

2 . 疲労及び疲労感の分子・神経メカニズムの解明

2 . 2 . 疲労生体信号と神経・免疫・内分泌関連の調整

2 . 2 . 1 . サイトカインの疲労生体信号への道筋

九州大学大学院医学研究院・統合生理・片淵俊彦

(1) 要約

疲労動物モデルとして Poly I:C の腹腔内投与による感染疲労ラットを作成し、自発行動量の低下が投与後少なくとも一週間は持続することを示した。Poly I:C 投与によって、大脳皮質および視床下部の視索前野の IFN- α 、IFN- γ 、5-HT トランスポーター、および p38 MAP キナーゼの mRNA 量が投与翌日から一週間にわたって増加した。また、Poly I:C を無条件刺激、サッカリン水を条件刺激にして、行動量の低下を条件付けすることに成功した。この条件付け行動は、5-HT 1A 受容体アゴニストの前投与で阻害された。

(2) 研究目的

免疫系情報伝達物質であるサイトカインが、おもにグリア細胞によって中枢神経内でも産生されることは、よく知られている。脳内で産生されたサイトカインは、中枢神経系に作用し、自律神経や内分泌系、摂食、睡眠、体温調節などに大きな影響を与えることが、行動学、電気生理学、および内分泌学的研究によって明らかになっている。これらのサイトカインの中枢神経作用と、疲労に伴う様々な兆候には多くの類似性があり、従って疲労の発現や持続と脳内サイトカインとの関連が強く示唆される。

一方、脳内サイトカインの産生は、中枢神経系における感染などの炎症によって誘発されるだけでなく、拘束ストレスや環境ストレスなど、非炎症性ストレスによっても誘導される。そして、疲労もまた、様々なストレスによって誘発され、さらに重症化、あるいは慢性化される。疲労の種類は、(1)強制歩行などによる肉体的疲労、(2)拘束や不安による精神的疲労、(3)暑熱暴露などによる環境疲労、および(4)感染や腫瘍、および自己免疫疾患などによる免疫学的疲労、に分けることができる。これらの分類は、とりもなおさずストレスの分類法でもあり、従ってストレスと疲労とは、表裏一体をなすものであり、脳内のサイトカインはこれらを結び、キーワードになると考えられる。

本研究課題である「サイトカインの疲労生体信号への道筋」の最終的な目標は、脳内で産生されるサイトカインの、疲労の発生要因および疲労感の増強への関与を、神経生理学および分子生物学的手法を用いて検討することであり、そのために、まず、

疲労による脳内サイトカインの産生動態を mRNA レベルで明らかにする手法として、リアルタイムキャピラリーPCR法を用いた mRNA の定量法を確立することを目標とした。

さらに、環境ストレスとして暑熱暴露、および感染ストレスとしての Poly I:C 投与をラットに加え、自発運動量を指標に疲労動物モデルを作成すること、各種ストレス時の脳内局所のサイトカインや蛋白キナーゼ (p38 MAP キナーゼ) および I B mRNA の発現量を定量的に測定し、サイトカインの脳内作用、および疲労の発現や持続に対する影響を、モデル作成方法 (ストレス) の違いを考慮しながら比較検討すること、疲労因子としての脳内セロトニン (5-HT) 系の関与を検討するため、IFN- α および IFN- γ で誘導されることが知られている 5-HT トランスポーター (5-HTT) mRNA の発現量を検討すること、さらに脳内 5-HT 動態に対する Poly I:C 投与の影響を、*in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて検討し、IFN- α による疲労の発現と、古典的条件付けの脳内メカニズムとの関連に注目し、Poly I:C を無条件刺激に用いて、発熱と活動量低下の条件付けを試み、その神経メカニズムと疲労との関連を考察することなど、以上 6 点を研究の目的とした。

(3) 研究方法

1) リアルタイムキャピラリー PCR 法を応用した mRNA 定量法

キャピラリーを用い、PCR バッファー内のサイバーグリーン I による蛍光をサイクルごとに測定するリアルタイム PCR 法 [1] を応用して、脳内局所のサイトカイン mRNA の定量を行った。

ラットを冷却した生理食塩水で灌流した後、脳を取りだし、大脳皮質、小脳、海馬、および視床下部の内側視索前野 (MPO)、外側視索前野 (LPO)、室傍核 (PVN)、外側野 (LHA)、および腹内側核 (VMH) の各ブロックを取り出し、平成 11 年度に購入した自動核酸抽出装置を用いて、全 RNA を抽出し、さらに逆転写を行って cDNA を作成した。そのうち一部は、通常のチューブを用いる PCR 法で目的とする cDNA の PCR 産物を作成し、これを精製して、既知濃度の cDNA を含む段階希釈溶液を作成した。これらの段階希釈溶液、およびサンプルを同時にキャピラリーを用いて増幅する際に、PCR バッファー液にサイバーグリーン I を入れておくと、PCR 時にサイバーグリーン I の蛍光強度を、各サイクル毎に測定することによって、増幅曲線が作成される (図 1A)。そこで、増幅がプラトーに達するより前のある一定の蛍光強度 (図 1B 上の点線) において、cDNA 濃度の対数とサイクル数との標準直線を作成すると、この標準直線から、同時に増幅したサンプルの cDNA 濃度を定量することができる (図 1B)。この方法を用いると、サンプルの cDNA 濃度が少なくとも 100 コピー/ μ l まで測定できた。視床下部の各部位のサイトカインについてプライマーを設計し、PCR を行ったが、比較する際には、サンプルの RNA 量によるばらつきを補正するため、ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) の mRNA も同じサンプルで測定し、その値で割ったものを用いた。また、この方法は、PCR 終了後、温度を変化させ

