

Effects of Fasting, Aging and Alcohol Drinking on Restraint-Induced Changes on Synthesis and Metabolism of Serotonin in Rat Brain

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8326

拘束による脳内セロトニンの合成 および代謝の変化におよぼす 加齢, 絶食またはアルコール摂取の影響

金沢大学医学部衛生学講座 (主任: 橋本和夫教授)

堀 口 優

(平成4年2月8日受付)

加齢, 絶食またはアルコール摂取の, 全身拘束時における 5-hydroxytryptamine (セロトニン) 生合成および代謝に及ぼす影響を, 雄性ラットを用いて検討した. 生後2ヵ月および1年のラット各々75匹を25匹ずつ3群に分け, 自由摂食群, 48時間絶食群, アルコール摂取群とし, 1時間または2時間の全身拘束を与えた. 生後2ヵ月ラットにおいて, 2時間の拘束によって脳内トリプトファン量の有意な増加が認められたのは, 摂食群では視床下部のみで, アルコール摂取群では中脳のみであったが, 絶食群では全6部位であった. 生後1年ラットでは, 摂食群, 絶食群, アルコール摂取群の全てで, 脳内トリプトファンの有意な増加が認められ, 特に絶食群で増加が顕著であった. 脳内セロトニンの拘束による変化は軽微であり, わずかに生後1年ラット絶食群で拘束1時間後に橋・延髄においてのみ有意上昇が認められた. 拘束による脳内5-ハイドロキシインドール酢酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) の変化は, 生後2ヵ月摂食群では, 大脳皮質, 線条体において有意な増加が認められ, 生後2ヵ月絶食群では全6部位で認められた. アルコール摂取群ではいずれの部位でも認められなかった. 生後1年ラットの脳内5-HIAA変化は, 摂食, 絶食, 両群では線条体, 橋・延髄の2部位で有意な増加が認められ, アルコール摂取群では, 大脳皮質, 線条体, 橋・延髄の3部位で有意な増加が認められた. 脳内トリプトファン濃度は血清遊離トリプトファン濃度に依存する傾向がみられた. また, 絶食のみならず拘束により, 血清遊離脂肪酸 (non esterified fatty acid, NEFA) 濃度の有意な増加が認められ, 血清 NEFA 濃度が血清遊離トリプトファン濃度増減に影響をおよぼすことが示唆された. 拘束により橋・延髄および中脳でセロトニン生合成および代謝の亢進がみられ, これは絶食によりさらに促進された. アルコール摂取により, 生後1年ラットでは摂食群と同様セロトニン代謝の亢進が認められたが, 2ヵ月ラットでは認められず, アルコール摂取時の拘束によるセロトニンニューロン機能の変化に年齢差が認められた.

Key words serotonin synthesis and metabolism, free tryptophan, NEFA, body conditions, restraint stress

現代社会における各種ストレスの健康への影響に関しては, 医学, 心理学, 社会学, その他, さまざまな角度から多くの研究がなされている. ストレスとストレス反応の関連性についての実験医学的研究では, 従来主にラットやマウスを用いた研究が少なくない. この際選択されるストレスとして拘束, 寒冷, 振動, 電撃, 尾のクリッピングによる刺激, 強制水浸などがある. また, ハンドル操作による刺激回避装置を用い, 心理的ストレスを与える方法などがある¹⁾. ストレス反応の指標としては, 糞, 尿の量, 鳴き声の回数, 胃潰瘍の発生数, 血中コルチコステロン量^{2,3)}, β -エンドルフィン量⁴⁾, 神経伝達物質である脳内モノアミン量などがある. 最近では, 高速液体クロマトグラフィーによる脳内モノアミン定量法が広く用いられるようになった. また脳組織のホモジネート試料のみならず, マイクロダイアリース法を用い, 直接生きたままの動物より脳内かん流液を引き出し, 脳内アミン類を測定する方法も採用されてきている⁵⁾. 刺激法も1日1回のみの急性曝露,

間隔において繰り返し曝露させるもの⁶⁾, 毎日1回時刻を決め, 1週間から数週間継続して亜急性曝露させる^{7,8)}などの報告がある.

一方, ストレス反応は用いる動物の生体条件によって影響されることが知られているが, この観点に立った研究は少ない. 著者は, 今回生体側諸条件のうち, とくに加齢, 絶食およびアルコール負荷の3条件を選び, ストレス反応への影響を検索した. 実験動物としてはラットを用い, ストレスとして, 2時間の全身拘束刺激を与えた. ストレス反応の観察は, 拘束終了後解放2時間までの脳内セロトニンを中心としたモノアミン量の経時変化を, 高速液体クロマトグラフィー法を用いておこなった. ストレスとして拘束刺激を用いた理由は, 従来の研究で本刺激法を採用したものが多く, これらの成績との比較が可能のためである.

脳内アミンの観測と合わせて, 血清トリプトファンの動態を知るため, 血清総トリプトファン, 遊離トリプトファンおよび

Abbreviations: EDTA, ethylene diamine tetraacetic acid; 5-HIAA, 5-hydroxyindoleacetic acid; 5-HT, 5-hydroxytryptamine; NEFA, non esterified fatty acid.

血清遊離脂肪酸の測定を行った。これらの成績を報告する。

材料および方法

I. 試薬類

L-tryptophan (ナカライテスク, 京都), 5-hydroxytryptamine (和光純薬, 大阪), 5-ハイドロキシインドール酢酸 (5-hydroxyindoleacetic acid, 5-HIAA) (シグマ社, セントルイス, 米国) を用いた。その他の試薬は特級ないし高速液体クロマトグラフィー用を用いた。

II. 実験材料

ウィスター系雄性ラット (生後2ヶ月, 体重 256.2 ± 15.1 g, 75匹および生後1年, 体重 619.9 ± 78.2 g, 75匹) を日本エスエルシー(株) (浜松) より購入した。これを1ホームケージにつき2匹または3匹に分け, 午前8時30分から午後8時30分の点灯・明暗サイクルにて飼育した。飼料 (MF, オリエンタル酵母, 東京) および飲水を自由に摂取させた。

III. 動物の前処置

1. 自由摂食群

生後2ヶ月ラットおよび生後1年ラットそれぞれ25匹を1週間自由摂食させ, 拘束実験前日午後8時より絶食させた。

2. 絶食群

1と同様に各年齢群25匹ずつを, 拘束開始前48時間より絶食させた。

3. アルコール摂取群

1と同様に25匹ずつを, 拘束前28日より飲水をエチルアルコール10%水溶液に代えた。拘束実験は1と同様に前日午後8時より絶食させて行った。

IV. 拘束曝露

拘束はラットを仰臥位にて四肢をガーゼ製の紐でしばり, 腹部を5cm幅の布バンドで胸部を圧迫しすぎないように注意し, 木枠に固定して, 最高2時間まで与えた。前記の自由摂食群, 絶食群およびアルコール摂取群を, 更に各5匹ずつの5小グループに分け, 無拘束対照群, 拘束1時間, 拘束2時間, 拘束より開放後1時間および開放後2時間群とした。拘束はすべて午前8時30分より9時30分までの間に開始した。

V. 生体試料の調整

観察終了後断頭し, 脳解剖は Glowinski ら⁹⁾の方法に準じておこなった。すなわち, 摘出した全脳を直ちに氷上においたガラス板上にて, 大脳皮質, 線条体, 海馬, 中脳, 視床下部, 橋・延髄の6部位に分け, 脳内モノアミン測定まで -80°C にて凍結保存した。また断頭時に流出した血液を採取した。

