要な課題であり、これを明らかにすることは容易なことではないが、彼のこの提言は行動研究者にとって非常に示唆に富むものである。別の言い方をすれば、行動のこの四つの側面を明らかにしたとき、私たちはある行動を“理解した”といってもよいだろう。

当然、行動や生理機能にみられる概日リズムを研究するときにも、この視点は有益になる。前章で見たように、睡眠・覚醒の概日リズムの発現に、24時間で変動する環境要因への暴露は必須でないことが明らかにされた。しかしながら、この研究では睡眠・覚醒と活動性の記録には、3～5ヶ月の成体のラットを用いた。そのため、概日リズムが生得的に発現することはいえども、いつ頃、短周期のウルトラディアンリズムから概日リズムへの移行が始まるのかは明らかでない。これは Tinbergen の②の問題である。

概日リズムの個体発達の研究は、記録時間のオーダーが長いこと、この時期の動物が幼弱なことなどの理由により、特に睡眠・覚醒リズムの場合には、記録電極を頭蓋に埋め込むなどの技術的な困難さのため、これまで研究されてこなかった。

一方、近年の研究により、概日リズムを発現させる生物時計は視床下部視交叉上核（SCN）に存在することが明らかにされたが (Ibuka & Kawamura, 1975; Ibuka ら, 1977; Inouye & Kawamura, 1979; Schwartz & Gainer, 1977; Stephan &

Zucker,1972)、概日リズムの個体発達については、ラットで副腎コルチコステロン、松果体メラトニンの酵素であるセロトニン-N-アセチル転移酵素 (NAT) など 2、3 の事例で報告されているだけで、その成立時期ははっきりと特定されていない (Deguchi, 1975; Miyabo ら, 1980; Takahashi ら, 1979)。また、睡眠・覚醒の概日リズムについては、Kleitman と Engelman (1953) の行動観察によるヒトの先駆的な事例研究が報告されているだけである。

また、睡眠の発達的变化については Jouvett-Mounier (1970) による早熟性動物であるモルモットと晩熟性動物のラットで、先駆的な研究がなされた。しかしながら、この研究では一日の睡眠の出現量の発達変化のみが注目され、概日リズムの成立や、PS、SWSの出現周期など睡眠理解に重要な生体リズムの視点が欠落している。

本研究ではこのような背景を踏まえ、睡眠・覚醒の概日リズムが個体発生的にいつ頃成立するかを、Portmann (1961) に従い、出生時における脳の成熟度が低い晩熟動物のラットと、成熟度が高い早熟性動物のモルモットを用いて、確定する。この時、概日リズムの形成に、生後直後からの 24 時間の明暗サイクルへの暴露と恒常明環境 (LL) への暴露とで、早い、遅いの違いが出るかを検討した。これにより概日リズム形成の速さにかかわる環境要因の役割を検討する。さらに、晩熟性動物のラットと早熟性動物のモルモットにおいて、SWSやPSの出現周期、12 時間の明期、暗期それぞれにおけるSWSとPS量の個体発達変化を比較し、それぞれの種の睡眠特性を明らかにする。

方法

生後 1 週齢よりの種々の発達段階にあるウイスター系ラットとハートレー系モルモットを用いた。これらの動物は静岡実験動物繁殖研究所 (SLC) より購入され、滋賀大学心理学研究室で維持繁殖された。これらの被験動物は LD 12:12 (L, 0830-2030)、温度一定 (23 ± 2 °C) の環境で飼育された。何匹

かの動物は分娩 2, 3 日前に実験目的のため連続照明の飼育環境に移動された。そこでのケージ床面での照度は約 100 ルクス。睡眠・覚醒の概日リズムを長期に連続記録することの技術上の困難さから、ラットでは生後 17 日、モルモットでは 7 日齢以後の動物を用いた。成体動物はラットでは 12 週齢以上、モルモットでは 10 週齢以上の動物である。実験に用いた被験体の数は Table 2-1 (47 頁参照) のとおりである。

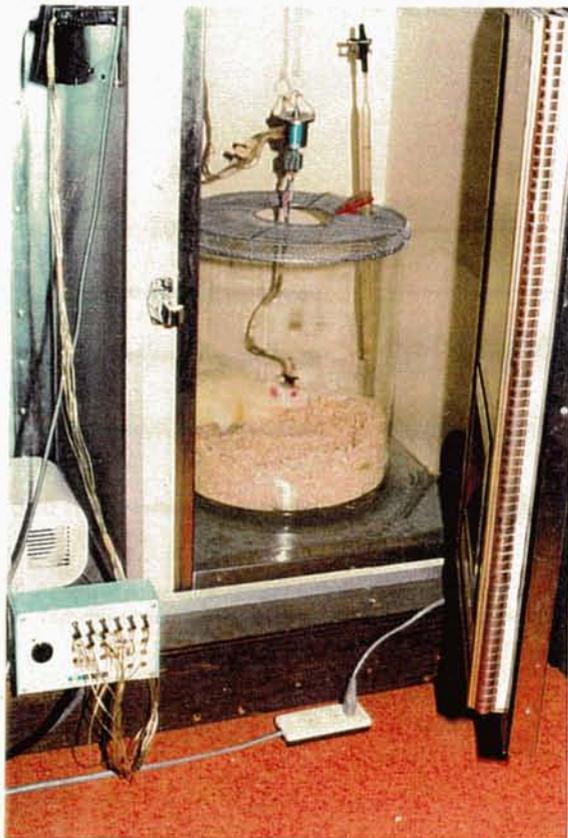


Fig.2-1 The electrically shielded and sound-proofed chamber for recording polygraph in the present experiment.

ガラス容器（直径 18 cm 高さ 25 cm, 幼若動物用；直径 30 cm, 高さ 36 cm; 大人動物用）に入れられ睡眠・覚醒リズムを長時間記録された。動物はアンフェノール社の slip-ring により、身体の動きを拘束されることなく、自由に容器内を動きまわることができた (Fig. 2-1)。餌と水は常時摂取出来た。ガラス容器は、電氣的に遮蔽された温度一定 (23 ± 2 °C) な、LD12:12 (L, 0830-2030)

前頭、後頭部に皮質脳波記録のためのネジ電極、頸部に筋電図記録のための針電極、眼球運動記録のための銀針電極を眼球脇に麻酔下で動物に埋め込んだ。麻酔はペントバルビタールを用い、動物の発達段階に応じ投与量を 25 mg/kg ~ 50 mg/kg (i.p.) の範囲で変えた。電極リード線をアンフェノール社のプラグにまとめ、歯科用セメントで頭部に慢性的に固定した。動物は床敷の敷かれた大きな

の個別の防音室に置かれた (Fig. 2-1)。

ポリグラフ記録は、日本光電社の8チャンネル脳波計により、長時間の睡眠・覚醒記録のため通常より遅い紙送りスピード (60 mm/min) でなされた。ポリグラフ記録をもとに10秒単位で、高振幅脳波、低振幅筋電図および無眼球運動を特徴とするSWS、低振幅脳波、急速眼球運動 (REM)、筋緊張消失を伴うPS、低振幅脳波と高振幅筋電図を特徴とする覚醒 (awake) の3相に分類し (Fig. 2-2)、これらの値を電算機に入力し、処理した。睡眠・覚醒の周期成分検出のために電算機 (HITAC10II) でパワー・スペクトル分析を行った。

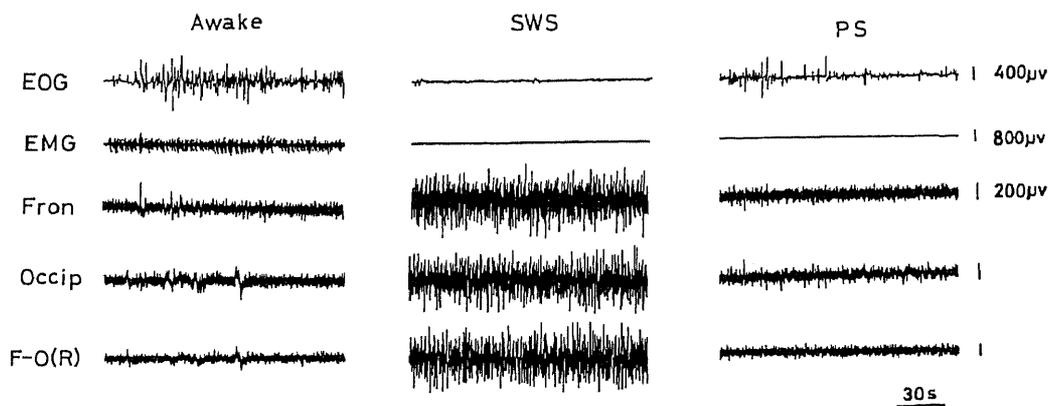


Fig.2-2 Sample of polygraphic records with slow paper speed of 3 vigilant states for the adult guinea pig. EOG, electrooculogram; EMG, electromyogram; Fron, frontal cortex; Occip, occipital cortex; F-O (R), fronto-occipital cortex in the right hemisphere.

結果

概日リズムの形成：最初に、SWS とPSの睡眠カテゴリーを無視し、両者を合算した全睡眠 (TS, total sleep) の指標に基づいて発達過程をみた。明暗サイクル下で育った2.5週齢、3週齢、3.5週齢のラットの睡眠・覚醒リズムは3～4時間周期のウルトラディアンリズムからのみ成り立っている。このリズムは明期、暗期にかかわらず出現し、成体に比べ振幅が大きいのが

特徴である。4 から 4.5 週頃になって、睡眠は明期に多発しはじめ、概日リズムが形成されはじめる (Fig. 2-3)。一方、恒常明(LL)の環境で飼育されたラットの睡眠・覚醒リズムも、明暗サイクル(LD)下で飼育された動物のそれと本質的な違いは無い。この場合にも、4 から 4.5 週頃に概日リズムが形成され始める (Fig. 2-4)。恒常明環境下で飼育された 5 週齢の動物のパワースペクトル分析から、はっきりと 24 時間成分が顕著であることがわか (Fig. 2-5) が、3, 8, 12 時間の成分も同時に検出される。したがって、概日リズムは生後直後からの明暗サイクル暴露の経験の有無に関係なく、同じ時期に形成され始めるといえる。一方、成体ラットでは明期に睡眠が多発し、暗期に減少する概日リズムを示す (Fig. 2-3)。同時に、成体では概日リズムに重畳する睡眠・覚醒のウルトラディアンリズムの振幅が小さくなるのが特徴である。

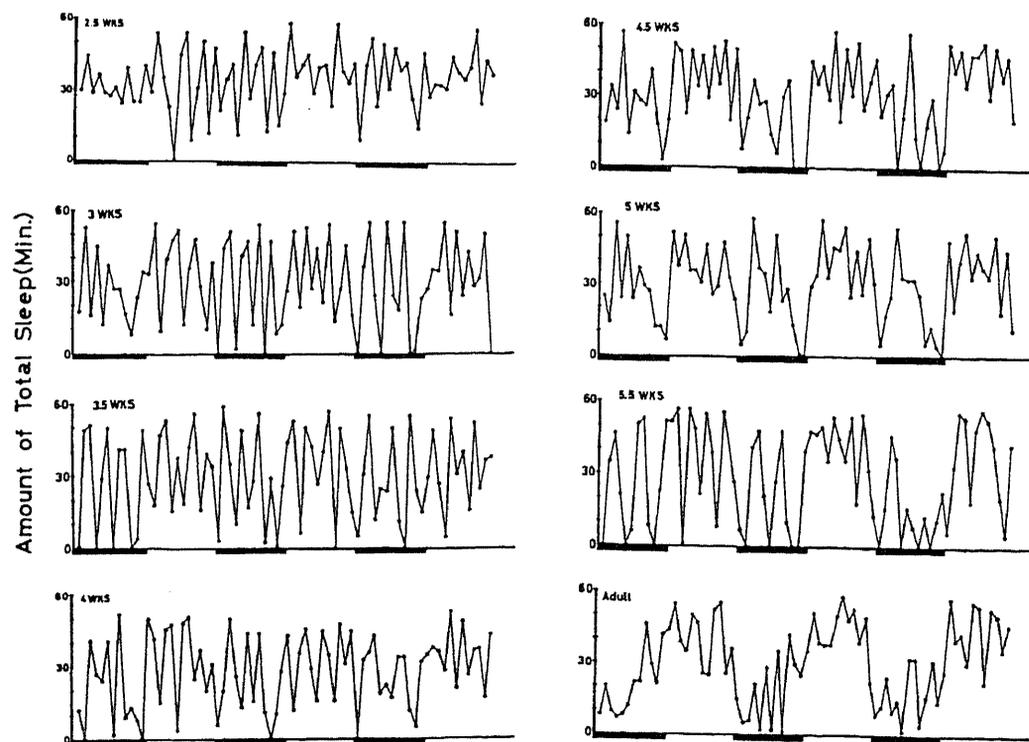


Fig. 2-3 Development of circadian sleep-wakefulness rhythms in rats born and raised under LD 12:12 h lighting schedule. Ordinates: amount of total sleep (SWS plus PS) per hour. Abscissae: time of day. Black bars indicate the dark phase with light off (20.30-08.30 h). Each diagram was taken from a different rat.

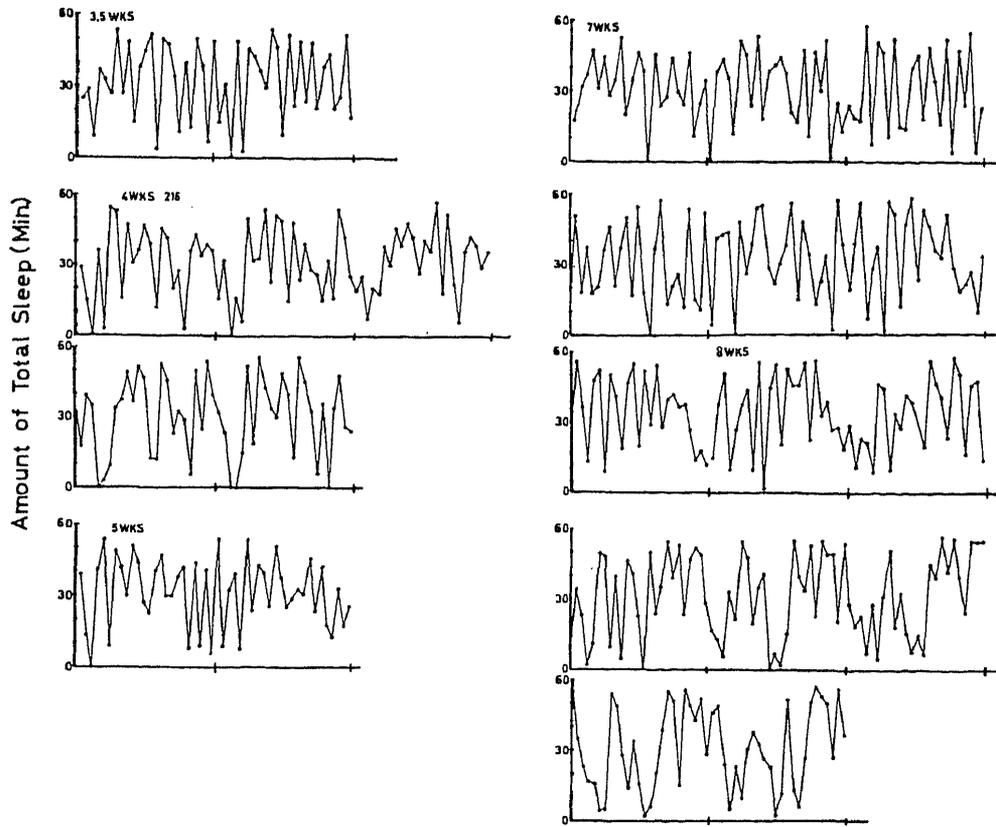


Fig.2-4 Development of circadian sleep-wakefulness rhythms in rats born and raised under constant illumination at different developmental stage. Ordinates: amount of total sleep per hour. Abscissae: time of day. Each diagram was taken from a different rat.