ながら蛍光強度を連続的に測定することで PCR 産物の融解曲線が得られる。従って融解曲線を微分し、ピークを観察することで目的とする PCR 産物が生成されたかどうか、あるいは単一なものかどうか判定できるという利点がある。

2) 疲労動物モデルの作成

ア) 自発運動量の測定

ラットを用い、ホームケージ内に設置した直径約 30cm の回転かごに自由に入れるようにし、回転数を 1 分ごとにコンピュータに取り込んだ。

イ) 暑熱暴露モデル

人工気候室において室温 36℃、湿度 60~70%の環境に一日 1 時間の暴露を、連続して 3 日間連続して与えた。暑熱暴露の体温が上昇するのを確認し、再びホームケージに戻した。また、別の群では、暑熱暴露の直後および 1 日後に、脳を取り出し、サイトカインの mRNA を定量した。

ウ) Poly I:C による感染モデル

ラットの自発運動量をホームケージ内に設置した回転ケージの回転数で測定し、回転数が安定したところで腹腔内に Poly I:C (3mg/kg)を投与した。発熱を確認し、自発運動量は、Poly I:C 投与後 1 週間は観察した。また、脳内サイトカインおよび 5-HTT の mRNA 量は、Poly I:C 投与の翌日および 1 週間後に脳を取り出し、測定した。

3) mRNA の定量

上述したリアルタイムキャピラリーPCR 法を応用して、ラットの大脳皮質、小脳、海馬、視床下部内側視索前野(MPO)、外側視索前野(LPO)、室傍核(PVN)、外側野(LHA)、および腹内側核(VMH)を切り出してサイトカイン(IFN- γ 、IL-1 β 、TNF- α 、および IL-6) および 5-HTT の mRNA を定量した。さらに、p38 MAP キナーゼおよび I B の mRNA についても測定した。これらの物質のプライマーと PCR 産物の大きさは、以下の通りであった。

センスプライマー

アンチセンスプライマー

IFN- γ (488 bp)

5' -CCTGCCTCATACTCATAACC-3' 5' -CTTCTCTCAGTCTTCCCATC-3'

IL-1 β (378 bp)

5' -CAAAAATGCCTCGTGCTGTC-3' 5' -CCGACCATTGCTGTTTCCTA-3'

IL-6 (602 bp)

5' -GTTGCCTTCTTGGGACTGAT-3' 5' -TAGGTTTGCCGAGTAGACCT-3'

TNF- α (509 bp)

5' -GACCCTCACACTCAGATCAT-3' 5' -TAGGTTTGCCGAGTAGACCT-3'

5-HTT (313 bp)

5'-TTAGCATCTGGAAAGGCTGTC-3' 5'-CTTGTCATGCAGTTCACCAC-3'

p38 (320 bp)

5'-TGAAGTGTGAGAAGCTTACCGA-3' 5'-AAACAACGTTCTTCCGGTCAAC-3'

I B (294 bp)

5'-GAGTGTGGTGACTGAGAGA-3' 5'-GGATGACAGCTACATGGAGT-3'

G3PDH (544 bp)

5'-AAAA GGGTCATCATCTCCGC-3' 5'-CAGCATCAAAGGTGGAGGA A-3'

4) in vivo マイクロダイアリシス法による脳内 5-HT 動態

透析チューブを用いて作成した半透膜プローブをラットの前頭前野に刺入し、1 μl/min で環流しながら細胞外液を回収し、20 分ごとのサンプル (20 μl) を高速液クロマトグラフィーで分離した後、電気化学検出器 (electrochemical detector, ECD) で、酸化還元電位により 5-HT 濃度を測定した。

5) 疲労および発熱の条件付け

ラットの腹腔内に送信器を植え込み、テレメトリーシステムにより体温および運動量を測定しながら、1 日 30 分間 (9:00 ~ 9:30) の制限飲水を 2 ~ 3 週間行った (Pre)。Training 日には、水の代わりに条件刺激としてサッカリン水を与え、その直後に無条件刺激として Poly I:C (1mg/kg) を腹腔内投与した (Conditioned 群)。対照群は通常通り水を与えて Poly I:C を投与した (Unconditioned 群)。その後 3 日間は、水を与え (Interval (Int.))、4 日目にサッカリン水 (条件刺激) を与えた (Test 日)。さらにその後数日間は、体温および運動量を測定した (Post)。

(4) 研究成果

1) 暑熱暴露による脳内サイトカイン mRNA 動態

ラットを暑熱 (36 °C) 環境下に 1 時間暴露すると、体温が約 3 °C 上昇した。視床下部各部位の IFN- γ mRNA は、暑熱暴露によって内側視索前野 (MPO)、外側視索前野 (LPO)、室傍核 (PVN)、および腹内側核 (VMH) で著明に増加し、IL-1 mRNA は、MPO および LPO では変化せず、PVN、視床下部外側野 (LHA)、および VMH で減少した。一方、IL-6 および TNF- α mRNA 量は、暑熱暴露によって変化しなかった。

2) 暑熱暴露および Poly I:C による自発行動量の変化

暑熱暴露および Poly I:C による自発行動量を比較すると、図 2 に示すように、明らかな相違が見られた。すなわち、36 °C、1 時間の暑熱暴露では、自発運動量は初日

のみ低下したが、その後連続して2日間暴露しても、活動量はむしろ増加した。一方、腹腔内に Poly I:C (1mg/kg)を投与すると、自発運動量は投与翌日から低下し、8日目まで持続した。対照群として、生理食塩水を投与した。

