

# 輸送によりヤギの間脳および下垂体に発現する c-Fos タンパク質の分布

前島 裕子<sup>1,2)</sup>、青山 真人<sup>1)</sup>、阿部 朗子<sup>1)</sup>、杉田 昭栄<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 宇都宮大学農学部, 生物生産科学科, 動物機能形態学研究室 321-8505 宇都宮市峰町 350

<sup>2)</sup> 東京農工大学大学院, 連合農学研究科 183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8

## Induced expression of c-Fos in the diencephalon and the pituitary gland of goats following transportation

Yuko Maejima<sup>1,2)</sup>, Masato Aoyama<sup>1)\*</sup>, Akiko Abe<sup>1)</sup>, Shoei Sugita<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University: 350 Minemachi, Utsunomiya, Tochigi 321-8505

<sup>2)</sup> Department of Animal Production, United Graduate School of Agricultural Science,

Tokyo University of Agriculture and Technology: 3-5-8 Saiwaichou, Fuchu, Tokyo 183-8509

\* Corresponding: Masato Aoyama (aoyamam@cc.utsunomiya-u.ac.jp)

### Abstract

To identify regions of the caprine diencephalon and the pituitary gland related to transportation stress, the expression of c-Fos protein was examined immunohistochemically, as an indicator of neural activation. Ten castrated Shiba goats, five transported and five controls, were used in the present study. Transported goats were trucked for 1 h and were deeply anesthetized one hour after the transportation offset. Control goats were housed in single pens as usual. Plasma cortisol concentrations during and after transportation were also investigated. During transportation, plasma cortisol concentrations increased ( $P < 0.05$ ) compared with those in the controls. In the diencephalon, c-Fos immunoreactive cells were detected in the area subcallosa, the lateral septal area, the bed nucleus of stria terminalis (BNST), the preoptic hypothalamic area (POA), the suprachiasmatic nucleus (SCN), the supraoptic nucleus, the paraventricular hypothalamic nucleus parvocellular part (PVNp), the paraventricular hypothalamic nucleus magnocellular part (PVNm), the arcuate nucleus (ARC), the paraventricular thalamic nucleus and the stria medullaris in both control and transported goats. The numbers of c-Fos immunoreactive cells were increased by transportation in the PVNm, the PVNp, the BNST, the POA ( $P < 0.05$ ), the ARC ( $P = 0.052$ ) and the SCN ( $P = 0.082$ ). In the anterior pituitary gland, the number of c-Fos immunoreactive cells in transported goats was four to 30 times as much as in control goats. However, there were no differences in the intermediate and posterior lobes between control and transported goats. This study has identified regions in the caprine diencephalon and pituitary gland that show transport-induced increases in c-Fos immunoreactive cells. In conclusion, the PVNm, the PVNp, the BNST, the POA, the SCN in the diencephalons and the anterior lobe of the pituitary gland can be involved in the stress responses of goats to transportation.

**Key Words :** c-Fos, diencephalon, goat, pituitary gland, stress, transportation

**キーワード :** c-Fos タンパク質、下垂体、間脳、ストレス、ヤギ、輸送

## はじめに

輸送は家畜にとって強いストレスとなり、畜産物の品質低下などの諸問題を引き起こす。動物がストレスにさらされるとその情報は脳辺縁系を介して視床下部に入力され、二つの主要なストレス反応、すなわち視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸および交感神経系の反応を引き起こす (青山ら 2004)。輸送によりこれらの生理的反応が引き起こされることは、ウシ (Warriss et al. 1995)、ウマ (Smith et al. 1996)、ヒツジ (Parrott et al. 1994)、ヤギ (Aoyama et al. 2003; 2005) で報告されている。輸送ストレスの軽減は、畜産を産業として成立させるためにも、動物福祉の観点からも必要なことである。そのためには輸送が家畜にとってどのようなストレスであるかを判定することが重要である。

脳は前脳、中脳および菱脳の3つに大きく分類され、更に前脳は終脳と間脳に分類される (加藤 1991)。前述した視床下部は間脳の一部である。

HPA 軸のストレス反応においては、視床下部における室旁核 (paraventricular nucleus: PVN) という神経核が主要な役割を果たす (Whitnall 1993)。PVN は外側の大細胞群 (PVNm) と内側の小細胞群 (PVNp) に分けられる。HPA 軸のストレス反応には副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) およびアルギニン・バソプレッシン (AVP) という神経ペプチドが深く関わるが、PVNp には CRH 産生細胞が、PVNm には AVP 産生細胞が存在する (Kikusui et al. 1997)。CRH と AVP は下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌を促進し、さらに ACTH は副腎皮質からの糖質コルチコイドの分泌を促進する (Whitnall 1993)。動物実験におけるストレス反応の指標には、血液中の糖質コルチコイドの濃度が一般的に使用されている。

視床下部における他の神経核 - 視索前野 (preoptic area: POA)、視交叉上核 (sprachiasmatic nucleus: SCN)、弓状核 (arcuate nucleus: ARC) など - は、PVN における CRH の合成・分泌に影響を与えることが報告されており、間接的に HPA 軸のストレス反応を調節している (Moore & Victor 1972; Sawchenko & Swanson 1983; Cascio et al. 1987; Dunn 1987; Herman et al. 1994; Bell et al. 2000)。

一方、PVN は HPA 軸活性のみでなく、交感神経系の活性に関与する神経細胞も含む (Pacak et al. 1995)。PVNp の神経細胞の一部は脊髄や延髄孤束核へ長い下行路を伸ばし (Pacak et al. 1995; 遠山と塩谷 1987)、交感神経系-副腎髄質系へ作用する。さらに交感神

経系は脊髄路の胸髄 (T12)-腰髄 (L2) から発する大内臓神経により副腎髄質へ投射し、ストレスによるエピネフリンやノルエピネフリンの分泌促進に主要な役割を果たす (伊藤ら 1997)。

