

<平成 28 年度助成>

## 雌ラットを用いた更年期女性の冷えと 香辛料に関する基礎研究

内田 有希

(奈良女子大学 生活環境学部 心身健康学科)

### 1. 序論

一般的に快適と感じる環境温でも日本の女性は「冷え」を感じやすいと報告されている。「冷え」に関するアンケート（女性 318 名）では、38.7%の女性が「冷え」を自覚していた<sup>1)</sup>。アンケートで病院の女性外来患者（99 名）の 67%は日常的に冷えて苦痛だと感じた<sup>2)</sup>。この症状は一般的に冷え症といわれている。ある調査研究（女性 140 名）では約 30%が冷え症であり、閉経後の女性によくみられたことから<sup>3)</sup>、閉経に伴う血中女性ホルモン（エストロゲン (E2)、プロゲステロン）欠乏が冷え症に関わる可能性がある。

E2 は意識にのぼらない自律性の体温調節に影響する<sup>4)</sup>。寒くて不快と感じると起こす行動を「体温調節行動」というが、E2 は実験動物のラットにおいて新たに発見された寒冷時体温調節行動（尾隠し行動）<sup>5)</sup>を増加させたことから<sup>6)</sup>、E2 は自律性・行動性体温調節に影響するといえる。しかし、E2 が末梢である皮膚の温度感受性に影響を与えているかは明らかではない。

皮膚の感覚神経に発現する冷受容分子 TRPA1 に着目した研究<sup>7)</sup>では、ラット TRPA1 を発現させた培養細胞は温度を下げる毎に強い活性化を示したため、ラット TRPA1 は冷受容体であると考えられる<sup>8)</sup>。一方、雄ラットで TRPA1 アンタゴニスト腹腔投与は、寒冷暴露時の結腸温、尾部皮膚温に影響しなかったため<sup>9)</sup>、TRPA1 は寒冷時自律性体温調節に関与しないという報告もある。雌ラットにおける報告はない。TRPA1 が冷受容か温受容か、現在議論の余地が残っている。我々は雌ラットにおいて TRPA1 を冷受容

分子と考え、身近なスパイスであるシナモンの成分で TRPA1 アゴニストのシナモアルデヒド (CA)<sup>10)</sup>を本研究で使用した。

本研究では、E2 が CA を塗布時の体温調節反応に影響すると仮説を立てた。これを検証するため、卵巣摘出ラットに 30% CA を塗布し、室温暴露、または寒冷暴露を行い、腹腔温と尾部皮膚温を自律性体温調節、尾隠し行動を行動性体温調節の指標として計測した。実験後、血漿と脳を採取した。無毛皮膚血管を収縮する交感神経から放出されるノルアドレナリン<sup>11)</sup>、尾部血管収縮作用のあるアドレナリン<sup>12)</sup>、直腸温を低下させるドーパミン<sup>13)</sup>の血漿濃度を HPLC 法で測定した。

### 2. 方法

9 週齢の Wistar 雌ラットを麻酔下で卵巣摘出し、E2 (22.3 mg) 含有 (E2(+)) または非含有 (E2(-)) のシリコンチューブを背側皮下に留置した (E2(+)) 群、E2(-) 群、各群 n=9)。ラットの体幹に 30% CA または対照として 99.9%エタノールを塗布し、120 分間の室温 (27℃) または寒冷 (16℃) 暴露を行い、腹腔温はデータロガー (サーモクロン SL®、株式会社 KN ラボラトリーズ) で、尾部皮膚温、尾隠し行動時間は赤外線サーモグラフィ (Thermo Gear、日本アビオニクス株式会社) で測定し、暴露終了後に血漿を採取し、血漿ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミン濃度を株式会社 SRL にて高速液体クロマトグラフィー法で計測した。寒冷暴露時の採血量が少なく計測できなかったため、室温暴露時のサンプルのみ計測した (各群 n=7)。生理データに E2

の有無で有意差が認められなかったため、脳解析は行わなかった。全てのデータは、平均値±標準誤差で示した。腹腔温と尾部皮膚温の変化量は30分ごとの平均で示した。ベースラインの値(16°Cまたは27°C暴露前30分の平均)、腹腔温と尾部皮膚温のベースラインからの変化量は計算によって求められた。腹腔温と尾部皮膚温の変化量において、各群の差は2元配置分散分析によって評価した。Student's t-testは時間ごとの有意差を求めるために使用した。また、6分類の尾部配置時間、血漿アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン濃度においては、一変量の分散分析によって統計処理をした。P<0.05を有意な差とみなした。統計ソフトはSPSS Statistics 21 (IBM Corp., Armonk, NY)を用いた。