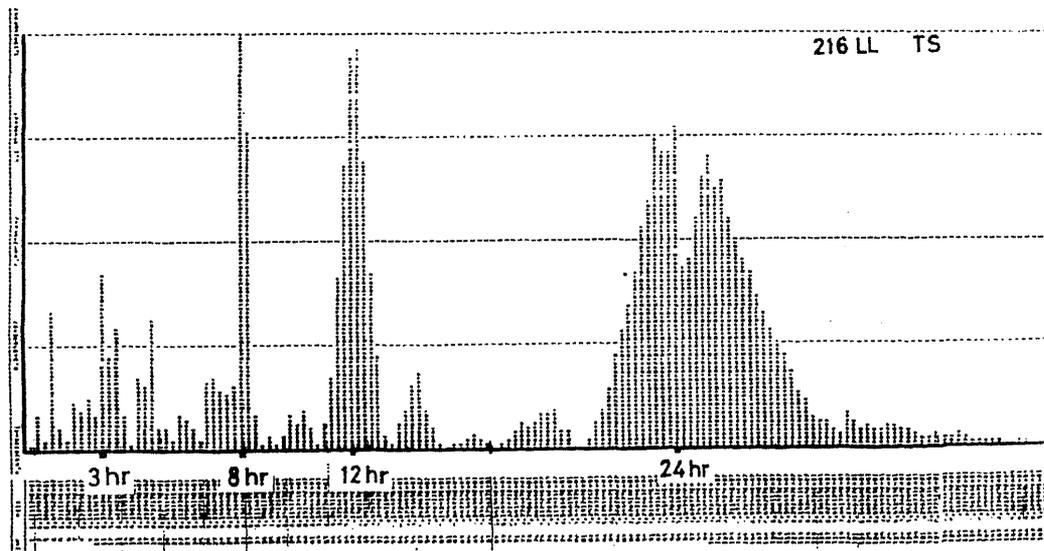


Fig.2-5 Power spectrum based on records of 5 consecutive days of total sleep by a computer in a 4-week-old rat (No. 216) shown in Fig.2.4 Ordinate: intensity in arbitrary unit. Abscissa: period.

次にSWS, PS相別に明暗サイクル下でのリズム形成の個体発達を調べた (Fig. 2-6)。大人のラットでは、SWSの出現とPSの出現はほぼ平行し、明期に多く出現した。ところが、2.5週齢と4週齢動物では、SWSは明期に同調する傾向を示したが、PSはそのような傾向を全く示さず、SWSと相対的に独立して出現した。一般に、SWSの出現量とPSの出現量は正の相関を持つことが知られているが、本実験の場合、2.5週齢ラットのSWSとPSの相関係数は $r=0.493$ 、成体ラットでは $r=0.734$ となり、上記を裏付けた。以上のこととも関係するが、SWS相の概日リズムの方が、PSのそれより早く形成され始める傾向が見られた。

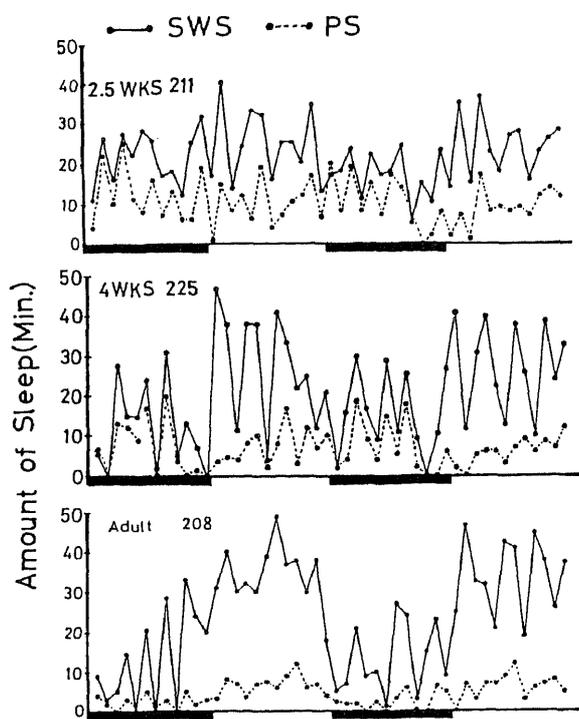


Fig. 2-6 Development of circadian sleep-wakefulness rhythms in SWS and PS stages in rats born and raised under LD 12:12 h lighting schedule. Ordinates: amount of SWS (solid line) and PS (broken line) per hour. Abscissae: time of day. Black bars indicate the dark phase with light off (20.30-08.30 h).

一方、モルモットでは全睡眠を指標にしてみると、生後1週齢、2週齢、3週齢、4週齢、成体の睡眠・覚醒リズムの間に本質的な差はない (Fig. 2-7)。すべての発達段階において、明期、暗期の区別無く、数時間周期のウルトラディアンリズムのみで構成されている昼夜行性のはっきりしない睡眠・覚醒リズムが特徴である。ラットと異なつて、成長につれて睡眠・覚醒の概日リズムが形成されることはない。換言すると、生後1週齢ですでに成体の睡眠・覚醒リズムを示すといえる。

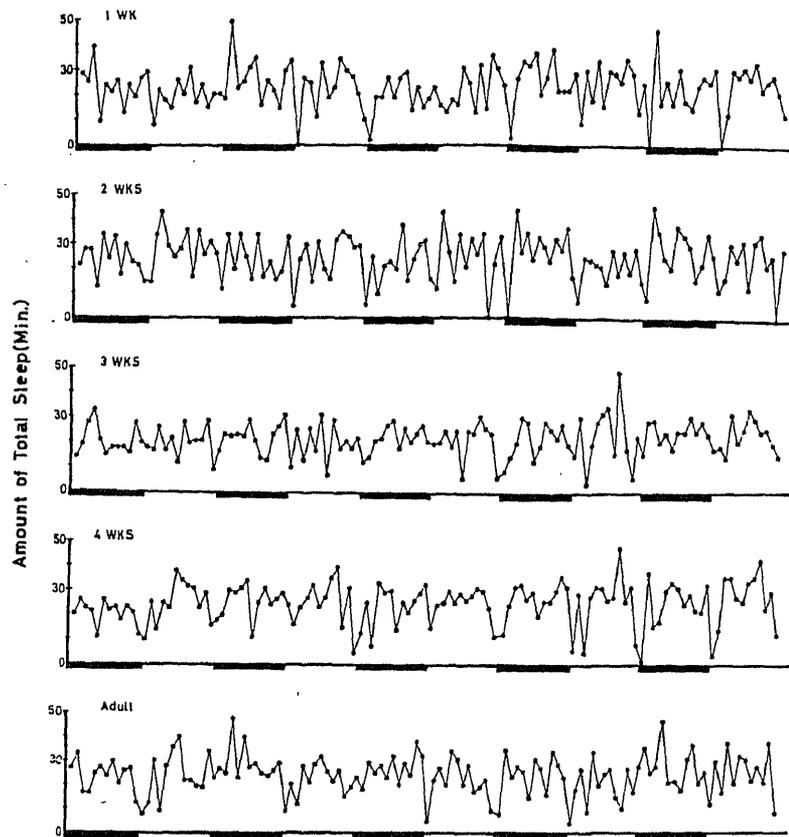


Fig.2-7 Rhythms of total sleep (SWS plus PS) in the precocial guinea pig. Sleep-wakefulness rhythms of the infant guinea pig could not be discriminated from those of the adult. Dark bars on the abscissae indicate the dark phase (20.30-08.30 h). Ordinates: amounts of sleep (min.) in every hour. Each diagram was taken from a different guinea pig.

このことは、SWS, PS 別の睡眠・覚醒リズムについても当てはまり、生後1週齢動物と成体の睡眠リズムは、ウルトラディアンリズムでのみで構成され、昼夜は特に区別されない (Fig. 2-8)。

睡眠の周期現象の発達変化：次に、SWS周期 (SWSから次のSWS出現までの時間)、PS周期 (PSから次のPS出現までに時間)、PS潜時 (SWS終了からPS出現までの時間) の発達変化を調べた。Fig. 2-9 (ラット) と Fig. 2-10 (モルモット) にSWSとPS周期の発達的变化を明期、暗期別に示した。ラットでは2.5週齢と3週齢では、明期、暗期におけるPS周期には有意差は見られない (サインテスト、 $p > 0.05$; $n=7$ 、および $n=6$)。

ところが、ラットが発達するにつれて、明期におけるPS周期は暗期に比

べ長くなり、成体では有意差が見られた（サインテスト、 $p < 0.01$, $n = 13$ ）。また、明期、暗期におけるPS周期はともに発達につれて有意に延長した（Hテスト、 $\chi^2 = 18.77$, $df = 4$, $p < 0.001$; $\chi^2 = 27.44$, $df = 4$, $p < 0.001$ ）。一方、SWS周期は、明期に比べ暗期において長い傾向にあるが、発達に伴って著しい変化を示すことはなかった。

モルモットにおいても成長につれ、PS周期は長くなるが、SWS周期は全く変わらない。PS周期は、明期においても、暗期においても、発達するにつれて有意に延長した（Hテスト、 $\chi^2 = 17.88$, $df = 4$, $p < 0.001$; $\chi^2 = 22.76$, $df = 4$, $p < 0.001$ ）。これに加え、明期におけるPS周期は暗期より有意に長い（サインテスト、 $p < 0.05$, $n = 15$ ）。いずれの種のどの発達段階においても、PS周期は常にSWS周期より長い傾向が見られた。

PS潜時については、ラットのそれはモルモットに比べ長い傾向にあったが、PS周期とは異なり、い

ずれの種においても、成長に伴う一貫した変化を示さなかった。

睡眠量の発達変化：Table 2-1 にラ

ットとモルモットの発達に伴う種々の睡眠パラメターの一日あたりの量的変化を示した。最も劇的な変化はラットにおけるPS量の減少であり、成長につれ有意に減少した（Hテスト、 $\chi^2 = 17.62$, $df = 6$, $p < 0.001$, Fig. 2-11。このことはPS/TS,

PS/RTのパラメターにおいても反映されている（Table 2-1）。それに対し、モルモットでは、成長に伴って一日あたりPS出現量は

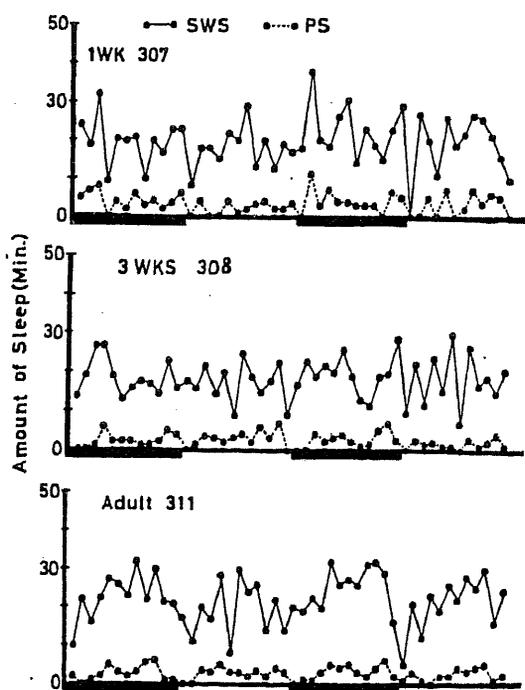


Fig.2-8 Rhythms of SWS and PS stages in the precocial guinea pig. Rhythms in SWS and PS in the infant guinea pig were very similar to those of the adult guinea pig. Dark bars on the abscissae indicate the dark phase (20.30-08.30 h). Ordinates: amounts of SWS (solid line) and PS (broken line) in every hour.

有意に減少したものの（Hテスト、 $\chi^2=18.54$, $df=4$, $p<0.01$ ）、ラットに比べ極めて変化量は少ない。一方、SWS量の一あたり出現量はラットでは発達に伴いPSの減少を補うかたちで有意に増加する（Hテスト、 $\chi^2=17.66$, $df=6$, $p<0.001$ ）が、モルモットでは有意な変化は見られない（Table 2-1）。

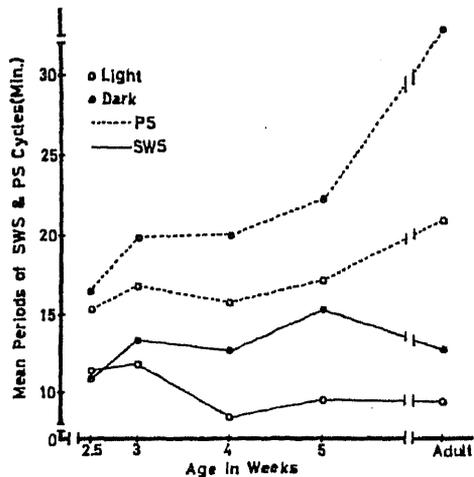


Fig.2-9 The developmental changes of the periods of SWS cycle (solid line) and PS (broken line) in the light phase (empty circles) and in the dark phase (filled circles) in rats. The period of PS cycle became longer as the rat grew. Ordinate: periods of sleep cycles. Abscissa: age in weeks.

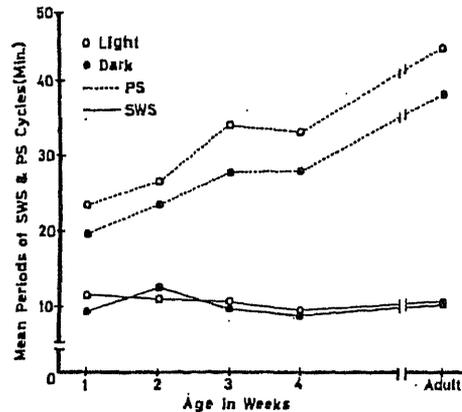


Fig.2-10 The developmental changes of the periods of SWS (solid line) and PS (broken line) cycles in the light and the dark phases in the guinea pig. The period of PS cycle became longer with age while that of SWS was constant throughout development.

最後に、PSエピソードの長さの発達的变化を分析した(Fig.2-12)。明期、暗期ともにラットではPSエピソードは有意に短くなるが（Hテスト $\chi^2=21.99$, $df=6$, $p<0.001$; $\chi^2=34.00$, $df=6$, $p<0.001$ ）、モルモットでは逆に長くなることのが認められた（ $\chi^2=9.56$, $df=4$, $p<0.05$; $\chi^2=19.26$, $df=4$, $p<0.001$ ）。

討議

睡眠現象の本質的理解には、数日にわたる連続的記録が必要であることが、最近の時間生物学的立場から主張されている(井深 1982、1985ab; Monnierら、1980)。その意味から、本研究は睡眠・覚醒の概日リズムの時期を個体発達的に調べ、ラットにおける生後直後からの明暗サイクル暴露が、連続照明暴露と比べ、概日リズム形成を促進することはない、ことを

Table 2-1

Summary of the daily amounts of wakefulness, SWS, PS/TS (%) and PS/RT (%) at each developmental stage for rats and guinea pigs
Mean \pm SD in minutes. RT, recording time (= 24 hours).

Rat						
Age: No. Animals:	2.5 weeks n = 7	3 weeks n = 6	3.5 weeks n = 7	4 weeks n = 5	4.5 weeks n = 2	
Awake	610.5 \pm 43.4	696.6 \pm 60.1	702.5 \pm 36.8	711.7 \pm 70.7	694.7 \pm 63.3	
SWS	554.1 \pm 28.6	528.1 \pm 43.9	556.0 \pm 55.5	569.4 \pm 81.6	606.9 \pm 60.9	
PS/TS	33.2 \pm 8.3	29.0 \pm 1.5	24.8 \pm 4.0	22.1 \pm 3.8	18.7 \pm 1.2	
PS/RT	19.1 \pm 2.2	15.0 \pm 1.4	12.6 \pm 1.7	11.0 \pm 0.9	9.6 \pm 0.2	
Guinea pig						
Age: No. Animals:	1 week n = 5	2 weeks n = 7	3 weeks n = 8	4 weeks n = 6	Adult n = 15	
Awake	878.1 \pm 38.9	851.1 \pm 21.2	910.2 \pm 26.6	871.8 \pm 38.3	889.0 \pm 54.5	
SWS	485.0 \pm 31.8	515.6 \pm 20.2	467.7 \pm 26.6	497.0 \pm 36.8	495.6 \pm 48.8	
PS/TS	13.6 \pm 1.8	12.4 \pm 1.3	11.7 \pm 1.4	12.6 \pm 0.9	10.0 \pm 1.6	
PS/RT	5.3 \pm 1.1	5.1 \pm 0.4	4.3 \pm 0.5	4.9 \pm 0.9	3.8 \pm 0.9	

明らかにした。つまり、明暗の環境サイクルは概日リズム形成には副次的な役割しか持たず、概日リズムを同調させるのが一次的な役割りであるといえる。

睡眠・覚醒リズムでは生後初期から、まずウルトラディアンリズムが出現する。ヒトでは15週齢で概日リズムへの移行が始まるが(Kleitman & Engelman, 1953)、ラットではこの時期は4から4.5週齢であった。ラットでは、ヒトと同じように、幼若時に一日あたりPS量も多く、PS周期も短い。この睡眠・覚醒の概日リズムの個体発達を他の概日リズムと比べると、時計本体であるSCNが生後1日(Fuchs & Moore, 1980)、松果体NATで12日(Deguchi, 1975)、副腎コルチコステロンで3週齢(Miyaboら, 1980)、そして本報告の睡眠・覚醒では概日リズム形成に4~4.5週を要した。このことは

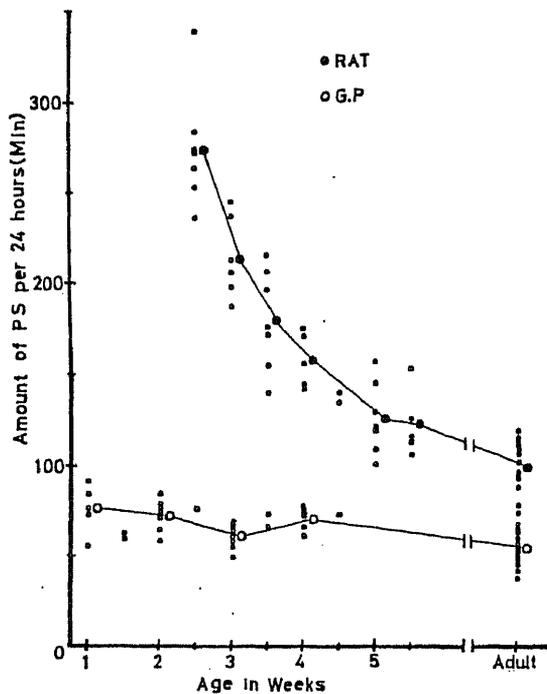


Fig.2-11 The developmental changes of the average amount of PS per day in the rat (filled circles) and in the guinea pig (empty circles). Note the rapid decrease of the amount of PS with age in the rat. Smaller circles indicate individually measured values. Mean amounts of PS (large circles) were calculated in cases where more than 5 measurements were obtained. Ordinate: total amount of PS (min) per day. Abscissa: age in weeks.

