

アフリカツメガエルの視床下部・脳下垂体系に対する過重力の影響

都老人研 新海正, 松田道子, 広島大・院理・両生類研 柏木昭彦, 柏木啓子, 古野伸明, 芝工大・工 浦野四郎, 都臨床研 久保英夫, 鹿児島大・理 板井雅夫, 札幌医大・保健医療 藤井博匡, 宇宙研 山下雅道

Effects of Hypergravity on the Hypothalamus-Pituitary Axis in the Frog, *Xenopus laevis*.

Tadashi Shinkai^a, Michiko Matsuda^a, Akihiko Kashiwaga^b, Keiko Kashiwaga^b, Nobuaki Furuno^b, Shiro Urano^c, Hideo Kubo^d, Masao Itai^e, Hirotada Fujii^f, Masamichi Yamashita^g

^aRedox Regulation Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015, ^bInstitute for Amphibian Biology, Graduate School of Science, Hiroshima University, ^cLaboratory of Biological Chemistry, Shibaura Institute of Technology, ^dDepartment of Neurobiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, ^eFaculty of Science, Kagoshima University, ^fSchool of Health Science, Sapporo Medical University, ^gJapan Aerospace Exploration Agency
E-mail:shinkait@tmig.or.jp

Abstract To investigate the effects of hypergravity on the hypothalamus of amphibians, we raised frogs, *Xenopus laevis* under hypergravity environment (2 and 5G) environments from hatch to the beginning of metamorphosis (St 57) and completion of metamorphosis (St 66). The frogs developed at 2G and 5G, but they were smaller than those raised at 1G. In the hypergravity-treated hypothalamus, the total volume were reduced. The length of median eminence of treated frogs were also reduced. These morphological dwarves of the hypothalamus and median eminence indicate that hypergravity alters their endocrinological functions. These results suggest that gravity different from the terrestrial environment causes dysfunction and hypofunction in the endocrine systems, and that the organisms may change their inherent life cycles under such conditions.

Key words: Hypergravity, Hypothalamus, Median eminence, Metamorphosis, *Xenopus laevis*

宇宙進出は人類が長年にわたって抱き続けてきた夢であり、今日では実現可能となりつつある。しかし、宇宙での環境はわれわれヒトが生活基盤を持つ地球と多くの面で異なっていると考えられ、その変化に人類が耐えることができるか否か不明な点が多い。したがって、それを理解することが宇宙開発に不可欠の責務ということができよう。われわれは「両生類の生活環（初期発生・変態・減数分裂）に対する重力影響の形態学および分子生物学」を研究課題として研究班ワーキンググループを立ち上げ、継続している。その研究の一環として、通常の1Gとは異なった過重力環境下で、アフリカツメガエルが受精・発生・変態・成熟さらに老化へと一連の生命活動を継続する時、動物の恒常性の維持に重要な役割を果たす視床下部・脳下垂体・標的器官を軸とした内分泌系への影響について解析を進めている。そして、その動物実験の結果から、ヒトが宇宙環境で遭遇するかもしれない多種多様な重力下で、正常な世代交代を重ねる可能性について、推考する事を研究目標としている。

地上の1Gとは異なった重力環境で実験動物を用いて生体内の変化を検討した研究は、最近報告されるようになってきた。両生類を用い微少重力、過重力環境下での研究から、初期胚やオタマジャクシで

の発生・成長阻害や形態異常¹⁻³、頭部、胸部の小型化^{1,4}、遊泳時での行動異常⁵あるいは初期発生期でのアポトーシスの増加⁶などが報告されている。われわれのワーキンググループの研究でも、過重力環境（2G, 5G）での長期飼育によりオタマジャクシの形態異常や組織・臓器の発達変異⁷⁻⁹、小頭や双頭などの重複奇形^{9,10}、変態完了までの時間の遅延などの知見^{9,10}、さらに、カエルの矮小化、ならびに脳下垂体・甲状腺、生殖腺、副腎の形態異常¹¹⁻¹²を発見し、形態学的見地より変態期における過重力の影響を明らかにした。