3) Poly I:Cによる脳内サイトカインおよびその関連物質の mRNA 動態

ア) IFN- γ および IL-1 mRNA の変動

Poly I:C および生理食塩水投与群後1日目および8日目のラットの脳を取りだし、その切片から、大脳皮質、小脳、海馬、視床下部の MPO、LPO、PVN、LHA、および VMH の各部位の IFN- γ mRNA の定量を行った。図3に示すように、ラットの腹腔内に Poly I:C を注射して1日後では、IFN- γ mRNA は大脳皮質、小脳、MPO、LPO で有意に増加し、大脳皮質および MPO では1週間後でも増加は持続していた。また、PVN、VMH および海馬では1週間目の方がより著明に増大していた。一方、IL-1 mRNA は、Poly I:C 投与の翌日は IFN- γ と同じ部位で増加していたが、一週間後には、投与前のレベルに戻っていた。

すでに述べたように IFN- γ mRNA は、暑熱暴露によっても増加するが、自発運動量は暑熱暴露によって2日目以降はむしろ増加した(図2)。そこで、Poly I:C との違いを mRNA レベルで検討するため、暑熱暴露の翌日に IFN- γ mRNA を定量したところ、Poly I:C と異なり、IFN- γ mRNA は、すでに投与前のレベルに戻っていた。

イ) 5-HTT mRNA の変動

強制歩行により疲労を誘発したラットの脳内で細胞外セロトニン濃度が上昇していることから、中枢性疲労にセロトニンの関与が示唆されているが、その詳細は不明な点が多い。一方、最近、グリア細胞において IFN- γ がセロトニントランスポーター(5-HTT)の発現を促進することが明らかになった[2]。そこで、Poly I:C 投与による脳内 5-HTT mRNA 量を定量し、変化のパターンを IFN- γ と比較検討した。

図4に示すように、Poly I:C の腹腔内投与によって、投与1日後には大脳皮質、MPO で増加し、これらは1週間後も増加していた。また、PVN、VMH、および海馬では1週間後の方がより著明に増加していた。すなわち、Poly I:C 投与後の 5-HTT mRNA の増加パターンは、IFN- γ mRNA の変化(図3)とほとんど同じであった。

ウ) p38 MAP キナーゼおよび I κ B mRNA の動態

細胞が種々の刺激を受けると、増殖、炎症、およびアポトーシスに関連した様々な蛋白キナーゼや転写調節因子が活性化される。そのなかで p38 MAP キナーゼ、および Nuclear Factor κ B (NF κ B)の活性化のマーカーである I κ B の mRNA について、Poly I:C による発現の変化を検討した。図5に示すように、p38 MAP キナーゼ mRNA は、MPO および PVN で増加し、IFN- γ mRNA と同様、1週間後までその増加は持続した。一方、I κ B mRNA は、Poly I:C 投与の翌日は増加していたが、1週間後には元のレベルに

戻っていた。この経過は、IL-1 mRNA と一致していた。

4) Poly I:C による脳内 5-HT 濃度の変化

ラットの前頭前野に透析プローブを刺入し、5-HT 濃度が安定した後、Poly I:C を 3 mg/kg 腹腔内投与し、その後約 6 時間測定した。その結果、前頭前野の 5-HT 濃度は、Poly I:C 投与によって約 3 時間後から、基礎値の 10~20% 低下することが明らかになった。

5) 発熱および活動量低下の条件付けの試み

1 日 30 分間の制限飲水をしたラットに、条件刺激としてサッカリン水を、無条件刺激として Poly I:C (1mg/kg) の腹腔内投与を行い、その 3 日後にサッカリン水を与えると、約 1 時間後に体温が上昇したことから、発熱が条件付けされたことが示された。

図 6 は、1 日のうちで自発運動がほとんどなく、じっとしている時間 (Resting Time) の総和をグラフにしたものである。Unconditioned 群では、Poly I:C 投与前 (Pre) と比較して、Poly I:C 投与日 (Training)、サッカリン水投与前日 (Interval、Int.)、サッカリン水投与日 (Test)、およびその翌日 (Post) は、いずれも Resting Time が長い傾向が見られたが、それぞれ有意差はなかった (図 6 左)。しかし、Conditioned 群において、サッカリン水だけを与えた日 (Test) の Resting Time は、Pre および Post と比較して有意に増加していた (図 6 右)。すなわち、無条件刺激を Poly I:C、条件刺激をサッカリン水とすると、条件刺激によって活動量が低下したことから、活動量低下の条件付けは成功したと考えられた。

さらに、活動量の条件付けにおける 5-HT 系の関与を検討するため、Test 日にサッカリン水 (条件刺激) を提示する前に 5-HT_{1A} 受容体アゴニストを腹腔内に前投与しておくと、活動量の低下が阻害された。

(5) 考察

本研究によって、ストレス時における脳内のサイトカイン産生動態が明らかになった。mRNA の定量的測定法としては、ミミック DNA あるは RNA を用いる競合的 RT-PCR 法が比較的定量性の高い方法であったが、最近は、リアルタイム PCR 法を用いた測定法も散見するようになった。本研究では、キャピラリーチューブを用いたリアルタイム PCR 法を用いた。PCR 産物の検出法としては、DNA 二重鎖に結合する蛍光色素であるサイバークリーン I を用いた。

暑熱暴露により視床下部の MPO、PVN、および VMH において、IFN- mRNA が有意に増加していた。一方、IL-1 の mRNA はむしろ低下していたことから、同じストレス刺激でも、サイトカインによって産生動態に対する影響は異なることが示された。