ここ 10 数年の間、ストレスに対する中枢神経系における活性部位を知るために、c-Fos タンパク質の分布の同定が幅広く使われてきた。c-Fos タンパク質は神経細胞における転写調節因子の 1 つで c-fos 遺伝子にコードされている 62 kDa のタンパク質である (田中と中山 1997)。ヒツジにおいては輸送ストレス、隔離ストレス、低血糖ストレスにより PVN に c-Fos タンパク質が発現することが知られており (Vellucci & Parrott 1994)、低血糖ストレスは SON にも c-Fos タンパク質を発現させる (Herrera & Robertson 1996)。さらに、ラットではストレスの種類によって視床下部における c-Fos タンパク質の発現の部位が異なることが報告されている (Briski & Gillen 2001)。従って、ストレス負荷により視床下部に発現する c-Fos タンパク質の分布様式を解析することにより、そのストレスの種類を判定できると考えられる。本研究では、輸送したヤギの間脳における c-Fos タンパク質の発現の分布を解析した。

間脳に加え、本研究では輸送により下垂体に発現する c-Fos タンパク質の分布の解析も行った。前述のように、下垂体は HPA 軸のストレス反応に不可欠な器官である。下垂体は腺性下垂体と神経性下垂体の 2 つに大きく分けられる。腺性下垂体はさらに前葉、中葉に、神経性下垂体は漏斗と後葉に分けられる (Bacha & Wood 1997)。HPA 軸に関わる ACTH 産生細胞は前葉に存在している。

ラットではストレス負荷による c-Fos タンパク質の発現は、中枢のみならず下垂体においても確認されている。例えばラットにおいて、4 時間の拘束ストレスにより下垂体の前葉と中葉に c-Fos タンパク質が発現することが報告されている (Kononen et al. 1992)。一方ラットにおける電気刺激や有害な温度刺激 (Autelitano 1998)、新奇環境ストレス (Handa et al. 1993) では c-Fos タンパク質は前葉のみに発現した。よって下垂体においてもストレスの種類により HPA 軸活性に関わる細胞は異なる可能性がある。本研究の目的は、輸送によりヤギの間脳および下垂体に発現する c-Fos タンパク質の分布を解析し、ヤギの輸送ストレスに対する間脳の各神経核および下垂体の反応機序を検討するとともに、輸送が家畜にとってどのようなストレスであるかを検討することである。

なお、本研究は *Journal of Animal Science* に掲載されたものであり (Maejima et al. 2005a)、本研究の多くの実験は宇都宮大学農学部附属農場を利用して行ったものである。また、家畜の輸送ストレス対策において重要な知見が得られたので、農場報告に資料として報告する。

## 材料と方法

### 供試動物

供試動物には健康な去勢オスシバヤギ 10 頭 (1 ~ 5 歳、体重 15 ~ 40kg) を使用した。去勢は性成熟に達した後、実験日の少なくとも 3 週間前に行った。供試したヤギは宇都宮大学附属農場の畜舎で、1 区画 (約 2.0×2.0m) に 1 頭ずつ飼育した。餌として、ルーサン (栃木三和酪農協同組合) を自由摂取で与え、さらに草食動物用固形飼料 ZC (オリエンタル酵母株式会社) を 1 日 100g 与えた。また水は自由摂取とし、温度、湿度、照明は自然状態のままとした。

### 輸送および血液採取

10 頭のヤギを 5 つの組 (各組 2 頭) に分け、各組について 1 頭に輸送を負荷し、残る 1 頭は通常飼育のままとした。組分けをする際には、一つの組内のヤギの年齢や体重が大きく異なるよう配慮した。また、季節による影響を最小限に留めるため、各組における 1 頭を実験に供試した後、4 日以内に残る 1 頭を実験に供試した。輸送した 5 頭を輸送群、通常飼育のままの 5 頭を対照群とした。

輸送条件は、宇都宮大学農学部「農場報告」第 21 号 (青山ら 2004) および第 22 号 (前島ら 2005b) に記載した方法と同様とした。簡潔に記載すると、輸送時間は 9:00 から 10:00 の 1 時間とし、平均時速約 26km、最高時速 60km で 1 周 6.4km、15 分のコースを 4 周した。全ての実験において、運転は同一人物が行った。実験に先立ち、運転のペースを一定に保つことができるようドライバーを訓練した。

血液の採取のため、実験を行う 1-2 日前にヤギの頸静脈にカテーテルを留置した。採血は 9:00 (輸送開始直前)、9:15、9:30、9:45、10:00、11:00 (輸送終了 1 時間後) の計 6 回行った。対照群のヤギからも同じ時刻に採血を行った。

### 血中コルチゾル濃度の測定

採取した血液は直ちにヘパリンを込めた遠心管に入れ、遠心分離 (3000rpm、4°C、15 分) により血漿を取り出した。血漿は測定まで -30°C で保存した。

血漿中のコルチゾル濃度をラジオイムノアッセイ法 (DPC コルチゾルキット、Diagnostic Products Corp、Los Angeles、CA) で測定した。

### 組織標本作成

輸送終了 1 時間後 (11:00) に灌流固定を行った。致死量のペントバルビタール系麻酔薬 (ネンブタール: 大日本製薬株式会社) を投与し、心臓よりリンゲル液 6 L、続いてザンボニ固定液 (2% パラホルムアルデヒド、0.2% ピクリン酸) 6 ~ 8 L を灌流し、全身を固定した。その後、脳を摘出し、視床下部を含む間脳を切りだした。また、脳を取り出した後に下垂体を摘出した。それらを 1-2 日間ザンボニ固定液により後固定した後、30% スクロース溶液で 2 日間スクロース置換した。

間脳については、マイクロトームにより厚さ 40  $\mu$  m の前額断凍結切片を作成した。切片は Zuccolilli et al (1995) のシバヤギ脳アトラスに基づき、耳孔からの距離 (Inter aurial line: IA) が 34 から 23 mm の範囲で作成した。下垂体については、厚さ 40  $\mu$  m の矢状断凍結切片を作成し、その範囲は前葉、中葉、後葉が全て含まれる部分とした。

### 免疫染色

間脳については、5 枚おき (200  $\mu$  m おき) の切片に c-Fos タンパク質の免疫染色を行った。また、下垂体については一頭につき約 20 枚の切片を染色した。免疫染色は抗ヒト c-Fos ポリクロナール抗体 (SC-52: Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) を用いて、Peroxidase Anti Peroxidase (PAP) 法により行った。免疫染色の詳細な手順は、前島ら (2005b) と同様とした。