一方、過重力環境下でのラット脳下垂体と生殖腺の変化についての研究より、2G以下の低レベル過重力を短期間曝露しても、脳下垂体・卵巣系の内分泌機能に変化がおこらないという報告¹³や、短時間の過重力曝露（3.14G）も脳下垂体のホルモン調節機能に大きな変化を与えないという報告¹⁴がある。また、過重力環境下（2G）での初代培養系を用いた研究でも、Bioactiveな成長ホルモンの放出量は1Gと比べて減少するが、Immnoactiveな成長ホルモン量は差が認められない¹⁵としている。これらの報告は異なった重力環境下でも生体の内分泌系に対してはあまり大きな影響を与えないことを意味し、地球上と違った重力環境にある宇宙でも、

ヒトの生体内の恒常性は維持される可能性を示唆している。

本研究は過重力環境で変態期のアフリカツメガエルの脳下垂体と甲状腺に形態学的な変化が認められたという、われわれの以前の結果をもとに、内分泌系の上位制御領域である視床下部に着目し、過重力の影響について解析する。さらに、地上とは異なる宇宙での重力環境において、生物が進化の過程で獲得した固有の生活環の維持が可能か否かについて考察する。

研究動物としてアフリカツメガエルを用い、遠心力を応用した遠心式の過重力負荷装置の中で飼育した。ツメガエルの生活環を考慮に入れ、ふ化直後から過重力環境下で飼育し、変態開始期 (St57) および変態完了期 (St66) に達するまで継続して維持・管理した。なお、地上での 1G を対照群として、低過重力として 2G を、高過重力として 5G をそれぞれカエルに曝露した。各 St に達したカエルをブアン液中で常温固定し、パラフィン包埋したのち厚さ 8 μm の連続切片を作成した。その後、その切片より得られた顕微鏡写真を用い、画像解析した。

アフリカツメガエルに対し、2G ならびに 5G の過重力を曝露すると、重力ストレスにより視床下部の形状に変化が認められた。視床下部の正中断面を計測すると、縦軸では対照群 (1G) の場合、変態開始期から終了期までの間、長さはほとんど変わらなかった。過重力曝露も対照と同様に 2G、5G とともに長さの変化は認められなかったが、対照群に比べ St57、St66 とともに小型化 (おおよそ 10% の減少) が認められた (図 1)。一方、横軸では St57 から St66 へと移行するにしたがって対照、2G、5G 群ともに長さの増加がみられた。また過重力曝露群は縦軸と同様小型となり、2G ではおおよそ 12%、5G ではおおよそ 10% 減少した (図 2)。これらの結果は、視床下部の形状が過重力の影響により相似的に小型化することを示している。

われわれはこれまで過重力曝露によりカエルの外部形態の相似的小型化や、脳下垂体や甲状腺の小型化した形態異常について報告した⁷⁻¹²⁾。今回の視床下部の結果も同様に、過重力の影響により形状は変わらないまま小さい視床下部を形成した。このことは、過重力が視床下部の形態形成に重要な影響を与えていると考えられる。しかし、それが視床下部の機能にも影響を与えているか否かは不明である。

視床下部は間脳の一部を形成し、脳下垂体・標的器官系を統率する内分泌系の上位制御器官である。われわれの研究課題の 1 つとしてカエルの変態に着目している。この変態は甲状腺ホルモンによりコ

ントロールされているが、このホルモンの調節は視床下部より分泌される甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) によりおこなわれている。TRH は視床下部のいくつかの領域の細胞より分泌されるが、視索前核もその領域の 1 つである。そこで、アフリカツメガエル視床下部の視索前核に対する過重力の影響について形態学的に調べたところ、2G、5G 曝露とともに細胞の形状、細胞密度ともに 1G と比べ大きな変化は認められなかった。このことは過重力が視索前核の TRH 分泌機能に影響を与えない可能性を示唆するものであり、Burden H. W. や Megory E. の研究結果¹³⁻¹⁴⁾を支持する。今後、TRH の分泌能力試験や体内の TRH 定量あるいは細胞内の微細構造の解析をおこない、機能面からの検討が必要であると考えられる。