ストレスによって脳内でサイトカインの産生が誘導される機序については、不明な点が多い。しかし最近我々は、c-fos mRNA のアンチセンスオリゴ DNA を MPO に微量注入して FOS 蛋白の発現を阻害すると、IFN- γ の mRNA 量が低下することを見いだした。すなわち、IFN- γ mRNA の転写調節に FOS 蛋白が関与していることが考えられる。

一方、ラットに温熱ストレスを 3 日間連続して加えても自発行動量は低下するどころか、むしろ上昇した。ラットにケージスイッチなどのマイルドなストレスを加えると、その後ラットは回転かごを回し始め、回転数は上昇する。従って、本研究で観察された暑熱暴露後の自発行動量の増加は、ストレスに対する代償行為を反映している可能性がある。ところが、2 重鎖 RNA である Poly I:C を腹腔内に投与すると、自発運動量は投与後、少なくとも 1 週間にわたって自発運動量が投与前の 50~60%まで低下することが明らかになった(図 2)。従って Poly I:C は、感染疲労モデルの作成に用いられると考えられる。

脳内の IFN- γ mRNA をリアルタイム RT-PCR 法で測定すると、大脳皮質、海馬、MPO、PVN、および VMH において、Poly I:C 投与 1 週間後でも増加していた(図 3)。暑熱暴露によっても脳内の IFN- γ mRNA が増加するが、活動量は暑熱暴露によってむしろ増加することが明らかになった。IFN- γ mRNA が暑熱暴露の翌日には著明に低下していたのに対し、Poly I:C は mRNA の増加が 1 週間後まで持続し、自発運動量の低下も同様に持続していたことから、脳内の IFN- γ が疲労の発現に強く関与していることを示唆している。

従来から中枢性疲労のメカニズムとして 5-HT 説がある。これは、おもに強制歩行などの肉体的疲労において、中枢神経系において 5-HT の合成が亢進し、細胞外 5-HT 濃度が上昇すること、脳内へのトリプトファンの取り込みを抑制すると肉体的疲労度が低下すること、などが根拠になっているが、疲労のメカニズムにおける関与の詳細は不明な点が多い。本研究において、Poly I:C の投与により自発運動量の低下と一致して大脳皮質や視床下部の特定の部位で 5-HTT mRNA が増加し、前頭前野では、マイクロダイヤリシス法で 5-HT の細胞外濃度が低下していることが明らかになった。従来から、5-HTT はおもに 5-HT ニューロンの細胞体や樹状突起およびシナプス前終末に発現することが知られている。5-HT ニューロン自体はおもに中脳の縫線核に存在し、従って 5-HTT ニューロンの神経終末しかない視床下部や大脳皮質で見いだされた 5-HTT mRNA が、5-HT ニューロン由来である可能性は考えにくい。一方、最近になって、アストロサイトが 5-HTT を発現していることが RT-PCR で確認され、機能的にも選択的 5-HTT 再取り込み阻害剤 (selective serotonin re-uptake inhibitor、SSRI) のターゲットとなっていることが示された。従って本研究で大脳皮質や視床下部で検出された 5-HTT mRNA は、アストロサイト由来である可能性が高い。また、Poly I:C 投与後の IFN- γ mRNA の発現パターンと 5-HTT mRNA のそれとはほぼ一致しているこ

とが明らかになったが、最近、培養アストロサイトにおいて、IFN- α が 5-HTT mRNA の発現を誘導することが示された [2]。従って、本研究において脳局所で産生された 5-HTT mRNA は、同じ部位で産生された IFN- α によって誘導されたと考えられる。

本研究によって、Poly I:C は、発熱を惹起するとともに、脳内に IFN- α 、および 5-HTT を誘導し、自発運動量を低下させることが明らかになった。さらに、無条件刺激に Poly I:C を、条件刺激にサッカリン水を用いることによって活動量の低下を条件付けすることに成功した。これまで、恐怖条件付けによる活動の抑制 (freezing) が SSRI によってブロックされることが示されており、さらに本研究によって疲労の条件付けが 5-HT 1A アゴニストによって阻害されることが明らかになった。これらのことを考慮すると、Poly I:C によって誘導された IFN- α が 5-HTT の発現を増加させ、細胞外の 5-HTT が減少することによって活動量の低下が起こると考えられる。条件付けの阻害実験から、疲労の予防あるいは回復に 5-HT の reuptake inhibitor、および 5-HT 1A 受容体アゴニストが有効である可能性が考えられる (図 7)。今後さらに、Poly I:C による感染疲労の条件付けモデルを用いて、その疲労の発現に関与する脳内部位、条件付けの神経メカニズムにおける IFN- α などのサイトカイン、あるいは p38 MAP キナーゼ、および 5-HT 系の関与などについて、行動学的、電気生理学的、およびアンチセンスオリゴ DNA による 5-HTT の発現阻止実験などの分子生物学的手法を用いて研究を行う予定である。

IFN- α は、末梢で作用すると、NK 細胞活性を上昇させるにもかかわらず、ラット脳室内に投与すると、脾臓交感神経活動の上昇を介して脾臓 NK 細胞活性が低下し [3、4]。その脳内作用部位として MPO が示唆されている [5、6、7]。ストレスによって、免疫機能が修飾を受けることは知られていたが、その機序として脳内サイトカインが重要であることが次第に明らかになってきた [8]。また、海馬に IFN- α が作用すると、長期増強現象を抑制し、空間認知学習行動が障害される [9]。慢性疲労症候群においても、NK 細胞活性の低下や学習能力の低下が報告されていることから、脳内 IFN- α が、慢性疲労に何らかの役割を果たしている可能性は高いと考えられる。

(6) 参考文献

[1] Morrison, T.B., Weis, J.J. and Wittwer, C.T.: Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR green I monitoring during amplification. *BioTechniques* 24: 954-962, 1998.