VI. 脳内トリプトファン, セロトニンおよび5-HIAAの測定 Tanii らの方法¹⁰⁾に準じて, 凍結保存組織に1mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 添加2%過塩素酸溶液を加え, 5倍または10倍に加水希釈し, 超音波破砕機 (モデル UR-20P, トミー製, 東京) にてホモジェナイズした。4 $^{\circ}\text{C}$, 11,000rpmにて20分間遠心し, その上清を孔径0.45 μm のフィルター (ミリポア社, 東京) に通した溶液20 μl を高速液体クロマトグラフィー (CCPD, トーソー, 東京) に注入し, 電器化学検出器 (EC-8010, トーソー) にて溶出液中のトリプトファン, セロトニン, 5-HIAAを測定した。使用カラムは ODS-80TM, 150mm \times 4.6mm (トーソー) で, カラム温度30 $^{\circ}\text{C}$, 参照電圧800mV, 流速1.0ml/minとした。移動相は7.5%アセトニトリル溶液に, 50mM クエン酸ナトリウム, 75mM 過塩素酸ナトリ

ウム, 0.64mM EDTA, 180mg/l 1-オクタンスルホン酸を添加し, pH4.3に調整した溶液を用いた。

VII. 血清トリプトファン測定

1. 血清総トリプトファン

Rocchi らの方法¹¹⁾に準じた。採取した血液を約1時間室温で放置した後, 3,000rpm, 5分間遠心して血清を分離した。得られた血清500 μl に10%トリクロロ酢酸溶液100 μl を添加し, 混和した後, 11,000rpm, 5分間遠心にて得た上清を0.45 μm フィルターに通し, 前記高速液体クロマトグラフィーにて測定した。

2. 血清遊離トリプトファン

血清200 μl に Tagliamonte ら¹²⁾, Hernández ら¹³⁾の方法に準じて pH7.4, 40mM 磷酸緩衝液200 μl を加え, フィルター付チューブ (ウルトラフリー, ミリポア社) を用い, 3,000 \times g, 20分間の遠心で得た上清をミリポアフィルターでろ過し前記高速液体クロマトグラフィーにて測定した。

VIII. 血清 NEFA 測定

VI. 1と同様にして得た血清50 μl を NEFA C-テストワーク (和光純薬) を用い, 酵素法にて測定した。分光光度計は UV-120-02 (島津, 京都), 波長550nmを使用した。

IX. 統計学的処理

得られた成績はすべて平均値 \pm 標準偏差であらわした。多群間の平均値の差の検定は一元配置, または二元配置分散分析を用い, 多重比較は Scheffé 法によった。有意水準は5%とした。

成 績

I. 脳内トリプトファンの変化

表1にラットの年齢, 食餌およびアルコール摂取の条件下における拘束の, 脳内6部位でのトリプトファン量に及ぼす影響をまとめて示す。生後2ヶ月ラット摂食群において無拘束対照群との有意差が認められたのは, 拘束2時間後における視床下部のみであり, その他5部位では変化がなかった。生後2ヶ月ラット絶食群では測定した全部位に拘束中または解放後1時間で有意上昇が認められた。生後2ヶ月アルコール摂取群で無拘束対照群に比して有意上昇が認められたのは, 中脳・拘束2時間のみであり, その他では変化がなかった。生後1年ラットでは摂食群, 絶食群, アルコール摂取群のいずれにも, 全部位に拘束中, または解放後1時間に有意上昇が認められた。2ヶ月ラットの摂食群と絶食群の差は, 大脳皮質, 線条体, 海馬, 橋・延髄で認められたが, 摂食群とアルコール摂取群との間の差は認められなかった。1年ラットの摂食群と絶食群の差は中脳以外の5部位で認められたが, 摂食群とアルコール摂取群においては認められなかった。摂食群の2ヶ月と1年ラットでの差は大脳皮質の拘束前にだけ認められた。絶食群の2ヶ月と1年ラットでの差は大脳皮質, 海馬において, 拘束1時間または解放後1時間に認められた。アルコール摂取群の2ヶ月と1年ラットの差は認められなかった。

II. 脳内セロトニンの変化

表2に脳内セロトニンの変化をまとめて示す。脳内セロトニンの拘束による変化は軽微であり, 拘束前との有意差が認められた唯一の変化は1年ラット絶食群の拘束1時間の橋・延髄においてであった。2ヶ月ラットの摂食群と絶食群, 摂食群とアルコール摂取群に差は認められなかった。1年ラット摂食群と

Table 1. Changes in brain tryptophan

Conditions	Tryptophan content (ng/mg tissue)				
	No restraint	Restraining		Unfastening after 2hr restraint	
		1hr	2hr	1hr	2hr
<i>Cerebral Cortex</i>					
2M feeding	4.20±0.90	5.12±0.22	5.57±0.19	4.60±0.31	3.75±0.74
2M fasting	4.48±0.59	7.55±1.66 ^{ab}	7.90±1.77 ^{ab}	6.72±0.93 ^{ab}	5.02±1.01
2M drinking	4.84±0.73	5.91±1.18	6.44±0.75	4.73±1.32	3.87±0.47
1Y feeding	3.29±0.56 ^c	4.89±0.48 ^a	5.54±1.05 ^a	4.52±0.61	3.64±0.65
1Y fasting	4.17±0.64	5.85±0.67 ^{ac}	7.18±1.48 ^{ab}	5.29±0.78	4.25±0.39
1Y drinking	4.00±0.66	5.10±1.23	7.39±0.89 ^a	5.18±0.64	4.12±0.68
<i>Striatum</i>					
2M feeding	4.38±0.94	5.03±0.56	5.74±1.07	4.76±0.66	4.31±0.68
2M fasting	4.64±0.45	7.43±2.07 ^{ab}	7.41±1.55 ^{ab}	6.17±0.69 ^a	4.40±1.03
2M drinking	5.07±1.28	5.40±0.99	6.16±1.15	5.18±1.59	3.95±0.88
1Y feeding	3.52±0.45	4.91±0.56	5.69±0.53 ^a	5.11±1.59	3.98±0.74
1Y fasting	4.76±0.64	6.53±0.46 ^b	8.09±1.65 ^{ab}	6.05±1.02	5.03±0.18
1Y drinking	4.01±0.85	5.61±1.59	6.73±1.20 ^a	5.28±0.86	4.43±1.35
<i>Hippocampus</i>					
2M feeding	4.35±0.73	4.92±0.26	5.62±0.30	4.61±0.64	3.91±0.49
2M fasting	4.21±0.98	6.93±1.39 ^{ab}	7.23±1.05 ^{ab}	6.52±0.66 ^{ab}	4.58±1.07
2M drinking	4.50±1.00	5.24±0.79	5.89±1.12	5.06±1.46	3.76±0.80
1Y feeding	3.10±0.38	4.36±0.29	5.28±0.76 ^a	4.46±1.57	3.53±0.67
1Y fasting	4.12±0.65	5.46±0.61 ^c	6.97±1.54 ^{ab}	4.82±0.80 ^c	4.01±0.51
1Y drinking	3.71±0.67	4.93±1.01	6.20±0.86 ^a	4.69±0.74	4.11±1.18
<i>Midbrain</i>					
2M feeding	3.97±0.61	4.61±0.49	5.08±0.81	4.30±0.68	3.70±0.36
2M fasting	3.68±0.35	5.83±0.89 ^a	6.21±0.80 ^a	5.60±0.96	3.80±1.10
2M drinking	4.46±0.32	5.68±0.90	5.88±0.30 ^a	4.69±0.98	3.68±0.32
1Y feeding	3.06±0.38	4.43±0.41	5.04±0.83	6.17±3.88 ^a	3.44±0.72
1Y fasting	4.34±0.78	5.75±1.08	6.83±1.18 ^a	5.15±0.90	4.03±0.47
1Y drinking	3.52±0.35	5.24±0.87 ^a	5.68±0.57 ^a	4.21±0.62	3.64±0.41
<i>Hypothalamus</i>					
2M feeding	4.22±0.76	5.05±1.18	6.16±1.17 ^a	4.94±0.91	4.48±0.75
2M fasting	4.54±1.14	6.67±0.94 ^a	6.54±1.39 ^a	6.12±0.83	4.68±0.43
2M drinking	5.29±0.46	5.89±1.13	6.32±0.92	5.01±0.81	4.07±0.35
1Y feeding	4.09±0.59	5.52±0.53	6.35±1.09 ^a	5.73±1.58	4.23±0.88
1Y fasting	5.61±0.88	7.16±1.16	8.55±1.80 ^{ab}	6.46±1.19	5.43±0.37
1Y drinking	4.15±0.49	5.71±0.54 ^a	6.76±0.98 ^a	5.13±0.56	4.57±0.66
<i>Pons-medulla oblongata</i>					
2M feeding	4.11±0.49	4.13±0.42	4.91±0.61	4.29±0.57	3.72±0.67
2M fasting	4.11±0.66	5.86±1.10 ^{ab}	5.79±1.15 ^a	5.09±1.30	4.52±0.23
2M drinking	4.38±1.02	4.96±0.45	4.96±1.01	4.67±0.87	3.87±0.14
1Y feeding	3.30±0.23	4.33±0.33	4.93±0.69 ^a	4.46±0.85	3.42±0.43
1Y fasting	4.03±0.45	5.67±0.54 ^{ab}	6.46±1.09 ^{ab}	4.98±0.85	3.81±0.20
1Y drinking	4.01±0.23	5.11±0.40	5.29±1.01 ^a	4.46±0.54	3.93±0.39