染色に使用した試薬のロットの違いや、反応時間や室温の微妙なずれに起因する染色程度の違いを考慮し、一つの組に属する 2 頭は必ず同じ試薬を用いて同時に染色を行った。

使用した抗ヒト c-Fos 抗体の特異性を確かめるために、あらかじめ合成 c-Fos ペプチド (13.4 nmol/ml) (PP10-100UG、CALBICHEM、Darmstadt、Germany) と反応させた sc-52 を使用して、同様の手順で免疫染色を施した。

### Nissl 染色

c-Fos タンパク質陽性 (c-Fos IR) 細胞の分泌部位を確認するために、免疫染色に使用した切片と隣接する切片に Nissl 染色を行った。間脳における各神

経核あるいは神経組織領域の特定には、シバヤギ脳アトラス (Zuccolilli et al. 1995) を参考にした。

### c-Fos タンパク質陽性細胞数の算出

間脳の切片において、c-Fos IR 細胞を光学顕微鏡下で全て数え、各神経核および領域ごとに集計した。また、下垂体については、光学顕微鏡下で単位面積 (0.08×0.08 mm すなわち 0.0064 mm<sup>2</sup>) あたりの c-Fos IR 細胞を数えた。これを各個体につき 5 枚の切片で行い、その平均値を当該個体のデータとした。c-Fos IR 細胞数の集計は前葉、中葉、後葉ごとに行った。前葉はさらに隆起部 (ZT)、尾側部 (C)、背側部 (HD)、腹側部 (FV)、吻側部 (HV)、内側部 (M) の 6 つの領域に分けて集計した。

### 統計解析

輸送の血漿中コルチゾル濃度への影響を検定するため、3 元配置分散分析 (組×時刻×輸送の有無) と Tukey の検定を行った。輸送による間脳各神経核および神経組織領域における c-Fos 陽性細胞数への影響を検定するため、二元配置分散分析 (組×輸送の有無) を行った。なお、下垂体における c-Fos 陽性細胞数については、サンプル数が少ないため統計解析は行わなかった。

## 結 果

### 血中コルチゾル濃度

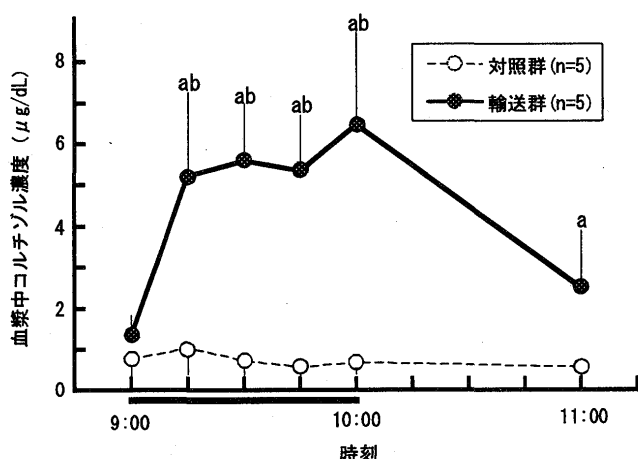


図 1

輸送がヤギの血漿中コルチゾル濃度に及ぼす影響。対照・輸送いずれの群も 5 頭のヤギの平均値±標準誤差で示した。輸送負荷は、水平線で示した 9:00 から 10:00 までの 1 時間に行った。対照群のヤギには輸送を負荷せず、通常飼育のままとした。a: 同時刻における対照群との間に有意差あり (P < 0.05)、b: 各群において輸送前 (9:00) の値との間に有意差あり (P < 0.05)。

血中コルチゾル濃度の結果を図 1 に示した。輸送により血中コルチゾル濃度は増加し、9:15-10:00 のいずれの時刻においても、輸送群の血中コルチゾル濃度は同じ時刻の対照群のそれに比較し有意に高かった (P < 0.05)。輸送群の 11:00 (輸送終了 1 時間後) における血中コルチゾル濃度は輸送中に比べ減少していたものの、まだ対照群に比較し有意に高い値を維持していた。

### 間脳における c-Fos タンパク質陽性細胞の分布

対照・輸送いずれの群においても、c-Fos IR 細胞は以下に記す神経核あるいは領域に存在した—弓状核 (arcuate nucleus: ARC)、梁下野 (area subcallosa: AS)、分界条床核 (bed nucleus of stria terminalis: BNST)、外側中隔野 (lateral septal area: LSA)、視索前野 (preoptic hypothalamic area: POA)、室旁核小細胞群 (paraventricular hypothalamic nucleus parvoceller part: PVNp)、室旁核大細胞群 (paraventricular hypothalamic nucleus magnoceller part: PVNm)、視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN)、視床の室旁核 (paraventricular thalamic nucleus: PVT)、視床髓条 (stria medullaris: SM)、視索上核 (supraoptic nucleus: SON) —。各神経核および神経組織領域の位置は図 2 の模式図に示した。

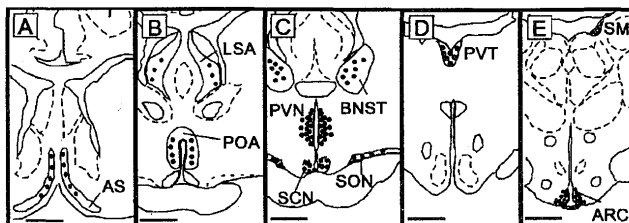


図 2

ヤギの間脳の前額断切片の模式図。図中の黒い点は c-Fos タンパク質陽性細胞が観察された部位を示し、1 個の点は輸送群のヤギにおける c-Fos タンパク質陽性細胞約 100 個に相当する。A、B、C、D、E はそれぞれ Zuccolilli ら (1995) によるシバヤギ脳アトラスの 32、30、29、26、23 mm IA line に相当する。ARC = 弓状核、AS = 梁下野、BNST = 分界条床核、LSA = 外側中隔野、POA = 視索前野、PVNm = 室旁核大細胞群、PVNp = 室旁核小細胞群、PVT = 視床の室旁核、SCN = 視交叉上核、SM = 視床髓条、SON = 視索上核。スケールバー = 3 mm。

各神経核および領域における c-Fos IR 細胞数を図 3 にまとめた。上記の神経核および領域の中で、対照群に比べ輸送群の c-Fos IR 細胞数が有意 (P < 0.05) に多かったものは BNST、POA、PVNm、PVNp であった。特にストレスに深く関わるとされる PVNp においては、輸送群の c-Fos IR 細胞数は対照