[2] Morikawa, O., Sakai, N., Obara, H. and Saito, N.: Effects of interferon- α , interferon- γ and camp on the transcriptional regulation of the serotonin transporter. *Eur. J. Pharmacol.* 349: 317-324, 1998.

[3] Katafuchi, T., Take, S. and Hori, T.: Roles of sympathetic nervous system

in the suppression of cytotoxicity of natural killer cells in the rat. J. Physiol. (Lond.) 465: 343-357, 1993.

[4] Take, S., Mori, T., Katafuchi, T. et al.: Central interferon α inhibits the natural killer cytotoxicity through sympathetic innervation. Am. J. Physiol. 265: R453-R459, 1993.

[5] Katafuchi, T., Ichijo, T., Take, S. et al.: Hypothalamic modulation of splenic natural killer cell activity in rats. J. Physiol. (Lond.) 471: 209-221, 1993.

[6] Take, S., Uchimura, D., Kanemitsu, Y. et al.: Interferon- α acts at the preoptic hypothalamus to reduce natural killer cytotoxicity in rats. Am. J. Physiol. 268: R1406-R1410, 1995.

[7] Hori, T., Katafuchi, T., Take, S. and Shimizu, T. Neuroimmuno-modulatory actions of hypothalamic interferon- α . Neuroimmuno-modulation 5: 172-177, 1998.

[8] 片淵俊彦. ストレスと免疫系. 感染炎症免疫 28 (2): 106-115, 1998.

[9] 片淵俊彦. IFN の神経系に対する作用. インターフェロン—その研究の歩みと臨床応用への可能性— 今西二郎編: pp.112-121, ライフサイエンス, 東京, 1998.

(7) 成果の発表

1) 原著論文による発表

イ) 国外誌

1. Kamikawa, H., Katafuchi, T., Hosoi, M., Yamamoto, T. and Hori, T. Hyperalgesic response to noxious stimulation in genetically polydipsic mice. Brain Res. 846: 171-176, 1999.

2. Katafuchi, T., Li, A-J., Hirota, S., Kitamura, Y. and Hori, T. Impairment of spatial learning and hippocampal synaptic potentiation in *c-kit* mutant rats. Learn Mem. 7: 383-392, 2000.

3. Katafuchi, T., Kondo, T. and Hori, T. Comparable effects of adrenalectomy and C fiber depletion on delayed-type hypersensitivity in rats. Neuroimmunomodulation 9: 157-162, 2001.

4. Katafuchi, T., Takaki, A., Kondo, T. and Hori, T. Changes in brain cytokine mRNA due to heat stress in aged rats: possible role of bacterial translocation. Prog. Biometeorol. 17: 173-183, 2001.

5. Kondo, T., Katafuchi, T. and Hori, T. Stem cell factor modulates paired-pulse facilitation and long-term potentiation in the hippocampal mossy fiber-CA3 pathway in mice. Brain Res. 2002, in press.

2) 原著以外による発表

ア) 国内誌

1. 片渕俊彦．神経・免疫・内分泌．免疫学からみた神経系と神経疾患，吉田孝人，糸山泰人，錫村明生編，日本医学館，p.149-158，1999.
2. 片渕俊彦．ストレスとサイトカイン．サイトカインと疾患．別冊 医学のあゆみ，107-111，2000.
3. 片渕俊彦．神経・内分泌・免疫系連関とストレス応答．日本皮膚アレルギー学会雑誌，第8巻 第3号，56-61，2000.
4. 片渕俊彦．免疫機能と脳．日本 ME 学会雑誌，第14巻 第11号，65-72，2000.
5. 片渕俊彦．ストレスと免疫応答．臨床検査，第45巻 第2号，207-212，2001.
6. 堀哲郎，片渕俊彦．IL-6の神経系への作用．Clinical Neuroscience，第19巻 第6号，114-116，2001.
7. 片渕俊彦．脳・免疫系連関とストレス応答．神経研究の進歩，第45巻 第6号，884-890，2001.
8. 片渕俊彦．ラットの手術法．Freshman 技術講座 日本生理学雑誌，第63巻 第10号，261-270，2001.

イ) 国外誌

1. Hori, T., Katafuchi, T., Ota, K., Matsuda, T., Oka, T. and Oka, K. Evidence for the involvement of AV3V in the circulating IL-1 β -to-brain communication. *J. Therm. Biol.* 25: 29-33, 2000.
2. Hori, T., Katafuchi, T. and Oka, T. Central cytokines: effects on peripheral immunity, inflammation and nociception. In: *Psychoneuroimmunology. Third Edition volume 1* (Eds. Ader, R., Felten D.L. and Cohen, N.) Academic Press Inc., San Diego, p.517-545, 2001.
3. Katafuchi, T., Kondo, T., Take, S. and Hori, T. Autonomic and neuroendocrine modulation of cellular immunity. In: *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation and Pain* (Eds. Kosaka, M., Sugahara, T., Schmidt, K.L. and Simon, E.) Springer-Verlag Tokyo, Inc. Tokyo, p.252-257, 2001.
4. Hori, T., Kaizuka, Y., Takaki, A. and Katafuchi, T. Thermal stress and immunity. In: *Thermotherapy for Neoplasia, Inflammation and Pain* (Eds. Kosaka, M., Sugahara, T., Schmidt, K.L. and Simon, E.) Springer-Verlag Tokyo, Inc. Tokyo, p.242-251, 2001.
5. Katafuchi, T., Shi, Z., Take, S. and Hori, T. Hypothalamo-sympathetic control of cellular immunity. In: *Catecholamine Research: From molecular insights to clinical medicine* (Ed. Nagatsu, T., Nabeshima, T., McCarthy, R. and Goldstein, D.) Kluwer Academic/Plenum Publishers Inc. New York,

2002, in press.