Each value represents the mean±SD (ng/mg tissue) of 5 animals per group. a, significant differences between mean values of the prestress and experimental groups; b, significant differences between the feeding and fasting, or feeding and giving alcohol in the same age; c, significant differences between the 2-month and the 1-year on the same feeding, fasting, giving alcohol. Differences were evaluated by one- or two-way analysis of variance followed by Scheffé multiple comparisons. $p < 0.05$.

Table 2. Changes in brain serotonin

Conditions	Serotonin content (ng/mg tissue)				
	No restraint	Restrained		Unfastening after 2hr restraint	
		1hr	2hr	1hr	2hr
<i>Cerebral Cortex</i>					
2M feeding	0.27±0.08	0.29±0.07	0.28±0.06	0.25±0.08	0.26±0.06
2M fasting	0.27±0.09	0.29±0.08	0.27±0.13	0.29±0.10	0.26±0.09
2M drinking	0.29±0.04	0.29±0.04	0.27±0.04	0.25±0.02	0.25±0.07
1Y feeding	0.25±0.04	0.29±0.05	0.27±0.06	0.29±0.03	0.25±0.07
1Y fasting	0.21±0.04	0.26±0.06	0.28±0.06	0.25±0.05	0.24±0.26
1Y drinking	0.32±0.09	0.33±0.08	0.33±0.10	0.34±0.10	0.33±0.09
<i>Striatum</i>					
2M feeding	0.47±0.10	0.52±0.11	0.51±0.07	0.45±0.09	0.45±0.13
2M fasting	0.45±0.07	0.47±0.15	0.49±0.12	0.53±0.14	0.45±0.14
2M drinking	0.43±0.06	0.42±0.08	0.39±0.10	0.34±0.05	0.37±0.07
1Y feeding	0.40±0.06	0.42±0.06	0.37±0.08 ^c	0.39±0.20	0.33±0.09
1Y fasting	0.38±0.09	0.38±0.13	0.39±0.05	0.39±0.05 ^c	0.37±0.04
1Y drinking	0.48±0.09	0.57±0.07	0.51±0.12	0.52±0.10	0.53±0.07
<i>Hippocampus</i>					
2M feeding	0.24±0.08	0.29±0.04	0.29±0.04	0.24±0.05	0.24±0.04
2M fasting	0.22±0.07	0.23±0.06	0.26±0.08	0.20±0.04	0.20±0.07
2M drinking	0.19±0.05	0.21±0.03	0.18±0.02	0.19±0.04	0.17±0.03
1Y feeding	0.22±0.06	0.32±0.07	0.29±0.06	0.26±0.11	0.23±0.11
1Y fasting	0.15±0.05	0.22±0.06 ^b	0.24±0.09	0.21±0.06	0.20±0.09
1Y drinking	0.20±0.05	0.22±0.04	0.21±0.04	0.20±0.07	0.22±0.05
<i>Midbrain</i>					
2M feeding	0.78±0.22	0.89±0.24	0.87±0.26	0.69±0.17	0.63±0.11
2M fasting	0.67±0.10	0.69±0.10	0.79±0.17	0.80±0.26	0.67±0.13
2M drinking	0.61±0.17	0.67±0.13	0.58±0.15	0.58±0.13	0.53±0.13
1Y feeding	0.53±0.09 ^c	0.67±0.12	0.61±0.10 ^c	0.56±0.22	0.61±0.12
1Y fasting	0.48±0.09 ^c	0.62±0.18	0.62±0.14	0.58±0.15 ^c	0.58±0.05
1Y drinking	0.65±0.16	0.80±0.23	0.69±0.13	0.76±0.18	0.70±0.08
<i>Hypothalamus</i>					
2M feeding	0.44±0.17	0.52±0.13	0.55±0.16	0.45±0.18	0.41±0.12
2M fasting	0.46±0.13	0.46±0.14	0.53±0.18	0.43±0.14	0.36±0.20
2M drinking	0.35±0.07	0.40±0.15	0.38±0.08	0.37±0.16	0.37±0.09
1Y feeding	0.49±0.20	0.64±0.18	0.58±0.19	0.55±0.21	0.52±0.19
1Y fasting	0.34±0.11	0.59±0.26	0.52±0.17	0.50±0.16	0.50±0.15
1Y drinking	0.43±0.21	0.44±0.15	0.49±0.10	0.47±0.20	0.44±0.13
<i>Pons-medulla oblongata</i>					
2M feeding	0.48±0.05	0.54±0.09	0.55±0.03	0.52±0.07	0.47±0.07
2M fasting	0.50±0.06	0.54±0.08	0.57±0.10	0.53±0.05	0.50±0.07
2M drinking	0.40±0.11	0.48±0.06	0.45±0.06	0.43±0.05	0.41±0.05
1Y feeding	0.41±0.07	0.49±0.05	0.48±0.05	0.48±0.11	0.46±0.06
1Y fasting	0.36±0.06 ^c	0.50±0.09 ^a	0.47±0.04 ^c	0.44±0.05 ^c	0.45±0.04
1Y drinking	0.42±0.08	0.39±0.06	0.48±0.04	0.46±0.04	0.44±0.06

Each value represents the mean±SD (ng/mg tissue) of 5 animals per group. a, significant differences between mean values of the prestress and experimental groups; b, significant differences between the feeding and fasting, or feeding and giving alcohol in the same age; c, significant differences between the 2-month and the 1-year on the same feeding, fasting, giving alcohol. Differences were evaluated by one- or two-way analysis of variance followed by Scheffé multiple comparisons. $p < 0.05$.