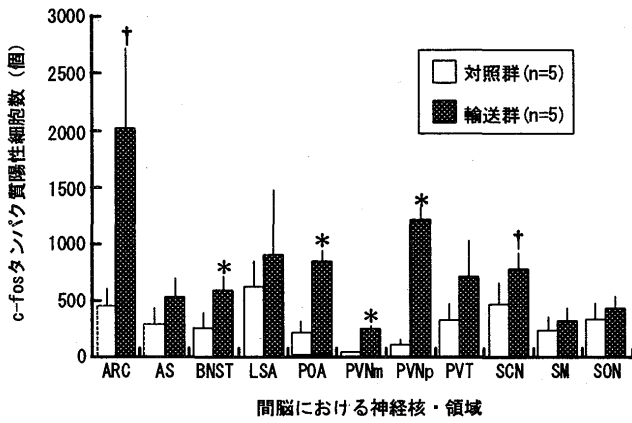


図3 輸送がヤギの間脳における c-Fos タンパク質陽性細胞数に及ぼす影響。対照・輸送いずれの群も5頭のヤギの平均値±標準誤差で示した。各神経核および神経組織領域の位置と略語の解説については、図2を参照せよ。対照群との間に有意差あり (†: P < 0.1, \*: P < 0.05)。

群のそれの約10倍の値を示した。また、統計的に有意ではなかったものの、ARC、SCNにおける輸送群の c-Fos IR 細胞数は、対照群のそれと比較して多い傾向にあった (ARC: P < 0.052, SCN: P < 0.082)。

間脳における対照群および輸送群の c-Fos IR 細胞の例として、PVNの顕微鏡写真を図4に示した。

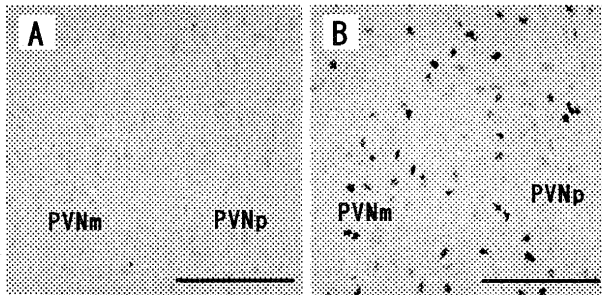


図4 室旁核大細胞群 (PVNm) および室旁核小細胞群 (PVNp) における c-Fos タンパク質陽性細胞の顕微鏡写真の例。A、Bはそれぞれ対照実験、輸送実験に供試されたヤギの間脳である。スケールバー = 100 μm。

#### 下垂体における c-Fos タンパク質陽性細胞の分布

対照群と輸送群の下垂体における c-Fos IR 細胞数の結果を図5示した。下垂体における輸送群、対照群の c-Fos IR 細胞は観察した全ての部位、すなわち前葉、中葉、後葉に存在した。両群の c-Fos IR 細胞数を比較すると、前葉全ての領域において輸送群は対照群に比較して著しく多かった。前葉の部位別にみると、輸送群の c-Fos IR 細胞数は対照群の、隆起部 (ZT) では約4倍、尾側部 (C) では約7倍、腹側部 (FV) では約15倍、背側部 (HD) では約30倍、吻側部 (HV) では約15倍、そして内側部 (M)

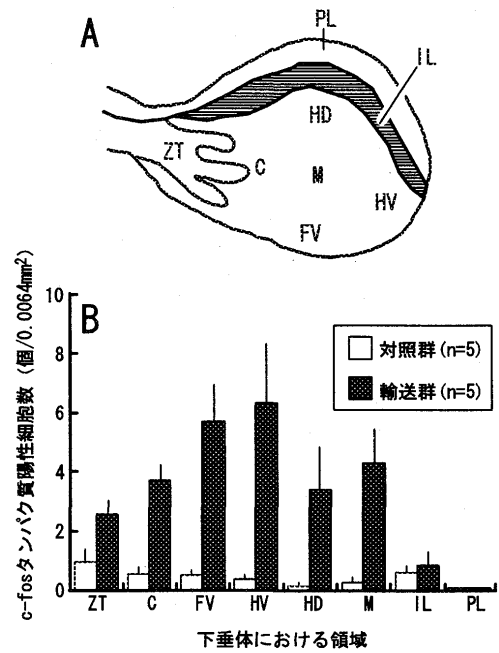


図5 A: ヤギの下垂体の矢状断切片の模式図。下垂体前葉を隆起部 (ZT)、尾側部 (C)、腹側部 (FV)、背側部 (HD)、吻側部 (HV)、内側部 (M) の6つの領域に分けた。IL、PLはそれぞれ下垂体中葉、後葉を示す。B: 輸送がヤギの下垂体における c-Fos タンパク質陽性細胞数に及ぼす影響。対照・輸送いずれの群も3頭のヤギの平均値±標準誤差で示した。なお、下垂体における c-Fos タンパク質陽性細胞数については、サンプル数が少ないため統計処理を行っていない。

では約15倍であった。中葉においては、輸送群の c-Fos IR 細胞数は  $0.9 \pm 1.7$  個/0.0064mm<sup>2</sup>、対照群のそれは  $0.6 \pm 0.5$  個/0.0064mm<sup>2</sup> であり、大きな差はなかった。後葉においては、輸送群と対照群の c-Fos IR 細胞数の平均値はともに 0.07 個/0.0064mm<sup>2</sup> であった。

下垂体前葉における対照群および輸送群の c-Fos IR 細胞の例として、隆起部の顕微鏡写真を図6に示した。

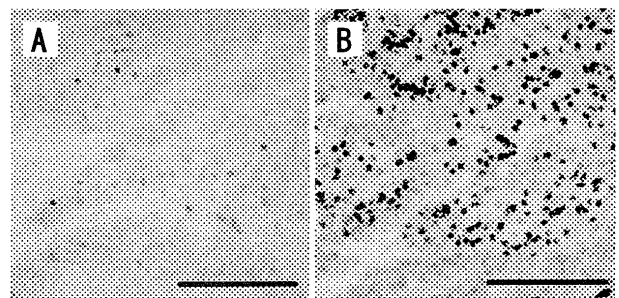


図6 下垂体前葉隆起部における c-Fos タンパク質陽性細胞の顕微鏡写真の例。A、Bはそれぞれ対照実験、輸送実験に供試されたヤギの下垂体である。スケールバー = 100 μm。