3) 口頭発表

ア) 招待講演

1. Katafuchi, T. Neural modulation of splenic natural killer cell activity through the sympathetic nerve. International Conference "Mechanisms of Functioning of Visceral Systems" (dedicated to Academician Ivan Pavlov's 150-anniversary) Program p.163-164, (St. Peterburg, Russia) September 23-25, 1999.
2. 片淵俊彦. 神経・免疫系連関とストレス. シンポジウム 1「環境とストレス」第25回環境トキシコロジーシンポジウム・第3回衛生薬学フォーラム合同大会 講演要旨集 S1-3, p.7, 1999. (名古屋) 10月.
3. 片淵俊彦. 神経・内分泌・免疫系連関とストレス応答. 教育講演 第30回日本皮膚アレルギー学会 日本皮膚アレルギー学会雑誌 8(1): 15-16, 2000. (大阪) 7月.
4. Katafuchi, T. Changes in brain cytokine mRNA due to heat stress in aged rats: possible role of bacterial translocation. The 20th International Symposium of UOEH "Physiological Evaluation of Working Capability in Aged Laborers" Abstracts p.22, (Kitakyushu) October 25-27, 2000.
5. 片淵俊彦. 脳・免疫系連関とストレス応答. 第36回 脳のシンポジウム. 日本学術会議、脳・神経学研究連絡委員会 2001. (福岡) 3月.
6. Katafuchi, T. and Hori, T. Hypothalamo-sympathetic control of cellular immunity. The 9th International Catecholamine Symposium Session 4. "Catecholamines and Cytokines" Abstracts S4-6, p.14, (Kyoto) March 31-April 5, 2001.
7. Katafuchi, T., Takaki, A. and Kondo, T. Role of bacterial translocation in hot environment-induced brain cytokines in aged rats. Session III Reactions of biological systems to the unfavorable environmental factors. The International Conference on Environmental Pollution. (Volgograd-Perm, Russia) September 18-25, 2001.
8. 片淵俊彦. 脳・免疫系連関とストレス応答. シンポジウム 3「脳循環と代謝の病態生理」第12回日本病態生理学会大会 日本病態生理学会雑誌 10(2): 33, 2002. (愛媛) 1月.
9. 片淵俊彦. 環境ストレスと脳内サイトカイン. 第2回環境生理シンポジウム (第79回日本生理学会大会サテライトシンポジウム 人類生存への環境創

造へ向けて 抄録集 p.11, 2002. (広島) 3月.

イ) 応募・主催講演等

1. 片淵俊彦, 八坂敏一, 堀哲郎. 脳内 c-fos 蛋白の機能的役割 アンチセンスオリゴ DNA によるノックダウン動物を用いた解析. シンポジウム 5「新しい統合生理学研究法の開発応用とその有用性」第 76 回日本生理学会大会予稿集 1C-S5-1, p.80, 1999. (長崎) 3月.
2. 片淵俊彦, 近藤哲哉, 堀哲郎. Poly I:C による感染疲労の解析. 第 51 回西日本生理学会抄録集 p.12, 2000. (北九州) 11月.
3. 片淵俊彦. 疲労の生体信号としてのサイトカイン. シンポジウム「疲労と疲労感の神経メカニズム」第 78 回日本生理学会大会予稿集 S17-2, p.154, 2001. (京都) 3月.
4. 片淵俊彦, 近藤哲哉, 久保和彦. 脳内サイトカインと感情評価. シンポジウム「ゲノム時代と感情評価」第 24 回日本神経科学、第 44 回日本神経化学合同大会抄録集 S53-5, p.202, 2001. (京都) 9月.
5. 片淵俊彦, 高木厚司, 近藤哲哉. 老化ラットにおける暑熱暴露時の脳内サイトカイン動態. 第 79 回日本生理学会大会予稿集 p.222, 2002. (広島) 3月.