Table 3. Changes in brain 5-HIAA

Conditions	5-HIAA content(ng/mg tissue)				
	No restraint	Restrstraint		Unfastening after 2hr restraint	
		1hr	2hr	1hr	2hr
<i>Cerebral Cortex</i>					
2M feeding	0.30±0.03	0.38±0.04	0.42±0.05 ^a	0.37±0.05	0.35±0.04
2M fasting	0.33±0.02	0.50±0.04 ^{ab}	0.53±0.12 ^{ab}	0.63±0.11 ^{ab}	0.45±0.02 ^b
2M drinking	0.38±0.02	0.41±0.06	0.48±0.07	0.47±0.08	0.38±0.04
1Y feeding	0.33±0.10	0.34±0.10	0.44±0.15	0.45±0.13	0.39±0.11
1Y fasting	0.37±0.12	0.41±0.12	0.49±0.10	0.45±0.11 ^c	0.43±0.11
1Y drinking	0.42±0.07	0.51±0.07	0.68±0.08 ^a	0.74±0.10 ^{ab}	0.73±0.14 ^{ab,c}
<i>Striatum</i>					
2M feeding	0.49±0.04	0.52±0.05	0.67±0.13 ^a	0.54±0.07	0.51±0.10
2M fasting	0.41±0.08	0.58±0.08 ^a	0.60±0.10 ^a	0.77±0.14 ^{ab}	0.59±0.11 ^a
2M drinking	0.48±0.09	0.48±0.04	0.57±0.07	0.51±0.10	0.44±0.07
1Y feeding	0.46±0.04	0.53±0.11	0.65±0.09 ^a	0.69±0.21 ^{ac}	0.59±0.08
1Y fasting	0.57±0.12 ^c	0.60±0.10	0.72±0.15	0.72±0.12	0.83±0.11 ^{ab,c}
1Y drinking	0.48±0.04	0.62±0.11	0.68±0.08	0.74±0.10 ^a	0.73±0.14 ^{ac}
<i>Hippocampus</i>					
2M feeding	0.57±0.14	0.55±0.09	0.67±0.16	0.59±0.12	0.59±0.10
2M fasting	0.51±0.12	0.74±0.14	0.72±0.17	0.96±0.14 ^{ab}	0.72±0.26
2M drinking	0.60±0.14	0.66±0.17	0.69±0.17	0.74±0.17	0.62±0.15
1Y feeding	0.47±0.13	0.49±0.07	0.59±0.08	0.61±0.08	0.58±0.13
1Y fasting	0.67±0.11 ^b	0.58±0.07	0.73±0.17	0.65±0.14	0.70±0.19
1Y drinking	0.55±0.11	0.61±0.08	0.75±0.24	0.74±0.15	0.68±0.19
<i>Midbrain</i>					
2M feeding	0.90±0.15	0.96±0.14	0.13±0.20	0.95±0.16	0.94±0.17
2M fasting	0.88±0.30	1.16±0.24	1.15±0.23	1.54±0.35 ^{ab}	1.04±0.22
2M drinking	1.00±0.25	1.00±0.15	1.08±0.06	1.02±0.15	0.99±0.12
1Y feeding	0.71±0.07	0.69±0.07	0.80±0.06 ^c	1.02±0.25	0.78±0.07
1Y fasting	0.91±0.17	0.84±0.16 ^c	1.02±0.20	1.03±0.16 ^c	1.05±0.13
1Y drinking	0.86±0.20	1.10±0.30	1.24±0.39	1.22±0.18	1.09±0.19
<i>Hypothalamus</i>					
2M feeding	0.80±0.21	0.80±0.24	1.08±0.26	0.85±0.18	1.02±0.10
2M fasting	0.91±0.29	1.15±0.23	1.10±0.21	1.47±0.24 ^{ab}	1.16±0.33
2M drinking	1.01±0.22	1.01±0.15	1.15±0.16	1.14±0.17	0.97±0.21
1Y feeding	0.88±0.22	0.80±0.21	0.94±0.05	1.05±0.30	0.95±0.14
1Y fasting	1.20±0.21	1.03±0.07	1.21±0.25	1.22±0.25	1.34±0.21
1Y drinking	0.98±0.16	1.22±0.21	1.26±0.29	1.22±0.18	1.19±0.21
<i>Pons-medulla oblongata</i>					
2M feeding	0.73±0.14	0.81±0.18	0.93±0.17	0.87±0.14	0.79±0.12
2M fasting	0.82±0.08	1.07±0.12 ^{ab}	1.17±0.09 ^{ab}	1.36±0.18 ^{ab}	0.99±0.17
2M drinking	0.79±0.22	0.94±0.17	1.08±0.10	0.98±0.08	0.89±0.15
1Y feeding	0.45±0.09 ^c	0.51±0.06 ^c	0.66±0.09 ^{ac}	0.75±0.14 ^a	0.65±0.05 ^a
1Y fasting	0.60±0.08 ^{bc}	0.75±0.12 ^{bc}	0.79±0.14 ^c	0.83±0.13 ^{ac}	0.79±0.10
1Y drinking	0.72±0.11	0.80±0.18 ^b	0.96±0.13	1.03±0.14 ^a	1.01±0.16

Each value represents the mean±SD (ng/mg tissue) of 5 animals per group. a, significant differences between mean values of the prestress and experimental groups; b, significant differences between the feeding and fasting, or feeding and giving alcohol in the same age; c, significant differences between the 2-month and the 1-year on the same feeding, fasting, giving alcohol. Differences were evaluated by one- or two-way analysis of variance followed by Scheffé multiple comparisons. p<0.05.

絶食群の差は海馬, 拘束1時間にのみ認められ, 摂食群とアルコール摂取群では認められなかった. 2ヵ月と1年ラットの差は摂食群では線条体の拘束2時間, 中脳の拘束前と拘束2時間で認められ, 絶食群では線条体の解放後1時間, 中脳拘束前, 解放後1時間, 橋・延髄の拘束前, 拘束2時間, 解放後1時間で認められたが, アルコール摂取群では認められなかった.

Ⅲ. 脳内 5-HIAA の変化

表3に脳内5-HIAAの変化を示す. 生後2ヵ月ラット摂食群で非拘束対照群に比べて有意な変化が認められたのは大脳皮質と線条体であり, その他の部位では認められなかった. それに対し, 生後2ヵ月ラット絶食群ではトリプトファンと同様, 全部位で有意差が認められた. 生後2ヵ月アルコール摂取群では全部位で拘束による変化は認められなかった. 生後1年ラットでは摂食群, 絶食群, 両群とも有意差が認められたのは線条体と橋・延髄であり, アルコール摂取群では前記2部位と大脳皮質でも有意上昇が認められた. 2ヵ月ラットの摂食群と絶食群では, 全部位にて解放後1時間を中心に絶食群の有意上昇が認められた. 摂食群とアルコール摂取群で有意差は認められなかった.