抗ヒト c-Fos タンパク質抗体の特異性

合成 c-Fos ペプチドと 24 時間反応させた一次抗体を用いて免疫染色を行ったところ、対照・輸送いずれの群においても、間脳・下垂体に c-Fos IR 細胞は観察されなかった。今回用いた抗ヒト c-Fos タンパク質抗体 (sc-52) が確かにヤギの c-Fos タンパク質と交叉していることが確認された。

## 考 察

輸送が間脳の c-Fos タンパク質陽性細胞の分布に及ぼす影響

対照・輸送いずれの群においても、間脳における c-Fos IR 細胞は 11 の神経核または神経組織領域に分布していたが、そのうち PVNm、PVNp、POA、BNST において輸送群の方が対照群に比べ有意に c-Fos IR 細胞数が多かった。また、SCN と ARC においては統計的に有意ではないものの輸送群の方が対照群よりも c-Fos IR 細胞数が多い傾向にあった (それぞれ  $P = 0.082$  と  $P = 0.052$ )。間脳におけるこれらの神経核および神経組織領域は輸送に深く関わる部位であると考えられた。

本研究において、輸送ストレスによりヤギの PVN には著しく c-Fos IR 細胞数が増加した。ストレス刺激により PVN における c-Fos 発現が増加することは、ラットの拘束ストレス (Briski & Gillen 2001)、ヒツジの輸送、隔離、インスリン投与による低血糖 (Vellucci & Parrott 1994)、ブタの寒冷ストレス、痛み、輸送ストレス (Parrott & Vellucci 1994) でも報告されている。「はじめに」で述べたように、PVN は内側の PVNp と外側の PVNm とに分けられ、PVNp には CRH 産生細胞が、PVNm には AVP 産生細胞が存在する (Kikusui et al. 1997)。CRH および AVP はストレスに対する HPA 軸の反応に深く関わる物質である。輸送群の血漿中コルチゾル濃度は輸送により対照群のそれよりも有意に増加していたので、輸送がヤギにおいても HPA 軸の反応を引き起こすことは明らかである。本研究において、輸送により PVN に発現した c-Fos IR 細胞は CRH 産生細胞と AVP 産生細胞であると考えられた。

AVP 産生細胞は PVN だけでなく SON にも多く存在しており (Kikusui et al. 1997)、SON の AVP も HPA 軸の反応に関わると考えられている (Aguirela & Rabadan-Diehl 2000)。ラットでは浸透圧ストレスにより SON に c-Fos 発現が増加することが報告されている。しかし本実験では、輸送によりヤギの SON の c-Fos IR 細胞数は増加しなかった。ヒツジにおいて

も、低血糖ストレスは SON における c-Fos IR 細胞数を増加させるが、輸送ストレスと隔離ストレスは SON におけるそれに影響しないことが報告されている (Vellucci & Parrott 1994)。さらにブタにおいても、輸送ストレスは SON の c-Fos IR 細胞数に影響しないことが報告されている (Parrott & Vellucci 1994)。このことは、あらゆる家畜において、SON の AVP 産生細胞は輸送ストレスに対する HPA 軸の反応には関わらないことを示唆する。

ストレス刺激は大脳皮質辺縁系を介して視床下部に入力されるが、ラットでは大脳辺縁系から視床下部への入力の神経回路は 2 つあり、それらは striaterminalis pathway および amygdalofugal pathway と呼ばれている (Pacak et al. 1995)。striaterminalis pathway は扁桃体から BNST または POA への入力と、さらにそれらの部位から PVNp へ投射する経路であり、PVNp における CRH 産生の制御と自律神経機能を調整する。一方、amygdalofugal pathway は扁桃体から視床と LSA への入力、さらにそれらの部位から視床下部に投射する経路である。本研究で輸送により c-Fos IR 細胞数が増加した POA、BNST は striaterminalis pathway に含まれ、輸送による影響が無かった LSA は amygdalofugal pathway に含まれる。ヤギにおける大脳辺縁系から視床下部への入力経路がラットのそれと類似しているなら、輸送ストレスは主に striaterminalis pathway を介して視床下部に入力され、amygdalofugal pathway の関与は薄いものと考えられた。

Striaterminalis pathway に含まれる BNST において、輸送により c-Fos IR 細胞は著しく増加した。BNST はヤギの輸送ストレス反応に深く関わる領域であることが示唆された。ラットにおいて、BNST には PVN に投射する神経細胞が存在する (Sawchenko & Swanson 1983)。さらに、ラットにおいて BNST の刺激によりコルチコステロン (ラットにとって主要な糖質コルチコイド) の分泌が増加すること (Dunn 1987)、BNST の破壊により PVN の CRH mRNA の発現が減少すること (Herman et al. 1994) が報告されている。ヤギにおいても BNST は PVN における HPA 軸の反応に関わる部位と考えられ、輸送ストレスに対する HPA 軸の反応に深く関わっていると考えられた。

本研究において、BNST と同様 striaterminalis pathway に含まれる POA においても、輸送により c-Fos IR 細胞は著しく増加した。ラットにおいて、拘束ストレスおよび見慣れないケージに導入される新

奇環境ストレスが POA における c-Fos タンパク質の発現を増加させることが報告されている (Briski & Gillen 2001)。さらにラットでは POA から PVN への神経投射が存在する (Sawchenko & Swanson 1983)。POA も PVN に作用することによってヤギの輸送ストレス反応に関わっていると考えられた。

ヤギの輸送により SCN における c-Fos 陽性細胞数は増加する傾向にあった ( $P=0.082$ )。SCN は概日リズムのペースメーカーと考えられている神経核である (遠山と塩谷 1978) が、拘束ストレスはラットのこの神経核における c-Fos 発現を増加させ (Briski & Gillen 2001)、ストレス反応に関わる神経核でもある。SCN の損傷により ACTH と糖質コルチコイドの日内リズムは消失することが報告されている (Moore & Victor 1972; Cascio et al. 1987)。また、SCN と PVN との間に直接的な神経の連絡は確認されていないが、SCN は PVN に隣接する神経核を介して CRH の産生に関わっていると考えられている (Buijs et al. 1993)。SCN はヤギの輸送に対する HPA 軸の反応に関わっていると考えられた。