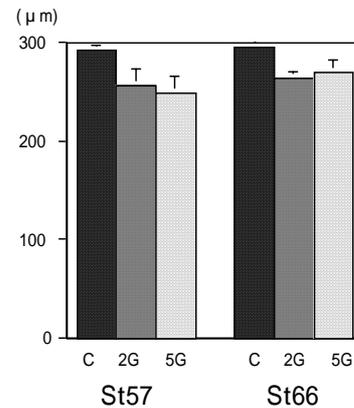


図 1 過重力曝露によるアフリカツメガエルの視床下部正中面の横軸長の変化

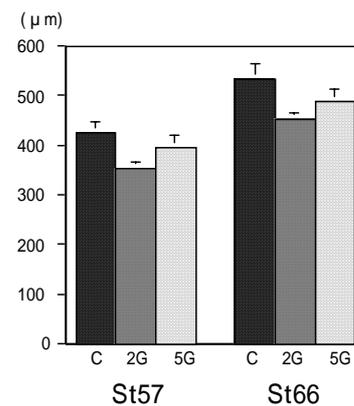


図 2 過重力曝露によるアフリカツメガエルの視床下部正中面の縦軸長の変化

正中隆起には血管叢が存在し、ここから脳下垂体門脈へと続くのであるが、この血管叢へ神経細胞からの TRH が放出され、甲状腺ホルモンの分泌を制

御することが知られている。そこで、過重力の影響が正中隆起にもあらわれるのかを調べるために、顕微鏡よりデジタル画像を取り込み、画像解析ソフトを用いて検討した。

過重力曝露により St57, St66 とともに視床下部は小型の形状を呈した。変態終了期の St66 になると視床下部の血管叢と脳下垂体門脈の発達にも違いが認められ、対照群に比べコンパクトな形となった。しかし、機能異常を示すような極端な器官萎縮は観察できなかった(図3)。

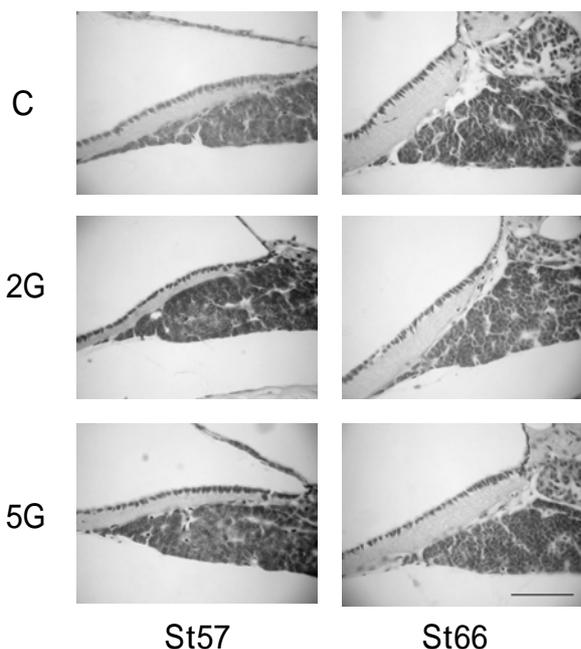


図3 変態期のアフリカツメガエル正中隆起に対する過重力曝露の影響 スケールバーは5μm

さらに、過重力の影響を確かめるために、正中隆起の正中面における横軸長(前正中隆起から後正中隆起までの長さ)を計測した。対照群では St57 から St66 へと変態が進行しても、正中隆起の横軸長はほとんど変わらなかった。一方、過重力群では横軸長は発生の進行に伴って減少した。また、曝露群は St57 では対照群のおよそ 90%, St66 ではおよそ 80%の割合であった(図4)。しかし、図3から明らかなように、正中隆起は変態の進展とともに分化が効率よく進み、過重力群でも十分に甲状腺機能の制御役を果たしていると思われる形態像を示している。ただ、重力曝露の影響により、正中隆起の場合も器官が小型化するということがいえそうである。