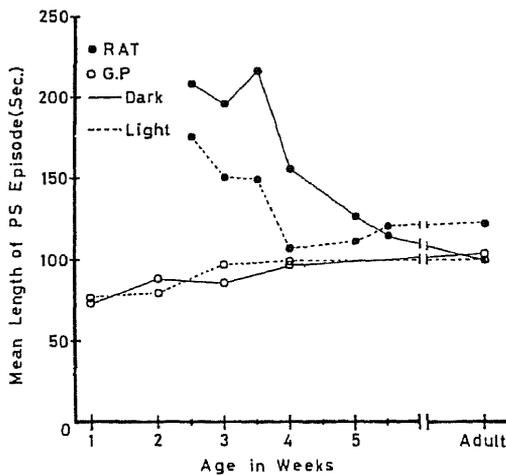


Fig.2-12 The developmental changes of the length of PS episode in the rat (filled circles) and in the guinea pig (empty circles). Note the gradual increase of the length of PS episode in the guinea pig in rather sharp contrast to decrease in the rat.

概日時計本体が機能しても、ホルモン、行動の順序で少しの時間的遅れをもって、それぞれの概日リズムが形成されることを示唆する。

一方モルモットでは、成長しても明瞭な概日リズムは形成されない。この意味で、昼、夜行性ははっきりとしない動物である。別の表現をすると、生後1週間ですでに大人の睡眠・覚醒リズムを示した。概日リズムだけでなく一日あたりSWS出現量、PS出現量も成長による変化は認められなかった。これは Jouvet-Mounierら(1970)の研究を裏付けるものであり、唯一変化したパラメータはPSエピソードであり、ラットと逆に成長につれ長くなった。

ラットに比べモルモットは一日あたりの総睡眠

量極めて少なかったが、これはそれぞれの種が置かれている生態的環境や捕食-被捕食関係が関係している (Allison & Twyver, 1970)。一般に、棲息環境が安全な動物は一日あたり睡眠量が多いことがわかっているが、穴居性のラットと地表で多くの時間を過ごすモルモットでは、本研究結果が示すとおり、ラットの睡眠量は多かった。

結論すると、出生時に脳の成熟度が未熟な晩熟性ラットは、成長につれ概日リズムは徐々に形成される過程をとり、SWSとPS周期は長くなり、PS量は減少し、SWS量は増加した。一方、出生時の脳の成熟度が高く、出生直後の感覚・運動機能も良好な早熟性モルモットでは、生後1週齢ですでに大人型の昼夜行性の不明瞭な24時間の睡眠・覚醒リズムを示し、1日あたりSWSとPS出現量、SWS周期にも、成長による変化は認められなかった。

これまでに概日リズムは生得的な生物リズムで、その発現には、24時間で変動する環境要因への暴露を必要としないことが明らかにされた。さらに、本章でラットとモルモットを用いて概日リズムの個体発生を比較した結果、ここでも明暗サイクルへの暴露が睡眠・覚醒の概日リズム形成を早めることはないことが、明らかにされた。このことは、環境要因は概日リズム形成に副次的な役割しか果たさないことを意味し、概日リズム発現には生体内にある概日時計（生物時計）が重要な役割を果たしていることを示す。近年、この概日時計の生理的実体が明らかにされ、視床下部にある一対の小さな視交叉上核が時計機能を果たしていることが明らかにされつつある。次の章から、この視交叉上核と概日リズム発現の関係を検討する。

第 3 章 生物時計の種普遍性の問題

Ibuka,N., Nihonmatsu,I., and Sekiguchi,S(1980) Sleep-wakefulness rhythms in mice after suprachiasmatic nucleus lesions. *Waking and Sleeping*, 4, 167-173. を中心に

第3章 生物時計の種普遍性の問題

『マウスの視交叉上核破壊後の睡眠・覚醒リズム』

問題と目的

これまで、1章、2章で概日リズム発現にかかわる環境要因の役割を見てきたともいえる。本章では概日リズムを作り出す時計機構、換言すると、概日時計の局在の問題を取り上げ、視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) が広く哺乳類で概日時計として機能するかを検討する。

行動の理解に進化の視点は欠かせない。この視点から概日リズムを生み出す時計機構を見ると、ゴキブリやコオロギでは視葉に概日時計 (生物時計) が存在することが明らかにされている (Nishiitsutsuji-Uwo, 1968; Page, 1982)。軟体動物のアメフラシでは眼が時計機構にとって本質的な役割を持つことが報告されている (Block, 1981)。一方、鳥類では永らく松果体が概日時計として有力視されてきたが (Gaston & Menaker, 1968)、近年、ラット、ハムスターの概日時計である視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus, SCN) を破壊しても、スズメやブンチョウの活動性の概日リズムが完全に無周期になることから、松果体を唯一の時計として考えることには無理がある、と考えられる。むしろ、現在では、松果体-SCN 複合体が一つの時計として働き、概日リズムを発生させると考えられている (Ebihara & Kawamura, 1981; Takahashi & Menaker, 1982)。面白いことに、これらの動物において概日時計は視覚系を構成する神経系の一部として進化してきたことである (Fig. 3-1)。

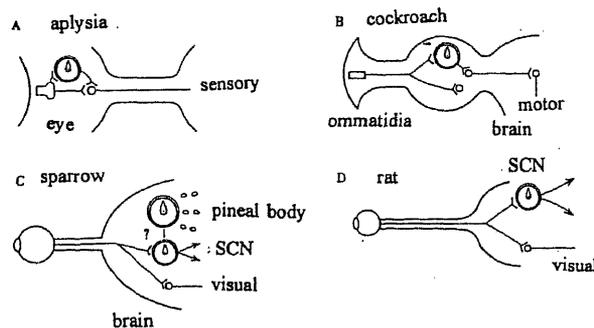


Fig.3-1 Localization of circadian clocks from evolutionary point of view. Circadian clocks compose a part of visual system in various animals. (Ibuka, 1990, Fig.18 modified from Kawamura & Ibuka (1978))

一方、哺乳類では概日時計の局在を求める研究は、ラット、ハムスターを中心になされており、概日時計として SCN の位置を確立するには、異種間の比較によって、より普遍的、一般的な結論を得る必要がある。

概日時計の局在を求めて、これまでに多くの研究がなされてきたが、ラットの脳損傷実験 (Stephan & Zucker, 1972; Ibuka & Kawamura, 1975; Ibuka ら, 1977)、SCN のマルチプル・ユニットの記録 (Inouye & Kawamura, 1979)、2-DG による SCN 機能の概日変動の証明、(Schwartz & Gainer, 1977)、さらには SCN 破壊により概日リズムを消失したラットへの新生仔 SCN の移植による活動性概日リズムの復活 (Sawaki ら, 1984) などの研究により、視交叉上核は概日時計として注目された。その中でも、特に SCN の破壊により、私たちの睡眠・覚醒リズムをはじめ、活動性 (Stephan & Zucker, 1972; Rusak, 1977)、摂食行動 (Nagai ら, 1978)、松果体 NAT (Moore & Klein, 1974)、副腎コルチコステロン (Moore & Eichler, 1972) の概日リズムの消失が報告されているが、これらの研究はラット、ハムスターで SCN が概日時計であることを確立するのに、大いに貢献した。

しかしながら、哺乳類において SCN が概日時計として機能することを結論するためには、さらに用いる種を拡大して、研究を進める必要がある。近年、マウスでも網膜－視床下部線維路 (retino-hypothalamic tract) の存在が証明された (Wenisch, 1976)。このことは、マウスにおいてもまた、SCN が概日リズムのペースメーカーとして機能することを強く示唆する。本章では、マウスにおいて SCN 破壊後の睡眠・覚醒リズムの変化を調べることにより、SCN がラット、ハムスター以外の哺乳類においても、概日リズムのペースメーカーとして機能することを確認しようとした。

方法

滋賀大学心理学研究室で維持管理されている雄の近交系マウス BALB/c、19 匹を用いた。SCN 破壊は麻醉下で、動物を David-Kopf 社の脳定位固定装置に固定し、先端を剥離した細い絶縁昆虫ピンをブレグマ直下、中心線

よりラテラルに 0.2 mm、頭蓋表面より 5.8 mm の位置に刺入し、0.6 mA の直流電流を 30 秒流した。統制群 (n=4) として、近傍の視床下部の部位を同様なやり方で破壊した。前頭部と後頭部に脳波記録のためのネジ電極と筋電図記録の電極を頸部に慢性的に埋め込み、これをアンフェノール社の 5 ピンプラグにまとめ、頭蓋に歯科用セメントで固定した。

動物は床敷がしかれたガラス容器（直径 18 cm, 高さ 25 cm）におかれ、2～4 日ポリグラフを連続記録された。ガラス容器は温度一定（ $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）の防音シールド・チャムバーに入れられ、明暗サイクル LD12:12 (L, 08:30-20:30) の環境条件に暴露された（2 章、Fig. 2-1 参照）。餌と水は常時自由に摂取できた。すべての実験終了後、動物をペントバルビタールで、深く麻酔し、脳を生理食塩水で還流後、10%ホルマリンで固定した。凍結脳標本を 15 ミクロンの厚さで切り出し、チオニン染色後、SCN 破壊を顕微鏡下で確認した (Fig. 3-2)。

ポリグラフ記録は日本光電社の 8 チャンネル脳波計で、長期間の連続記



Fig.3-2 A representative example of bilateral SCN lesion in a mouse.

録を考慮し、通常より遅い紙送り(60 mm/min)でなされた。得られたポリグラフ記録は前章で述べたやり方で、10秒単位でSWS, PS, Awake(覚醒)の3相に分類し、電算機(HITAC10 II)に入力し、処理した。これにより、1時間あたりのSWS量、PS量、PS周期など必要な統計量を算出した。

結果

健常マウスは明期の12時間の間、その多くを睡眠に費やしたが、暗期には覚醒が基調となり、時々眠るという夜行性動物に特徴的な概日リズムに数時間周期のウルトラディアンリズムが重畳する睡眠・覚醒リズムを示した。SWS相とPS相を個別に見ても、この二相は明暗サイクルに同調した(Fig.3-3 下段)。ところが、SCNを破壊するとSWS相とPS相の概日リズムは全く消失した(Fig.3-3 上段)。盲目にした後にSCNを破壊したマウスで

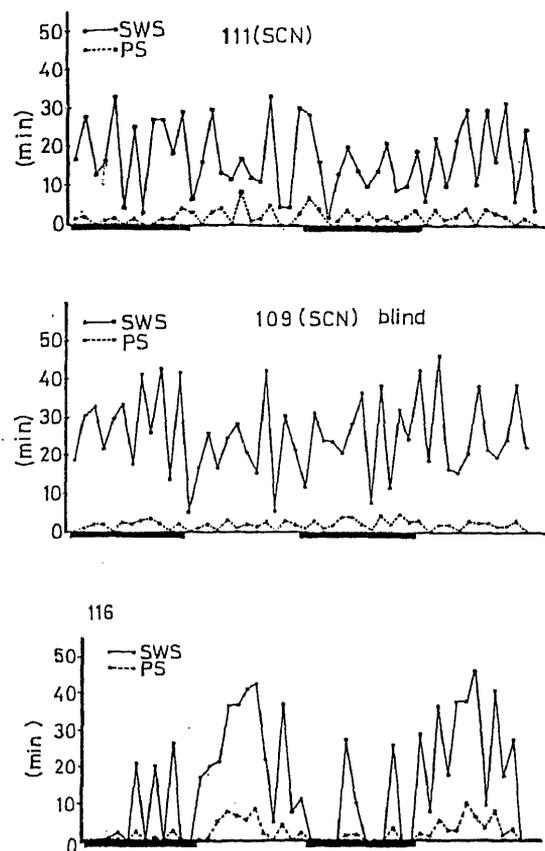


Fig.3-3 Hourly values (min/h) of SWS (solid line) and PS (broken line) of an intact mouse (bottom), a blinded mouse with SCN lesions (middle) and a mouse with intact eyes (top). Black bars indicate 12h dark phase.

も、SWS と PS の概日リズムの消失が見られた。しかしながら、この場合でも、2～4時間周期のウルトラディアンリズムは残存した。

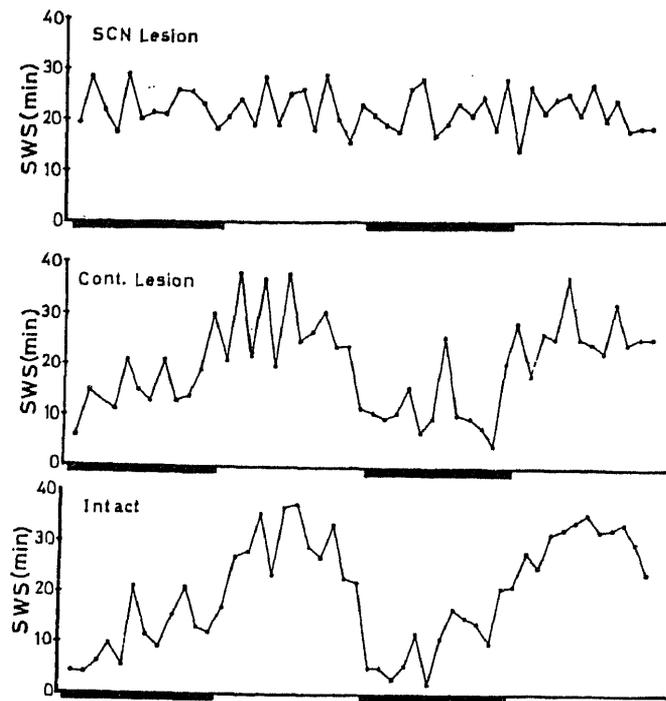


Fig.3-4 Means of the hourly distribution of SWS for three groups. Ordinate indicates the hourly amount of SWS in min. The diurnal rhythm of SWS was completely abolished in the group with SCN lesions. (top), but not in the group with anterior hypothalamic lesions sparing SCN (control lesion, middle).

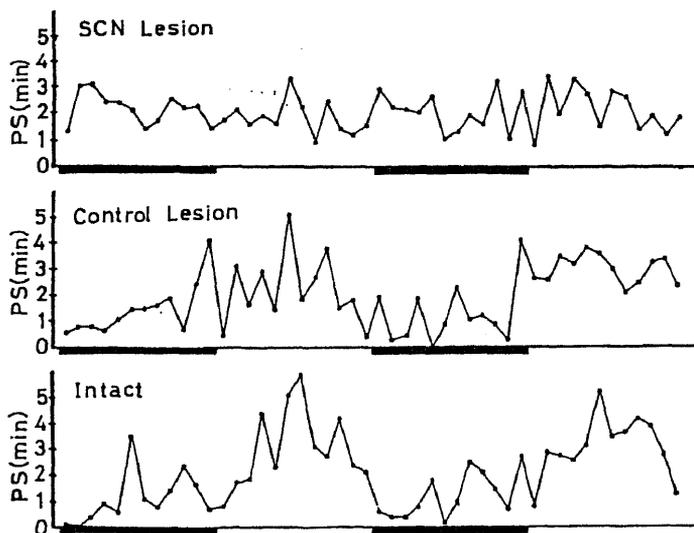


Fig.3-5 Hourly distribution of PS for three groups. Ordinate indicates the hourly amount of PS in min. The diurnal rhythm of PS was completely eliminated in the group with SCN lesions (top), but not in the group with anterior hypothalamic lesions sparing SCN (control lesion, middle)

Fig. 3-4 に SCN 破壊 (n=8)、統制の SCN 近傍破壊 (n=4)、および健常マウス (n=7) の SWS 相のリズムを平均化して、グラフに示した。SCN 破壊群のみが完全に SWS の睡眠・覚醒の概日リズムが消失している。同じことが、PS の睡眠相でも確認された (Fig. 3-5)。

Table 3-1 に 3 群の 12 時間の明期、暗期別の PS 出現回数と PS 出現時間が示されている。SCN 破壊群では PS 回数と PS 出現時間において、明期と暗期の間に有意差はない (ウィルコクソン・テスト、 $p > 0.05$)。一方、これに対し、統制破壊群と健常群では、暗期に比べ、明期における PS 量と PS 出現回数は有意に増大している (ウィルコクソン・テスト、 $p < 0.05$)。ところが、一日あたりの PS 出現量では 3 群間に全く差はない (H テスト、 $p > 0.05$)。つまり、SCN 破壊により一日の PS 出現の分布パターンが変わっただけのことである。同様に、SWS の一日あたり出現時間も 3 群間で、有意差は見られなかった (H テスト、 $p > 0.05$)。SWS においても、SCN 破壊により、その一日あたり出現時間は健常群と異なることなく、出現の分布が変化しただけであった。

Table 3-1 Frequency and total time of PS for dark phase (D), light phase (L) and total day (24 h), for three groups. The total amount of PS in a day was not significantly differ between the groups. Mean \pm S.D.