### 3. 結果

腹腔温変化量は室温暴露時、E2(-)群でCA塗布により有意に低下し、寒冷暴露時、E2(+)群で有意に増加した。尾部皮膚温変化量は環境温、E2の有無にかかわらず、CA塗布により低下した(Fig. 1)。尾隠し行動時間(Fig. 2f)はCA塗布により、室温暴露時はE2(+)群で、寒冷暴露時はE2(-)、E2(+)両群で短くなったが、5分以内であり生理学的な有意な差ではなかった(Fig. 2 and 3)。血漿ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミン濃度は全群で有意差は認められなかった(Fig. 4)。

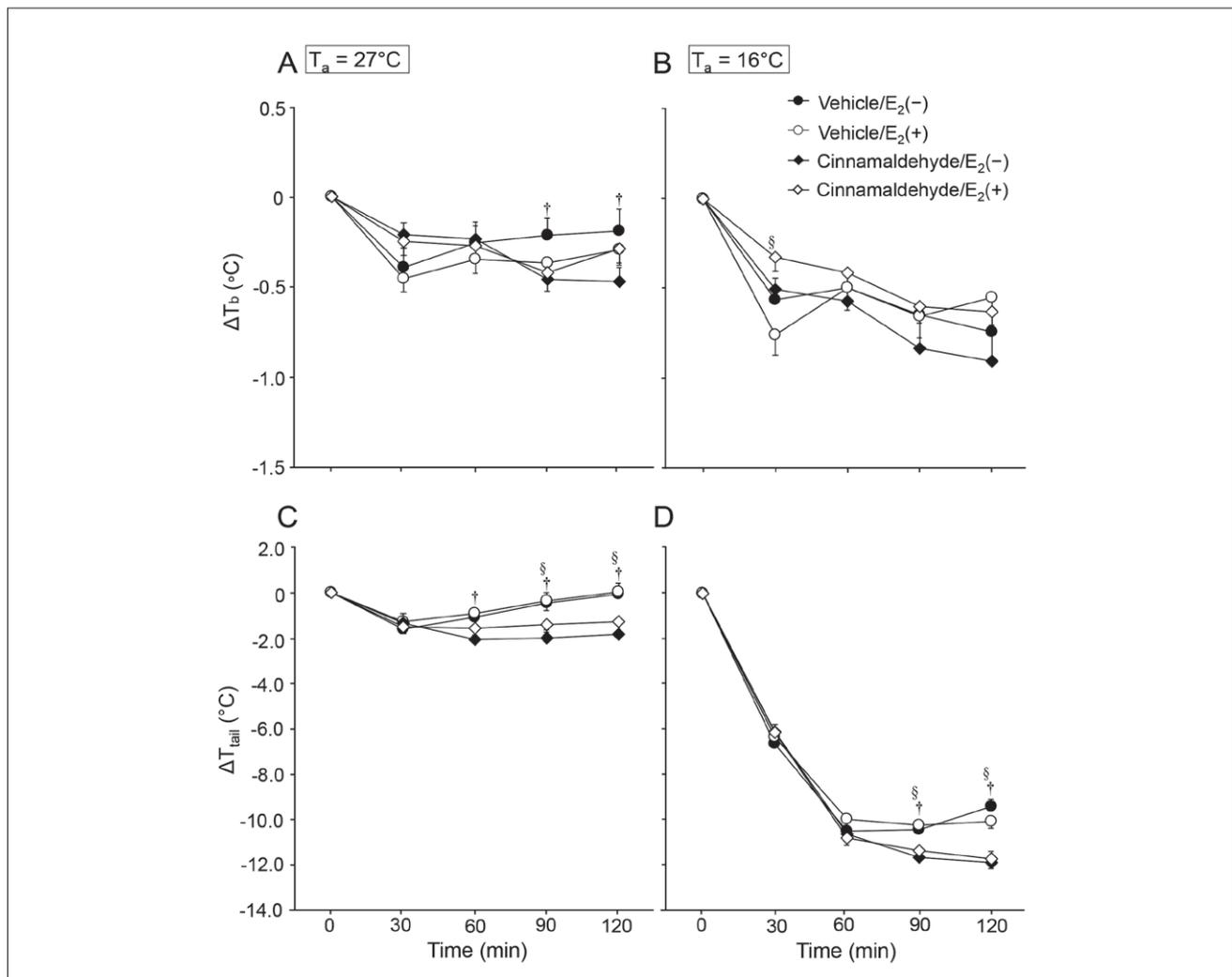


Figure.1 Change in body temperature ( $T_b$ ) and tail temperature ( $T_{tail}$ ) from the baseline at 27°C (A and C) and 16°C (B and D). Values are presented as the mean  $\pm$  standard error ( $n=9$ /group). Significant difference between Vehicle/E<sub>2</sub>(-) and Cinnamaldehyde/E<sub>2</sub>(-) groups (†), and Vehicle/E<sub>2</sub>(+) and Cinnamaldehyde/E<sub>2</sub>(+) groups (§),  $P<0.05$ .