ARC も、ヤギの輸送により c-Fos 陽性細胞数が増加する傾向にあった ( $P=0.052$ )。Briski & Gillen (2001) の報告によると、ラットにおいて電気刺激および温度刺激は ARC における c-Fos 発現を増加させるが、新奇環境ストレスは影響しない。この神経核は ACTH、メラニン細胞刺激ホルモン ( $\alpha$ -MSH) などの前駆物質である POMC 遺伝子が発現する部位であり (田中と中山 1997)、POMC 由来の  $\beta$ -エンドルフィン、ニューロペプチド Y (NPY)、ニューロテンシン (NT)、ガラニン、ドーパミンなど数多くの神経伝達物質を含む (Pan et al. 1996)。またラットでは ARC における POMC を合成する神経細胞の約 8% が、NPY を合成する神経細胞の約 20% が PVN に投射している (Baker & Herkenham 1995)。さらに  $\alpha$ -MSH、NPY は PVN の CRH 産生細胞を刺激して HPA 軸活性を調節する (Bell et al. 2000)。ARC もヤギの輸送ストレス反応、特に HPA 軸の反応に深く関わると考えられた。

興味深いことに、対照・輸送いずれの群においても視床下部腹内側核 (ventromedial Hypothalamic nucleus: VMH) に c-Fos 陽性細胞は確認されなかった。ラットでは、ネコに暴露されることにより VMH に c-Fos 発現が増加するが (Canteras et al. 1997)、新奇環境への導入では影響がない (Briski & Gillen 2001)。VMH は環境性の恐怖に対して反応し、乳頭体や視床前核と共に内側視床防衛システム (Medial

Hypothalamic Defensive System) を構成している (Canteras 2002)。ネコに暴露されることはラットにとってまさに生命の危機に関わる状況と考えられる。本実験で輸送群のヤギの VMH に c-Fos タンパク質が発現していなかったことから、輸送ストレスはヤギに強い恐怖感を起こすストレスではないのかも知れない。

輸送が下垂体の c-Fos タンパク質陽性細胞の分布に及ぼす影響

本研究において、輸送はヤギの下垂体前葉のいずれの領域においても有意に c-Fos IR 細胞数を増加させた。ストレス刺激により下垂体前葉に c-Fos タンパク質が発現することは、ラットにおける電気刺激や有害な温度ストレス負荷でも確認されている (Kononen et al. 1992)。下垂体前葉からは 6 種類のホルモン - 成長ホルモン (GH)、プロラクチン (PRL)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、黄体形成ホルモン (LH) そして ACTH - が分泌される。

輸送により c-Fos タンパク質が発現した下垂体前葉の細胞については 4 種の細胞が考えられる。第 1 に ACTH を分泌する corticotrophs である。ACTH は HPA 軸に関わるホルモンであり、輸送により HPA 軸が活動することは血中コルチゾール濃度の結果より明らかである。また、前述したように ACTH は POMC ペプチドより細胞内で合成されるが、c-Fos タンパク質はこの POMC 遺伝子発現をコントロールする (Kononen et al. 1992) という報告がある。第 2 の可能性としては成長ホルモンを分泌する somatotrophs が考えられた。糖質コルチコイドには、下垂体前葉に作用して CRH に対する ACTH の分泌を抑制する働き (ネガティブフィードバック) があり、ラットにおいては corticotrophs と somatotrophs がネガティブフィードバックに関わる糖質コルチコイドの標的細胞である (Yokote et al. 1991)。さらに糖質コルチコイドのネガティブフィードバックは c-Fos タンパク質に調節されるという報告がある (Autelitano 1998)。このことから下垂体前葉において輸送により発現した c-Fos IR 細胞にはネガティブフィードバックに関わる somatotrophs が含まれている可能性がある。第 3 の可能性として PRL を分泌する mammotrophs が考えられた。PRL は多くの動物種において多様な作用を持つが、ストレス反応に関わるホルモンとしても知られており、ヒツジの輸送により血中の PRL 濃度が増加することが知られている

(Parrott et al. 1994)。ヤギにおいても輸送により PRL が分泌されると考えられ、ヤギ下垂体の c-Fos IR 細胞には *mammotrophs* が含まれていると考えられた。第 4 の可能性は *somatomammotrophs* である。ラットでは GH と PRL の両方を含有する下垂体前葉細胞が存在する (Shiino 1993)。この細胞については *mammotrophs* の変化したものであるという見解がある (Nishimura et al. 2001)。上記のように c-Fos タンパク質の発現していた細胞に *somatotrophs* と *mammotrophs* が含まれる可能性があるならばその両方を含有する *somatomammotrophs* も含まれていた可能性もある。

以上のことから、輸送群の下垂体前葉における c-Fos IR 細胞は、*corticotrophs* を含む POMC ペプチド産生細胞、GH 産生細胞である *somatotrophs*、PRL 産生細胞である *mammotrophs*、GH と PRL 両方を含有する *somatomammotrophs* などストレス反応に関与する可能性のある数種の細胞であると思われる。

本研究の結果において下垂体中葉の c-Fos IR 細胞数については、対照・輸送の両群に有意な差がなかったことから、輸送ストレスによる中葉の細胞の活性化は起こっていないと考えられた。発生学的にみると下垂体中葉は前葉と同じ胎生期の口窩の上壁が陥入してできたラトケ嚢を原基とする。よって神経外胚葉に由来する後葉とは発生学的には異なる (山本ら 2002)。ラットにおいては、下垂体における POMC ペプチドの遺伝子は前葉の ACTH 産生細胞と中葉の MSH 産生細胞に存在し (田中と中山 1997)、ACTH は下垂体の前葉からも中葉からも分泌される。ラットに 4 時間の拘束ストレスを負荷すると、下垂体前葉にはまばらに、中葉にはほぼ全ての細胞に c-Fos タンパク質が発現するが (Kononen et al. 1992)、電気刺激や有害な温度刺激では下垂体前葉にのみ c-Fos タンパク質が発現する (Autelitano 1998)。本研究における輸送群のヤギの下垂体における c-Fos IR 細胞の分布は、Autelitano (1998) の報告結果と類似していた。ラットにおける下垂体中葉からの ACTH 分泌調節がどのようになされているか現時点では不明であるが、ストレスの種類によりその活性は異なるのは確かなようである。ヤギにおいても、輸送以外に、下垂体中葉に c-Fos タンパク質を発現させるストレスが存在する可能性はある。