	PS frequency			PS time (min)		
	D	L	24 h	D	L	24 h
SCN	19.7 \pm 4.04	19.5 \pm 2.44	39.2 \pm 6.65	24.9 \pm 5.64	23.3 \pm 3.70	48.2 \pm 7.96
Control	13.1 \pm 3.01	25.8 \pm 5.66	38.9 \pm 7.65	17.1 \pm 3.79	31.5 \pm 5.93	48.6 \pm 8.44
Intact	11.3 \pm 3.01	29.4 \pm 6.44	40.7 \pm 6.62	14.1 \pm 6.71	36.8 \pm 8.72	50.9 \pm 8.41

討議

本実験の結果は SCN が、マウスにおいてもまた睡眠・覚醒リズムのサーカディアン・ペースメーカーとして機能していることを示したものである。この報告により、ラット (Stephan & Zucker, 1972; Moore & Eichler, 1972)、ハムスター (Rusak, 1977; Stetson & Watson-Whitmyre, 1976) に加え、マウスでも SCN が概日時計として機能していることが明らかとなり、概日リズム時計

としての SCN が哺乳類において、より普遍性をもつことの一つの証拠を加えたことになる。さらに Inouye & Kawamura (1979)は、生体でハラスナイフにより外科的に SCN を含む “島 (island)” 標本でのマルチプル・ユニット記録から、島内部のニューロン活動には 24 時間の周期性が見いだされたが、島外部のニューロン活動には全く 24 時間の周期性が検出されなかったことを報告し、SCN のニューロンが時計機能を持つことを明らかにした。彼らのこの発見は SCN が概日時計として機能していることを確立し、強固なものとした。

また、彼らの実験で得られた結果は、我々が先にラットの睡眠・覚醒リズムで報告した内容をマウスで確認、敷衍するものであった

(Ibuka & Kawamura, 1975; Ibuka ら、1977)。すなわち、SCN 破壊は一日あたりの PS と SWS の出現量や PS 回数などの睡眠内容を変化させることなく、ただその時間分布のみを変えるという点でのみ、有効であった。換言すれば、SCN が概日時計として機能していて、これが破壊されると明暗期に同調して出現した睡眠・覚醒の概日リズムの時間構造が乱され、その周期性を喪失した、と考えることが出来る。

本実験結果から、ラット、ハムスターに加え、マウスでも SCN の破壊により、時計機能が失われ、概日リズムは消失することがわかった。視交叉上核は、多くの哺乳類で存在することが明らかにされているので (Moore-Ede ら、1982)、他の哺乳類でもこの神経核が、広く概日時計として機能している可能性は、極めて高いと思われる。

しかしながら、序章で述べたように内的脱同調や、SCN 破壊後においてなお出現する体温やコルチコステロンの予期的亢進のリズムは、生体内に SCN 以外にも第二の概日時計機構が存在する可能性があることを強く示唆している。次章ではこの第二の概日時計機構の問題を検討する。

第 4 章 生物時計としての視交叉上核の位置－第二の時計の存在の可能性－

Saito,M., and Ibuka,N(1983) Decreased food intake of rats kept under adurnal feeding cycles: effect of suprachiasmatic lesions. *Physiology and Behavior*, 30, 87-92. を中心に

第4章 生物時計としての視交叉上核の位置—第二の時計の存在の可能性—

『非24時間周期の給餌サイクル下でみられるラットの
摂食量の減少：視交叉上核破壊の効果』

問題

前述のように、一つの概日時計（生物時計）が生体の行動や生理機能の複数の概日リズムをコントロールしているのかどうかは、必ずしも研究者の間で意見が一致しているわけではない。特にヒトに見られる内的脱同調と呼ばれる現象は、睡眠・覚醒の概日リズムと体温の概日リズムを支配する概日時計が別個に存在することの強い証拠として考えられている。私たちは普段、日常的に生活している限り、両者の時計は連動していて、睡眠・覚醒と体温リズムの周期は一致している。ところが、時間手がかりの全くない環境で生活させられると、ある時点から二つ概日リズムの周期が、全く異なってくるのが知られている（Fig. 4-1）。Fig. 4-1において、14日より、体温リズムの周期が25.1時間、睡眠・覚醒リズムの周期が33.4時間となる。この事実は、ヒトでは、概日リズムを生み出す概日時計は、少なくとも睡眠・覚醒と体温の二つあることを強く示すものである。

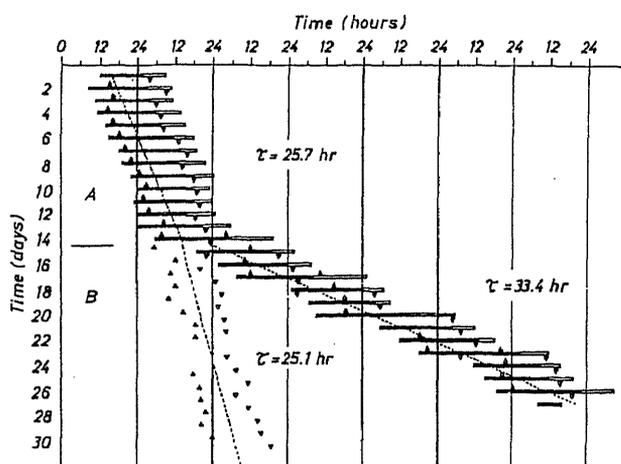


Fig.4-1 Desynchronization of a subject living under constant conditions without environmental time cues. The activity rhythm is represented by bars (black=activity, white=rest). The rectal temperature is represented by triangles, indicating the temporal position of maximum (▲) and minimum values (▼). (Wever, 1979, Fig. 27)

一方、ラットでも1日に与える餌の量を、毎日特定の時刻に1～2時間に制限すると、やがて動物は餌をもらえる時刻を予測し、給餌時刻の2～3時間前から、活発に動くことが知られていた（Bolles & Strokes, 1965）。この制限給餌による予期的な活動性の高まりは餌が与えられる

前から出現することと、制限給餌の周期を 18 時間、あるいは 30 時間というように 24 時間より大きく逸脱した周期では出現しない、ことが重要である。つまり、この二つの性質は、制限給餌を同調因子とするこの予期的リズムが、概日時計（振動体）によって作り出された概日リズムであることをはっきりと示しているからである。

ところが、近年、制限給餌を同調因子として作り出された活動性、体温、コルチコステロンの予期的高進の概日リズムは、ラットの視交叉上核（SCN）を破壊しても消失することはない、との報告がなされた（Krieger ら, 1977; Boulos ら, 1980）。これらの結果はラットにおいても、体温や活動性の概日リズムをコントロールする時計が SCN 一つであるとするならば、説明できないことになる。なぜなら、SCN は破壊されていて、機能しておらず、従って概日時計として働いていないので、動物は時刻を予測することは出来ないからである。

これらの実験が契機となり、ラットでもヒトのように、SCN 以外に第二の概日時計が存在する可能性が出てきた。本章では、以下に述べるような新しい実験パラダイムを考案することにより、この第二の概日時計の存在の可能性を探った。

これまで述べてきたように、ラット、ハムスター、マウス、おそらくは多くの哺乳類で、種々の行動の概日リズムが視交叉上核（SCN）によってコントロールされていることが明らかになった。ラットの摂食行動の概日リズム時計も SCN に存在することがわかっている（Nagai ら, 1978）。

しかしながら、これまでのラットの摂食行動の概日リズムの情報は、すべて自由摂食下で 24 時間連続的に動物が摂食できる、いわゆる「連続自由摂食法」によっている。ところが、最近、非 24 時間周期の給餌では、24 時間周期の給餌に比べ、動物の摂食量が少なくなり、成長が遅くなることを見いだされた (Saito & Noma, 1980)。この摂食量の減少は明暗サイクルのいかににかかわらず出現するので、内因的な 24 時間の概日時計機構と給餌サイクルの間に脱同調が生じたためと解釈された。

そこで本研究では、実験 1 において '自由摂食法'、実験 2 において、非 24 時間周期の '制限給餌法' を導入することにより、概日時計としての SCN の位置をより一層明確にし、SCN 以外の概日時計の存在の可能性を探った。

実験 1 目的

視交叉上核 (SCN) が破壊された動物は、'自由摂食' 法のもとで摂食の概日リズムが消失すること示し、実験 2 において使用する概日リズム消失の被験動物を作り出すことを目的とした。

方法

日本動物社 (大阪、豊中) より購入した雄の成体ウイスター系ラット 10 匹を用いた。動物は明暗サイクル LD12:12(L, 06:00-18:00)、温度 24 ± 2 °C、餌と水が自由に摂取できるケージが置かれた飼育室で維持管理された。ケージ床面での明るさは 130 ~ 150 ルクスであった。

動物は David-Kopf 社の脳定位固定装置にペントバルビタール麻酔 (50 mg/kg, i.p) で麻酔され固定された後、以下の処置がなされた。SCN の破壊 (5 匹、No. 6-10) は 2mA の直流を 30 秒通電した。電極の座標位置は、先端が剥離された絶縁昆虫ピンの先端がブレグマ直下、中心線よりラテラルに 0.4 mm、頭蓋表面 9.2 mm 下にセットされた。統制群 (5 匹、No. 1 ~ 5) は SCN より 1 mm 上を同様なやり方で破壊された。両群の動物は手術後 1 ヶ月の後、個別の実験ケージに入れられた。このケージは餌箱と住居部がトンネルで連結され、シャッターを閉じることにより、動物は餌にアクセスできないよう工夫されている。摂食量は餌箱に付設された秤により自動的に定期的に計量され、記録紙に印字された。

前述のケージに動物を入れ、1 週間後から連続 5 日 LD 下で、餌箱のシャッターを開放して、自由に餌を摂取させ、動物の摂食パターンを 3 時間ごとに計量した。また、5 日間の連続記録から、コンピュータ (HITAC10 II)

により摂食行動のリズムを周期分析した。

結果

統制破壊動物 (No. 1-5) と SCN 破壊動物の LD 下での摂食リズムをみると、統制動物は暗期に摂食が増加し、明期では減少する典型的な夜行性摂食リズムを示したが、SCN を破壊された動物ではこの摂食リズムは完全に消失した (Fig. 4-2 bottom; No. 6-10)。しかし、一日あたり摂食量は統制群 $14.6 \pm 0.7g$ 、SCN 破壊動物 $12.5 \pm 0.6g$ と両群に有意差は見られなかった。パワースペクトル分析からも、SCN 破壊動物で 24 時間周期成分が完全に消えた (Fig. 4-3)。

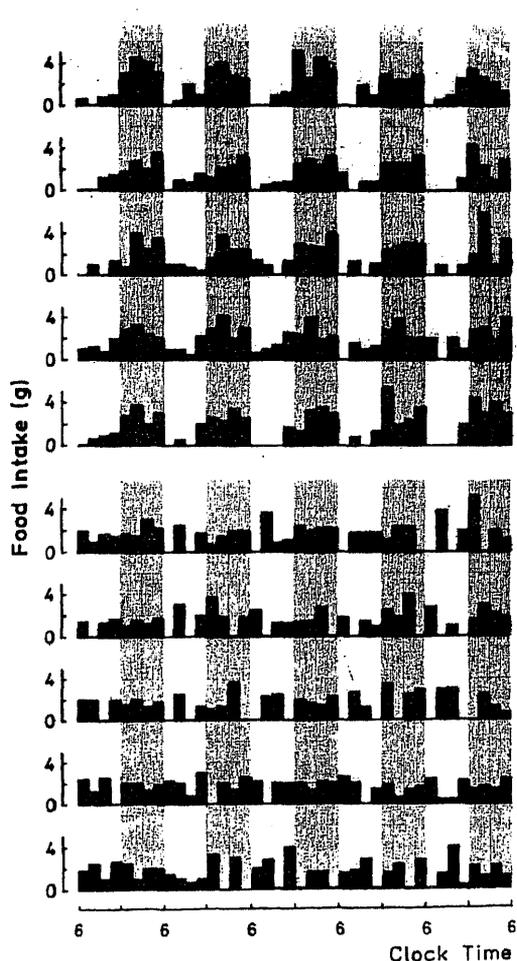


Fig.4-2 Feeding patterns of individual rats for 5 consecutive days. The black columns indicate amounts of food consumed (g) during 3-hr periods. The shaded areas correspond to times of darkness (1800-0600 hr). Rats No. 1-5; control-lesions, Rats No. 6-10; SCN-lesions.

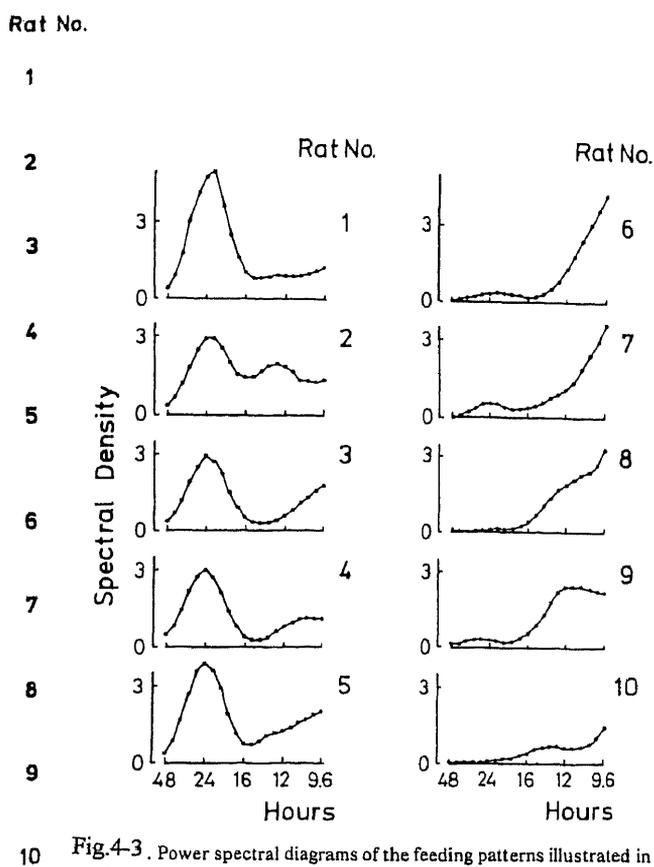


Fig.4-3. Power spectral diagrams of the feeding patterns illustrated in Fig.4-2.