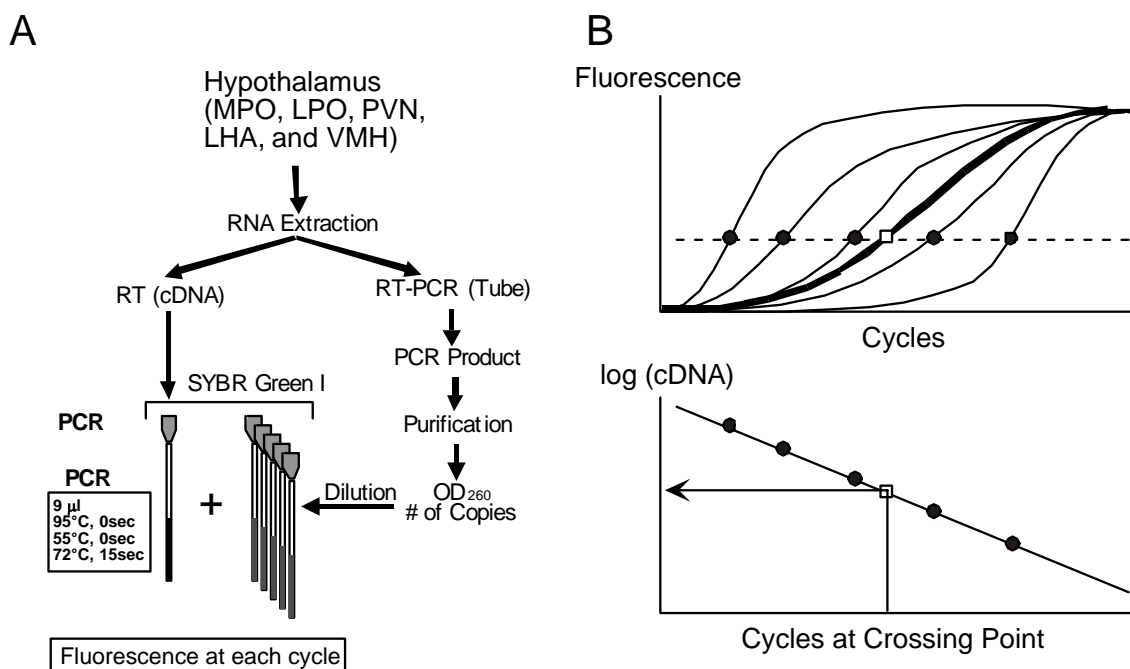


図1 リアルタイムキャピラリーPCR法を用いた mRNA の定量方法

A、定量方法のブロック図。B、上段、cDNA の段階希釈溶液（細線）およびサンプル（太線）の増幅曲線。下段、上段点線で設定した蛍光強度における各溶液のサイクル数（横軸）とそれぞれの cDNA 濃度の対数による標準直線（黒丸を結んだ線）から、サンプル（白四角）の cDNA 濃度が推定できる。

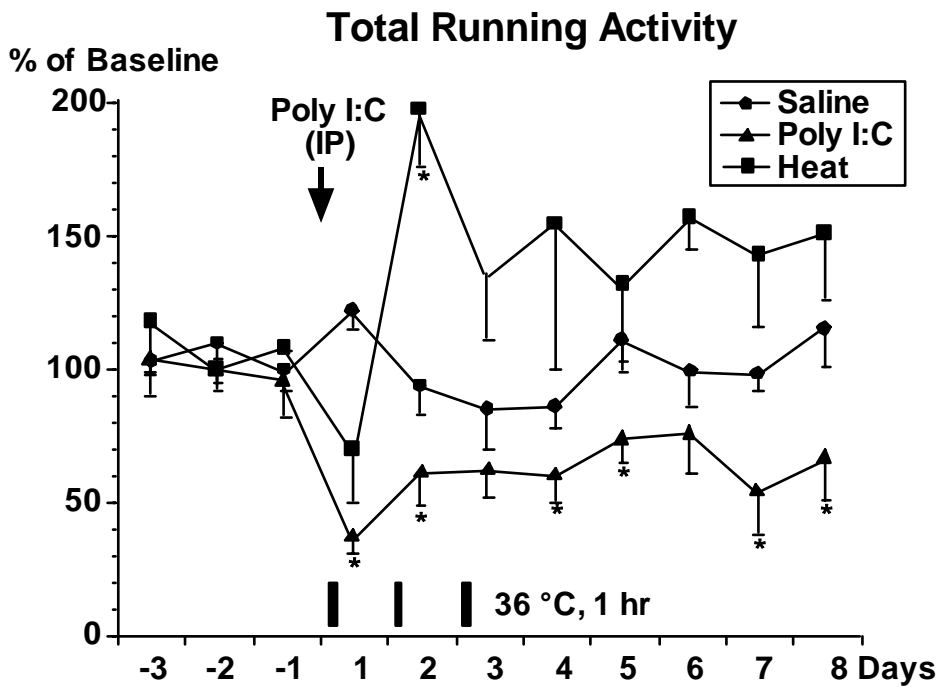


図2 Poly I:C (1mg/kg)による自発運動量の低下

Poly I:C (1m/kg)を腹腔内投与すると、8日後まで自発運動量が低下した()。暑熱暴露群()はむしろ運動量が増加した。*、生食群との比較、 $P < 0.05$