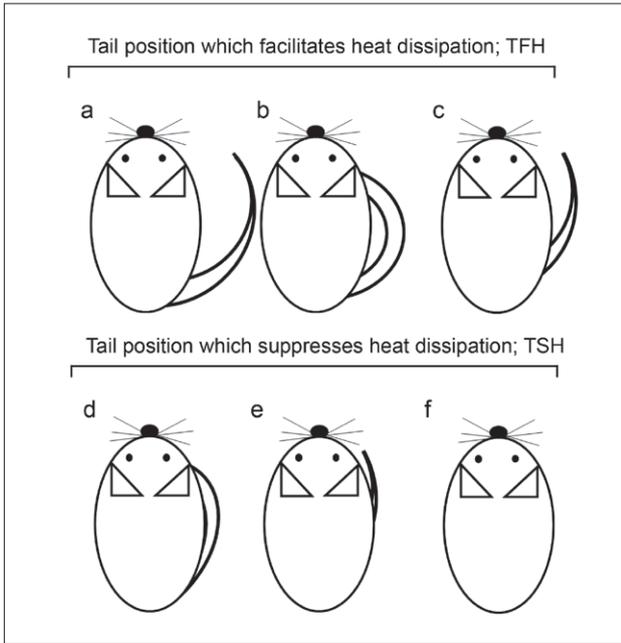


Figure.2 Tail placement classification; whole tail (a), tail position which tip part is hidden (b), tip part of tail (c), middle part of tail at side of body trunk (d), little part of tip of tail (e), tail-hiding behavior (f). This picture was cited from a previous study (Uchida et al., 2018).

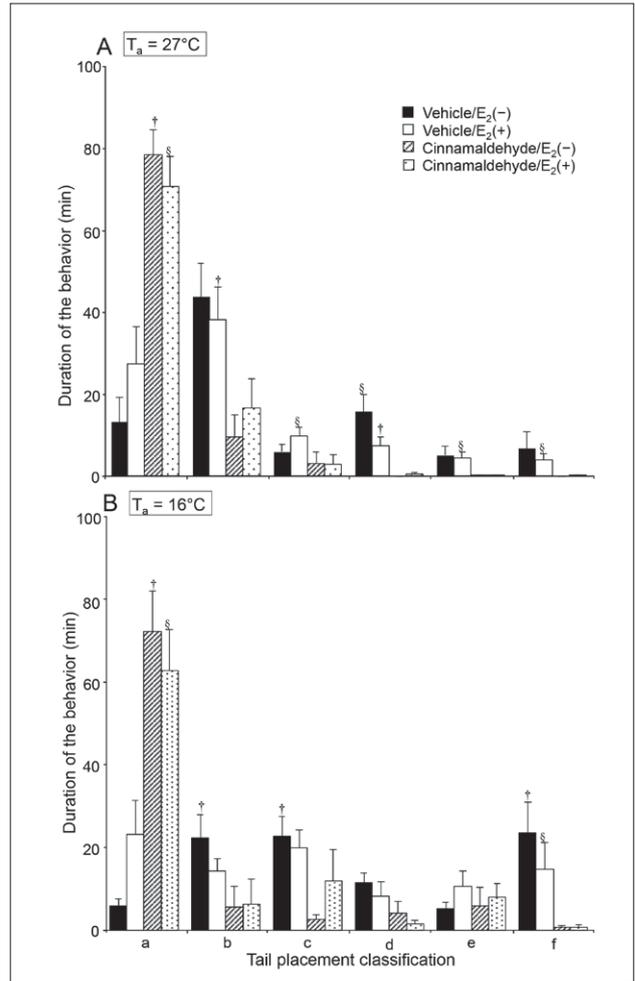


Figure.3 The duration for which each tail position was observed at 27°C and 16°C (A and B).