下垂体後葉については、対照・輸送群いずれの群でも c-Fos IR 細胞はわずかしか存在しなかった。他種のストレス、他の動物種で下垂体後葉に c-Fos IR 細胞が増加したという報告もない。しかし下垂体後

葉におけるこれらの結果から単純に下垂体後葉がストレス反応には関連していないと解釈することはできないだろう。下垂体後葉は主に無髄の軸索と後葉細胞および有窓性の血管で構成されており、軸索の細胞体は視床下部の PVNm、SON、SCN にある (Kikusui et al. 1997)。輸送により間脳 PVNm や SCN における c-Fos IR 細胞数が有意に増加したことから、輸送により AVP をはじめとする下垂体後葉ホルモンが分泌されていた可能性は大きいと思われる。

輸送とはヤギにとってどのようなストレスか？

以上、ヤギにおいて輸送により間脳と下垂体に発現する c-Fos IR 細胞の分布を明らかにした。輸送がヤギにとってどのようなストレスであるかを特定するためには、ヤギの間脳・下垂体における c-Fos タンパク質の発現に対する、輸送以外のストレスの影響を明らかにし、輸送ストレスによるそれと比較することが必要である。しかし、主にラットで報告された過去の知見と比較すると、例えば輸送によって VMH における c-Fos IR 細胞数に影響がなかったことなどから、輸送はヤギにとって強い心理的ストレスを誘発するものではなく、むしろ物理的ストレスの要素が強いストレスであると考えられた。

以前我々は、輸送がヤギの副腎における c-Fos IR 細胞の分布に及ぼす影響を報告し、輸送は副腎髄質においてノルエピネフリン細胞よりもエピネフリン細胞の方により健著に c-Fos タンパク質を発現させることを明らかにした (前島ら 2005b; Maejima et al. 2006)。ヒツジではノルエピネフリンは主に心理的ストレスに、エピネフリンは主に物理的ストレスに反応するとされている (Parrott et al. 1994)。このことから、輸送はヤギにとって強い心理的ストレスを誘発するものではなく、むしろ物理的ストレスの要素が強いストレスであると考えられた。

## 要 約

輸送は家畜にとって強いストレスとなる。本研究では、c-Fos タンパク質の発現を細胞の活動の指標として、ヤギの間脳および下垂体において輸送に関わる神経核および神経組織領域を明らかにした。シバヤギ去勢オス 10 頭を用い、5 頭を輸送実験に供試し (輸送群)、残る 5 頭を通常飼育のままとした (対照群)。輸送群には 1 時間の輸送を負荷した。さらに、輸送が血漿中コルチゾル濃度に及ぼす影響も検討した。ヤギの血漿中コルチゾル濃度は輸送により顕著に増加し、輸送群の血漿中コルチゾル濃度は同



時刻の対照群のそれに比較して有意に高かった ( $P < 0.05$ )。c-Fos タンパク質の免疫組織化学の結果、間脳においては、対照・輸送いずれの群においても以下に挙げる 11 の神経核および領域に c-Fos タンパク質陽性 (c-Fos IR) 細胞が発現していた。一弓状核 (ARC)、梁下野、分界条床核 (BNST)、外側中隔野、視索前野 (POA)、室旁核小細胞群 (PVNp)、室旁核大細胞群 (PVNm)、視交叉上核 (SCN)、視床の室旁核、視床髓条、視索上核。しかしながら、PVNm、PVNp、BNST、POA において、輸送群の c-Fos IR 細胞数は対照群のそれと比較して有意 ( $P < 0.05$ ) に多く、また統計的に有意ではないものの ARC ( $P = 0.052$ ) と SCN ( $P = 0.082$ ) において類似の傾向がみられた。下垂体前葉においては、輸送群の c-Fos IR 細胞数は対照群のその 4 倍から 30 倍多かった。一方、下垂体中葉および後葉においては、対照・輸送群の間に c-Fos IR 細胞数に相違はなかった。本研究の結果より、間脳における PVNm、PVNp、BNST、POA、ARC、SCN および下垂体前葉は、ヤギにおいて輸送に対するストレス反応に深く関わる部位であると考えられた。

**謝辞** 生物資源研究所の岡村裕昭博士には、用いた抗体の特異性を検査するための合成 c-Fos ペプチドを譲って頂きました。深謝致します。また、現秋田県畜産試験場の職員、渡邊潤博士には実験の手伝いをして頂きました。ありがとうございました。

宇都宮大学附属農場畜産部門主任の長尾慶和助教授、畜産班の技官の皆様、家畜繁殖生理学研究室の皆様には動物の維持管理の面で大変お世話になりました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

この研究は、宇都宮大学若手教員研究助成の補助を受けて行いました。

#### 参考文献

Aoyama M, Maejima Y, Keyaki S, Muroi M, Tohei A, Sugita S. 2005. Effects of androgen on plasma levels of adrenocorticotropic hormone and cortisol during transportation in goats. *The Journal of Veterinary and Medical Science* 67:1109-1114.

Aoyama M, Negishi A, Abe A, Maejima Y, Sugita S. 2003. Sex difference in stress responses to transportation in goats: Effects of gonadal hormones. *Animal Science Journal* 74:511-519.

青山真人・根岸昭人・阿部朗子・前島裕子・杉田昭

栄. 2004. シバヤギにおける輸送ストレス反応の性差：性腺ホルモンの関与. 宇都宮大学農学部農場報告 21:16-21.

Aguilera G, Rabadan-Diel C. 2000. Vasopressinergic regulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis: implication for stress adaptation. *Regulatory Peptides* 96:23-29.

Autelitano DJ. 1998. stress-induced stimulation of pituitary POMC gene expression is associated with activation of transcription factor AP-1 in hypothalamus and pituitary. *Brain Research Bulletin* 45:75-82.