実験 2 目的

概日時計である SCN が破壊され、摂食の概日リズムが失われた動物において、以下に述べる非 24 時間 '制限給餌' 法での摂食量と、24 時間周期の摂食量を比較することにより、SCN 以外の第二の概日時計の存在の可能性を検討する。

方法

被験体は実験 1 で用いたラット 10 匹を用いた。これらの被験体は、実験 1 終了後、明暗サイクルが連続照明環境(LL)に変えられた条件で、2 週間自由摂食が許された。その後の実験は次の 5 段階より構成されている。Phase 1 (24 時間周期給餌) : 毎日、10-16 時の 6 時間、24 時間周期で 17 日間摂食が許される。Phase 2 (20 時間周期給餌) : 第 1 日、10-15 時、第 2 日 6-11 時、第 3 日 2-7 時、・・・のように、20 時間ごとに 5 時間、15 日間摂食が許される。Phase 3 (24 時間周期給餌) : Phase 1 と同じ要領で毎日、6 時間、24 時間周期で 17 日間摂食が許される。Phase 4 (28 時間周期給餌) : 第 1 日、10-17 時、第 2 日 14-21 時、第 3 日 18-1 時、・・・のように 28 時間ごとに 7 時間、20 日間摂食が許された。Phase 5 : Phase 1 と同じ要領で、毎日 6 時間、24 時間周期で 17 日の摂食が許された。各給餌サイクルでの摂食時間は、6/24, 5/20, 7/28 となり、動物は各サイクルの 1/4 と等しい摂食時間を与えられた。この実験 2 の制限給餌では、実験 1 で用いたケージのシャッターは摂食時間以外の時間閉じられ、動物は餌を摂取することは出来なかった。実験終了後、すべての動物の脳を生理食塩水で還流し、10 %ホルマリンで固定した。凍結標本を 15 ミクロンの厚さで切り出し、チオニン染色後、顕微鏡で破壊部位を組織学的に吟味した。

結果

すべての動物は LL 下で、24 時間周期で 6 時間の摂食 17 日間 (Phase 1, 3, 5)、20 時間周期で 5 時間の摂食 15 日間 (Phase 2)、28 時間周期で 7 時間の摂食 20 日間 (Phase 4) のスケジュール条件で、摂食量が測定された。摂食

パターンが安定した最後 10 サイクルの摂食量と実験開始時と終了時の体重をすべての動物において示した (Table 4-1)。両群とも実験時開始時 (SCN 破壊群; $291 \pm 15g$, 統制群 $283 \pm 5g$) に比べ体重は減少したが、実験終了時の SCN 破壊群 (No. 6-10) の平均体重 $257 \pm 20g$ 、統制群 (No. 1-5) の体重 $256 \pm 27g$ と、両群に差は認められない。Phase 1, 3, 5 で摂食量は多少変動したものの、ほとんどすべての動物において Phase 1, 3 に比べ、Phase 2 での摂食量は少ない。同じように、Phase 3 と 5 に比べても、Phase 4 での摂食量は少なかった (Table 4-1)。24 時間周期制限給餌サイクルの順序効果を相殺する目的で、Phase 1 と 3 の摂食量の平均と Phase 2 の摂食量、Phase 3 と 5 の摂食量の平均と Phase 4 の摂食量の比較を SCN 破壊群と統制群それぞれについて行った (Table 4-2)。ここでも明らかのように、24 時間周期制限給餌と比べ、20 時間周期と 28 時間周期の給餌サイクルでの摂食量は SCN 破壊群、統制群共に同じように有意に少ない (Table 4-2)。また、両群は 24 時間サイクルの Phase 1, 3, 5 での摂食量に有意差はない。同じように、20 時間サイクルと 28 時間サイクルの Phase 2 と Phase 4 でも両群間の摂食量に有意差はない。これらのことから、非 24 時間周期の給餌下でみられる摂食量の減少は、SCN 破壊によっても消失することは無いといえる。

SCN 破壊と統制破壊の組織標本写真を Fig. 4-4 に示した。

Table 4-1
BODY WEIGHTS AND FOOD INTAKES OF INDIVIDUAL RATS UNDER
ADIURNAL FEEDING SCHEDULES

Rat No.	Body Weight (g)		Food Intake (g/hr)						
	initial	final	I	II	III	IV	V	(I+III)/2	(III+V)/2
1	295	294	2.5	2.1	2.5	1.9	2.2	2.5	2.3
2	270	164	1.8	1.3	1.8	1.5	1.3	1.8	1.6
3	293	267	2.4	1.3	2.1	1.9	2.0	2.2	2.1
4	281	235	3.0	1.9	2.2	1.9	2.4	2.6	2.3
5	278	321	3.0	1.8	2.5	2.4	2.5	2.8	2.5
6	298	245	1.8	1.1	1.8	1.5	2.0	1.8	1.9
7	302	313	2.5	1.9	2.3	1.9	2.1	2.4	2.2
8	336	292	3.0	1.2	2.5	1.4	1.9	2.8	2.2
9	275	215	2.4	2.0	2.1	1.1	1.0	2.2	1.5
10	246	218	2.4	1.1	1.6	1.3	1.8	2.0	1.7

Food intake was calculated by dividing the total amount of food intake by the total feeding time in consecutive 10-cycle periods. Feeding cycle: I, III, V; 24 hr, II; 20 hr, IV; 28 hr. Rats No. 1-5; control-lesions, Rats No. 6-10; SCN-lesions.

Table 4-2

EFFECTS OF SCN-LESIONS ON FOOD INTAKE UNDER ADIURNAL FEEDING CYCLES

Feeding Cycle	(I+III)/2	II		(III+V)/2	IV	
	24 hr	20 hr		24 hr	28 hr	
Food Intake (g/hr)						
Control-lesions	2.4 ± 0.2	1.7 ± 0.2	(<i>p</i> <0.01)	2.2 ± 0.2	1.9 ± 0.1	(<i>p</i> <0.05)
SCN-lesions	2.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2	(<i>p</i> <0.05)	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.1	(<i>p</i> <0.02)
	(N.S.)	(N.S.)		(N.S.)	(N.S.)	

Food intake was calculated from the data in Table 1 and was expressed as the mean ± S.E.

Statistical significance of differences between values was determined by the paired *t*-test (between values for rats under different feeding cycles) or by Student's *t*-test (between values for rats with control-lesions and SCN-lesions). N.S.; not significant (*p*>0.05).

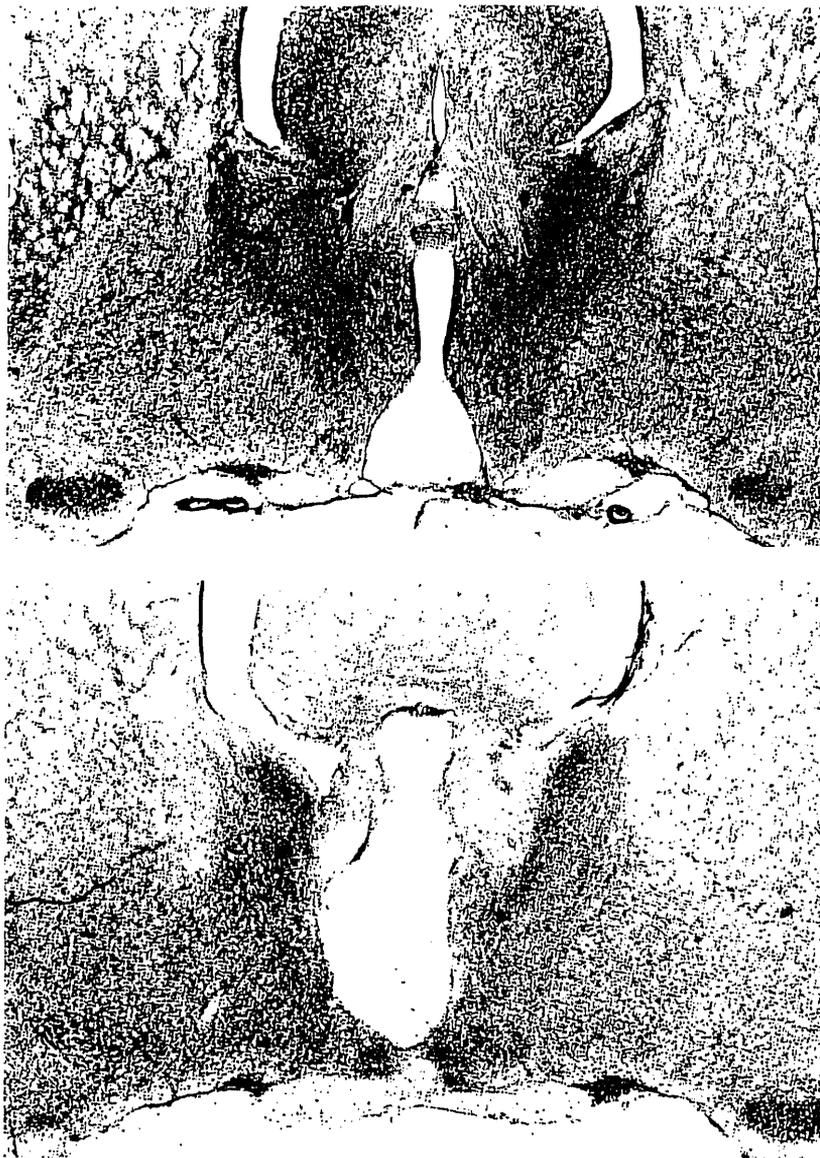


Fig.4-4 Photomicrograph of a coronal section through the optic chiasm, showing the SCN-lesion (upper) and the control-lesion (lower).

討議

本章実験 1 の連続自由摂食法の結果から、SCN 破壊は明暗サイクル下で見られた摂食の概日リズムを完全に消失させた。ところが、ここでもまた SCN 破壊群の一日あたり摂食量は統制群の動物と異なることなく、SCN 破壊はただ摂食リズムのパタン、換言すれば、摂食行動の時間分布、を変化させたただけであった。これらの知見は今までの先行研究結果を裏付けるものであり、SCN が明暗サイクルを同調因子とする概日リズムにおける概日時計（振動体）であることを示すものである。

一方、実験 2 の非 24 時間周期の制限給餌での摂食量は、SCN 破壊群も統制群も共に、20 時間、28 時間周期と 24 時間の制限給餌法では許された摂食率が、各サイクルの 1/4 と 3 群とも同じであるにもかかわらず、非 24 時間周期制限給餌で減少することが明らかとなった。その理由として、概日時計（振動体）と摂食リズムに脱同調が生じたためと考えた。そこで、もし SCN がラットにおいてただ一つの概日時計（振動体）であると仮定すると、本実験では SCN は破壊され、機能していないわけで、概日時計と摂食リズムの脱同調は起こらないことが予測される。従って、SCN 破壊群においては、非 24 時間周期給餌（20 時間と 28 時間周期制限給餌）と 24 時間周期制限給餌の間で、摂食量に違いは見られないはずである。ところが、結果は SCN 破壊群においては、統制群と同じように、非 24 時間周期制限給餌下での摂食量は減少した。このことは SCN 以外に第二の振動体が存在することを強く示す。

これまでもラットを一日 2 時間程度の制限給餌におくと、やがて動物は制限給餌の時刻を予知して、制限給餌時刻の少し前から、活動性が高まることが知られていた (Bolles & Strokes, 1965; Phillips & Mikulka, 1979; Stephan ら 1979a)。この予期的活動性の亢進は、SCN 破壊後でも依然として見られ、副腎のコルチゾールや肝臓のグリコーゲン代謝活動でも生起することが報告されている (Ishikawa & Shimazu, 1980; Krieger ら, 1977)。この予期的活動性の亢進は、18 時間や 30 時間周期の制限給餌では観察されないことから、

概日時計（振動体）を利用して形成されるリズムであると考えられた (Stephan ら、1979b)。

これらの予期的亢進のリズムと本章第2実験の結果はともに SCN 以外にも第二の概日時計が存在することを強く示すものである。

そこで、実際に SCN 以外に第二の概日時計がどこにあるのか、ということが大きな問題である。

摂食行動の概日リズムとの関連から、候補としてあげられたのが、視床下部腹内側核 (VMH) である。VMH は満腹中枢として知られ、この神経核の破壊により、摂食行動は異常をきたし、過度の摂食により肥満になることが知られている。その根拠は、制限給餌によって作り出された摂食の概日リズムが、餌をたべることと関係したことと、SCN 破壊後に見られるコルチコステロンの予期的亢進のリズムが、VMH を破壊すると消失するという Krieger (1980) 自身の報告に基づいていた。しかし、Krieger (1980) の報告は VMH を破壊しても SCN のニューロン活動の概日変動は依然として持続することから、直ちに否定された (Inouye, 1983)。

制限給餌によって活動性、体温、コルチコステロンなどの予期的活動の亢進リズムを作り出すことが出来ても、SCN のニューロン活動は、この制限給餌の影響を受けない。従って、制限給餌は概日時計それ自体の周期や位相を変えることは出来ないといえる。

これらを総合すると、VMH それ自体は自律的に振動する時計ではなく、時計機能を有しているとしても、それはマスタークロックからの信号で動く子時計の役割しか持っていないと考えた方が適切である。このようなわけで、現在も、現実に第二の概日時計がどこにあるかは特定されていない。むしろ、SCN が破壊された場合には、SCN 以外のある特定の部位が概日時計として働くのではなく、脳全体がシステムとして時計機能を担うのかも知れない。いずれにしても、SCN が機能しなくなった場合、上述のように第二の概日時計を想定しなくては説明出来ない多くの事象が存在することは事実なので、SCN 以外の第二の概日時計機構の問題の解明は今後に残さ

れた重要な問題といえる。

3章で、概日時計である視交叉上核の種普遍性の問題を、4章で今日においてもなお大きな課題である概日時計の複数説の問題を取り上げ、実験的に検討した。その結果、SCN 以外に第二の概日時計が存在することが示された。第二の概日時計の局在を解明するには、さらなる実験パラダイムの開発か、技術を含めた研究上のブレイクスルーが必要とされるだろう。

これまで見てきたように、SCN は概日時計として機能し、概日リズムを発現させた。一方、多くの季節リズムは、デイリー・トーパーを含め、その発現に松果体とそのホルモンであるメラトニンが関与している。また、松果体は概日時計である SCN の神経支配を受けている。さらに、哺乳類の光周反応性は概日系を利用しているとの指摘がある (Elliott, 1976)。以上の事実から、季節リズムの発現に概日時計が積極的に関与していることが考えられる。次章では、このように概日リズム研究において、未開拓な季節リズム発現と概日リズムの関係、より端的に言えば、季節リズム発現に関わる概日時計の視交叉上核の役割を取り上げる。

第 5 章 概日リズムと季節リズムの関係ー視交叉上核の 関わりー

Ruby, N.F., Ibuka, N., Barnes, B.M., and Zucker, I. (1989) Suprachiasmatic nuclei influence torpor and circadian temperature rhythms in hamsters. American Journal of Physiology, 257, R210-R215 を中心に

第5章 概日リズムと季節リズムの関係ー視交叉上核の関わりー

『視交叉上核はハムスターのトーパーの発現に大きく影響する』

問題と目的

地球の自転によって作り出された環境変化に対する生理的、あるいは行動的な適応、これが進化の過程において自律性の性質を獲得した現象が、概日リズムといえる。この概日リズムは、誕生以来、24時間周期の明暗や温度変化を経験したことのない深海動物や真洞窟性の動物を除けば、地球に生息するほとんどすべての生物において発達したと言えよう。

この概日リズムと並んで、むしろある場合には、もっと生物的に重要な生物リズムが季節リズム (seasonal cycle, seasonal rhythm) とよぶものである。この季節リズムは、約 23.5° の傾きをもって地球が太陽の周りを1年かけて公転することによって、作り出される地球物理学的な変化に適応した生物リズムといえる。

生物は季節に応じて多くの環境変化を経験する。この中で、最も大きく動物の行動や生理機能に働きかけ、影響する要因が、日の出から日没までの時間、いわゆる日長 (day-length) あるいは光周期 (photoperiod) の変化である。もちろん、温度、降雨量や餌の入手しやすさなども、季節とともに変化し、ある場合には動物の行動を調節するが、季節リズム発現のうえでは、日長に比べれば副次的な役割しか担わない。

このことは、季節により温度や餌の量が、年ごとに変動する幅が大きく不安定であるのに対し、日長変化は毎年極めて正確に繰り返され、安定していて、生物が季節変化を知る手掛かりとして、最も有効な手段であったことと関係している。自然環境では、これらの要因が加重されて、生物に働きかけ、季節の訪れを知らせる。

季節リズムの研究は、概日リズムと比べ、長周期なのでデータ収集に時間を要し、また動物が1年以上の寿命を持つことが必要であるために、概日リズムに比べると、研究の数も限られ、研究が遅れている現状にある。

実験室環境で季節リズムを研究するのに適した動物がハムスター類である。実験に供されるハムスター類は、シリアハムスター（ゴールデンハムスター）、シベリアハムスター（ジャンガリアンハムスター）、トルコハムスター、の三種がいる。これらの動物に共通する特徴は、いずれも春型繁殖動物（長日種、 vernal breeder）であることである。

これらの動物は冬期になると、性腺は萎縮し、生殖行動は停止する。また、シベリアハムスターは、餌の不足するこの寒冷な厳しい環境を生き抜くため、体温を下げ、代謝を抑制するデイリー・トーパー（daily torpor、日内休眠）を示し、エネルギーの消費を極力節約する。同時に、体重を大きく減少させ、必要とするエネルギー摂取を少なくして済むような季節適応をする。

これらの季節リズム行動の発現には、松果体が関与していることが知られている。季節変化の手掛かりである日長の情報は、眼から網膜－視床下部繊維路（RHT）を経て、概日時計（SCN）に達する。その後、室傍核（PVN）、脊髄の IML 核、上頸神経節（SCG）を經由し、一日における陽の長さの情報は松果体に達し、メラトニン分泌を調節する（Fig. 5-1）。秋・冬期は、春・夏に比べ夜（暗）が長くなり、メラトニン分泌は長時間、多量に分泌

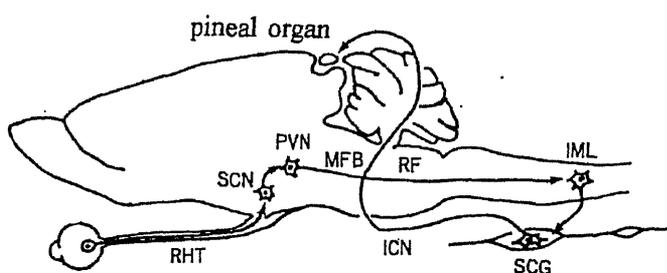


Fig.5-1 Tract of light into pineal organ in a rat. RHT:retino-hypothalamic tract, SCN:suprachiasmatic nucleus, PVN:paraventricular nucleus, MFB:medial forebrain bundle, RF:reticular formation, SCG:superior cervical ganglion. (Honma・Honma・Hiroshige,1989, Fig-2-28).