Tail position classification; whole tail (a), tail position which tip part is hidden (b), tip part of tail (c), middle part of tail at side of body trunk (d), little part of tip of tail (e), tail-hiding behavior (f). Values are presented as the mean  $\pm$  standard error (n=9/group). Significant difference between Vehicle/E<sub>2</sub>(-) and Cinnamaldehyde/E<sub>2</sub>(-) groups (†), and Vehicle/E<sub>2</sub>(+) and Cinnamaldehyde/E<sub>2</sub>(+) groups (§), P<0.05.

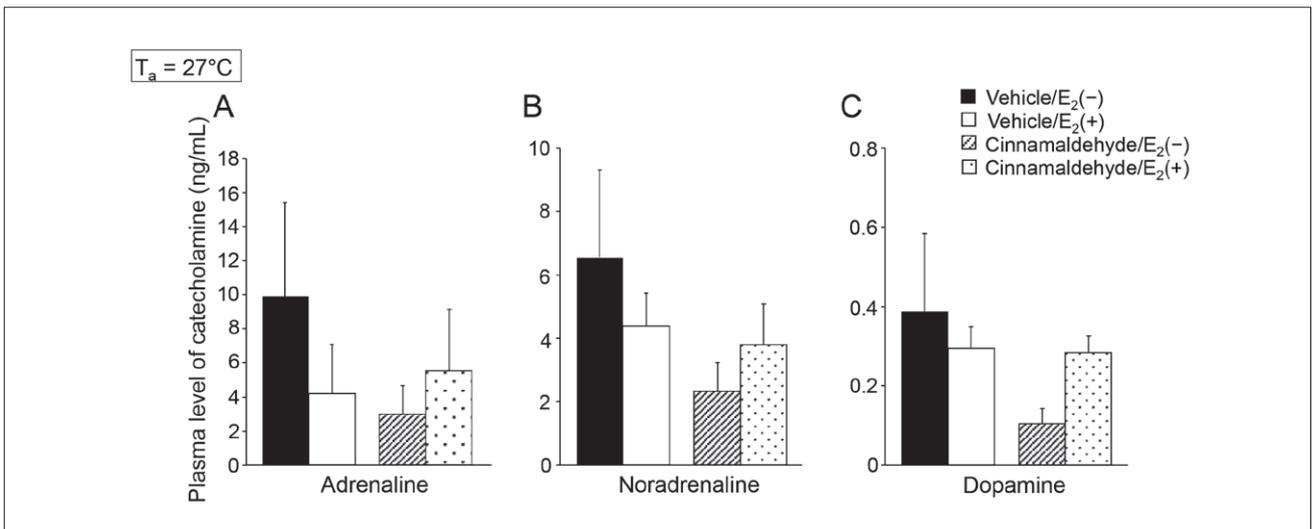


Figure.4 Plasma levels of adrenaline (A), noradrenaline (B) and dopamine (C) concentration at 27°C. Values are presented as the mean  $\pm$  standard error (n=7/group).

#### 4. 結論

本研究では、雌ラットにおいてE2はCA塗布時の自律性、行動性体温調節反応に影響するとはいえなかった。また、雌ラットにおいて、CA塗布は室温、寒冷時にE2の有無にかかわらず、尾部皮膚温低下作用があることが明らかとなった。この尾部皮膚温低下の原因は明らかにできなかったが、原因としてCAによる中枢性の神経制御が推測された。CAによる交感神経中枢の視床下部室傍核<sup>9)</sup>と尾部交感神経活動の促進に関与する腹側延髄縫線核<sup>14)</sup>の活性化による尾部皮膚血管収縮である。もう一つは、CAによる末梢性の神経制御である。CA刺激が軸索反射により逆行性に伝導し、尾部に分布する感覚神経から皮膚血管収縮性の神経ペプチドが放出され、尾部皮膚血管が収縮し皮膚温が低下した可能性である。本研究の社会的意義は、皮膚へのCA塗布により熱放散が抑制され、体温維持に効果が期待できることである。また、E2の有無にかかわらずCA塗布の尾部皮膚温低下作用があったことから、若年女性だけでなくE2濃度の低い閉経後女性にも同様に体温維持効果が得られる可能性を示したことである。

#### 謝辞

本研究の一部は公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団の研究助成により実施されました。貴財団に感謝申し上げます。