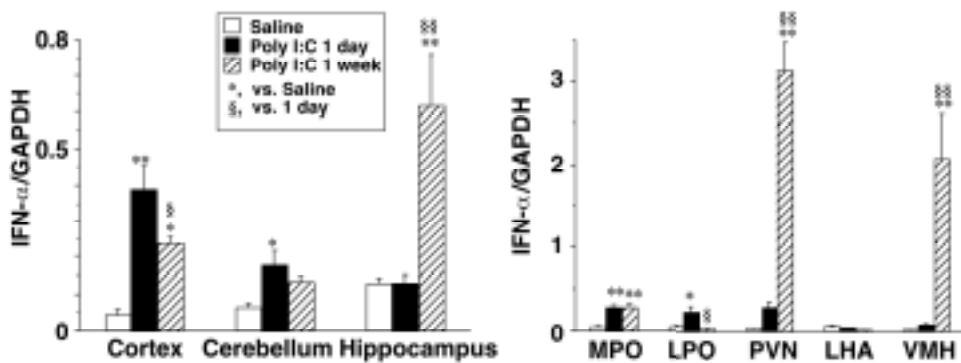


図3 Poly I:Cによる脳内 IFN- mRNA の増加

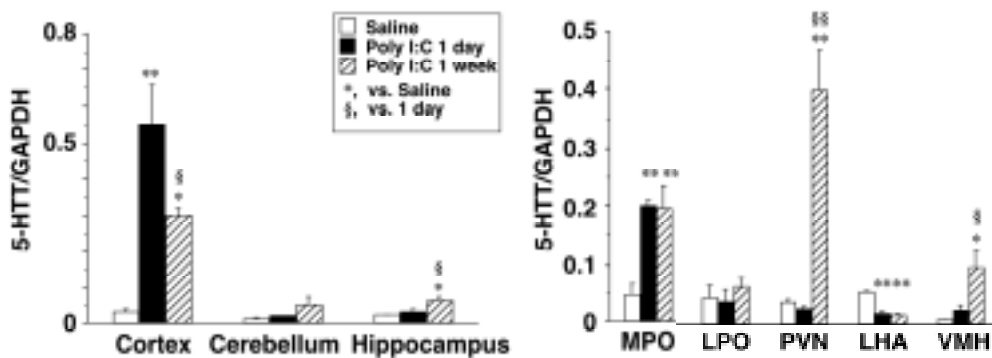


図4 Poly I:Cによる脳内 5-HTTmRNA の増加

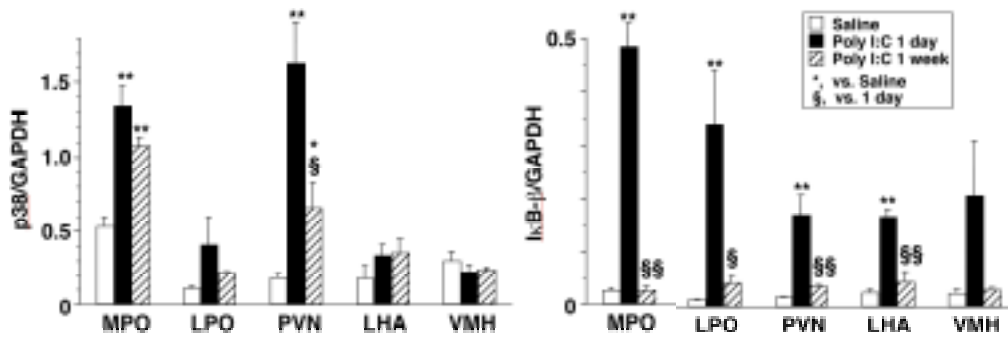


図5 Poly I:Cによる脳内 p38 MAP キナーゼおよび IκB mRNA の増加

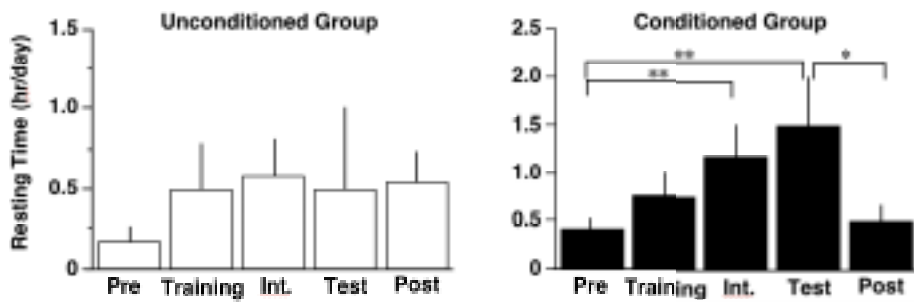


図6 Conditioned および Unconditioned 群における条件刺激 (サッカリン水) 投与前後の Resting Time

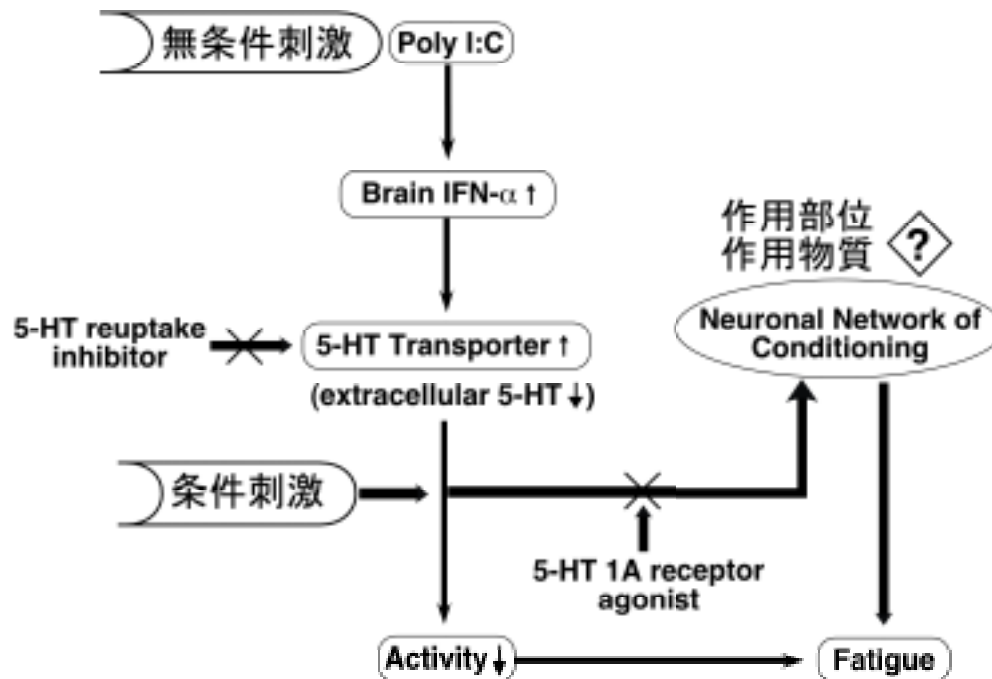


図7 Poly I:Cによる疲労における 5-HT 系の関与