Bacha WJ, Wood LM. 1997. 「カラーアトラス獣医組織学」(監訳：月瀬東・林良博). 株式会社チクサン出版社. 東京.

Baker RA, Herkenham M. 1995. Arcuate nucleus neurons that project to the hypothalamic paraventricular nucleus: neuropeptidergic identity and consequences of adrenalectomy on mRNA levels in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 358:518-530.

Bell ME, Bhatnagar S, Akana SF, Choi S, Dallman MF. 2000. Distribution of arcuate/paraventricular nucleus connections changes body energy balance and response to acute stress. *The Journal of Neuroscience* 20:6707-6713.

Briski K, Gillen E. 2001. Differential distribution of fos expression within the male rat preoptic area and hypothalamus in response to physical stress vs psychological stress. *Brain Research Bulletin* 55:401-408.

Buijs RM, Markman M, Nunes-cardoso B, Hou YX, Shinn S. 1993. Projections of the suprachiasmatic nucleus to stress-related areas in the rat hypothalamus: A light and electron microscopic study. *The Journal of Comparative Neurology* 335:42-54.

Canteras NS. 2002. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 71:481-491.

Canteras NS, Chiavegatto S, Valle EL, Swanson WL. 1997. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. *Brain Research Bulletin* 44:297-305.

Cascio CS, Shinsako J, Dallman MF. 1987. The

- suprachiasmatic nuclei stimulate evening ACTH secretion in the rat. *Brain Research* 423:173-178.
- Dunn JD. 1987. Plasma corticosterones to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Research* 407:327-331.
- Handa RJ, Waller MN, Melanin RB. 1993. Induction of c-fos mRNA in the brain and anterior pituitary gland by a novel environment. *Neuroreport* 4:1079-1082.
- Herman JP, Cullinan WE, Watson SJ. 1994. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *Journal of Neuroendocrinology* 4:433-442.
- Herrera DG, Robertson HA. 1996. Activation of c-fos in the brain. *Progress in Neurobiology* 50:83-107.
- 伊藤眞次・熊谷眞次・出村博. 1997. 「情動とストレス」 中山書店. 東京.
- 加藤嘉太郎. 1991. 「家畜解剖図説 下巻」 養賢堂. 東京.
- Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y. 1997. Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor, [Arginine<sup>8</sup>]-Vasopressin and oxytocin neurons in the goat hypothalamus. *The Journal of Veterinary Medical Science* 59:621-628.
- Kononen J, Honkaniemi J, Alho H, Koistinaho J, Iadarola M, Pelt-Huikko M. 1992. Fos-like immunoreactivity in the rat hypothalamic-pituitary axis after immobilization stress. *Endocrinology* 130:3041-3047.
- Maejima Y, Aoyama M, Abe A, Sugita S. 2005a. Induced expression of c-fos in the diencephalon and pituitary gland of goats following transportation. *Journal of Animal Science* 83:1845-1853.
- 前島裕子・青山真人・杉田昭栄. 2005b. 輸送後のヤギ副腎における c-Fos タンパク質発現細胞の分布. 宇都宮大学農学部農場報告. 22:9-18.
- Maejima Y, Aoyama M, Sugita S. 2006. Expression of c-fos-like immunoreactive cells in the adrenal gland following transportation stress in goats. *Small Ruminant Research* 63:162-169.
- Moore RY, Victor BE. 1972. Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research* 42:201-206.
- Nishimura S, Ikeda K, Okano K, Gotoh T, Tabata S, Iwamoto H. 2001. Proportional changes of somatotrophs, mammatrophs and somatomammatrophs induced by cessation of lactation in female goat adenohypophysis. *Animal Science Journal* 72:32-38.
- Pacak K, Palkovits M, Kopin IJ, Goldstein DS. 1995. Stress-induced norepinephrine release in hypothalamic paraventricular nucleus and pituitary-adrenocortical and sympathoadrenal activity: in vivo microdialysis studies. *Frontiers in Neuroendocrinology* 16:89-150.
- Pan B, Castro-lobos M, Coimbra A. 1996. Activation of anterior lobe corticotrophs by electroacupuncture or noxious stimulation in the anesthetized rat, as shown by colocalization of fos protein with ACTH and  $\beta$ -endorphin and increased hormone release. *Brain Research Bulletin* 40:175-182.
- Parrott RF, Misson BH, Delariva CF. 1994. Differential stressor effects on the concentrations of cortisol, prolactin and catecholamines in the blood of sheep. *Research in Veterinary Science* 56:234-239.
- Parrott RF, Vellucci SV. 1994. Stress-induced changes in c-fos immunoreactivity in the porcine brain. *British Veterinary Journal* 150:355-363.
- Sawchenko PE, Swanson LW. 1983. The organization of forebrain afferents to paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 218:121-144.
- Shiino M. 1993. Morphology and electron microscopic structures of pituitary gland. *Nippon Rinsho* 51:2517-2523.
- Smith BL, Jones JH, Hornof WJ, Miles JE, Longworth KE, Willits NH. 1996. Effects of road transport on indicators of stress in horses. *Equine Veterinary Journal* 28:446-454.
- 田中滋康・中山和久. 1997. 「ストレスとホルモン」. 学会出版センター. 東京.
- 遠山正彌・塩谷弥兵衛. 1987. 「化学的神経機能解剖学」. 厚生社. 大阪.
- Vellucci SV, Parrott RF. 1994. Expression of c-fos in ovine brain following different types of stress, or central administration of corticotropin-releasing hormone. *Experimental Physiology* 79:241-248.
- Warriss PD, Brown SN, Knowles TG, Kestin SC, Edwards JE, Dolan SK, Phillips AJ. 1995. Effects on cattle of transport by road for up to 15 hours. *Veterinary Record* 136:319-323.
- Whitnall MH. 1993. Regulation of the hypothalamic

corticotrophin-releasing hormone neurosecretory system. *Progress in Neurobiology* 40:573-629.

山本一彦, 松村譲児, 多久和陽. 2002. 「カラー図解 人体の正常構造と機能VII 血液・免疫・内分泌」 日本医事新報社. 東京.

Zuccolilli GO, Hayashi S, Mori Y. 1995. Hypothalamic structures of the goat stereotaxic coordinates. *The Journal of Veterinary Medical Science* 57:459-467.