#### 参考文献

- 1) Kondo and Okamura, 1987, Cold Constitution: Analysis of the Questionnaire. *Acta Obst Gynaec Jpn* 39(11): 2000-2004.
- 2) Takatori A (1992) Assessment of Diagnostic Criterion of Coldness in Women with Thermography (Japanese article). *Acta Obst Gynaec Jp* 44: 559-565.
- 3) Melby, 2005, Chilliness: a vasomotor symptom in Japan. *Menopause* 14(4): 752-759.
- 4) Uchida, Y. et al., 2010. Estrogen in the medial preoptic nucleus of the hypothalamus modulates cold responses in female rats. *Brain Res.* 1339, 49-59.
- 5) Uchida, Y. et al., 2012. Tail position affects the body temperature of rats during cold exposure in a low-energy state. *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol Sens. Neural Behav. Physiol.* 198, 89-95.
- 6) Uchida, Y. et al., 2017. Systemic estradiol administration to ovariectomized rats facilitates thermoregulatory behavior in a cold environment. *Brain Res.* 1670, 125-134.
- 7) Story, G.M. et al., 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112, 819-829.
- 8) Chen, J. et al., 2013. Species differences and molecular determinant of TRPA1 cold sensitivity. *Nat. Commun.* 4, 2501.
- 9) Ondicova, K. and Mravec, B., 2010. Multilevel interactions between the sympathetic and parasympathetic nervous systems: a minireview. *Endocr. Regul.* 44, 69-75.
- 10) Premkumar, L.S., Abooj, M., 2013. TRP channels and analgesia. *Life Sci.* 92, 415-424.
- 11) Ootsuka, Y. and Tanaka, M., 2015. Control of cutaneous blood flow by central nervous system. *Temperature (Austin)* 2, 392-405.
- 12) Wade, D.N. and Beilin, L.J., 1970. Vascular resistance in the perfused isolated rat tail. *Br. J. Pharmacol.* 38, 20-36.
- 13) Cox, B. and Lee, T.F., 1977. Do central dopamine receptors have a physiological role in thermoregulation? *Br. J. Pharmacol.* 61, 83-86.
- 14) Tanaka, M. et al., 2007. Independent vasomotor control of rat tail and proximal hairy skin. *J. Physiol.* 582, 421-433.

## **Effect of spices on coldness in menopausal women –Basic research using female rats–**

**Yuki UCHIDA**

*Department of Health Sciences, Faculty of Human Life and Environment,  
Nara Women's University*

[INTRODUCTION] Estradiol (E2) contributes to the maintenance of body temperature (Tb), by modulation of the autonomic thermoregulatory responses via the hypothalamus in the cold, in female rats (Uchida et al., 2010, Brain Res). Previously, we reported that E2 facilitates thermoregulatory behavior in the cold (Uchida et al., 2017, Brain Res), using a new behavioral indicator ('tail-hiding behavior', in which rats place their tails beneath their bodies) (Uchida et al., 2012, J Comp Physiol A). The aim of the present study was to examine the effect of E2 on the thermoregulatory responses induced by the application of cinnamaldehyde extracted from cinnamon. [METHODS] Ovariectomized rats were implanted with a silastic tube, with or without E2 (22.3 mg) underneath the dorsal skin (E2(+), E2(-); n = 9 for each group) and data loggers in the peritoneal cavity. After the application of 30% cinnamaldehyde or vehicle (ethanol) to the skin of the whole trunk of the rats, rats were exposed to temperatures of 16°C or 27°C for 2 hours, and Tb, tail temperature (Ttail), and tail-hiding behavior were measured via the data logger and thermography. Following exposure, blood was obtained, and plasma noradrenaline, adrenaline, and dopamine concentrations were measured by high performance liquid chromatography. [RESULTS] In the E2(-) group at 27°C, the change in Tb in rats with applied cinnamaldehyde was significantly lower than that of rats with applied vehicle. In the E2(+) group at 16°C, the change in Tb in rats with applied cinnamaldehyde was significantly higher than that of rats with applied vehicle. The change in Ttail in rats with applied cinnamaldehyde was significantly lower than that of rats with applied vehicle, in both the E2(-) and E2(+) groups at 27°C and 16°C. The duration of tail-hiding behavior in rats with applied cinnamaldehyde was significantly shorter than that of rats with applied vehicle, in the E2(+) group in rats at 27°C. The duration of tail-hiding behavior in rats with applied cinnamaldehyde was significantly shorter than that of rats with applied vehicle, in both the E2(-) and E2(+) groups at 16°C. No differences were observed in plasma noradrenaline, adrenaline, or dopamine concentrations at 27°C among the groups. [CONCLUSION] In both the E2(-) and E2(+) groups, the application of cinnamaldehyde decreased Ttail in female rats. E2 might not affect the thermoregulatory responses induced by the application of cinnamaldehyde in female rats.