地上と異なった重力環境に対する生物の生活環境への影響の研究として、われわれ研究班ワーキング

グループは過重力環境下(2G および 5G)でアフリカツメガエルをふ化より長期間飼育し、カエルの発生遅延や小型化、形態異常を引き起こすことを報告した⁷⁻¹²⁾。一方、実際の宇宙実験より、重力変化は動物の発生初期では異常化をおこす要因となるが、その後の発生過程の進行とともに、生体の補償作用により、正常な形態形成がおこなわれるという報告もなされている¹⁾。今回、われわれは過重力とアフリカツメガエルの変態制御に関与する内分泌系の上位機構、特に、視床下部と正中隆起に着目し、過重力を継続して負荷したところ、過重力環境で形成された視床下部や正中隆起では形状は類似するが、大きさは小型化する事を明らかにした。このことは、通常とは異なった重力環境が内分泌系上位制御器官のホルモンの合成・分泌機構に変化をもたらし、動物の恒常性の維持に影響を与える可能性を示しているのかもしれない。したがって、重力環境の異なる場所で生物が継代して生活を継続する際には、地上環境とは異なった発生・成長の過程・形態をとる可能性も考慮に入れるべきである。

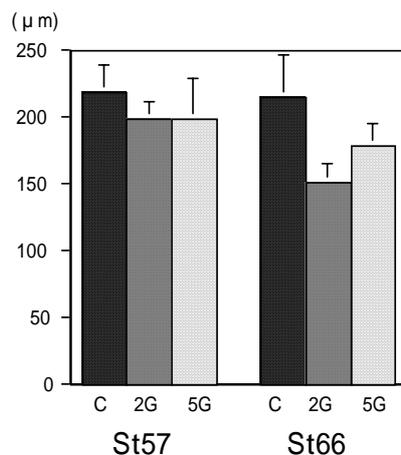


図4 過重力曝露によるアフリカツメガエルの正中隆起正中面の横軸長の変化

重力の影響を内分泌学的見地より解析する試みは、哺乳類を用いた短期の過重力負荷実験によりおこなわれているが、いずれも顕著な異常の報告はなく、過重力環境での内分泌学上の危険性については言及していない¹³⁻¹⁵⁾。われわれの報告は、生活環、特にカエルの変態に着目し、ふ化から変態完了まで長い期間の過重力曝露により得られた視床下部・脳下垂体系での変化の結果であり、長期の重力ストレスが内分泌系による生体の恒常性の維持およびその影響は無視できないこともあると考える。

今日、ヒトが地上の 1G とは異質の重力環境に到

達し、開拓者からその子孫へと世代交代を繰り返しながら、そこに定住する見込みが立ちつつある。今後、種としてのヒトが、本来兼ね備えている重力に対する適応性を駆使し、移住した新しい重力環境でも、恒常性の維持機構が正常に作用できるか否かについての議論は必要であると考えられる。

おわりに

ヒトが地球から離れ、新しい世界での正常な生活可能か否かを探る為に、アフリカツメガエルを実験動物として、地上重力と異なる重力環境を人工的に作成し、動物の生活環、特に変態機構にどのような影響を与えるかについて、内分泌学的見地から形態学的手法を用いて解析した。過重力環境（2G と 5G）にアフリカツメガエルを曝露すると、内分泌系の上位制御器官である視床下部、正中隆起葉はどちらの環境でも発達したが、形状は変わらないものの、小型となり、そこに至るまでの日数も延長した。この結果は視床下部 - 脳下垂体系にホルモン合成・分泌の機能変化がおこっている可能性を示している。さらに、これらの結論は地上と異なる重力環境はアフリカツメガエルの視床下部 - 脳下垂体系の内分泌機能に影響を与え、生体の恒常性維持の変化、さらには、別の生活環への移行を引き起こす可能性を示唆する。