1年ラットの摂食群と絶食群では線条体, 海馬, 橋・延髄の3部位で絶食群の有意上昇が認められ, 摂食群とアルコール群では大脳皮質, 橋・延髄でアルコール群の有意上昇が認められた. 2ヵ月と1年ラットでは, 摂食群間では線条体, 中脳, 橋・延髄に有意差が認められるが, 線条体では1年ラットの有意上昇が認められたのに対し, 中脳, 橋・延髄においては有意低下が認められた. 絶食群間においても摂食群と同様, 線条体では1年ラットの有意上昇, 中脳, 橋・延髄での有意低下が認められた. アルコール摂取群間では大脳皮質, 線条体で1年

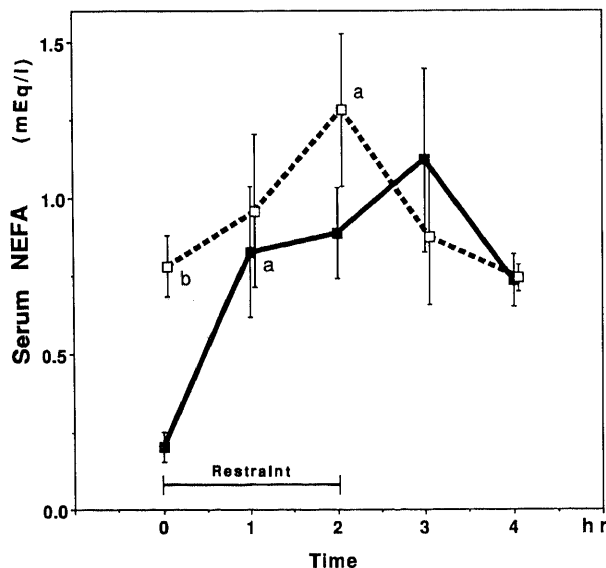


Fig. 1. Changes in serum NEFA. Each value represents the mean \pm SD (mEq/l serum) of 5 animals per group. a, significant differences between mean values of the prestress and experimental groups; b, significant differences between the feeding and fasting in the 1-year. Differences were evaluated by one- or two-way analysis of variance followed by Scheffé multiple comparisons. $p < 0.05$.

■, 1-year feeding; □, 1-year fasting.

ラットの有意上昇が認められた.

Ⅳ. 血清 NEFA の変化

図1に生後1年ラット摂食群と絶食群の拘束に伴う血清NEFA量の変化を示す. 摂食群では拘束により急増し, 解放後1時間で減少しはじめたが, 2時間後なお拘束前値にはもどらなかった. 絶食群では拘束前から摂食群に比較しNEFA値は高かった. 拘束中は有意の上昇を示し, 解放後2時間で拘束前値にもどった.

Ⅴ. 血清総トリプトファンの変化

図2に拘束に伴う血清総トリプトファン量の変化を示す. 2ヵ月ラットについて摂食群で解放後1時間, 絶食群で拘束1時間から解放後2時間まで継続して, またアルコール摂取群で解放後1時間, 2時間でそれぞれ拘束前値にくらべて有意な低下が認められた. 1年ラットについて摂食群では有意差を認めなかったが, 絶食群で拘束1時間から継続して解放後2時間まで, アルコール摂取群で解放後1時間にそれぞれ有意低下が認められた. 2ヵ月ラットの摂食群と絶食群の差は拘束1時間, 解放後1時間, 2時間で認められ, 摂食群とアルコール群の差は解放後1時間, 2時間で認められた. 1年ラットの摂食群と絶食群の差は解放後2時間で認められ, 摂食群とアルコール群では無拘束時にアルコール群で有意上昇が認められた. 2ヵ月ラットと1ヵ月ラットの差は摂食群間, アルコール摂取群間では認められなかったが, 絶食群間では無拘束, 解放後1時間, 2時間において1年ラットの有意低下が認められた.

Ⅵ. 血清遊離トリプトファンの変化

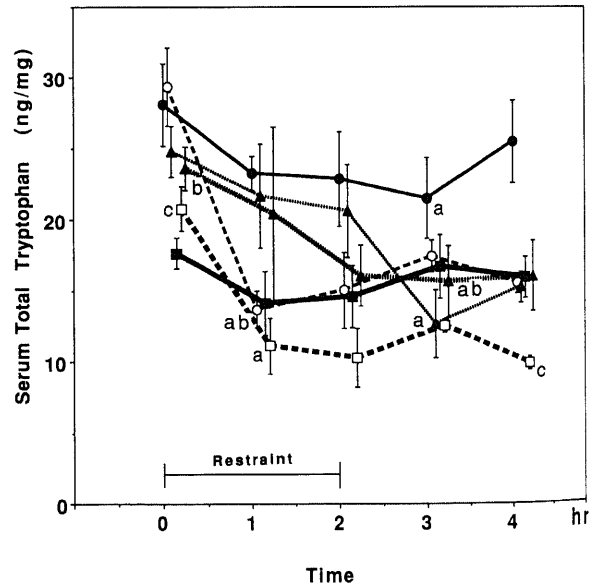


Fig. 2. Changes in serum total tryptophan. Each value represents the mean \pm SD (ng/mg serum) of 5 animals per group. a, significant differences between mean values of the prestress and experimental groups; b, significant differences between the feeding and fasting, or feeding and giving alcohol in the same age; c, significant differences between the 2-month and the 1-year on the same feeding, fasting, giving alcohol. Differences were evaluated by one- or two-way analysis of variance followed by Scheffé multiple comparisons. $p < 0.05$.

●, 2-month feeding; ○, 2-month fasting; ---▲---, 2-month giving alcohol; ■, 1-year feeding; □, 1-year fasting; ---▲---, 1-year giving alcohol.

図3に拘束に伴う血清遊離トリプトファン量の変化を示す。2ヵ月ラットでは、摂食群で拘束前との有意差が認められなかったが、絶食群、アルコール摂取群間で解放後1時間、2時間に有意低下が認められた。1年ラットでは摂食群で拘束1時間、2時間、解放後1時間で拘束直前より有意上昇、アルコール摂取群拘束2時間、解放後1時間でも有意上昇が認められた。絶食群では拘束前値との差は認められなかったが、拘束2時間に比し、解放後2時間では有意低下が認められた。2ヵ月ラットの摂食群と絶食群の差は認められず、摂食群とアルコール群の差は解放後1時間にアルコール摂取群の有意低下が認められた。1年ラットの摂食群と絶食群では、無拘束で絶食群の有意上昇が認められたが解放後1時間では有意低下が認められた。摂食群とアルコール摂取群の差は認められなかった。2ヵ月ラットと1年ラットでは、摂食群間では無拘束で1年ラットの有意低下が認められ、アルコール摂取群間では拘束2時間、解放後1時間に1年ラットの有意上昇が認められた。

考 察

各種のストレスに対するストレス反応の指標として、神経伝達物質ノルエピネフリン、ドーパミン、セロトニンを中心とした脳内モノアミンの動態を調べた研究は数多く、これらからそれぞれノルエピネフリン作動性ニューロン、ドーパミン作動性ニューロン、およびセロトニン作動性ニューロンの活動性が評価されている。Tanakaら¹⁴⁾はラットの全身拘束により全脳でノルエピネフリンが減少し、その代謝産物である3-メト