される。ハムスターのような長日種ではメラトニンは性機能に対し、抑制的に働くので、これらの動物の性腺は冬期に萎縮する。いふなれば、松果体は日長という光情報をメラトニンの量と分泌パターンという液性情報に変

換するトランスデューサーであると言える。

このように生物が一日の陽の長さを弁別する能力を光周期測定 (photoperiodic time measurement, PTM) といい、その基礎に概日振動系の積極的関与が指摘されている (Elliott, 1976)。季節リズムの発現については現在のところ、前述の松果体と概日振動系の関与以上のことは知られていない。しかし、光情報が SCN を経由して松果体に達することと、概日振動系の関与から、概日時計本体である SCN の関与が考えられる。本実験はこのような文脈のもとに、季節リズム発現と視交叉上核の関わりを明らかにしようとしたものである。

シベリアハムスターはデイリー・トーパーを示す夜行性の小型齧歯類である。デイリー・トーパーは短日、寒冷の餌の不足する冬を乗り切るために昼間の非活動期に体温を下げ、代謝活動を抑制することにより、エネルギー消費を節約する季節適応行動である (Hudson, 1978)。この意味では、冬眠と同じであるが、トーパーは低体温状態が普通は 5-8 時間程度、最大でも 10 数時間しか持続しないことと、体温が 15 °C 以下に決してならない、の二つの点で冬眠と異なる。シベリアハムスターは、冬期にこのトーパーの他に、生殖腺の萎縮、熱産生能力の増大、白色への毛衣の変化などの季節適応行動を示す (Goldman & Darrow, 1983; Heldmaier & Steinlechner, 1981; Hoffmann, 1978)。この季節行動を誘発する主要な近要因が日長の短縮である。これらの行動の発現には、日長の短縮によって多量に分泌されるようになる松果体のメラトニンが深く関係している (Steinlechner ら, 1986)。従って、長日下であらかじめシベリアハムスターの松果体を摘出しておくと、短日に暴露しても彼らはこれらの季節行動を示さなくなる、ことが明らかにされている (Vitale ら, 1985)。

デイリー・トーパー発現のタイミングに関する神経機構は全くといっていいほど、研究されていない。一方、これまでの研究から視交叉上核 (SCN) は様々な概日リズム行動を調節していることが明らかにされてきた。同時に冒頭で述べたように、季節時計の役割を担う松果体は複数の径路を

経て、概日時計の SCN よりの入力を受ける。また、デイリー・トーパーは季節性行動のひとつであり、季節行動発現の近要因の日長の弁別には概日振動系の関与が指摘されている。このような理由から、デイリー・トーパーの発現には概日時計本体の SCN が深く関与している可能性が強く示唆される。

本研究では、これらの知見にもとずき SCN が日内休眠の発現にどのように関係しているかを明らかにする。

方法

被験動物と飼育環境：シベリアハムスター（Fig. 5-2）は生後直後から長日 LD14:10(L, 08:00-22:00)の光周期環境で飼育された。18日齢で動物（♂ 14, ♀ 19）は個別ケージに入れられ、短日 LD8:16(L, 08:00-16:00)で温暖(23 ± 2 °C)な環境に移された。これらの動物は 60日齢で同じ短日環境ではあるが、寒冷(15 ± 2 °C)な実験環境に暴露された（Fig. 5-3）。ケージ床面での照度はケージ位置により 30 ~ 150lxであった。動物は木くずの床敷と巣材が入れたプラスチックケージで生活した。餌と水は常時摂取できた。



Fig.5-2 A Siberian hamster with winter coat.

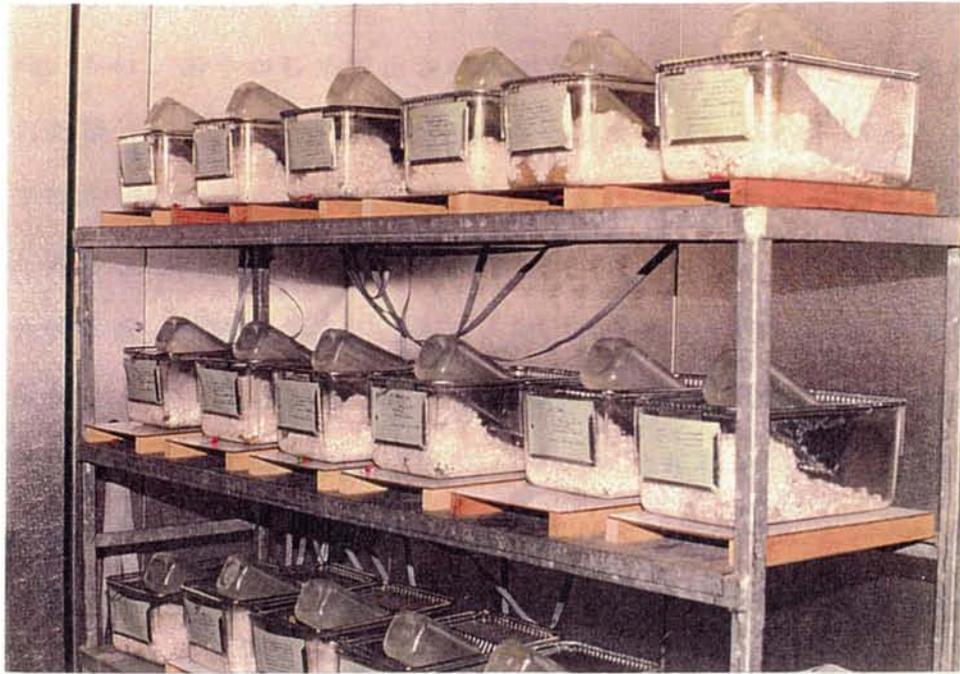


Fig 5-3 An experimental cold room with a short photoperiod. Body temperature is monitored by a transmitter placed under abdomen of an animal.

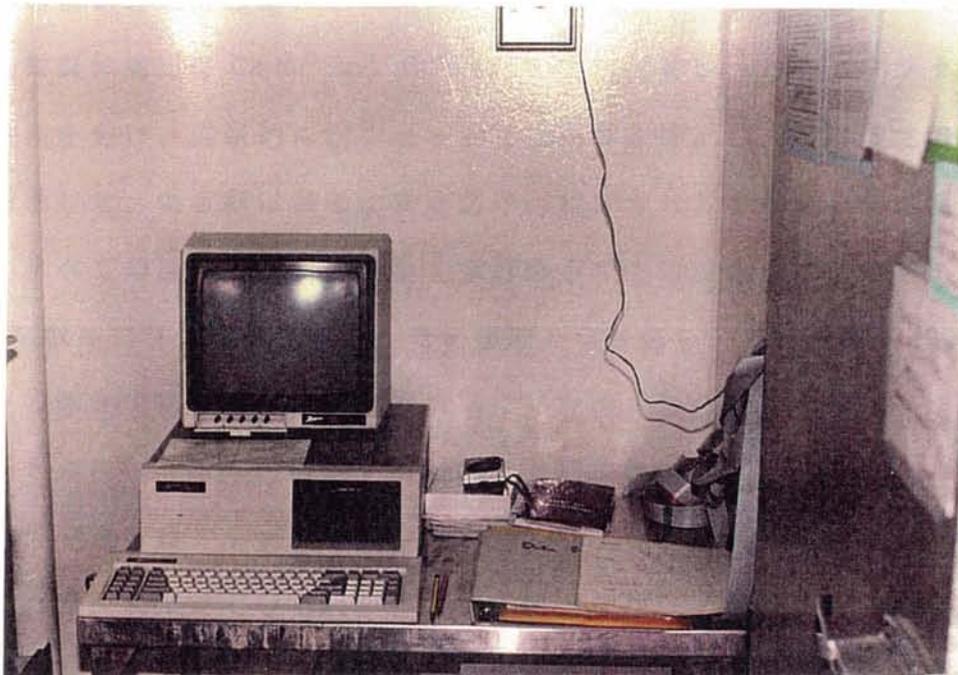


Fig 5-4 An IBM computer system for data-acquisition and data-analysis in the present experiment.

データ収集：体温と活動性はケージ下に置かれた受信ボードによりテレメターシステムによりモニターされた。この原理は動物の腹部に慢性的に埋め込まれたトランスミッター (Minimitter 社、オレゴン州) を利用して、体温を周波数に変換した信号をケージ底面の受信器が捉え、Dataquest 社

(ミネソタ州) のソフトを利用してパソコンに取り込むものである (Fig. 5-4)。あらかじめ較正された小指爪の大きさの送信機は殺菌、消毒された後、58-60 日齢で動物の小腸近くの腹部に、ペントバルビタール麻酔下 (100 mg/kg, i.p) で、慢性的に埋め込まれた。動物は 48 時間の回復を待ち、先の寒冷な実験室環境に戻された。

外科手術：動物が少なくとも週 1 回、トーパー (30 °C 以下の低体温状態) を示すことが 2 週続いたことを確認した後、麻酔下で動物に SCN 破壊、松果体摘出、松果体摘出偽手術のいずれかの手術を施した。SCN 破壊は麻酔された動物を脳定位固定装置に固定し、ブレグマより 1 mm 前方、中心線よりラテラルに 0.2 mm、脳硬膜より 6.6 mm 下の部位を先端 0.1 mm を剥離した絶縁昆虫ピンで 30 秒間、6 mA の直流で熱破壊した。結果的に SCN の部分破壊、あるいは SCN より離れた部位が破壊されたものが統制群の役割を果たした。

松果体摘出は Carter and Goldman の方法に従い、頭蓋にデンタルドリルで穴をあけ、肉眼的にピンセットで松果体を摘出し、顕微鏡で摘出組織を確認した。偽手術は頭蓋に穴をあけ、ピンセットを松果体まで挿入した。

すべての実験終了後、動物を深麻酔下で生理食塩水により脳を還流し、10%ホルマリンで固定した。その後脳を切り離し、凍結脳標本を 50 ミクロンの厚さで切り出し、標本ガラスにマウントした後、クレシールバイオレット染色し、SCN の破壊を顕微鏡で確認した。

データ分析：トーパーの定義は 30 °C 以下の体温が 4 時間以上持続することで、視察でその生起が容易に確認された。上記の短日、寒冷の環境に暴露後、およそ 2 ヶ月したときに出現したトーパーの 3 匹の記録例を Fig. 5-5 に、1 個体の連続 15 日の記録例を Fig. 5-6 に示した。

結果

脳破壊部位確認：SCN が両側性に完全に破壊されていた動物は 7 匹であった (SCN 破壊動物、以後 SCNx と略す)。これらの動物では破壊は、

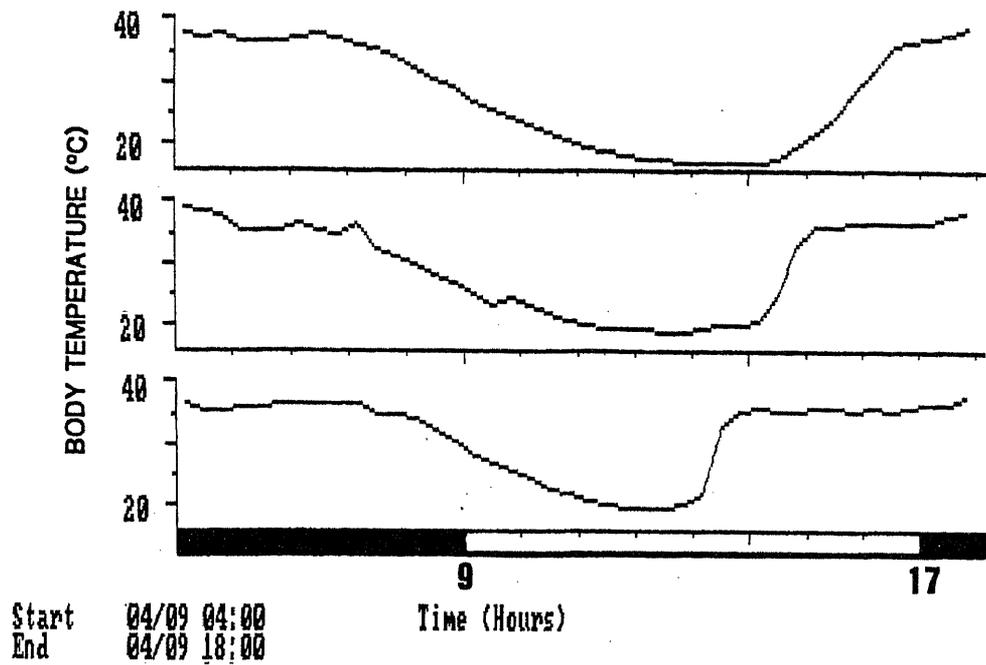


Fig.5-5 Examples of daily torpor in 3 animals under cold and short photoperiod. Body temperature begin to decline a few hours before the onset of light period.

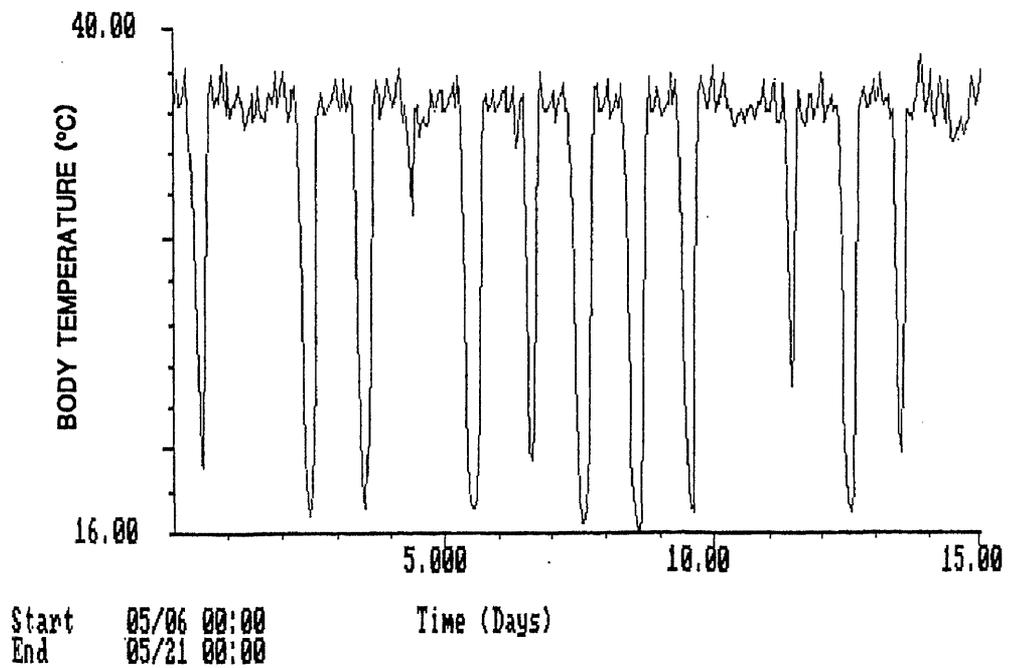


Fig.5-6 Daily torpor in an animal for consecutive 15 days.