参考文献

- 1) Souza, K. A., Black, S. D. and Wassersug, R. J., Amphibian development in the virtual absence of Gravity. Proc. Natl Acad Sci. USA, **92**, 1975-1978, (1995)
- 2) Wassersug R. J., Vertebrate biology in microbiology. American Scientist, **89**, 46-53, (2001)
- 3) Black S. D., Twinning of amphibian embryos by centrifugation. NASA. Washington NASA Space Biol. Program, **p74**, (1984)
- 4) Snetkova, E., Chelneya N., Serova, L., Saveliev, S., Cherdanzova, E., Pronych S. and Wassersug, R. J., Effects of space flight on *Xenopus laevis* larval development. J. Exp. Zool., **273**, 21-32, (1995)
- 5) Neubert J., Schatz, A., Bromeis, B. and Linke-Hommel, A., Effects of gravity on early development. Adv. Space Res., **22**, 265-371, (1998)
- 6) Kawakami S., Kashiwagi K., Furuno N., Yamashita M., Kashiwagi A., Effects of hypergravity environments on amphibian development, gene expression and apoptosis. Comp. Biochem. Physiol., Part A **145b**, 65-72, (2006)

- 7) 柏木昭彦, 柏木啓子, 久保英夫, 新海正, 藤井博匡, 無尾両生類の変態におけるアポトーシスや体の形態・機能の変化と重力 - . Space Utiliz. Res., **17**, 84-87, (2001)
- 8) 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 久保英夫, 新海正, 藤井博匡, 山下雅道, 無尾両生類の変態におけるアポトーシスや体の形態・機能の変化と重力 - . Space Utiliz. Res., **18**, 109-112, (2002)
- 9) Kashiwagi A., Hanada H., Kawakami S., Kubo H., Shinkai T., Fujii H., Kashiwagi K., Effects of high gravity on amphibian development. Biol. Sci. Space. **17**, 215-6, (2003)
- 10) 柏木昭彦, 柏木啓子, 花田秀樹, 久保英夫, 新海正, 藤井博匡, 山下雅道, 無尾両生類の変態におけるアポトーシスや体の形態・機能の変化と重力 - . Space Utiliz. Res., **19**, 45-48, (2003)
- 11) 新海正, 柏木昭彦, 柏木啓子, 古野伸明, 浦野四郎, 佐藤嘉哉, 久保英夫, 板井雅夫, 渡辺稔, 吉留賢, 藤井博匡, 山下雅道, 過重力環境がアフリカツメガエルの脳下垂体・標的器官におよぼす影響についての研究. Space Utiliz. Res., **22**, 231-234, (2006)
- 12) Shinkai T., Kashiwagi A., Kashiwagi K., Matsuda K., Urano S., Sato H., Kubo H., Furuno N., Itai M., Watanabe M., Yoshitome S., Fujii H., Yamashita M., Effects of hypergravity on pituitary-target organs in the frog, *Xenopus laevis*. Biol. Sci. Space. (2007) in press.
- 13) Burden H. W., Zary J. T., Hodson C. A., Gregory H. L., Baer L. A. and Ronca A. E., Effects of hypergravity on ovarian-hypophyseal function in antepartum and postpartum rats. Aviat. Space Environ. Med., **73**, 110-114 (2003)
- 14) Megory E and Oyama J., Hypergravity induced prolactin surge in female rats. Aviat. Space Environ. Med., **56**, 415-418 (1985)
- 15) Shellenberger K. E., Grindeland R. E. and Hymer W. C., Rat anterior pituitary hormone cells: Responses to variable Gravity. Aviat. Space Environ. Med., **69**, A37-44, (1998)