キシ-4-ハイドロキシフェニルエチレンジグリコール硫酸が増加することを報告している。ドーパミンに関しては、刺激の種類により、有意な変化がないとする報告¹⁶⁾や、逆に増加するという報告¹⁷⁾があるが、代謝産物である3, 4-ジハイドロキシフェニル酢酸が増加するという報告¹⁸⁾もある。セロトニンに関してもドーパミン同様有意な変化なし²⁰⁾、増加する²¹⁾、逆に減少する²²⁾などという報告もある。しかし、代謝産物である5-HIAAはほとんどの研究で増加すると報告されていることから、ストレスがセロトニン作動性ニューロンの活動性亢進をひきおこすことは一般に認められている²¹⁾⁻²²⁾。最近では、限られた部位ではあるが脳内にプローブを埋め込み、マイクロダイアリース法により直接脳内のかん流液を採取し、これらの部位でのドーパミン、セロトニン放出量の増加を見た報告がある⁵⁾。

脳組織のセロトニン測定では De Souza ら⁶⁾は拘束により増加、Dunn²³⁾は電撃により大脳皮質、視床下部で減少、Rothら¹⁸⁾は振動により有意な変化なしと、刺激の種類や曝露法によっても異なる結果が得られている。これは、刺激により放出されるセロトニン量、供給されるトリプトファン量、およびこれらの代謝速度などがストレスの条件によって異なるためと考えられている²⁴⁾。このため、脳組織における神経伝達物質の動態を評価する場合には、セロトニンだけではなく、その前駆物質および代謝生成物の動態を正確に把握することが必要となる²⁵⁾。今回著者は、セロトニンの前駆物質である脳内トリプトファン、セロトニン、その代謝物である5-HIAAに加えて、血清トリプトファン(総トリプトファン、遊離トリプトファン)および血清 NEFA の測定をおこなった。

脳内セロトニンは、食物から摂取された血中トリプトファンが血液-脳関門を通過し、脳神経細胞内で5-ハイドロキトリプトファンを経て生合成され、シナプス小胞内に貯蔵される。セロトニンはその後シナプス間隙に放出された後、主にモノアミンオキシダーゼの作用で5-HIAAに変換され、脳内より血液に移行し、大部分は尿中に排泄される²⁶⁾。血中トリプトファンにはアルブミン結合トリプトファンと遊離トリプトファンの2つが存在する²⁵⁾。その総和である血清総トリプトファン濃度と他のアミノ酸との比が脳内トリプトファン量に影響を与えるとする説²⁶⁾²⁷⁾と、脳内トリプトファンは血清遊離トリプトファン量に大きく依存するという説²⁸⁾²⁹⁾がある。今回の成績からは血清遊離トリプトファン量が脳内トリプトファン量と関連していることが示唆された。

摂食と脳内セロトニン生合成についても種々の論議がある。Wurtman³⁰⁾は高トリプトファンまたは高炭水化物食を摂取すると、脳内セロトニン量とその放出が増加することを示した。また、逆に高タンパク食を摂取すると、血中トリプトファン濃度は上昇するが、逆に脳内トリプトファン濃度が低下し、セロトニン脳内濃度も減少すると述べている。また、Gessaら³¹⁾は、トリプトファンを除いたアミノ酸混合物摂取により、血清遊離トリプトファン、脳内トリプトファン、5-HIAAの減少を報告している。血清遊離トリプトファン量に影響を与えるものの1つに血清 NEFA がある。動物を絶食させると血清 NEFAが増加し、この NEFA にアルブミン結合トリプトファンを遊離トリプトファンに変換させる作用がある²⁸⁾ため、血清遊離トリプトファンが増加すると考えられている。筆者の成績からも、拘束によってもこの血清 NEFA の増加がみられ、これが拘束に

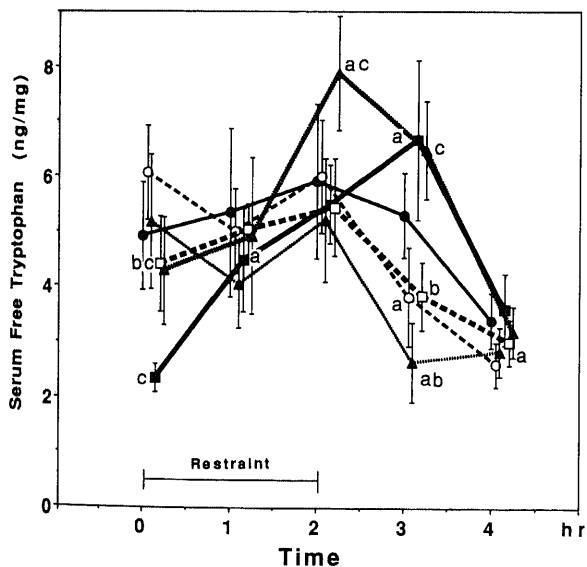


Fig. 3. Changes in serum free tryptophan. Each value represents the mean±SD (ng/mg serum) of 5 animals per group. a, significant differences between mean values of the prestress and experimental groups; b, significant differences between the feeding and fasting, or feeding and giving alcohol in the same age; c, significant differences between the 2-month and the 1-year on the same feeding, fasting, giving alcohol. Differences were evaluated by one- or two-way analysis of variance followed by Scheffé multiple comparisons. $p < 0.05$.
 ●, 2-month feeding; ○, 2-month fasting; ▲, 2-month giving alcohol; ■, 1-year feeding; □, 1-year fasting; ◆, 1-year giving alcohol.

よる血清遊離トリプトファンの増加の大きな要因と考えられた。次いで血清中のトリプトファンの動態を考察する。生後2ヵ月ラット摂食群では拘束によっても血清遊離トリプトファン量は変化がなく、脳内セロトニンの生合成亢進に十分対応したことを示した。生後2ヵ月ラット絶食群では拘束時に血清総トリプトファンが減少したにも拘らず血清遊離トリプトファン量は拘束解放後に減少した。これは絶食により血清遊離トリプトファンの供給量が不足したためと考えられた。生後2ヵ月ラットのアルコール摂取下でも絶食後に拘束解放後血清遊離トリプトファンの減少があった。生後1年ラット摂食群は2ヵ月と同様に十分供給が可能で、生後1年ラット絶食群では、2ヵ月ラット絶食群同様に血清総トリプトファンが減少したにも拘らず、解放後血清遊離トリプトファン量は減少した。しかし、この減少は2ヵ月ラットに比較して、軽度であった。生後1年ラットアルコール群では血清遊離トリプトファン量の減少はみられなかった。

セロトニン生合成および代謝に関しては、生後2ヵ月ラット摂食群では軽度の亢進、絶食群では高度の合成亢進があり、アルコール摂食群では生合成亢進はごく軽度で、代謝亢進も認められなかった。生後1年ラットでは、摂食群で中等度の合成亢進、絶食群で高度亢進、アルコール摂取群で中等度亢進が認められた。ストレスがセロトニンニューロンにおいてセロトニン代謝を亢進させるという報告は、拘束では De Souza ら⁹⁾、電撃では Dunn²⁰⁾、水浸では Ikeda ら³⁰⁾をはじめ数多い。Kennett ら²⁰⁾は拘束中に脳内トリプトファン増加が認められ、脳内でのセロトニン合成の亢進が認められたと報告している。Dunn²⁰⁾も電撃により血中トリプトファンと大脳皮質、視床下部、脳幹のトリプトファン量増加によりセロトニン代謝も影響を受けているとしている。本研究においても拘束により種々の脳部位で脳内トリプトファン増加が認められた。しかし、今回無拘束、無刺激下では、Knott ら³⁰⁾、Tagliamonte ら¹²⁾が24時間絶食後で認めた様なトリプトファンの増加は、48時間絶食において認められなかった。これは Knott ら、Tagliamonte らは24時間、筆者は48時間という絶食時間の違いだけではなく、摂食条件の差異にもよると考えられる。すなわち筆者は個体の摂食時間の差を極力避けるため摂食群も実験前12~13時間絶食したのに対し、Knott らは実験前3時間のみ絶食、Tagliamonte らは直前まで摂食させている。本研究では無拘束時に生後2ヵ月ラットでは摂食群に比べて絶食群で血清遊離トリプトファンの増加傾向が認められたが、脳内トリプトファンには変化がなかった。一方、生後1年ラットでは血清遊離トリプトファンは絶食群で有意増加を示した。このことより動物を絶食させると、まず脳内トリプトファンが増加し、ついで血清遊離トリプトファンが増加するのではないかと考えられる。また、これはセロトニン生合成の律速段階が、トリプトファンから5-ハイドロキシトリプトファンへの水酸化反応であり、トリプトファン濃度が十分でない時、酵素活性ではなくトリプトファン濃度自体が律速段階となることと関連している³⁴⁾³⁵⁾。