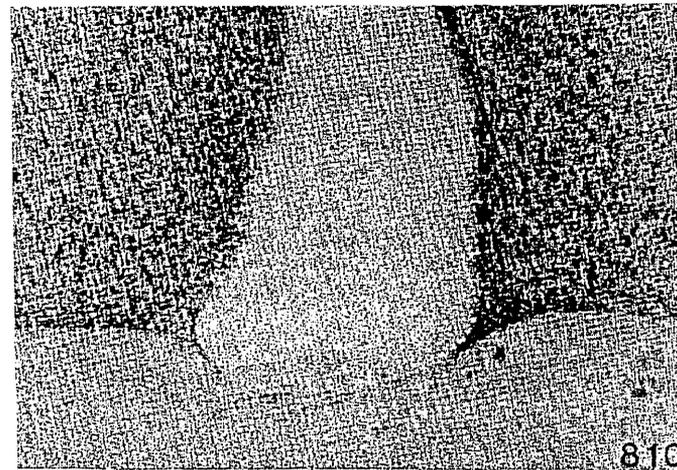
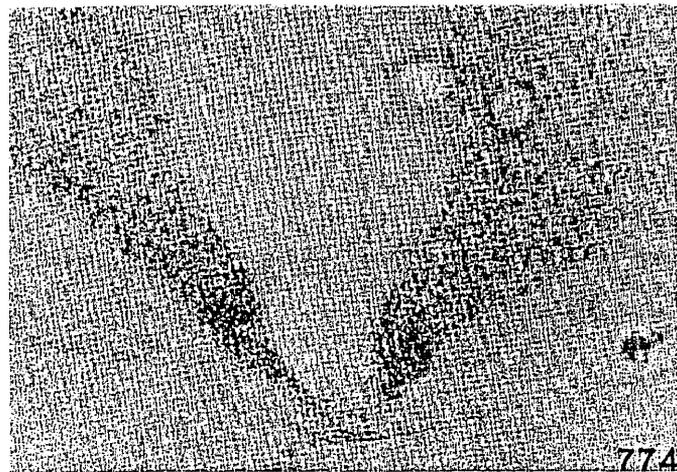
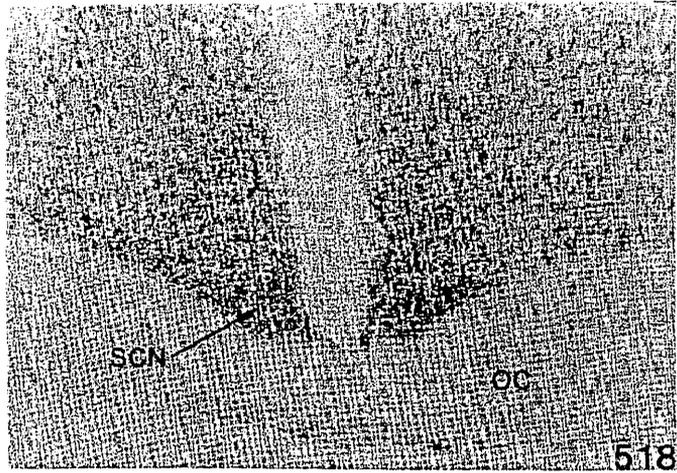


Fig. 5-7 Representative photomicrographs ($\times 100$ original) of cresyl violet-stained coronal brain sections of an intact animal (no. 518) and 2 animals not manifesting torpor postoperatively (nos. 774 and 810). Animal 810 sustained complete ablation of suprachiasmatic nuclei (SCN), while animal 774 sustained partial damage to SCN (see Table 1 for damage to other structures). OC, optic chiasm.

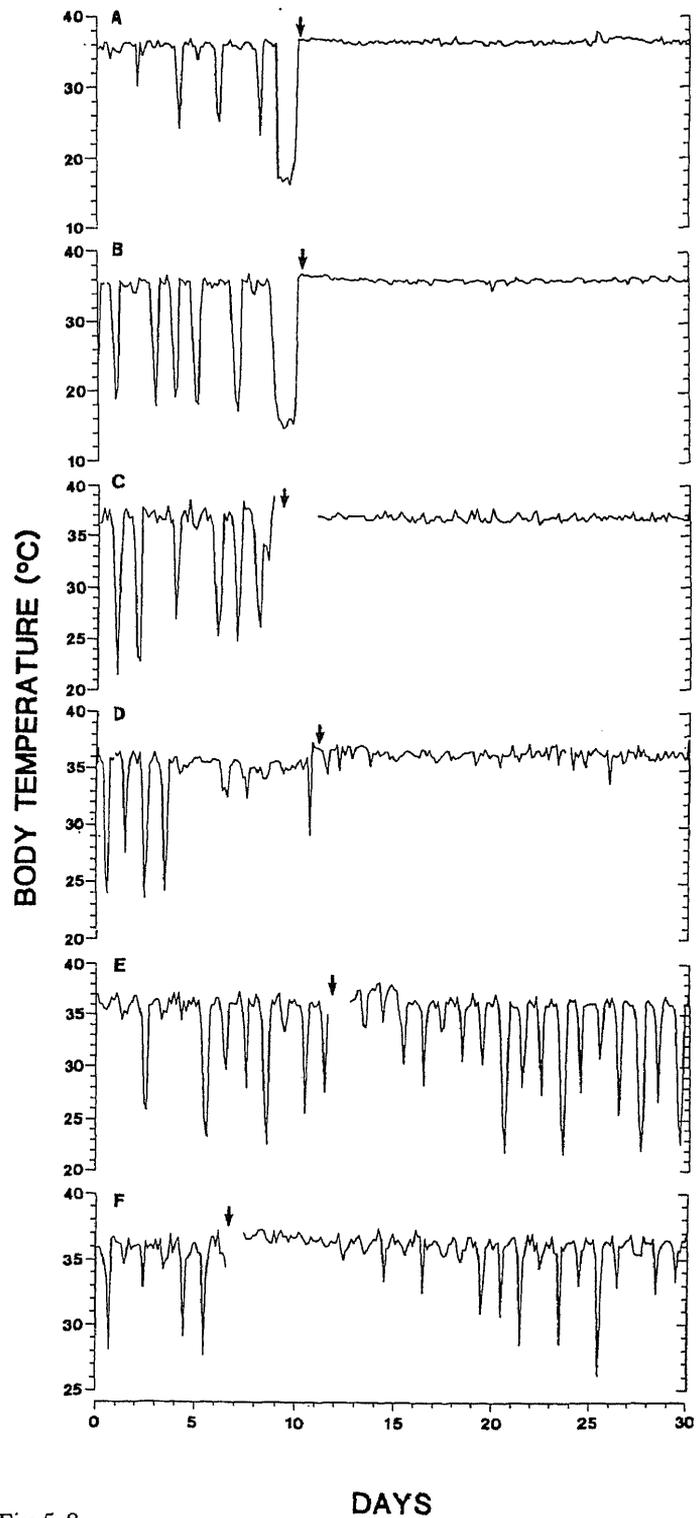


Fig. 5-8. Representative body temperatures of individual hamsters before and after surgery (indicated with arrows). Records in A-D are from animals that sustained complete lesions of SCN; the circadian temperature rhythm was eliminated in each case. Data in E are from a hamster that sustained only partial damage to SCN; other nuclei also were damaged. Record in F is from a representative pinealectomized (PINx) animal.

しばしば室傍核、弓状核、視床下部腹内側核、視交叉などの部位に及んでいた。4匹の動物では破壊は部分的で不完全であり、SCNの一部が残った(部分的SCNx)。12匹がSCNの近傍破壊であった(SCN手術統制)。これらの代表的組織標本例が図5-7に示されている(Fig. 5-7上; 健常SCN、中; SCN部分破壊、下; SCN完全破壊例)。

デイリー・トーパー: SCNxの7匹すべては、手術後30日間の記録で、二度とトーパーを示すことは無かった(Fig. 5-8, A-D)。このうち4匹は術後10週まで、3匹は14-15週目までトーパーの有無をモニターしたが、トーパーの出現は見られなかった。これとは対照的に、SCN破壊が不完全であった動物は術後再びトーパーを示した(Fig. 5-8, E)。これらのSCNの部分的破壊の動物では、最初のトーパーは術後平均で 4.4 ± 0.9 日で出現し、最後のトーパーは 22.6 ± 4.3 日であった。この間に動物は平均で 12.8 ± 0.4 回(日)のトーパーを示した。

松果体摘出動物(PINxと略す, 8匹)は、平均すると、最初のトーパーは術後 11.1 ± 3.2 日、最後のトーパーは 31.6 ± 2.6 日で出現した(Fig. 5-8, F)。この間に彼らは平均 11.9 ± 2.3 回(日)のトーパーを示した。すべての動物で術後6-11週間、トーパーの生起を追跡した。偽松果体摘出動物($n=2$)では術後 3.5 ± 0.4 日目にトーパーが出現し、最後のトーパーは 42 ± 2.3 日であった。

術前において最初のトーパー出現までの日数、すなわちトーパー潜時は短日環境暴露後、SCNx群で 96.3 ± 4.9 日、部分的SCNx群 87.8 ± 5.5 日、そしてPINx群で 82.3 ± 4.9 日で3群の間に有意差は認められなかった(分散分析、 $P > 0.05$)。SCNx、部分的SCNx、PINxそれぞれの手術は最初のトーパーが示されてから、 29.4 ± 4.1 日、 31.5 ± 3.4 日、 33.7 ± 3.9 日で行った。

体温: 補足的に体温リズムを調べた。6匹のSCNxは術後10-15週間、1匹は4週間体温をモニターした。いずれも体温の概日リズムは消失していた。一方、部分的SCNxの4匹は体温の概日リズムが認められた。PINxにおいても体温の概日リズムは消失することはなかった。

討議

SCN 破壊により、例外なくトーパーの出現が見られなくなったことから、はっきり言えることは、SCN がトーパーの発現に必要な神経回路の一部を構成していることである。これまでの研究から、SCN 破壊は睡眠・覚醒、活動性、摂食、水飲み、などの行動やホルモンの概日リズムを消失させたが、SCN 破壊は行動や生理機能の時間的分布を変えるだけで、行動やホルモン分泌の出現そのものを消失させるものでなかった。ところが、デイリー・トーパーの場合、SCN 破壊によりトーパーそのものの発現が完全に消失した。同時に、Fig. 5-8, A-D を見てもわかるように、体温リズムは全く平坦化し 36 °C 付近に安定する。この傾向は術後 30 日経っても、変わらない。

長日から短日に移行した後に見られるデイリー・トーパーや生殖行動の停止のような季節リズムを、動物が示すためには、当然彼らが長日と短日を弁別出来なければならない。換言すると、季節リズム行動の発現機構は光周期測定 (photoperiodic time measurement, PTM) の問題ともいえる。哺乳類でこの光周期測定に概日振動系が関与していることが主張されている

(Elliott, 1976)。事実、概日時計の SCN を破壊すると、長日、短日の区別が不可能になり、ゴールデンハムスターで短日移行後に観察される精巣萎縮が起こらなくなることが報告されている (Rusak & Morin, 1976)。一方、松果体は SCN の神経支配を受けていて (Bittman, 1984; Klein & Moore, 1979)、しかも松果体ホルモンのメラトニンがトーパーの季節発現に必要とされることがわかっているので (Vitale ら, 1985)、SCNx 動物でトーパーの発現が停止したことは、SCN 破壊により松果体が機能的に損傷されたのだと結論したくなる。しかしこの説明は正しくない。なぜなら、本実験からわかるように、PINx 動物では数週間トーパーの出現は持続した (Fig. 5-8, F)。このことは短日下で一旦トーパーが出現した後では、トーパーの維持に松果体は必要でないことを示唆しているからである。

ここで注意しなくてはならないのは、短日暴露後と、短日暴露前の長日

のもとでは松果体摘出の効果が異なることである。前述のように長日下で松果体を摘出した後に、短日にハムスターを暴露しても、デイリー・トーパーや精巣萎縮は見られない。このことは、トーパーの発現とその長期的維持や性腺萎縮のためには、松果体ホルモンのメラトニン分泌が必要であることを示している。ところが、トーパーが短日暴露後に発現した後で、松果体が摘出された場合には、トーパーは依然として発現し続けた。このことからわかるように、松果体摘出後に見られるトーパーの出現は、SCNが健常であれば松果体を必ずしも必要としておらず、トーパーの発現メカニズムは単純でない。

従って、SCN破壊後に見られたトーパーの消失は、松果体が季節性トーパーの発現に関与する機序とは異なった機序で行われていることを示唆する。むしろ、冒頭で述べたように、デイリー・トーパーを含め哺乳類の季節リズム行動の光周期測定（PTM）に概日振動系が関与しているので、概日時計であるSCNの破壊により、光周期測定機能が喪失し、トーパー自体の出現が見られなくなった、と考えた方が妥当である。いずれにしても、季節リズムと概日振動系、概日時計であるSCNと季節リズム、の関わりは今後の研究に待つところが多い。また、低体温の持続が2日以上に及ぶ冬眠とデイリー・トーパーで、SCNが同じような働きをするかどうかも今後の研究課題である。

結論と残された問題

結論と残された問題

本論文では次の事柄が明らかにされた。

第1章『概日リズムの生得的、獲得的基盤』では、突然変異の先天性無眼球症ラットを使って、睡眠・覚醒リズムと回転輪活動の概日リズムの発現過程を調べた。睡眠・覚醒と活動性は、明暗サイクルからフリーランしている明瞭な概日リズムを示した。一方、一眼球が残存したラットでは、明暗サイクルの位相を6時間後退したサイクルに数日の移行期を経て再同調した。

これらの無眼球症ラットでは視神経と視交叉は完全に退化、欠損していたが、視交叉上核(SCN)そのものは、大きさは多少健常ラットに比べ萎縮していたものの、形態学的な異常は特に認められなかった。一眼球残存ラットでは、眼球とSCNをつなぐ網膜視床下部繊維路が正常に機能していたことにより、再同調が可能であった。

これらの知見は、概日時計のSCNが健常であれば概日リズムは出現することを示す。同時にまた、これらの結果は概日リズムは、生後直後からの24時間の明暗サイクルへの暴露によって形成されたものでない、ことを示している。この意味で概日リズムは生得的リズムといえる。

第2章『概日リズムの個体発達』では、早熟性のモルモットと晩熟性のラットを用いて、概日リズムの個体発達の形成を調べた。ラットでは生後直後から、24時間周期の明暗サイクル条件(LD)で飼育しても、恒常明(LL)環境で飼育しても、ともに睡眠・覚醒の概日リズムは4～4.5週にかけて、形成されはじめ、LDサイクルへの暴露が概日リズム形成を早めることはなく、この意味で明暗の環境サイクルは概日リズム形成には二次的役割しか果たさない。一方、モルモットの睡眠・覚醒は昼夜行性がはっきりしないリズムを示した。この特徴は生後直後と大人でも変わらない。その意味

では、早熟性動物の特徴は形態だけでなく、睡眠・覚醒リズムにおいてもみられた。

一日あたりの逆説睡眠（PS）量、徐波睡眠（SWS）量、PS周期、SWS周期などの睡眠特性についても、晩熟性のラットでは成長につれ大きく変化した。最も劇的に変化したのがラットでの一日あたりのPS量であり、成長につれ著しい減少が見られたが、モルモットではこのような傾向は観察されなかった。この点にも早熟性と晩熟性の特徴が反映された。

第3章『生物時計の種普遍性の問題』において、ラットで概日リズムのペースメーカーであることが確立している、視床下部視交叉上核(SCN)が近縁種のマウスにおいても、概日時計であることを確認した。マウスのSCNはラットに比べさらに小さく、これを選択的に破壊することはきわめて困難であったが、SCNが破壊された場合、ラットと同じようにその睡眠・覚醒の概日リズムは完全に消失した。SWS相とPS相を個別に見てもその概日リズムは消失した。SCN近傍破壊、あるいはSCNを完全に破壊できなかった場合には、この概日リズムの消失は観察されなかった。一方、SWSとPSの一日あたり出現量は、SCN破壊により変化することはなく、出現の分布パターンが変化したのみであった。これらの結果は、SCNがマウスにおいても、概日時計であることを示すものであり、哺乳類においてSCNが概日時計である可能性を一層増した、といえる。

第4章『生物時計としての視交叉上核の位置—第二の時計の存在の可能性—』においては、第1実験で、SCN破壊によりラットの摂食概日リズムが消失することを示した。第2実験では、SCN以外に第二の概日時計が存在する可能性を、“非24時間周期制限給餌”の実験デザインを考案することにより明らかにした。この第2実験では、許された摂食時間は20時間周期制限給餌、24時間周期制限給餌、28時間周期制限給餌群でそれぞれ

5 時間、6 時間、7 時間であるが、1 サイクルあたり摂食時間は 3 群において、各サイクルの 1/4 と等しくなっている。SCN 破壊群と統制破壊群の最終 10 サイクルの摂食量は、両群共に 24 時間周期制限給餌に比べ、20 時間周期制限給餌と 28 時間周期制限給餌で減少した。

非 24 時間周期制限給餌での摂食量が 24 時間周期制限給餌に比べ、減少するのは概日時計と摂食行動との間に脱同調が生じたためであると考えられる。第 2 実験では、摂食行動の概日リズムが完全に消失していて、SCN が完全に破壊されていることが明らかである第 1 実験と同じ被験体を用いたので、摂食行動と概日時計である SCN との間に脱同調は生じようがなく、従って、SCN 破壊群では非 24 時間周期制限給餌と 24 時間周期制限給餌での摂食量に差が無いはずである。ところが、本実験では SCN を破壊したにもかかわらず、統制群と同じように、非 24 時間周期制限給餌での摂食量は 24 時間周期制限給餌と比べ、減少した。このことは SCN 以外に第二の概日時計が存在することを強く示すものである。

第 5 章『概日リズムと季節リズムの関係ー視交叉上核の関わりー』においては、シベリアハムスターのデイリー・トーパー (daily torpor、日内休眠) 発現にかかわる視交叉上核 (SCN) の役割を明らかにした。トーパーは短日、寒冷の冬期に発現する季節行動である。その一方、トーパーはこの動物の非活動期である明期に同調して出現する概日リズム特性を示す。

齧歯類のトーパーや生殖行動の停止のような季節リズム行動を誘発する近要因は日長の短縮である。一日あたりの陽の長さの情報は眼から SCN を経て、最終的に松果体に達し、メラトニン分泌を調節する。従って、松果体は広く季節リズム行動の発現に関与することが知られている。また、動物が季節リズム行動を示すためには、当然、長日と短日を弁別することが必要され、この弁別には概日振動系を利用していることもわかっている。

