



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Effects of hyperglycemia on neuronal activity in the nucleus tractus solitarius and the area postrema [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	播磨, 美樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12168号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62226
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Miki_Harima_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 播 磨 美 樹

学 位 論 文 題 名

Effects of hyperglycemia on neuronal activity
in the nucleus tractus solitarius and the area postrema

（孤束核および最後野のニューロン活動に対する血糖値上昇の影響）

【目的】延髄の孤束核および最後野に細胞外グルコース濃度の変化に対して応答するグルコース応答性ニューロンが存在することは、脳スライスを用いた電気生理学的研究により明らかにされている。また、孤束核および最後野へは求心性迷走神経の直接投射があり、末梢器官からのグルコース動態の情報が伝達される。すなわち、上述のニューロンは、血液から中枢神経系に供給されるグルコース濃度の変化および迷走神経によって伝えられる門脈のグルコースセンサーの情報を統合して自律系の反射を誘発する。また、孤束核および最後野からは視床下部への投射があり、視床下部ニューロンの活動を修飾して、摂食行動の調節に重要な役割を果たしていると考えられている。このような糖定常説として知られている摂食調節機序における脳幹部のグルコース応答性ニューロンの役割を検討する際に、血糖値の経時的変化とそれに随伴する脳幹部のニューロン活動の変化を同時に定量評価した知見が必要であった。そこで本研究では、血糖値上昇に伴う脳幹部ニューロン活動の変化を*in vivo*で明らかにして、血糖値変化に伴う摂食調節機序の詳細を明らかにすることを目的として実験を行った。

【方法】以下に人為的な血糖値を上昇とその測定方法、およびニューロン活動の評価方法について述べる。SD系雄性ラット（250～500 g）を用い、自由水摂取下において24時間の絶食をさせた後、1.1 Mグルコース溶液（D(+)-glucoseを生理食塩水に溶解）または生理食塩水を腹腔内注射（10 ml/kg 体重）により投与し、各々をグルコース群および対照群とした。血糖値を測定するために一定のタイミングで尾静脈から採血を行った。まず始めの実験として、絶食開始直前、24時間絶食後、各溶液投与後15, 30, 60, 90, 120分の時点で採血し、グルテストNeoアルファ（三和化学研究所）を用いて血糖値を測定した。次に異なる動物を用いて、上述と同じ条件で各溶液を投与した2群を設定し、各溶液投与2時間後にウレタン麻酔（1 g/kg 体重、腹腔内注射）を施し、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定を行い、脳幹部前額断切片（厚さ35 μ m）を作製した。標本は0.3%

過酸化水素水含有メタノール溶液で内因性ペルオキシダーゼの不活化を行い、ブロッキング剤（Blocking one Histo, ナカライテスク）にて非特異的抗原-抗体反応が生じるのを阻害した後、一次抗体として抗c-Fos抗体（rabbit polyclonal antibody, 1:2500, SantaCruz Biotechnology Inc.）を35℃で一晩、反応させた。続いてビオチン標識抗ウサギIgG抗体（Biotinylated Anti-Rabbit IgG 7.5 µg/ml, Vector Laboratories）を35℃で1時間反応させた後、アビジン-ビオチン標識複合体（Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories）を室温で1時間反応させた後、DAB（3,3'-diaminobenzidine 0.01%）/ 硫酸ニッケルアンモニウム（0.05%）溶液にH₂O₂（0.3%）を加えて発色させた。DAB染色後の標本を乾燥後、封入剤（CC / Mount, Diagnostic BioSystem）を用いて封入した。孤束核と最後野を含む領域の光学顕微鏡写真を撮影後、画像解析ソフト（Image J, NIH）にて最後野および孤束核におけるc-Fos陽性細胞数を計測し、1個体より得られたスライス標本のc-Fos陽性細胞数の合計数を比較した。尚、c-Fos陽性細胞の解析には、グルコース溶液投与直前と投与後15分の時点での血糖値を計測して、通常生じる血糖値の経時変化が確認できた動物のみを用いた。

血糖値およびc-Fos陽性細胞数の比較には各群の平均値±SEMを算出し、Student's *t* testを行い、有意水準はいずれも5%以下とした。

【結果】絶食開始直前と24時間絶食後の平均血糖値は97.7 ± 1.9 mg/dl から65.2 ± 2.7 mg/dl に減少し、統計学的な有意差が認められた（*p* < 0.01, *n* = 12）。グルコース溶液投与による血糖値変化は、投与から15, 30, 60, 90, 120分後において、279.9 ± 8.5, 210.0 ± 7.4, 122.3 ± 3.0, 98.3 ± 3.4, 82.8 ± 4.8 (mg/dl) となり、15分程度で最高値となりその後徐々に下降し、投与後90分で絶食直前の血糖値レベルまで低下した。グルコース群の血糖値は、グルコース溶液投与後のいずれの時点でも対照群と比較して有意に高値を示した（グルコース群, *n* = 6; 対照群, *n* = 6, *p* < 0.05）。次にグルコース投与2時間後のc-Fos陽性細胞数を解析したところ、孤束核におけるc-Fos陽性細胞数は、対照群で484.0 ± 119.0 (*n* = 5) であり、グルコース群の1504.3 ± 233.8 (*n* = 6) と比較して有意な増加が認められた（*p* < 0.01）。最後野におけるc-Fos陽性細胞数は、対照群で503.0 ± 68.6 (*n* = 5) であり、グルコース群の677.8 ± 70.5 (*n* = 6) と比較して増加する傾向を示したが、両群間に統計学的な有意差は認められなかった。

【考察】血糖値上昇により孤束核において多数のグルコース応答性ニューロンの活動が亢進したこと、または血糖値上昇に伴い二次的に増加した食欲関連ペプチド等に応答するニューロン活動が亢進したことが示唆された。一方、最後野においては、血糖値上昇に伴うc-Fos陽性細胞数の有意な増加が認められなかったことから、血糖値上昇時において最後野のグルコース応答性ニューロンお

よび同部の化学受容性ニューロンの挙動は孤束核の神経活動の変化とは並行して生じないことが示唆された。これらの結果から、摂食調節における孤束核と最後野の役割に差があることが示唆され、その詳細の解明が今後の課題となった。また、最後野ニューロンの活動については、今後の研究において、最後野におけるグルコース応答性ニューロンの分布密度や迷走神経の直接投射の割合などの局所解剖学的な孤束核との差異や血液中の食欲関連物質動態の影響などを考慮して解析することの重要性が示された。