拘束によってセロトニンニューロンの活動が亢進することはすでに述べたが、絶食状態ではこの亢進がさらに顕著となる。すなわち、2ヵ月ラットでは摂食群でセロトニンの生合成軽度亢進、代謝の亢進、すなわち5-HIAAの増加が脳内2部位のみであったが、絶食群では生合成の高度亢進、代謝亢進が全部で認められた。生後1年ラットでは摂食群と絶食群を比較する

と絶食群で生合成および代謝の亢進が著しくなり、とくに橋・延髄では絶食群拘束1時間にセロトニン量の有意増加を認めた。橋・延髄はセロトニンニューロンの多くが集まる縫線核の存在する部位で、とくに知られている。拘束がこれらのセロトニンニューロンを刺激し、その結果橋・延髄のトリプトファンのみならず、セロトニン、5-HIAAの有意増加をもたらしたと考えられる。

アルコール摂取の影響については、摂食群とアルコール摂取群を比較すると、生後2ヵ月ラットでは摂食群で生合成の軽度亢進、代謝亢進が脳の2部位で認められたのに対し、アルコール摂取群では生合成の軽度亢進は同様にみられたが、代謝亢進はいずれの部位でも認められなかった。これは無拘束の状態に近いといえるが、ただこのとき血清遊離トリプトファンの減少があり、このため脳内への供給不足の傾向があった。生後1年ラットでは生合成および代謝に関して摂食群もアルコール摂取群とほぼ同様の状態であった。このことより、若年ラットでは栄養状態を正常に保ちながらアルコールを摂取させると、拘束の影響が最小限にとどまることが示唆された。これは Livezey ら³⁰⁾が拘束時の血中カテコールアミンの変化がアルコール投与によって軽減されることをみた報告と矛盾しない結果であり、脳内セロトニン生合成代謝の観点からも、アルコールがストレス軽減作用を示すと考えられた。

結 論

全身拘束による脳内セロトニン生合成および代謝の経時変化に加齢、絶食またアルコール摂取の生体条件がどのような影響を及ぼすかを、脳内トリプトファン、セロトニン、5-HIAA濃度、血清 NEFA、総トリプトファンおよび遊離トリプトファン濃度を測定することによって検討し、以下の結果と結論を得た。

1. 無拘束下、生後1年ラット48時間絶食群では摂食群と比較し、血清 NEFA と血清遊離トリプトファンの増加が認められた。また、拘束によって血清 NEFA と血清遊離トリプトファンが増加し、解放後拘束前値にもどる傾向がみられた。このことより、絶食のみならず拘束によっても血清 NEFA が血清遊離トリプトファン増減に影響を及ぼす可能性が強い。
2. 48時間絶食群では、血清遊離トリプトファンの減少が生後2ヵ月ラットでは拘束よりの解放後1時間から認められ、生後1年ラットでは解放後2時間で認められた。また、生後2ヵ月ラットではアルコール摂取群でも解放後に血清遊離トリプトファンの減少が認められたが、生後1年ラットでは認められなかった。このことにより生後1年より生後2ヵ月ほど、また絶食により栄養摂取が不足するほどセロトニン生合成への抑制効果が現れることを示唆する。
3. 拘束により脳内トリプトファンおよび5-HIAA量の増加が認められた。この増加は摂食群と比較し48時間絶食群で、また生後2ヵ月と比較し生後1年ラットでとくに顕著であった。
4. 生後2ヵ月ラットアルコール摂取群では、拘束下でも脳内5-HIAAの増加が認められず、セロトニンニューロンの活性はほぼ無拘束状態の活性に近いことを示唆する。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師橋本和夫教授に深謝致します。また御指導と御助言をいただいた谷井秀治助教授、羽

保健所長林 正男博士、御協力をいただいた出村千恵子氏および金沢大学医学部衛生学教室の皆様へ感謝致します。尚、本論文の一部は、ICOH-WHO-ILO 第4回国際神経・精神・行動学会議(東京)において発表した。