これらのことを総合すると、トーパーの発現に SCN が積極的に関与していることは確実であるが、全くその発現機構は研究されていない。

そこで、トーパ発現に及ぼす SCN 破壊と松果体摘出の効果を見た。動物を短日寒冷に暴露して数十日経過後、動物がトーパーを示した後、SCN を破壊すると以後 2 度とトーパーは全く出現しない。ところが統制破壊動物では、動物は再びトーパーを示した。動物がトーパーを示した後、松果体を摘出した場合にも、動物はトーパーを再び示した。これらの結果はトーパーの発現には SCN が積極的に関与し、SCN を必要とすることを示す。この場合、SCN 破壊により松果体が機能しなくなったわけではない。なぜなら、松果体を摘出して、依然トーパーは出現し続けたからである。むしろ、SCN 破壊により、概日振動系を利用して、動物が長日と短日を弁別する光周期測定機構 (photoperiodic time measurement, PTM) が損なわれた可能性が強く示唆された。

本研究で以上のとおりの知見を得たが、これらの結果は概日リズム研究の発展に大きく寄与したものであると信じている。その一方で、今後の更なる研究を必要とする問題も残された。

その一つが概日時計の複数説の問題である。この問題はヒトだけでなく、ラットやハムスターの齧歯類でも問題とされた。本研究の実験パラダイムやこれまでの実験で明らかにされたように、齧歯類でも複数の概日時計の存在を仮定しなくては、説明のつかない現象の存在は多い。しかし、SCN のような強力な別の概日時計機構が、脳のどこかに局在するかの問題は容易に解決できないだろう。SCN が破壊され、機能しなくなった場合には、代償的に脳全体が計時機能を持つシステムとして働き出す可能性も考えられないことではない。スズメのような鳥では、視交叉上核と松果体が共に、概日時計機能を持って、行動を制御している。しかし、齧歯類では松果体を摘出して、概日リズムが消失しないことは、古くから知られている

複数時計を考える場合も、これらの時計が親時計 (master clock) と子時計 (slave oscillator) の関係にあるのか、あるいは、時計は相互に独立し、

階層関係を持たないのか、の問題も重要である。これらは依然として未解決であり、今後の課題である。

次に残された課題は、概日時計である視交叉上核が、季節リズム以外にも他の生体リズムにおいてどのような役割を果たしているかの問題である。恒常環境下で出現する概年リズム (circannual rhythm)での役割は最近になってやっと検討されはじめたが、SCN を破壊しても、それは体重変化や冬眠の概年リズムに大きな影響を与えるが、本研究で見た季節リズムとは異なり、体重変化を喪失させたり、冬眠の出現そのものを消失させるはないことが知られている (Ruby ら、1998)。また、本研究では季節リズムとしてデイリー・トーパーを取り上げ、SCN 破壊の効果を調べたが、本研究で得られた結果が、毛色変化や、体重変化のような他の季節リズムに広く妥当するのかな問題も、今後の検討を必要としている。半日周期の生体リズム、約1月周期の生体リズム、前述の概年リズム、など生物はこれらのリズムに固有な生体時計を持っているのか、あるいはこれらすべてに共通する時計を持っているのか、この問題も実は概日リズム研究で重要な大きな課題であり、今後の研究が待たれるところである。

引用文献

- Allison,T., and Van Twyver,H. (1970) The evolution of sleep. *Nat. His.* 79,56-66.
- Aschoff,J. (1960) Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 25, 11-28.
- Barnes,B., Kretzman,M., Licht,P., and Zucker, I. (1986) The influence of hibernation on testis growth and spermatogenesis in the golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Biol. Reprod.*, 35, 1289-1297.
- Bittman,E.L. (1984) Melatonin and photoperiodic time measurement: evidence from rodents and ruminants. In: *The Pineal Gland*, edited by R.J.Reiter. New York: Raven Press. pp.155-192.
- Block,G.D. (1981) In vivo recording of the ocular circadian rhythm in *Aplysia*. *Brain Res.*, 222, 138-143.
- Bolles,R.C., and Stokes,L.W. (1965) Rat's anticipation of diurnal and a-diurnal feeding. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 60, 290-294.
- Boulos,Z., Rosenwasser,A.M., and Terman,M. (1980) Feeding schedules and the circadian organization of behavior in the rat. *Behav. Brain Res.*, 1, 39-65.
- Davis,F.C., and Menaker,M.(1981) Development of the mouse circadian pacemaker. *J. Comp. Physiol.*, 43, 527-539.
- Deguchi,T.(1975) Ontogenesis of a biological clock for serotonin: acetyl coenzyme A N-acetyltransferase in pineal gland of rat. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 72, 2817-2818.
- Ebihara, S., and Kawamura, H. (1981) The role of pineal organ and the suprachiasmatic nucleus in the control of circadian locomotor rhythms in the Java sparrow, *Padda oryzivora*. *J. Comp. Physiol.*, 141, 207-214.
- Elliott,J.A. (1976) Circadian rhythms and photoperiodic time measurement in mammals. *Fed. Proc.*, 35, 2339-2346.
- Faradji,H.R., Cespuglio,G., Rondot,L.Paut, and Jouvet,M. (1980) Absence of light-dark entrainment of the sleep-waking cycle in mice with intact visual perception. *Brain Res.*, 202, 41-49.
- Fuchs,J.L., and Moore,R.Y.(1980) Development of circadian rhythmicity and light responsiveness in the rat suprachiasmatic nucleus: a study using the 2-deoxy(1-¹⁴C) glucose method. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 77, 1204-1208.
- Gaston,S., and Menaker,M.(1968) Pineal function: the biological clock in the sparrow? *Science*, 160, 1125-1127.

- Gibbs,F.P. (1981) Temperature dependence of rat circadian pacemaker.
Am. J. Physiol., 241, R17-R20.
- Goldman,B.D., and Darrow,J.M. (1983) The pineal gland and mammalian photoperiodism.
Neuroendocrinology, 37, 386-396.
- Halberg,F.(1959) Physiologic 24-hour periodicity : general and procedural considerations
with reference to the adrenal cycle. Z. Vitamin-, Hormon- und Fermentforsch,
10, 225-296.
- Heldmaier,G., and Steinlechner,S. (1980) Seasonal pattern and energetics of short daily
torpor in the Djungarian hamster, *Phodopus sungorus*. Oecologia, 48,265-270.
- 本間 研一・本間さと・広重 力 (1989) 生体リズムの研究. 北海道大学
図書刊行会
- Hoffmann,K. (1978) Effects of short photoperiods on puberty, growth, and moult in the
Djungarian hamster(*Phodopus sungorus*). J. Reprod. Fertil., 54, 29-35.
- Hudson,J.W. (1978) Shallow daily torpor: a thermoregulatory adaptation. In:Strategies
in the Cold, edited by L.H.C.Wang, and J.Hudson. New York: Academic Press,
pp.67-108.
- 井深信男 (1982) 睡眠覚醒の発現機構. 蛋白質 核酸 酵素, 27, 246-258.
- Ibuka, N. (1984) Ontogenesis of circadian sleep-wakefulness rhythms and developmen-
tal changes of sleep in the altricial rat and in the precocial guinea pig. Behavioural
Brain Research, 11, 185-196.
- 井深信男 (1985a) サーカディアン・システムの神経機構とその生理心理学.
心理学研究, 56, 300-315.
- 井深信男 (1985b) 睡眠・覚醒のサーカディアンシステム. 神経研究の
進歩,29, 15-27.
- Ibuka,N. (1987) Circadian rhythms in sleep-wakefulness and wheel-running activity
in a congenitally anophthalmic rat mutant. Physiol.Behav., 39, 321-326.
- 井深信男 (1990) 行動の時間生物学. 朝倉書店 (東京)
- Ibuka,N., and Fukumura,K. (1997) Unpredictable deprivation of water increases the
probability of torpor in the Syrian hamster. Physiol. Behav., 62, 551-556.
- Ibuka,N., and Kawamura,H. (1975) Loss of circadian rhythm in sleep- wakefulness cycle
in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. Brain Res., 96, 76-81.
- Ibuka,N., and Zucker,I. (1986) Daily torpor and sleep. Abstract of Japan-US Seminar
on Biological Rhythms (Honolulu).
- Ibuka,N., Inouye, S.T., and Kawamura,H.(1977) Analysis of sleep-wakefulness rhythms

- in male rats after suprachiasmatic nucleus lesions and ocular enucleation.
Brain Res., 122, 33-47.
- Ibuka,N., Nihonmatsu,I., and Sekiguchi,S. (1980) Sleep-wakefulness rhythms in mice after suprachiasmatic nucleus lesions. *Waking and Sleeping*, 4, 167-173.
- 井深信男・関口茂久・阿部 勲 (1977) Infradian Zeitgeber への同調・脱同調 (マウス) . 日本動物心理学会第 3 7 回大会発表抄録。
- Ikeda,Y., and Chiba,Y. (1981) Circadian activity rhythm in an anophthalmic mouse mutant. *Zool. Mag.*, 90, 362-367.
- 池上 朗・井深信男 (1985) 明暗刺激の位相変位後の睡眠・覚醒リズム . 日本動物心理学会第 4 5 回大会発表抄録。
- Inouye,S.T. (1983) Does the ventromedial hypothalamic nucleus contain a self-sustained oscillator associated with the periodic feedings ? *Brain Res.*, 279, 53-63.
- Inouye,S.T.,and Kawamura,H. (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 76, 5962-5966.
- Ishikawa,k., and Shimazu,T. (1980) Circadian rhythm of liver glycogen metabolism in rats: effects of hypothalamic lesions. *Am. J. Physiol.*, 238, E21-E45.
- Jouvet-Mounier,D., Astic,L., and Lacote,D. (1970) Ontogenesis of the states of sleep in rat, cat, and guinea pig during the first postnatal month. *Develop. Psychobiol.*, 2, 216-239.
- Klein,D.C., and Moore,R.Y. (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxy indole-O-methyltransferase: control by the retino-hypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.*, 174, 245-262.
- Kleitman, N., and Engelman,T.G. (1953) Sleep characteristics of infants. *J. Appl. Physiol.*, 7, 269-282.
- Krieger,D.T. (1980) Ventromedial hypothalamic lesions abolish food-shifted adrenal and temperature rhythmicity. *Endocrinol.*, 106, 649-654.
- Krieger,D.T., Hauser,H., and L.C.Krey.(1977) Suprachiasmatic nuclear lesions do not abolish food-shifted circadian adrenal and temperature rhythmicity. *Science*, 197, 398-399.
- Miyabo,S., Yanagisawa,K.,Ooya,E.,Hisada,T., and Kishida,S. (1980) Ontogeny of circadian corticosterone rhythm in female rats: effects of periodic maternal deprivation and food restriction. *Endocrinology*, 106, 636-642.
- Monnier,M., Bremer,F., Gaillard,J.M., Hediger,H., Horne,J.A., Parmeggiani,P.L., Passouant, P., and Rossi,G.F. (1980) *Biology of sleep. An interdisciplinary survey.*

- Experientia, 36, 1-27.
- Moore,R.Y., and Eichler,V.B. (1972) Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Res.*, 42, 201-206.
- Moore,R.Y., and Klein,D.C. (1974) Visual pathways and the central neural control of a circadian rhythm in pineal serotonin N-Acetyltransferase activity. *Brain Res.*, 71, 17-33.
- Moore-Ede,M.C., Sulzman,F.M., and Fuller,C.A. (1982) *The Clocks That Time Us.* Cambridge, Massachusetts:Harvard University Press
- Nagai,K., Nishio,T., Nakagawa,H., Nakamura,S., and Fukuda,Y. (1978) Effect of bilateral lesions of the suprachiasmatic nuclei on the circadian rhythm of food intake. *Brain Res.*, 142, 384-389.
- Nishiitsutsuji-Uwo,J., Pittendrigh,C.S.(1968) Central nervous control of circadian rhythmicity in the cockroach III. The optic lobes, locus of the driving oscillator ? *Zeitsch. verglei. Physiol.*, 58, 14-46.
- Page,T.L.(1982) Transplantation of the cockroach circadian pacemaker. *Science*, 216, 73-75.
- Phillips,J.L.M., and Mikulka,P.T.(1979) The effect of restricted food access upon locomotor activity in rats with suprachiasmatic nucleus lesions. *Physiol. Behav.*, 23, 257-262.
- Portman,A(1961) 人間はどこまで動物か. 高木正孝訳 岩波書店 (東京)
- Richter, C.P.(1967) Sleep and activity: their relation to the 24-h clock. In: *Sleep and Altered States of Consciousness*, Vol.45, edited by S.S.Kety, E.V.Evarts, and R.L.Williams. Baltimore:William and Wilkins, pp.8-29.
- Richter, C.P.(1971) Inborn nature of the rat's 24-hour clock. *J.Comp.Physiol.Psychol.*, 75, 1-4.
- Ruby,N.F., Dark,J., Heller,H.C., and Zucker, I.(1998) Suprachiasmatic nucleus:role in circannual body mass and hibernation rhythms of ground squirrels. *Brain Res.*, 782, 63-72.
- Ruby,N.F., Ibuka,N., Barnes,B., and Zucker,I. (1989) Suprachiasmatic nuclei influence torpor and circadian temperature rhythms in hamsters. *Am. J. Physiol.*, 257, R210-R215.
- Rusak,B. (1977) The role of the suprachiasmatic nuclei in the generation of circadian rhythms in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *J. Comp. Physiol.*, 118, 145-164.
- Rusak,B., and Morin,L.P. (1976) Testicular responses to photoperiod are blocked by lesions of the suprachiasmatic nuclei in golden hamsters. *Biol. Reprod.*, 15, 366-374.
- Saito,M., and Ibuka,N.(1983) Decreased food intake of rats kept under adiaburnal feeding

- cycles: Effect of suprachiasmatic lesions. *Physiol. Behav.*, 30, 87-92.
- Saito,M., and Noma,H. (1980) Food intake and growth of rats fed with adurnal periodicity. *Physiol. Behav.*, 24, 87-91.
- Scheuch,G.C., Johnson,W., Conner,L., and Silver,J.(1982) Investigation of circadian rhythms in a genetically anophthalmic mouse strain: correlation of activity patterns with suprachiasmatic nuclei hypogenesis. *J. Comp. Physiol.*, 149, 333-338.
- Scwartz,W.J., and Gainer,H. (1977) Suprachiasmatic nucleus: Use of ¹⁴C-labeled deoxyglucose uptake as a functional marker. *Science*, 197, 1089-1091.
- Steinlechner,S.G., Heldmaier,C., Wever,C., and Ruf,T. (1986) Role of photoperiod: pineal gland interaction in torpor control. In: *Living in the Cold: Physiological and Biochemical Adaptations*, edited by H. C.Heller, X.J.Musacchia, and L.H.C.Wang. New York: Elsevier, pp.301-307.
- Stephan,F.K., and Zucker,I.(1972) Circadian rhythms in drinking and ocomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 69, 1583-1586.
- Stephan,F.K., Swan,J.M., and Sisk,C.L. (1979a) Anticipation of 24-hr feeding schedules in rats with lesions of the suprachiasmatic nucleus. *Behav. Neural. Biol.*, 25, 346-363.
- Stephan,F.K., Swann,J.M., and Sisk,C.L. (1979b) Entrainment of circadian rhythms by feeding schedules in rats with suprachiasmatic lesions. *Behav. Neural. Biol.*, 25, 545-554.
- Stetson,M.H., and Watson-Whitmyre,M. (1976) Nucleus suprachiasmatics: The biological clock in the hamster? *Science*, 191, 197-199.
- Takahashi,J.S., and Menaker,M. (1982) Role of the suprachiasamtic nuclei in the circadian system of the house sparrow, *Passer domesticus*. *J. Neurosci.*, 2, 815-828.
- Takahashi,K., Hanada,K., Kobayashi,K., Hayafuji,C., Otani,S., and Takahashi,Y.(1979) Development of the circadian adrenocorticosterone rhythm in rats:studies by determination of 24- or 48-hour patterns of blood corticosterone levels in individual pups. *Endocrinology*, 104, 954-961.
- Tinbergen,N. (1965) On aims and methods of the ethology. *Zeitsch. fur Tierpsychol.*, 20, 410-433.
- Ueda,S., and Ibuka, N.(1995) An analysis of factors that induce hibernation in the Syrian hamster. *Physiol. Behav.*, 62, 551-556.
- Vitale,P.M., Darrow,J.M., Duncan,C.A., Shustak,C.A., and Goldman,B.D. (1985) Effects of photoperiod, pinealectomy and castration on body weight and daily torpor in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *J. Endocrinol.*, 106, 367-375.

- Wenisch,H.J.C. (1976) Retinohypothalamic projection in the mouse: Electron microscopic and iontophoretic investigations of hypothalamic and optic centers.
Cell Tiss. Res., 167, 547-561.
- Wever,R.A.(1979) The circadian system of man. Berlin:Springer-Verlag.