文 献

- 1) 田中正敏: ストレス—そのとき脳は。第1版, 82-124頁 講談社, 東京, 1987.
- 2) Vogel, W. H. & Jensch, R.: Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosci. Lett.*, **87**, 183-188 (1988).
- 3) De Souza, E. B. & Van Loon, G. R.: Stress-induced inhibition of the plasma corticosterone response to a subsequent stress in rats: a nonadrenocorticotropin-mediated mechanism. *Endocrinology*, **110**, 23-33 (1982).
- 4) Van Loon, G. R. & De Souza, E. B.: Effect of β -endorphin on brain serotonin metabolism. *Life Sci.*, **23**, 971-978 (1978).
- 5) Pei, Q., Zetterström, T. & Fillenz, M.: Tail pinch-induced changes in the turnover and release of dopamine and 5-hydroxytryptamine in different brain regions of the rat. *Neuroscience*, **35**, 133-138 (1990).
- 6) De Souza, E. B. & Van Loon, G. R.: Brain serotonin and catecholamine responses to repeated stress in rats. *Brain Res.*, **367**, 77-86 (1986).
- 7) Adell, A., Garcia-Marquez, C. & Armario, A.: Chronic stress increases serotonin and noradrenaline in rat brain and sensitizes their responses to a further acute stress. *J. Neurochem.*, **50**, 1678-1681 (1988).
- 8) Kennet, G. A., Dickinson, S. L. & Curzon, G.: Enhancement of some 5-HT-dependent behavioural responses following repeated immobilization in rats. *Brain Res.*, **330**, 253-263 (1985).
- 9) Glowinski, J. & Iversen, L. L.: Regional studies of catecholamines in the rat brain-I. The disposition of [3 H]-dopamine and [3 H]-dopa in various regions of the brain. *J. Neurochem.*, **13**, 655-669 (1966).
- 10) Tanii, H., Hayashi, M. & Hashimoto, K.: Alterations in the metabolism of serotonin and dopamine in the central nervous system of mice displaying a persistent dyskinesia due to crotononitrile or 2-pentenenitrile. *Arch. Toxicol.*, **64**, 231-236 (1990).
- 11) Rocchi, E., Farina, F. & Silingardi, M.: High-performance liquid chromatographic determination of total and free tryptophan in serum from control subjects and liver patients. *J. Chromatogr.*, **380**, 128-132 (1986).
- 12) Tagliamonte, A., Biggio, G. & Vargiu, L.: Free tryptophan in serum controls brain tryptophan level and serotonin synthesis. *Life Sci.*, **12**, Pt. II, 277-287 (1973).
- 13) Hernández R. J., Manjarréz, G. G. & Chagoya, G.: Newborn humans and rats malnourished in utero: free plasma L-tryptophan, neutral amino acids and brain serotonin synthesis. *Brain Res.*, **488**, 1-13 (1989).
- 14) Tanaka, M., Kohno, Y. & Nakagawa, R.: Time-related differences in noradrenaline turnover in rat brain regions by stress. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **16**, 315-319 (1982).
- 15) 田中正敏, 中川良一, 河野康子: ラット脳内各部位のノルアドレナリン代謝におよぼす拘束ストレスの影響. *精神薬療基金年報*, **11**, 103-113 (1979).
- 16) Eugene, L. B., Janie, A. & Janet, Z.: Metabolism of norepinephrine, serotonin and dopamine in rat with stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **164**, 122-134 (1968).
- 17) Kiss, A., Culman, J. & Kvetnansky, R.: Distribution of catecholamines and serotonin in 17 portions of rat ventromedial nucleus and effect of acute immobilization stress. *Endocrinol. Exp.*, **15**, 219-228 (1981).
- 18) Roth, K. A., Mefford, I. M. & Barchas, J. D.: Epinephrine, norepinephrine, dopamine and serotonin: differential effects of acute and chronic stress on regional brain amines. *Brain Res.*, **239**, 417-424 (1982).
- 19) 穴戸計一: マイクロ波全身照射のラット脳内アミン代謝への影響に関する研究. *十全医会誌*, **98**, 290-301 (1989).
- 20) Kennett, G. A. & Joseph, M. H.: The functional importance of increased brain tryptophan in the serotonergic response to restraint stress. *Neuropharmacology*, **20**, 39-43 (1981).
- 21) Mueller, G. P., Twohy, C. P. & Chen, H. T.: Effects of L-Tryptophan and restraint stress on hypothalamic and brain serotonin turnover, and pituitary TSH and prolactin release in rats. *Life Sci.*, **18**, 715-724 (1976).
- 22) Dunn, A. J.: Changes in plasma and brain tryptophan and brain serotonin and 5-hydroxyindoleacetic acid after footshock stress. *Life Sci.*, **42**, 1847-1853 (1988).
- 23) 田中正敏, 井田能成, 津田 彰: 脳内ノルアドレナリンとストレス. *臨床精神医学*, **15**, 1459-1473 (1986).
- 24) 栗山欣弥, 大熊誠太郎: 神経伝達物質, 第1版, 85-103頁 中外医学社, 東京, 1986.
- 25) McMenamy, R. H. & Oncley, J. L.: The specific binding of L-tryptophan to serum albumin. *J. Biol. Chem.*, **233**, 1436-1447 (1958).
- 26) Fernstrom, J. D. & Wurtman, R. J.: Brain serotonin content: Physiological dependence on plasma tryptophan levels. *Science*, **173**, 149-152 (1971).
- 27) Fernstrom, J. D. & Wurtman, R. J.: Brain serotonin content: Physiological regulation by plasma neutral amino acids. *Science*, **178**, 414-416 (1972).
- 28) Moja, E. A., Cipolla, P. & Castoldi, D.: Dose-response in plasma tryptophan and in brain tryptophan and serotonin after tryptophan-free amino acid mixtures. *Life Sci.*, **44**, 971-976 (1989).
- 29) Knott, P. J. & Curzon, G.: Free tryptophan in plasma and brain tryptophan metabolism. *Nature*, **239**, 452-453 (1972).
- 30) Wurtman, R. J.: Circulating nutrients and neurotransmitter synthesis. *J. Appl. Nutr.*, **39**, 7-28 (1987).
- 31) Gessa, G. L., Biggio, G. & Fadda, F.: Effect of the oral administration of tryptophan-free amino acid mixtures on

serum tryptophan, brain tryptophan and serotonin metabolism. *J. Neurochem.*, **22**, 869-870 (1974).

32) Ikeda, M. & Nagatu, T.: Effects of short-term swimming stress and diazepam on 3, 4-DOPAC and 5-HIAA levels in the caudate nucleus: an in vivo voltametric study. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **331**, 23-26 (1985).

33) Knott, P. J., Joseph, M. H. & Curzon, G.: Effect of food deprivation and immobilization on tryptophan and other amino acids in rat brain. *J. Neurochem.*, **20**, 249-251 (1973).

34) Eccleston, D., Ashcroft, G. W. & Crawford, T. B.: 5-hydroxyindole metabolism in rat. A study of intermedi-

ate metabolism in rat using the technique of tryptophan loading. *J. Neurochem.*, **12**, 493-503 (1965).

35) Hamon, M., Bourgoin, S. & Artaud, F.: The respective roles of tryptophan uptake and tryptophan hydroxylase in the regulation of serotonin synthesis in the central nervous system. *J. Physiol.*, **77**, 269-279 (1981).

36) Livezey, G. T., Balabkins, N. & Vogel, W. H.: The effect of ethanol (Alcohol) and stress on plasma catecholamine levels in individual female and male rats. *Neuropsychobiology*, **17**, 193-198 (1987).

Effects of Fasting, Aging and Alcohol Drinking on Restraint-Induced Changes on Synthesis and Metabolism of Serotonin in Rat Brain Masaru Horiguchi, Department of Hygiene, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med Soc., **101**, 385 - 394 (1992)

Key words serotonin synthesis and metabolism, free tryptophan, NEFA, body conditions, restraint stress

Abstract

The effects of aging, fasting or drinking alcohol on 5-hydroxytryptamine (5HT) synthesis and metabolism in the brain was studied in rats undergoing restraint stress. A total of 150 2-month old and 1-year old male Wistar rats were divided into three groups; the first group were fed, the second fasted for 48 hr, and the third drank alcohol. All these groups underwent restraint stress for 1 or 2 hr. The 2 hr stress induced an increase of the brain tryptophan concentration only in the hypothalamus of the fed 2-month old rats, and only in the midbrain of the drunk rats, but in the fasted rats the stress produced an increase in all six brain regions examined. In all the fed, fasted and alcohol-fed 1-year old rats, an increase of the brain tryptophan concentration was seen after the restraint stress, the increase being higher in the fasted rats than in the fed and drunk rats in all the six brain regions. There were no changes of the 5HT concentration in any of the regions of the fasted 1-year old rats undergoing 1hr restraint stress. The stress induced an increase of the brain 5HIAA in the cerebral cortex and striatum in the fed 2-month old rats, all of the six regions in drunk 2-month old rats. In both the fed and fasted groups of 1-year old rats, an increase in the brain 5HIAA was noted in the striatum and pons-medulla oblongata, but in the drunk 1-year old rats this was noted in the cerebral cortex, striatum and pons-medulla oblongata. The brain tryptophan concentration has a relation to a serum free tryptophan concentration. Serum NEFA concentration in rats showed a significant increase not only after starvation but also under restraint stress. This implies that the serum NEFA concentration is also related to a serum free tryptophan concentration. In 5-HT neurons which mainly existed in the raphe nucleus of the pons-medulla oblongata and midbrain, activation of 5HT synthesis and metabolism was induced under restraint stress, the activation being seen more distinctly in the fasted rats. The activation of 5HT metabolism was recognized in the drunk 1-year old rats as well as in the fed rats. In the drunk 2-month old rats, however, the activation was seen in none of six brain regions. Under the restraint stress, a difference in the function of the 5HT neurons was noted between young and old inebriated rats.